



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO
PROGRAMA DE CIÊNCIAS NATURAIS
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

SAVIO ANGLESON MARQUES DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA COLETA PASSIVA DE DNA AMBIENTAL EM UMA ÁREA DE
VÁRZEA DO RIO AMAZONAS**

SANTARÉM-PA

2025

SAVIO ANGLESON MARQUES DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA COLETA PASSIVA DE DNA AMBIENTAL EM UMA ÁREA DE
VÁRZEA DO RIO AMAZONAS**

Trabalho de conclusão de curso
Apresentado ao Programa de
Ciências de Naturais, para obtenção do
grau de Licenciado em Ciências
Biológicas, pela Universidade Federal
do Oeste do Pará.

Orientador: Gabriel Iketani Coelho

SANTARÉM-PA

2025

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas (SIBI) da UFOPA
Catalogação de Publicação na
Fonte. UFOPA - Biblioteca Unidade Rondon

Silva, Savio Angleson Marques da.

Avaliação da coleta passiva de DNA ambiental em uma área de várzea do Rio Amazonas / Savio Angleson Marques da Silva. - Santarém, 2025.

32p.: il.

Universidade Federal do Oeste do Pará, Instituto de Ciências da Educação, Programa de Ciências Naturais.

Orientador: Gabriel Iketani Coelho.

1. Amostragem de DNA ambiental. 2. Gaze. 3. Metabarcodificação. I. Coelho, Gabriel Iketani. II. Título.

UFOPARondon

CDD 575

Elaborado por RENATA DE MAGALHAES FERREIRA - CRB-1440/2



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
PROGRAMA DE CIÊNCIAS NATURAIS
COMISSÃO ORGANIZADORA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO (TCC)

Ata de Defesa Pública do Trabalho de Conclusão de Curso – TCC

No dia 26 de fevereiro de 2025, às 14h e 30 min., a Banca constituída pelos membros abaixo relacionados, reuniram-se no Laboratório de Ensino de Biologia 1 no campus Rondon, para avaliar o TCC Intitulado: "Avaliação da Coleta Passiva de DNA ambiental em uma Área de Várzea do Rio Amazonas" do aluno Savio Angleson Marques da Silva. Aberta a sessão pelo presidente (orientador), coube ao acadêmico, na forma regimental, expor o tema do TCC. Ao final da apresentação, dentro do tempo regulamentar, o discente foi questionado pelos membros da Banca Examinadora e, em seguida, deu as explicações que se faziam necessárias. As notas atribuídas pela Banca Examinadora são as que seguem:

Orientador: Prof. Dr. Gabriel Iketani Coelho	
Nome	Notas
Membro 1: Dr. Alfredo Pedroso dos Santos Júnior	8,9
Membro 2: Dra. Talita Fernanda Augusto Ribas	9,8
	Média Final 9,35

Observações da Banca Examinadora:

Dr. Gabriel Iketani Coelho (Orientador)

Dr. Alfredo Pedroso dos Santos Júnior (Membro 1)

Dra. Talita Fernanda Augusto Ribas (Membro 2)

Santarém, 26 de fevereiro de 2025.

*Dedico este trabalho principalmente a minha mãe, que sempre me deu apoio,
carinho e incentivo*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe, Maria do Carmo Barrozo, que apesar das dificuldades, sempre esteve me apoiando e motivando a seguir com os estudos e nunca deixou de acreditar em meu potencial, pois passei por uma fase da minha vida que eu mesmo já não acreditava que teria oportunidade de ingressar em uma universidade e concluir meu ensino superior, enquanto ela sempre teve fé e jamais deixou de dar incentivo pra que isso acontecesse.

Agradeço também a minha irmã, Leide Daiana Marques da Silva e meu cunhado Luiz Carlos Laurindo Junior que me acolheram em sua residência pelo tempo que precisei quando me desloquei de minha cidade para Santarém. Obrigado pelas mensalidades do cursinho pré-vestibular e por tudo que fizeram por mim. Estas duas pessoas maravilhosas não mediram esforços pra me fazer acreditar que seria possível chegar até aqui. Vocês foram a minha fonte inesgotável de inspiração e posso dizer que sem o apoio que me deram, certamente não teria nem iniciado essa trajetória acadêmica. Obrigado!

Agradeço ao meu orientador Gabriel Iketani Coelho pela paciência, generosidade, profissionalismo e por ter me adotado como “filho científico”, sendo meu guia na iniciação científica onde tive experiências e aprendizados incríveis e enriquecedores para a minha formação profissional.

Agradeço também a todos os professores que me transmitiram conhecimento ao longo de minha jornada acadêmica.

Agradeço a todos os colegas do LEDEVO pelo carisma e companheirismo de cada um, em especial a Eliziane que não mediu esforços pra me ajudar nas coletas de campo, a Isadora que me ensinou fazer extração de DNA e Aline que me ensinou fazer PCR. É muito bonito de ver como o conhecimento é construído, compartilhado e transmitido entre a equipe LEDEVO!

Agradeço a minha namorada e melhor amiga, Maria Klicia, pelo afeto e disposição em estar ao meu lado em todos os momentos.

Agradeço também a toda minha turma Biologia 2020, pelo companheirismo de cada um, em especial a meu amigo Filipe que sempre foi meu parceiro pra fazer trabalho em dupla ou equipe, pois nossa forma de trabalhar combinou muito.

“Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente, mas sim o que melhor se adapta às mudanças.”

Charles Darwin

RESUMO

Ha pouco mais de uma década o uso do DNA ambiental tem tomado destaque em pesquisas de análise da biodiversidade de ecossistemas aquáticos. Contudo, essa ferramenta ainda apresenta desafios metodológicos e logísticos principalmente na etapa de coleta e filtragem de grandes volumes de água. Assim, o presente trabalho investiga eficácia da coleta passiva utilizando a gaze como material de amostragem. Neste estudo foi utilizada uma estrutura de baixo custo feita a partir de materiais recicláveis que serviu de suporte para a realização da coleta passiva com gazes inseridas em sondas. Objetivou-se avaliar a capacidade da gaze em capturar DNA ambiental em diferentes tempos de submersão (5 minutos, 30 minutos, 4 horas e 12 horas) horas. As amostras foram coletadas em uma área de várzea às margens do Rio Amazonas. Após todo o processo de curadoria foram obtidas 1.979.936 *reads*, que após o controle de qualidade e remoção das sequências apresentadas no controle negativo resultou em 1.655.863 *reads* distribuídas entre as amostras de gaze e filtro. Identificou-se 348 unidades taxonômicas a nível de gênero (similaridade $\geq 95\%$) e 89 a nível de espécie (similaridade $\geq 98\%$), que se distribuíram em ambos os materiais de coleta. O trabalho concluiu que a coleta passiva com gaze possui eficiência semelhante a coleta ativa que envolve a filtragem, e que o tempo de 5 minutos é suficiente para a realização da coleta passiva, sugerindo assim, que essa técnica é uma alternativa viável para a coleta de eDNA oferecendo melhor logística, reduzindo o esforço físico e financeiro na etapa de coleta.

Palavras-chave: Amostragem de DNA ambiental; Gaze; Metabarcodificação.

