

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Genética, Ecologia e Evolução
Programa de Pós-graduação em Genética

Gabriel Antônio Mendes de Brito

**EMPREGO DO *eDNA METABARCODING* NA INVESTIGAÇÃO DA
BIODIVERSIDADE DE PEIXES DE UM RESERVATÓRIO URBANO**

Belo Horizonte

2024

Gabriel Antônio Mendes de Brito

**EMPREGO DO *eDNA METABARCODING* NA INVESTIGAÇÃO DA
BIODIVERSIDADE DE PEIXES DE UM RESERVATÓRIO URBANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética

Orientador: Dr. Daniel Cardoso de Carvalho

Coorientador: Dr. Heron Oliveira Hilário

Belo Horizonte

2024

043

Brito, Gabriel Antônio Mendes de.

Emprego do eDNA metabarcoding na investigação da biodiversidade de peixes de um reservatório urbano [manuscrito] / Gabriel Antônio Mendes de Brito. – 2024.

108 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Dr. Daniel Cardoso de Carvalho. Coorientador: Dr. Heron Oliveira Hilário.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Genética. 2. Monitoramento Biológico. 3. DNA ambiental. 4. Osteichthyes. I. Carvalho, Daniel Cardoso de. II. Hilário, Heron Oliveira. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 575



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO	354/2024 entrada 1º/2022 CPF: 130.086.606-30
Gabriel Antônio Mendes de Brito	

Às nove horas do dia **22 de março de 2024**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora de Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "**Emprego do eDNA metabarcoding na investigação da biodiversidade de peixes de um reservatório urbano**", requisito para obtenção do grau de Mestre em **Genética**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Daniel Cardoso de Carvalho**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	CPF	Indicação
Daniel Cardoso de Carvalho	PUC Minas	034.375.066-09	APROVADO
Heron Oliveira Hilário	PUC Minas	069.766.006-04	APROVADO
Bruno Henrique Saranholi	UFSCar	338.871.358-81	APROVADO
Patricia Sanae Sujii	UFMG	018.107.021-94	APROVADO

Pelas indicações, o candidato foi considerado: **APROVADO**

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 22 de março de 2024.

Daniel Cardoso de Carvalho (Orientador)-PUC Minas

Heron Oliveira Hilário (Coorientador)- PUC Minas

Bruno Henrique Saranholi-UFSCar

Patricia Sanae Sujii- UFMG

Assinatura dos membros da banca:



Documento assinado eletronicamente por **Heron Oliveira Hilário, Usuário Externo**, em 22/03/2024, às 12:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Henrique Saranholi, Usuário Externo**, em 22/03/2024, às 12:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Patricia Sanae Sujii, Professora Magistério Superior-Substituta**, em 22/03/2024, às 12:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Cardoso de Carvalho, Usuário Externo**, em 22/03/2024, às 16:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3129075** e o código CRC **34924EDC**.

*“Não há estrada real para a ciência e só têm
possibilidade de chegar aos seus cumes
luminosos aqueles que não temem fatigar-se a
escalar as suas veredas escarpadas”*

K. M.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à minha família, especialmente a meus pais, Almir e Érica, por todo suporte, carinho, confiança e amor necessários para que eu pudesse seguir meus caminhos e ter coragem de lutar pelos meus desejos.

Aos meus irmãos, Ana e Mateus, por todos esses anos e por terem sido meus primeiros amigos e companheiros.

Às minhas amigadas, especialmente a Biel, Marina, Caio, Iara, Letícia, Art, Clara, Luísa, Fifão, Johnny, Luís, Verônica e Lucio, obrigado por todos esses anos que passamos juntos. A companhia e o amor de vocês são o maior tesouro que eu poderia desejar.

À Stephanie, meu amor, por todo seu carinho, paciência e os bons momentos que passamos juntos.

Agradeço à Chefa, Glória Franco, por ter me ajudado a dar os primeiros passos no mundo acadêmico, me ensinado a valorizar e amar o aprendizado e o conhecimento. Sou grato às oportunidades que você me proporcionou e por ter me permitido frequentar o laboratório de Bioinformática do LGB durante meu mestrado.

Também sou muito grato aos Gloriosos, especialmente ao Lucio, por toda sua proatividade e empenho em compartilhar seu conhecimento. Da nova geração, agradeço a André, Bárbara, Dáfne, Fred, Gabrielle, Júlia e Iza pelo acolhimento e pelas risadas nas minhas manhãs e tardes na UFMG. Meu mestrado teria sido muito solitário sem a presença de vocês.

Agradeço a Heron, meu co-orientador e amigo, por todo seu companheirismo, bom-humor e paciência em lidar comigo. Sua confiança em mim me proporcionou muitas oportunidades.

Também agradeço ao meu orientador Daniel Carvalho, por ter aberto as portas do LGC para mim e ter me ajudado a dar os primeiros passos nesse vasto campo que é o trabalho com DNA ambiental e todas as suas potencialidades.

Sou grato também a todos os membros e ex-membros do LGC, que me acolheram e me acompanharam nessa jornada: Izabela, Daniel Teixeira, Gui, Júlia, Igor e Carol.

Agradecimentos especiais à equipe da Pós-Graduação em Genética da UFMG, especialmente à Raíssa, Fred Soriani e Marcelo Luizon por toda sua dedicação para com os alunos da pós-graduação.

Também agradeço à equipe da Pós-Graduação em Zoologia de Vertebrados da PUC Minas por terem me acolhido durante minha iniciação científica e meu mestrado.

Gostaria de agradecer à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Pró-Reitoria de Graduação da UFMG (PROGRAD) pelo financiamento das minhas bolsas de estudos, tornando viável minha dedicação integral à pesquisa.

Por último, agradeço à FAPEMIG pelo financiamento deste projeto, a partir dos recursos do projeto nº APQ-02247-23.

RESUMO

O monitoramento da biodiversidade em ambientes aquáticos é fundamental para a conservação dos ecossistemas e para o manejo sustentável dos recursos naturais. A utilização de métodos não invasivos, como o *metabarcoding* de DNA ambiental (eDNA), tem se mostrado uma alternativa eficaz e promissora para o estudo da diversidade de espécies aquáticas. Neste contexto, neste projeto desenvolvemos protocolos de eDNA *metabarcoding* para o monitoramento da ictiofauna na Lagoa dos Ingleses, um reservatório artificial de água doce na região Neotropical. Além disso, comparamos metodologias distintas de coleta de DNA ambiental e avaliamos sua efetividade para elucidação da biodiversidade. A escolha da Lagoa dos Ingleses, localizada em Nova Lima, Minas Gerais, Brasil, como modelo para o aperfeiçoamento do monitoramento de peixes é estratégica, pois é um local de fácil acesso com uma ictiofauna reduzida. Os resultados indicam que a metodologia tem a capacidade de realizar a identificação de espécies nativas, endêmicas e introduzidas, além de fornecer informações sobre a variação temporal e espacial da ocorrência de espécies no reservatório. Identificamos 44 espécies, pertencentes a 39 gêneros e 22 famílias. Observamos que a escolha do protocolo de monitoramento influencia nos resultados, com os filtros Sterivex recuperando a identificação de mais espécies, mesmo com menor volume de água filtrada. O desenho amostral empregado foi crucial, pois a variação espacial e temporal das espécies exigiu monitoramento de múltiplos pontos em diferentes temporadas para uma obtenção mais completa da biodiversidade do reservatório.

Palavras-chave: Região Neotropical, Biomonitoramento, DNA ambiental, Ictiofauna, Reservatório Urbano.

ABSTRACT

Biodiversity monitoring in aquatic environments is essential for ecosystem conservation and sustainable natural resource management. The use of non-invasive methods, such as environmental DNA (eDNA) metabarcoding, has emerged as an effective and promising alternative for studying aquatic species diversity. In this context, this project developed eDNA metabarcoding protocols for monitoring fish fauna in Lagoa dos Ingleses, a Neotropical freshwater artificial lake.. We also compared different eDNA collection methodologies and assessed their effectiveness for biodiversity elucidation. The choice of Lagoa dos Ingleses, an artificial lake located in Nova Lima, Minas Gerais, Brazil, as a model for improving fish monitoring is strategic, as it is an easily accessible site with a reduced fish fauna. The results indicate that the methodology can identify native, endemic, and introduced species, and provide information on the temporal and spatial variation of species occurrence in the reservoir. We identified 44 possible species, belonging to 39 genera and 22 families. We observed that the choice of the monitoring protocol influences the results, with Sterivex filters recovering the identification of more species, even with a smaller volume of filtered water. The sampling design employed was crucial, as the spatial and temporal variation of the species required monitoring of multiple points in different seasons to obtain a more complete picture of the reservoir's biodiversity.

Keywords: eDNA metabarcoding, Fish fauna, Biodiversity Monitoring, Artificial lake, Neotropical region.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. JUSTIFICATIVA	14
3. OBJETIVOS	15
3.1. Objetivo geral	15
3.2. Objetivos específicos	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS	15
4.1. Coletas de amostras de água e filtração.....	15
4.2. Extração do DNA ambiental.....	18
4.3. Amplificação e sequenciamento	18
4.4. Processamento das sequências.....	19
5. RESULTADOS	23
5.1. Processamento das amostras.....	23
5.2. Identificações taxonômicas de peixes.....	23
5.3. Análises ecológicas.....	33
6. DISCUSSÃO	42
6.1. Identificação e curadoria taxonômica	42
6.2. Riqueza de espécies, ASVs e OTUs	43
6.3. Monitoramento temporal	43
6.4. Monitoramento espacial	44
6.5. Influência do método de captura de eDNA: MCE e Sterivex	45
6.6. Correlação entre reads e abundância de indivíduos.....	47
7. CONCLUSÃO.....	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
ANEXOS.....	60

1. INTRODUÇÃO

A região Neotropical, abrangendo o México, América Central, Caribe e toda a América do Sul, compreende diversos *hotspots* de biodiversidade (Ríos-Touma & Ramírez, 2019). A América do Sul, especificamente, apesar de ocupar menos de 15% da superfície terrestre do planeta, alberga mais de 30% das espécies de peixes de água doce já catalogadas (Reis et al., 2016). No entanto, essa riqueza inestimável se encontra em risco devido à superexploração dos recursos naturais e alterações climáticas (Pelicice et al., 2017; Prakash, 2017; Vitule, 2009). A biodiversidade, definida como a variedade molecular, de espécies e de funções ecológicas dos organismos (Hester & Harrison, 2007), é crucial para o funcionamento dos ecossistemas, garantindo a obtenção de recursos, produção de biomassa, decomposição e ciclagem de nutrientes (Alho, 2012; Zari, 2018). No entanto, o declínio da biodiversidade leva à deterioração dessas funções ecossistêmicas, impedindo a manutenção natural dos habitats e também prejudicando atividades econômicas humanas (Paxton, 2023). Em ambientes de água doce neotropicais, a ação humana se manifesta através da poluição, introdução de espécies exóticas, construção de barragens e retificação de cursos d'água. Tais atividades fragilizam as condições que favorecem a biodiversidade aquática, e atividades de mitigação desses impactos se fazem imprescindíveis (Friberg et al., 2011).

Os impactos antrópicos, somados à falta de conhecimento sobre a biodiversidade de água doce, representam um grande desafio para a conservação. No entanto, as informações disponíveis sobre o estado e as características das populações são geralmente limitadas e enviesadas, o que dificulta a priorização de áreas e espécies. Isso, por sua vez, impede a criação de políticas públicas e ações de manejo eficazes (Dudgeon et al., 2006). As atividades de manejo e o desenvolvimento de políticas de conservação exigem avaliações constantes da biodiversidade. Porém, diferentemente do monitoramento de atributos físico-químicos dos ecossistemas (temperatura, pH, nível de gás oxigênio, etc.), que já possuem métodos simples e robustos de mensuração, a biodiversidade, principalmente em ambientes aquáticos megadiversos, é difícil de ser avaliada de maneira rápida e confiável utilizando os métodos convencionais (Miya et al., 2020). Os métodos tradicionais de estudo de ecossistemas aquáticos consomem muito tempo e recursos por envolver a captura direta dos organismos a partir de diversos meios de pesca (com redes, armadilhas, pesca elétrica, etc.). Esses métodos são laboriosos, invasivos, destrutivos e necessitam da identificação taxonômica com subsequente armazenamento dos espécimes capturados (Miya et al., 2020). Além disso, a disponibilidade de taxonomistas está em decadência (Hopkins & Freckleton, 2002). A coleta de organismos em

ecossistemas aquáticos também depende principalmente das condições temporais momentâneas. Nessas circunstâncias, é inviável monitorar a biodiversidade com a frequência necessária a partir dos métodos tradicionais (Miya et al., 2020).

O DNA é continuamente liberado pelos macroorganismos para o ambiente a partir da pele, do muco corporal, sangue, excretas e fluidos sexuais (Balasingham et al., 2018). Esse material genético, de natureza intra ou extracelular, pode estar dissolvido na água ou acumulado no sedimento, sendo denominado DNA ambiental (eDNA, do inglês *environmental DNA*). Ele pode então ser filtrado de amostras ambientais, amplificado utilizando marcadores específicos e então sequenciado, sendo necessária a utilização de técnicas computacionais para a detecção e identificação dos organismos que estavam presentes no habitat amostrado, através da comparação das sequências obtidas com bancos de sequências referência (Rees et al., 2014; Takahashi et al., 2023). Desde meados da primeira década do século XXI, a técnica de *metabarcoding* de DNA ambiental (eDNA *metabarcoding*) tem se consolidado como uma alternativa inovadora para a detecção e identificação de espécies em relação aos métodos convencionais (Dejean et al., 2012; Ficetola et al., 2008; Goldberg et al., 2011; Jerde et al., 2011; Kelly et al., 2014; Layton et al., 2006). O eDNA *metabarcoding* utiliza diversos protocolos de biologia molecular que permitem a identificação de múltiplos organismos diferentes a partir de uma mesma amostra ambiental, reduzindo o tempo de coleta de amostras em campo e simplificando a logística do monitoramento ambiental (Ruppert et al., 2019).

Assim, o *metabarcoding* de eDNA destaca-se por suas vantagens em relação aos métodos convencionais e possui grande potencial de uso na conservação dos ecossistemas aquáticos neotropicais. Porém, atualmente, as técnicas que envolvem o uso de DNA ambiental são empregadas principalmente em regiões temperadas (Handley et al., 2019; McDevitt et al., 2019) e é necessário avaliar a eficácia de diferentes protocolos de *metabarcoding* de eDNA para o biomonitoramento dos ecossistemas neotropicais (Sales et al., 2021). A avaliação da biodiversidade em ecossistemas megadiversos, particularmente em ambientes neotropicais, é especialmente desafiadora. As principais dificuldades residem em condições ambientais, como a alta incidência de radiação ultravioleta (UV) e temperaturas médias elevadas, que aceleram a degradação do DNA ambiental. Além disso, a imensa riqueza de espécies nesses locais torna complexa a construção de bancos de referência abrangentes e representativos da diversidade presente (Sales et al., 2019, 2020).

Além de sistemas hídricos naturais, o *metabarcoding* de DNA ambiental possui grande potencial de aplicação em sistemas artificiais, como lagos e barragens construídos a partir do represamento de cursos d'água. Diversos trabalhos têm se dedicado a avaliar o uso do DNA

ambiental nesses sistemas, bem como suas dinâmicas e a eficácia dos protocolos de monitoramento. As pesquisas realizadas em lagoas e barragens na região neotropical (Dal Pont et al., 2021; Giongo et al., 2022; Valdez-Moreno et al., 2019) e na região temperada (Di Muri et al., 2020; Larson et al., 2017; H. Li et al., 2022; Shu et al., 2022) oferecem *insights* valiosos, porém ainda existem lacunas no conhecimento sobre a ecologia do eDNA em sistemas lênticos e lóticos. Nota-se a ausência de trabalhos que realizaram o emprego do eDNA *metabarcoding* e a avaliação de seus protocolos em lagos urbanos localizados em regiões biodiversas para o monitoramento das comunidades de peixes.

O desenvolvimento de estudos dedicados à elaboração e avaliação de metodologias aplicadas ao eDNA *metabarcoding* em ambientes urbanos neotropicais requer uma compreensão aprofundada das determinantes que envolvem a ecologia do DNA ambiental. A complexa relação entre o material genético extracorpóreo e o ambiente, assim como a detecção, quantificação, análise e aplicações do eDNA (Barnes & Turner, 2016) são aspectos cruciais a serem considerados. No que diz respeito ao ambiente, características como o tipo - se é um sistema lêntico ou lótico - e o volume de água, juntamente com o tamanho do sistema, podem exercer uma influência direta na recuperação do eDNA. Em sistemas lóticos, como rios, cachoeiras e córregos, a vazão constante dispersa o material genético longitudinalmente de acordo com o fluxo (Sales et al., 2019; Thalinger et al., 2021), diferentemente de sistemas lênticos, que tendem a apresentar uma distribuição lateral mais homogênea (Zhang et al., 2020). Quanto ao tamanho, corpos d'água maiores demonstram uma propensão a exibir padrões mais complexos na distribuição de populações de peixes, possivelmente devido à sua maior heterogeneidade de ambientes e de características hidrodinâmicas (Zhang et al., 2020), influenciando diretamente nos padrões de dispersão do DNA ambiental e como ele pode ser recuperado de amostras ambientais.

Além das condições ambientais, a escolha dos protocolos utilizados também influencia na recuperação do eDNA e da biodiversidade (Deiner et al., 2015). Aspectos técnicos dos protocolos, como o tipo de amostra (água ou sedimento), local escolhido para coleta (margem ou leito), número de pontos amostrados, tipo de membrana dos filtros utilizados (éster de nitrocelulose, fibra de vidro, polycarbonato), tipo de estrutura dos filtros (abertos ou cartuchos fechados), volume de amostras filtradas, quantidade de replicatas técnicas, métodos de preservação das amostras, método de extração do material genético, método de amplificação, método de construção de bibliotecas, plataforma de sequenciamento e entre outras decisões podem afetar os resultados obtidos (Majaneva et al., 2018; Sales et al., 2019; Spens et al., 2017; Wong et al., 2020). Trabalhos anteriores avaliaram a eficiência de diferentes tipos de filtros

para a elucidação da biodiversidade de ambientes de água doce (Capo et al., 2020; Di Muri et al., 2020; Djurhuus et al., 2017; Lacoursière-Roussel et al., 2016). Porém, esses estudos não envolveram a avaliação dos diferentes filtros e seus protocolos em ambientes localizados em habitats megadiversos como a região neotropical. As diferenças ambientais e na diversidade de espécies nesses locais exigem a avaliação da aplicabilidade dos protocolos estabelecidos para regiões temperadas e a identificação de possíveis adaptações necessárias.

Sendo assim, propomos avaliar a eficácia do eDNA *metabarcoding* e comparar protocolos para a elucidação da ictiofauna de um reservatório urbano conhecido como Lagoa dos Ingleses, localizado no município de Nova Lima, Minas Gerais, Brasil. A Lagoa dos Ingleses, também chamada de Lagoa Grande, foi formada no início do século XX pelo represamento das águas do Rio do Peixe, integrante da Bacia Hidrográfica do Rio das Velhas na região do Alto Rio das Velhas, pertencente ao complexo da Bacia Hidrográfica do Rio São Francisco (Sisema, 2010). Atualmente, a lagoa é tecnicamente denominada Barragem Lagoa Grande, e pertence ao complexo do Sistema Hidrelétrico Rio do Peixe (SHRP), juntamente com mais dois reservatórios: Barragem Lagoa do Miguelão e Barragem Lagoa da Codorna (Ashanti, Anglogold, 2022). O reservatório que constitui a Lagoa dos Ingleses teve suas obras concluídas no ano de 1937, possui capacidade de cerca de 16 milhões de metros cúbicos e uma área de superfície líquida de 2,27 km². Esse complexo hidrelétrico é de propriedade da mineradora sul-africana AngloGold Ashanti, que realiza o extrativismo de ouro na região. Devido à produção de energia, o nível da lagoa é artificialmente controlado. Durante períodos de escassez de chuvas, as águas do reservatório podem ser utilizadas para abastecimento hídrico. Em um contexto de seca histórica entre outubro de 2020 e abril de 2021, que registrou a maior estiagem em 111 anos na região metropolitana de Belo Horizonte (Cruz, 2021a), o volume da Lagoa dos Ingleses foi utilizado para aumentar a vazão do Rio das Velhas, resultando nos níveis mais baixos da lagoa da série histórica (Cruz, 2021b).

Além da avaliação do *metabarcoding* de eDNA, desenvolvemos um protocolo de coleta utilizando filtro tipo cartucho Sterivex (membrana PVDF, tamanho do poro: 0,45µm, Merck Millipore) e adaptamos um protocolo de extração de eDNA para esse tipo de filtro. Em seguida, realizamos a comparação da detecção de espécies por este protocolo com outro, que emprega o filtro aberto composto por MCE (membrana de Éster de Celulose Mista, tamanho do poro: 0,45µm, Merck Millipore).

2. JUSTIFICATIVA

Neste projeto objetivamos desenvolver e realizar o monitoramento da ictiofauna em uma lagoa de água doce na região Neotropical através do *metabarcoding* de eDNA, visando contribuir para estratégias inovadoras de manejo e mitigação de impactos antrópicos. Para atingir esse objetivo, realizamos o eDNA *metabarcoding* para detectar a diversidade de espécies de peixes na Lagoa dos Ingleses, localizada em Nova Lima, no estado de Minas Gerais, Brasil.

A escolha da Lagoa dos Ingleses como modelo para o aperfeiçoamento do monitoramento de peixes é estratégica pois esse reservatório possui biodiversidade reduzida, é um local de fácil acesso, e sua ictiofauna ainda não foi cientificamente descrita. Também está localizada em um ambiente sujeito a diversas pressões antrópicas, como poluição urbana e mineração. Dessa forma, o uso do *metabarcoding* de eDNA poderá fornecer informações mais abrangentes e precisas sobre as espécies presentes no local, permitindo aprimorar as estratégias de manejo e conservação.

Os resultados deste projeto têm potencial para otimizar o processo de biomonitoramento de peixes no contexto neotropical, especialmente no Brasil, permitindo a detecção de espécies de forma mais eficiente e menos invasiva em comparação aos métodos convencionais de coleta. Isto pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes de conservação e manejo da ictiofauna em reservatórios de água doce sujeitos a impactos antrópicos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Caracterizar a biodiversidade da Lagoa dos Ingleses em períodos de seca e cheia utilizando dois protocolos distintos de eDNA *metabarcoding*.

3.2. Objetivos específicos

1. Criar um protocolo de coleta de amostras de DNA ambiental utilizando filtros Sterivex;
2. Adaptar o protocolo de extração de DNA ambiental de filtros MCE para filtros Sterivex;
3. Aperfeiçoar o *pipeline* de análises bioinformáticas para identificação de espécies a partir das amostras de eDNA;
4. Comparar os dois protocolos de coleta, verificando a eficácia de cada um para detectar a diversidade de espécies de peixes na Lagoa dos Ingleses;
5. Desenvolver uma estratégia de curadoria dos dados de eDNA;
6. Determinar a biodiversidade de espécies de peixes presentes no reservatório da Lagoa dos Ingleses.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Coletas de amostras de água e filtragem

Foram realizadas cinco campanhas de coleta de amostras da Lagoa dos Ingleses, sendo duas em 2020, duas em 2021 e uma campanha em 2022. No total foram coletadas 52 amostras, utilizando duas metodologias de obtenção de eDNA: filtro aberto e filtro Sterivex (Quadro 1). No ano de 2020 não houve estiagem, e a lagoa apresentava seu nível normal, por volta de 18 m. As coletas foram realizadas nos pontos Fundação (Lat. -20.19573, Long. -43.95986) e Ponte (Lat. -20.1797, Long -43.95823), localizados nas margens da lagoa (Figura 1). Nas duas coletas realizadas neste ano, uma replicata de 500 mL de água foi coletada de cada ponto, na superfície da água, utilizando garrafas estéreis (Quadro 1).

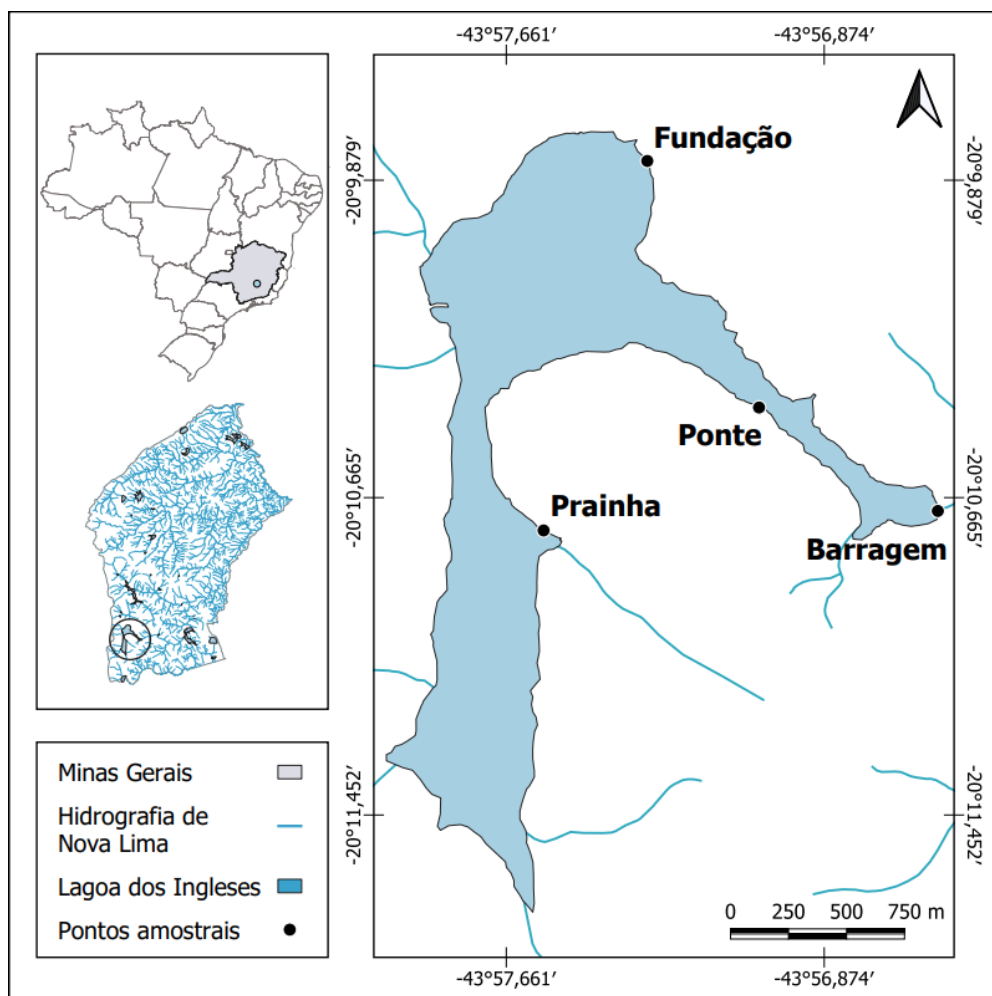


Figura 1 – Mapa dos pontos de coleta na Lagoa dos Ingleses, localizada em Nova Lima, Minas Gerais, Brasil.

Em outubro de 2021, devido à estiagem iniciada no ano anterior, o reservatório ainda apresentava níveis baixos, com menos de 12 m. Neste mês realizamos uma campanha que, além dos pontos anteriormente avaliados, incluiu mais dois pontos de amostragem: Prainha (Lat. -20.1797 e Long. -43.95823) e Barragem (Lat. -20.17435, Long. -43.95003). A partir desta coleta, todas as campanhas envolveram a coleta de água nos quatro pontos: Prainha, Ponte, Barragem e Fundação. Em cada ponto foram coletadas três replicatas de 500 mL de água da lagoa a partir da margem utilizando garrafas estéreis. Em novembro de 2021, foi realizada mais uma coleta, e desta vez além da coleta de água para subsequente filtragem utilizando o filtro MCE também foram realizadas filtrações *in loco* utilizando o filtro cartucho tipo Sterivex com uma metodologia própria. Nesta metodologia foram filtrados aproximadamente 180 mL de água para cada uma das três replicatas em cada ponto, em passagens sucessivas utilizando uma seringa de 60 mL. Após a filtragem, foram inseridos 2 mL de tampão *buffer* ATL (Qiagen) dentro dos cartuchos Sterivex utilizando uma seringa descartável de 10 mL, para preservação

do material genético. O protocolo completo de coleta das amostras utilizando os filtros Sterivex desenvolvido para este projeto pode ser encontrado na seção de Anexos (Protocolo de coleta utilizando filtro Sterivex).

A última campanha ocorreu em Janeiro de 2022, quando o volume da lagoa já estava praticamente recuperado (volume normal). Nesta campanha os mesmos quatro pontos anteriores foram avaliados, e o protocolo de coleta para posterior filtração com filtros MCE foi repetido. O Quadro 1 apresenta a sumarização do desenho amostral e da relação de amostras coletadas por campanha.

Quadro 1 – Desenho amostral utilizado e amostras coletadas por campanha.

Período	Nível do reservatório	Pontos	Replicatas	Filtração
Novembro/2020	Normal	Fundação, Ponte	1x500 mL	Filtros MCE
Dezembro/2020	Normal	Fundação, Ponte	1x500 mL	Filtros MCE
Outubro/2021	Baixo	Prainha, Ponte, Barragem, Fundação	3x500 mL	Filtros MCE
Novembro/2021	Baixo	Prainha, Ponte, Barragem, Fundação	3x500 mL / 3x180 mL	Filtros MCE/ Sterivex
Janeiro/2022	Normal	Prainha, Ponte, Barragem, Fundação	3x500 mL	Filtros MCE

Após a coleta, as amostras de água e os filtros Sterivex foram devidamente identificados e armazenados em uma caixa térmica refrigerada e protegida da luz solar. No mesmo dia, as amostras de água foram transportadas para o laboratório, onde foram filtradas com um Manifold EZ-fit (Merck Millipore) com membrana de filtração de Éster de Celulose Mista (MCE, diâmetro: 47 mm, tamanho do poro: 0,45 µm, Merck Millipore), presa em um funil plástico acoplado à bomba elétrica EZ-stream (Merck Millipore). Após a filtração, os filtros foram acondicionados em tubos falcon estéreis de 15 mL com sílica gel branca, de granulidade 2-4 mm, e armazenados a 20 °C. Os filtros do tipo Sterivex, preenchidos com *buffer* ATL, também foram acondicionados a 20 °C até as extrações.

As pinças utilizadas na manipulação dos filtros foram imersas em solução de água cloro 25% por 10 min e, em seguida, enxaguadas com água destilada, borrifadas com etanol 70% e flambadas. As bancadas, a bomba elétrica e o Manifold foram higienizados previamente com uma solução descontaminante de moléculas residuais de ácidos nucleicos e proteínas (*Cleaner* - LGC Biotecnologia).

4.2. Extração do DNA ambiental

Após a filtragem de todas as amostras, o material genético foi extraído dos filtros MCE e dos cartuchos Sterivex utilizando o *kit* DNeasy PowerWater (Qiagen) adaptado (Protocolo de extração, Anexos).

As extrações ocorreram em triplicatas, onde todos os filtros extraídos pertenciam ao mesmo ponto. Em relação à extração de eDNA do filtro Sterivex, o *ATL buffer* foi cuidadosamente retirado dos cartuchos dos filtros Sterivex com auxílio de uma seringa descartável. Em seguida os cartuchos foram abertos e os filtros foram removidos e cortados em pequenos pedaços de aproximadamente 0,5 cm² utilizando um bisturi estéril dentro de uma placa de petri previamente higienizada com solução de cloro 10%, enxaguada com água destilada e irradiada com luz UV durante 15 min. As adaptações ao protocolo podem ser conferidas no Protocolo de extração (Anexos).

4.3. Amplificação e sequenciamento

A amplificação de um marcador do gene mitocondrial 12S rDNA foi realizada utilizando os *primers* MiFish (Miya et al., 2015). As sequências *Forward* e *Reverse* utilizadas estão relacionadas no Quadro 2.

Às sequências dos *primers* utilizados foram adicionadas sequências *index* únicas nas extremidades 5'. Para cada amostra de eDNA extraída foi utilizada em sua amplificação uma combinação única de *primers* indexados, permitindo que durante a construção das bibliotecas todos os produtos de PCR fossem agrupados em um único *pool*, diminuindo o tempo de preparo para o sequenciamento e o *tag jumping*.

Quadro 2 – Sequência dos *primers* MiFish *Forward* e *Reverse*.

<i>Primer</i>	Sequência 5'-3'
MiFish <i>Forward</i>	GCCGGTAAACTCGTGCCAGC
MiFish <i>Reverse</i>	CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG

As PCRs foram preparadas em triplicatas para cada replicata coletada. O *mix* de PCR foi preparado utilizando um volume final de 20 µL contendo 6,84 µL de água destilada, 10 µL 2x de Applied Biosystems Amplitaq Gold 360 Master Mix (Taq DNA polimerase DNA, Tampão de reação, dNTP e MgCl₂ a 2,5 mM), 0,16µL de BSA de (Albumina Sérica Bovina a

0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 0,5 μL de cada *primer* a 10 nM e 2 μL do eDNA extraído. As PCRs foram preparadas em triplicatas, utilizando um programa com um ciclo inicial de desnaturação a 95°C durante 10 min, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 30s, seguido por 45s de anelamento a 61 °C, extensão a 72 °C por 30s e extensão final a 72 °C durante 7 min. Após os 40 ciclos, o *hold* foi de 10 °C. Todas as amostras foram combinadas em um *pool* para a construção das bibliotecas para sequenciamento.

A construção das bibliotecas para sequenciamento foi realizada com o *kit* Collibri ES DNA Library Prep (Thermo Fisher). A quantificação das bibliotecas foi feita através do método de fluorescência utilizando o fluorímetro Qubit 4 (Thermo Fisher), com o *kit* DNA HS (Thermo Fisher), utilizando o tamanho médio do *amplicon* (~172pb) para cálculo de molaridade. O sequenciamento das amostras filtradas com filtros MCE em 2020 e 2021 foi realizado com a plataforma Illumina MiniSeq, seguindo o protocolo do fabricante, no Laboratório de Genética da Conservação da PUC Minas. Já as amostras filtradas com os filtros Sterivex em Novembro de 2021 e as amostras filtradas com filtros MCE em Janeiro de 2022 foram sequenciadas utilizando a plataforma NextSeq 2000, na *facility* EcoMol (<https://ecomolconsultoria.com.br>).

4.4. Processamento das sequências

4.4.1. Inferência de *Amplicon Sequence Variants* (ASVs) utilizando o DADA2

Os dados brutos do sequenciamento foram processados por um *pipeline* customizado, integrado utilizando a linguagem R v4.1.0 (<https://www.R-project.org/>). A primeira etapa consistiu na realização do *demultiplexing* com o *software* Cutadapt (Martin, 2011). Foram fornecidos os indexes utilizados na amplificação de cada amostra durante a etapa de PCR para a criação dos arquivos contendo separadamente as *reads* de cada amostra. Nesta etapa também foi feita a retirada dos *primers* das *reads*, utilizando as sequências dos *primers forward* e *reverse* nas orientações direta e complemento reverso.

