

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RAÍSSA VITÓRIA VIEIRA LEITE

ESTUDO DE ORGANISMOS AQUÁTICOS INVASORES INCRUSTANTES
RELATADAS EM USINAS HIDRELÉTRICAS: IDENTIFICAÇÃO, DETECÇÃO E
IMPACTOS ASSOCIADOS

CURITIBA

2020

RAÍSSA VITÓRIA VIEIRA LEITE

ESTUDO DE ORGANISMOS AQUÁTICOS INVASORES INCRUSTANTES
RELATADAS EM USINAS HIDRELÉTRICAS: IDENTIFICAÇÃO, DETECÇÃO E
IMPACTOS ASSOCIADOS

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Zootecnia, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de grau de Mestre em Zootecnia.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Ostrensky Neto

CURITIBA

2020

Leite, Raíssa Vitória Vieira

Estudo de organismos aquáticos invasores incrustantes relatadas em usinas hidrelétricas: identificação, detecção e impactos associados. / Raíssa Vitória Vieira Leite. - Curitiba, 2020.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná. Setor de Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Orientador: Antonio Ostrensky Neto.

1. Bioincrustação. 2. Bioinvasão. 3. Impacto ambiental - Aspectos econômicos. 4. Usina hidrelétrica. 5. Genética ambiental. I. Ostrensky Neto, Antonio. II. Título. V. Universidade Federal do Paraná.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ZOOTECNIA -
40001016082P0

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ZOOTECNIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **RAÍSSA VITÓRIA VIEIRA LEITE** intitulada: **Estudo de organismos aquáticos invasores incrustantes relatados em usinas hidrelétricas: identificação, detecção e impactos associados**, sob orientação do Prof. Dr. ANTONIO OSTRENSKY NETO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua Aprovação do rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 27 de Fevereiro de 2020.


ANTONIO OSTRENSKY NETO

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)


MARCIO ROBERTO PIE

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)


ALEX MAIORKA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTO

Aos meus pais Juscelino Leite, Socorro Vieira e Hélia Leite, que sempre torceram por mim, acreditaram no meu trabalho e nunca me deixaram desistir.

Ao meu professor e orientador Dr. Antonio Ostrensky por toda orientação, oportunidade e apoio durante esses dois anos.

A minha grande amiga/irmã, Ana Paula da Silva Bertão, que inúmeras vezes parou o que estava fazendo para me auxiliar na conclusão desse trabalho. Agradeço seu incondicional apoio e paciência para me ajudar a superar os inúmeros obstáculos que ao longo desta caminhada foram surgindo. Minha eterna gratidão.

Aos meus amigos e vizinhos Camila Proença e Rodrigo Nascimento pelas palavras de apoio, por ouvirem meus desabafos e por todas as comilanças nos finais de semanas. Vocês foram essenciais nessa jornada.

Ao meu companheiro e melhor amigo Julio Cesar por toda paciência, compreensão e apoio nesse longo período.

Ao meu irmão Diogo Leite por todo companheirismo e por sempre me mostrar o lado positivo das coisas.

Aos meus colegas do GIA, agradeço pelas palavras de apoio e contribuições em todas as etapas deste trabalho. Um agradecimento especial ao colega André Olivotto por toda paciência e didática em me fazer enxergar, com outros olhos, a biologia molecular.

A Universidade Federal do Paraná e a Pós-Graduação em Zootecnia pela oportunidade em ser aluna do programa.

A Companhia Paranaense de Energia, pelo financiamento do projeto e a concessão da bolsa.

Aos professores Marcio Roberto Pie e Alex Maiorka por compor a banca de defesa, compartilhando seus conhecimentos e experiências para a avaliação desta dissertação.

RESUMO

Identificar corretamente as espécies aquáticas invasoras incrustantes, conhecer sua biologia, tentar minimizar e monitorar o processo de dispersão são fatores essenciais para o estabelecimento de métodos de gestão para o controle das mesmas. Métodos baseados em DNA ambiental (eDNA) são eficientes ferramentas metodológicas para a detecção precoce dessas espécies até mesmo quando sua abundância é relativamente baixa. O objetivo do presente estudo foi identificar, através de uma revisão sistemática da literatura, as principais espécies aquáticas invasoras incrustantes que têm afetado o funcionamento das UHE em todo o mundo, bem como analisar a distribuição geográfica, as estratégias de bioinvasão e o potencial de cada uma delas de causar danos operacionais às UHE. Ainda, esse estudo procurou avaliar, a partir de um processo de diluição serial, a sensibilidade e acurácia de métodos fluorométricos de quantificação de DNA de *Limnoperna fortunei* em amostras de DNA ambiental (eDNA). Por meio de uma extensa revisão de literatura utilizando como base a metodologia PRISMA, verificou-se que atualmente oito espécies invasoras incrustante de água doce ameaçam a operação da UHE: quatro moluscos (*Dreissena polymorpha*, *Dreissena bugensis*, *Limnoperna fortunei* e *Corbicula fluminea*); um cnidário (*Cordylophora caspia*), duas diatomáceas (*Didymosphenia geminata* e *Gomphonema tarraleahae*); e um briozoário (*Plumatella fungosa*). Essas espécies são distribuídas globalmente e utilizam diferentes estratégias de invasão e estruturas de fixação para anexar às estruturas hidráulicas da UHE. Dentre as espécies identificadas, *L. fortunei* e *D. polymorpha* foram as que mais apresentaram impacto ao setor hidroelétrico. Em experimento laboratorial utilizando o eDNA da espécie *L. fortunei* constatou-se que o método quantitativo por rtPCR mostrou-se muito mais sensível quando comparado ao fluorômetro Qubit®. Através do método rtPCR foi possível identificar até 10^{-6} ng/ μ L de DNA de *L. fortunei* em amostras de água, o que equivale a identificar a presença de um animal adulto em 920.000 L de água.

Palavras chave: bioincrustação; invasão biológica; impactos econômicos; UHE; eDNA; detecção

ABSTRACT

Managing control methods against invasive fouling aquatic species requires essential factors such as: proper identification, biology understanding, monitoring and minimizing dispersion process. Methods based on environmental DNA (eDNA) are efficient methodological tools during species early detection even when their abundance is relatively low. Therefore, the study purpose is to identify, through a systematic literature review, the main fouling invasive aquatic species that have affected the operation of HPPs worldwide as well as to analyze the geographic distribution, the bioinvasion strategies and the potential of each of them when causing operational damage to the HPPs. Furthermore, this study searched to evaluate, from a serial dilution process, the sensitivity and accuracy of fluorometric methods for quantifying the DNA of *Limnoperna fortunei* in environmental DNA samples (eDNA). Through an extensive literature review based on the PRISMA methodology, it was found that currently eight invasive fouling species of fresh water threaten the operation of the UHE: four molluscs (*Dreissena polymorpha*, *Dreissena bugensis*, *Limnoperna fortunei* and *Corbicula fluminea*); one cnidarian (*Cordylophora caspia*), two diatoms (*Didymosphenia geminata* and *Gomphonema tarraleahae*); and a bryozoan (*Plumatella fungosa*). These species are globally spread with different invasion strategies and fixation attaching to the hydraulic structures of the HPPs. Among the identified species, *L. fortunei* and *D. polymorpha* were the most impacted to the hydroelectric sector. In a laboratory experiment using *L. fortunei* eDNA it was found that the quantitative method by rtPCR proved to be much more sensitive when compared to the Qubit® fluorometer. Using the rtPCR method it was possible to identify up to 10⁻⁶ ng / µL of *L. fortunei* DNA in water samples, which is equivalent to identifying the presence of an adult animal in 920,000 L of water.

Keywords: biofouling; biological invasion; economic impacts; HPP; eDNA; detection

LISTA DE FIGURAS

Figure 1. Correlation ($\Phi \geq 0.5$) between words used in 1,080 scientific papers on the occurrence of invasive freshwater encrusting species published between 1967 and January 2019.	36
Figure 2. Correlation ($\Phi \geq 0.5$) between words used in 72 scientific documents written in English relating to the occurrence of invasive freshwater encrusting species.	38
Figura 3. Representação esquemática do delineamento experimental adotado, sendo D0 _A a D0 _I – os tratamentos (exposição dos animais em banho-maria, a $25 \pm 0,5$ °C, por 24 horas, para liberação de DNA; D ₁ a D ₆ as diluições seriadas de cada tratamento; e NC _A a NC _I – controle negativo (apenas água ultrapurificada).	69
Figura 4. Relação entre as concentrações de DNA ambiental de <i>Limnoperna fortunei</i> , quantificadas através de fluorômetro Qubit, utilizando os kits fluorométricos BR – Broad Range (log da diluição 2 e 1) e HS – High Sensitivity (0 a -4), e a diluição serial aplicada às amostras.	74
Figura 5. Relação entre as concentrações de DNA ambiental de <i>Limnoperna fortunei</i> , quantificadas através da técnica de PCR em tempo real (rtPCR) e a diluição serial aplicada às amostras.	75
Figura 6. Relação entre o log da concentração de DNA (ng/uL/g) e o <i>cycle threshold</i> (Ct) da reação obtida a partir da análise de rtPCR.	76
Figura 7. Resultado das análises de regressão múltipla comparando os efeitos de três fatores (diluição das amostras, taxa de mortalidade e número de indivíduos utilizados em cada tratamento) sobre as concentrações de DNA ambiental de <i>Limnoperna fortunei</i>	77

LISTA DE TABELAS

Table 1. Terms used for the searches of articles related to invasive aquatic species that affect hydropower plants.	23
Table 2. The selection process, based on the PRISMA methodology, applied to identify the invasive freshwater encrusting species affecting hydroelectric plants.....	24
Table 3. Conceptual synthesis of the algorithm used to analyse the correlation between words in the texts analysed.	25
Table 4. Freshwater invasive aquatic species reported as causing biofouling in hydroelectric plants.	26
Table 5. Synthesis of data on the dispersion of freshwater invasive encrusting species and the hydroelectric power plants they have affected.	28
Table 6. Biological characteristics and environmental tolerances of freshwater encrusting aquatic species and the hydraulic structures they affect in HPP.....	33
Tabela 7. Síntese dos dados (valores totais, médias e desvio padrão) relativos à fase de obtenção experimental de DNA ambiental de <i>Limnoperna fortunei</i>	73
Tabela 8. Capacidade de detecção e quantificação de DNA ambiental (eDNA) a partir de análises por meio de fluorômetro Qubit (HS e BR) e PCR em tempo real (rtPCR).	73