ABSTRACT

For just over a decade, the use of environmental DNA has been gaining prominence in research analyzing the biodiversity of aquatic ecosystems. However, this tool still presents methodological and logistical challenges, especially at the stage of collecting and filtering large volumes of water. This study investigates the effectiveness of passive collection using gauze as a sampling material. This study used a low-cost structure made from recyclable materials to support passive collection with gauze inserted into probes. The aim was to assess the ability of gauze to capture environmental DNA at different submergence times (5 minutes, 30 minutes, 4 hours and 12 hours). The samples were collected in a floodplain area on the banks of the Amazon River. After the entire curation process, 1,979,936 reads were obtained, which after quality control and removal of the sequences presented in the negative control resulted in 1,655,863 reads distributed between the gauze and filter samples. 348 taxonomic units were identified at genus level (similarity $\geq 95\%$) and 89 at species level (similarity $\geq 98\%$), which were distributed in both collection materials. The study concluded that passive collection with gauze has similar efficiency to traditional filtering, and that a time of 5 minutes is sufficient for passive collection, thus suggesting that this technique is a viable alternative for eDNA collection, offering better logistics and reducing physical and financial effort at the collection stage.

Keywords: Environmental DNA sampling; Gauze; Metabarcoding

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01: Mapa de localização da área de estudo – território Maria Valentina, município de Santarém, PA.....	16
Figura 02: Sonda equipada com gaze para coleta.....	16
Figura 03: Estrutura feita para as sondas ficarem presas.....	17
Figura 04: Diagrama Venn com quantidades de organismos identificados por método de coleta.....	21
Gráfico 1: Representação dos organismos identificados a nível de gênero (gráfico A) e espécie (gráfico B) com abundância relativa maior que 5% do total das identificações.....	23
Gráfico 2: Curva de rarefação.....	24
Gráfico 3: Diversidade alfa por tempo de coleta.....	24
Gráfico 4: Diversidade alfa por material de coleta.....	25
Gráfico 5: (A) diversidade beta por tempo de coleta. (B) diversidade beta por material de coleta.....	25

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Sumário de qualidade do DNA e das sequências obtidas.....	20
---	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	DNA ambiental	12
1.2	Coleta ativa de eDNA aquático	13
1.3	Coleta passiva de eDNA	13
2	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivo geral:	16
2.2	Específicos:	16
3	METODOLOGIA	16
3.1	Local de coleta	16
3.2	Procedimentos laboratoriais	19
3.3	Análise dos dados	20
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1	Dados pós sequenciamento	21
4.2	Abundância taxonômica relativa	23
4.3	Diversidade alfa	25
5	CONCLUSÃO	28
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

1 INTRODUÇÃO

Os métodos tradicionais de monitoramento da diversidade envolvem uma logística complexa, que exige observação direta, captura, identificação e catalogação das diferentes espécies presentes no ambiente. Esse processo torna a metodologia trabalhosa e limitada por conhecimentos morfotaxonômicos (Blaxter, 2004). Löbl *et al.*, (2023), destacam que o declínio no financiamento e no treinamento em taxonomia coloca em risco a capacidade de monitorar a biodiversidade de forma adequada. Esse cenário representa mais um obstáculo para os métodos tradicionais de monitoramento, uma vez que eles dependem de taxonomistas capacitados para diferenciar e identificar as milhares de espécies existentes.

Nesse contexto, o DNA ambiental (eDNA) surge como uma ferramenta inovadora, consistindo na detecção de fragmentos genéticos liberados por organismos no ambiente por meio de muco, fezes, urina, liberação de células mortas e excreções diversas. Essa técnica permite a identificação de espécies presentes no local sem a necessidade de observação direta, com o potencial de tornar as avaliações da biodiversidade e da composição da comunidade mais eficientes, contribuindo significativamente para o monitoramento e a pesquisa da biodiversidade (Thomsen; Willerslev, 2015).

1.1 DNA ambiental

O eDNA é um método de estudo amplamente aplicado para análise e monitoramento da macrofauna aquática, podendo ser empregado em estudos de qualquer tipo de ambiente sem causar prejuízos ao habitat em estudo ou às espécies presentes no local (Sahu *et al.*, 2023). Conhecida desde o início dos anos 2000, a técnica de eDNA metabarcoding passou a se destacar como uma ferramenta de análise de espécies aquáticas em 2008, quando foi utilizada para detectar uma espécie invasora de rã (*Ficetola et al.*, 2008). Desde então, tem se mostrado uma ferramenta de destaque, apresentando vantagens em relação aos métodos tradicionais de monitoramento (Banerjee *et al.*, 2022).

O eDNA possui alta capacidade de difusão no meio ambiente, o que permite detectar organismos presentes mesmo que estejam distantes do local de coleta (Rees *et al.*, 2014). Além disso, essa técnica possibilita a detecção de espécies

independentemente da fase de vida em que se encontram, como ovo, larva, entre outras, tornando o inventário faunístico do ambiente em estudo ainda mais preciso (LU SHU *et al.*, 2020). Outra vantagem é que o método dispensa a necessidade de procedimentos invasivos durante a etapa de obtenção de amostras (Stat *et al.*, 2019). Para a efetivação dessa análise, é necessária apenas uma pequena amostra coletada no local, que pode ser de solo, água, sedimento, entre outros (Thomsen & Willerslev, 2015).

1.2 Coleta ativa de eDNA aquático

Apesar da maior facilidade na obtenção de resultados oferecida pelo eDNA na análise da biodiversidade de ecossistemas aquáticos, ainda existem desafios relacionados aos procedimentos metodológicos, especialmente na etapa de filtragem do material coletado (Kirtane; Atkinson; Sassoubre, 2020). Para obter o eDNA por meio da coleta de água são necessários equipamentos especializados (bombas a vácuo, filtros, frascos esterilizados), enfrenta-se dificuldades no transporte e armazenamento de grandes quantidades de água e o eDNA coletado é passível de degradação durante o transporte (Bessey *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2022). A coleta ativa também aumenta o potencial de contaminação cruzada devido à quantidade de materiais utilizados e às etapas envolvidas até a obtenção final dos filtros com o eDNA pronto para extração (Minamoto *et al.*, 2016).

As águas do Rio Amazonas são caracterizadas por sua coloração branca e aspecto barrento, decorrentes da presença de grande quantidade de partículas em suspensão, principalmente material argiloso, que se deposita ao longo das planícies inundáveis (Almeida; Amaral; Silva, 2004). Essa característica torna o processo de filtração ainda mais limitado, devido ao entupimento frequente dos filtros, que possuem porosidade em escala nanométrica, variando em média de 0,45 a 0,7 μm , dependendo do material da membrana (Tsuji *et al.*, 2019). Considerando que a etapa de coleta é a fase mais complexa em trabalhos com eDNA aquático, o desenvolvimento de uma metodologia eficaz de coleta passiva pode ser uma alternativa para minimizar os problemas nessa etapa, que é crucial para a obtenção de bons resultados nas fases laboratoriais subsequentes (Verdier *et al.*, 2022).

1.3 Coleta passiva de eDNA

A coleta passiva de eDNA pode ser realizada utilizando uma sonda carregada com materiais de captura (no caso deste trabalho, a gaze), podendo ser feita em um ponto fixo ou por meio de arrasto. Após a coleta, o material já estará pronto para extração. Diferentemente do método de filtração, no qual a coleta de água ocorre em um momento específico, sem capturar a entrada contínua de água que passa pelo local (Zhang *et al.*, 2024), a coleta passiva permite capturar uma maior quantidade de eDNA, pois fica exposta por mais tempo à passagem de água, aumentando a eficiência na detecção de espécies. Além disso, oferece uma logística menos complexa (Yan *et al.*, 2024), reduz o tempo de obtenção das amostras, diminui o uso de insumos e minimiza custos e riscos de contaminação durante a coleta (Jeunen *et al.*, 2024; Maiello *et al.*, 2022).