Após o *demultiplexing* iniciaram-se as etapas envolvendo o uso do *pacote* DADA2 (Callahan et al., 2017) para a inferência das Variantes de sequências de *amplicons* (ASVs). A primeira etapa consistiu no uso da função “*filterAndTrim*”. Neste momento foram fornecidos para o *pipeline* os arquivos *forward* (R1) e *reverse* (R2) gerados do sequenciamento de cada amostra. Em seguida, a função aplicou um filtro de maneira independente a cada um desses arquivos, removendo as *reads* com a taxa máxima de erros esperados igual a 30 (maxEE = 30,30). Também foram retiradas as *reads* que não possuíam um par correspondente em um dos arquivos *forward* ou *reverse* (“*matchIDs* = TRUE”). Foram removidas também as *reads*

identificadas como originadas do phiX (“rm.phix = TRUE”) e, por último, a realização da remoção das *reads* com comprimento menor que 30 bases (minLen = 30). As taxas de erro dos conjuntos *forward* e *reverse* foram então modeladas utilizando a função “*learnErrors*”. Na próxima etapa, foi feito o *dereplication* com a função “*derepFastq*”. Nesta etapa é realizado o agrupamento das *reads* em “sequências únicas” que possuem uma abundância correspondente ao número de *reads* daquela sequência. Na etapa seguinte, denominada “*Sample Inference*”, foi determinada a composição e abundância de sequências genéticas em com base nas *reads* brutas do sequenciamento. Esse processo consiste em identificar e quantificar as sequências com valor genético, agrupando aquelas semelhantes e estimando sua abundância relativa. O algoritmo DADA2 separa as *reads* com base em um modelo de qualidade de erros de *reads* geradas por sequenciamento Illumina, permitindo a resolução precisa de sequências com diferenças de até um nucleotídeo.

Foi feita a inferência das sequências com verdadeiro valor biológico a partir dos erros que foram aprendidos do conjunto de dados. Com as sequências *forward* e *reverse* resultantes foi feita a etapa de *merge*, sobrepondo as sequências *forward* com o complemento reverso das sequências *reverse* correspondentes, com uma sobreposição mínima de 10 bases e permitindo um máximo de uma base de *mismatch*. Em seguida foi realizada a remoção de sequências quiméricas da matriz de ASVs.

4.4.2. Inferência de Operational Taxonomic Units (OTUs)

A criação de OTUs foi feita a partir do agrupamento das ASVs resultantes utilizando o Swarm v3.1.0 (Mahé et al., 2021), com a opção “*fastidious*” e “*d=1*”.

4.4.3. Identificação taxonômica

A identificação taxonômica das ASVs foi realizada utilizando o pacote BLASTr (Hilário, 2022) que realiza a automatização da execução da função BLASTn 2.10.1+ (Altschul et al., 1990). Foram definidos um mínimo percentual de identidade e de cobertura iguais a 80%. Foi utilizado como referência o banco NCBI Nucleotide (National Library of Medicine (US), 2010), atualizado em dezembro de 2023, e o banco LGC 12Sdb (Hilário et al., 2023). O LGC 12Sdb possui um conjunto de 187 sequências de 600pb do gene ribossomal 12s rDNA. Este trecho abrange a região alvo dos marcadores MiFish com ~170pb, (Miya et al., 2015), NeoFish de ~190 bp, (Milan et al., 2020) e Teleo com ~70 bp, (Valentini et al., 2016, p. 20). Neste banco estão representadas 99 espécies de peixes, sendo 40 espécies da Bacia do Rio Jequitinhonha em 53 sequências e 70 espécies da Bacia do Rio São Francisco com 134 sequências.

Após a designação da taxonomia das ASVs, para avaliar o resultado do alinhamento feito com o BLASTn, realizamos o cálculo de um *pseudoscore* para poder unir em apenas uma métrica os valores de identidade e de cobertura. Este *pseudoscore* foi calculado da seguinte maneira:

$$Pseudoscore = \frac{Valor\ de\ identidade \times Valor\ de\ cobertura}{100}$$

O nível taxonômico da identificação das sequências foi então automaticamente definido a partir do valor do *pseudoscore*, seguindo os critérios descritos no Quadro 3.

Se o *match* da identificação do BLASTn teve o *pseudoscore* igual ou superior a 98%, foi adotada a identificação a nível de espécie integralmente. Para valores de *pseudoscore* iguais ou maiores que 95% e menores que 98%, foi utilizado o nível de gênero fornecido pelo *match* do BLASTn. No caso de valores iguais ou maiores que 95% e menores que 90%, foi considerada a família da identificação taxonômica. Para valores menores que 90% e maiores ou iguais a 80%, foi utilizada apenas a ordem do *match* fornecido pelo BLAST.

Quadro 3 – Níveis taxonômicos definidos a partir de cada *pseudoscore*.

Nível taxonômico	<i>Pseudoscore</i>
Espécie	≥ 98
Gênero	$95 \leq Pseudoscore < 98$
Família	$90 \leq Pseudoscore < 95$
Ordem	$80 \leq Pseudoscore < 90$

4.4.4. Filtragem e curadoria individual das identificações

Após a identificação taxonômica das ASVs, foi feita a primeira etapa de filtragem. As sequências que estavam fora do tamanho esperado para o *amplicon* MiFish (> 185 e < 200) e as sequências que não tiveram nenhuma identificação atribuída pelo BLASTn foram removidas. Após esta etapa, foi feita a curadoria individual das identificações. As ASVs foram alinhadas utilizando o *software* MUSCLE (Edgar, 2004) com as configurações *default* e em seguida o alinhamento foi utilizado para construir uma árvore usando o método de Máxima Verossimilhança a partir de um *bootstrap* de 100 (Figura suplementar 1A) com o MEGAX (Kumar et al., 2018). Também foram calculadas a distância genética média entre as sequências,

usando a função “*DistanceMatrix*” do pacote DECIPHER (Wright, 2016) com o método de substituição de Jukes-Cantor.

A abundância relativa de ocorrência de cada ASV foi calculada a partir do quociente da divisão da soma do total de reads de cada ASV pela soma das abundâncias totais de reads de cada amostra. Foram levados em consideração na avaliação de cada identificação os três maiores *hits* atribuídos pelo BLASTn a cada ASV, a árvore, a distância genética média entre as sequências e seus respectivos valores de abundância relativa de *reads* (Relative *reads abundance*, RRA). As ASVs que tiveram identificação atribuída às classes Mammalia e Aves não passaram pela curadoria individual, tendo sido removidas se apresentavam um *pseudoscore* menor que 98, mantendo apenas as que tiveram uma identificação considerada confiável ao nível de espécie.

4.4.5. Análises ecológicas

As análises ecológicas foram realizadas utilizando a linguagem R v4.1.0 (<https://www.R-project.org/>), com o uso do pacote Tidyverse (Wickham et al., 2019) para manipulação dos dados e ggplot2 (Wickham, 2016) para a construção de figuras. O índice de α -diversidade (riqueza de espécies) foi calculado usando o número total de ASVs identificadas até o nível de gênero e de espécie. A comparação entre os resultados apresentados no *Box Plot* foi calculada a partir do método de Wilcoxon, utilizando o comando “*compare_means*” do pacote ggpubr (Kassambara, 2023). O cálculo de β -diversidade foi feito utilizando o pacote vegan 2.6-4 com a função “*vegdist*” (Jari Oksanen et al., 2022), utilizando o método de Jaccard para avaliar a similaridade entre os grupos formados no gráfico. O comando “*cmdscale*” foi empregado para criar uma representação visual dos efeitos de cada tipo de filtro na detecção de espécies, a partir de um gráfico PCoA utilizando a matriz de β -diversidade. O gráfico de correlação entre os dois tipos de coleta foi construído utilizando o Coeficiente de Correlação de Pearson e plotado com o pacote ggplot2.

As análises ecológicas temporais foram realizadas apenas com os dados gerados a partir das amostras filtradas com os filtros MCE. As amostras filtradas com filtros Sterivex foram usadas na comparação apenas com as amostras coletadas com os filtros abertos MCE da mesma campanha, que ocorreu em Novembro de 2021.

5. RESULTADOS

5.1. Processamento das amostras

Foram geradas 10.590.450 *reads* no sequenciamento de todas as amostras da série temporal 2020 a 2022. Após o processamento com o *pipeline*, curadoria e filtragem das *reads*, restaram 3.724.843 *reads* atribuídas a 703 ASVs que se agruparam em 465 OTUs, resultando em 61 registros de espécies (Quadro 4).

Quadro 4 – Reads, ASVs, OTUs, ordens, família, gêneros e espécies atribuídas a cada classe taxonômica

Classe	Reads totais	ASVs	OTUs	Ordens	Famílias	Gêneros	Espécies
Actinopteri	3.553.061	563	359	10	22	40	44
Aves	351	9	9	4	5	6	6
Mammalia	171.429	131	97	7	10	11	11

Não foi possível realizar o *demultiplex* das *reads* das amostras coletadas no ponto *Fundação* em Novembro e Dezembro de 2020. Por isso, nas análises conduzidas foram agrupadas as *reads* das amostras de um mesmo ponto amostral por ano, e não por mês em que foi realizada a campanha de coleta. Outro detalhe que é importante ressaltar é que, após a filtragem de controles negativos de PCR e ASVs fora do tamanho esperado, não sobraram sequências pertencentes à classe Actinopteri nas amostras coletadas nos pontos *Ponte* e *Fundação* da campanha que foi realizada em 2022 (lagoa cheia), apenas algumas ASVs identificadas como pertencentes a *Homo sapiens*. Por esse motivo, no Quadro principal (Anexos) e nas figuras de análises, apenas os pontos *Prainha* e *Barragem* estão representados.

5.2. Identificações taxonômicas de peixes

Após a curadoria integrativa, considerando os três melhores *hits* atribuídos pelo BLASTn a cada ASV, a árvore de Máxima Verossimilhança, a distância genética média entre as sequências, seus respectivos valores de abundância relativa nas amostras e os dados de ocorrência de espécies na Bacia Hidrográfica do Rio São Francisco (BHSF) e na Bacia Hidrográfica do Rio das Velhas (BHRV), foram detectadas 563 ASVs atribuídas a 22 famílias, 39 gêneros e a pelo menos 44 espécies de peixes (Quadro 5).

Quadro 5 – Lista de identificações atribuídas à ASVs após a curadoria, com seus respectivos valores de reads, ASVs, OTUs e taxonomia correspondentes. Os resultados detalhados da curadoria estão disponíveis no quadro Suplementar 1.

Ordem	Família	Gênero	Identificação curada	Reads	ASVs	OTUs
Acanthuriformes	Sciaenidae	<i>Pachyurus</i>	<i>Pachyurus squamipennis</i>	93	5	5
Characiformes	Erythrinidae	<i>Hoplias</i>	<i>Hoplias intermedius</i>	549.244	43	22
	Characidae	<i>Psalidodon</i>	<i>Psalidodon sp.</i>	325.079	44	17
	Characidae	<i>Moenkhausia</i>	<i>Moenkhausia costae</i>	267.344	32	9
	Characidae	<i>Astyanax</i>	<i>Astyanax lacustris</i>	135.194	44	30
	Characidae	<i>Hemigrammus</i>	<i>Hemigrammus marginatus</i>	66.161	9	5
	Prochilodontidae	<i>Prochilodus</i>	<i>Prochilodus sp.</i>	48.001	22	14
	Anostomidae	<i>Schizodon</i>	<i>Schizodon knerii</i>	31.494	15	7
	Characidae	<i>Astyanax</i>	<i>Astyanax bimaculatus</i>	23.034	13	7
	Erythrinidae	<i>Hoplias</i>	<i>Hoplias malabaricus</i>	13.605	11	11
	Anostomidae	<i>Leporinus</i>	<i>Leporinus sp.</i>	12.392	24	22
	Characidae	<i>Odontostilbe</i>	<i>Odontostilbe sp.</i>	12.019	8	5
	Anostomidae	<i>Megaleporinus</i>	<i>Megaleporinus sp.</i>	10.227	8	7
	Serrasalminidae	<i>Serrasalmus</i>	<i>Serrasalmus brandtii</i>	5.766	4	4
	Characidae	<i>Oligosarcus</i>	<i>Oligosarcus argenteus</i>	3.944	4	3
	Characidae	<i>Piabina</i>	<i>Piabina argentea</i>	2.269	3	3
	Curimatidae	<i>Steindachnerina</i>	<i>Steindachnerina elegans</i>	1.297	3	3
	Serrasalminidae	<i>Pygocentrus</i>	<i>Pygocentrus nattereri</i>	507	8	8
	Serrasalminidae	<i>Myleus</i>	<i>Myleus micans</i>	137	2	2
	Characidae	-	<i>Characidae 1</i>	32	1	1
	Serrasalminidae	<i>Colossoma</i>	<i>Colossoma macropomum</i>	30	3	3
	Anostomidae	<i>Leporellus</i>	<i>Leporellus vittatus</i>	14	3	3
	Crenuchidae	<i>Characidium</i>	<i>Characidium sp.</i>	8	1	1
Characiformes	Bryconidae	<i>Salminus</i>	<i>Salminus sp.</i>	6	1	1
Cichliformes	Cichlidae	<i>Coptodon</i>	<i>Coptodon rendalli</i>	1.890.97	102	31
				2		

	Cichlidae	<i>Oreochromis</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	39.155	28	24
	Cichlidae	<i>Geophagus</i>	<i>Geophagus brasiliensis</i>	16.502	7	6
Clupeiformes	Clupeidae	<i>Opisthonema</i>	<i>Opisthonema sp.</i>	530	1	1
Cypriniformes	Xenocyprididae	<i>Ctenopharyngodon</i>	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	4.217	4	4
	Poeciliidae	<i>Poecilia</i>	<i>Poecilia reticulata</i>	6.417	14	14
Cyprinodontiformes	Poeciliidae	<i>Poecilia</i>	<i>Poecilia latipinna</i>	91	6	6
	Gymnotidae	<i>Gymnotus</i>	<i>Gymnotus carapo</i>	6.421	8	7
	Sternopygidae	<i>Eigenmannia</i>	<i>Eigenmannia virescens</i>	94	9	9
	Sternopygidae	<i>Eigenmannia</i>	<i>Eigenmannia sp.</i>	43	5	5
Gymnotiformes	Sternopygidae	<i>Sternopygus</i>	<i>Sternopygus macrurus</i>	12	1	1
Salmoniformes	Salmonidae	<i>Salmo</i>	<i>Salmo salar</i>	1.885	3	3
	Pimelodidae	<i>Rhamdia</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	42.454	20	17
	Loricariidae	<i>Hypostomus</i>	<i>Hypostomus sp.</i>	22.416	11	6
	Pimelodidae	<i>Pimelodus</i>	<i>Pimelodus sp.</i>	7.802	24	23
	Pseudopimelodidae	<i>Lophiosilurus</i>	<i>Lophiosilurus alexandri</i>	2.499	1	1
	Clariidae	<i>Clarias</i>	<i>Clarias gariepinus</i>	1.078	2	2
	Pimelodidae	<i>Pseudoplatystoma</i>	<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>	718	3	3
Siluriformes	Trichomycteridae	<i>Trichomycterus</i>	<i>Trichomycterus sp.</i>	262	2	2
Synbranchiformes	Synbranchidae	<i>Synbranchus</i>	<i>Synbranchus marmoratus</i>	1.596	1	1

As ordens com maior número de espécies identificadas foram Characiformes (n=24) e Siluriformes (n=7), porém as ordens que apresentaram maior número de *reads* e de ASVs foram respectivamente Cichliformes, com 1.946.629 *reads* (cerca de 54,8%) atribuídas a 137 ASVs e Characiformes, com 1.507.806 *reads* (aproximadamente 42,4%) atribuídas a 318 ASVs (Quadro 6).

Após a curadoria do resultado do BLASTn, dentre as 44 espécies detectadas, 31 identificações foram feitas ao nível de espécie (gênero + epíteto específico) e 13 identificações foram feitas apenas até o nível de gênero. Cerca de 42% das identificações não foram ao nível de espécie. Essa proporção alta de identificações ao nível de espécie é devido ao processo de curadoria das sequências, necessária para que apenas sejam mantidas identificações que sejam

confiáveis e representem a comunidade que é esperada de ser encontrada, levando em conta os grupos taxonômicos que possuem registro na bacia.

Quadro 6 – Número de *Reads*, ASVs, OTUs, ordens, família, gêneros e espécies atribuídas à cada ordem taxonômica

Ordem	<i>Reads</i> totais	ASVs	OTUs	Famílias	Gêneros	Espécies
Cichliformes	1.946.629	137	61	1	3	3
Characiformes	1.507.804	306	188	8	21	23
Siluriformes	77.229	63	54	5	7	7
Gymnotiformes	6.570	23	22	2	3	4
Cyprinodontiformes	6.508	20	20	1	1	2
Cypriniformes	4.217	4	4	1	1	1
Salmoniformes	1.885	3	3	1	1	1
Synbranchiformes	1.596	1	1	1	1	1
Clupeiformes	530	1	1	1	1	1
Acanthuriformes	93	5	5	1	1	1

5.2.1. Identificações alteradas após a curadoria

5.2.1.1 *Coptodon rendalli*

Após a curadoria, a maior parte das *reads* foi atribuída à espécie exótica *Coptodon rendalli*. Inicialmente as ASVs que foram atribuídas a essa espécie tinham sido identificadas pelo BLASTn como *Tilapia rendalli* e *Coptodon zilli* (Quadro Suplementar 1). Apesar de terem sido identificadas como espécies diferentes, essas ASVs agruparam-se na árvore de Máxima Verossimilhança (Figura suplementar 1A) formando um clado onde a divergência média entre elas foi de 1,6%. Nota-se também a baixíssima proporção de *reads* identificadas como *Coptodon zilli*, sendo aproximadamente 0,0018% do total identificado como *T. rendalli*. Devido à baixa distância genética entre as sequências dessas espécies, e à baixíssima proporção de sequências atribuídas a *Coptodon zilli*, essas ASVs tiveram suas identificações alteradas para *Coptodon rendalli*, atualizando o gênero que anteriormente era denominado *Tilapia* e agrupando todas as ASVs sob essa espécie exótica que possui amplo registro de ocorrência na BHSF (Bueno et al., 2021).

5.2.1.2 *Psalidodon sp.*

As ASVs identificadas como *Psalidodon sp.* foram anteriormente identificadas pelo BLASTn como *Psalidodon rivularis*, *Astyanax cf fasciatus* e *Astyanax paranae* (Quadro Suplementar 1). Na Árvore de Máxima Verossimilhança (Figura suplementar 1A), essas ASVs agruparam-se em um único clado, com divergência média de 1,5%. Trabalhos recentes evidenciam que a espécie *Psalidodon rivularis*, endêmica do Alto São Francisco, pode ser na verdade, um complexo de espécies, devido ao acúmulo elevado de diferenças cariotípicas, morfológicas e moleculares entre os indivíduos de diferentes localidades (Oliveira, 2021). A referência para a identificação das ASVs atribuídas a *Astyanax cf fasciatus* é oriunda do nosso banco de sequências personalizado, LGC12sDB. No entanto, há um nível de incerteza na identificação morfológica do indivíduo que forneceu esta sequência. A espécie *Astyanax paranae*, descrita por Eigenmann (1914), é nativa da Bacia do Alto Rio Paraná, sem registros de introdução na BHSF. Devido a esses motivos, e às recentes revisões taxonômicas do gênero *Astyanax*, conhecido por ser o gênero que comporta maior diversidade de espécies da família Characidae (Terán et al., 2020), as identificações dessas ASVs foram alteradas para *Psalidodon sp.*

5.2.1.3 *Prochilodus sp.*

Foram recuperadas sequências de DNA que tiveram sua identificação atribuída a três espécies do gênero *Prochilodus* pelo BLASTn (Quadro Suplementar 1): *Prochilodus harttii*, *Prochilodus argenteus* e *Prochilodus vimboides*. A maior parte das *reads* atribuídas a este gênero foram identificadas como *P. harttii*, porém entre essas três espécies, *Prochilodus argenteus* e *P. costatus* possuem registro de ocorrência na BHSF na região sudeste do Brasil (Bueno et al., 2021). Na árvore de Máxima Verossimilhança essas sequências agrupam-se, e a divergência genética média entre elas é de 1,42% (Figura suplementar 1A). Hilário e colaboradores (2023) realçam que a região do gene 12S não possui resolução suficiente para discriminar as espécies *Prochilodus argenteus* e *Prochilodus harttii*, além de problemas já relatados em relação à taxonomia das espécies deste gênero (Guimarães et al., 2021) e o registro de ocorrência de híbridos (Sales et al., 2018). Devido a esses motivos, após a curadoria, todas essas ASVs foram identificadas como *Prochilodus sp.*

5.2.1.4 *Oreochromis niloticus*

As sequências identificadas pelo BLASTn como *Oreochromis sp.* e *Oreochromis niloticus* (Quadro Suplementar 1) apresentaram uma divergência média 3,1%. Apesar do grau

de distância genética ser suficiente para se considerar a detecção de sequências oriundas de espécies diferentes do gênero *Oreochromis*, a única espécie conhecida deste gênero que possui registro de introdução na BHSF é a espécie *O. niloticus*, consumida na culinária e amplamente reproduzida em cativeiro sob o nome popular de Tilápia-do-Nilo (Bueno et al., 2021; E. M. de Souza, 2022). Também é necessário ressaltar que mesmo algumas ASVs identificadas como *Oreochromis niloticus* pelo BLASTn com um alto valor de *pseudoscore* (acima de 98%) possuem uma divergência de aproximadamente 4% com outras sequências com a mesma identificação e valor de *pseudoscore*, sugerindo que esta espécie tenha um grau mais elevado de divergência intraespecífica. Devido a estes motivos, as ASVs identificadas como pertencentes ao gênero *Oreochromis* foram denominadas *Oreochromis niloticus* neste trabalho.

5.2.1.5 *Hypostomus* sp.

Aproximadamente 22 mil *reads* correspondendo a 8 ASVs distintas foram atribuídas à espécie *Hypostomus affinis* (Quadro Suplementar 1). O gênero *Hypostomus* pertence à família Loricariidae, peixes popularmente conhecidos como cascudos. A espécie *H. affinis* é nativa da Bacia do Rio Doce e do Rio Paraíba do Sul e não possui registros de introdução na BHSF, porém outras espécies do gênero *Hypostomus* são encontradas. O segundo e terceiro *hits* do BLASTn atribuíram a identificação das sequências às espécies *H. commersoni* e *Hypostomus* sp. com a mesma pontuação do primeiro *hit*. Portanto, devido a esses fatores, as sequências foram renomeadas para *Hypostomus* sp.

5.2.1.6 *Leporinus* sp.

A curadoria de sequências atribuídas ao gênero *Leporinus* sugere que o fragmento de aproximadamente 170 bp do gene 12S rRNA utilizado no eDNA *metabarcoding* não possui resolução taxonômica suficiente para diferenciar espécies congêneres. As identificações do BLASTn (Quadro Suplementar 1) atribuíram sete espécies distintas ao gênero *Leporinus* (*Leporinus crassilabris*, *Leporinus octofasciatus*, *Leporinus piau* e *Leporinus steindachneri*), mas apenas *L. piau* e *L. octofasciatus* possuem registro de ocorrência na BHSF (Bueno et al., 2021; E. M. de Souza, 2022). A divergência média entre as sequências atribuídas às diferentes espécies do gênero *Leporinus* foi de 13%, e o posicionamento das ASVs na árvore de Máxima Verossimilhança (Figura suplementar 1A) sugere a presença de mais de uma linhagem do gênero *Leporinus*. No entanto, devido à ausência de registros de coleta de peixes da Lagoa dos

Ingleses, a curadoria dessas sequências manteve a identificação apenas ao nível de gênero, buscando uma identificação mais cautelosa.

5.2.1.7 *Pimelodus* sp.

As sequências atribuídas ao gênero *Pimelodus* pelo BLASTn (Quadro Suplementar 1) apresentaram divergência média de 0,9%. Foram identificadas quatro espécies diferentes: *Pimelodus albicans*, *Pimelodus fur*, *Pimelodus maculatus* e *Pimelodus mysteriosus*. Dentre essas espécies, apenas *P. fur* e *P. maculatus* ocorrem na BHSF (Bueno et al., 2021; E. M. de Souza, 2022). Na árvore de Máxima Verossimilhança (Figura suplementar 1A), as sequências identificadas como *Pimelodus* agruparam-se com duas ASVs de *Iheringichthys labrosus*, espécie nativa da Bacia do Rio Paraná e sem registros atuais para as bacias do sudeste do Brasil (Bueno et al., 2021). A divergência média das sequências de *I. labrosus* em relação às sequências de *Pimelodus* é inferior a 3%. Após descartada a possibilidade de contaminação, todas as sequências atribuídas a diferentes espécies do gênero *Pimelodus*, tiveram sua identificação alterada para *Pimelodus* sp., junto com as ASVs previamente atribuídas à espécie *Iheringichthys labrosus*.

5.2.1.8 *Odontostilbe* sp.

A resolução taxonômica da região do gene 12s rDNA empregada para *mini-barcoding* pode ser considerada insuficiente na distinção entre os gêneros *Odontostilbe* e *Serrapinnus*, ambos pertencentes à subfamília Cheirodontinae. Um total aproximado de 2 mil *reads* foi atribuído à espécie *Serrapinnus heterodon* (Quadro Suplementar 1), um caracídeo nativo das Bacias dos Rios São Francisco e Paraná, apesar de apresentar um *pseudoscore* de 97. Na árvore de Máxima Verossimilhança (Figura suplementar 1A), as ASVs desta espécie agruparam-se junto das ASVs identificadas como *Odontostilbe* sp., com uma divergência genética média de 1,2%. No entanto, entre as sequências identificadas como *Odontostilbe* sp., a distância genética média foi de 1,4%, maior que a distância entre as sequências atribuídas a *Serrapinnus heterodon*.

Importante notar que as ASVs desta última espécie foram identificadas exclusivamente na mesma amostra que aquelas reconhecidas como provenientes de *Odontostilbe* sp.. Diante dessas constatações e após a devida curadoria das identificações, todas essas ASVs foram finalmente categorizadas como *Odontostilbe* sp..

5.2.1.9 *Megaleporinus* sp.

Cerca de 10 mil *reads* foram identificadas pelo BLASTn como oriundas da espécie *Megaleporinus garmani*, espécie pertencente à Bacia do Rio Jequitinhonha (Quadro Suplementar 1). Atualmente sabe-se que apenas a espécie *Megaleporinus obtusidens* é natural da BHSF, tendo as espécies congêneres *M. piavussu*, *M. macrocephalus* e *M. elongatus* sido introduzidas artificialmente na bacia (Souza, 2021). Buscando então uma identificação mais conservadora, as sequências foram atribuídas apenas ao nível do gênero *Megaleporinus* sp..

5.2.1.10 *Gymnotus carapo*

Aproximadamente 90% das *reads* que foram atribuídas ao gênero *Gymnotus* foram identificadas como oriundas da espécie *Gymnotus sylvius* (Quadro Suplementar 1). Esta espécie descrita em 1999 por Almeida-Toledo e colaboradores (Albert et al., 1999) é considerada nativa da Bacia do Rio Paraná no estado de São Paulo. Sua introdução na BHSF ocorreu devido ao processo de Transposição do Rio São Francisco (Souza, 2021), porém, este processo impacta apenas as bacias dos rios temporários do Semiárido, localizadas nos estados do Nordeste Setentrional, mais especificamente em Pernambuco, Paraíba, Ceará e Rio Grande do Norte (de Castro, 2011). Assim, apesar da confiabilidade da identificação pelo BLASTn (pseudoscore de 100 para as duas ASVs identificadas como *G. sylvius*), essas sequências tiveram suas identificações alteradas para a espécie *Gymnotus carapo*, que possui registro de ocorrência na bacia (Barbosa et al., 2017) e apenas 2% de divergência das sequências identificadas como pertencentes a *G. sylvius*.

5.2.1.11 *Opisthonema* sp.

Entre as sequências possivelmente oriundas de espécies exóticas encontradas nas amostras da lagoa, o BLASTn atribuiu a identificação de *Opisthonema libertate* a 530 *reads* (Quadro Suplementar 1). Esta espécie da família Clupeidae é encontrada na região do Oceano Pacífico Oriental, desde o Golfo do México até o Chile, e é amplamente consumida em diversos países (Ruiz-Domínguez et al., 2018). Porém, no Brasil, a espécie deste gênero que é consumida é a *Opisthonema oglinum* (Lesueur, 1818), popularmente conhecida como Sardinha-Laje, abundante no litoral do Nordeste Brasileiro, sendo a única representante deste gênero na costa Atlântica das Américas (Simoni, 2019). Apesar da identificação do BLASTn não ter sido robusta a nível de espécie, apresentando um *pseudoscore* de 95,48, os três maiores *hits* foram com sequências do gênero *Opisthonema*, respectivamente, *O. libertate*, *O. medirastre* e *O.*

oglinum. Este último *hit* apesar de ter uma cobertura de 80%, possui 100% de identidade entre a sequência encontrada na amostra e a sequência depositada.

É improvável que as sequências atribuídas a este gênero sejam oriundas de indivíduos vivos, já que estas espécies são nativas de ambientes marinhos. Porém, em 2021, um trabalho conduzido por pesquisadores em Taiwan, demonstrou que é possível recuperar eDNA oriundo de espécies de peixes comercializadas para o consumo humano em amostras de água descartada por drenos de estabelecimentos que comercializam produtos marinhos (Lee et al., 2021). Podemos supor então que essas sequências não são um falso positivo, mas podem representar algum descarte de material biológico na Lagoa dos Ingleses. Portanto, devido a essas condições, as sequências identificadas como *Opisthonema libertate* foram mantidas no *pool* de sequências e foram alteradas para *Opisthonema sp.*

5.2.1.12 Characidae 1

Apenas 32 *reads* foram atribuídas à espécie *Planaltina myersi* (Quadro Suplementar 1), porém com um *pseudoscore* de 93,7. Não existem evidências da ocorrência desta espécie na BHSF, porém, Barbosa e colaboradores (2017) citam que existem diversos registros na literatura da ocorrência de *Planaltina sp.* na bacia, mas ainda sem caracterização a nível de espécie. Devido ao baixo valor de *pseudoscore* e à ausência de mais evidências que permitam elucidar qual a identificação mais adequada para esta ASV, foi mantido a nível de família.

5.2.1.13 *Colossoma macropomum*

No *pool* de sequências, 30 *reads* foram identificadas como pertencentes à espécie *Piaractus brachypomus* (Quadro Suplementar 1). Esta espécie popularmente conhecida como Pirapitinga é improvável de ser encontrada na Lagoa dos Ingleses, por ser oriunda da Bacia do Rio Amazonas e do Rio Orinoco. Porém, ao avaliar os outros *top hits* do BLASTn, o segundo resultado atribuiu às sequências a identificação de *Colossoma macropomum*, também com 100 pontos de *pseudoscore*. Esta espécie é introduzida na BHSF, sendo a segunda espécie mais cultivada na piscicultura brasileira (Souza, 2022). Portanto, após a curadoria, as duas ASVs previamente denominadas *Piaractus brachypomus* foram renomeadas para *Colossoma macropomum*.

5.2.1.14 *Salminus sp.*

A identificação de *Salminus brasiliensis* feita pelo BLASTn atribuiu a 6 *reads* uma identificação com *pseudoscore* elevado, de aproximadamente 98. Os três maiores *hits* atribuíram a mesma identificação às sequências. Porém, apenas as espécies *Salminus franciscanus* e *Salminus hilarii* possuem registros de ocorrência para a BHSF. Sendo assim, essas sequências tiveram sua identificação alterada para *Salminus sp.*.

5.2.2. Identificações atribuídas a espécies exóticas sem registros para a BHSF

Foram detectadas ASVs que foram atribuídas a algumas espécies exóticas entre as amostras. Aproximadamente 53% de todo o total de *reads* pertencentes à classe Actinopteri foram identificadas como oriundas da espécie *Coptodon rendalli* (Quadros 4 e 5), popularmente conhecida como Tilápia-de-barriga-vermelha, nativa do norte do continente africano e do Oriente Médio. Outro ciclídeo exótico norte africano foi detectado, *Oreochromis niloticus*, popularmente chamada de Tilápia-do-Nilo. Ambas as espécies são amplamente usadas na piscicultura e são muito relevantes comercialmente devido ao seu emprego na alimentação. Sendo a formação de híbridos realizadas pelos piscicultores. entre Também foram identificadas ASVs como pertencentes à espécie *Ctenopharyngodon idella*, espécie asiática conhecida por Carpa-do-limo, empregada no aquarismo e no controle de macrófitas (Leslie Jr. et al., 1987). Porém, apesar de serem espécies exóticas, possuem amplo registro de introdução e ocorrência nas bacias brasileiras, incluindo na Bacia do Rio São Francisco (Barbosa et al., 2017; Bueno et al., 2021; Souza, 2021; Souza, 2022).

Apesar das diferentes etapas de filtragem e de curadoria, objetivando a eliminação de sequências espúrias, artefatos, contaminações, erros de sequenciamento e problemas de identificação, foram identificadas ASVs pertencentes às espécies marinhas *Salmo salar* e *Opisthonema sp.* Os valores de *Pseudoscore* e de *e-value* atribuídos a esses *hits* pelo BLASTn (Quadro Suplementar 3) excluem a possibilidade de terem identificações espúrias. É improvável que essas espécies tenham sido introduzidas na Lagoa dos Ingleses, mas por serem espécies comumente usadas na alimentação humana, é possível que tenham sido detectadas devido ao descarte irregular de esgoto ou material biológico na lagoa. Uma reportagem do jornal O Tempo, publicada em Novembro de 2008, relata que um laudo da Fundação Estadual do Meio Ambiente (Feam) realizado com análises feitas pela Copasa (Companhia de Saneamento de Minas Gerais) apontaram a presença de coliformes fecais acima do limite normal nas águas da Lagoa dos Ingleses (Carvalho, 2008; Vidigal, 2008). Portanto, é possível que ainda ocorra o despejo irregular de esgoto na lagoa, levando à contaminação de suas águas.

5.3. Análises ecológicas

5.3.1. Monitoramento temporal 2020 a 2022 realizado com o filtro MCE

A **Figura 2** apresenta uma visão geral da composição da comunidade da Lagoa dos Ingleses baseada na riqueza de Ordens. A maior parte das espécies detectadas pertence às ordens Characiformes e Siluriformes, seguidas por Cichliformes e Gymnotiformes.

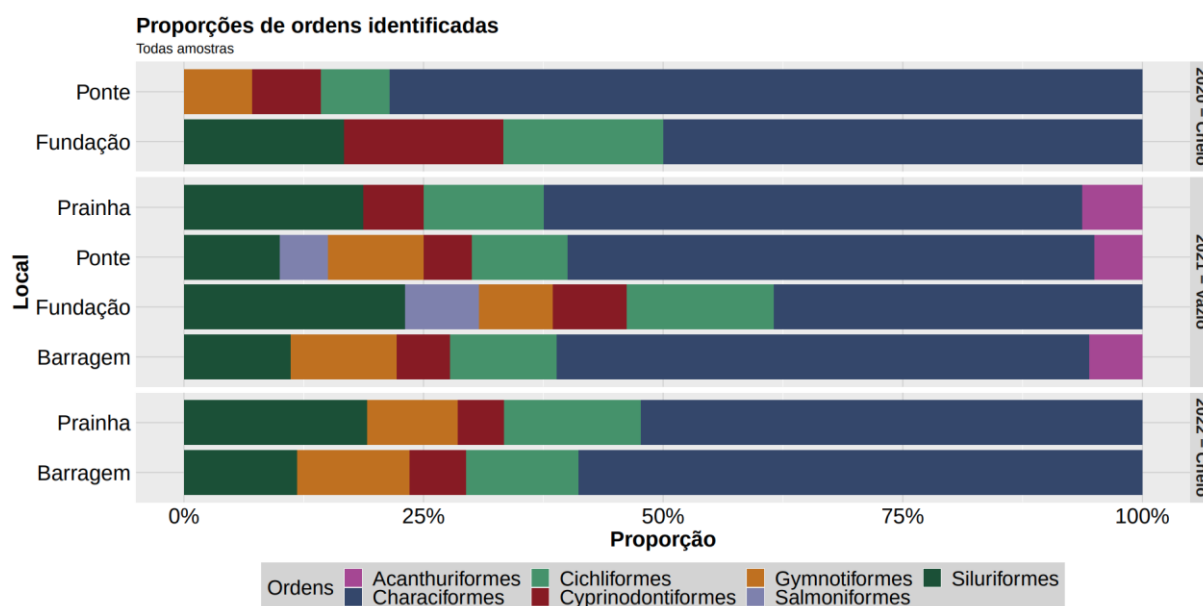


Figura 2 – Proporção de ordens identificadas por ponto em cada ano. O tamanho das barras é proporcional à riqueza de espécies identificadas em cada ordem.