LISTA DE SIGLAS

PRISMA - Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-Analyses

HPP - Hydroelectric plant

NR – Not reported

AC - Adhesion cells

BY – Byssus

ST – Statoblast

FS - Free swimming-larvae

GC - Glandular cells

HT – High environmental tolerance

HY – Hydrorhiza

LA – Latency

RE – Regeneration

MT - Mmucous thread

MU - Mucilage Production

OC - Tolerance to oligotrophic conditions

PE – Peduncle

RD - Rapid development

RP - Resistance to pollutants

TL - Tolerance to low luminosity

BR – Binary division reproduction

GD – Larval development in the gills

IF – Internal fertilization

OA – Fixation on other animals

LO – Low oxygen tolerance

UHE - Usina Hidrelétrica de Energia

eDNA - DNA ambiental

Lat – Latitude

Long - Longitude

D - Diluição

D0 - Diluição inicial

NC - Controle negativo

SPRI - Imobilização Reversível de Fase Sólida

HS - High Sensitivity

BR – Broad Range

WS – Solução trabalho

PCR – Reação em cadeia da polymerase

rtPCR – PCR em tempo real

Ct - Cycle threshold

ng - Nanograma

μL - Microlitro

μm – Micrômetro

** LS - Concentração de DNA superior ao limite de quantificação

* LI - Concentração de DNA inferior ao limite de detecção

Q – Quantificado

GIA – Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais

UFPR – Universidade Federal do Paraná

LISTA DE SÍMBOLOS

® - Marca registrada

% - Porcentagem

φ - Coeficiente phi

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO GERAL.....	15
REFERÊNCIAS.....	17
CAPÍTULO I. INVASIVE FRESHWATER ENCRUSTING SPECIES: A SYSTEMATIC REVIEW OF PROBLEMS CAUSED IN HYDROPOWER PLANTS WORLDWIDE.....	21
1.1 Introduction	21
1.2 Materials and methods.....	23
1.3 Results.....	26
1.3.1 Origins and dispersion of invasive freshwater encrusting species	26
1.3.2 Biological characteristics of invasive fouling species.....	32
1.3.3 Data Mining	35
1.4 Discussion.....	38
1.5 Conclusion	44
Acknowledgements	45
Compliance and ethical standards	45
1.6 References.....	45
CAPÍTULO II. AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE MÉTODOS QUANTITATIVOS PARA ANÁLISES DE DNA AMBIENTAL DO MEXILHÃO-DOURADO <i>Limnoperna fortunei</i> (DUNKER, 1857).....	65
1.7 Introdução.....	65
1.8 Material e Métodos	68
1.8.1 Coleta e manutenção dos animais em laboratório	68
1.8.2 Experimento	68
1.8.3 Biometria e avaliação da mortalidade.....	70
1.8.4 Coleta, preparação, extração e purificação de DNA das amostras	70

1.8.5	Quantificação do DNA por fluorômetro Qubit®.....	71
1.8.6	Quantificação do DNA por PCR em tempo real	71
1.8.7	Análise dos dados	72
1.9	Resultados	72
1.10	Discussão	77
1.11	Referências	80
	Considerações finais	88
	REFERÊNCIAS.....	89

APRESENTAÇÃO GERAL

O processo de bioinvasão pode ter origem tanto a partir de processos naturais como por ações antrópicas (Ricciardi e Macisaac, 2000; Richardson *et al.*, 2000). É considerada uma das maiores ameaças à biodiversidade global, ficando atrás apenas da destruição de habitats naturais (McGeoch *et al.*, 2010; Vitousek *et al.*, 2017). As invasões são ocasionadas pela existência de corredores de dispersão ou pela vulnerabilidade e baixa resistência biótica encontrada em ambientes previamente alterados (Heger e Trepl, 2003; Darrigran e Damborenea, 2009; Souza *et al.*, 2009). As espécies invasoras caracterizam-se pela grande facilidade em quebrar barreiras ecológicas, por possuírem alta eficiência reprodutiva, rápido crescimento populacional e dispersão geográfica acelerada (Mansur *et al.*, 2012; Pombo, 2016).

Espécies incrustantes estão entre os organismos invasores que mais causam impactos em ambientes aquáticos dulcícolas. As incrustações ocasionadas por essas espécies afetam sistemas de abastecimento de água, no sistema hidráulico de usinas hidrelétricas, térmicas e nucleares, em refinarias de petróleo, em fábricas de papel, entre outros setores (Darrigran e Damborenea, 2005; Mansur *et al.*, 2016; Castro, 2018). Os sistemas de resfriamento, canais, grade e tubulações de usinas hidrelétricas, entretanto, são as estruturas que mais têm sido afetadas pela bioincrustação oriundas dessas espécies (Grohmann, 2008; Karatayev *et al.*, 2015; Pucherelli *et al.*, 2018). Em casos extremos, elas provocam a redução no volume e na velocidade do fluxo de água no interior desses sistemas hidráulicos (Darrigran, 2002), oclusão de filtros e aumento da corrosão estrutural (Nakano e Strayer, 2014). Além dos efeitos negativos ao setor econômico, as espécies aquáticas invasoras incrustantes interferem drasticamente na ecologia dos ambientes invadidos. Algumas dessas espécies podem levar à redução da quantidade de materiais particulados em suspensão na coluna d'água, transferindo-os aos sedimentos de fundo na forma de fezes e pseudofezes e, desta forma, provocar alterações na dinâmica de nutrientes e de oxigênio dissolvido, afetando o ecossistema como um todo (Boltovskoy *et al.*, 2009). Uma espécie aquática invasora incrustante característica é o molusco *Dreissena polymorpha* também conhecido como

mexilhão-zebra, ele interage diretamente com níveis tróficos superiores, ao ser incorporadas à cadeia alimentar de algumas espécies de peixes de água doce (Ferriz et al. 2000, Pechaszadhe et al. 2000, Cataldo et al. 2002, Belz 2006).

Métodos de gestão para o controle de espécies aquáticas invasoras incrustantes são particularmente desafiadores devido às grandes limitações na detecção, quantificação e identificação precoce. Com isso, métodos baseados em DNA ambiental (eDNA) foram recentemente considerados úteis para investigar as distribuições de organismos aquáticos (Bohmann *et al.*, 2014; Thomsen e Willerslev, 2015; Goldberg *et al.*, 2016). De acordo com Taberlet *et al.* (2012), todos os organismos liberam fragmentos de DNA nos ambientes em que estão inseridos, deixando “rastros” compostos por pele, escamas, fezes, mucos, gametas sexuais e diferentes tecidos, referidos como eDNA. Esses métodos têm sido aplicados em espécies de vários habitats aquáticos, incluindo lagos e lagoas (Takahara *et al.*, 2012), rios e córregos (Minamoto *et al.*, 2012) e até mesmo em habitats marinhos (Ardura *et al.*, 2015; Yamamoto *et al.*, 2017). Os métodos já foram aplicados para uma variedade de táxons, como anfíbios (Pilliod et al. 2013; Katano et al. 2017), peixes (Minamoto *et al.*, 2012; Takahara *et al.*, 2012; Miya *et al.*, 2015), crustáceos (Ikeda et al. 2016), insetos (Doi et al. 2017a) e moluscos (Ardura et al. 2015; Dysthe et al. 2018; Takahara et al. 2019).

O DNA ambiental também pode ser aplicado para estimar a abundância e a biomassa de espécies com base nas concentrações de DNA presente no ambiente. Nos últimos anos, métodos de quantificação por meio de fluorometria foram desenvolvidos para determinar a concentração de DNA presente em diferentes tipos de amostras a partir do eDNA (Nakayama *et al.*, 2016; Pie *et al.*, 2017; Xia, Zhan, *et al.*, 2018).

O presente trabalho identificou e caracterizou as principais espécies aquáticas invasoras incrustantes que afetam o funcionamento de UHE e avaliou a sensibilidade de métodos quantitativos baseado em eDNA.

A dissertação é constituída por dois capítulos, sendo:

- **Capítulo I:** Invasive Freshwater Encrusting Species: A Systematic Review of Problems caused in Hydropower Plants Worldwide;

- **Capítulo II:** Avaliação da sensibilidade de métodos quantitativos para análises de DNA ambiental do mexilhão-dourado *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857)

REFERÊNCIAS

Ardura A, Zaiko A, Martinez JL, Samuiloviene A, Borrell Y, Garcia-Vazquez E. 2015. Environmental DNA evidence of transfer of North Sea molluscs across tropical waters through ballast water. *Journal of Molluscan Studies* 81:495-501.

Bohmann K, Evans A, Gilbert MTP, Carvalho GR, Creer S, Knapp M, Douglas WY, De Bruyn M. 2014. Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends in ecology & evolution* 29:358-367.

Boltovskoy D, Sylvester F, Otaegui A, Leites V, Cataldo DH. 2009. Environmental modulation of reproductive activity of the invasive mussel *Limnoperna fortunei*: implications for antifouling strategies. *Austral Ecology* 34:719-730.

Darrigran G. 2002. Potential impact of filter-feeding invaders on temperate inland freshwater environments. *Biological Invasions* 4:145-156.

Darrigran G, Damborenea C. 2009. Introdução a biologia das invasões o Mexilhão Dourado na América do Sul: biologia, dispersão, impacto, prevenção e controle. CUBO Editora, São Carlos.

Darrigran G, Damborenea C. 2005. A South American bioinvasion case history: *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857), the golden mussel. *American Malacological Bulletin* 20:105.

de Castro ALP. 2018. Estudo da abrasividade da concha de (*Limnoperna fortunei*) com enfoque no labirinto superior em turbina hidráulicas.

Goldberg CS, Turner CR, Deiner K, Klymus KE, Thomsen PF, Murphy MA, Spear SF, McKee A, Olyer-McCance SJ, Cornman RS. 2016. Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods in Ecology and Evolution* 7:1299-1307.

Grohmann PA. 2008. BIOINCRUSTATION CAUSED BY A HYDROID SPECIES IN THE TURBINE COOLING SYSTEM AT THE FUNIL HYDROELECTRIC POWER PLANT, ITATIAIA. *Naturalia, Rio Claro* 31:16-21.

Heger T, Trepl L. 2003. Predicting biological invasions. *Biological Invasions* 5:313-321.

Karatayev AY, Burlakova LE, Padilla DK. 2015. Zebra versus quagga mussels: a review of their spread, population dynamics, and ecosystem impacts. *Hydrobiologia* 746:97-112.

Mansur M, Santos C, Pereira D, Bergonci P, Callil C. 2016. Moluscos límnicos-Bivalves. Espécies exóticas invasoras de águas continentais no Brasil. Brasília: Ministério do Meio Ambiente:127-175.

Mansur M, Santos C, Pereira D, Paz IP, Zurita ML, Rodriguez MR, Nehrke M, Bergonci PA. 2012. Moluscos límnicos invasores no Brasil: biologia, prevenção e controle. Porto Alegre: Redes Editora.

McGeoch MA, Butchart SH, Spear D, Marais E, Kleynhans EJ, Symes A, Chanson J, Hoffmann M. 2010. Global indicators of biological invasion: species numbers, biodiversity impact and policy responses. *Diversity and Distributions* 16:95-108.

Minamoto T, Yamanaka H, Takahara T, Honjo MN, Kawabata Zi. 2012. Surveillance of fish species composition using environmental DNA. *Limnology* 13:193-197.

Miya M, Sato Y, Fukunaga T, Sado T, Poulsen JY, Sato K, Minamoto T, Yamamoto S, Yamanaka H, Araki H. 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* 2:150088.

Nakano D, Strayer DL. 2014. Biofouling animals in fresh water: biology, impacts, and ecosystem engineering. *Frontiers in Ecology and the Environment* 12:167-175.

Nakayama Y, Yamaguchi H, Einaga N, Esumi M. 2016. Pitfalls of DNA quantification using DNA-binding fluorescent dyes and suggested solutions. *PLoS One* 11:e0150528.

Pie MR, Stroher PR, Agostinis AO, Belmonte-Lopes R, Tadra-Sfeir MZ, Ostrensky A. 2017. Development of a real-time PCR assay for the detection of the golden mussel (*Limnoperna fortunei*, Mytilidae) in environmental samples. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 89:1041-1045.