Por apresentar uma logística mais simples, mesmo em locais remotos, a coleta passiva permite obter um maior número de amostras (N amostral) em diferentes pontos do local de estudo, mantendo um menor risco de contaminação e aumentando a capacidade de recuperação da diversidade de organismos presentes (Van der heyde *et al.*, 2023). Esse método não requer equipamentos sofisticados, como bombas peristálticas ou sistemas a vácuo, tornando-o mais viável para aplicação em locais remotos e de difícil acesso (Bessey *et al.*, 2022). Estudos que visam melhorar a logística na obtenção de amostras de eDNA são importantes, pois, à medida que se desenvolvem trabalhos voltados ao seu aperfeiçoamento, os procedimentos envolvidos na aplicação dessa técnica tendem a evoluir e se tornar cada vez mais aprimorados (Deiner *et al.*, 2017).

Alguns trabalhos já têm buscado avaliar métodos de coleta passiva de eDNA. Kirtane *et al.* (2020), avaliaram a coleta passiva utilizando carvão ativado granular (GAC) e argila montmorilonita (MC) como adsorventes para captura de eDNA, comparando a eficácia desses materiais com diferentes protocolos de extração. Os resultados mostraram que o carvão granulado, utilizado em sachês, apresentou desempenho superior ao da argila montmorilonita, capturando a mesma quantidade de eDNA de peixes em comparação ao método de filtração com 1 litro de água. Valdir *et al.* (2021) testaram a coleta passiva utilizando amostradores de hidroxiapatita (HAp) impressos em 3D, demonstrando que o método foi eficiente e obteve resultados semelhantes aos dos métodos convencionais de filtração. Bessey *et al.* (2021), avaliaram a coleta passiva com membranas de nylon carregadas

positivamente e de éster de celulose não carregadas, concluindo que a coleta passiva permitiu uma detecção abrangente das espécies de peixes, com eficácia equivalente à dos métodos tradicionais, sendo as membranas de éster as que apresentaram melhores resultados. Zarcero *et al.*, (2024) desenvolveram um novo dispositivo de amostragem passiva, denominado POMPOM, composto basicamente por malha de poliamida, projetado para facilitar a logística em ambientes de difícil acesso. Os resultados demonstraram que a coleta passiva com POMPOMs foi capaz de capturar uma diversidade de organismos semelhante à obtida pelo método de filtragem.

Apesar da existência de trabalhos voltados à avaliação da eficácia da coleta passiva, poucos estudos investigaram o tempo necessário de submersão do amostrador para a recuperação eficiente da diversidade de espécies. Bessey *et al.* (2021), avaliaram tempos de 4h, 8h, 12h e 24h, concluindo que o aumento no tempo de submersão não resultou em maior riqueza de espécies detectadas. Bessey *et al.* (2022) testaram a coleta passiva com tempos variando entre 5 e 1080 minutos, observando que, para a maioria dos materiais testados (celulose, celulose com 1% e 3% de quitosana, celulose sobreposta com nanofibras eletrofiadas e 1% de quitosana, fibras de algodão, fibras de cânhamo e esponja com zeólita ou carbono ativo), 5 minutos foram suficientes para recuperar a mesma riqueza de espécies obtida pela coleta ativa. Apesar dos avanços, ainda são necessários estudos que avaliem novos materiais para a coleta passiva, visando simplificar a logística, reduzir o esforço físico e tornar o método financeiramente mais viável.

Diante disso, este trabalho concentra-se em avaliar a coleta passiva de eDNA com foco em peixes, utilizando a gaze como amostrador em diferentes tempos de submersão, comparando-a com a coleta ativa. Parte-se da hipótese de que a coleta passiva pode ser uma alternativa ao método de filtragem, garantindo menor esforço humano, custos reduzidos e menores riscos de contaminação, ao mesmo tempo em que mantém a eficiência na coleta.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

- Avaliar a coleta passiva de DNA ambiental com gaze analisando sua eficácia em diferentes tempos de submersão.

2.2 Específicos:

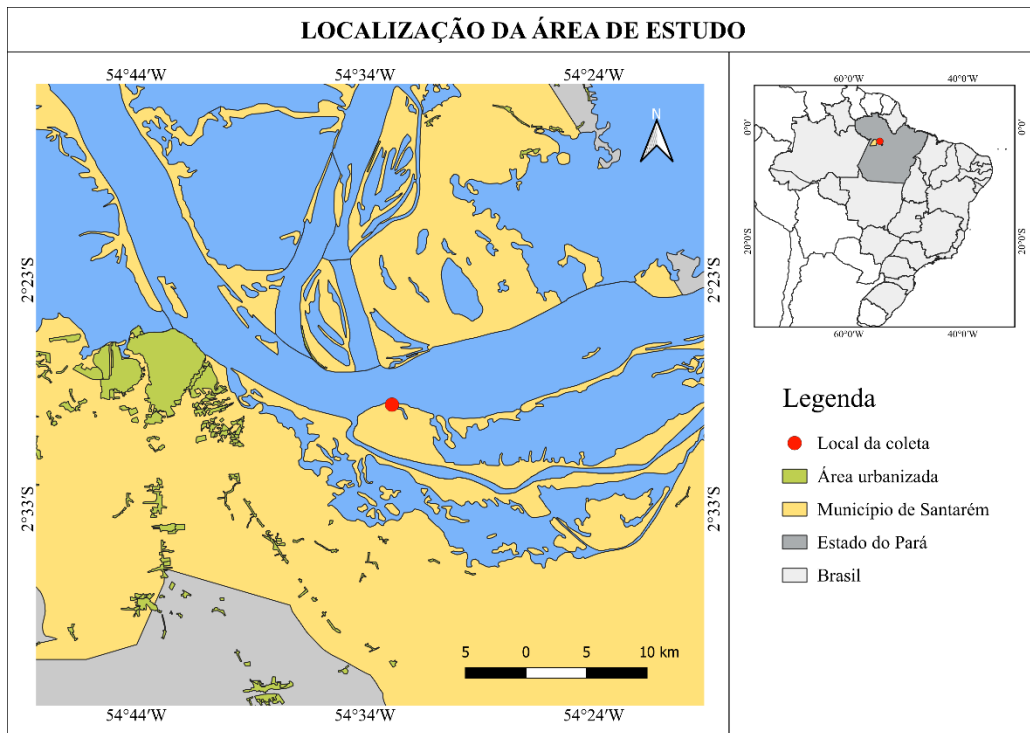
- Desenvolver uma metodologia de coleta passiva com gaze para a captura de DNA ambiental de peixes, em rios de turbidez elevada.
- Comparar a biodiversidade identificada através da gaze com a observada pela coleta passiva.
- Comparar a diversidade de vertebrados (peixes) detectados entre as coletas ativa e passiva.

3 METODOLOGIA

3.1 Local de coleta

A coleta foi realizada em uma área de várzea situada nas proximidades do canal do rio Ituqui, no território Maria Valentina (2°28'20.0"S 54°32'58.9"W), que fica à margem do rio Amazonas, no município de Santarém, Pará, Brasil (figura 1).