Podemos observar que, ao longo das coletas, a proporção de espécies detectadas pertencentes a cada ordem se manteve praticamente constante, sendo que a ordem com mais espécies detectadas em todos os pontos em todo período avaliado foi Characiformes, tendo 23 espécies detectadas (Quadro Suplementar 1, Figura 2), com uma variação de riqueza por ponto entre 38,5% no ponto *Fundação*, em 2021 (lagoa vazia) a 78,6% no ponto *Ponte* em 2020 (lagoa cheia) (Figura 2). Em Characiformes, as famílias que tiveram maior riqueza de espécies detectadas foram Characidae com 9 espécies e variação de riqueza entre 17,6% a 42,9% e Anostomidae com 5 espécies e variação de 5,6% a 18,8% (Figura 3).

Em seguida, a ordem com maior diversidade de espécies foi Siluriformes, com 7 espécies detectadas (Quadro Suplementar 1, Figura 2), variando de 10% do total de riqueza de espécies das amostras coletadas no ponto *Ponte* em 2021 (lagoa vazia) para 23% no ponto *Fundação* em 2021 (lagoa vazia) (Figura 2). Não ocorreu a detecção de nenhuma espécie pertencente à Siluriformes no ponto *Ponte* em 2020 (lagoa cheia). Siluriformes foi representada

principalmente pelas famílias Pimelodidae (5,9% a 23,1%) e Loricariidae (4,8% a 5,9%)(Figura 3).

Por último, a ordem Cichliformes teve a terceira maior diversidade de espécies, representada por 3 espécies diferentes (Quadro Suplementar 1, Figura 2). Sua variação de riqueza se deu de 7,1% a 16,7% (Figura 2). Cichlidae foi a única família detectada da ordem (Figura 3). Além de Cichliformes, as ordens Characiformes e Cyprinodontiformes foram detectadas em todos os pontos amostrais em todos os anos da série temporal.

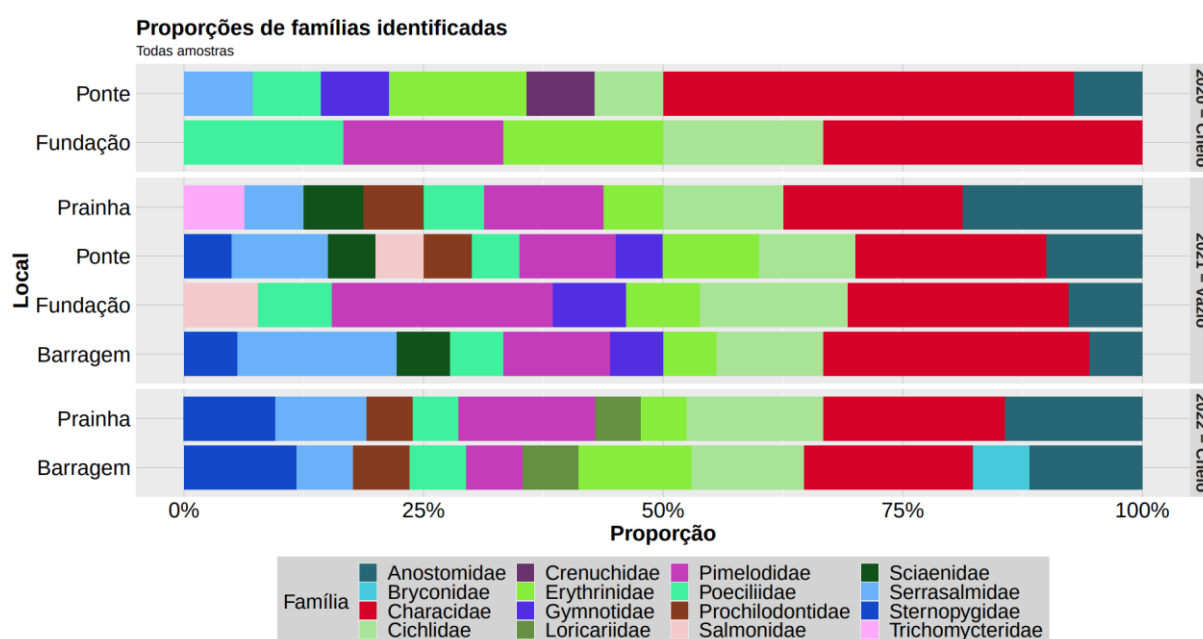


Figura 3 – Proporção de famílias identificadas por ponto em cada ano. O tamanho das barras é proporcional à riqueza de espécies identificadas em cada família.

Apenas nas amostras de 2021, coletadas quando a lagoa estava com o nível mais baixo, foi possível detectar todas as cinco ordens desta série temporal (Figura 2). Neste momento foi possível detectar as ordens Acanthuriformes, representada por sequências identificadas como pertencentes à espécie *Pachyurus squamipennis* (Corvina) e Salmoniformes, representada por sequências pertencentes à espécie marinha *Salmo salar* (Salmão) (Figura 4).

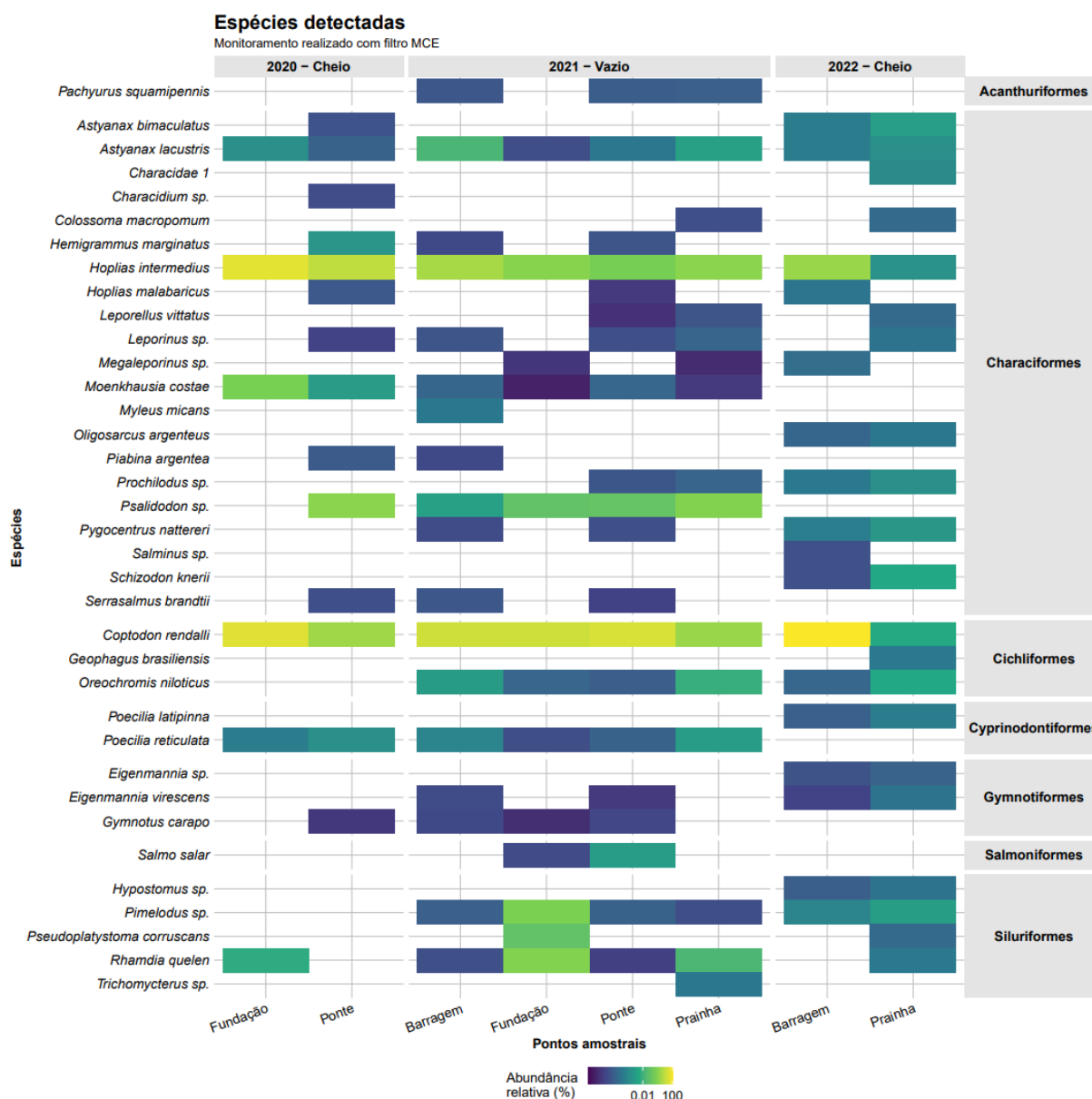


Figura 4 – Espécies identificadas por ponto em cada ano. As cores representam a abundância relativa de *reads* em cada amostra.

Sequências identificadas como oriundas das espécies *Astyanax lacustris* (Lambari-de-rabo-amarelo) e *Hoplias intermedius* (Traíra) foram as únicas atribuídas à ordem Characiformes que foram identificadas em todos os pontos amostrais, em todo o período avaliado (Figura 4). Em relação à ordem Cichliformes, a espécie *Coptodon rendalli* (Tilápia-de-barriga-vermelha) foi a única espécie detectada em todos os pontos, em todo o período. Além disso, apresentou a maior abundância relativa de *reads* em todos os pontos amostrais em todo o período do estudo, exceto Prainha em 2022 (Figura 4). As *reads* atribuídas apenas a essa espécie representaram um total de ~50,8% de todas as *reads* identificadas neste trabalho.

5.3.2. Comparação de espécies detectadas pelos filtros MCE e Sterivex

Na campanha efetuada em Novembro de 2021, foram filtradas amostras *in loco* utilizando o filtro tipo cartucho Sterivex e foram coletadas réplicas de água para filtragem no laboratório com o filtro de membrana MCE. As amostras filtradas com cada tipo de filtro foram sequenciadas em plataformas distintas: Illumina MiniSeq para amostras filtradas com MCE e Illumina NextSeq 2000 para amostras filtradas com Sterivex. O Quadro 7 apresenta o número total de *reads* por amostra e plataforma. Observa-se maior variabilidade nas quantidades de *reads* entre as amostras sequenciadas pela plataforma Illumina MiniSeq em comparação com a plataforma Illumina NextSeq 2000, que apresentou quantidades mais homogêneas. No entanto, em relação ao total de *reads* produzidas, ambas as plataformas apresentaram resultados semelhantes, com a plataforma Illumina MiniSeq gerando 11,31% a mais de *reads*.

Quadro 7 – Número de Reads e Reads totais por amostra e por sequenciamento

Filtro	Plataforma	Amostra	Ponto	Reads	Reads totais
MCE	MiniSeq	L1_nov21	Prainha	66.387	810.211
		L2_nov21	Barragem	178.510	
		L3_nov21	Ponte	49.597	
		L4_nov21	Fundação	515.717	
Sterivex	NextSeq 2000	STX_L1_nov21	Prainha	218.760	718.520
		STX_L2_nov21	Barragem	278.279	
		STX_L3_nov21	Ponte	220.688	
		STX_L4_nov21	Fundação	793	

Nesta campanha, com o filtro MCE foram detectadas 23 espécies (Figura 5), de 12 famílias (Characidae, Serrasalminidae, Cichlidae, Sternopygidae, Gymnotidae, Erythrinidae, Anostomidae, Sciaenidae, Pimelodidae, Poeciliidae, Prochilodontidae e Salmonidae) pertencentes a 7 ordens (Characiformes, Cichliformes, Gymnotiformes, Acanthuriformes, Siluriformes, Cyprinodontiformes e Salmoniformes). Com o filtro Sterivex foram identificadas 33 espécies (Figura 5), de 17 famílias (Characidae, Clariidae, Serrasalminidae, Cichlidae, Xenocypridae, Sternopygidae, Gymnotidae, Erythrinidae, Loricariidae, Anostomidae, Pseudopimelodidae, Clupeidae, Pimelodidae, Poeciliidae, Prochilodontidae, Curimatidae e Synbranchidae) pertencentes a 8 ordens (Characiformes, Siluriformes, Cichliformes, Cypriniformes, Gymnotiformes, Clupeiformes, Cyprinodontiformes e Synbranchiformes).

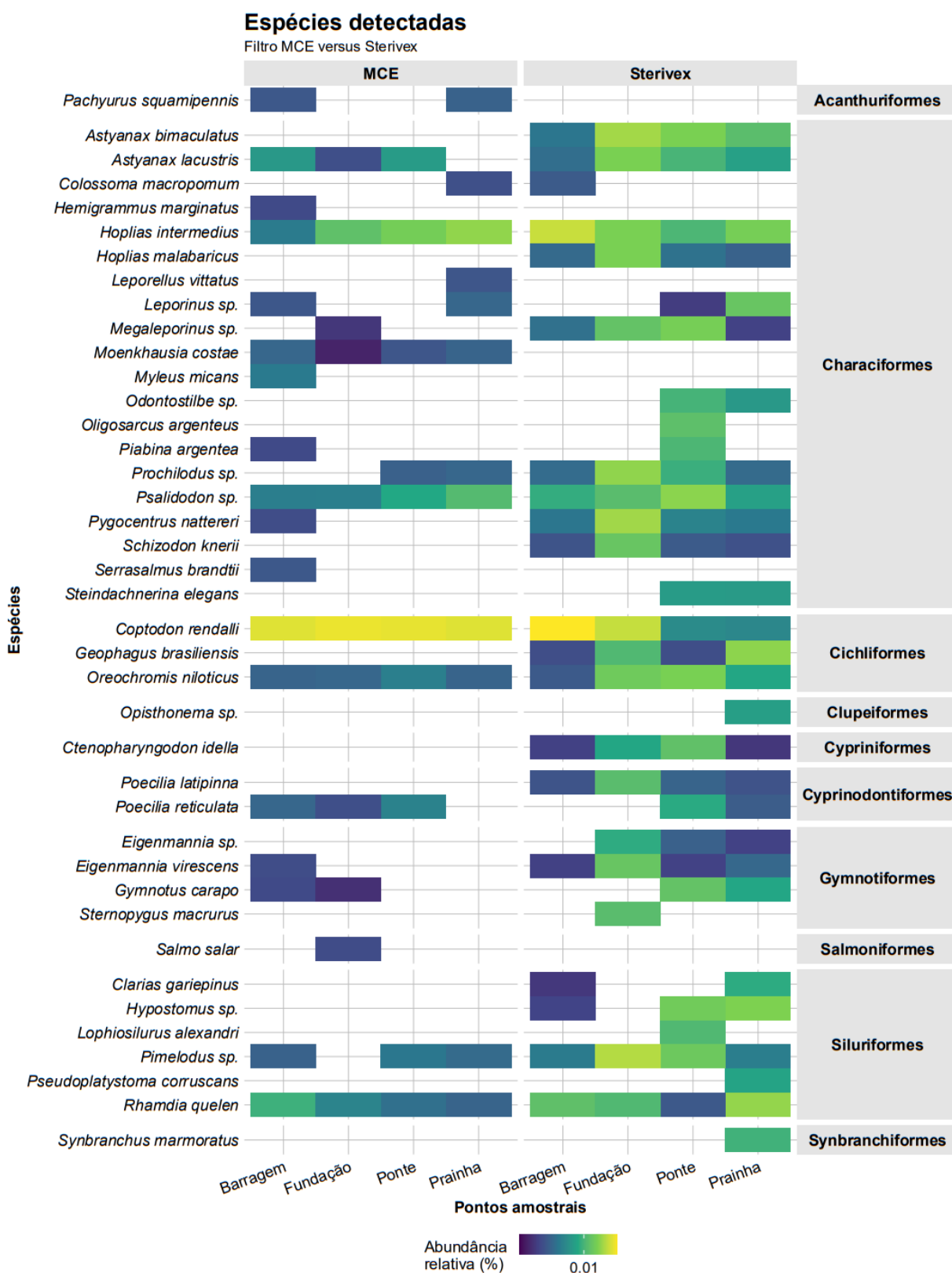


Figura 5 – Comparação entre as espécies detectadas com filtro MCE e com filtro Sterivex. As cores representam a abundância relativa de *reads* em cada amostra.

A metodologia utilizando o filtro Sterivex permitiu recuperar um número maior de identificações (n=33 espécies) e cerca de 17 espécies únicas (42,5% do total), não detectadas

utilizando o filtro MCE, que detectou 7 espécies exclusivas (17,5% do total), como mostra o diagrama de Venn da Figura 6.

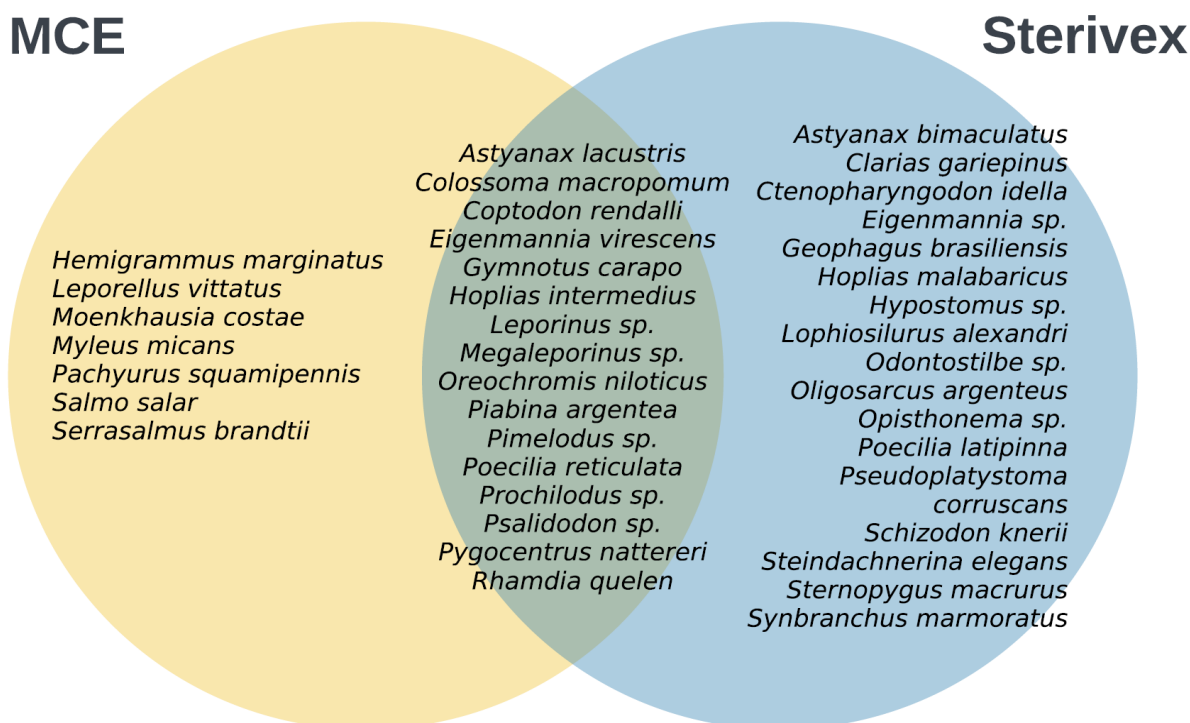


Figura 6 – Diagrama de Venn comparando as espécies detectadas com filtro MCE e com filtro Sterivex.

Apesar da diferença na detecção de espécies exclusivas, ambas as metodologias permitiram a identificação de 16 espécies em comum, totalizando 40% das espécies identificadas nesta campanha.

As “espécies” *Hoplias intermedius* (Traíra), *Moenkhausia costae* (Tetra fortuna), *Psalidodon sp.*, *Coptodon rendalli* (Tilápia-de-barriga-vermelha), *Oreochromis niloticus* (Tilápia-do-Nilo) e *Rhamdia quelen* (Bagre) foram detectadas em todos os pontos amostrais utilizando a metodologia do filtro MCE. Além delas, a metodologia usando o filtro Sterivex também detectou em todos os pontos ASVs identificadas como pertencentes a: *Astyanax bimaculatus* (Lambari), *Astyanax lacustris* (Lambari), *Hoplias intermedius* (Traíra), *Megaleporinus sp.*, *Prochilodus sp.*, *Pygocentrus nattereri* (Piranha), *Schizodon knerii* (Piau-branco), *Geophagus brasiliensis* (Cará), *Ctenopharyngodon idella* (Carpa-do-limo), *Poecilia latipinna* (Barrigudinho), *Eigenmannia virescens* (Ituí transparente) e *Pimelodus sp.* Entre as ASVs detectadas em todos os pontos, apenas as identificadas como pertencentes à espécie *Moenkhausia costae* não foram detectadas nas amostras filtradas com Sterivex (Figura 5). A

diferença entre a riqueza de espécies recuperadas pelos dois filtros (α -diversidade) foi significativa (p -value = 0.029; Figura 7).

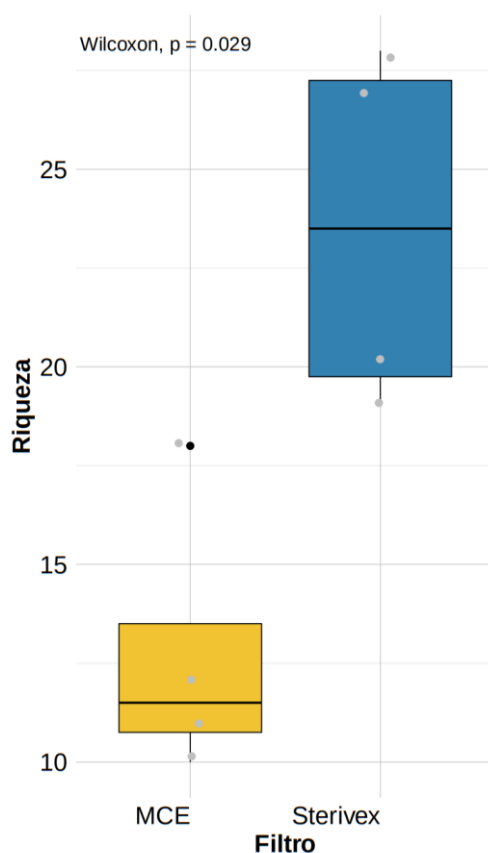


Figura 7 – Box Plot comparando a riqueza de espécies recuperadas em cada metodologia, filtragem por MCE e Sterivex.

O gráfico de PCoA baseado nos índices de β -diversidade das amostras demonstrou uma clara separação entre as comunidades obtidas usando os dois métodos de amostragem, sem sobreposição entre as riquezas de espécies recuperadas pelas duas metodologias ($R^2 = 2.75$, p -value = 0.011; Figura 8).

<i>Índice</i>	<i>Df</i>	<i>Sum Sq</i>	<i>R²</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>
Jaccard	1	0.0275	0.0275	13.1	0.011

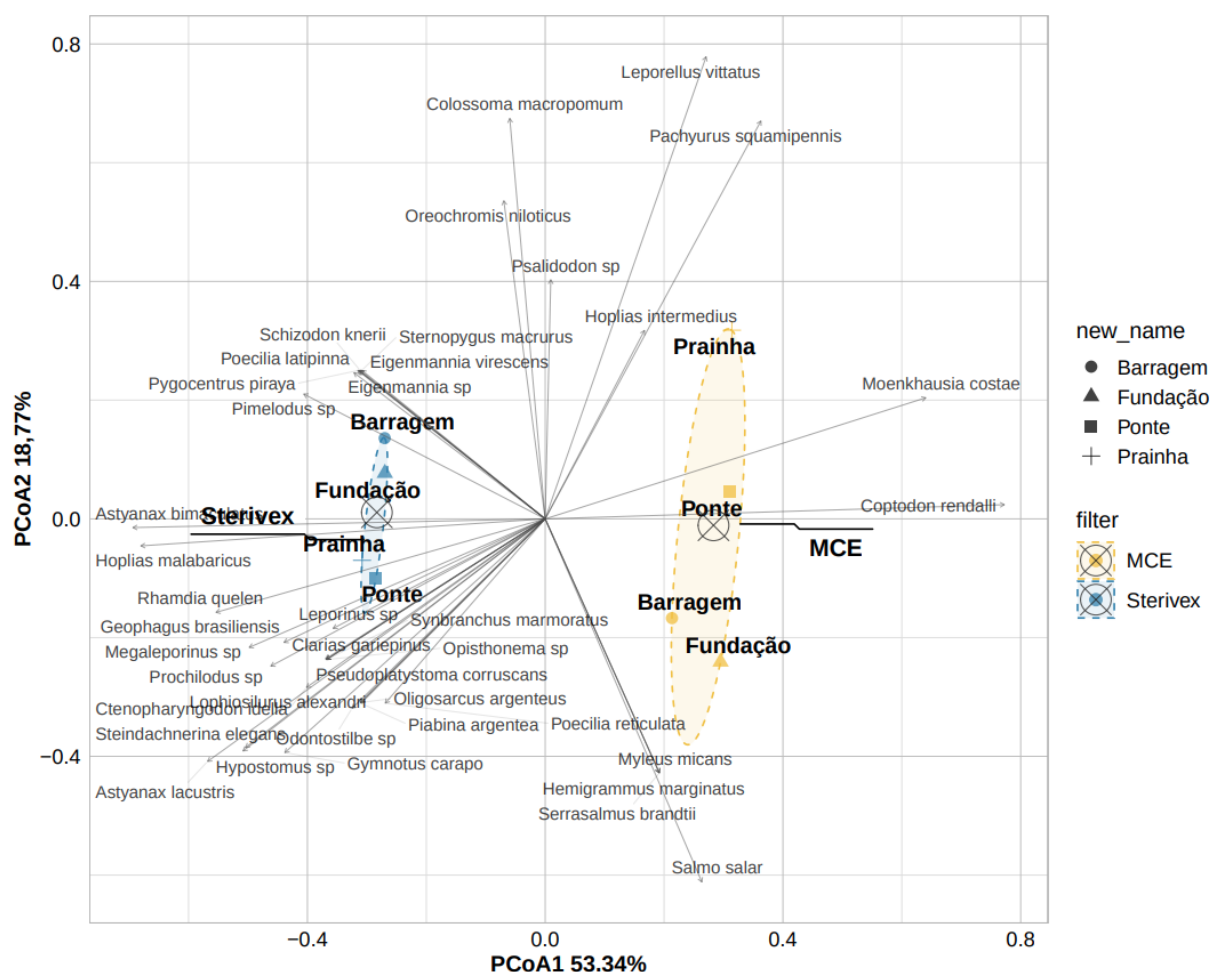


Figura 8 – PCoA plot comparando as comunidades recuperadas com cada metodologia, filtragem por MCE e Sterivex. A posição dos nomes indica as espécies determinantes para a separação dos grupos

O diagrama de dispersão (Figura 9) demonstrou uma correlação positiva forte e significativa ($p\text{-value} = 0.0088$) entre as abundâncias (número de *reads*) recuperadas com os dois tipos de filtro. Podemos deduzir que apesar das diferenças de recuperação de espécies entre as duas metodologias, em geral os dois filtros recuperam informações complementares. É importante observar que, apesar de haver correlação para algumas das identificações, a grande maioria das identificações detectadas por uma metodologia não é detectada pela outra, como se pode ver pelos pontos localizados nos eixos x e y (valores = 0 em alguma das metodologias).

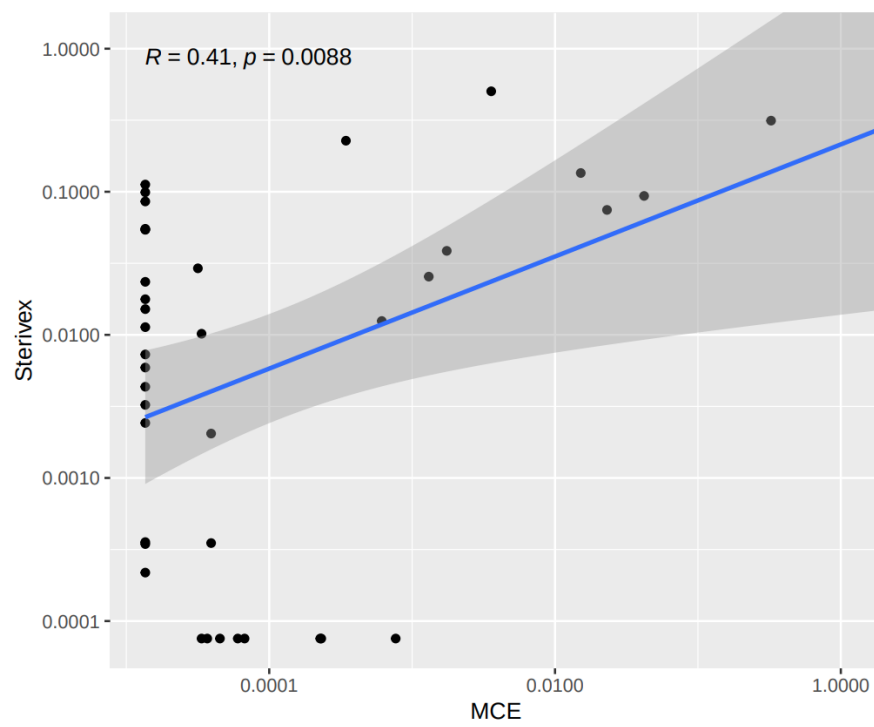


Figura 9 – Diagrama de dispersão comparando as comunidades recuperadas com cada metodologia, filtragem por Sterivex e MCE.

6. DISCUSSÃO

Neste projeto, utilizamos a metodologia de eDNA *metabarcoding* para elucidar a ictiofauna de um reservatório de água doce urbano situado na região neotropical. Ressalta-se que, mesmo com um número reduzido de pontos amostrais em comparação a outras pesquisas em lagoas urbanas de tamanho similar (Di Muri et al., 2020; Zhang et al., 2020), foi possível identificar 44 espécies de peixes na Lagoa dos Ingleses. Essa diversidade encontra-se em consonância com a fauna registrada na Bacia do Rio das Velhas e no Alto da Bacia do Rio São Francisco (Barbosa et al., 2017; Bueno et al., 2021; Souza, 2021; Souza, 2022). Ademais, a Lagoa dos Ingleses está inserida em um ambiente de urbanização recente, e o seu biomonitoramento pode ser fundamental para a conservação das espécies que a habitam. O biomonitoramento de sistemas hídricos urbanos é crucial para o manejo e a preservação de espécies que habitam esses locais que são impactados pela crescente supressão e fragmentação de habitats (Kemp, 2014). Parques, rios e lagos podem servir como refúgios de biodiversidade em ambientes urbanizados, e o eDNA *metabarcoding* demonstra ser eficiente para a compreensão da diversidade desses habitats. Devido à expansão da urbanização sobre ambientes naturais, o manejo e a conservação de espécies que habitam locais urbanizados são essenciais para a manutenção da vida selvagem e para a própria vida humana (Zhang et al., 2023).

6.1. Identificação e curadoria taxonômica

Neste trabalho foram feitas 44 identificações de espécies de peixes. Entre essas identificações, apenas *Salmo salar* e *Opisthonema sp.* não possuem qualquer registro de ocorrência na BHSF e podem ser oriundas de descarte irregular de esgoto doméstico ou resíduos na Lagoa dos Ingleses. As identificações foram refinadas após uma extensa etapa de curadoria integrativa das identificações atribuídas automaticamente usando o critério de *pseudoscore*. Antes da curadoria, foram identificadas 63 espécies pertencentes a 43 gêneros (Quadro suplementar 3). Após a curadoria, o número de espécies reduziu para 44, de 39 gêneros (Quadro 5). A curadoria integrativa, apesar de ser laboriosa, é uma etapa crucial no eDNA *metabarcoding*, por impactar diretamente na acurácia dos resultados. A identificação taxonômica automática feita por *softwares* como BLASTn e DADA2 não leva em conta a falta de resolução taxonômica das sequências curtas das moléculas de eDNA (<200pb), além da ausência de dados ecológicos e metadados importantes, tais como abundância de *reads*, listas de ocorrência de espécies e outras informações que podem ser essenciais para discriminar

identificações espúrias de identificações acuradas. Essa etapa, realizada com o trabalho conjunto de ictiólogos e bioinformatas, pode ajudar a minimizar as limitações do *metabarcoding* de eDNA, como incompletude de bancos de dados, resolução limitada da região de análise, *barcoding gap*, etc. (Jackman et al., 2021). Esse trabalho conjunto não pode limitar-se apenas às análises, mas usar as informações obtidas para poder caracterizar novos grupos ou espécies que possuem baixa representatividade em bancos de dados.

6.2. Riqueza de espécies, ASVs e OTUs

A riqueza de ASVs (n=563, Quadro 5) e de OTUs (n=359, Quadro 5), foi maior do que a riqueza de espécies (n=44, Quadro 5), indicando superestimação da diversidade. Essa discrepância decorre da capacidade de uma mesma espécie poder ser representada por múltiplas ASVs/OTUs. Apesar da utilização frequente de ASVs/OTUs como *proxy* para espécies, a relação entre essas categorias de classificação taxonômica é controversa. Seu uso pode levar à superestimação da diversidade, especialmente devido à presença de diferentes haplótipos, espécies crípticas, ocorrência de híbridos, e escolha de *thresholds* arbitrários na inferência de ASVs/OTUs. Hilário et al. (2023) demonstraram a superestimação de ASVs/OTUs mesmo em *mock communities*, sugerindo que os valores obtidos podem refletir a variabilidade intraespecífica natural das populações. Devido a esses motivos, o *metabarcoding* livre de taxonomia (*taxonomy-free metabarcoding*), proposto para estudos em ambientes megadiversos com carência de espécies descritas (Mächler et al., 2021), deve ser utilizado com cautela.

6.3. Monitoramento temporal

Apesar do esforço amostral reduzido quando comparado a outros estudos que avaliaram reservatórios de tamanho semelhante ou menor, (Di Muri et al., 2020; H. Li et al., 2022; Zhang et al., 2020) neste trabalho houve o emprego de um maior esforço temporal, com cinco campanhas em três anos distintos, abrangendo períodos de seca e chuvas (Quadro 1). Essa estratégia possibilitou a detecção de oito espécies que foram detectadas apenas uma vez: *Characidium sp.*, *Lophiosilurus alexandri*, *Myleus micans*, *Opisthonema sp.*, *Salminus sp.*, *Sternopygus macrurus*, *Synbranchus marmoratus* e *Trichomycterus sp.*. Já é difundido que a coleta de replicatas espaciais, com amostras em diferentes pontos do ambiente, é conhecida por aumentar a probabilidade de detecção de espécies raras ou com distribuição restrita (Di Muri et al., 2020). No entanto, a coleta em diferentes períodos também otimiza a detecção, já que, devido às particularidades ecológicas de cada espécie, elas podem apresentar flutuações

populacionais e diferentes estágios do desenvolvimento, influenciando a taxa de liberação de eDNA ao longo do tempo (Bedwell & Goldberg, 2020). Para animais ectotérmicos como os peixes, a temperatura ambiente também influencia a liberação do eDNA, pois esses indivíduos tendem a ser mais ativos em temperaturas mais elevadas (A. S. Buxton et al., 2017). Porém, existe um *tradeoff* entre a quantidade de eDNA liberada e a sua degradação, já que temperaturas maiores também favorecem a degradação do material genético (Bedwell & Goldberg, 2020). Na região neotropical esse fenômeno é potencializado pela maior incidência de radiação solar e temperaturas médias mais elevadas (Barnes et al., 2014; Matheson et al., 2010; Pilliod et al., 2014).