Pombo V. 2016. *Invasoras de Águas Continentais no Brasil*.

Pucherelli SF, Claudi R, Prescott T. 2018. Control of biofouling in hydropower cooling systems using HOD ultraviolet light. *Management of Biological Invasions* 9:451-461.

Ricciardi A, MacIsaac HJ. 2000. Recent mass invasion of the North American Great Lakes by Ponto–Caspian species. *Trends in ecology & evolution* 15:62-65.

Richardson DM, Pyšek P, Rejmánek M, Barbour MG, Panetta FD, West CJ. 2000. Naturalization and invasion of alien plants: concepts and definitions. *Diversity and Distributions* 6:93-107.

Souza RCCLd, Calazans SH, Silva EP. 2009. Impacto das espécies invasoras no ambiente aquático. *Ciência e Cultura* 61:35-41.

Taberlet P, Coissac E, Pompanon F, Brochmann C, Willerslev E. 2012. Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Molecular ecology* 21:2045-2050.

Takahara T, Minamoto T, Yamanaka H, Doi H, Kawabata Zi. 2012. Estimation of fish biomass using environmental DNA. *PLoS One* 7:e35868.

Thomsen PF, Willerslev E. 2015. Environmental DNA—An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation* 183:4-18.

Vitousek PM, Loope LL, Westbrooks R. 2017. Biological invasions as global environmental change.

Xia Z, Zhan A, Gao Y, Zhang L, Haffner GD, Maclsaac HJ. 2018. Early detection of a highly invasive bivalve based on environmental DNA (eDNA). *Biological invasions* 20:437-447.

Yamamoto S, Masuda R, Sato Y, Sado T, Araki H, Kondoh M, Minamoto T, Miya M. 2017. Environmental DNA metabarcoding reveals local fish communities in a species-rich coastal sea. *Scientific reports* 7:1-12.

CAPÍTULO I. INVASIVE FRESHWATER ENCRUSTING SPECIES: A SYSTEMATIC REVIEW OF PROBLEMS CAUSED IN HYDROPOWER PLANTS WORLDWIDE

Abstract:

One of the problems often faced during the maintenance and operation of hydroelectric plants (HPP) is the occurrence of biofouling, which affects the operation of several hydraulic systems. Biofouling leads to a reduction in the service life of the equipment and a higher demand for energy, decreases the intervals between cleaning and, consequently, increases operational costs of companies. The present study aimed to identify, through a systematic review of the literature, the invasive freshwater encrusting species that affect the operation of HPPs, as well as to analyse the distribution and invasion strategies of these species. This review was based on the criteria defined in the PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-Analyses) methodology. From an initial collection of 3,594 articles, 89 studies were selected. It was found that currently, eight invasive freshwater encrusting species have threatened the operation of HPP: four molluscs (*Dreissena polymorpha*, *Dreissena bugensis*, *Limnoperna fortunei*, and *Corbicula fluminea*); one cnidarian (*Cordylophora caspia*), two diatoms (*Didymosphenia geminata* and *Gomphonema tarraleahae*); and one bryozoan (*Plumatella fungosa*). These species are globally distributed, and utilize different invasion strategies and fixation structures to attach to the hydraulic structures of HPP.

Keywords: fouling, bioinvasion, power generation, economic impacts, HPP

1.1 INTRODUCTION

Today, hydroelectric plants (HPP) are the second leading source of energy in the global electrical matrix (Felix, 2011; Hoppe e De Vries, 2018), only surpassed in importance by thermoelectric plants (Van Vliet *et al.*, 2013; Van Vliet *et al.*, 2016). In 2015, energy generated from HPP accounted for about 15% of the world's electricity grid and, despite the growth of cleaner energy sources such as wind and photovoltaic power (Jung *et al.*, 2019; Stephens, 2019), the

projection is that by 2035 this share will reach 20% of the electrical energy produced worldwide (Mcnabb, 2019).

One problem that is increasingly encountered during the HPP process is fouling, which is a continuous threat to the proper functioning of hydraulic structures (Lopes *et al.*, 2010; Mansur *et al.*, 2012; Pucherelli *et al.*, 2018) and, more specifically, of the cooling systems of the plants (Rajagopal *et al.*, 2003; Netto, 2012). Cooling systems dissipate the heat generated during the operation of pumps, generators, turbines, and various other electrical and hydraulic equipment (Chiesa, 2002; Netto, 2012). The decrease in efficiency and the increase in temperature caused by fouling impairs the useful life of such equipment, increasing energy demands, and also reduces the intervals between the cleaning of the hydraulic systems, increasing the associated operating costs (Darrigran e Pastorino, 1995; Ricciardi, 1998). In extreme cases, overheating of this equipment can even cause blackouts (Behera e Varma, 2019).

Fouling may be due to deposition of suspended solids, precipitation of dissolved salts, or biological activities biofouling (Vrouwenvelder *et al.*, 2003; Antony *et al.*, 2011; Lauxen, 2014). Biofouling is considered the primary cause of pipeline clogging and efficiency loss in the hydraulic systems of HPP (Mansur *et al.*, 2016; Pucherelli *et al.*, 2018). This type of fouling is caused by the colonisation and growth of bacteria, algae, and sessile invertebrates on submerged or water-filled surfaces, such as grids, filters, and pipes (Da Gama e Renato, 2009; Mansur *et al.*, 2012).

The major problems caused by biofouling usually relate to the occurrence of invasive aquatic species (Netto, 2012; Boltovskoy, 2015), which colonize environments that are geographically distinct from their original distribution (Fernandes *et al.*, 2012), affecting the invaded region both economically and environmentally (Latini *et al.*, 2016; Mansur *et al.*, 2016). According to Vitousek *et al.* (2017), biological invasions are also considered to be the second-largest cause of global biodiversity loss, second only to habitat destruction. Invasive species exhibit ease in breaking down ecological barriers and have high reproductive efficiency, rapid population growth, and accelerated geographic dispersion (Mansur *et al.*, 2012; Pombo, 2016). Such characteristics, when associated with fouling organisms, become a serious potential problem for

hydroelectric plants. Because of this, correctly identifying these organisms, knowing their biology, and trying to minimize and monitor the dispersion process are essential factors for establishing operational and risk control plans for HPP. The objective of the present study was to identify, through a systematic review of the literature, the main aquatic invasive freshwater encrusting species that have affected the operation of HPP worldwide, and to analyse the geographic distributions, bioinvasion strategies, and potential that these species have to cause operational damage to HPP.

1.2 MATERIALS AND METHODS

A systematic literature review was conducted based on the PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-Analyses; (Moher *et al.*, 2009) methodology, with Google Scholar as the central search platform. Scientific articles, technical reports, books, book chapters, case studies, dissertations, and theses published up to January 2019 were investigated if the terms listed in Table 1 were present in their title, abstract, or keywords, both in English and in Portuguese.

Table 1. Terms used for the searches of articles related to invasive aquatic species that affect hydropower plants.

Group	Combinations
I	Fouling + Invasive + Hydroelectric + Power
II	Biofouling + “Invasive Species” + Hydroelectric
III	Fouling + Invasion + Hydroelectric + Species + Dispersion

The documents obtained through the searches were evaluated to assess whether they: a) addressed aquatic species that were both invasive and encrusting; b) established a relationship or causal nexus between the presence of the species and the operation of the HPP; and, c) contained information on the geographical dispersion of the aquatic encrusting species. After defining the search base, terms, and inclusion criteria, documents were evaluated and selected by the Mendeley 1.19.2 software (Elsevier, Netherlands).

At the end of the search phase, 3,594 documents were identified. After the elimination of duplicate documents and evaluating the relevance of the title of the publications to the focus of the present research, 1,080 of these documents were pre-selected. Of the 1,080 documents identified at the end of Phase 2, 245 were pre-selected after analysis of their abstracts. In those documents that did not have a structured abstract, such as technical reports, books, and book chapters, the relevant keywords were selected, and then the context in which the associated themes were treated by the respective authors was evaluated. After the complete reading of these 245 pre-selected documents, 89 documents were identified which complied with all previously determined inclusion criteria. Based on these documents, the following information was tabulated in electronic spreadsheets: species, continent/country of origin, country of first report, HPP where the invasive encrusting species were reported, the structure affected by organisms in the plant, damage caused to the electric sector. Information that enabled the biological characterization of each species was also added to the electronic spreadsheets. The entire selection process is summarised in Table 2.

Table 2. The selection process, based on the PRISMA methodology, applied to identify the invasive freshwater encrusting species affecting hydroelectric plants.

Phase 1: Pre-identification	Number of documents
Total number of documents identified	3,594
Duplicate documents	1,028
Phase 2: Selection	
Documents selected after deletion of duplicates	2,566
Exclusions for non-compliance with defined criteria	1,486
Documents selected after analysis of the securities and analysed by data mining	1,080
Phase 3: Eligibility	
Documents evaluated for eligibility	1,080
Deleted documents	835
Documents evaluated through full reading	245
Final Result: Total documents included	89
Documents included in English and analysed by data mining	72

The 1,080 documents selected at the end of Phase 2 were saved in PDF format and, using the software R (R Core Team, 2015), word mining was performed on the words used by the respective authors in the pre-selected texts. A correlation analysis was performed between all of the main words used by the respective authors in each document using specific algorithms. To make the results of the analysis more representative, the so-called "stopwords" (articles, prepositions, and adjectives) were removed from the sample. Next, the words with frequency $\geq 0.03\%$ of the total number of words in each text were selected. Finally, each word was correlated to every other word by the Phi (ϕ) coefficient, which corresponds to the Pearson correlation coefficient for dichotomous variables. The objective was to examine the frequency with which the words were quoted concomitantly in the same text, concerning the frequency with which they appeared separately. The coefficient Phi was calculated using the following formula:

$$\phi = \frac{n_{11}n_{00} - n_{10}n_{01}}{\sqrt{n_{1.}n_{0.}n_{.0}n_{.1}}}$$

Where: n_{11} indicates the number of documents in which two words (x and y) appeared together; n_{00} the number of documents in which neither of the two words was cited; n_{10} and n_{01} the number of documents in which only one of the words was cited, as is reiterated in Table 3. Only words presented $\Phi \geq 0.5$ were considered.

Table 3. Conceptual synthesis of the algorithm used to analyse the correlation between words in the texts analysed.

	Contains the word 'Y'	Does not contain the word 'Y'
Contains the word 'X'	n_{11}	n_{10}
Does not contain the word 'X'	n_{01}	n_{00}

As the last step of the study, the 72 documents in English went through a second word mining process. In this case, those words with a frequency $\geq 0.04\%$ of the total words used in each selected text were selected, excluding stopwords and considering $\Phi \geq 0.5$.

1.3 RESULTS

1.3.1 Origins and dispersion of invasive freshwater encrusting species

Table 4 shows the main inland aquatic encrusting species that negatively affect the functioning of hydropower systems in the world. Four of these species belong to the phylum Mollusca and were originally endemic to the Asian continent. The cnidarian *Cordylophora caspia* is also endemic to the Asian continent. The two species of diatoms, *Didymosphenia geminata* and *Gomphonema tarraleahae*, originated in North America and Oceania, respectively, while the bryozoan *Plumatella fungosa* is of European origin.

Table 4. Freshwater invasive aquatic species reported as causing biofouling in hydroelectric plants.