Figura 1: Mapa de localização da área de estudo. A área cinza escura representa a área urbana de Santarém-PA e o círculo indica o local da coleta no território Maria Valentina.



Fonte: Autor 2024

As coletas foram realizadas no mês de junho de 2024 que compreende o período da cheia. Foram utilizadas estantes de tubos de laboratório como sondas onde as gazes ficaram presas. Essas estantes proporcionam maior praticidade para abrir e fechar, além de possuírem suas próprias travas de segurança e seu formato retangular permitir que as gazes não se sobreponham uma sobre as outras aumentando a área de contato entre cada uma com a água. As gazes foram presas à sonda com linhas de nylon (figura 2).

Figura 2 – Sonda equipada com gaze para coleta

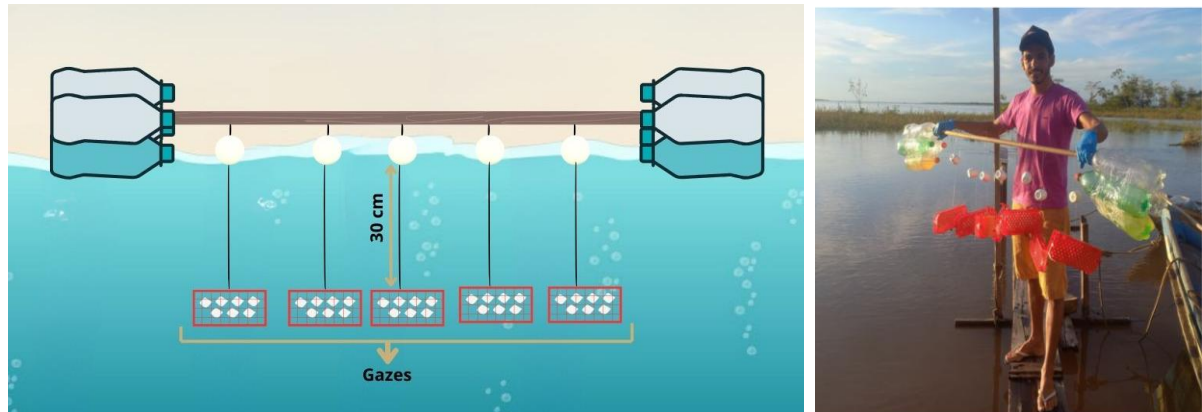


Fonte: Autor 2024

Um dia antes da coleta, os seguintes materiais foram esterilizados em laboratório: tesouras, garrafas plásticas de 1 L, linhas de nylon, estantes e chumbadas. Além disso, foram separados outros materiais, como isopor com gelo fabricado no laboratório, sílica, luvas e tubos Falcon de 50 mL. A esterilização dos materiais foi realizada com detergente diluído a 5% em água destilada e água sanitária a 10%. Em cada sonda, foram inseridas oito gazes para garantir que, em caso de perda por contaminação ou outros motivos, houvesse gaze de reserva. As gazes foram submersas por 5 minutos, 30 minutos, 4 horas e 12 horas. Foram realizadas duas rodadas de coleta com os mesmos tempos de submersão, sendo uma durante o dia das 06h00 às 18h00 e outra durante a noite das 18h00 às 06h00 totalizando um período de 24 horas de coleta. Foi coletado um litro de água às 06h00 da manhã e outro às 12h00 para a realização da filtragem e comparação com a coleta passiva.

Uma estrutura flutuante foi construída para que as sondas ficassem presas. Para construir a estrutura, foram necessárias 8 garrafas pet de 2 litros e uma haste de madeira. Quatro garrafas presas juntas com fita adesiva transformando-as em uma única boia, dessa forma, foram feitas duas boias e a haste de madeira se conectou de uma à outra (figura 3). Para garantir que as sondas ficassem na mesma altura em relação à superfície da água, em cada sonda foi presa uma chumbada para puxar em direção ao fundo e uma boia de isopor que ficou presa a sonda por uma linha de nylon distanciando a sonda da boia em 30 cm.

Figura 3 - Estrutura feita para as sondas ficarem presas.



Fonte: Autor, 2024.

Após cada tempo de submersão, as gazes foram retiradas da água e guardadas em tubos Falcon contendo sílica que foram armazenadas em gelo até chegar ao laboratório de educação e evolução Professor Horácio Schneider (LEDEVO), onde foram armazenadas no freezer a -20°C até serem feitas as etapas seguintes. As gazes usadas foram acondicionadas em envelopes de papel alumínio. A água coletada foi filtrada, e os filtros foram guardados da mesma forma que as gazes. Para cada litro de água coletado, foram feitas três réplicas durante a filtração, resultando em três filtros por amostra.

3.2 Procedimentos laboratoriais

As extrações de DNA foram realizadas utilizando o kit Nucleospin soil. Os procedimentos foram realizados dentro de uma cabine exclusiva para procedimentos de extração. Antes de iniciar a extração, as partes internas da cabine eram esterilizadas com água sanitária 10%, água destilada, álcool 70% e por fim era submetida à luz UV por 15 minutos para garantir a eliminação de contaminantes. Para a extração, utilizou-se cerca de 0,50 gramas de cada gaze por amostra e o processo de extração seguiu o protocolo recomendado pelo fabricante. Para a extração dos filtros utilizou-se metade de cada filtro e o mesmo protocolo. A PCR foi feita utilizando o com primer V12s-U desenhado para amplificar a região 12S rRNA de vertebrados (Riaz *et al.*, 2011). Cada amostra foi amplificada em triplicata usando reações com volumes totais de $15\ \mu\text{L}$ por amostra onde 5 era de água destilada ultrapura, 7,5 de master mix, 0,25 μL de cada primer, e 2 μL de DNA. As PCR foram

amplificadas em um termociclador (minipcr bio®) com o seguinte programa: desnaturação inicial a 98°C por 180 segundos, seguida de 30 ciclos a 98°C com duração de 30 segundos, anelamento a 55 °C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, sendo a extensão final com duração de 600 segundos. As PCRs amplificadas foram purificadas usando o Illumina® Purification Beads. A análise da qualidade de cada amplificação foi feita utilizando eletroforese em gel de agarose. Para a montagem das bibliotecas, foi utilizado o kit Nextera XT Indexs. A quantificação tanto da extração quanto das PCRs foi realizada utilizando o kit Promega Quantifluor dsDNA System e o fluorímetro Quantus (Promega). O sequenciamento foi realizado no sequenciador i-Seq 100 da Illumina, regulado no modo paired-end 150pb, com procedimento padrão adicionando 10% de phyX ao *pool* das bibliotecas a 85 pM, para obtenção de arquivos em formato fastq.