Devido à ausência de ASVs nas amostras dos pontos *Ponte e Fundação* da campanha que foi realizada em 2022 (lagoa cheia), não foi possível realizar a comparação entre a ictiofauna que foi recuperada com o reservatório com nível alto (2022) e o com o nível baixo (2021), durante a época de estiagem.

6.4. Monitoramento espacial

Neste trabalho todas as amostras foram coletadas na margem da lagoa. Em um estudo conduzido por Zhang e colaboradores em 2020, onde foi utilizado o eDNA *metabarcoding* para realizar o monitoramento da ictiofauna de reservatórios de água doce de diferentes tamanhos (0,03 km², 1,22 km² e 43,4 km²), concluiu-se que a amostragem na margem ou no leito irá recuperar a mesma biodiversidade, para os dois reservatórios menores. Já o reservatório maior que foi avaliado pelos pesquisadores possui uma biodiversidade mais heterogênea, e houve uma diferença significativa entre as espécies detectadas nas amostras da margem e as espécies detectadas nas amostras do leito. A Lagoa dos Ingleses possui 2,27 km², tendo uma área semelhante à do reservatório intermediário avaliado por este trabalho. Porém quando em máxima capacidade ela chega a ter 18 m de profundidade, sendo mais próxima do reservatório do trabalho de Zhang que possui 43,4 km². Desta maneira, podemos concluir que a Lagoa dos Ingleses possui uma maior heterogeneidade de ambientes e de hidrodinâmica.

Na nossa avaliação os pontos apresentaram diversidades semelhantes, sendo que cerca de metade das espécies detectadas são compartilhadas entre eles: *Astyanax bimaculatus*, *Astyanax lacustris*, *Hoplias intermedius*, *Hoplias malabaricus*, *Megaleporinus sp.*, *Moenkhausia costae*, *Prochilodus sp.*, *Psalidodon sp.*, *Pygocentrus nattereri*, *Schizodon knerii*, *Coptodon rendalli*, *Geophagus brasiliensis*, *Oreochromis niloticus*, *Ctenopharyngodon idella*, *Poecilia latipinna*, *Poecilia reticulata*, *Eigenmannia sp.*, *Eigenmannia virescens*, *Gymnotus carapo*, *Pimelodus sp.* e *Rhamdia quelen*. Apesar disso, houve espécies detectadas com menor

frequência, que não seriam detectadas sem a avaliação de todos os pontos amostrais: *Pachyurus squamipennis*, *Characidae 1*, *Characidium sp.*, *Colossoma macropomum*, *Hemigrammus marginatus*, *Leporellus vittatus*, *Leporinus sp.*, *Myelus micans*, *Odontostilbe sp.*, *Oligosarcus argenteus*, *Piabina argentea*, *Salminus sp.*, *Serrasalmus brandtii*, *Steindachnerina elegans*, *Sternopygus macrurus*, *Clarias gariepinus*, *Hypostomus sp.*, *Lophisilurus alexandri*, *Pseudoplatystoma corruscans*, *Synbranchus marmoratus* e *Trichomycterus sp.*. Um estudo conduzido com menor esforço amostral provavelmente detectaria apenas as espécies com maior abundância, ignorando as menos frequentes.

Devido às características do reservatório, é possível que um estudo conduzido com mais pontos amostrais pudesse detectar mais espécies. Portanto, sugerimos que estudos futuros considerem a inclusão de um número maior de pontos amostrais para uma avaliação mais precisa da diversidade e das possíveis diferenças entre os pontos.

6.5. Influência do método de captura de eDNA: MCE e Sterivex

Neste trabalho também avaliamos o emprego de duas metodologias distintas na captura de DNA ambiental, sendo um protocolo com uso do filtro aberto MCE e um segundo protocolo adaptado utilizando do filtro Sterivex. Ambas metodologias possuem suas vantagens e desvantagens próprias. Filtros MCE permitem filtragem de maiores quantidades de água antes de saturar (Y. Li et al., 2018; Takahashi et al., 2020), mas estão mais sujeitos à contaminação por ficarem expostos ao ar durante a filtragem. O protocolo que emprega estes filtros também pode favorecer a degradação do material genético, já que a filtragem exige infraestrutura específica (*manifold* e bomba elétrica), geralmente realizada em laboratório. Assim, as amostras precisam ser transportadas antes da filtração e acondicionamento, o que aumenta o risco de degradação. Já o uso do Sterivex tende a ser mais prático, já que a filtragem pode ocorrer no mesmo local de coleta das amostras e o subsequente uso de um tampão para conservação das amostras favorece a preservação do material genético. Em nosso protocolo, a filtragem com o Sterivex ocorre através do uso de seringas descartáveis, que são mais simples de serem utilizadas tanto por profissionais quanto por pessoas menos experientes (Takahashi et al., 2023). Porém o emprego desta metodologia, por ser um processo manual, favorece a filtragem de quantidades menores de água ($\leq 1\text{L}$), o que pode prejudicar a detecção de espécies com baixas abundâncias. Embora o filtro Sterivex seja frequentemente utilizado em programas internacionais de biomonitoramento (Biggs et al., 2015; Buxton et al., 2018; Larson et al., 2020), seu alto custo (até 10 vezes superior ao dos filtros MCE) e a alta quantidade de plástico descartável empregada em seu protocolo (Protocolo de coleta, Material Suplementar) podem

dificultar sua aplicação em larga escala. Cada tipo de filtro possui diversas vantagens e desvantagens associadas a seu emprego. Os problemas podem ser minimizados a depender do orçamento disponível e do planejamento adequado.

Em relação à eficiência de detecção de espécies, as amostras coletadas na campanha realizada em Novembro de 2021, com a lagoa com nível baixo, permitem a comparação. Enquanto as amostras filtradas com os filtros MCE possibilitaram a detecção de possíveis 23 espécies, com o filtro Sterivex foram detectadas 33, com 17 identificações exclusivas, em comparação com a metodologia que emprega o filtro MCE que detectou apenas 7 espécies exclusivas. Apesar da diferença na quantidade de água filtrada com cada tipo de filtro (500 ml com MCE contra 180 ml com Sterivex), os filtros fechados permitiram a detecção de mais espécies. Este resultado está em consonância com outros trabalhos (Takahashi et al., 2020). É importante ressaltar que 6 espécies que foram detectadas em todos os pontos utilizando os filtros Sterivex (*Astyanax bimaculatus*, *Hoplias malabaricus*, *Schizodon knerii*, *Geophagus brasiliensis*, *Ctenopharygodon idella* e *Poecilia latipinna*) não foram detectadas em nenhuma amostra desta campanha com os filtros MCE. Por sua vez, foi possível detectar usando os filtros MCE a espécie *Moenkhausia costae* em todos os pontos, mas ela não foi detectada usando o filtro Sterivex. Apesar da aparente maior capacidade dos filtros Sterivex de conseguir recuperar as espécies do reservatório, o filtro MCE também teve uma espécie exclusiva. O resultado apresentado no gráfico de dispersão (Figura 9) comparando a comunidade de espécies recuperadas pelos filtros MCE e Sterivex nesta campanha indica que há uma correlação positiva e forte entre alguns resultados obtidos com os dois filtros, mas entre outras identificações não. Podemos interpretar que talvez as duas metodologias sejam complementares, e ambas podem ser usadas para obter informações confiáveis sobre a presença das espécies em um sistema hídrico. O uso das duas metodologias simultaneamente permitiu a obtenção de resultados mais completos, visto que houve a detecção de espécies exclusivas por ambos protocolos.

6.6. Correlação entre *reads* e abundância de indivíduos

A abundância de *reads* obtida para cada identificação pode ser útil para inferir quais espécies são mais abundantes na lagoa. Na primeira campanha, realizada em 2020, foram identificadas visualmente indivíduos de *Coptodon rendalli*, que foi a espécie com maior abundância absoluta de *reads* (1.890.972 no total, Quadro suplementar 1) e chegou a ter 95,8% de abundância relativa na amostra coletada no ponto *Fundação* em 2021 com filtro MCE. Essa espécie também foi detectada em todos os pontos, em todas as campanhas (Figuras 4 e 5).

É desafiador associar a abundância de *reads* à biomassa de uma espécie a partir do eDNA, apesar de diversos estudos realizarem essa inferência (Di Muri et al., 2020; Lacoursière-Roussel et al., 2016; Pont et al., 2023; Rourke et al., 2022). A acurácia dessas estimativas pode ser influenciada por diversos fatores, como a composição da comunidade, o marcador utilizado, possíveis vieses de amplificação, concentração de DNA, entre outros (Hilário et al., 2023). Embora a inferência de biomassa a partir de RRA não tenha sido um dos objetivos deste trabalho, tal inferência é possível quando os fatores mencionados anteriormente são cuidadosamente considerados.

7. CONCLUSÃO

Neste trabalho, desenvolvemos um protocolo de coleta que emprega o filtro Sterivex para comparar sua eficiência com um protocolo que usa o filtro MCE, para realizar a caracterização da ictiofauna da Lagoa dos Ingleses, um reservatório de água doce urbano localizado na região neotropical através do eDNA *metabarcoding*. O desenvolvimento deste projeto envolveu a superação dos diversos desafios que envolvem esta metodologia, desde o desenvolvimento de protocolos de coleta, adaptação do protocolo de extração de eDNA, otimização da amplificação do material genético, realização de melhoras no *pipeline* de bioinformática e desenvolvimento das análises ecológicas.

A comparação entre os protocolos evidenciou as potencialidades do uso do filtro Sterivex, a partir da sua maior eficiência em recuperar o eDNA de peixes. O trabalho também obteve a lista de espécies de peixes da Lagoa dos Ingleses, além do desenvolvimento de reflexões sobre as potencialidades e limites da aplicação do *metabarcoding* de eDNA na região neotropical e em ambientes urbanos, como a escolha do protocolo, a realização da curadoria das identificações das ASVs e a importância da realização de biomonitoramentos com maior duração na elucidação da biodiversidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albert, J. S., De Campos Fernandes-Matioli, F. M., & De Almeida-Toledo, L. F. (1999). New Species of *Gymnotus* (Gymnotiformes, Teleostei) from Southeastern Brazil: Toward the Deconstruction of *Gymnotus carapo*. *Copeia*, 1999(2), 410. <https://doi.org/10.2307/1447486>
- Alho, C. J. R. (2012). The importance of biodiversity to human health: An ecological Perspective. *Estudos Avançados*.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). *Basic Local Alignment Search Tool*.
- Ashanti, Anglogold. (2022). *Plano de ação de Emergência—PAE BARRAGEM LAGOA GRANDE (LAGOA DOS INGLESES)*.
- Balasingham, K. D., Walter, R. P., Mandrak, N. E., & Heath, D. D. (2018). Environmental DNA detection of rare and invasive fish species in two Great Lakes tributaries. *Molecular Ecology*, 27(1), 112–127. <https://doi.org/10.1111/mec.14395>
- Barbosa, J. M., Soares, E. C., Cintra, I. H. A., Hermann, M., & Araújo, A. R. R. (2017). *Perfil da ictiofauna da bacia do rio São Francisco*.
- Barnes, M. A., & Turner, C. R. (2016). The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conservation Genetics*, 17(1), 1–17. <https://doi.org/10.1007/s10592-015-0775-4>
- Barnes, M. A., Turner, C. R., Jerde, C. L., Renshaw, M. A., Chadderton, W. L., & Lodge, D. M. (2014). Environmental Conditions Influence eDNA Persistence in Aquatic Systems. *Environmental Science & Technology*, 48(3), 1819–1827. <https://doi.org/10.1021/es404734p>
- Bedwell, M. E., & Goldberg, C. S. (2020). Spatial and temporal patterns of environmental DNA detection to inform sampling protocols in lentic and lotic systems. *Ecology and Evolution*, 10(3), 1602–1612. <https://doi.org/10.1002/ece3.6014>
- Biggs, J., Ewald, N., Valentini, A., Gaboriaud, C., Dejean, T., Griffiths, R. A., Foster, J., Wilkinson, J. W., Arnell, A., Brotherton, P., Williams, P., & Dunn, F. (2015). Using eDNA to develop a national citizen science-based monitoring programme for the great crested newt

(*Triturus cristatus*). *Biological Conservation*, 183, 19–28.

<https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.029>

Bueno, M. L., Magalhães, A. L. B., Andrade Neto, F. R., Alves, C. B. M., Rosa, D. D. M., Junqueira, N. T., Pessali, T. C., Pompeu, P. S., & Zenni, R. D. (2021). Alien fish fauna of southeastern Brazil: Species status, introduction pathways, distribution and impacts. *Biological Invasions*, 23(10), 3021–3034. <https://doi.org/10.1007/s10530-021-02564-x>

Buxton, A., Groombridge, J., & Griffiths, R. (2018). Comparison of Two Citizen Scientist Methods for Collecting Pond Water Samples for Environmental DNA Studies. *Citizen Science: Theory and Practice*, 3(2), 2. <https://doi.org/10.5334/cstp.151>

Buxton, A. S., Groombridge, J. J., Zakaria, N. B., & Griffiths, R. A. (2017). Seasonal variation in environmental DNA in relation to population size and environmental factors. *Scientific Reports*, 7, 46294. <https://doi.org/10.1038/srep46294>

Callahan, B. J., McMurdie, P. J., & Holmes, S. P. (2017). Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *The ISME Journal*, 11(12), 2639–2643. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.119>

Capo, E., Spong, G., Königsson, H., & Byström, P. (2020). Effects of filtration methods and water volume on the quantification of brown trout and Arctic char eDNA concentrations via droplet digital PCR. *Environmental DNA*, 2(2), 152–160. <https://doi.org/10.1002/edn3.52>

Carvalho, A. (2008, novembro 5). *Análise aponta poluição na lagoa dos Ingleses* | O TEMPO. <https://www.otempo.com.br/cidades/analise-aponta-poluicao-na-lagoa-dos-ingleses-1.278844>

Cruz, M. M. (2021a, agosto 29). *Lagoa dos Ingleses: Nível baixo da represa demonstra seca que atinge Minas*. Estado de Minas. https://www.em.com.br/app/noticia/gerais/2021/08/29/interna_gerais,1300486/lagoa-dos-ingleses-nivel-baixo-da-represa-demonstra-seca-que-atinge-minas.shtml

Cruz, M. M. (2021b, setembro 1). *BH usa água da Lagoa dos Ingleses, em Nova Lima, contra crise hídrica*. Estado de Minas. https://www.em.com.br/app/noticia/economia/2021/09/01/internas_economia,1301320/bh-usa-agua-da-lagoa-dos-ingleses-em-nova-lima-contracrise-hidrica.shtml

Dal Pont, G., Duarte Ritter, C., Agostinis, A. O., Stica, P. V., Horodesky, A., Cozer, N., Balsanelli, E., Netto, O. S. M., Henn, C., Ostrensky, A., & Pie, M. R. (2021). Monitoring fish communities through environmental DNA metabarcoding in the fish pass system of the second largest hydropower plant in the world. *Scientific Reports*, 11(1), 23167.

<https://doi.org/10.1038/s41598-021-02593-5>

de Castro, C. N. (2011). *Transposição do Rio São Francisco: Análise de oportunidade do projeto* [Texto para Discussão (TD)]. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (Ipea).

<https://repositorio.ipea.gov.br/handle/11058/1418>

Deiner, K., Walser, J.-C., Mächler, E., & Altermatt, F. (2015). Choice of capture and extraction methods affect detection of freshwater biodiversity from environmental DNA. *Biological Conservation*, 183, 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.018>

Dejean, T., Valentini, A., Miquel, C., Taberlet, P., Bellemain, E., & Miaud, C. (2012). Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding: The example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus*: Alien invasive species detection using eDNA. *Journal of Applied Ecology*, 49(4), 953–959. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2012.02171.x>

Di Muri, C., Lawson Handley, L., Bean, C. W., Li, J., Peirson, G., Sellers, G. S., Walsh, K., Watson, H. V., Winfield, I. J., & Hänfling, B. (2020). Read counts from environmental DNA (eDNA) metabarcoding reflect fish abundance and biomass in drained ponds. *Metabarcoding and Metagenomics*, 4, e56959. <https://doi.org/10.3897/mbmg.4.56959>

Djurhuus, A., Port, J., Closek, C. J., Yamahara, K. M., Romero-Maraccini, O., Walz, K. R., Goldsmith, D. B., Michisaki, R., Breitbart, M., Boehm, A. B., & Chavez, F. P. (2017). Evaluation of Filtration and DNA Extraction Methods for Environmental DNA Biodiversity Assessments across Multiple Trophic Levels. *Frontiers in Marine Science*, 4, 314. <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00314>

Dudgeon, D., Arthington, A. H., Gessner, M. O., Kawabata, Z., Knowler, D. J., Lévêque, C., Naiman, R. J., Prieur-Richard, A., Soto, D., Stiassny, M. L. J., & Sullivan, C. A. (2006). Freshwater biodiversity: Importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Reviews*, 81(2), 163–182. <https://doi.org/10.1017/S1464793105006950>

Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>

Ficetola, G. F., Miaud, C., Pompanon, F., & Taberlet, P. (2008). Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, 4(4), 423–425. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2008.0118>

Friberg, N., Bonada, N., Bradley, D. C., Dunbar, M. J., Edwards, F. K., Grey, J., Hayes, R. B., Hildrew, A. G., Lamouroux, N., Trimmer, M., & Woodward, G. (2011). Biomonitoring of Human Impacts in Freshwater Ecosystems. Em *Advances in Ecological Research* (Vol. 44, p. 1–68). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374794-5.00001-8>

Giongo, A., dos Anjos Borges, L. G., Simão, T. L. L., Eizirik, E., & Utz, L. R. P. (2022). Structure and Dynamics of Periphyton in a Neotropical Freshwater Lake, with Emphasis on Ciliates and Their Relationships with Bacterial Taxa. *Microbial Ecology*. <https://doi.org/10.1007/s00248-022-02101-w>

Goldberg, C. S., Pilliod, D. S., Arkle, R. S., & Waits, L. P. (2011). Molecular Detection of Vertebrates in Stream Water: A Demonstration Using Rocky Mountain Tailed Frogs and Idaho Giant Salamanders. *PLoS ONE*, 6(7), e22746. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022746>

Guimarães, K. L. A., Rosso, J. J., Souza, M. F. B., Díaz De Astarloa, J. M., & Rodrigues, L. R. R. (2021). Integrative taxonomy reveals disjunct distribution and first record of *Hoplias misionera* (Characiformes: Erythrinidae) in the Amazon River basin: morphological, DNA barcoding and cytogenetic considerations. *Neotropical Ichthyology*, 19(2), e200110. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-2020-0110>

Hester, R., & Harrison, R. (2007). *Biodiversity Under Threat*. The Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781847557650>

Hilário, H. O. (2022). *Heronoh/BLASr* [R]. <https://github.com/heronoh/BLASr> (Trabalho original publicado 2022)

Hilário, H. O., Mendes, I. S., Guimarães Sales, N., & Carvalho, D. C. (2023). DNA metabarcoding of mock communities highlights potential biases when assessing Neotropical fish diversity. *Environmental DNA*, 5(6), 1351–1361. <https://doi.org/10.1002/edn3.456>

- Hopkins, G. W., & Freckleton, R. P. (2002). Declines in the numbers of amateur and professional taxonomists: Implications for conservation. *Animal Conservation*, 5(3), 245–249. <https://doi.org/10.1017/S1367943002002299>
- Jackman, J. M., Benvenuto, C., Coscia, I., Oliveira Carvalho, C., Ready, J. S., Boubli, J. P., Magnusson, W. E., McDevitt, A. D., & Guimarães Sales, N. (2021). eDNA in a bottleneck: Obstacles to fish metabarcoding studies in megadiverse freshwater systems. *Environmental DNA*, 3(4), 837–849. <https://doi.org/10.1002/edn3.191>
- Jari Oksanen, Gavin L. Simpson, F. Guillaume Blanchet, Roeland Kindt, Pierre Legendre, Peter R. Minchin, R.B.O'Hara, Peter Solymos, M. Henry H. Stevens, Eduard Szoecs, Helene Wagner, Matt Barbour, Michael Bedward, Ben Bolker, Daniel Borcard, Gustavo Carvalho, Michael Chirico, Miquel De Caceres, Sebastien Durand, Heloisa Beatriz Antoniazzi, ... James Weedon. (2022). *vegan: Community Ecology Package* (2.6-4) [Software]. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Jerde, C. L., Mahon, A. R., Chadderton, W. L., & Lodge, D. M. (2011). “Sight-unseen” detection of rare aquatic species using environmental DNA: eDNA surveillance of rare aquatic species. *Conservation Letters*, 4(2), 150–157. <https://doi.org/10.1111/j.1755-263X.2010.00158.x>
- Kassambara, A. (2023). *ggpubr: “ggplot2” Based Publication Ready Plots* [Software]. <https://rpkgs.datanovia.com/ggpubr/>
- Kelly, R. P., Port, J. A., Yamahara, K. M., Martone, R. G., Lowell, N., Thomsen, P. F., Mach, M. E., Bennett, M., Prahler, E., Caldwell, M. R., & Crowder, L. B. (2014). Harnessing DNA to improve environmental management. *Science*, 344(6191), 1455–1456. <https://doi.org/10.1126/science.1251156>
- Kemp, S. (2014). The potential and limitations of linking biological monitoring data and restoration needs of urbanized waterways: A case study. *Environmental Monitoring and Assessment*, 186(6), 3859–3873. <https://doi.org/10.1007/s10661-014-3663-3>
- L. Handley, L., Read, D. S., Winfield, I. J., Kimbell, H., Johnson, H., Li, J., Hahn, C., Blackman, R., Wilcox, R., Donnelly, R., Szitenberg, A., & Hänfling, B. (2019). Temporal and spatial variation in distribution of fish environmental DNA in England’s largest lake. *Environmental DNA*, 1(1), 26–39. <https://doi.org/10.1002/edn3.5>

- Lacoursière-Roussel, A., Côté, G., Leclerc, V., & Bernatchez, L. (2016). Quantifying relative fish abundance with eDNA: A promising tool for fisheries management. *Journal of Applied Ecology*, 53(4), 1148–1157. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12598>
- Larson, E. R., Graham, B. M., Achury, R., Coon, J. J., Daniels, M. K., Gambrell, D. K., Jonassen, K. L., King, G. D., LaRacuente, N., Perrin-Stowe, T. I., Reed, E. M., Rice, C. J., Ruzi, S. A., Thairu, M. W., Wilson, J. C., & Suarez, A. V. (2020). From eDNA to citizen science: Emerging tools for the early detection of invasive species. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 18(4), 194–202. <https://doi.org/10.1002/fee.2162>
- Larson, E. R., Renshaw, M. A., Gantz, C. A., Umek, J., Chandra, S., Lodge, D. M., & Egan, S. P. (2017). Environmental DNA (eDNA) detects the invasive crayfishes *Orconectes rusticus* and *Pacifastacus leniusculus* in large lakes of North America. *Hydrobiologia*, 800(1), 173–185. <https://doi.org/10.1007/s10750-017-3210-7>
- Layton, A., McKay, L., Williams, D., Garrett, V., Gentry, R., & Sayler, G. (2006). Development of Bacteroides 16S rRNA Gene TaqMan-Based Real-Time PCR Assays for Estimation of Total, Human, and Bovine Fecal Pollution in Water. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6), 4214–4224. <https://doi.org/10.1128/AEM.01036-05>
- Lee, H.-T., Liao, C.-H., & Hsu, T.-H. (2021). Environmental DNA (eDNA) Metabarcoding in the Fish Market and Nearby Seafood Restaurants in Taiwan Reveals the Underestimation of Fish Species Diversity in Seafood. *Biology*, 10(11), 1132. <https://doi.org/10.3390/biology10111132>
- Leslie Jr., A. J., Dyke, J. M. V., Hestand III, R. S., & Thompson, B. Z. (1987). Management of Aquatic Plants in Multi-Use Lakes with Grass Carp (*Ctenopharyngodon Idella*). *Lake and Reservoir Management*, 3(1), 266–276. <https://doi.org/10.1080/07438148709354782>
- Li, H., Yang, F., Zhang, R., Liu, S., Yang, Z., Lin, L., & Ye, S. (2022). Environmental DNA metabarcoding of fish communities in a small hydropower dam reservoir: A comparison between the eDNA approach and established fishing methods. *Journal of Freshwater Ecology*, 37(1), 341–362. <https://doi.org/10.1080/02705060.2022.2086181>
- Li, Y., Evans, N. T., Renshaw, M. A., Jerde, C. L., Olds, B. P., Shogren, A. J., Deiner, K., Lodge, D. M., Lamberti, G. A., & Pfrender, M. E. (2018). Estimating fish alpha- and beta-

diversity along a small stream with environmental DNA metabarcoding. *Metabarcoding and Metagenomics*, 2, e24262. <https://doi.org/10.3897/mbmg.2.24262>

Mächler, E., Walser, J., & Altermatt, F. (2021). Decision-making and best practices for taxonomy-free environmental DNA metabarcoding in biomonitoring using Hill numbers. *Molecular Ecology*, 30(13), 3326–3339. <https://doi.org/10.1111/mec.15725>

Mahé, F., Czech, L., Stamatakis, A., Quince, C., De Vargas, C., Dunthorn, M., & Rognes, T. (2021). Swarm v3: Towards tera-scale amplicon clustering. *Bioinformatics*, 38(1), 267–269. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btab493>

Majaneva, M., Diserud, O. H., Eagle, S. H. C., Boström, E., Hajibabaei, M., & Ekrem, T. (2018). Environmental DNA filtration techniques affect recovered biodiversity. *Scientific Reports*, 8(1), 4682. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23052-8>

Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*, 17(1), 10. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>

Matheson, C. D., Gurney, C., Esau, N., & Lehto, R. (2010). *Assessing PCR Inhibition from Humic Substances*.

McDevitt, A. D., Sales, N. G., Browett, S. S., Sparnenn, A. O., Mariani, S., Wangenstein, O. S., Coscia, I., & Benvenuto, C. (2019). Environmental DNA metabarcoding as an effective and rapid tool for fish monitoring in canals. *Journal of Fish Biology*, 95(2), 679–682. <https://doi.org/10.1111/jfb.14053>

Milan, D. T., Mendes, I. S., Damasceno, J. S., Teixeira, D. F., Sales, N. G., & Carvalho, D. C. (2020). New 12S metabarcoding primers for enhanced Neotropical freshwater fish biodiversity assessment. *Scientific Reports*, 10(1), 17966. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74902-3>

Miya, M., Gotoh, R. O., & Sado, T. (2020). MiFish metabarcoding: A high-throughput approach for simultaneous detection of multiple fish species from environmental DNA and other samples. *Fisheries Science*, 86(6), 939–970. <https://doi.org/10.1007/s12562-020-01461-x>

- Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J. Y., Sato, K., Minamoto, T., Yamamoto, S., Yamanaka, H., Araki, H., Kondoh, M., & Iwasaki, W. (2015). MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: Detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Society Open Science*, 2(7), 150088. <https://doi.org/10.1098/rsos.150088>
- National Library of Medicine (US). (2010). *NCBI Nucleotide database* [dataset]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>
- Oliveira, I. H. R. (2021). *Psalidodon rivularis* (Characiformes: Characidae): Um complexo de espécies baseado em dados citogenéticos, morfométricos e genômicos [Universidade Federal de Lavras]. <https://locus.ufv.br/handle/123456789/28057>
- Paxton, M. (2023, abril 24). *The destruction of nature threatens the world economy. It's time to outlaw it as a serious financial crime*. United Nations Development Programme. <https://www.undp.org/blog/destruction-nature-threatens-world-economy-its-time-outlaw-it-serious-financial-crime>
- Pelicice, F. M., Azevedo-Santos, V. M., Vitule, J. R. S., Orsi, M. L., Lima Junior, D. P., Magalhães, A. L. B., Pompeu, P. S., Petrere, M., & Agostinho, A. A. (2017). Neotropical freshwater fishes imperilled by unsustainable policies. *Fish and Fisheries*, 18(6), 1119–1133. <https://doi.org/10.1111/faf.12228>
- Pilliod, D. S., Goldberg, C. S., Arkle, R. S., & Waits, L. P. (2014). Factors influencing detection of eDNA from a stream-dwelling amphibian. *Molecular Ecology Resources*, 14(1), 109–116. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12159>
- Pont, D., Meulenbroek, P., Bammer, V., Dejean, T., Erős, T., Jean, P., Lenhardt, M., Nagel, C., Pekarík, L., Schabuss, M., Stoeckle, B. C., Stoica, E., Zornig, H., Weigand, A., & Valentini, A. (2023). Quantitative monitoring of diverse fish communities on a large scale combining eDNA metabarcoding and qPCR. *Molecular Ecology Resources*, 23(2), 396–409. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13715>
- Prakash, S. (2017). *Climate change and need of biodiversity conservation: A review*.
- Rees, H. C., Maddison, B. C., Middleditch, D. J., Patmore, J. R. M., & Gough, K. C. (2014). REVIEW: The detection of aquatic animal species using environmental DNA - a review of

eDNA as a survey tool in ecology. *Journal of Applied Ecology*, 51(5), 1450–1459.

<https://doi.org/10.1111/1365-2664.12306>

Reis, R. E., Albert, J. S., Di Dario, F., Mincarone, M. M., Petry, P., & Rocha, L. A. (2016). Fish biodiversity and conservation in South America: FISH BIODIVERSITY AND CONSERVATION. *Journal of Fish Biology*, 89(1), 12–47. <https://doi.org/10.1111/jfb.13016>

Ríos-Touma, B., & Ramírez, A. (2019). Multiple Stressors in the Neotropical Region: Environmental Impacts in Biodiversity Hotspots. Em *Multiple Stressors in River Ecosystems* (p. 205–220). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811713-2.00012-1>

Rourke, M. L., Fowler, A. M., Hughes, J. M., Broadhurst, M. K., DiBattista, J. D., Fielder, S., Wilkes Walburn, J., & Furlan, E. M. (2022). Environmental DNA (eDNA) as a tool for assessing fish biomass: A review of approaches and future considerations for resource surveys. *Environmental DNA*, 4(1), 9–33. <https://doi.org/10.1002/edn3.185>

Ruiz-Domínguez, M., Quiñonez-Velázquez, C., Ruiz-Domínguez, M., & Quiñonez-Velázquez, C. (2018). Age, growth, and mortality of *Opisthonema libertate* on the coasts of northwestern Mexico. *Ciencias Marinas*, 44(4), 235–250. <https://doi.org/10.7773/cm.v44i4.2908>

Ruppert, K. M., Kline, R. J., & Rahman, M. S. (2019). Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. *Global Ecology and Conservation*, 17, e00547. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00547>

Sales, N. G., Kaizer, M. da C., Coscia, I., Perkins, J. C., Highlands, A., Boubli, J. P., Magnusson, W. E., Da Silva, M. N. F., Benvenuto, C., & Mcdevitt, A. D. (2020). Assessing the potential of environmental DNA metabarcoding for monitoring Neotropical mammals: A case study in the Amazon and Atlantic Forest, Brazil. *Mammal Review*, 50(3), 221–225. <https://doi.org/10.1111/mam.12183>

Sales, N. G., Pessali, T. C., Andrade Neto, F. R., & Carvalho, D. C. (2018). Introgression from non-native species unveils a hidden threat to the migratory Neotropical fish *Prochilodus hartii*. *Biological Invasions*, 20(3), 555–566. <https://doi.org/10.1007/s10530-017-1556-4>

Sales, N. G., Wangensteen, O. S., Carvalho, D. C., Deiner, K., Præbel, K., Coscia, I., McDevitt, A. D., & Mariani, S. (2021). Space-time dynamics in monitoring neotropical fish communities using eDNA metabarcoding. *Science of The Total Environment*, 754, 142096. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142096>

Sales, N. G., Wangensteen, O. S., Carvalho, D. C., & Mariani, S. (2019). Influence of preservation methods, sample medium and sampling time on eDNA recovery in a neotropical river. *Environmental DNA*, 1(2), edn3.14. <https://doi.org/10.1002/edn3.14>

Shu, L., Chen, S., Li, P., & Peng, Z. (2022). Environmental DNA Metabarcoding Reflects Fish DNA Dynamics in Lentic Ecosystems: A Case Study of Freshwater Ponds. *Fishes*, 7(5), 257. <https://doi.org/10.3390/fishes7050257>

Simoni, M. E. R. (2019). *Dinâmica reprodutiva da sardinha-laje Opisthonema oglinum, Lesueur, 1818 capturada no litoral norte de Pernambuco, Brasil*. <http://www.tede2.ufrpe.br:8080/tede2/handle/tede2/8423>

Sisema. (2010). *Seminário da Meta 2010 discute intervenções de saneamento em Nova Lima*. Portal Meio Ambiente MG. <http://www.meioambiente.mg.gov.br/noticias/679-seminario-da-meta-2010-discute-intervencoes-de-saneamento-em-nova-lima>

Souza, C. P. (2021). *Fatores antrópicos como facilitadores da ocorrência de peixes não-nativos na Bacia do Rio São Francisco*.

Souza, E. M. de. (2022). *Peixes do rio São Francisco: Nativos, endêmicos e exóticos*. IF Sertão-PE.

Spens, J., Evans, A. R., Halfmaerten, D., Knudsen, S. W., Sengupta, M. E., Mak, S. S. T., Sigsgaard, E. E., & Hellström, M. (2017). Comparison of capture and storage methods for aqueous microbial eDNA using an optimized extraction protocol. *Methods in Ecology and Evolution*, 8(5), 635–645. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12683>

Takahashi, M., Saccò, M., Kestel, J. H., Nester, G., Campbell, M. A., Van Der Heyde, M., Heydenrych, M. J., Juskiewicz, D. J., Nevill, P., Dawkins, K. L., Bessey, C., Fernandes, K., Miller, H., Power, M., Mousavi-Derazmahalleh, M., Newton, J. P., White, N. E., Richards, Z. T., & Allentoft, M. E. (2023). Aquatic environmental DNA: A review of the macro-

organismal biomonitoring revolution. *Science of The Total Environment*, 873, 162322.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162322>

Takahashi, S., Sakata, M. K., Minamoto, T., & Masuda, R. (2020). Comparing the efficiency of open and enclosed filtration systems in environmental DNA quantification for fish and jellyfish. *PLOS ONE*, 15(4), e0231718. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231718>

Terán, G. E., Benitez, M. F., & Mirande, J. M. (2020). Opening the Trojan horse: Phylogeny of *Astyanax*, two new genera and resurrection of *Psalidodon* (Teleostei: Characidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, zlaa019.
<https://doi.org/10.1093/zoolinnea/zlaa019>

Thalinger, B., Kirschner, D., Pütz, Y., Moritz, C., Schwarzenberger, R., Wanzenböck, J., & Traugott, M. (2021). Lateral and longitudinal fish environmental DNA distribution in dynamic riverine habitats. *Environmental DNA*, 3(1), 305–318.
<https://doi.org/10.1002/edn3.171>

Valdez-Moreno, M., Ivanova, N. V., Elías-Gutiérrez, M., Pedersen, S. L., Bessonov, K., & Hebert, P. D. N. (2019). Using eDNA to biomonitor the fish community in a tropical oligotrophic lake. *PLOS ONE*, 14(4), e0215505. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215505>

Valentini, A., Taberlet, P., Miaud, C., Civade, R., Herder, J., Thomsen, P. F., Bellemain, E., Besnard, A., Coissac, E., Boyer, F., Gaboriaud, C., Jean, P., Poulet, N., Roset, N., Copp, G. H., Geniez, P., Pont, D., Argillier, C., Baudoin, J., ... Dejean, T. (2016). Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, 25(4), 929–942. <https://doi.org/10.1111/mec.13428>

Vidigal, L. (2008, novembro 12). *Laudo indica excesso de poluição na Lagoa dos Ingleses*. Estado de Minas.
https://www.em.com.br/app/noticia/gerais/2008/11/12/interna_gerais,87624/laudo-indica-excesso-de-poluicao-na-lagoa-dos-ingleses.shtml

Vitule, J. (2009). Introdução de peixes em ecossistemas continentais brasileiros: Revisão, comentários e sugestões de ações contra o inimigo quase invisível. *Neotropical Biology and Conservation*, 4(2), 111–122. <https://doi.org/10.4013/nbc.2009.42.07>

Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*.