Species	Common name	Phylum	Origin	Reference
<i>Dreissena polymorpha</i>	Zebra mussell	Mollusca	Asian	(Mccarthy <i>et al.</i> , 1997)
<i>Dreissena bugensis</i>	Quagga mussell	Mollusca	Asian	(Mills <i>et al.</i> , 1996)
<i>Limnoperna fortunei</i>	Golden mussell	Mollusca	Asian	(Ricciardi, 1998) (Mansur <i>et al.</i> , 2016)
<i>Corbicula fluminea</i>	Asian clam	Mollusca	Asian	(Mansur <i>et al.</i> , 1999)
<i>Cordylophora caspia</i>	Freshwater hydroid	Cnidaria	Asian	(Folino <i>et al.</i> , 2000)
<i>Didymosphenia geminate</i>	Didymo	Bacillariophyta	North America	(Blanco e Ector, 2009) (Segura, 2011)
<i>Gomphonema tarraleahae</i>	-	Bacillariophyta	Oceania	(Ravizza, 2015)
<i>Plumatella fungosa</i>	Bryozoan	Bryozoa	Europe	(Wood e Okamura, 2005)

Table 5 summarises the dispersion records of these species over time. *Cordilophora caspia* is the only fouling species that has a history of invasion on all continents, except Antarctica. Brazil is the country with the most reports on the damage caused to HPP by the invasion of fouling species. *Limnoperna fortunei* began its history of invasion decades after the start of problems caused by the dispersion of *D. polymorpha* in North America and Europe. However, its invasion remains practically limited to South America and some Asian countries where the species is not considered endemic. Brazil is the country with the most significant number of reports on the problems caused by *L. fortunei* and *C. caspia* in HPP. Among the eight encrusting aquatic species identified, the least diatomaceous species (Bacillariophyta phylum) and the bryozoan *P. fungosa* represented species with the smallest numbers of citations.

Table 5. Synthesis of data on the dispersion of freshwater invasive encrusting species and the hydroelectric power plants they have affected.

Species	Continent	Country/Region	Year of Invasion	Hydroelectric Power Plants (HPP)	Reference
<i>Dreissena polymorpha</i>	Asia	Russia	1769	NR	(Aldridge <i>et al.</i> , 2004) (Mccarthy <i>et al.</i> , 1997)
	North America	Canada USA	1985	Ontario	(Armero e Halcón, 2001)
			1986	Monroe	(Harrington e Ewel, 1997)
<i>Dreissena bugensis</i>	Europe	England	1824	Ardnacrusha	(Mccarthy <i>et al.</i> , 1997)
		Netherlands	1826	Parteen	(Armero e Halcón, 2001)
		Germany	1838	Cathleen´s Falls	(Binimelis <i>et al.</i> , 2007)
		Belgium	1840	Ribarroja	(Aksu <i>et al.</i> , 2017)
		Denmark	1890	Mequinensa	(Lavin, 2016)
		Turkey	1897		(Pucherelli <i>et al.</i> , 2018)
		Ireland	1997		
		Spain	2001		
		Canada	1988	Parker Dan	
		USA	NR		
Europe	Germany	NR			
	Hungary	NR			
	Moldavia	NR			
	Netherlands	NR	NR		
	Romania	NR			
	Russia	1992			

Species	Continent	Country/Region	Year of Invasion	Hydroelectric Power Plants (HPP)	Reference
<i>Limnoperna fortune</i>		UK	NR		(Velde e Platvoet, 2007)
		Ukraine	2014		(Zhulidov <i>et al.</i> , 2010)
	Asia	China	1965		(Bódis <i>et al.</i> , 2014)
		Japan	1968		(Ricciardi, 1998)
Taiwan		1990	Shisanling	(Danrigran e De Drago, 2000)	
				(Zhang <i>et al.</i> , 2017)	
<i>Limnoperna fortune</i>					(Pastorino <i>et al.</i> , 1993)
	South America	Argentina	1991	Yaceretá	(Darrigran, 2002)
		Uruguay	1994	Itaipu	(Avelar <i>et al.</i> , 2004)
		Brazil	1995/1998	Salto GraNRe Jupia	(Von Ruckert <i>et al.</i> , 2004)
		Paraguay	2000	Porto Primavera Ilha Solteira	(Uliano-Silva <i>et al.</i> , 2013)
					(Duarte, 2012)
				(Scarabino e Verde, 1994)	
<i>Cordylophora caspia</i>	Africa	Egypt	1991	NR	(Zamponi e Escalante)
	North America	Cuba	1923		(Hurlbert e Villalobos-Figueroa, 1982)
		Mexico	1982	Parker Dan	
	South America	Uruguay	1941		(Grohmann, 2008)
		Argentina	1991	Funil	(Gutierrez, 2012)

Species	Continent	Country/Region	Year of Invasion	Hydroelectric Power Plants (HPP)	Reference
<i>Corbicula fluminea</i>		Panama	1994	Governador José Richa	(Borges, 2013)
		Brazil	NR	HPP Tucuruí	(Netto, 2012)
		Baltic Sea	1800	HPP Salto Santiago	(Folino <i>et al.</i> , 2000)
		Ireland	1882		(Conde <i>et al.</i> , 2013)
		New Zealand	1885		(Zamponi, 1991)
		Australia	1991		(Whitton <i>et al.</i> , 2009)
		Canada	1924		(Suriani <i>et al.</i> , 2007)
		USA	1938		
		Argentina	1960 – 1970		(Mansur <i>et al.</i> , 2012)
		Brazil	1985		(Ituarte, 1994; Silva, 2006)
	Uruguay	1981			
	Venezuela	NR			
	Europe	Portugal	1980		(Mouthon, 1981)
<i>Didymosphenia geminata</i>		Canada	NR		(Andrewartha <i>et al.</i> , 2007)
		USA	NR	Noyarsk	(Bothwell <i>et al.</i> , 2014)
			NR		(Whitton <i>et al.</i> , 2009)
	South America	Chile	2010		(Segura, 2011)
		Argentina	2010		(Sastre <i>et al.</i> , 2013)
	Oceania	Australia	2004	Tarraleahae	(Andrewartha <i>et al.</i> , 2007)
					(Bothwell <i>et al.</i> , 2014)

Species	Continent	Country/Region	Year of Invasion	Hydroelectric Power Plants (HPP)	Reference	
<i>Gomphonema tarraleahae</i>	Oceania	Australia	1996	Tarraleahae	(Andrewartha <i>et al.</i> , 2007)	
	North America	Canada USA	NR NR	NR	(Kipp <i>et al.</i> , 2010)	
<i>Plumatella fungosa</i>	Europe	France	NR		(Kaminski, 1984)	
		Lithuania	NR		(Økland e Økland 2005)	
		Poland	NR			
		Sweden	NR	NR		(Wood e Okamura, 2005)
		Finland	NR			
		Iceland	NR			
		Poland	NR			

NR – Not reported

1.3.2 Biological characteristics of invasive fouling species

The main invasion strategies shared by the vast majority of the freshwater invasive aquatic species are the ability to attach rigidly to the substrate, high tolerance to different environmental conditions, and rapid ontogenetic development. *Didymosphenia geminata* and *G. tarraleahae* are the invasive species that have the lowest levels of tolerance to environmental variation, although they can survive even in the absence of luminosity. Reports show that incrustations caused by these diatoms in HPP have mainly taken place in oligo or mesotrophic environments. *Cordilophora caspia* and the bryozoan *P. fungosa* enter into a state of latency when the environmental conditions (mainly water temperature) are unfavourable. The molluscs are distinguished by the presence of free-swimming larvae, except *C. fluminea*, whose larvae are kept incubated in the gills (BD) until they reach the pediveliger phase. The main problems caused by these species in HPP were reported in pipes, filters, protection grids, heat exchangers, and generators, causing issues such as clogging, loss of water flow pressure, low heat transfer by heat exchangers, and corrosion of equipment (Table 6).

Table 6. Biological characteristics and environmental tolerances of freshwater encrusting aquatic species and the hydraulic structures they affect in HPP.

Species	Invasion Strategy			Affected hydraulic Structures	References
	Fixation	Dispersion	Environmental Tolerance		
<i>Dreissena polymorpha</i>	By	FS; RD; OA	HT; TL	Protective screens and screens, valves, piping, and spill gates	(Mackie, 1991; Ackerman et al., 1994; Lancioni e Gaino, 2007; Cohen, 2008; Sardiña et al., 2008)
<i>Dreissena Bugensis</i>	By	FS; OA	OC; TL; LO	Protective grids and heat exchangers	(Mills et al., 1996; Orlova et al., 2005; Pimentel et al., 2005; McMahan, 2011)
<i>Limnoperna Fortune</i>	By	FS; RD; OA	HT; TL; RP	Protection grids, filters, generators, pipes, heat exchangers	(Darrigran, 2002; Cataldo et al., 2003; Boltovskoy et al., 2006; Darrigran e Damborenea, 2011; Uliano-Silva et al., 2013)
<i>Corbicula Fluminea</i>	MT	GD; RD; IF	HT; TL	Heat exchangers	(Morton, 1977; Potter e Liden, 1986; Mackie, 1991; Park e Chung, 2004; Karatayev et al., 2005)
<i>Cordylophora Caspia</i>	HY	LA	HT	Pipes, filters, protective grids	(Morri, 1980; M. e M., 1998)
<i>Didymosphenia geminata</i>	PE; MU	BR; OA	OC; TL	Water intake, areas with high water flow	(Kawecka e Sanecki, 2003; Miller et al., 2009; Segura, 2011)
<i>Gomphonema tarraleahae</i>	PE; MU	BR; OA	OC; TL	Concrete channels linking water systems to the power plant	(Kirkwood et al., 2007; Perkins et al., 2009; Ravizza, 2015)

Plumatella GC; AC LA; RD; ST HT; TL Piping and cooling (Pourcher e D'Hondt, 1987);
Fungosa Aprosi, 1988) system

* AC - Adhesion Cells; BY - byssus; ST – Statoblast; FS - Free swimming-larvae; GC - Glandular cells; HT – High environmental tolerance; HY – hydrorhiza; LA - Latency; RE – Regeneration; MT - mucous thread; MU - Mucilage Production; OC - Tolerance to oligotrophic conditions; PE – peduncle; RD - Rapid development; RP - Resistance to pollutants; TL - Tolerance to low luminosity; BR – Binary division reproduction; GD – Larval development in the gills; IF – Internal fertilization; OA – Fixation on other animals; LO – Low oxygen tolerance.

1.3.3 Data Mining

Figure 1 shows the result of the correlation analysis performed based on the words and terms used by the authors of the 1,080 pre-selected documents at the end of Phase 2. The lower the link distance between the terms, the higher the correlation (Φ) between them. The pre-selected articles mainly focused on the ecological and environmental aspects associated with the presence of invasive freshwater encrusting species. There were few references to the operational or economic impacts caused by these species on the hydroelectric sector. It is also evident that *Dreissena polymorpha* is the most studied aquatic invasive encrusting species in the world.