3.3 Análise dos dados

Implementamos a pipeline “metapipe” (<https://github.com/marlaux/METAPIPE>) que inicia mediante a introdução do FastQC v 0.12 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) com o objetivo de analisar os parâmetros de qualidade do sequenciamento. As sequências forward (R1) e reverse (R2) foram alinhadas usando o PEAR 0.9.11 (Zhang *et al.*, 2014). Após isso, os primers foram eliminados e a qualidade das reads foi controlada com o auxílio do VSEARCH (Rognes *et al.*, 2016) e do Cutadapt (Martin, 2011). Nessa fase, reads com qualidade inferior a phred score 20, muito curtas (menos de 100 pb) e sem as sequências de primers foram eliminadas, especialmente quando apresentavam uma taxa de erro superior a 1%. Além disso, singletons, doubletons e tripletons também foram removidos. Na etapa seguinte, foi realizada a clusterização e a remoção de quimeras utilizando o Swarm v3 (Mahé *et al.*, 2021). A classificação taxonômica foi feita com base em um banco de dados de referência composto por sequências de vertebradas, obtidas em dezembro de 2024 do National Center for Biotechnology Information (NCBI). O presente trabalho adotou os limiares de similaridade de 95% a nível de gênero e 98% a nível de espécie (Wang *et al.*, 2023).

As análises estatísticas incluíram a avaliação da abundância relativa considerando apenas gêneros e espécies com abundância a partir de 5%. Foi construído diagrama de Venn através do site

<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>. Para as análises de diversidade, os dados foram rarefeitos e obtidas as estimativas Observadas, ACE e Chao1. A diversidade alfa foi comparada utilizando diferentes métricas: riqueza de espécies, índices de diversidade de Shannon e testadas para diferenças significativas (Wilcoxon rank-sum test) para determinar se há uma diferença significativa na diversidade entre os materiais (gaze e filtro) e tempos de submersão. Por fim, para visualizar a similaridade na composição de espécies entre matérias e tempo de coleta foi realizada a Análise de Escalonamento não-Métrico (*non-Metric Multidimensional Scaling* - nMDS) baseado no índice de Jaccard com a significância sendo avaliada através do teste de ANOSIM. Todas essas análises estatísticas e gráficos foram realizadas no R 4.4.2 (R CORE Team, 2024) usando os pacotes phyloseq, vegan, microbiotaprocess, ggplot2, tidyverse, tibble, tidyr, dplyr e RColorBrewer.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Dados pós sequenciamento

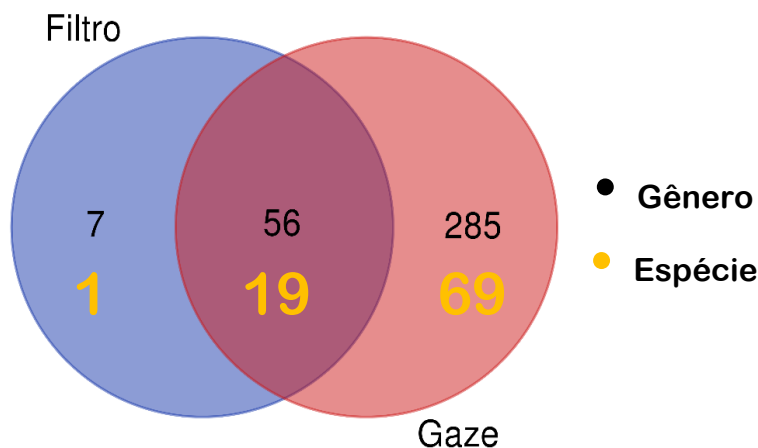
O sequenciamento gerou o total de 1.979.936 *reads*, que após o controle de qualidade e remoção das sequências apresentadas no controle negativo resultou em 1.655.863 *reads* distribuídas entre as amostras de gaze e filtro (tabela 1). Observou-se que o tempo de 5 minutos coletado no período noturno (N5) obteve maior quantidade de sequências superando os valores das amostras de água filtrada. Comparando os demais tempos de submersão observamos que a coleta passiva, no geral, teve quantidades de *reads* mais expressivas que a coleta ativa.

Quadro 1: Sumário de qualidade do DNA e das sequências obtidas

Amostras	Concentração do DNA (ng/ μ L)	Sequências filtradas	OTUs identificadas com $\geq 95\%$ ($\geq 98\%$)
T0	11	148595	36 (14)
T6	11	118081	37 (10)
D5	13	118669	141 (32)
D30	15	158747	83 (14)
D4H	10	140067	87 (22)
D12H	8,5	172675	89 (21)
N5	15	245834	83 (22)
N30	14	181093	43 (15)
N4H	7,6	183969	83 (22)
N12H	5,8	188133	29 (07)
Total		1.655.863	348 (89)

Fonte: Autor 2024

Foi feito um corte de confiança para identificar a quantidade de OTUs com similaridade $\geq 95\%$ a nível de gênero que resultou no total de 348 OTUs sendo 285 encontradas na gaze, 57 foram encontradas em ambos os materiais de coleta e 7 foram exclusivas de filtro (Figura 4). Realizou-se ainda um corte $\geq 98\%$ a nível de espécie que resultou em 89 OTUs sendo 69 exclusivas de gaze, 19 de ambos os materiais e uma exclusiva de filtro (Figura 4). Possivelmente, o motivo da gaze ter mostrado resultados mais expressivos se atribuiu pelo fato de a coleta passiva possuir maior N amostral.

Figura 4: Diagrama Venn com quantidades de organismos identificados por método de coleta.