<https://ggplot2.tidyverse.org>

Wickham, H., Averick, M., Bryan, J., Chang, W., McGowan, L., François, R., Golemund, G., Hayes, A., Henry, L., Hester, J., Kuhn, M., Pedersen, T., Miller, E., Bache, S., Müller, K., Ooms, J., Robinson, D., Seidel, D., Spinu, V., ... Yutani, H. (2019). Welcome to the Tidyverse. *Journal of Open Source Software*, 4(43), 1686.

<https://doi.org/10.21105/joss.01686>

Wong, M. K.-S., Nakao, M., & Hyodo, S. (2020). Field application of an improved protocol for environmental DNA extraction, purification, and measurement using Sterivex filter.

Scientific Reports, 10(1), 21531. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77304-7>

Wright, E., S. (2016). Using DECIPHER v2.0 to Analyze Big Biological Sequence Data in R.

The R Journal, 8(1), 352. <https://doi.org/10.32614/RJ-2016-025>

Zari, M. P. (2018). The importance of urban biodiversity – an ecosystem services approach.

Biodiversity International Journal, 2(4), 357–360. <https://doi.org/10.15406/bij.2018.02.00087>

Zhang, S., Lu, Q., Wang, Y., Wang, X., Zhao, J., & Yao, M. (2020). Assessment of fish communities using environmental DNA: Effect of spatial sampling design in lentic systems of different sizes. *Molecular Ecology Resources*, 20(1), 242–255. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13105>

Zhang, S., Zhao, J., & Yao, M. (2023). Urban landscape-level biodiversity assessments of aquatic and terrestrial vertebrates by environmental DNA metabarcoding. *Journal of Environmental Management*, 340, 117971. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.117971>

ANEXOS

Protocolo de coleta utilizando filtro Sterivex

Preparação

1. Primeiramente, certifique-se de realizar a coleta e a filtragem em um ambiente aberto e plano. Se possível, utilize uma superfície esterilizada para apoiar o kit de coleta e seus componentes durante os procedimentos. Após a filtragem e armazenamento das amostras, lembre-se de recolher os descartáveis para efetuar seu descarte adequado. Se possível, realizar os procedimentos em dupla.
2. O kit de coleta é composto pelos seguintes materiais:



- | | |
|---|----------------------------|
| 1. 2 pares de luvas | 5. 7,5ml de tampão ATL |
| 2. 3 filtros Sterivex | 6. 1 seringa de 60ml |
| 3. 3 pedaços de filme plástico Parafilm | 7. 1 saco Stand up pequeno |
| 4. 6 tampas Luer Lock | 8. 1 saco Stand up grande |
| | 9. 1 seringa de 10ml |

Coleta

3. Abra o kit com cuidado e coloque um par de luvas para começar a coleta.
4. A coleta da água pode ser feita diretamente através da seringa (1A), caso seja um local seguro para o coletor e sem o risco de contaminar a água a ser filtrada. Também é possível realizar a coleta utilizando o saco Stand Up grande (1B e 1C). Se houver muito sedimento em suspensão na água, aguarde alguns momentos para decantem e proceda com a filtração.



5. Com a seringa de 60ml, colete a água do saco Stand Up ou diretamente do ponto amostral (2A).



6. Encaixe o Sterivex na Seringa (2B) utilizando o encaixe de rosca luer lock (2C).
7. Passe a água pelo Sterivex pressionando o êmbolo da seringa (2D). Esse processo deve ser repetido quantas vezes for necessário. 1 passagem = 60ml de água. Se a seringa ficar obstruída e o êmbolo travar, puxe levemente o êmbolo para remover



particulado do filtro, e retome o processo. Evite passar ar pelo filtro, apenas água.

8. Após filtrar a quantidade total planejada, desencaxe a seringa do filtro e puxe o êmbolo para a posição inicial, preenchendo a seringa de ar (3A). Encaixe a seringa novamente no Sterivex e aperte o êmbolo, passando o ar pelo filtro Sterivex (3B). Repita esse passo até retirar toda a água do filtro. Este passo é muito importante para garantir a conservação da amostra.



Conservação das amostras

1. Após a filtração, é necessário colocar o tampão ATL para conservar o material genético contido no filtro. Primeiro abra a seringa de 10ml, remova o êmbolo e encaixe uma das tampas Luer Lock de cor vermelha na saída da seringa.
2. Abra o tubo falcon contendo ATL Buffer, e despeje seu conteúdo na seringa. A tampa Luer Lock irá impedir que o tampão saia (4B)



3. Cuidadosamente, recoloca o êmbolo na seringa. Com a seringa voltada para cima, retire a tampa Luer Lock. Em seguida, encaixe o filtro Sterivex que já foi utilizado na filtração.
4. Se o kit contém o Sterivex com apenas **uma saída Luer Lock (5A)**, utilize um pedaço de Parafilm ou de papel-filme para obstruir a saída



enquanto coloca o tampão. Esse mesmo papel pode ser utilizado na vedação final da amostra. Caso seja o Sterivex com **duas saídas Luer Lock**, feche a saída com a tampa Luer Lock (**5B**).

5. Encaixe a seringa preenchida com o tampão ATL na entrada Luer Lock do filtro Sterivex. Com seringa para baixo, coloque 2,5ml de ATL buffer em cada Sterivex filtrado. Pressione repetidamente a seringa para facilitar o processo de entrada do tampão (**6A**).
6. Após preencher o filtro com o tampão, desencaixe a seringa (**6B**) e coloque a tampa Luer Lock na entrada do filtro Sterivex (**6C**).



7. Com o Parafilm (**6A**) ou papel-filme (**6B**), embale o filtro. Durante o processo de embalo, adicione uma etiqueta de identificação única a cada um dos filtros, possibilitando seu armazenamento e identificação adequados (**6C**).



8. Repita os processos descritos acima para cada uma das replicatas biológicas coletadas em campo.
9. Após realizar os procedimentos para cada uma das replicatas, guarde os filtros no saco Stand Up pequeno (**6C** e **7**). Certifique-se que o lacre está bem vedado e coloque o saco dentro de um isopor



ou caixa térmica com gelo (7). Garanta que as amostras estarão protegidas da luz do sol e do calor.

Observações

Uso de amostras de controle de contaminação da filtração: estas amostras têm como objetivo garantir que não há contaminação intrínseca ao sistema de coleta. A filtração destas devem ser feitas em um ambiente limpo, utilizando água ultrapura (em experimentos com microorganismos), ou mineral (no caso de experimentos com vertebrados). Estas amostras devem ser extraídas, sequenciadas, analisadas e, caso apresentem ASVs/OTUs, as mesmas podem/devem ser excluídas das demais amostras.

O volume a ser filtrado em cada filtro (replicata) deve ser padronizado em todos os pontos amostrais. Recomendamos no mínimo 3 passagens de 60ml, mas pode variar devido a qualidade da água, podendo ser decidido pelo pesquisador no momento da coleta se o volume filtrado será maior.

Protocolo de extração de eDNA utilizando o Kit Qiagen DNEasy PowerWater

Para extração de eDNA de Sterivex, seguir a partir do item 1. Para extração de eDNA de filtros MCE, seguir a partir do item 9.

Extração de eDNA de Sterivex:

1. Após a limpeza da bancada e dos equipamentos, separar uma pinça para cada amostra (1 para cada filtro) e os cabos de bisturi. Colocá-los na solução de Hipoclorito de Sódio 25% durante 10 minutos. Após esse tempo, imergi-los na água destilada e, em seguida, borrifar álcool 70%. Após o álcool evaporar, flambar as peças e as separe em um papel na bancada.
2. Pegar uma seringa de 10mL para cada ponto, a mesma seringa será utilizada em todos os cartuchos réplicas (A, B e C) coletados no mesmo local. Separar as seringas em cima de um papel na bancada da extração.
3. Separar uma lâmina de bisturi para cada ponto. O mesmo bisturi será utilizado em todos os cartuchos de réplicas (A, B e C). Abrir parcialmente a embalagem da lâmina e encaixar o cabo do bisturi, repetir para o segundo cabo.
4. Retirar do freezer o recipiente com os Sterivex e separar quais cartuchos serão extraídos. Certificar-se de tirar o cartucho do recipiente que veio da coleta para evitar contaminação na sala limpa. Mantê-los sob um papel na bancada.
5. Pegar os reagentes na caixa (PW1, PW3, PW4, EB, Etanol, IRS, PK, etc.), os eppendorfs de 2mL para acomodar todos os reagentes (um para cada Sterivex e mais um para o branco de extração), os tubos com a “areia” de extração (um para cada Sterivex e mais um para o branco de extração). Organizar tudo em cima da bancada.
 - a. Aliquotar 1.5mL (2x de 750µl) de PW1 em eppendorfs de 2mL para cada amostra / replicata (um para cada Sterivex que vai ser extraído e mais um para o branco de extração);
 - b. Colocar esses eppendorfs no banho seco a 55°C / 1200rpm por 15 min.

6. Separar 1 placa de Petri autoclavada para cada ponto a ser extraído. A mesma placa de Petri será utilizada para remover o filtro de todos os Sterivex de um mesmo ponto. Não retirar as placas de Petri da embalagem de papel até a hora da remoção do filtro.
7. Enquanto o PW1 esquentar, pegar os tubos com as beads de extração e identificar eles para cada amostra. Como usamos 3 replicatas por ponto, associamos um número. Ex: ponto 3, replicata A: 1; ponto 3, replicata B: 2; ponto 4, replicata A: 3; etc.
8. **Parte crítica:** Realizar a remoção dos filtros do Sterivex enquanto o PW1 está no banho seco. Espera-se que os filtros já tenham descongelado um pouco, para a remoção do líquido tampão.
 - a. Desembalar o cartucho do primeiro ponto com cuidado e ligar a seringa com o êmbolo já puxado. Apertar e expulsar o dentro do bquer de descarte. Repetir quantas vezes necessário até que o sativex esteja seco, evitando entrar em contato com o líquido para evitar contaminação;
 - b. Após a retirada do líquido, utilizar uma pinça mais firme para separar o cartucho interno do invólucro plástico do Sterivex. Na parte inferior do cartucho existe uma abertura no invólucro externo que revela um pedaço da borda do cartucho interno. Utilizando a lateral da pinça, puxar o cartucho interno até que ele desencaixe do invólucro. Não utilize a ponta da pinça para tentar abrir. Cuidado para não deixar o cartucho interno sair voando, abra com delicadeza.
 - c. Após separar o cartucho interno do invólucro, pegar uma nova placa de Petri, tirar sua embalagem e apoiar o cartucho interno na placa;
 - d. Pegue o bisturi e termine de desembalar a lâmina. Segurando cuidadosamente, Extrair o filtro do cartucho e em seguida cortar o filtro em pedaços pequenos:
 - i. Cortar o filtro pelas bordas, começando pela lateral da sutura dele no cartucho;
 - ii. Lembre-se de limpar o cabo do bisturi e a bancada quando for trocar de ponto, para evitar contaminação.
 - e. Colocar os fragmentos do filtro de cada replicata do filtro do Sterivex em cada respectivo tubo com “areia” de extração, com a pinça:

- f. Macerar o filtro no tubo com a pinça, para aumentar a área de contato com os reagentes;
- g. Continuar a extração no item 13.

Extração de DNA de filtros abertos (MCE):

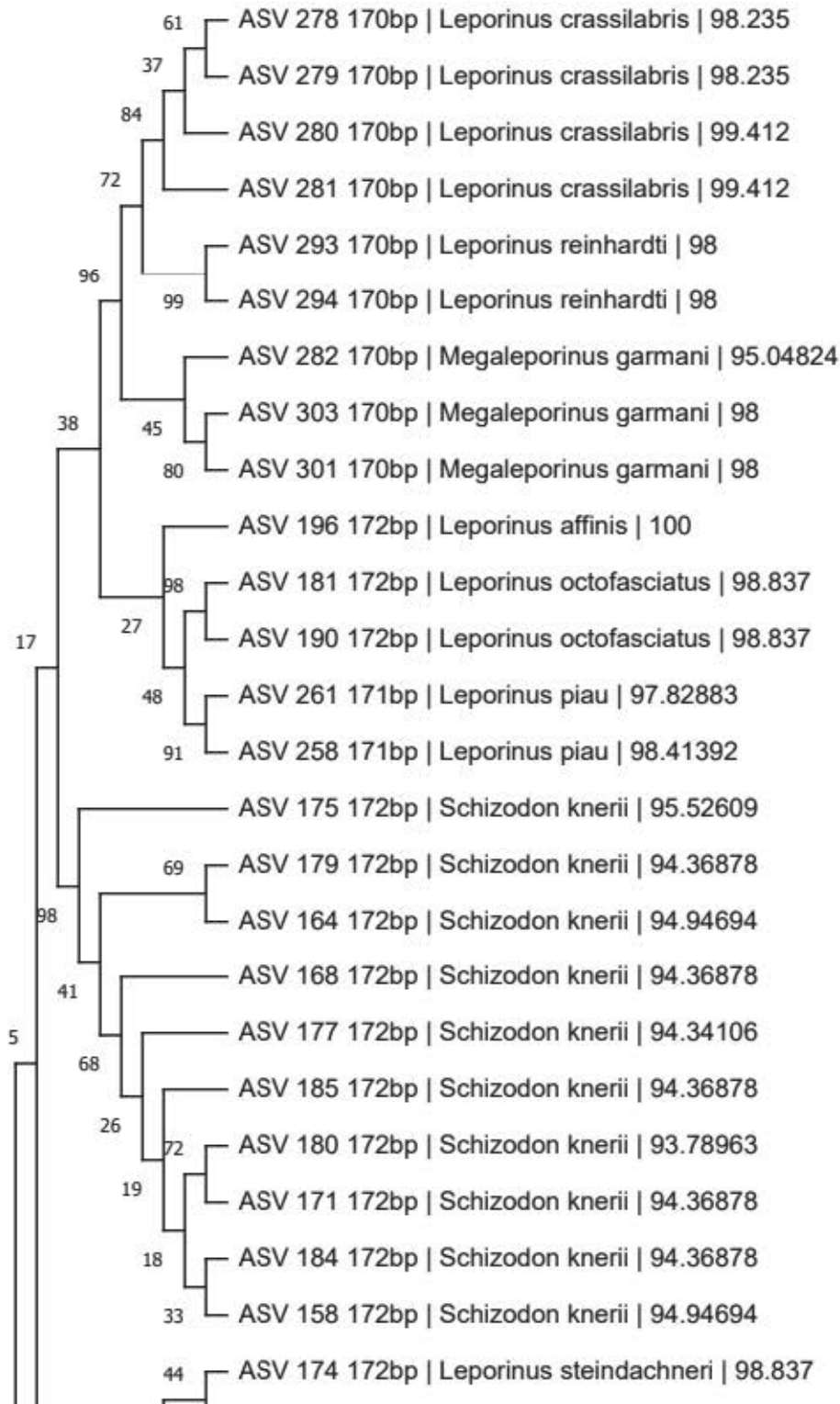
- 9. Após a limpeza da bancada e dos equipamentos, separar uma pinça para cada amostra (1 para cada filtro) e os cabos de bisturi. Colocá-los na solução de Hipoclorito de Sódio 25% durante 10 minutos. Após esse tempo, imergi-los na água destilada e, em seguida, borrifar álcool 70%. Após o álcool evaporar, flambar as peças e as separe em um papel na bancada.
- 10. Pegar os reagentes na caixa, os eppendorfs (uma para cada filtro) e os tubos com a “areia” de extração (1 para cada filtro)
 - a. Aliquotar 1.5mL (2x de 750µl) de PW1 em eppendorfs de 2mL para cada amostra / replicata (um para cada Sterivex que vai ser extraído e mais um para o branco de extração);
 - b. Colocar esses eppendorfs no banho seco a 55°C / 1200rpm por 15min.
- 11. Enquanto o PW1 esquenta, pegar os tubos com a “areia” de extração e identificar eles para cada amostra. Como usamos 3 replicatas para cada ponto, associamos um número. Ex: ponto 3, replicata A: 1; ponto 3, replicata B: 2; ponto 4, replicata A: 3; etc.
- 12. Enquanto o PW1 aliquotado continua no banho seco, retirar os filtros de seus tubos Falcon de 15mL com as pinças. Usar uma pinça para cada replicata. Devemos colocar os filtros, com cuidado, dentro do tubo com “areia” de extração. Macerar, com cuidado, os filtros para aumentar a área de contato com os reagentes
- 13. Retirar o eppendorf de PK do freezer e descongelá-lo.
 - a. Após macerar os filtros e descongelar a PK, provavelmente o PW1 já deve ter ficado 15min no banho seco. Virar cada eppendorf de PW1 em cada tubo de “areia” contendo a replicata de filtro macerada.

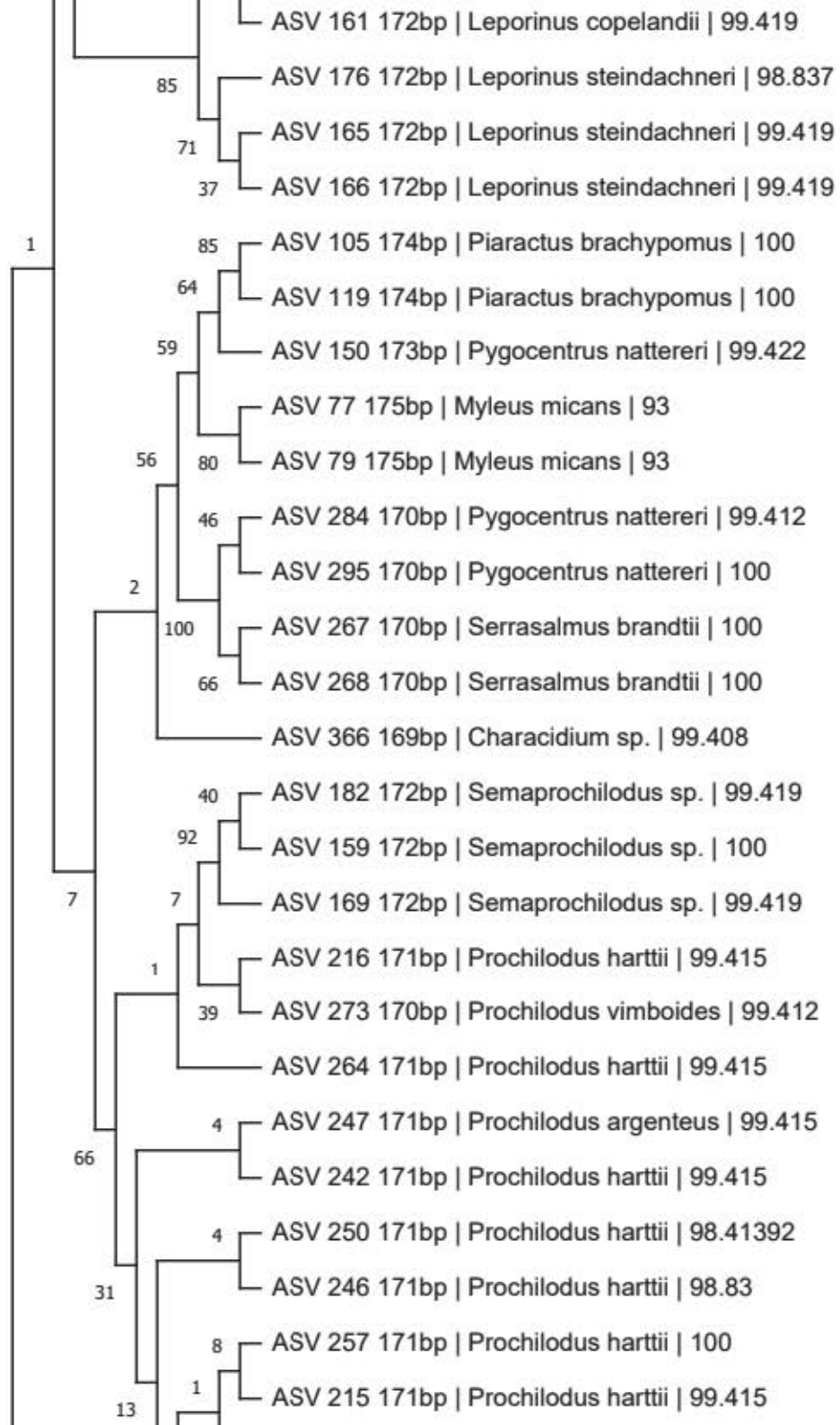
- b. Adicionar 20 μ l (2x de 10 μ l na falta de uma pipeta menor que 200 μ l) de PK em cada tubo de “areia” contendo cada replicata de filtro macerada com PW1. (Que está diluída na concentração 20ug/ μ l)
14. Vortexar por 2min cada tubo de areia contendo a replicata de filtro.
15. Colocar os tubos no banho seco a 55°C / 1200rpm por 15min.
 - a. Enquanto os tubos estão no banho seco, pegar da caixa do kit 6 eppendorfs + 1 tubo com filtro para cada replicata (+ branco de extração). Replicata 1 (Ponto 3A) = 6 eppendorfs + 1 tubo com filtro, replicata 2 (Ponto 3B) = 6 eppendorfs + 1 tubo com filtro, etc.
 - b. Nomear cada um desses tubos com o número da replicata ao qual eles vão receber (1, 2 ou 3) e diferenciar por etapa para evitar confusão:
16. Após os 15min do banho seco acabarem, vortexar novamente cada tubo por 2 min. Reiniciar o banho seco e manter os tubos nele por mais 15min. Repetir esse ciclo 4x.
17. Após o término do ciclo banho seco & vortex, transferir o líquido (sobrenadante) dos tubos de “areia” para o primeiro dos eppendorfs de 2mL (imagem acima). Usar uma pipeta de 1000 μ l. Fazer isso para cada replicata (1 no 1; 2 no 2; 3 no 3.etc). Tomar cuidado para pegar o mínimo de areia possível.
18. Com o sobrenadante transferido para o eppendorf de 2mL, pegá-los e colocar para centrifugar a 13000rpm por 60s.
19. Retirar da centrífuga e transferir o sobrenadante com a pipeta de 1000 μ l para um novo eppendorf 2mL. Cuidado para não perturbar o pellet que se forma no fundo! se isso ocorrer, centrifugar novamente a 13000rpm por 60s.
20. Após transferir o sobrenadante para o novo eppendorf, adicionar 200 μ l da solução IRS do kit.
21. Após adicionar o IRS, vortexar para homogeneizar o sobrenadante com o IRS. Colocar os eppendorfs no freezer por 7min.
22. Retirar do freezer e centrifugar novamente a 13000rpm por 60s.

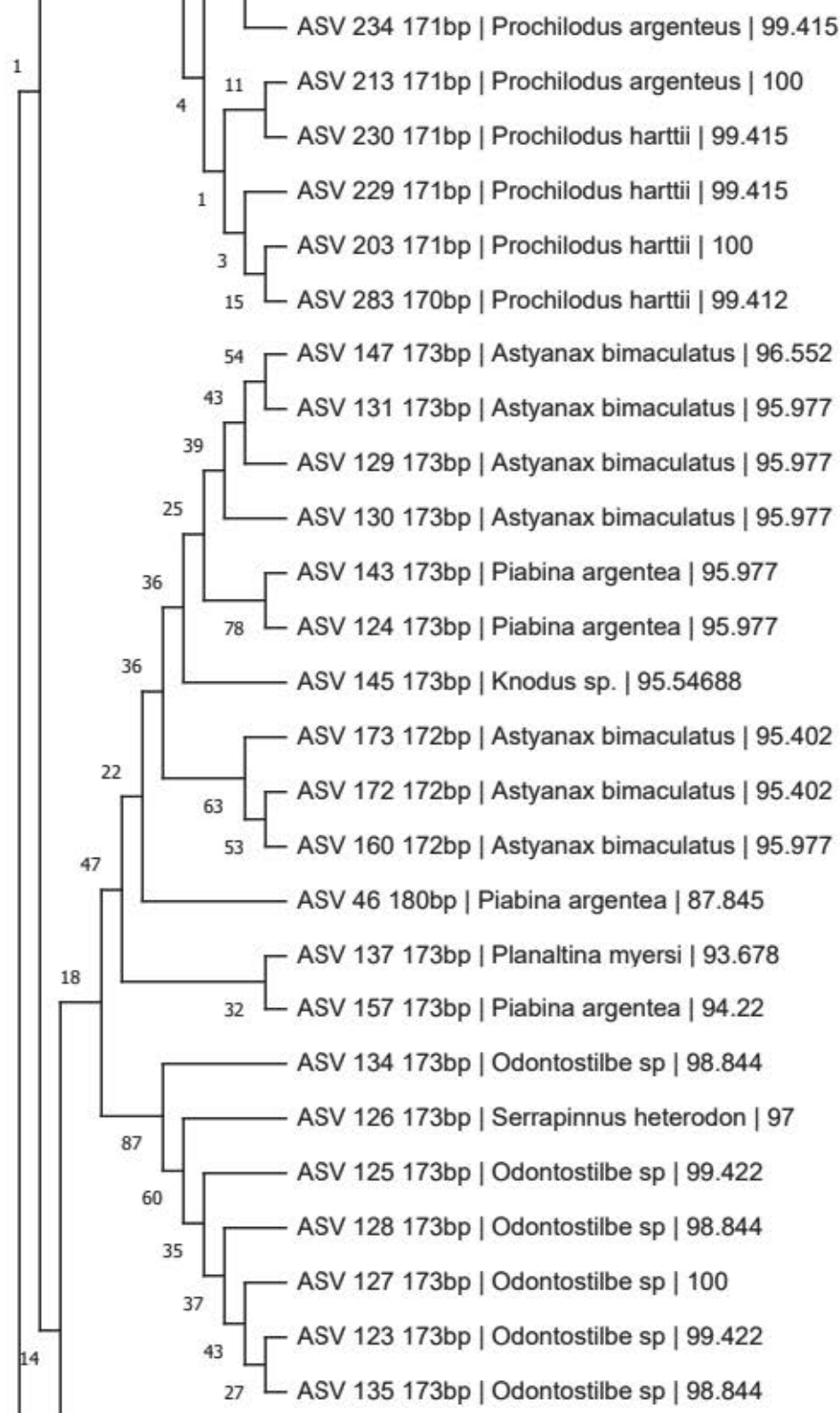
23. Transferir o sobrenadante para um novo eppendorf de 2mL com a pipeta de 1000µl. novamente, cuidado para evitar o pellet no fundo!
24. Adicionar 650µl de PW3 em cada eppendorf e vortexar para misturar.
25. Retirar 650µl do sobrenadante e transferir para o tubo com filtro. O tubo com filtro não suporta todo o líquido de uma vez. Colocar apenas 650µl. Atenção! Não descartar o resto do líquido no tubo Eppendorf.
26. Pegar os tubos com filtro e centrifugar a 13000rpm por 60s.
27. Descartar o líquido filtrado e voltar o filtro para a parte de baixo do tubo. Adicionar novamente 650µl do líquido que sobrou no eppendorf de 2mL e centrifugar novamente a 13000rpm por 60s.
 - a. Enquanto centrifuga, cortar as tampas dos eppendorfs de 2mL que sobraram na rack (Sobraram 2 para cada replicata / filtro)
28. Descartar o líquido filtrado e pela última vez, se sobrou líquido sem filtrar, adicionar nos tubos com filtro e centrifugar novamente.
29. Descartar o líquido filtrado e trocar o fundo do tubo com filtro por tubos Eppendorf de 2ml. Para isso, jogar fora a tampa dos tubos que foram cortados e colocar o recipiente com filtro no tubo Eppendorf destampado.
30. Agitar o recipiente que contém PW4 e adicionar 650µl dele no tubo com os filtros com o novo fundo.
31. Centrifugar todos os tubos com o fundo novo a 13000rpm por 60s.
 - a. Enquanto centrifuga, colocar o EB no banho seco a 55°C. para isso, aliquotar 100µl para cada amostra e um pouco a mais e colocar num eppendorf de 2mL. Como hoje temos 6 amostras (3 replicatas/filtro para cada ponto) colocamos 615µl no eppendorf novo que é deixado no banho seco.
32. Quando terminar de centrifugar, descartar o líquido e adicionar 650µl de etanol em cada tubo com filtro. Centrifugar novamente a 13000rpm por 60s.
33. Descartar o líquido que foi filtrado e colocar novamente o tubo com filtro para centrifugar, porém dessa vez por 2min para ter certeza que saiu todo o líquido.

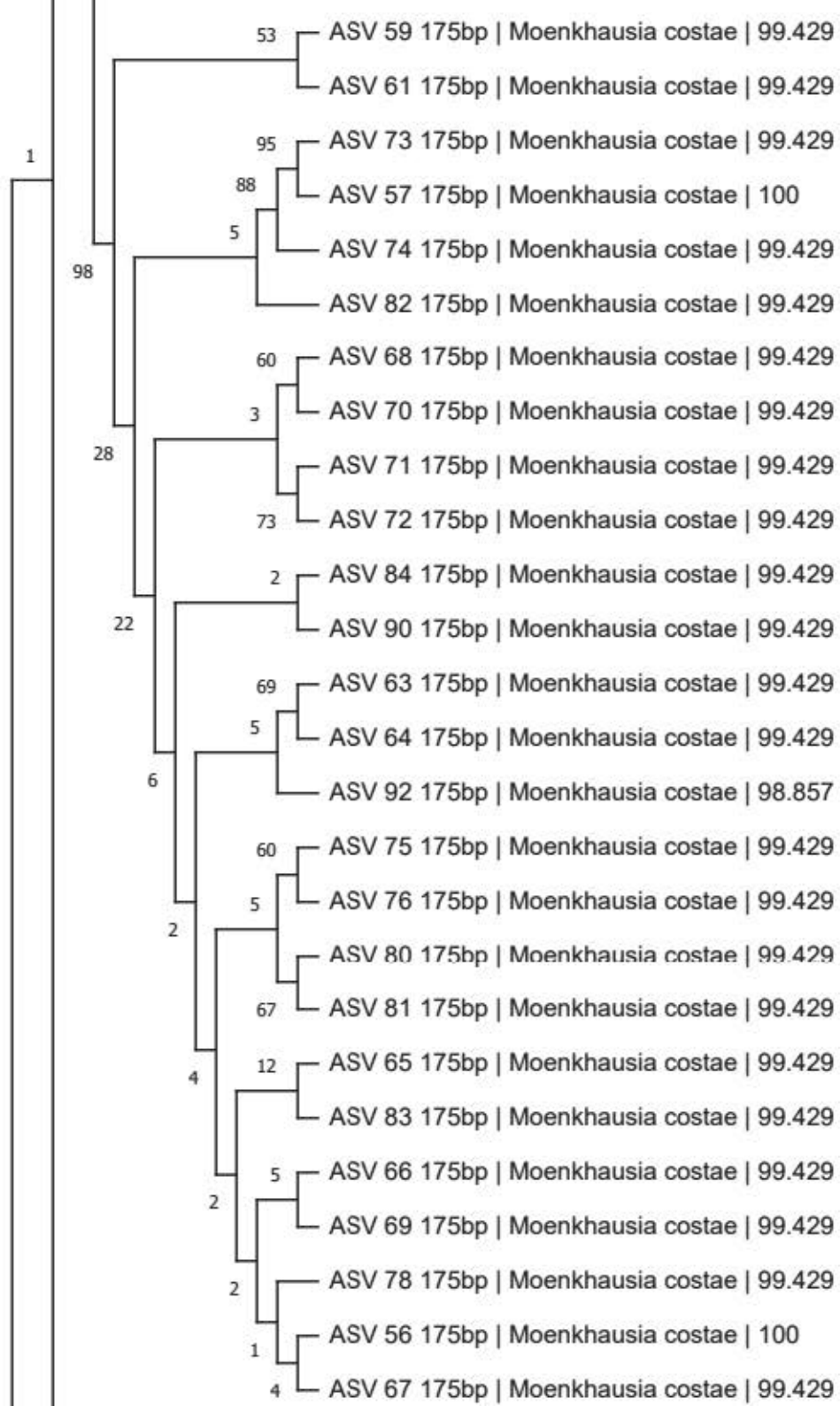
- a. Enquanto centrífuga, pegar 1 tubo eppendorf 2mL novo para cada replicata/filtro e escrever na tampa as seguintes informações:
 - i. Local de coleta (Abreviado, ex. LI)
 - ii. Meio de coleta (STX ou MCE)
 - iii. Identificação da amostra (Sigla do projeto: LI)
 - iv. Tipo de replicata (A, B ou C)
 - v. Data da campanha (JAN22)
 - b. Identificar no lado do tubo a data da extração.
34. Após centrifugar, jogar o fundo fora com o líquido e passar o filtro para o último fundo. dos 100µl de EB que está no banho seco, adicionar 50µl (parece muito mas não é, adicione o líquido direto ao filtro) com a pipeta de 200µl. Colocar para centrifugar a 13000rpm por 60s.
 35. Após centrifugar, não descarte o líquido filtrado. Ele contém o DNA obtido. Adicionar os 50µl restantes de EB em cada replicata e colocar para centrifugar novamente a 13000rpm por 60s.
 36. Descartar o filtro e transferir o filtrado para os eppendorfs com as identificações na tampa com a pipeta de 200µl calibrada em 110µl (10µl a mais para ter certeza que vai pegar tudo).
 37. Armazenar os eppendorfs com o DNA extraído a -20°C