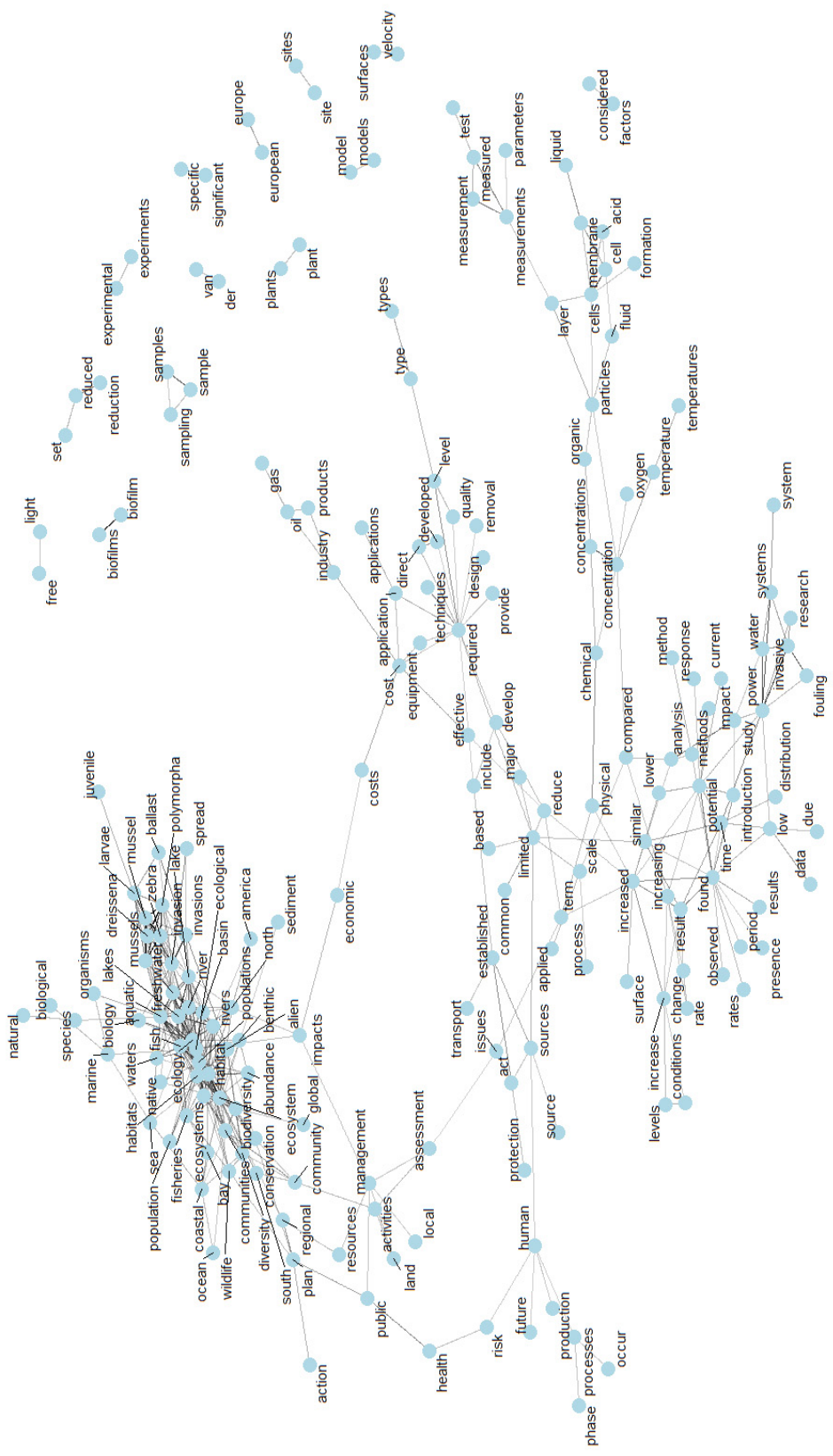


Figure 1. Correlation ($\Phi \geq 0.5$) between words used in 1,080 scientific papers on the occurrence of invasive freshwater encrusting species published between 1967 and January 2019.

Figure 2 shows the results of the correlation analysis based only on the words and terms used by the authors of the 72 documents written in English selected at the end of the selection process. It was observed that six of the eight species reported in the studies had a citation frequency $\geq 0.04\%$ and a correlation of $\Phi \geq 0.5$ with other words. Only *Cordylophora caspia* and *G. tarraleahae* did not meet these criteria. The absence of these species can be explained by the fact that most of the texts that deal with the impacts caused by *C. caspia* have been written in Portuguese and by the fact only a small number of studies have addressed the impacts of *G. tarraleahae*. Two other points to be highlighted are the relationship between the dispersion of these invasive species and ballast water, and the importance of the fixation structures of molluscs and diatoms to the success of the biofouling process. The final selection also shows the economic and operational impacts caused by the fouling organisms on the electric sector.

later, in North America (Hebert *et al.*, 1991; Claudi e Mackie, 1993; Schloesser e Nalepa, 1994). According to Karatayev *et al.* (2007) and Uliano-Silva *et al.* (2013), the zebra mussel shares many biological characteristics with the golden mussel *L. fortunei*, as well as similar environmental and economic impacts, but these similarities have not so far been sufficient for both species to share the same dispersion routes. It is known that high temperatures (> 26-32 °C) may result in the death of larvae and adult *D. polymorpha* individuals (McMahon, 1990). The same applies for *D. bugensis*, which presents significant mortality rates at temperatures above 28 °C, and temperatures between 32-35 °C are considered lethal for the species (Mills *et al.*, 1996; Benson *et al.*, 2018). According to Stoeckmann (2003), *D. bugensis* has a higher tolerance to low oxygenation environments when compared with *D. polymorpha*, which may be due to the lower metabolic rate of *D. bugensis*. *Dreissena polymorpha*, *L. fortunei*, and *D. bugensis* also share the characteristic wherein they are fixed to solid substrates through a byssus a rigid, rapidly-regenerating structure consisting of a complex set of protein wires, which can reach up to twice the length of the animal's shell (Reinecke *et al.*, 2017; Byette *et al.*, 2019).

Limnoperna fortunei is endemic to the rivers and streams of Southeast Asia (Ricciardi, 1998). The species has colonised areas where the water temperature exceeds 30-32 °C, as is the case for the Pantanal region in Brazil (Sylvester *et al.*, 2005). Pastorino *et al.* (1993) recorded this species in South America for the first time on the Rio de la Plata in 1991, where it was probably introduced through ballast water from cargo ships. According to Darrigran *et al.* (2000), Darrigran (2002), and Karatayev *et al.* (2007), ten years after the first report of *L. fortunei* in the Prata River, an average dispersion rate of the species upstream of this basin of about 250 km/year has been observed. Since then, the golden mussel has expanded its geographic distribution through the basins of the Paraná, Uruguay, and Paraguay rivers (Darrigran *et al.*, 1998; Cataldo e Boltovskoy, 2000). In Brazil, the golden mussel has already been detected in the Paraná and Paraguay rivers, in the states of Mato Grosso do Sul, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Rio Grande do Sul (Pestana *et al.*, 2010), Bahia (Barbosa *et al.*, 2016), and in the Amazon and Orinoco basins (Oliveira *et al.*, 2015). According to Ricciardi

(1998), *L. fortunei* is highly likely to invade countries in North America and Europe, as there is heavy maritime traffic in these regions.

According to Mansur *et al.* (1999), *C. fluminea* is of Asian origin, as well as the other molluscs mentioned above. This species was introduced into North America by the Chinese, as food, in the mid-1920s (Suriani *et al.*, 2007). In South America, introduction occurred via the Rio de la Plata, between the 1960s and 1970s (Ituarte, 1994). In Brazil, different authors have reported the presence of *C. fluminea* in places as distinct as the Rio Grande do Sul (Mansur e Garces, 1988), Pantanal (Callil e Mansur, 2002), the Amazon basin (Beasley *et al.*, 2003), and São Paulo state (Avelar, 1999). The invasion success of this species is associated with different biological characteristics such as high resistance to environmental stress, high reproductive capacity, and rapid growth (Graney *et al.*, 1980; Mackie, 1991). Mansur e Garces (1988) have stated that densities from 200 individuals/m² are sufficient to cause damage to HPP.

An essential difference in *C. fluminea*, when compared to other species of molluscs, is that this species has internal fertilization. Larvae are incubated in two pairs of gills, and are released upon reaching the pediveliger developmental phase (Morton, 1977; Aldridge e McMahon, 1978; Park e Chung, 2004). When released, these larvae are small (around 250 µm), and have well-developed shells, adductor muscles, feet, gills, digestive systems and a D-shaped configuration (Sousa *et al.*, 2008). Some days after their release into the water column, *C. fluminea* larvae adhere to different types of substrate, such as vegetation or hard substrates, producing a structure similar to the byssus called the "mucous thread" (Sousa *et al.*, 2008; Mansur *et al.*, 2012). This structure is produced by an elastic gland located at the foot of these bivalves, has adhesive properties, and assists in the movement of the individual (Kraemer *et al.*, 1986). The mucous thread is not as resistant as the byssus (Mansur *et al.*, 2012), however, in its early stages of development, this structure allows the attachment of *C. fluminea* to different substrates (Karatayev *et al.*, 2005). When the individuals reach the juvenile stage, measuring about 5 mm, the mucous thread disappears, and the individual ceases to be sessile (Latini *et al.*, 2016).

Cordilophora caspia originates from the Caspian and Black Seas (Folino *et al.*, 2000), but has spread across several countries, transported by the ballast

water of ships and even through passive introductions associated with commercially grown aquatic species (Netto, 2012). According to Nakano e Strayer (2014) and Obolewski *et al.* (2015), there are records of invasions of this species from almost all of the continents, except Antarctica and western Asia, where it is endemic. The introduction of *C. caspia* in Brazil probably occurred in the Prata Basin. The first report of the species on the Paraná River is from 1996 (Haddad e Nakatani, 1996). The presence of the species has also been reported in the states of São Paulo (Silveira e Boscolo, 1996) and Rio de Janeiro (Grohmann e Brum, 2007).

According to Moore (1952) and Smith *et al.* (2002), the success of the invasion of *C. caspia* is allied to its strategy of remaining in a state of latency under unfavourable conditions, especially in relation to temperature, and its ability to regenerate from fragments, adjusting its ecological and physiological needs when necessary. Roos (1979) reported that the state of latency, also called dormancy, occurs when a tissue called menontes envelopes the *C. caspia* stalks, protecting the animal from unfavourable environmental conditions. According to Folino-Rorem e Indelicato (2005), strategies to combat the species should focus on thermal or chemical control methods in order to minimise the regeneration of the individuals. *Cordylophora caspia* is still able to survive for long periods without feeding, as observed by Kinne (1956), which found that colonies of this species remain alive even after six months without access to food. *Cordylophora caspia* adheres to the substrate through its hydrorhiza (Folino-Rorem, 2015). According to Netto (2012) and Borges (2013), the presence of *C. caspia* encrusted in filters, heat exchangers, and in the piping of the cooling systems in the Governador José Richa and Governador Ney Braga HPP, both in Brazil, has been observed. In the latter, the increase in the temperature of the machines even jeopardized the operation of the plant.

Didymosphenia geminata, commonly known as didymo, is a diatom of temperate waters of the Northern Hemisphere (Cleve, 1894; Kociolek *et al.*, 2004). However, in recent years, the species has expanded its distribution at a fast pace (Spaulding e Elwell, 2007). This species was reported in New Zealand for the first time in 2004 (Kilroy, 2004), and later in Chilean Patagonia waters (Segura, 2011) and on the Futaleufú river in Argentina (Sastre *et al.*, 2013).