4.2 Abundância taxonômica relativa

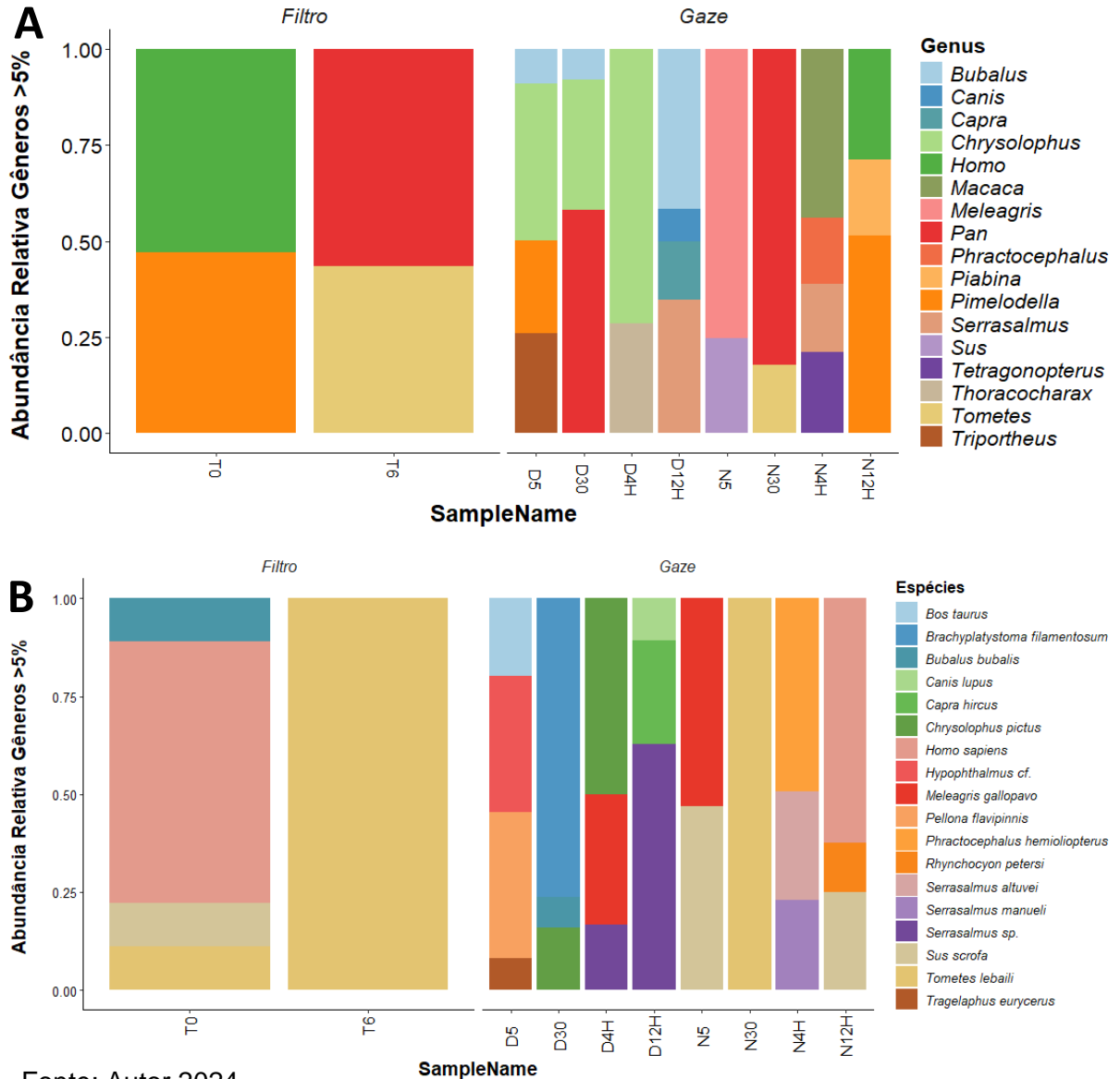
Dos 348 gêneros identificados com similaridade $\geq 95\%$, 17 apresentaram abundância relativa igual ou superior a 5% do total de gêneros, assim como dentre as 89 espécies identificadas com similaridade $\geq 98\%$, 18 apresentaram abundância igual ou maior que 5% (gráfico 2). Houve variação entre cada amostra, porém os resultados da abundância não ficam tão diferentes quando observamos a quantidade de gêneros obtidas por material. Observamos que a coleta com gaze teve capacidade de identificação taxonômica parecida com os filtros tendo variação de dois a quatro gêneros por material para a gaze e cada amostra de filtro identificou dois gêneros diferentes. Sobre o tempo de submersão, observou-se aqui que não houve diferenças na capacidade de detecção entre os tempos de 5 minutos e os mais longos. Este resultado se assemelha ao de outros trabalhos que também mostraram este tempo suficiente para a coleta passiva (Bessey *et al.*, 2022). Percebemos que houve diferença de gêneros detectados por tempo de submersão, o que pode ter ocorrido por alguns fatores como: quantidade de gaze usada para extração, taxa de degradação e renovação do eDNA que passa constantemente com o fluxo das correntezas no momento da coleta, ou mesmo, o processo de amplificação pode ter sido mais favorável para os organismos que mais apareceram em cada amostra. Esta análise de divergência de organismos por amostras se repete também a nível de espécie.

Das espécies de peixes encontradas, pelo menos quatro são representantes comercializados pelos próprios pescadores da região que são elas: Filhote ou Piraiba (*Brachyplatystoma filamentosum*), Mapará (*Hypophthalmus cf.*), Apapá ou Dourada (*Pelona flavipinis*), Pirarara (*Phractocephalus hemiliopterus*) e Pacu (*Tometes lebaili*). Foram identificadas também outras três espécies de piranha (*Serrasalmus altuvei*, *Serrasalmus manueli*, *Serrasalmus sp.*). Visto que o primer 12S pode também identificar outros vertebrados, foram identificados ainda quatro espécies de mamíferos amplamente presente na região: boi (*bos taurus*), búfalo (*Bubalus bubalis*), cabra (*Capra hircus*) e o porco (*Sus scrofa*). Estes animais fazem parte das criações dos moradores da região e estabelecem constante contato com

as águas do rio principalmente no período da cheia, período este que foram realizadas as coletas. Além disso, a identificação acusou a existência de três espécies de animais que não existem na região: Faisão-chinês (*Chrysolophus pictus*), Musaranho elefante (*Rhynchocyon petersi*) e o Bongo (*Tragelaphus eurycerus*).

De modo similar a muitos estudos, o presente trabalho adotou a estratégia de usar primers “universal” que amplifica uma pequena sequência do gene 12S. O uso de sequências curtas para identificação a nível intraespecífico é desafiador, principalmente sem a construção de um banco de sequências com curadoria que ateste que o marcador utilizado tenha variação suficiente para discriminação de espécies (Milan *et al.*, 2020; Carvalho e LEAL, 2023). Além disso, FRELLAND (2017) indica que o uso de apenas um marcador pode não ser capaz de fornecer variação genética suficiente para identificação de espécies de um grande grupo taxonômico como os vertebrados. Desse modo, as espécies que não ocorrem na região, mas que foram identificadas no presente estudo são, possivelmente, falsos positivos. Por fim, o presente trabalho mostra a necessidade da construção de um banco de sequência para os vertebrados da região com os dados sendo obtidos com a curadoria de taxonomistas experientes.

Gráfico 1: representação dos organismos identificados a nível de gênero (gráfico A) e espécie (gráfico B) com abundância relativa maior que 5% do total das identificações.

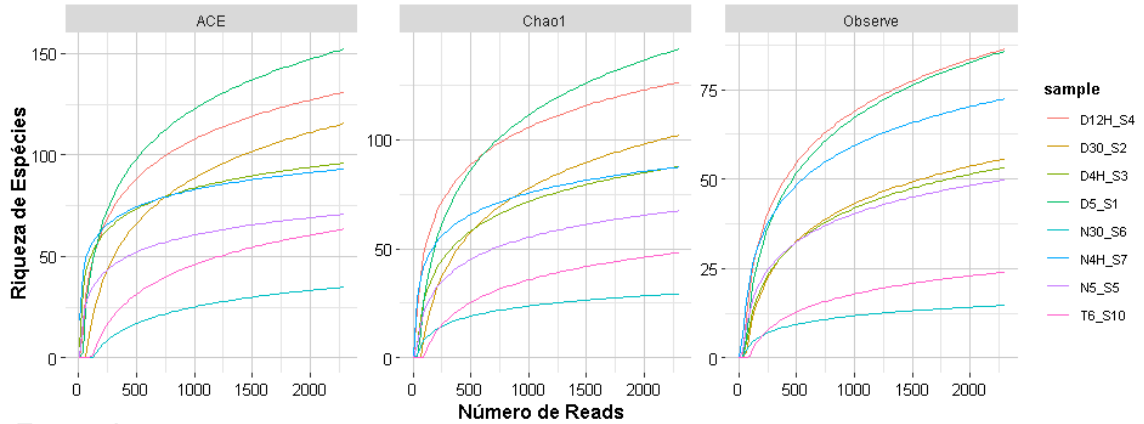


4.3 Diversidade alfa

Nas curvas de rarefação (gráfico 1), ACE e Chao1 representam estimativas que buscam prever a riqueza total de espécies por amostras, incluindo as que não puderam ser detectadas por conta da limitação do número de reads. O último gráfico (Observe) representa a riqueza real de cada amostra. Vimos aqui que o número de reads sequenciadas não foi suficiente para capturar o total das espécies presentes na amostra, pois as curvas de rarefação não foram estabilizadas o que significa que