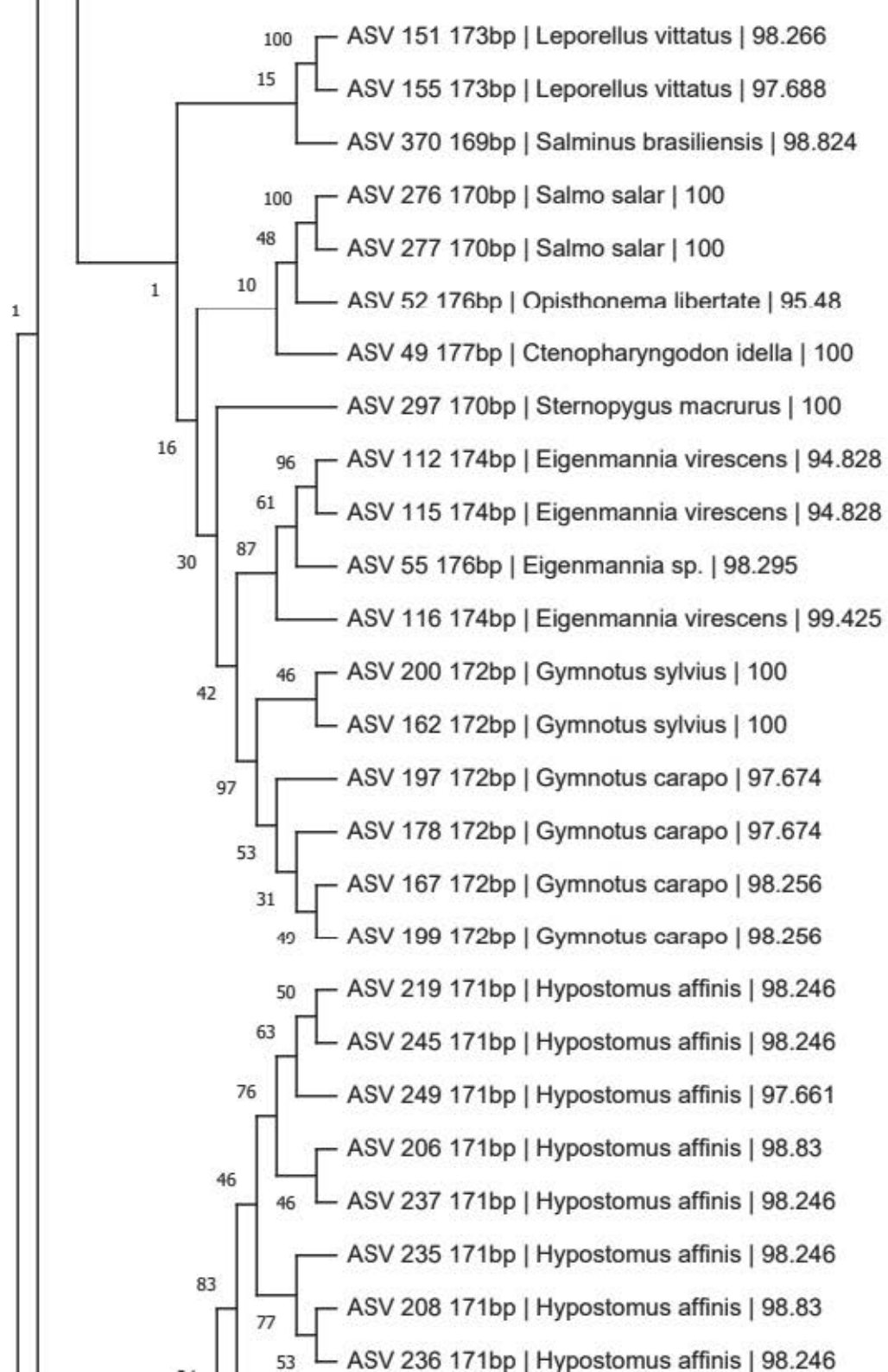
Figura Suplementar 1A – Árvore de Máxima Verossimilhança