Didymosphenia geminata, similarly to *G. tarraleahae*, uses a peduncular structure to fix itself to fishing and recreation equipment, footwear (Kilroy, 2004; Bothwell *et al.*, 2009), and even other organisms, including birds and fish (Sastre *et al.*, 2013). These diatoms reproduce by binary division. The frustules (outer cell wall) divide, thus creating daughter cells and facilitating dispersion of the species in aquatic environments (Kawecka e Sanecki, 2003; Perkins *et al.*, 2009).

Fouling by *D. geminata* and *G. tarraleahae* occurs due to the production of mucilage, a brown extracellular polymer substance (Thompson *et al.*, 2008; Ravizza, 2015), that assists in their growth and survival due to massive accumulation of organic matter (Andrewartha *et al.*, 2007). The peduncular structure, together with mucilage, allows the fixation of the organisms, even on substrates subjected to fast water flow (Callow, 1993; Wetherbee *et al.*, 1998). Perkins *et al.* (2010) identified these peduncular structures on the concrete walls of the main channel that transports the water to Tarraleah HPP, in Tasmania. According to Kirkwood *et al.* (2007), the peduncles remain attached to the substrate even after the death of the cells that produce them. The biofouling caused by the diatoms amounts to 17.6 tons (dry weight) for every 20 km of hydro channels reached, according to estimates (Perkins *et al.*, 2009), even causing reductions in water flow velocity (Andrewartha *et al.*, 2010) and, consequently, affecting power generation. A study conducted by Ravizza (2015), using metal tubes simulating the hydraulic systems of a hydropower plant, found that fouling peduncle-forming diatoms, such as *D. geminate* and *G. tarraleahae*, are capable of developing even in places where there is no light, although in smaller quantities than those observed in open channels. In an experiment conducted by Larned *et al.* (2011) with *D. geminata*, the authors observed that the species adopted a heterotrophic metabolism in reduced light and oxygen concentrations. Qing *et al.* (2003) and Tuchman *et al.* (2006) reported that, under limited light conditions, many diatoms could enter a dormant state or trigger heterotrophic metabolism to develop. These freshwater species, according to Tuchman *et al.* (2006), can metabolise efficiently even in the absence of light, but only use these mechanisms in extreme conditions. *Plumatella fungosa* is a sessile, filtering organism found in a wide range of submerged habitats, and is considered dominant in freshwater fouling communities (Ricciardi e Reiswig, 1994).

According to Jónasson (1963), fouling colonies of this species multiply rapidly and are capable of causing damage to different economic sectors, but mainly to the generation of energy. Pourcher e D'Hondt (1987) and Aprosi (1988) reported that the high density and rapid growth of *P. fungus* fouling colonies could obstruct the cooling systems of hydroelectric plants, causing significant operational damage. In an experiment performed by Aprosi (1988), it was observed that the colonies of this species are detached from the pipe when they are subjected to water velocities above 0.9 m/s. *Plumatella fungosa*, as well as most of the species presented in this study, has been propagated through the ballast water of transoceanic ships (Kipp *et al.*, 2010). This species is among the most dispersed bryozoans in Europe (Wood e Okamura, 2005), having been reported in countries such as Finland, Denmark, Iceland, Sweden (Økland and Ökland 2005), as well as in Poland (Kaminski, 1984), in addition to already being present in the east coast of North America (Kipp *et al.*, 2010). This species presents a dormant stage (statoblasts) as the main invasion strategy. Statoblasts are a type of "capsular" dormant, floating structure, rich in nutrients and germinative tissue, which are resistant to different types of environmental stressors (Bushnell, 1966; Wood, 1996; Wood, 2001). In this dormant stage, the species is able to survive even in slightly brackish water (Everitt, 1975; Massard e Geimer, 2008).

The present analysis found that the majority of studies already conducted involving biofouling caused by invasive aquatic species have focused on the ecological aspects related to invasive species. Terms such as "conservation", "biodiversity", "biology", "ecosystem", among others, are almost always present in published articles. On the other hand, studies that specifically analyse the operational or financial impacts caused to HPP are rare. Only in the second and more restrictive word mining process was it possible to observe the presence of terms such as "costs", "pipes", "equipment", and "reduction". Only 8.2% of the preselected articles (89 out of 1,080) addressed, albeit often superficially, the problems caused by these species to HPP. When the 72 documents written in English that formed the basis of the present study were analysed, it was observed that terms such as "biology", "ecosystem", and "environment", for example, continued to appear in the selected documents, but with a different focus to that presented in the initial mining data. In this case, the encrusting invasive aquatic

species and their main biological strategies presented, as expected, high correlations ($\Phi \geq 0.5$).

In one of the rare studies that reported quantitative data on the economic impact caused by invasive aquatic encrusting organisms, Inci *et al.* (2004) simulated the potential risks associated with fouling caused by *D. polymorpha*. The authors found that such organisms could cause a reduction of up to 4.2% in the amount of energy generated by a hydroelectric plant, a value similar to that reported by Jones *et al.* (1997) for the Wheeler HPP. The scarcity of studies does not necessarily mean that the impacts caused by invasive aquatic species are not potentially significant, but possibly that access to information may be limited by characteristics (industrial and sectoral strategic secrets) related to these energy generation ventures. Another hypothesis is that there is a certain lack of synergy” between studies in the field of bioinvasion and studies performed in HPP, since it is evident that the problems caused by the dispersion of invasive aquatic species have only been accentuated over time.

1.5 CONCLUSION

The problems caused to HPP by the presence of invasive freshwater encrusting species may be currently underestimated by lack of access to consistent and systematic data and information. However, based on the biological characteristics of the eight fouling species that have been proven to affect the functioning and operations of HPP, *C. fluminea* stands out as potentially less harmful, because the fouling capacity of this species is limited to the early stages of its ontogenetic development. At the other end of the spectrum are *L. fortunei* and *D. polymorpha*, the two species with the most impact reported worldwide, followed by *D. bugensis* and *C. caspia*. *Plumatella fungosa*, although it still has a limited biogeographic distribution when compared with other invasive species, it has already demonstrated its capacity to cause significant operational damage to HPP. The impacts caused by *D. geminata* and *G. tarraleahae*, in turn, are limited by the fact that species have only been reported to cause operational problems in plants located in a temperate oligo or mesotrophic environments to date.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for granting funding to Antonio Ostrensky (process number 381091/2014-7).

COMPLIANCE AND ETHICAL STANDARDS

This paper presents part of the results of the P&D project, code PD-06491-0383/2015, executed by the Federal University of Paraná and Aliança Prestadora de Serviços Ltda and funded by COPEL Geração e Transmissão SA, under the Research and Technological Development Program of Electricity Sector, regulated by the National Electric Energy Agency (ANEEL). The authors declare that they have no conflict of interest.

1.6 REFERENCES

ACKERMAN, J. D. et al. A review of the early life history of zebra mussels (*Dreissena polymorpha*): comparisons with marine bivalves. **Canadian Journal of Zoology**, v. 72, n. 7, p. 1169-1179, 1994. ISSN 0008-4301.

AKSU, S.; YILDIZ, D.; GÜNGÖR, A. P. How Zebra mussels threaten to water supply security and effects of preventive measures in Turkey. **World Scientific News**, v. 64, p. 99-126, 2017. ISSN 2392-2192.

ALDRIDGE, D. C.; ELLIOTT, P.; MOGGRIDGE, G. D. The recent and rapid spread of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) in Great Britain. **Biological Conservation**, v. 119, n. 2, p. 253-261, 2004. ISSN 0006-3207.

ALDRIDGE, D. W.; MCMAHON, R. F. Growth, fecundity, and bioenergetics in a natural population of the Asiatic freshwater clam, *Corbicula manilensis* Philippi, from North Central Texas. **Journal of Molluscan Studies**, v. 44, p. 49-70, 1978.

ANDREWARTHA, J. et al. Drag force and surface roughness measurements on freshwater biofouled surfaces. **Biofouling**, v. 26, n. 4, p. 487-496, 2010. ISSN 0892-7014.

ANDREWARTHA, J.; SARGISON, J.; PERKINS, K. The effect of gomphonema and filamentous algae streamers on hydroelectric canal capacity and turbulent boundary layer structure. Australasian Fluid Mechanics Conference, 2007, Citeseer. p.241-246.

ANTONY, A. et al. Scale formation and control in high pressure membrane water treatment systems: a review. **Journal of membrane science**, v. 383, n. 1-2, p. 1-16, 2011. ISSN 0376-7388.

APROSI, G. Bryozoans in the cooling water circuits of a power plant: With 4 figures in the text. **Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie: Verhandlungen**, v. 23, n. 3, p. 1542-1547, 1988. ISSN 0368-0770.

ARMERO, R. A.; HALCÓN, R. M. Á. El mejillón cebra en el Ebro: un grave caso de riesgo ambiental en Aragón. **Naturaleza aragonesa: revista de la Sociedad de Amigos del Museo Paleontológico de la Universidad de Zaragoza**, n. 8, p. 39-46, 2001. ISSN 1138-8013.

AVELAR, W. Moluscos Bivalves. **Biodiversidade do Estado de São Paulo**, v. 4, p. 65-68, 1999.

AVELAR, W.; MARTIM, S.; VIANNA, M. A new occurrence of *Limnoperna fortunei* (Dunker 1856)(Bivalvia, Mytilidae) in the state of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 64, n. 4, p. 739-742, 2004. ISSN 1519-6984.

BARBOSA, N. P. et al. *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857)(Mollusca, Bivalvia, Mytilidae): first record in the São Francisco River basin, Brazil. **Embrapa Pantanal-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2016.

BEASLEY, C. R.; TAGLIARO, C. H.; FIGUEIREDO, W. B. The occurrence of the Asian Clam *Corbicula fluminea* in the lowe amazon basin. **Acta Amazonica**, v. 33, n. 2, p. 317-324, 2003. ISSN 0044-5967.

BEHERA, B. K.; VARMA, A. Energy Security. In: (Ed.). **Bioenergy for Sustainability and Security**: Springer, 2019. p.1-77.

BENSON, A. et al. **Dreissena rostriformis bugensis (Andrusov, 1897): US Geological Survey, Nonindigenous Aquatic Species Database.[updated 2018 May 2; cited 2018 July 6]** 2018.

BINIMELIS, R.; MONTERROSO, I.; RODRÍGUEZ-LABAJOS, B. A social analysis of the bioinvasions of *Dreissena polymorpha* in Spain and *Hydrilla verticillata* in Guatemala. **Environmental Management**, v. 40, n. 4, p. 555-566, 2007. ISSN 0364-152X.

BLANCO, S.; ECTOR, L. Distribution, ecology and nuisance effects of the freshwater invasive diatom *Didymosphenia geminata* (Lyngbye) M. Schmidt: a literature review. **Nova Hedwigia**, v. 88, n. 3-4, p. 347-422, 2009. ISSN 0029-5035.

BÓDIS, E.; TÓTH, B.; SOUSA, R. Impact of *Dreissena* fouling on the physiological condition of native and invasive bivalves: interspecific and temporal variations. **Biological invasions**, v. 16, n. 7, p. 1373-1386, 2014. ISSN 1387-3547.

BOLTOVSKOY, D. **Limnoperna fortunei: the ecology, distribution and control of a swiftly spreading invasive fouling mussel**. Springer, 2015. ISBN 3319134949.