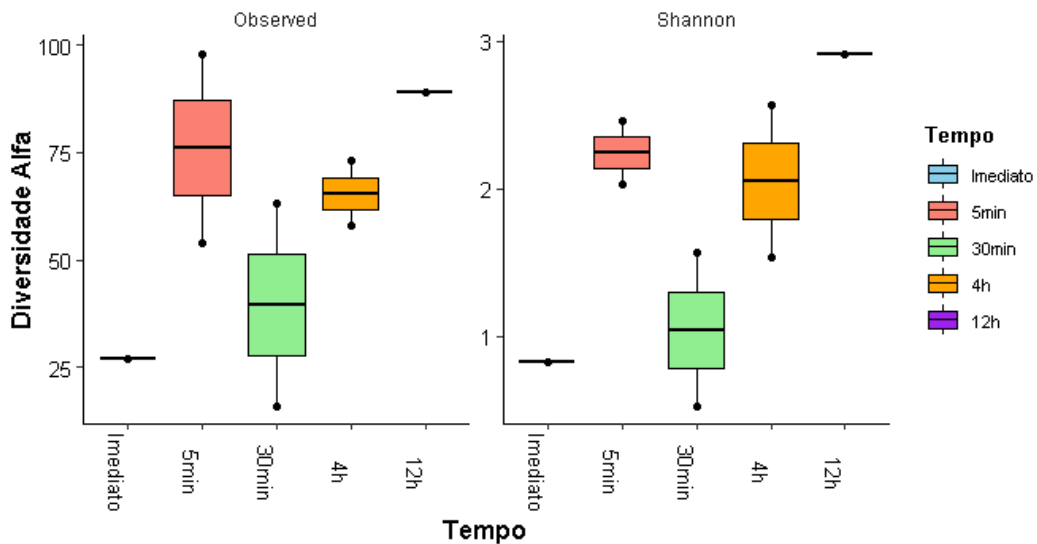
seriam necessárias mais réplicas de cada amostra para capturar a diversidade total de cada tempo.

Gráfico2: Curva de rarefação.



Fonte: Autor 2024

Gráfico 3: Diversidade alfa por tempo de coleta.

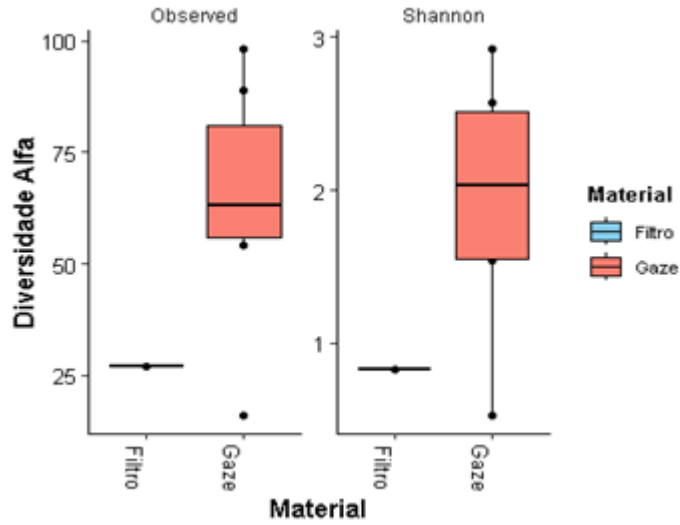


Fonte: Autor 2024

O gráfico de diversidade alfa por tempo de coleta (gráfico 3) mostra a riqueza de espécies à esquerda e a direita o índice Shannon que combina a riqueza e uniformidade resultando na abundância relativa em relação aos tempos. A amostra do filtro resultou em valores baixos para ambas as métricas mostrando que sua riqueza de foi menor assim como o índice de uniformidade mostrado no resultado de Shannon. O tempo de 5 minutos teve um aumento significativo variando de 60 a 90 OTUs no observado e aproximadamente 2.2 no índice de uniformidade Shannon. Os tempos de 30 minutos e 4 horas também mostraram valores de diversidade

observada com índices de uniformidade mais altos e variável que a filtragem. O tempo de 12 horas teve valor mais alto e mais estável para ambas as métricas.

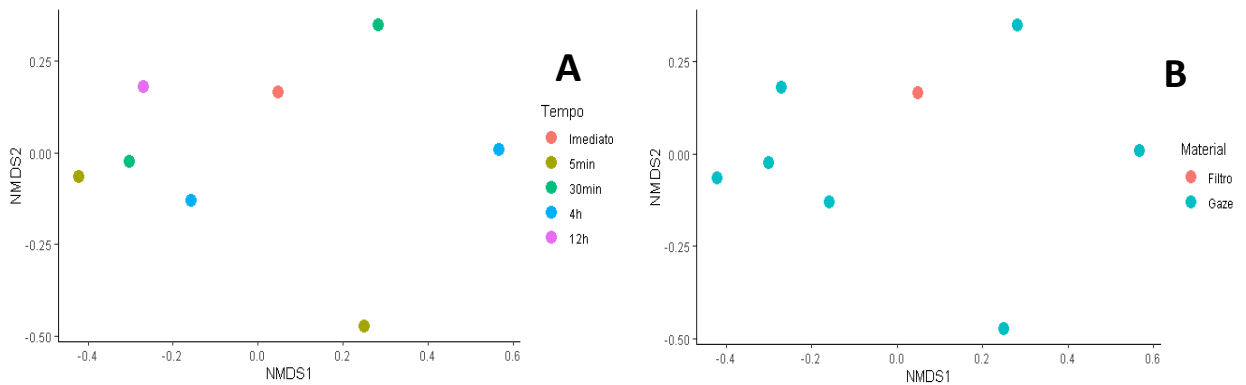
Gráfico 4: Diversidade alfa por material de coleta.



Fonte: Autor 2024

A diversidade alfa comparando os materiais de coleta (gráfico 4) mostrou o material gaze com valores expressivamente mais altos e variáveis. Mesmo com as diferenças explícitas no gráfico, os valores de p obtidos pelo teste estatístico foram superiores a 0,5 na comparação tanto de material quanto de tempo de coleta, mostrando que não há diferenças significativas entre estes considerando que o nível de significância é $\leq 0,05$.

Gráfico 5: (A) diversidade beta por tempo de coleta. (B) diversidade beta por material de coleta.



Fonte: Autor 2024

A diversidade beta foi comparada através do teste de NMDS, avaliamos considerando o tempo (gráfico 5 A) e o material (gráfico 5 B). Observou-se que nenhum dos fatores analisados apresentaram proximidade espacial significativa sobre a diversidade beta indicando que essas métricas possuem composições taxonômicas distintas. Porém a dissimilaridade encontrada não é estatisticamente significativa, visto que os valores de $Pr(>F)$ para o material foi de 0.873 e para o tempo tivemos o valor $Pr(>F)$ de 0.258 considerados bastante altos diante do nível confiável de significância 0,05.