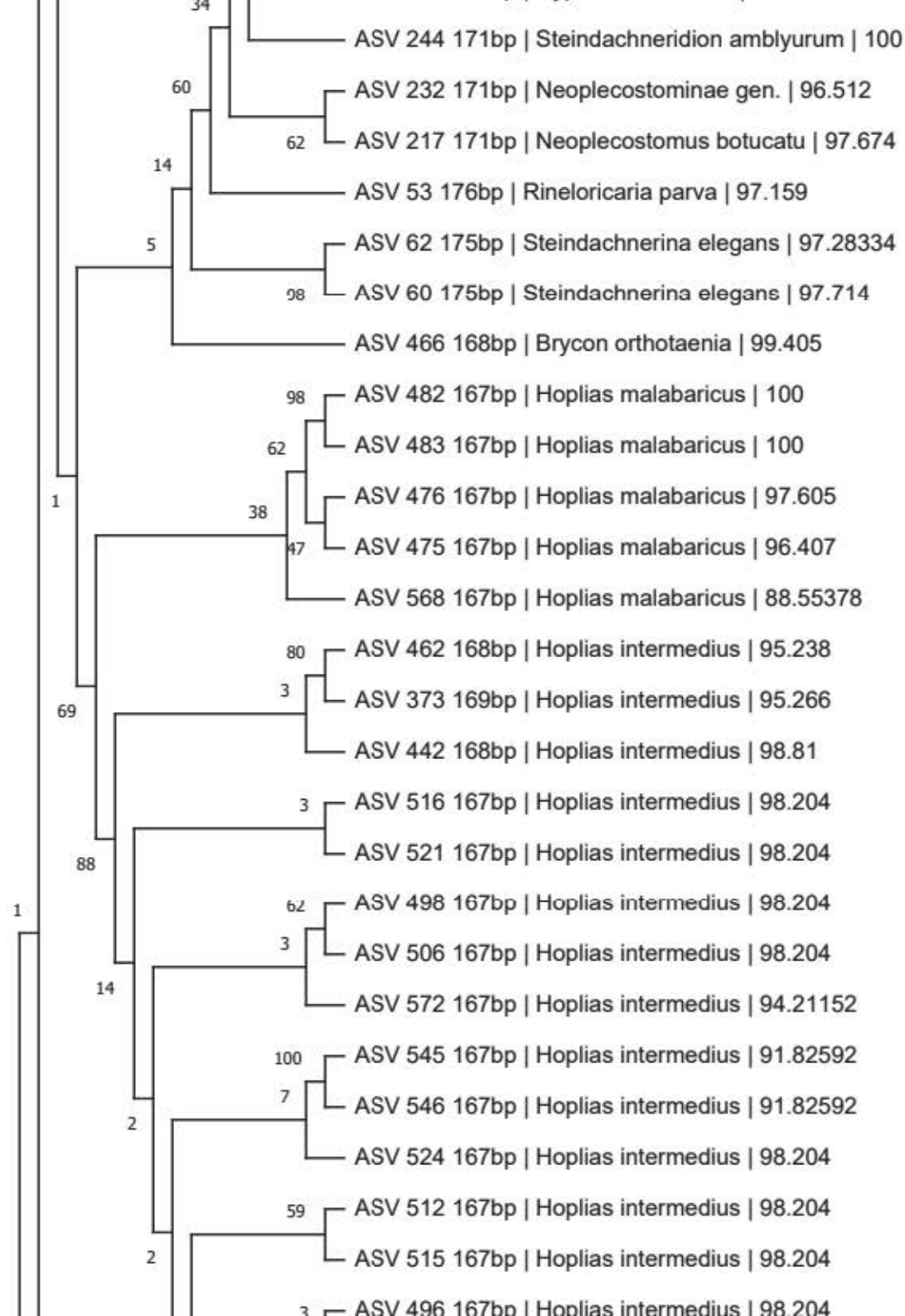


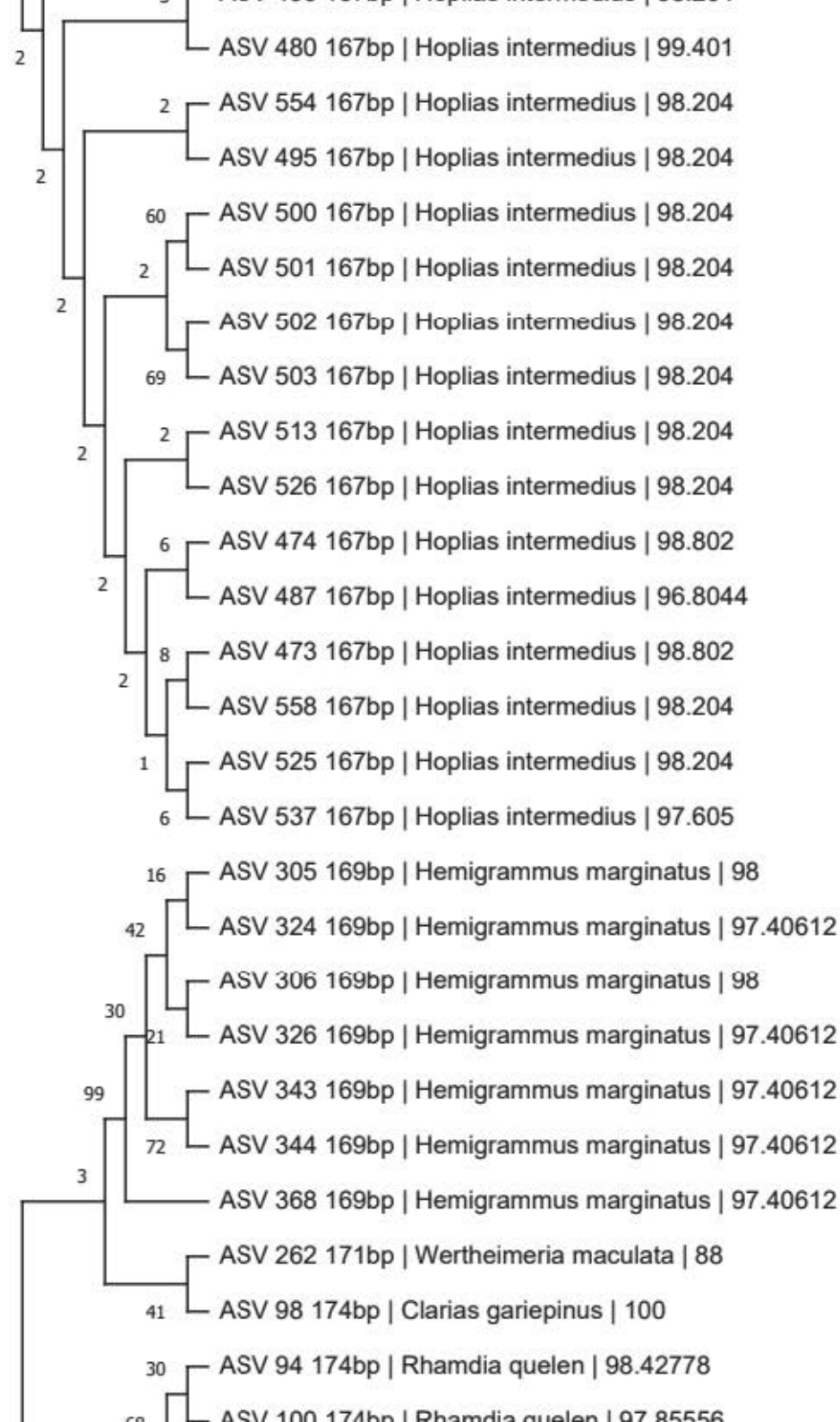


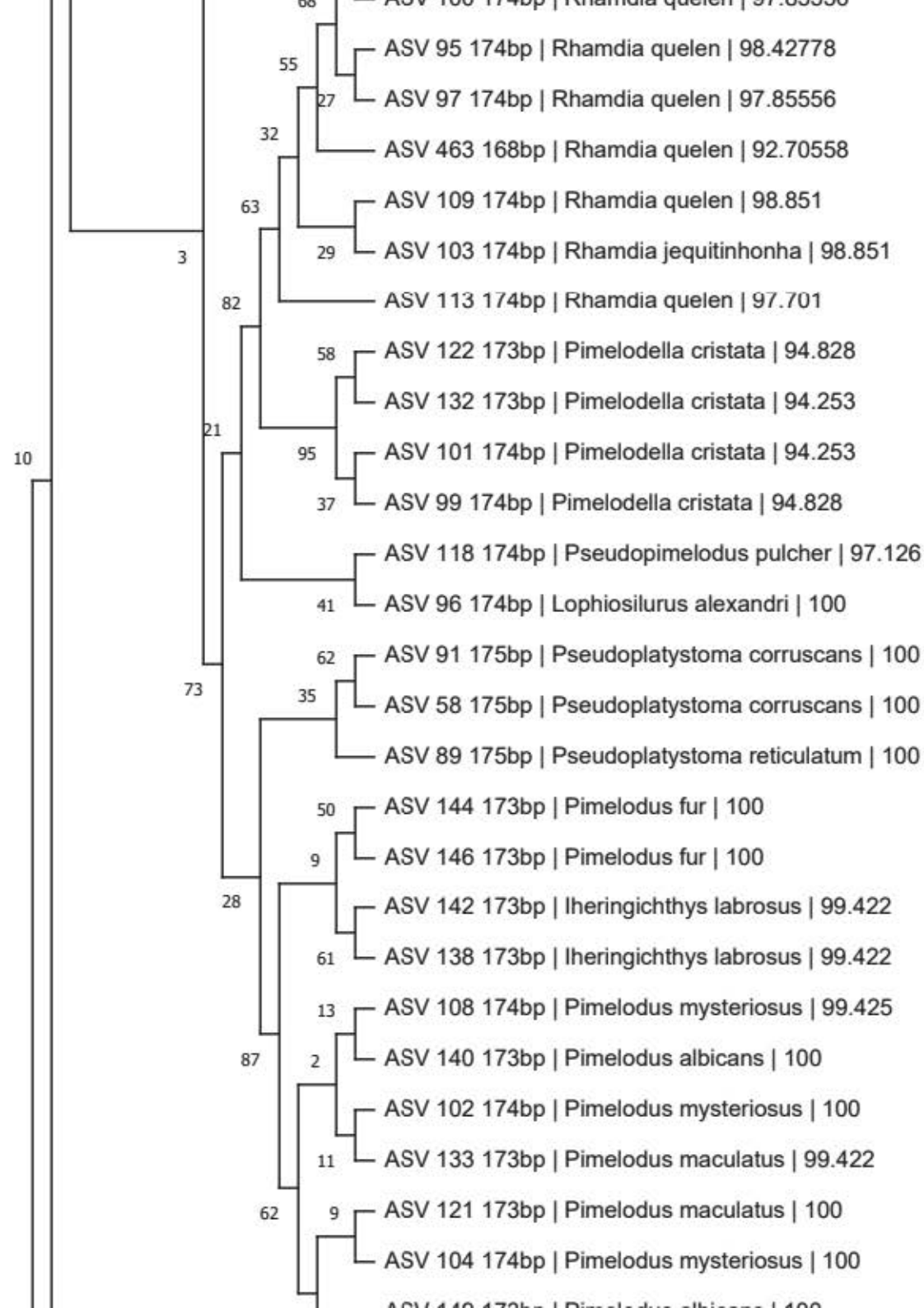


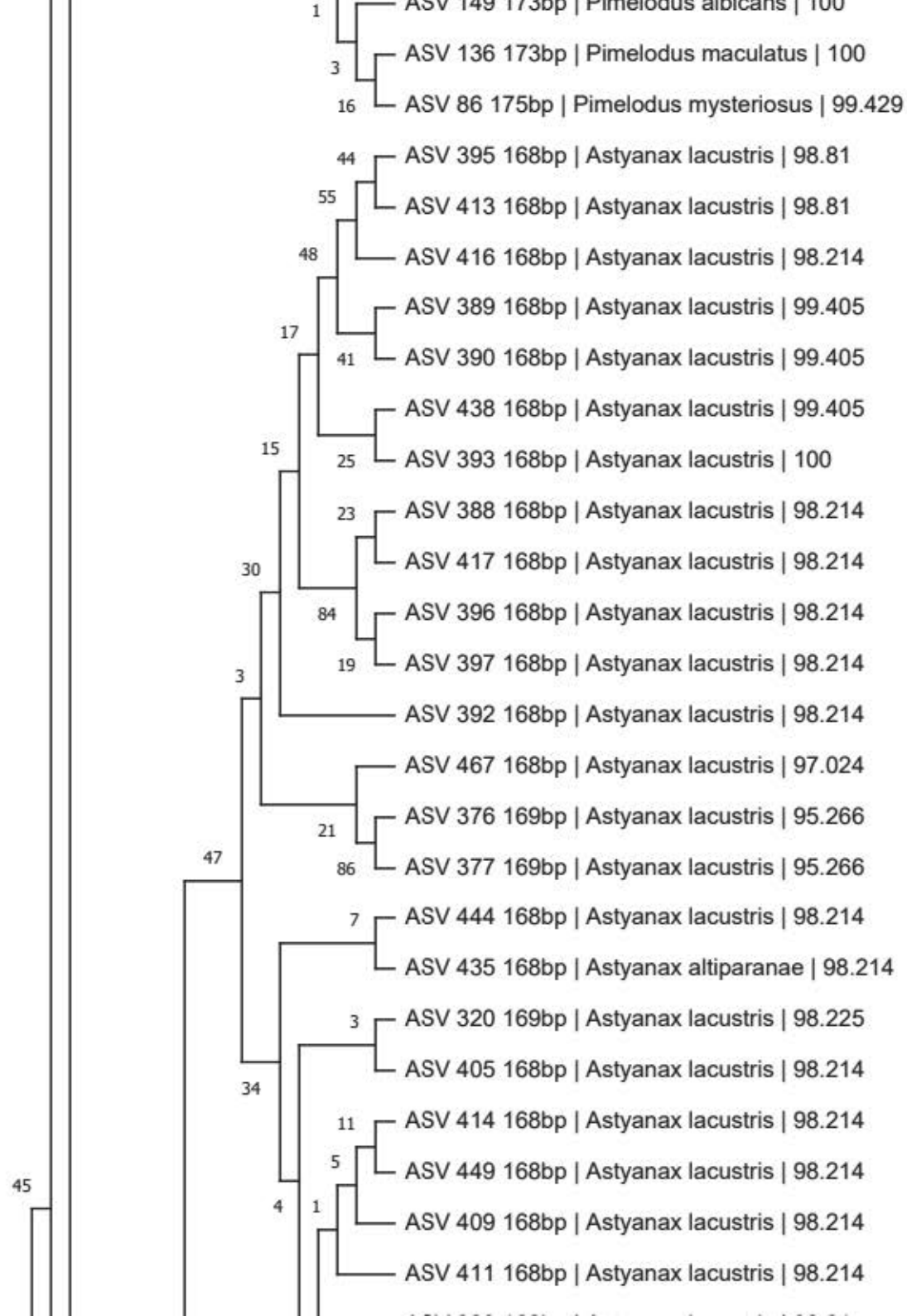


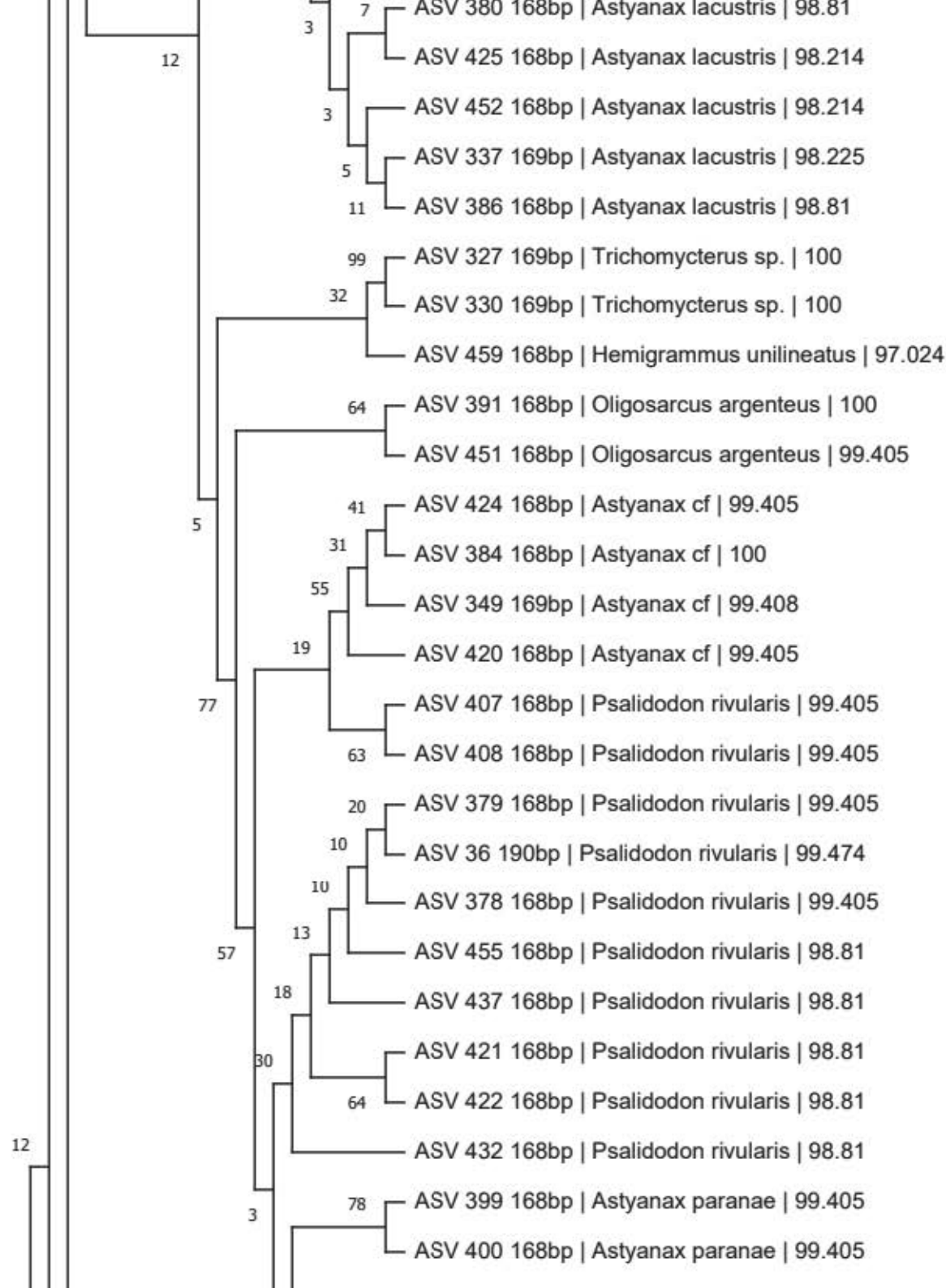


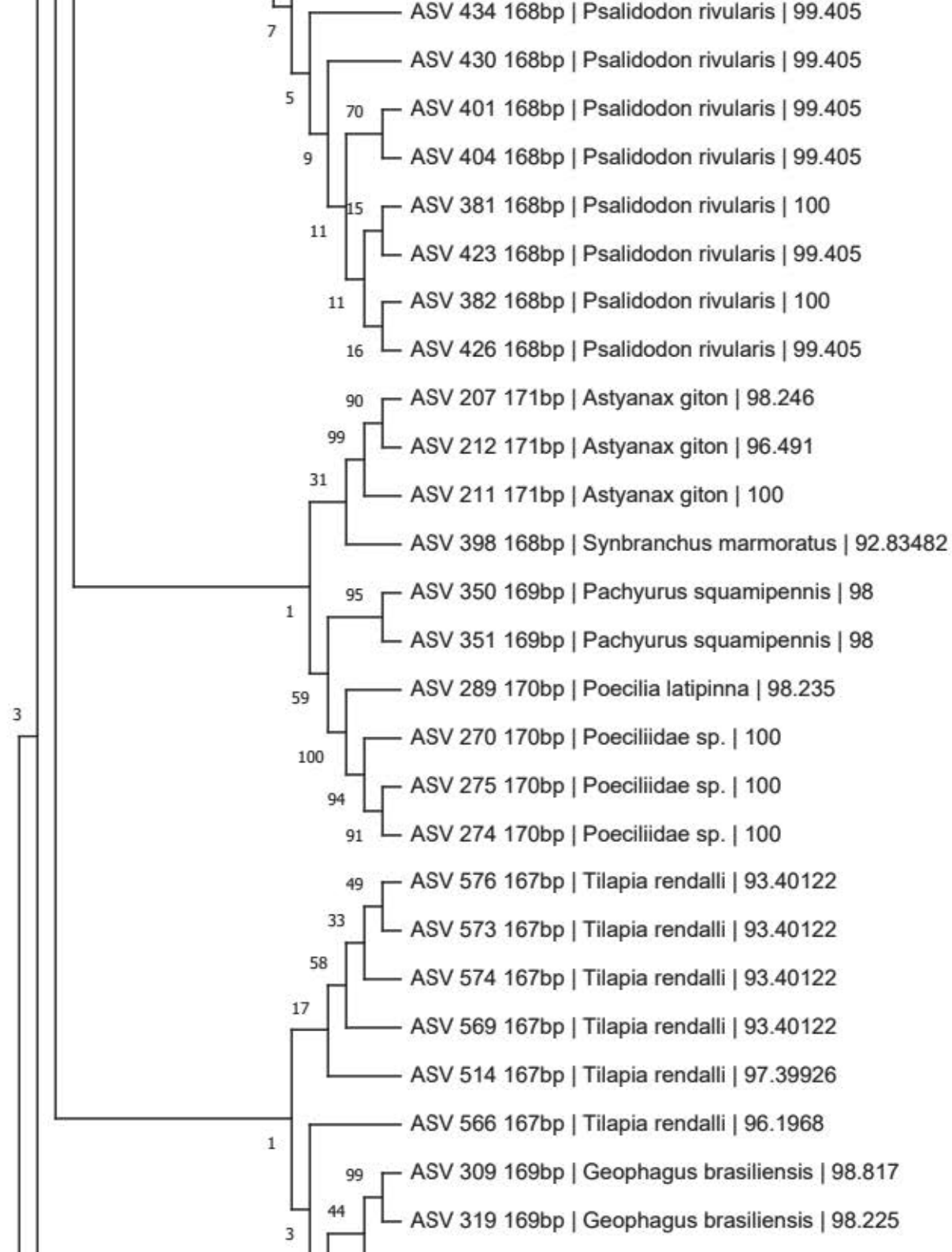


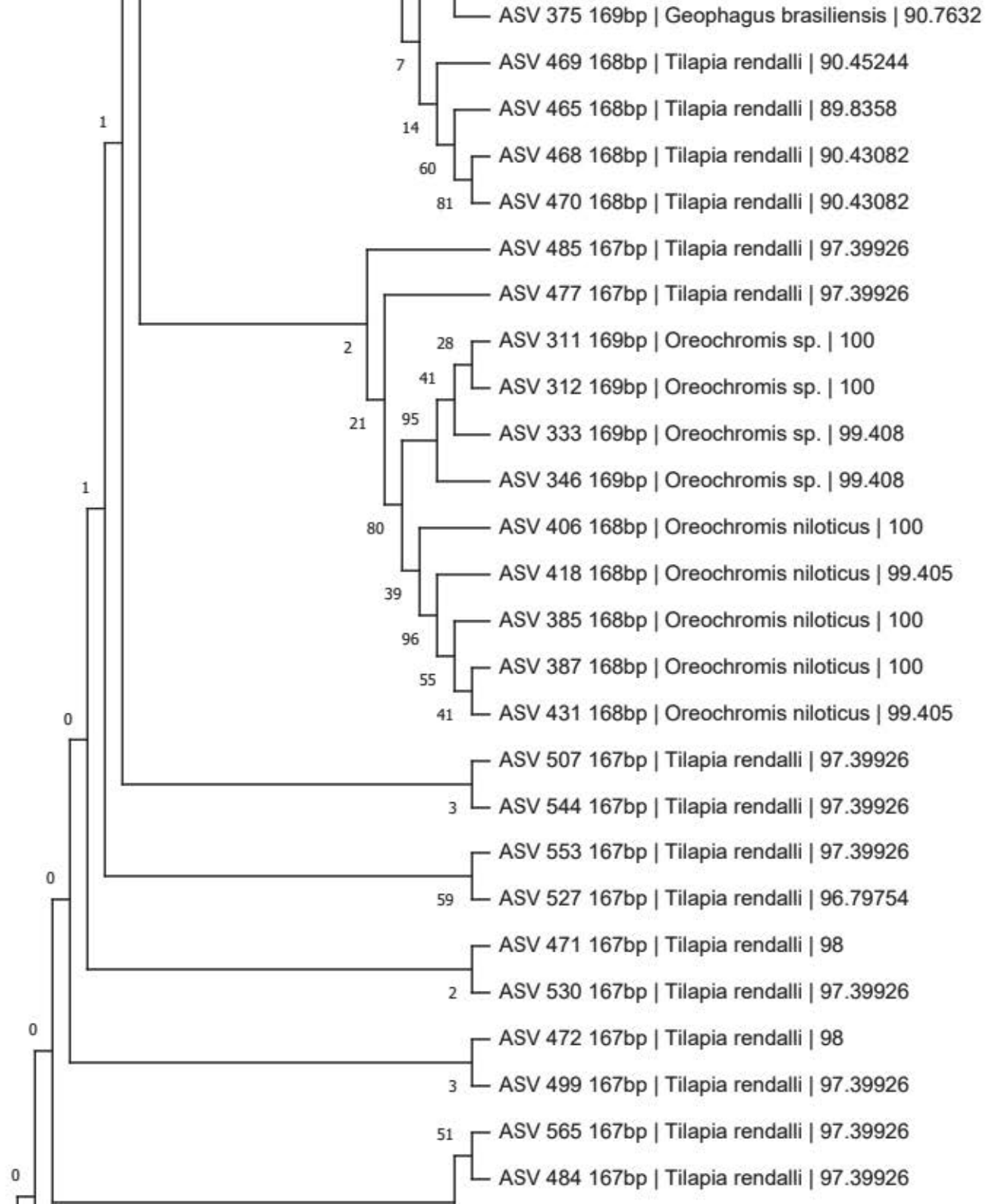


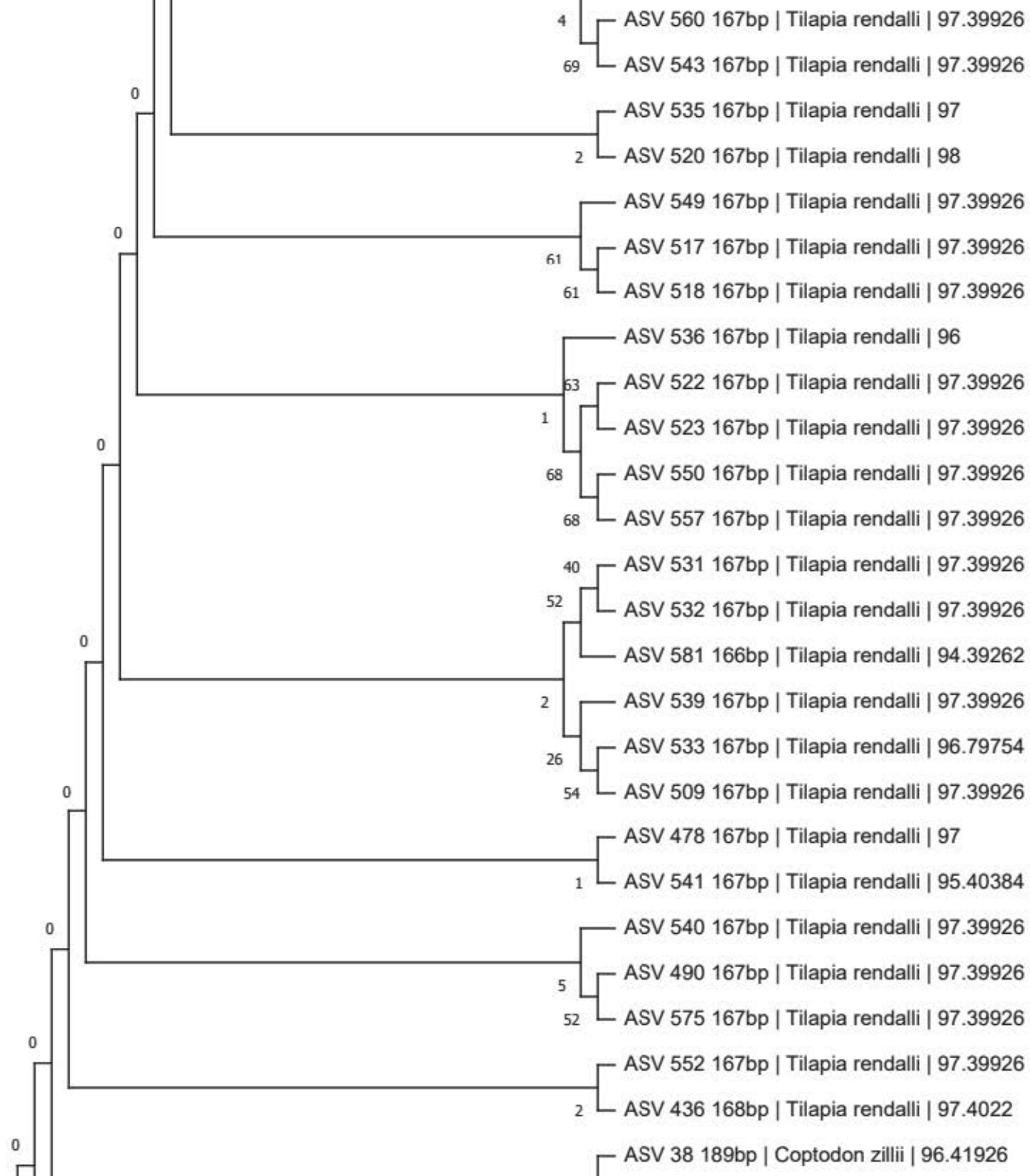












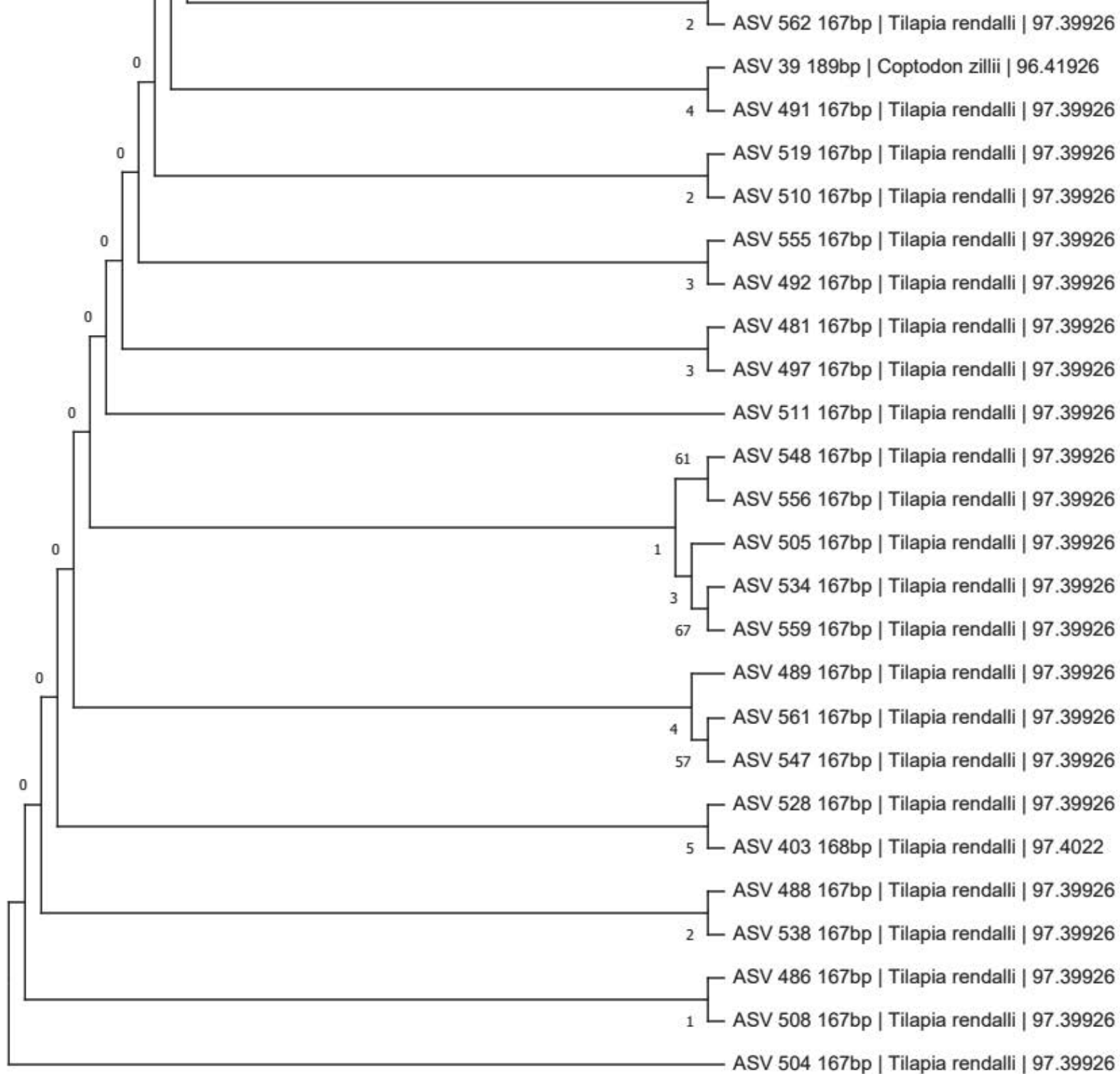
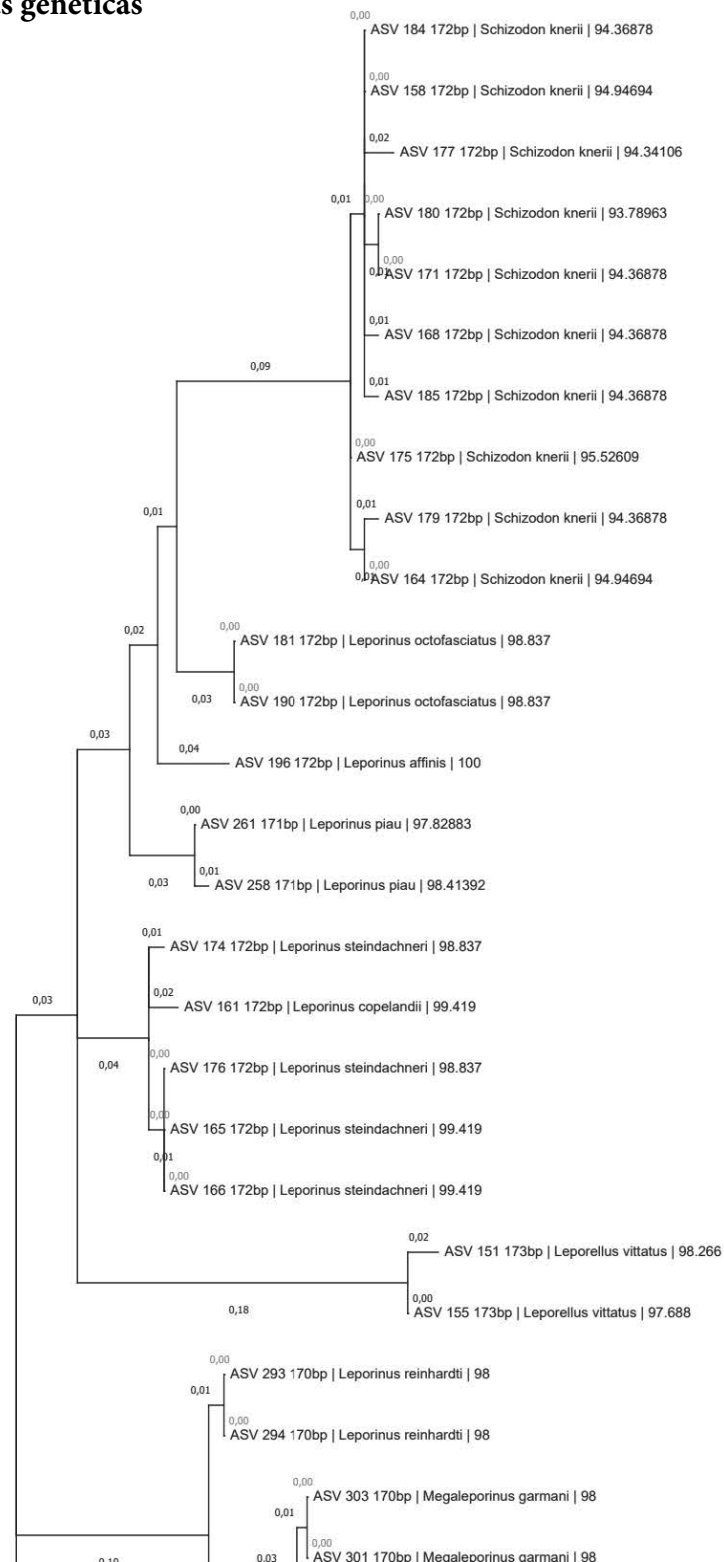
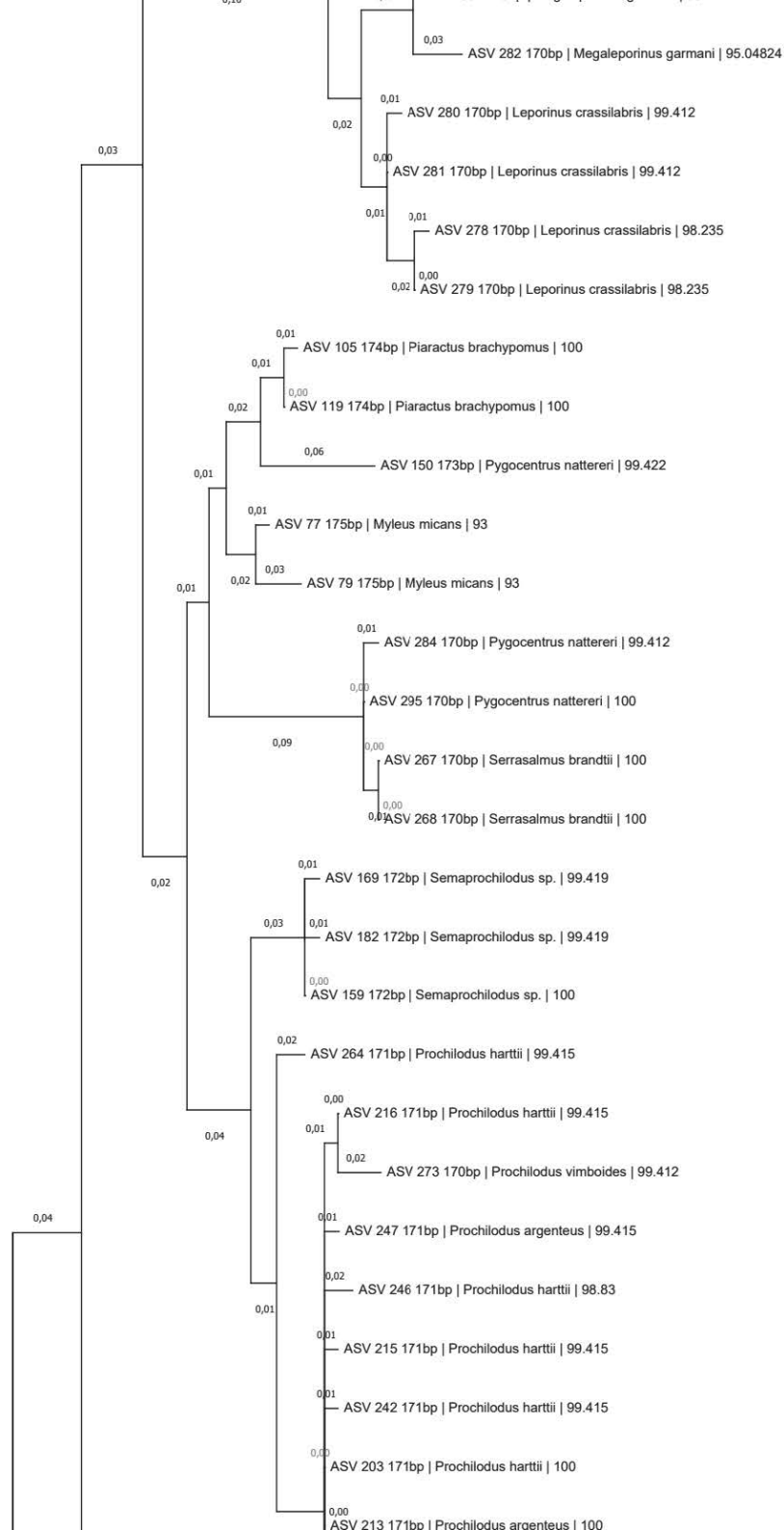
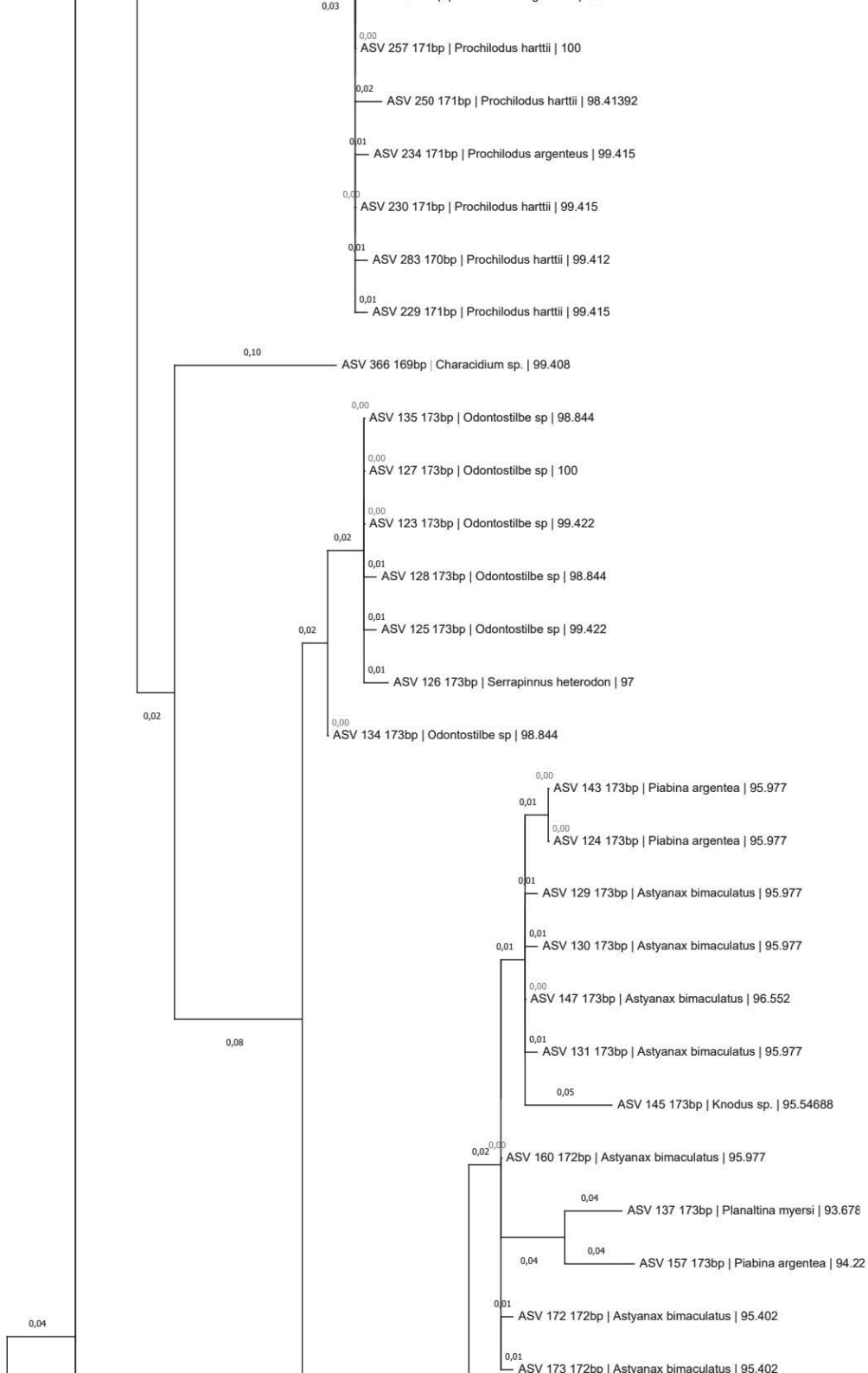
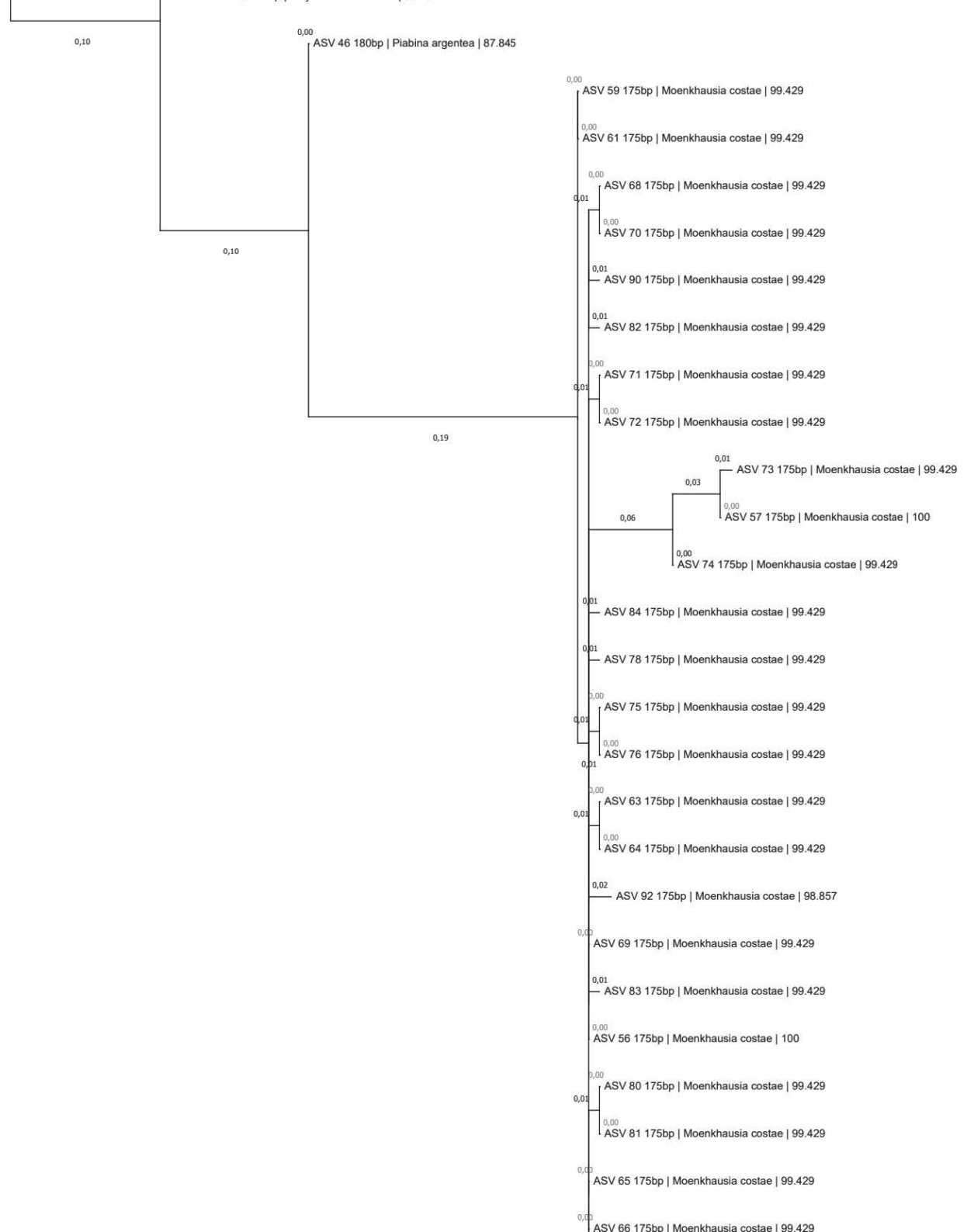


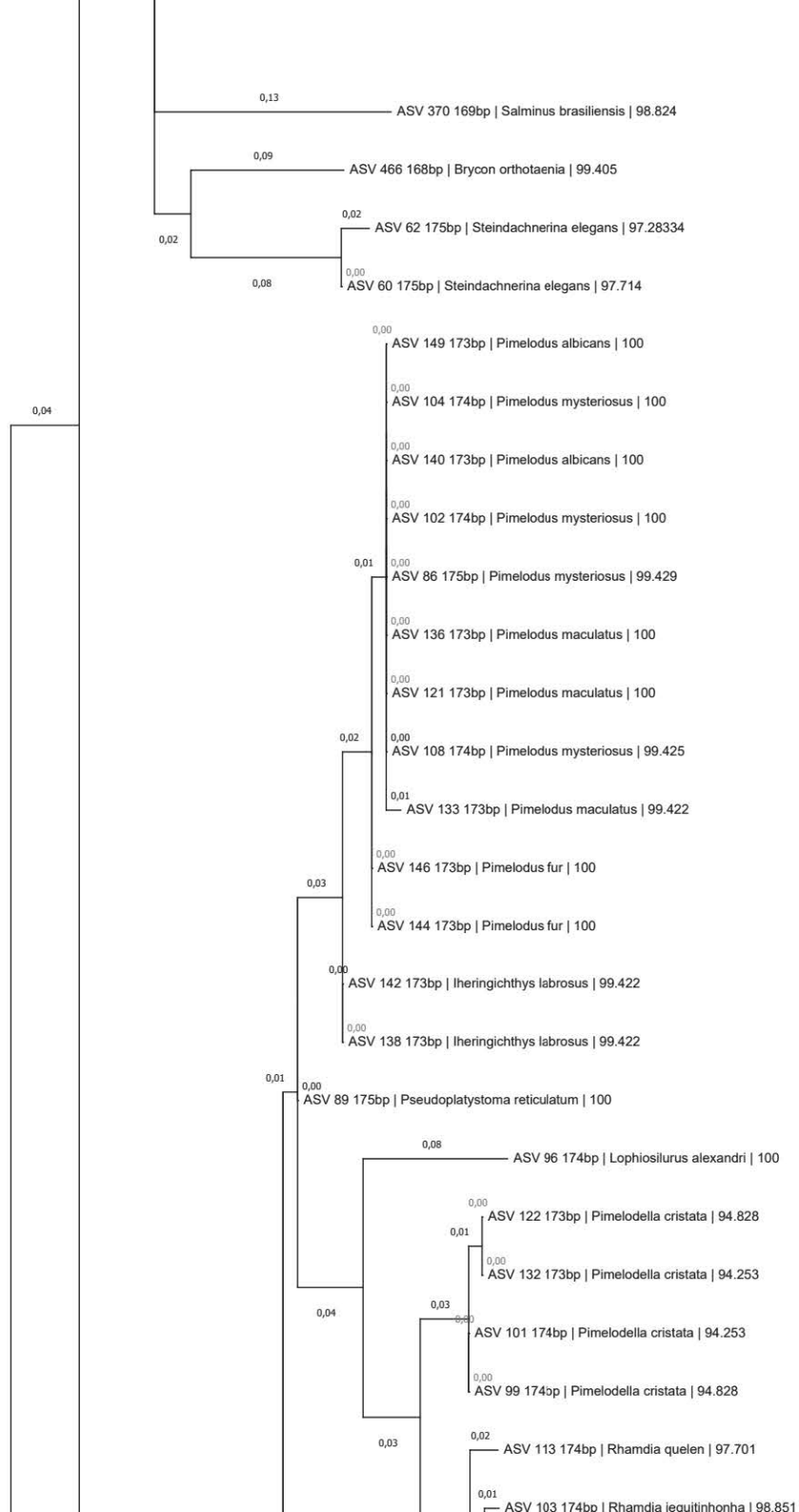
Figura Suplementar 1B – Árvore de distâncias genéticas