BOLTOVSKOY, D. et al. Dispersion and ecological impact of the invasive freshwater bivalve *Limnoperna fortunei* in the Río de la Plata watershed and beyond. **Biological Invasions**, v. 8, n. 4, p. 947-963, 2006. ISSN 1387-3547.

BORGES, P. D. Aspectos do ciclo de vida da espécie invasora *Cordylophora caspia* (Cnidaria) no reservatório da Usina Hidrelétrica Governador José Richa, Rio Iguaçu, Paraná. 2013.

BOTHWELL, M. et al. Blooms of *Didymosphenia geminata* in rivers on Vancouver Island 1990 to present: a new invasive species. *Journal of Phycology*, 2009, WILEY-BLACKWELL PUBLISHING, INC COMMERCE PLACE, 350 MAIN ST, MALDEN 02148 p.33-33.

BOTHWELL, M. L.; TAYLOR, B. W.; KILROY, C. The Didymo story: the role of low dissolved phosphorus in the formation of *Didymosphenia geminata* blooms. **Diatom Research**, v. 29, n. 3, p. 229-236, 2014. ISSN 0269-249X.

BUSHNELL, J. H. Environmental relations of Michigan *Ectoprocta*, and dynamics of natural populations of *Plumatella repens*. **Ecological Monographs**, v. 36, n. 2, p. 95-123, 1966. ISSN 1557-7015.

BYETTE, F.; MARCOTTE, I.; PELLERIN, C. Covalently crosslinked mussel byssus protein-based materials with tunable properties. **Peptide Science**, v. 111, n. 1, p. e24053, 2019. ISSN 2475-8817.

CALLIL, C.; MANSUR, M. D. central South America and biometrical data. **Amazoniana**, v. 17, n. 1/2, p. 153-167, 2002.

CALLOW, M. E. A review of fouling in freshwaters. **Biofouling**, v. 7, n. 4, p. 313-327, 1993. ISSN 0892-7014.

CATALDO, D.; BOLTOVSKOY, D.; POSE, M. Toxicity of chlorine and three nonoxidizing molluscicides to the pest mussel *Limnoperna fortunei*. **Journal-**

American Water Works Association, v. 95, n. 1, p. 66-78, 2003. ISSN 0003-150X.

CATALDO, D. H.; BOLTOVSKOY, D. Yearly reproductive activity of *Limnoperna fortunei* (Bivalvia) as inferred from the occurrence of its larvae in the plankton of the lower Paraná river and the Río de la Plata estuary (Argentina). **Aquatic Ecology**, v. 34, n. 3, p. 307-317, 2000. ISSN 1386-2588.

CHIESA, F. **Resfriadores Compactos: Uma Proposta de Solução para Trocadores de Calor Ar Solução para Trocadores de Calor Ar-Água**. 2002. Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba

CLAUDI, R.; MACKIE, G. L. **Practical Manual for the Monitoring and Control of Macrofouling Mollusks in Fresh Water Sys.** CRC Press, 1993. ISBN 0873719859.

CLEVE, P. T. **Synopsis of the naviculoid diatoms.** PA Norstedt & söner, 1894.

COHEN, A. N. Literature review of the exotic mussels *Dreissena polymorpha*, *Dreissena bugensis*, *Limnoperna fortunei* and *Mytilopsis leucophaeata*. **San Francisco Estuary Institute Oakland, Richmond, CA**, 2008.

CONDE, A. et al. First record of *Cordylophora caspia* (Hydrozoa: Cnidaria) in the Tagus estuary, central Portugal. **Marine Biodiversity Records**, v. 6, 2013. ISSN 1755-2672.

DA GAMA, B. A.; RENATO, C. **BIOINCRUSTAÇÃO MA**. 2009.

DANRIGRAN, G.; DE DRAGO, I. E. Invasion of the exotic freshwater mussel *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857)(Bivalvia: Mytilidae) in South America. **The Nautilus**, v. 114, p. 69-73, 2000.

DARRIGRAN, G. Potential impact of filter-feeding invaders on temperate inland freshwater environments. **Biological invasions**, v. 4, n. 1-2, p. 145-156, 2002. ISSN 1387-3547.

DARRIGRAN, G.; DAMBORENEA, C. Ecosystem engineering impact of *Limnoperna fortunei* in South America. **Zoological science**, v. 28, n. 1, p. 1-8, 2011. ISSN 0289-0003.

DARRIGRAN, G.; DE DRAGO, I. E.; INVERTEBRADOS, D. C. Z. PLATA. REGION NEOTROPICAL. **Medio Ambiente**, v. 13, n. 2, p. 75-79, 2000.

DARRIGRAN, G. et al. Macroinvertebrates associated with *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857)(Bivalvia, Mytilidae) in Río de la Plata, Argentina. **Hydrobiologia**, v. 367, n. 1-3, p. 223-230, 1998. ISSN 0018-8158.

DARRIGRAN, G.; PASTORINO, G. The recent introduction of a freshwater Asiatic bivalve, *Limnoperna fortunei* (Mytilidae) into South America. **Veliger**, v. 38, n. 2, p. 171-175, 1995. ISSN 0042-3211.

DUARTE, M. S. C. Efeito de superfícies na aderência de *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857). 2012.

EVERITT, B. Fresh-water Ectoprocta: distribution and ecology of five species in southeastern Louisiana. **Transactions of the American Microscopical Society**, p. 130-134, 1975. ISSN 0003-0023.

FELIX, É. P. **Avaliação de técnicas de controle da incrustação por mexilhão-dourado em hidrogeradores visando minimização da indisponibilidade**. 2011. Universidade de São Paulo

FERNANDES, F. D. C. et al. Abordagem conceitual dos moluscos invasores nos ecossistemas límnicos brasileiros. 2012.

FOLINO-ROREM, N. C. Phylum Cnidaria. In: (Ed.). **Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates**: Elsevier, 2015. p.159-179.

FOLINO-ROREM, N. C.; INDELICATO, J. Controlling biofouling caused by the colonial hydroid *Cordylophora caspia*. **Water Research**, v. 39, n. 12, p. 2731-2737, 2005. ISSN 0043-1354.

FOLINO, G.; PIZZUTI, C.; SPEZZANO, G. Genetic programming and simulated annealing: A hybrid method to evolve decision trees. European Conference on Genetic Programming, 2000, Springer. p.294-303.

GRANEY, R. et al. THE INFLUENCE OF THERMAL DISCHARGES AND SUBSTRATE COMPOSITION ON THE POPULATION-STRUCTURE AND DISTRIBUTION OF THE ASIATIC CLAM, *CORBICULA-FLUMINEA*, IN THE NEW RIVER, VIRGINIA. **Nautilus**, v. 94, n. 4, p. 130-135, 1980. ISSN 0028-1344.

GROHMANN, P. A. BIOINCRUSTATION CAUSED BY A HYDROID SPECIES IN THE TURBINE COOLING SYSTEM AT THE FUNIL HYDROELECTRIC POWER PLANT, ITATIAIA. **Naturalia, Rio Claro**, v. 31, p. 16-21, 2008.

GROHMANN, P. A.; BRUM, P. R. *Cordylophora caspia* (HYDROZOA, ANTHOMEDUSAE, CLAVIDAE) em corpos d'água doce no Brasil: um caso de bioincrustação no sistema de resfriamento das turbinas da usina de funil, Itatiaia, RJ. **XII congresso latino-americano de ciências do mar - XII colacmar**, 2007.

GUTIERRE, S. M. M. pH tolerance of the biofouling invasive hydrozoan *Cordylophora caspia*. **Hydrobiologia**, v. 679, n. 1, p. 91-95, 2012. ISSN 0018-8158.

HADDAD, M.; NAKATANI, K. Primeiro registro de *Cordylophora caspia* (Pallas, 1771)(Cnidaria, Hydroida) em águas continentais brasileiras. Resumos XXI Congresso Brasileiro de Zoologia, SBZ, 1996. p.5-9.

HARRINGTON, R. A.; EWEL, J. J. Invasibility of tree plantations by native and non-indigenous plant species in Hawaii. **Forest Ecology and Management**, v. 99, n. 1-2, p. 153-162, 1997. ISSN 0378-1127.

HEBERT, P. D. et al. Demography and ecological impacts of the invading mollusc *Dreissena polymorpha*. **Canadian Journal of Zoology**, v. 69, n. 2, p. 405-409, 1991. ISSN 0008-4301.

HOPPE, T.; DE VRIES, G. Social Innovation and the Energy Transition. **Sustainability**, v. 11, n. 1, p. 1-13, 2018.

HURLBERT, S.; VILLALOBOS-FIGUEROA, A. Aquatic Biota of Mexico. **Central America and the West**, 1982.

INCI, G.; MILLER, C.; YESILLER, N. Design of Zebra Mussel Control Measures for Hydro-Electric Power Projects. 2004.

ITUARTE, C. F. *Corbicula* and *Neocorbicula* (Bivalvia: Corbiculidae) in the Parana, Uruguay, and Rio de La Plata Basins. **Nautilus**, v. 107, n. 4, p. 129-135, 1994. ISSN 0028-1344.

JÓNASSON, P. M. The growth of *Plumatella repens* and *P. fungosa* (Bryozoa Ectoprocta) in relation to external factors in Danish eutrophic lakes. **Oikos**, v. 14, n. 2, p. 121-137, 1963. ISSN 0030-1299.

JONES, R. K. et al. Reliability and Efficiency Benefits of Online Trash Rack Monitoring. *Waterpower'97*, 1997, ASCE. p.1184-1191.

JUNG, C.; TAUBERT, D.; SCHINDLER, D. The temporal variability of global wind energy—Long-term trends and inter-annual variability. **Energy Conversion and Management**, v. 188, p. 462-472, 2019. ISSN 0196-8904.

KAMINSKI, M. Food composition of three bryozoan species (Bryozoa, Phylactolaemata) in a mesotrophic lake. **Polskie Archiwum Hydrobiologii/Polish Archives of Hydrobiology**, v. 31, n. 1, p. 45-53, 1984. ISSN 0032-3764.

KARATAYEV, A. Y. et al. The invasive bivalves *Dreissena polymorpha* and *Limnoperna fortunei*: parallels, contrasts, potential spread and invasion impacts. **Journal of Shellfish Research**, v. 26, n. 1, p. 205-214, 2007. ISSN 0730-8000.

KARATAYEV, A. Y.; BURLAKOVA, L. E.; PADILLA, D. K. Contrasting distribution and impacts of two freshwater exotic suspension feeders, *Dreissena polymorpha* and *Corbicula fluminea*. **NATO Science Series: IV— Earth and Environmental Sciences. Springer, Dordrecht, The Netherlands.**, p. 239–262 2005.

KAWECKA, B.; SANECKI, J. *Didymosphenia geminata* in running waters of southern Poland—symptoms of change in water quality? **Hydrobiologia**, v. 495, n. 1-3, p. 193-201, 2003. ISSN 0018-8158.

KILROY, C. A new alien diatom, *Didymosphenia geminata* (Lyngbye) Schmidt: its biology, distribution, effects and potential risks for New Zealand fresh waters. **NIWA, CHC2004-128, Christchurch, New Zealand**, 2004.

KINNE, O. Über den Einfluss des Salzgehaltes und der Temperatur auf Wachstum, Form und Vermehrung bei dem Hydroidpolypen *Cordylophora caspia* (Pallas, Athecata, Clavidae). **Zoologische Jahrbucher Abteilung fuer Allgemeine Zoologie und Physiologie der Tiere**, n. 66, p. 565-638, 1956.