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho apresentamos uma metodologia de baixo custo para coleta passiva de DNA ambiental. Com os resultados obtidos após o sequenciamento das amostras, constatou-se que não há diferenças significativas em relação a eficácia entre gaze e filtro, assim como o aumento no tempo de submersão da gaze não influenciou na abundância de espécies capturadas pela coleta passiva. Diante disso, conclui-se que o tempo de 5 minutos foi suficiente para a coleta passiva de DNA ambiental utilizando a gaze. Contudo, o método de coleta passiva apresentado ainda é passível de aprimoramento que envolva um N amostral maior para ambos os métodos de coleta, assim como é importante investigar novas metodologias de extração do DNA da gaze a fim de melhorar sua qualidade garantindo melhores resultados nas etapas seguintes de PCR e sequenciamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, S. S. DE; AMARAL, D. D. DO; SILVA, A. S. L. DA. Análise florística e estrutura de florestas de várzea no estuário amazônico. **Acta Amazonica**, v. 34, p. 513–524, dez. 2004. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/aa/a/phR3nQLz6yFRBwwGBmrzgQG/?lang=pt>. Acesso em: 02 jan. 2025.
- BANERJEE, P. *et al.* Environmental DNA analysis as an emerging non-destructive method for plant biodiversity monitoring: a review. **AoB PLANTS**, v. 14, n. 4, p. plac031, 1 ago. 2022. Disponível em: <https://academic.oup.com/aobpla/article/14/4/plac031/6627252>. Acesso em: 18 fev. 2024.
- BESSEY, C. *et al.* Passive eDNA collection enhances aquatic biodiversity analysis. **Communications Biology**, v. 4, n. 1, p. 1–12, 22 fev. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01444-4>. Acesso em: 16 jun. 2024.
- BESSEY, C. *et al.* Comparison of materials for rapid passive collection of environmental DNA. **Molecular Ecology Resources**, v. 22, n. 7, p. 2559–2572, 2022a. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1755-0998.13640>. Acesso em: 25 dez. 2023.
- BLAXTER, M. L. The promise of a DNA taxonomy. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 359, n. 1444, p. 669–679, 29 abr. 2004. Disponível em: <https://royalsocietypublishing.org/doi/abs/10.1098/rstb.2003.1447>. Acesso em: 14 out. 2024.
- CARVALHO, D. C.; LEAL, C. G. Steps forward in biomonitoring 2.0: eDNA Metabarcoding and community-level modelling allow the assessment of complex drivers of Neotropical fish diversity. **Global change biology**, v. 29, n. 7, p. 1688–1690, 2023. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/gcb.16596>. Acesso em: 13 set. 2023.
- CHEN, X. *et al.* Comparative Evaluation of Common Materials as Passive Samplers of Environmental DNA. **Environmental Science & Technology**, v. 56, n. 15, p. 10798–10807, 2 ago. 2022. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.est.2c02506>. Acesso em: 11 ago. 2024.
- DEINER, K. *et al.* Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. **Molecular Ecology**, v. 26, n. 21, p. 5872–5895, 2017. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/mec.14350>. Acesso em: 17 fev. 2024.
- 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. Disponível em: <https://royalsocietypublishing.org/doi/full/10.1098/rsbl.2008.0118>. Acesso em: 24 set. 2023.

JEUNEN, G.-J. *et al.* Streamlining large-scale oceanic biomonitoring using passive eDNA samplers integrated into vessel's continuous pump underway seawater systems. **Science of The Total Environment**, v. 946, p. 174354, 10 out. 2024.

Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969724045029>. Acesso em: 22 nov. 2024.

KIRTANE, A.; ATKINSON, J. D.; SASSOUBRE, L. 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, 6 out. 2020.

Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.est.0c01863>. Acesso em: 08 dez. 2024.

LÖBL, I. *et al.* The Silent Extinction of Species and Taxonomists—An Appeal to Science Policymakers and Legislators. **Diversity**, v. 15, n. 10, p. 1053, out. 2023.

Disponível em: <https://www.mdpi.com/1424-2818/15/10/1053>. Acesso em: 16 ago. 2024.

MAIELLO, G. *et al.* Little samplers, big fleet: eDNA metabarcoding from commercial trawlers enhances ocean monitoring. **Fisheries Research**, v. 249, p. 106259, 1 maio 2022.

Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165783622000364>. Acesso em: 23 dez. 2023.

MILAN, D. T. *et al.* New 12S metabarcoding primers for enhanced Neotropical freshwater fish biodiversity assessment. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 17966, 2020.

Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-74902-3>. Acesso em: 03 fev. 2024.

MINAMOTO, T. *et al.* Techniques for the practical collection of environmental DNA: filter selection, preservation, and extraction. **Limnology**, v. 17, n. 1, p. 23–32, jan. 2016.

Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10201-015-0457-4>

Acesso em: 22 set. 2024

REES, H. C. *et al.* REVIEW: The detection of aquatic animal species using environmental DNA – a review of eDNA as a survey tool in ecology. **Journal of Applied Ecology**, v. 51, n. 5, p. 1450–1459, 2014.

Disponível em:

<https://besjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1365-2664.12306>. Acesso em: 13 jun. 2024.

RIAZ, T. *et al.* ecoPrimers: inference of new DNA barcode markers from whole genome sequence analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 21, p. e145, 1 nov. 2011.

Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article/39/21/e145/1105558>.

Acesso em: 09 ago. 2024.

SAHU, A. *et al.* Environmental DNA (eDNA): Powerful technique for biodiversity conservation. **Journal for Nature Conservation**, v. 71, p. 126325, 1 fev. 2023.

Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1617138122001984>. Acesso em: 24 dez. 2024.

STAT, M. *et al.* Combined use of eDNA metabarcoding and video surveillance for the assessment of fish biodiversity. **Conservation Biology**, v. 33, n. 1, p. 196–205, fev. 2019. Disponível em: <https://conbio.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/cobi.13183>. Acesso em: 12 jun. 2024.

THOMSEN, P. F.; WILLERSLEV, E. Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. **Biological Conservation**, Special Issue: Environmental DNA: A powerful new tool for biological conservation. v. 183, p. 4–18, 1 mar. 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006320714004443>. Acesso em: 26 out. 2024.

TSUJI, S. *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. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/edn3.21>. Acesso em: 10 jul. 2024.

VAN DER HEYDE, M. *et al.* Rapid detection of subterranean fauna from passive sampling of groundwater eDNA. **Environmental DNA**, v. 5, n. 6, p. 1706–1719, 2023. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/edn3.491>. Acesso em: 13 set. 2024

VERDIER, H. *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. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1755-0998.13604>. Acesso em: 23 ago. 2024

WANG, Z. *et al.* VertU: universal multilocus primer sets for eDNA metabarcoding of vertebrate diversity, evaluated by both artificial and natural cases. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 11, 19 jun. 2023. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/ecology-and-evolution/articles/10.3389/fevo.2023.1164206/full>. Acesso em: 08 jun. 2024

YAN, Z. *et al.* Angling and trolling for eDNA: A novel and effective approach for passive eDNA capture in natural waters. **Environment International**, v. 194, p. 109175, 1 dez. 2024. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016041202400761X>. Acesso em: 03 jan. 2025.

ZARCERO, J. *et al.* A new sampling device for metabarcoding surveillance of port communities and detection of non-indigenous species. **iScience**, v. 27, n. 1, p. 108588, jan. 2024. Disponível em: [https://www.cell.com/iscience/fulltext/S2589-0042\(23\)02665-2?uuid=uuid%3Abcc174ab-4294-4a65-aece-39bc7951d88c](https://www.cell.com/iscience/fulltext/S2589-0042(23)02665-2?uuid=uuid%3Abcc174ab-4294-4a65-aece-39bc7951d88c). Acesso em: 02 dez. 2024.

Zhang, L. *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, 15 jan. 2024. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969723069255>. Acesso em: 30 out. 2024.