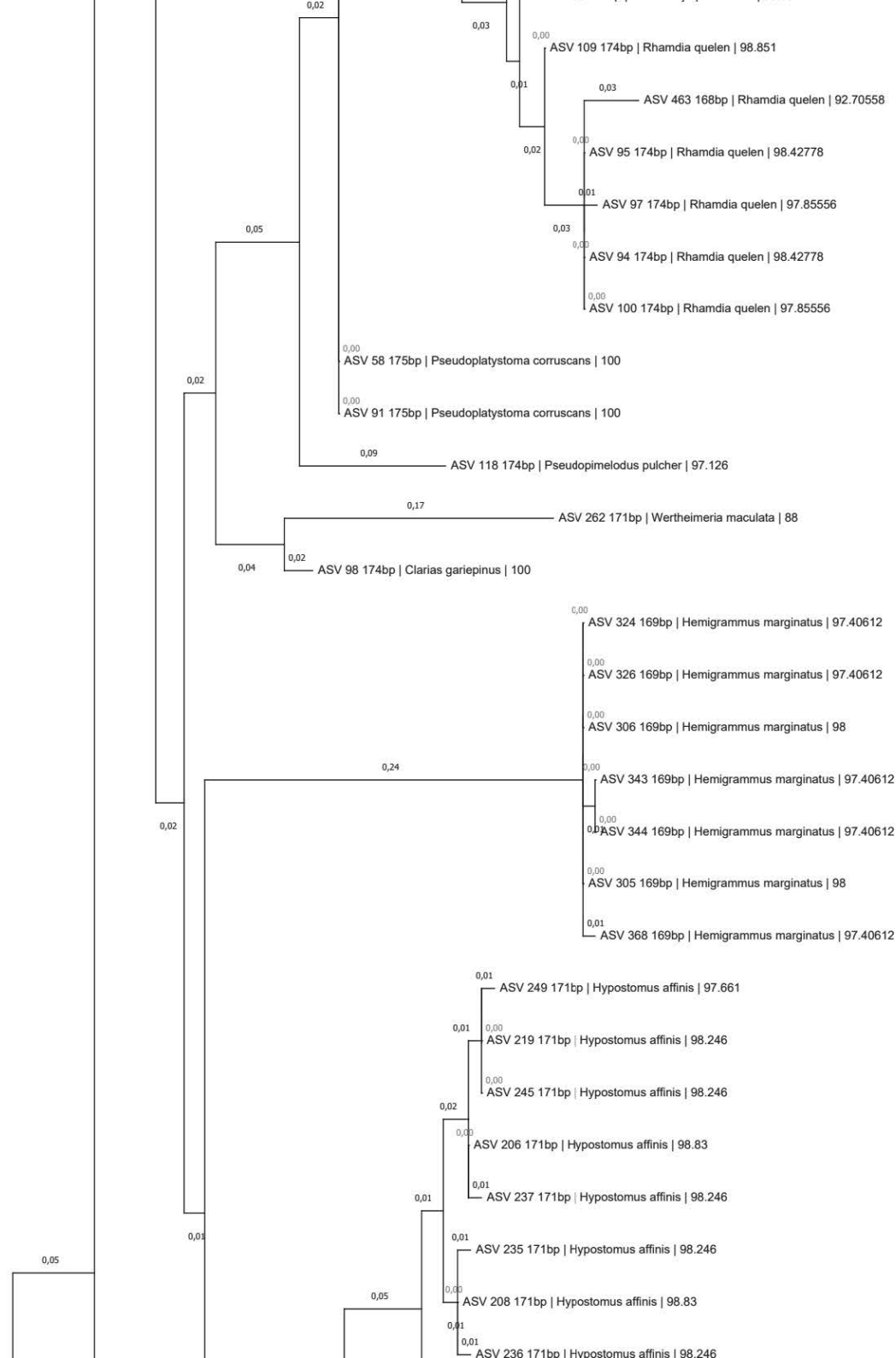


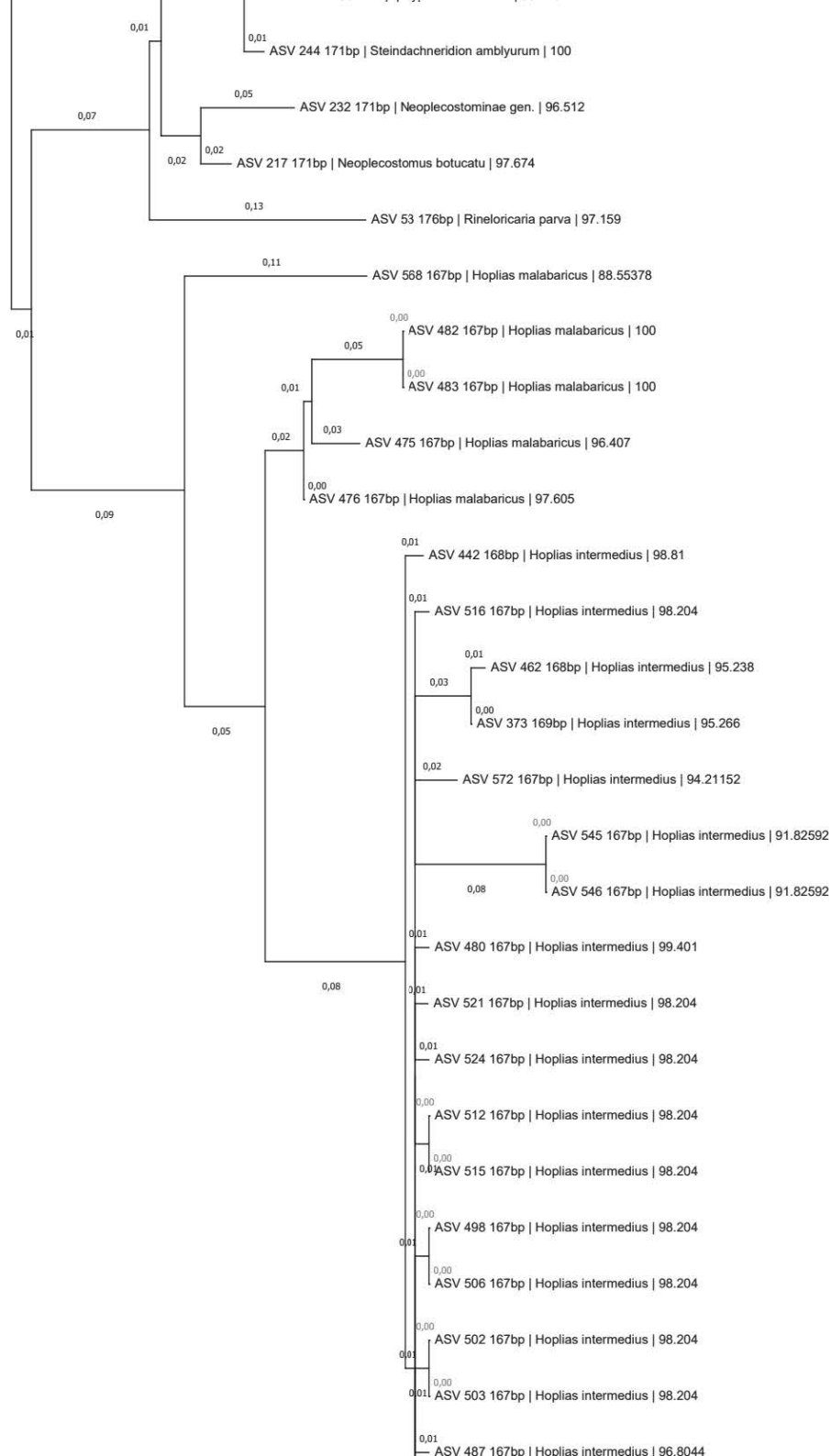


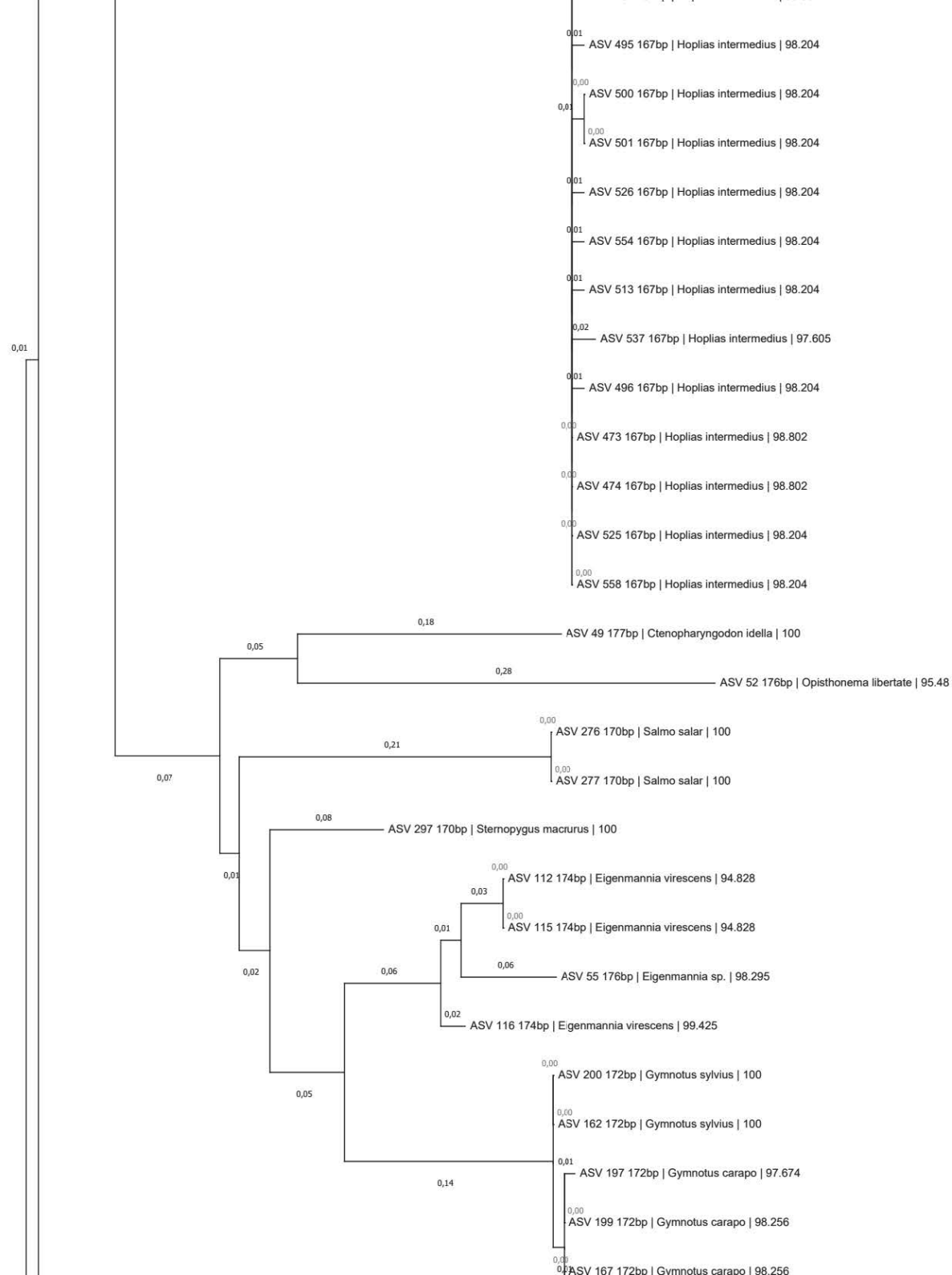


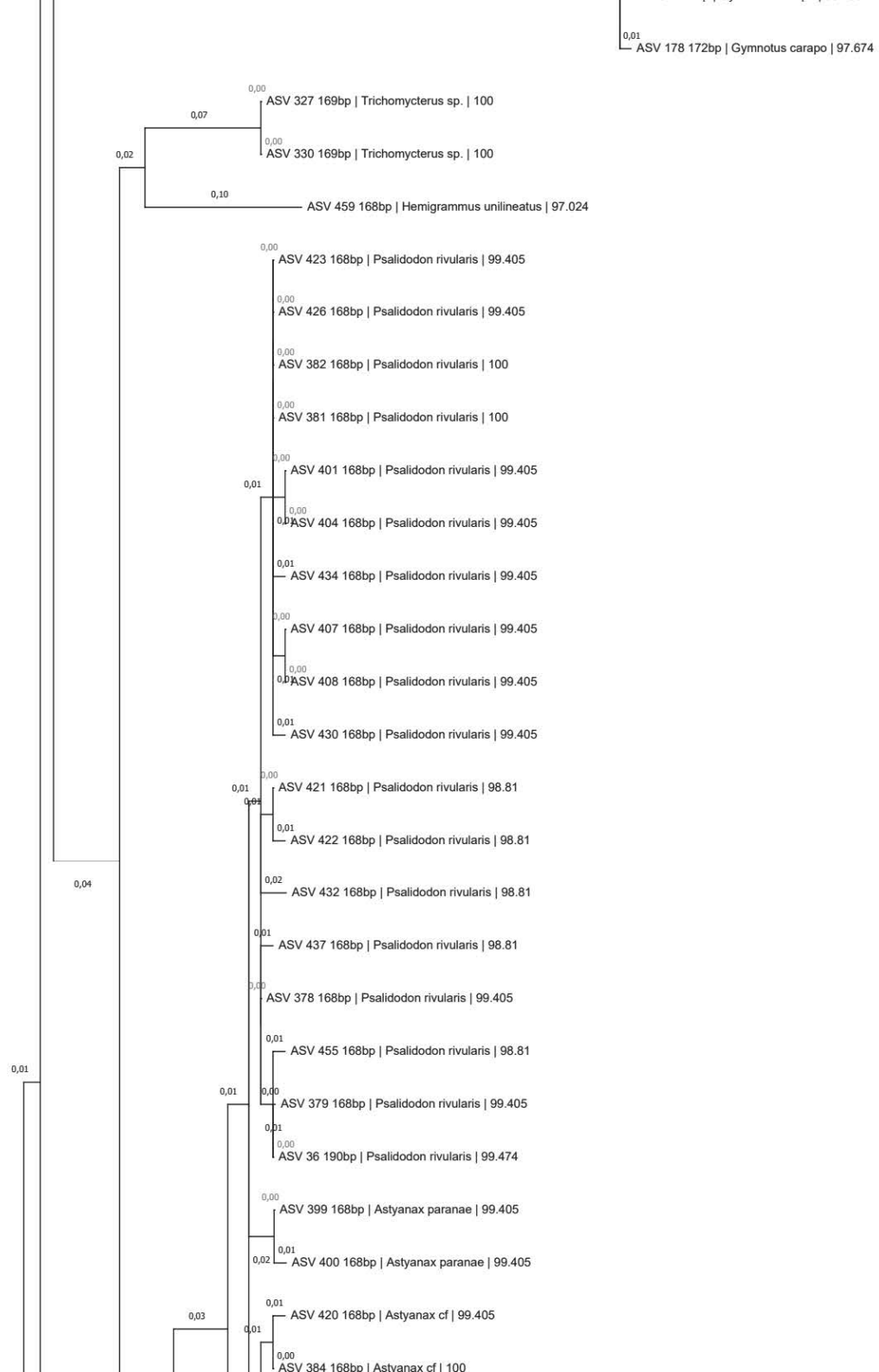


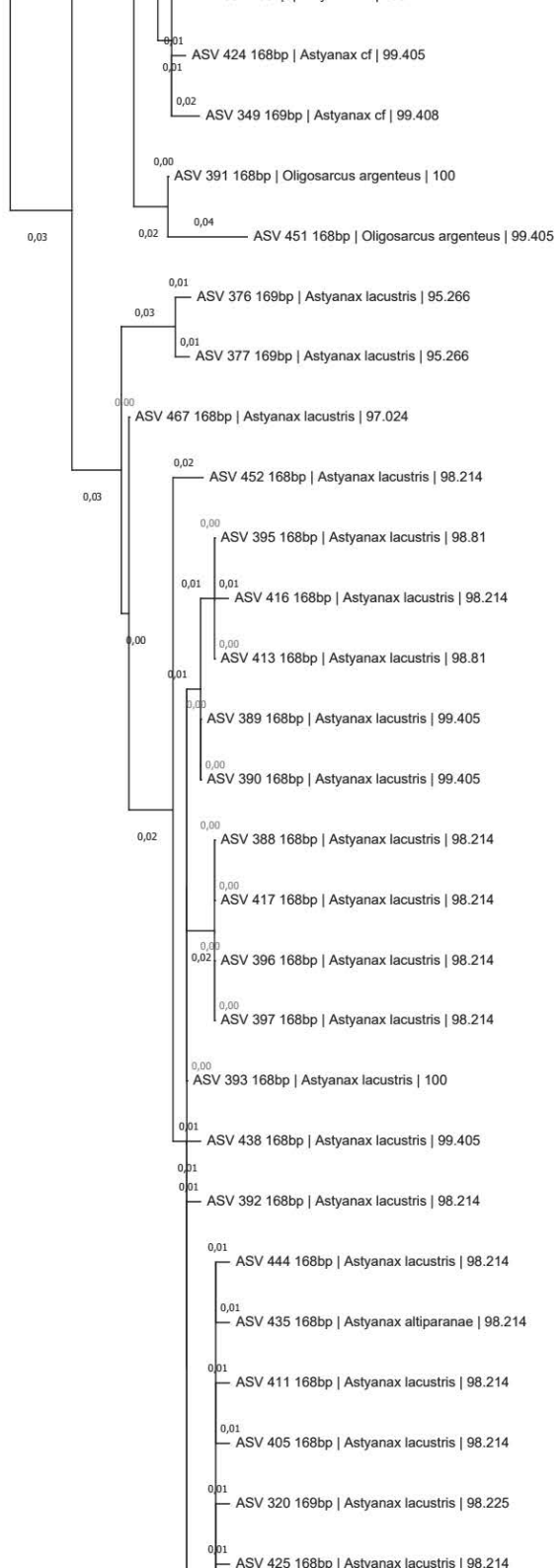


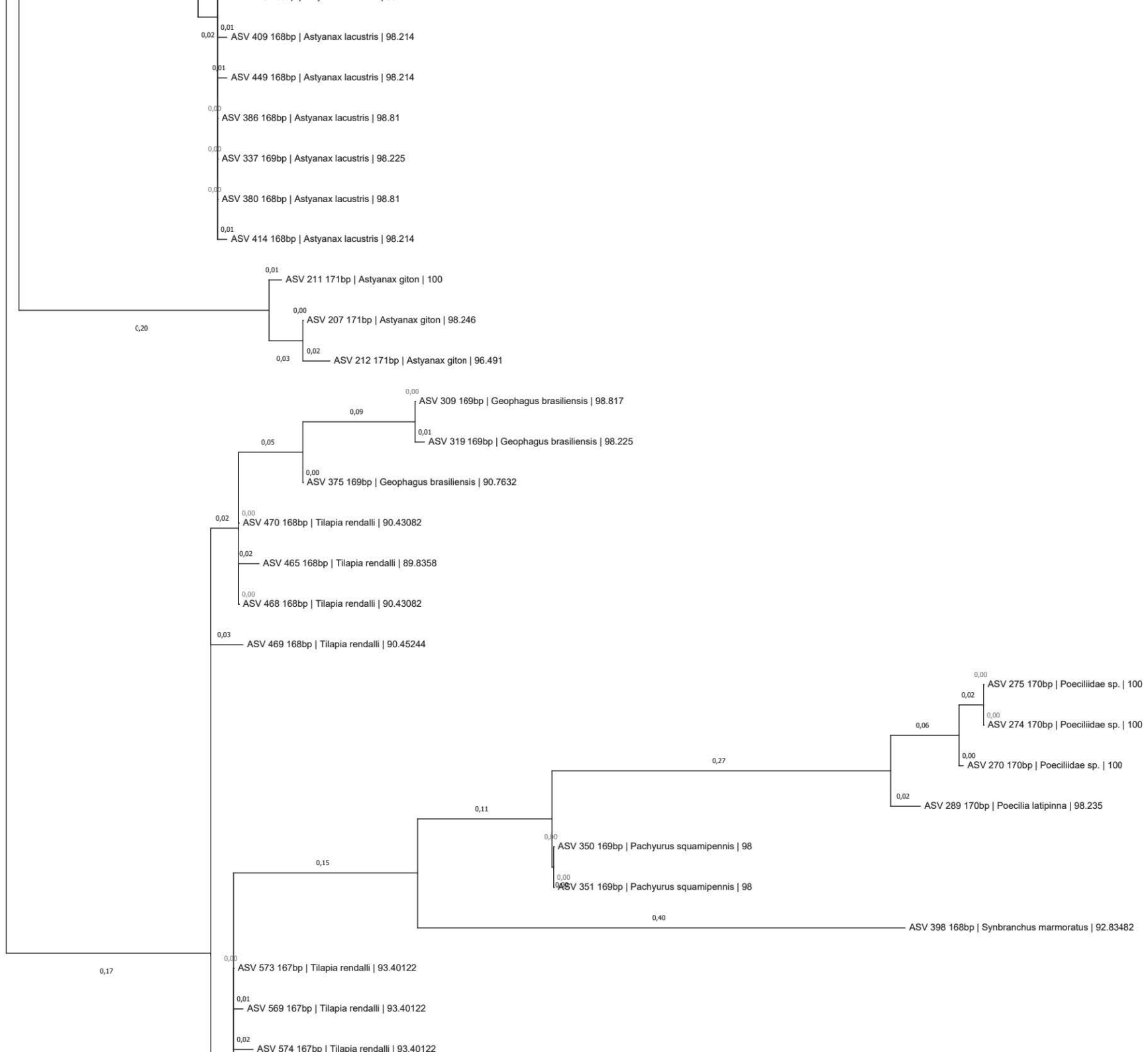


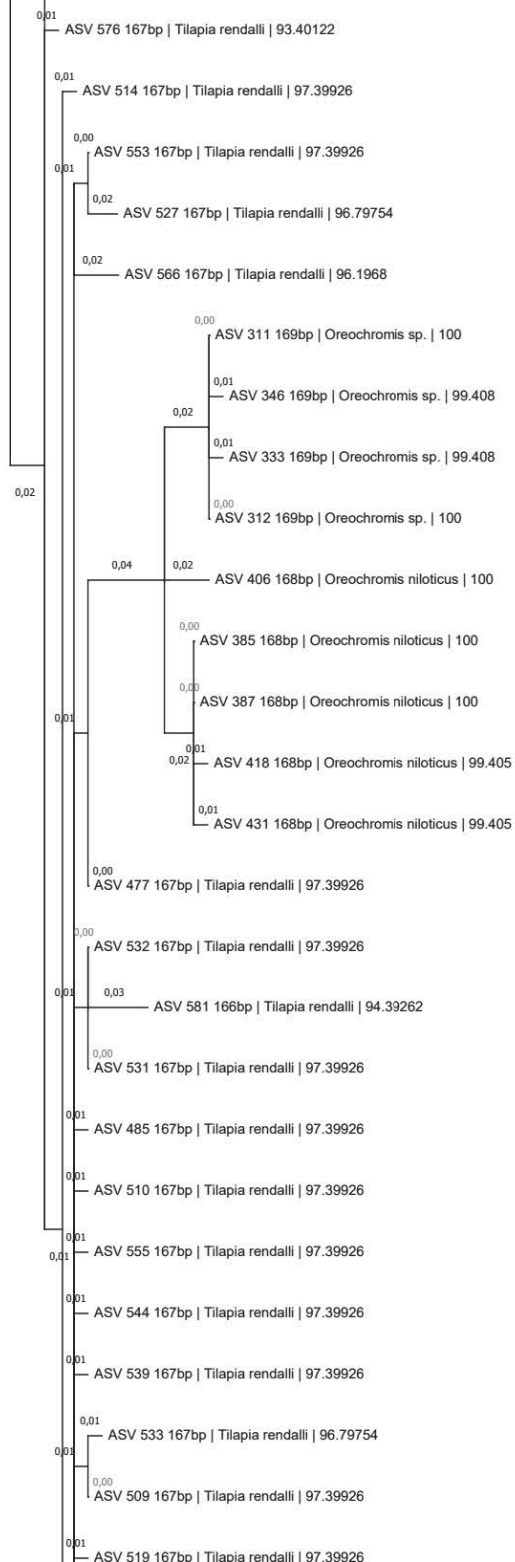


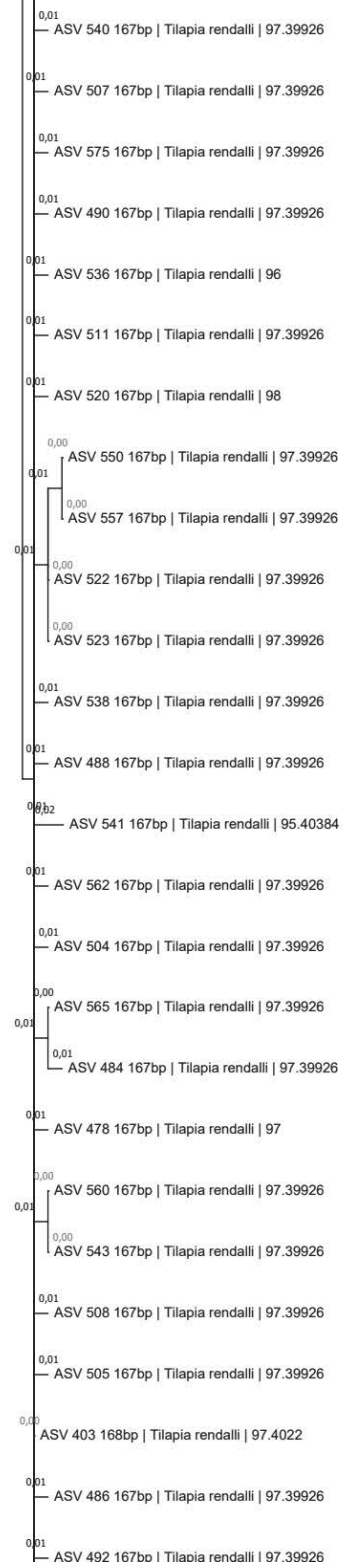


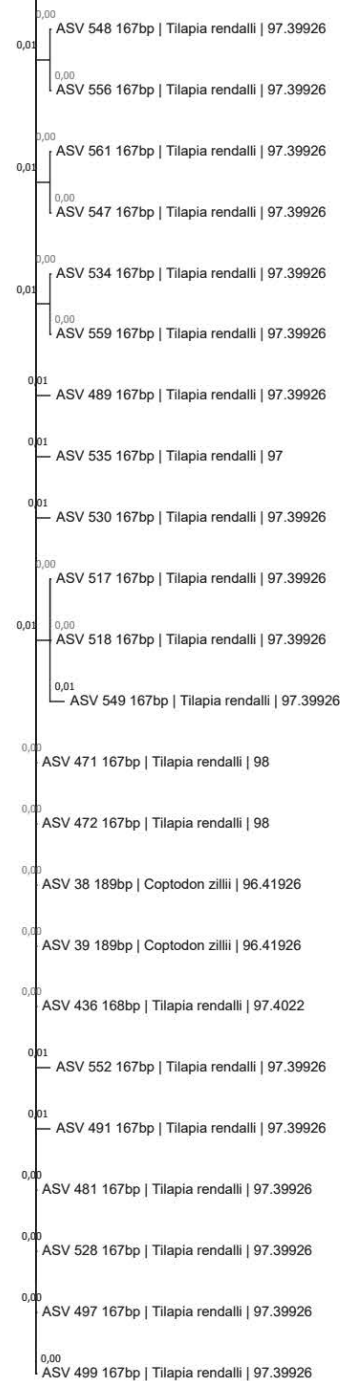












0,20

Actinopteri	genus of Pseudocichlaeini	97.39026 Cichliformes	1 True detection	In-range	167	Tagia read1 Salmo alar isolate C3370/194-the gene, partial sequence, 125 ribosomal rRNA and tRNA-Val genes, complete sequence, and 16S ribosomal rRNA gene, partial sequence, mitochondrial	97.3907	98	0	4861	163 126GcGB	97.4005	167	0	LC382366.1	NT	Capdoen albi isolates C215/95 small subunit ribosomal rRNA gene, partial sequence, mitochondrial	97.4005	100	0	0.0089943.1	167	NT	TRUE	+ASV_486_167a	CTCCGGCTGTACGAGAGCCCAATTGACACATCCGGCAAGATGTAAAGATTTTAACTACCAAGCCCTCAGATCTGTGATCTCCGAGTGAAGAGCCACGAGAGTGGCTTTTTCCTCCGACCCGACGAAGCTGGAA			
Actinopteri	Salmo alar	Salmo alar	100 Subfamilies	91 True detection	In-range	170	Salmo alar mitochondrial gene for 12S rRNA, partial sequence, specimen voucher: UW-21734	100	100	0	0.079802.1	170	NT	170	NT	0.020619.1	NT	Salmo alar mitochondrial gene for 12S rRNA, partial sequence, specimen voucher: UW-21734	100	100	0	0.0202545.1	170	NT	TRUE	+ASV_278_170a	TTCTGATCTTCGTGGGTGTAGGTAAGAGTGAAGCTCTCTGATGATCTGTGCTCCGAGCTGAGCTGGAGGAGTCTGGCTTTTAAATTTTCTCCAGACATCTCTTGCGGTGATTCACATAGGAGCTCTTACACCGGCTG		
Actinopteri	Salmo alar	Salmo alar	100 Subfamilies	92 True detection	In-range	100	Salmo alar mitochondrial gene for 12S rRNA, partial sequence, specimen voucher: UW-21734	100	100	0	0.079802.1	100	100	170	0	0.020619.1	NT	Salmo alar mitochondrial DNA, complete genome	100	100	0	0.0202545.1	170	NT	TRUE	+ASV_277_170a	CTCCGGCTGTACGAGAGCCCAATTGACACATCCGGCAAGATGTAAAGATTTTAACTACCAAGCCCTCAGATCTGTGATCTCCGAGTGAAGAGCCACGAGAGTGGCTTTTTCCTCCGACCCGACGAAGCTGGAA		
Actinopteri	Cichla kelberi	Cichla kelberi	98.408 Cichliformes	22 True detection	In-range	169	Cichla kelberi voucher 104 421 small subunit ribosomal rRNA gene, partial sequence, mitochondrial	98.408	100	0	0.0278851.1	169	NT	98.408	100	0	NC_030272.1	NT	Cichla kelberi mitochondrial, complete genome	98.408	100	0	0.0278851.1	169	NT	TRUE	+ASV_413_169a	CTCCGGCTGTACGAGAGCCCAATTGACACATCCGGCAAGATGTAAAGATTTTAACTACCAAGCCCTCAGATCTGTGATCTCCGAGTGAAGAGCCACGAGAGTGGCTTTTTCCTCCGACCCGACGAAGCTGGAA	
Actinopteri	Hypomelas affinis	Hypomelas affinis	98.246 Siluriformes	27 True detection	In-range	171	Hypomelas affinis voucher PM9237 small subunit ribosomal rRNA gene, partial sequence, mitochondrial	98.246	100	0	0.0278851.1	171	NT	98.246	100	0	0.0278851.1	NT	Hypomelas affinis mitochondrial, complete genome	98.246	100	0	0.0278851.1	171	NT	TRUE	+ASV_218_171a	CTCCGGCTGTACGAGAGCCCAATTGACACATCCGGCAAGATGTAAAGATTTTAACTACCAAGCCCTCAGATCTGTGATCTCCGAGTGAAGAGCCACGAGAGTGGCTTTTTCCTCCGACCCGACGAAGCTGGAA	
Actinopteri	Oreochromis niloticus	Oreochromis niloticus	100 Cichliformes	94 True detection	In-range	168	Lepomis crassilabris voucher 298 small subunit ribosomal rRNA gene, partial sequence, mitochondrial	100	100	0	0.047626.1	168	NT	100	100	0	0.047626.1	NT	Oreochromis niloticus 22S ribosomal rRNA gene, partial sequence, mitochondrial	98.405	100	0	0.0265661.1	168	NT	TRUE	+ASV_408_168a	CTCCGGCTGTACGAGAGCCCAATTGACACATCCGGCAAGATGTAAAGATTTTAACTACCAAGCCCTCAGATCTGTGATCTCCGAGTGAAGAGCCACGAGAGTGGCTTTTTCCTCCGACCCGACGAAGCTGGAA	
Actinopteri	Lepomis crassilabris	Lepomis crassilabris	98.235 Characiformes	95 True detection	In-range	170	Lepomis crassilabris voucher 298 small subunit ribosomal rRNA gene, partial sequence, mitochondrial	98.235	100	0	0.0792438.1	170	NT	98.235	100	0	0.0792438.1	NT	Lepomis crassilabris mitochondrial, complete genome	98.235	100	0	0.0792438.1	170	NT	TRUE	+ASV_278_170a	CTCCGGCTGTACGAGAGCCCAATTGACACATCCGGCAAGATGTAAAGATTTTAACTACCAAGCCCTCAGATCTGTGATCTCCGAGTGAAGAGCCACGAGAGTGGCTTTTTCCTCCGACCCGACGAAGCTGGAA	
Actinopteri	Lepomis crassilabris	Lepomis crassilabris	98.235 Characiformes	96 True detection	In-range	170	Lepomis crassilabris voucher 298 small subunit ribosomal rRNA gene, partial sequence, mitochondrial	98.235	100	0	0.0792438.1	170	NT	98.235	100	0	0.0792438.1	NT	Lepomis crassilabris mitochondrial, complete genome	98.235	100	0	0.0792438.1	170	NT	TRUE	+ASV_278_170a	TTTCTGATCTTCGTGGGTGTAGGTAAGAGTGAAGCTCTCTGATGATCTGTGCTCCGAGCTGAGCTGGAGGAGTCTGGCTTTTAAATTTTCTCCAGACATCTCTTGCGGTGATTCACATAGGAGCTCTTACACCGGCTG	
Actinopteri	Hoplosternum littorale	Hoplosternum littorale	98.405 Characiformes	10 True detection	In-range	168	Hoplosternum littorale voucher LA2570 - 2614 mitochondrial, complete genome	98.405	100	0	0.04748070.1	168	NT	98.405	100	0	NC_031803.1	NT	Anypanes cf. lucicola	98.405	100	0	0.1153	168	126GcGB	TRUE	+ASV_407_168a	TTTCTGATCTTCGTGGGTGTAGGTAAGAGTGAAGCTCTCTGATGATCTGTGCTCCGAGCTGAGCTGGAGGAGTCTGGCTTTTAAATTTTCTCCAGACATCTCTTGCGGTGATTCACATAGGAGCTCTTACACCGGCTG	
Actinopteri	Hoplosternum littorale	Hoplosternum littorale	98.404 Characiformes	3 True detection	In-range	168	Hoplosternum littorale voucher LA2570 - 2614 mitochondrial, complete genome	98.404	100	0	NC_031803.1	168	NT	98.404	100	0	NC_031803.1	NT	Anypanes cf. lucicola	98.405	100	0	0.1153	168	126GcGB	TRUE	+ASV_407_168a	TTTCTGATCTTCGTGGGTGTAGGTAAGAGTGAAGCTCTCTGATGATCTGTGCTCCGAGCTGAGCTGGAGGAGTCTGGCTTTTAAATTTTCTCCAGACATCTCTTGCGGTGATTCACATAGGAGCTCTTACACCGGCTG	
Actinopteri	Gymnotus carapo	Gymnotus carapo	97.256 Gymnotiformes	97 True detection	In-range	172	Gymnotus carapo mitochondrial gene for 12S rRNA, partial sequence, specimen voucher: NM0877-7335	98.758	98	0	0.0496846.1	172	NT	98.758	96	161	0	0.1177	126GcGB	Gymnotus carapo voucher 18P 13825 mitochondrial, complete genome	98.611	96	0	0.1772	147 126GcGB	TRUE	+ASV_487_167a	CTCCGGCTGTACGAGAGCCCAATTGACACATCCGGCAAGATGTAAAGATTTTAACTACCAAGCCCTCAGATCTGTGATCTCCGAGTGAAGAGCCACGAGAGTGGCTTTTTCCTCCGACCCGACGAAGCTGGAA	
Actinopteri	Gymnotus carapo	Gymnotus carapo	97.256 Gymnotiformes	97 True detection	In-range	172	Gymnotus carapo mitochondrial gene for 12S rRNA, partial sequence, specimen voucher: NM0877-7335	98.758	98	0	0.0496846.1	172	NT	98.758	96	161	0	0.1177	126GcGB	Gymnotus carapo voucher 18P 13825 mitochondrial, complete genome	98.611	96	0	0.1772	147 126GcGB	TRUE	+ASV_487_167a	CTCCGGCTGTACGAGAGCCCAATTGACACATCCGGCAAGATGTAAAGATTTTAACTACCAAGCCCTCAGATCTGTGATCTCCGAGTGAAGAGCCACGAGAGTGGCTTTTTCCTCCGACCCGACGAAGCTGGAA	
Actinopteri	Pseudoplatystoma cornutum	Pseudoplatystoma cornutum	100 Siluriformes	99 True detection	In-range	175	Pseudoplatystoma cornutum mitochondrial, complete genome	100	100	0	NC_028466.1	175	NT	100	100	175	0	0.008937.1	NT	Pseudoplatystoma cornutum voucher M0207-ant. lat. 125 ribosomal rRNA gene, partial sequence, tRNA-Val gene, complete sequence, and 16S ribosomal rRNA gene, partial sequence, mitochondrial	98.611	100	0	0.008937.1	175	NT	TRUE	+ASV_18_175a	CTCCGGCTGTACGAGAGCCCAATTGACACATCCGGCAAGATGTAAAGATTTTAACTACCAAGCCCTCAGATCTGTGATCTCCGAGTGAAGAGCCACGAGAGTGGCTTTTTCCTCCGACCCGACGAAGCTGGAA
Actinopteri	Pseudoplatystoma cornutum	Pseudoplatystoma cornutum	100 Siluriformes	99 True detection	In-range	175	Pseudoplatystoma cornutum mitochondrial, complete genome	100	100	0	NC_028466.1	175	NT	100	100	175	0	0.008937.1	NT	Pseudoplatystoma cornutum	100	100	0	0.1105	175 126GcGB	TRUE	+ASV_18_175a	CTCCGGCTGTACGAGAGCCCAATTGACACATCCGGCAAGATGTAAAGATTTTAACTACCAAGCCCTCAGATCTGTGATCTCCGAGTGAAGAGCCACGAGAGTGGCTTTTTCCTCCGACCCGACGAAGCTGGAA	
Actinopteri	Pseudoplatystoma cornutum	Pseudoplatystoma cornutum	100 Siluriformes	99 True detection	In-range	175	Pseudoplatystoma cornutum mitochondrial, complete genome	100	100	0	NC_028466.1	175	NT	100	100	175	0	0.008937.1	NT	Pseudoplatystoma cornutum	100	100	0	0.1105	175 126GcGB	TRUE	+ASV_18_175a	CTCCGGCTGTACGAGAGCCCAATTGACACATCCGGCAAGATGTAAAGATTTTAACTACCAAGCCCTCAGATCTGTGATCTCCGAGTGAAGAGCCACGAGAGTGGCTTTTTCCTCCGACCCGACGAAGCTGGAA	
Actinopteri	Pseudoplatystoma cornutum	Pseudoplatystoma cornutum	100 Siluriformes	99 True detection	In-range	175	Pseudoplatystoma cornutum mitochondrial, complete genome	100	100	0	NC_028466.1	175	NT	100	100	175	0	0.008937.1	NT	Pseudoplatystoma cornutum	100	100	0	0.1105	175 126GcGB	TRUE	+ASV_18_175a	CTCCGGCTGTACGAGAGCCCAATTGACACATCCGGCAAGATGTAAAGATTTTAACTACCAAGCCCTCAGATCTGTGATCTCCGAGTGAAGAGCCACGAGAGTGGCTTTTTCCTCCGACCCGACGAAGCTGGAA	
Actinopteri	Pseudoplatystoma cornutum	Pseudoplatystoma cornutum	100 Siluriformes	99 True detection	In-range	175	Pseudoplatystoma cornutum mitochondrial, complete genome	100	100	0	NC_028466.1	175	NT	100	100	175	0	0.008937.1	NT	Pseudoplatystoma cornutum	100	100	0	0.1105	175 126GcGB	TRUE	+ASV_18_175a	CTCCGGCTGTACGAGAGCCCAATTGACACATCCGGCAAGATGTAAAGATTTTAACTACCAAGCCCTCAGATCTGTGATCTCCGAGTGAAGAGCCACGAGAGTGGCTTTTTCCTCCGACCCGACGAAGCTGGAA	
Actinopteri	Pseudoplatystoma cornutum	Pseudoplatystoma cornutum	100 Siluriformes	99 True detection	In-range	175	Pseudoplatystoma cornutum mitochondrial, complete genome	100	100	0	NC_028466.1	175	NT	100	100	175	0	0.008937.1	NT	Pseudoplatystoma cornutum	100	100	0	0.1105	175 126GcGB	TRUE	+ASV_18_175a	CTCCGGCTGTACGAGAGCCCAATTGACACATCCGGCAAGATGTAAAGATTTTAACTACCAAGCCCTCAGATCTGTGATCTCCGAGTGAAGAGCCACGAGAGTGGCTTTTTCCTCCGACCCGACGAAGCTGGAA	
Actinopteri	Pseudoplatystoma cornutum	Pseudoplatystoma cornutum	100 Siluriformes	99 True detection	In-range	175	Pseudoplatystoma cornutum mitochondrial, complete genome	100	100	0	NC_028466.1	175	NT	100	100	175	0	0.008937.1	NT	Pseudoplatystoma cornutum	100	100	0	0.1105	175 126GcGB	TRUE	+ASV_18_175a	CTCCGGCTGTACGAGAGCCCAATTGACACATCCGGCAAGATGTAAAGATTTTAACTACCAAGCCCTCAGATCTGTGATCTCCGAGTGAAGAGCCACGAGAGTGGCTTTTTCCTCCGACCCGACGAAGCTGGAA	
Actinopteri	Pseudoplatystoma cornutum	Pseudoplatystoma cornutum	100 Siluriformes	99 True detection	In-range	175	Pseudoplatystoma cornutum mitochondrial, complete genome	100	100	0	NC_028466.1	175	NT	100	100	175	0	0.008937.1	NT	Pseudoplatystoma cornutum	100	100	0	0.1105	175 126GcGB	TRUE	+ASV_18_175a	CTCCGGCTGTACGAGAGCCCAATTGACACATCCGGCAAGATGTAAAGATTTTAACTACCAAGCCCTCAGATCTGTGATCTCCGAGTGAAGAGCCACGAGAGTGGCTTTTTCCTCCGACCCGACGAAGCTGGAA	
Actinopteri	Pseudoplatystoma cornutum	Pseudoplatystoma cornutum	100 Siluriformes	99 True detection	In-range	175	Pseudoplatystoma cornutum mitochondrial, complete genome	100	100	0	NC_028466.1	175	NT	100	100	175	0	0.008937.1	NT	Pseudoplatystoma cornutum	100	100	0	0.1105	175 126GcGB	TRUE	+ASV_18_175a	CTCCGGCTGTACGAGAGCCCAATTGACACATCCGGCAAGATGTAAAGATTTTAACTACCAAGCCCTCAGATCTGTGATCTCCGAGTGAAGAGCCACGAGAGTGGCTTTTTCCTCCGACCCGACGAAGCTGGAA	
Actinopteri	Pseudoplatystoma cornutum	Pseudoplatystoma cornutum	100 Siluriformes	99 True detection	In-range	175	Pseudoplatystoma cornutum mitochondrial, complete genome	100	100	0	NC_028466.1	175	NT	100	100	175	0	0.008937.1	NT	Pseudoplatystoma cornutum	100	100	0	0.1105	175 126GcGB	TRUE	+ASV_18_175a	CTCCGGCTGTACGAGAGCCCAATTGACACATCCGGCAAGATGTAAAGATTTTAACTACCAAGCCCTCAGATCTGTGATCTCCGAGTGAAGAGCCACGAGAGTGGCTTTTTCCTCCGACCCGACGAAGCTGGAA	
Actinopteri	Pseudoplatystoma cornutum	Pseudoplatystoma cornutum	100 Siluriformes	99 True detection	In-range	175	Pseudoplatystoma cornutum mitochondrial, complete genome	100	100	0	NC_028466.1	175	NT	100	100	175	0	0.008937.1	NT	Pseudoplatystoma cornutum	100	100	0	0.1105	175 126GcGB	TRUE	+ASV_18_175a	CTCCGGCTGTACGAGAGCCCAATTGACACATCCGGCAAGATGTAAAGATTTTAACTACCAAGCCCTCAGATCTGTGATCTCCGAGTGAAGAGCCACGAGAGTGGCTTTTTCCTCCGACCCGACGAAGCTGGAA	
Actinopteri	Pseudoplatystoma cornutum	Pseudoplatystoma cornutum	100 Siluriformes	99 True detection	In-range	175	Pseudoplatystoma cornutum mitochondrial, complete genome	100	100	0	NC_028466.1	175	NT	100	100	175	0	0.008937.1	NT	Pseudoplatystoma cornutum	100	100	0	0.1105	175 126GcGB	TRUE	+ASV_18_175a	CTCCGGCTGTACGAGAGCCCAATTGACACATCCGGCAAGATGTAAAGATTTTAACTACCAAGCCCTCAGATCTGTGATCTCCGAGTGAAGAGCCACGAGAGTGGCTTTTTCCTCCGACCCGACGAAGCTGGAA	
Actinopteri	Pseudoplatystoma cornutum	Pseudoplatystoma cornutum	100 Siluriformes	99 True detection	In-range	175	Pseudoplatystoma cornutum mitochondrial, complete genome	100	100	0	NC_028466.1	175	NT	100	100	175	0	0.008937.1	NT	Pseudoplatystoma cornutum	100	100	0	0.1105	175 126GcGB	TRUE	+ASV_18_175a	CTCCGGCTGTACGAGAGCCCAATTGACACATCCGGCAAGATGTAAAGATTTTAACTACCAAGCCCTCAGATCTGTGATCTCCGAGTGAAGAGCCACGAGAGTGGCTTTTTCCTCCGACCCGACGAAGCTGGAA	
Actinopteri	Pseudoplatystoma cornutum	Pseudoplatystoma cornutum	100 Siluriformes	99 True detection	In-range	175	Pseudoplatystoma cornutum mitochondrial, complete genome	100	100	0	NC_028466.1	175	NT	100	100	175	0	0.008937.1	NT	Pseudoplatystoma cornutum	100	100	0	0.1105	175 126GcGB	TRUE	+ASV_18_175a	CTCCGGCTGTACGAGAGCCCAATTGACACATCCGGCAAGATGTAAAGATTTTAACTACCAAGCCCTCAGATCTGTGATCTCCGAGTGAAGAGCCACGAGAGTGGCTTTTTCCTCCGACCCGACGAAGCTGGAA	
Actinopteri	Pseudoplatystoma cornutum	Pseudoplatystoma cornutum	100 Siluriformes	99 True detection	In-range	175	Pseudoplatystoma cornutum mitochondrial, complete genome	100	100	0	NC_028466.1	175	NT	100	100	175	0	0.008937.1	NT	Pseudoplatystoma cornutum	100	100	0	0.1105	175 126GcGB	TRUE	+ASV_18_175a	CTCCGGCTGTACGAGAGCCCAATTGACACATCCGGCAAGATGTAAAGATTTTAACTACCAAGCCCTCAGATCTGTGATCTCCGAGTGAAGAGCCACGAGAGTGGCTTTTTCCTCCGACCCGACGAAGCTGGAA	
Actinopteri	Pseudoplatystoma cornutum	Pseudoplatystoma cornutum	100 Siluriformes	99 True detection	In-range	175	Pseudoplatystoma cornutum mitochondrial, complete genome	100	100	0	NC_028466.1	175	NT	100	100	175	0	0.008937.1	NT	Pseudoplatystoma cornutum	100	100	0	0.1105	175 126GcGB	TRUE	+ASV_18_175a	CTCCGGCTGTACGAGAGCCCAATTGACACATCCGGCAAGATGTAAAGATTTTAACTACCAAGCCCTCAGATCTGTGATCTCCGAGTGAAGAGCCACGAGAGTGGCTTTTTCCTCCGACCCGACGAAGCTGGAA	
Actinopteri	Pseudoplatystoma cornutum	Pseudoplatystoma cornutum	100 Siluriformes	99 True detection	In-range	175	Pseudoplatystoma cornutum mitochondrial, complete genome	100	100	0	NC_028466.1	175	NT	100	100	175	0	0.008937.1	NT	Pseudoplatystoma cornutum	100	100	0	0.1105	175 126GcGB	TRUE	+ASV_18_175a	CTCCGGCTGTACGAGAGCCCAATTGACACATCCGGCAAGATGTAAAGATTTTAACTACCAAGCCCTCAGATCTGTGATCTCCGAGTGAAGAGCCACGAGAGTGGCTTTTTCCTCCGACCCGACGAAGCTGGAA	
Actinopteri	Pseudoplatystoma cornutum	Pseudoplatystoma cornutum	100 Siluriformes	99 True detection	In-range	175	Pseudoplatystoma cornutum mitochondrial, complete genome	100	100	0	NC_028466.1	175	NT	100	100	175	0	0.008937.1	NT	Pseudoplatystoma cornutum	100	100	0	0.1105	175 126GcGB	TRUE	+ASV_18_175a	CTCCGGCTGTACGAGAGCCCAATTGACACATCCGGCAAGATGTAAAGATTTTAACTACCAAGCCCTCAGATCTGTGATCTCCGAGTGAAGAGCCACGAGAGTGGCTTTTTCCTCCGACCCGACGAAGCTGGAA	
Actinopteri	Pseudoplatystoma cornutum	Pseudoplatystoma cornutum	100 Siluriformes	99 True detection	In-range	175	Pseudoplatystoma cornutum mitochondrial, complete genome	100	100	0	NC_028466.1	175	NT	100	100	175	0	0.008937.1	NT	Pseudoplatystoma cornutum	100	100	0	0.1105	175 126GcGB	TRUE	+ASV_18_175a	CTCCGGCTGTACGAGAGCCCAATTGACACATCCGGCAAGATGTAAAGATTTTAACTACCAAGCCCTCAGATCTGTGATCTCCGAGTGAAGAGCCACGAGAGTGGCTTTTTCCTCCGACCCGACGAAGCTGGAA	
Actinopteri	Pseudoplatystoma cornutum	Pseudoplatystoma cornutum	100 Siluriformes	99 True detection	In-range	175	Pseudoplatystoma cornutum mitochondrial, complete genome	100	100	0	NC_028466.1	175	NT	100	100	175	0	0.008937.1	NT	Pseudoplatystoma cornutum	100	100	0	0.1105	175 126GcGB	TRUE	+ASV_18_175a	CTCCGGCTGTACGAGAGCCCAATTGACACATCCGGCAAGATGTAAAGATTTTAACTACCAAGCCCTCAGATCTGTGATCTCCGAGTGAAGAGCCACGAGAGTGGCTTTTTCCTCCGACCCGACGAAGCTGGAA	
Actinopteri	Pseudoplatystoma cornutum	Pseudoplatystoma cornutum	100 Siluriformes	99 True detection	In-range	175	Pseudoplatystoma cornutum mitochondrial, complete genome	100	100	0	NC_028466.1	175	NT	100	100	175	0	0.008937.1	NT	Pseudoplatystoma cornutum	100	100	0	0.1105	175 126GcGB	TRUE	+ASV_18_175a	CTCCGGCTGTACGAGAGCCCAATTGACACATCCGGCAAGATGTAAAGATTTTAACTACCAAGCCCTCAGATCTGTGATCTCCGAGTGAAGAGCCACGAGAGTGGCTTTTTCCTCCGACCCGACGAAGCTGGAA	
Actinopteri	Pseudoplatystoma cornutum	Pseudoplatystoma cornutum	100 Siluriformes	99 True detection	In-range	175	Pseudoplatystoma cornutum mitochondrial, complete genome	100	100	0	NC_028466.1	175	NT	100	100	175	0	0.008937.1	NT	Pseudoplatystoma cornutum	100	100	0	0.1105	175 126GcGB	TRUE	+ASV_18_175a	CTCCGGCTGTACGAGAGCCCAATTGACACATCCGGCAAGATGTAAAGATTTTAACTACCAAGCCCTCAGATCTGTGATCTCCGAGTGAAGAGCCACGAGAGTGGCTTTTTCCTCCGACCCGACGAAGCTGGAA	
Actinopteri	Pseudoplatystoma cornutum	Pseudoplatystoma cornutum	100 Siluriformes	99 True detection	In-range	175	Pseudoplatystoma cornutum mitochondrial, complete genome	100	100	0	NC_028466.1	175																	

[illegible]

[illegible]