KIPP, R. et al. Transoceanic ships as vectors for nonindigenous freshwater bryozoans. **Diversity and Distributions**, v. 16, n. 1, p. 77-83, 2010. ISSN 1366-9516.

KIRKWOOD, A. E. et al. *Didymosphenia geminata* in two Alberta headwater rivers: an emerging invasive species that challenges conventional views on algal

bloom development. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 64, n. 12, p. 1703-1709, 2007. ISSN 0706-652X.

KOCIOLEK, J. P. et al. New Gomphonema (Bacillariophyta) species from Tasmania. **Phycologia**, v. 43, n. 4, p. 427-444, 2004. ISSN 0031-8884.

KRAEMER, L. et al. Biological basis of behavior in *Corbicula fluminea*, II. Functional morphology of reproduction and development and review of evidence for self-fertilization. **American Malacological Bulletin, Special Edition**, v. 2, p. 193-202, 1986.

LANCIONI, T.; GAINO, E. The zebra mussel *Dreissena polymorpha*: reproduction and competition with the sponge *Ephydatia fluvia*. In: (Ed.). **Biological invaders in inland waters: Profiles, distribution, and threats**: Springer, 2007. p.597-611.

LARNED, S. T. et al. Interactions between the mat-forming alga *Didymosphenia geminata* and its hydrodynamic environment. **Limnology and Oceanography: Fluids and Environments**, v. 1, n. 1, p. 4-22, 2011. ISSN 2157-3689.

LATINI, A. et al. Espécies exóticas invasoras de águas continentais no Brasil. **Brasília: MMA**, 2016.

LAUXEN, D. H. Avaliação do pré-tratamento eletromagnético para o processo de osmose inversa. 2014.

LAVIN, M. Invasive species compendium. 2016.

LOPES, A. et al. Aumento da produtividade de geradores de usinas hidroelétricas através da automação do processo de limpeza dos trocadores de calor do sistema de resfriamento. **Convencion internacional de la ingenieria em Cuba (CIIC 2010)**, 2010.

M., G. J.; M., H. G. The ecology of marine benthic hydroids. **Oceanography and Marine Biology: an Annual Review**, v. 33, p. 351-426, 1998.

MACKIE, G. Biology of the exotic zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, in relation to native bivalves and its potential impact in Lake St. Clair. **Hydrobiologia**, v. 219, n. 1, p. 251-268, 1991. ISSN 0018-8158.

MANSUR, M.; GARCES, L. Ocorrência e densidade de *Corbicula fluminea* (Mueller, 1774) e *Neocorbicula limosa* (Maton, 1811) na estação ecológica do Taim e áreas adjacentes, Rio Grande do Sul, Brasil (Mollusca, Bivalvia, Corbiculidae). **Iheringia, Série Zoologia**, v. 68, p. 99-115, 1988.

MANSUR, M.; RICHINITTI, L.; SANTOS, C. D. *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) molusco bivalve invasor na bacia do Guaíba, Rio Grande do Sul, Brasil. **Biociências**, v. 7, n. 2, p. 147-149, 1999.

MANSUR, M. et al. Moluscos límnicos-Bivalves. **Espécies exóticas invasoras de águas continentais no Brasil. Brasília: Ministério do Meio Ambiente**, p. 127-75, 2016.

MANSUR, M. et al. Moluscos límnicos invasores no Brasil: biologia, prevenção e controle. **Porto Alegre: Redes Editora**, 2012.

MASSARD, J. A.; GEIMER, G. Global diversity of bryozoans (Bryozoa or Ectoprocta) in freshwater: an update. **Bulletin de la Société des naturalistes luxembourgeois**, v. 109, p. 139-148, 2008.

MCCARTHY, T.; FITZGERALD, J.; O'CONNOR, W. The occurrence of the zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771), an introduced biofouling freshwater bivalve in Ireland. **The Irish Naturalists' Journal**, v. 25, n. 11/12, p. 413-416, 1997. ISSN 0021-1311.

MCMAHON, R. Impact of European zebra mussel infestation to the electric power industry. Proceedings of the American Power Conference;(United States), 1990.

MCMAHON, R. F. Quagga mussel (*Dreissena rostriformis bugensis*) population structure during the early invasion of Lakes Mead and Mohave January-March 2007. **Aquatic Invasions**, v. 6, n. 2, p. 131-140, 2011. ISSN 1798-6540.

MCNABB, D. E. Pathways to Water-Smart Power. In: (Ed.). **Global Pathways to Water Sustainability**: Springer, 2019. p.201-215.

MICU, D.; TELEMBICI, A. First record of *Dreissena bugensis* (Andrusov 1897) from the Romanian stretch of River Danube. international symposium of malacology, 2004. p.19-22.

MILLER, M. P. et al. Factors controlling streambed coverage of *Didymosphenia geminata* in two regulated streams in the Colorado Front Range. **Hydrobiologia**, v. 630, n. 1, p. 207-218, 2009. ISSN 0018-8158.

MILLS, E. L. et al. A review of the biology and ecology of the quagga mussel (*Dreissena bugensis*), a second species of freshwater dreissenid introduced to North America. **American Zoologist**, v. 36, n. 3, p. 271-286, 1996. ISSN 0003-1569.

MOHER, D. et al. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate health care interventions: explanation and elaboration. **PLoS medicine**, v. 6, n. 7, p. e1000100, 2009. ISSN 1549-1676.

MOLLOY, D. P. et al. Discovery of *Dreissena rostriformis bugensis* (Andrusov 1897) in western Europe. **Biological Invasions**, v. 9, n. 7, p. 871-874, 2007. ISSN 1387-3547.

MOORE, J. Interstitial cells in the regeneration of *Cordylophora lacustris*. **Journal of Cell Science**, v. 3, n. 23, p. 269-288, 1952. ISSN 0021-9533.

MORRI, C. Alcune osservazioni sulle Cordylophora italiane (Cnidaria, Hydroida). **Atti V. conv. Gr. G. Gadio Varese, Maggio**, p. 151-170, 1980.

MORTON, B. The population dynamics of *Corbicula fluminea* (Bivalvia: Corbiculacea) in Plover Cove Reservoir, Hong Kong. **Journal of Zoology**, v. 181, n. 1, p. 21-42, 1977. ISSN 0952-8369.

MOUTHON, J. Sur la pre'sence en France et au Portugal de *Corbicula* (Bivalvia, Corbiculidae) originaire d'Asie. p. 109-116, 1981.

NAKANO, D.; STRAYER, D. L. Biofouling animals in fresh water: biology, impacts, and ecosystem engineering. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 12, n. 3, p. 167-175, 2014. ISSN 1540-9309.

NETTO, O. S. M. Controle da incrustação de organismos invertebrados em materiais de sistemas de resfriamento de usinas hidrelétricas. 2012.

OBOLEWSKI, K.; JAROSIEWICZ, A.; OŹGO, M. Invasive ponto-caspian hydrozoan *Cordylophora caspia* (Hydrozoa: Cnidaria) in southern Baltic coastal lakes. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 167, p. 147-153, 2015. ISSN 0272-7714.

OLIVEIRA, M. D. et al. Colonization and spread of *Limnoperna fortunei* in South America. In: (Ed.). **Limnoperna Fortunei**: Springer, 2015. p.333-355.

ORLOVA, M. I. et al. Invasion ecology of quagga mussels (*Dreissena rostriformis bugensis*): a review of evolutionary and phylogenetic impacts. **Aquatic Ecology**, v. 39, n. 4, p. 401-418, 2005. ISSN 1386-2588.

PARK, G.-M.; CHUNG, E.-Y. Histological studies on hermaphroditism, gametogenesis and cyclic changes in the structures of marsupial gills of the introduced Asiatic clam, *Corbicula fluminea*, and the Korean clam, *Corbicula*

leana. **Journal of Shellfish Research**, v. 23, n. 1, p. 179-185, 2004. ISSN 0730-8000.

PASTORINO, G. et al. **Limnoperna fortunei (Dunker, 1857)(Mytilidae), nuevo bivalvo invasor en aguas del Río de la Plata**. 1993

PERKINS, K.; SARGISON, J.; HALLEGRAEFF, G. DIATOM FOULING PROBLEMS IN A TASMANIAN HYDRO CANAL, INCLUDING THE DESCRIPTION OF GOMPHONEMA TARRALEAHAE SP. NOV. **Diatom Research**, v. 24, n. 2, p. 377-391, 2009. ISSN 0269-249X.

PERKINS, K. J. et al. Succession and physiological health of freshwater microalgal fouling in a Tasmanian hydropower canal. **Biofouling**, v. 26, n. 6, p. 637-644, 2010. ISSN 0892-7014.

PESTANA, D. et al. Prospecção do molusco invasor *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) nos principais corpos hídricos do estado do Paraná, Brasil. **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 50, n. 34, p. 553-559, 2010. ISSN 0031-1049.

PIMENTEL, D.; ZUNIGA, R.; MORRISON, D. Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. **Ecological economics**, v. 52, n. 3, p. 273-288, 2005. ISSN 0921-8009.

PLATVOET, D.; VAN DER VELDE, G.; SONG, Y. Description of the Lateral Line Organ of *Dikerogammarus Villosus* (Sowinsky, 1894), With Discussion on its Function (Peracarida, Amphipoda) Amphipod Pilot Species Project (Ampis)—Report 4. **Crustaceana**, v. 80, n. 11, p. 1373-1392, 2007. ISSN 1568-5403.

POMBO, V. Invasoras de Águas Continentais no Brasil. 2016. ISSN 978-85-7738-176-0.

POTTER, J.; LIDEN, L. Corbicula control at the Potomac River Steam Electric Station Alexandria, Virginia. **American Malacological Bulletin**. 1986., 1986. ISSN 0740-2783.

POURCHER, A. M.; D'HONDT, J. L. Étude ultrastructurale du sessoblaste et du flottoblaste chez Plumatella fungosa (Pallas, 1768) (Bryozoaires, Phylactolaemates). **Nat. Zool**, v. 13°, p. 209-216, 1987.

PUCHERELLI, S. F.; CLAUDI, R.; PRESCOTT, T. Control of biofouling in hydropower cooling systems using HOD ultraviolet light. **Management of Biological Invasions**, v. 9, p. 451-461, 2018.

QING, Z.; GRADINGER, R.; QINGSONG, Z. Competition within the marine microalgae over the polar dark period in the Greenland Sea of high Arctic. **海洋学报 (中文版)**, n. 2, p. 233-242, 2003.

R CORE TEAM. A language and environment for statistical computing (version 3.2. 2). **R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria**, 2015.

RAJAGOPAL, S.; VAN DER VELDE, G. Invasive species: implications for industrial cooling water systems. In: (Ed.). **Operational and Environmental Consequences of Large Industrial Cooling Water Systems**: Springer, 2012. p.127-162.

RAJAGOPAL, S. et al. How effective is intermittent chlorination to control adult mussel fouling in cooling water systems? **Water Research**, v. 37, n. 2, p. 329-338, 2003. ISSN 0043-1354.

RAVIZZA, M. **Stalk forming fouling diatoms: a problem for the hydro-electricity industry**. 2015. University of Tasmania

REINECKE, A.; BREZESINSKI, G.; HARRINGTON, M. J. pH-Responsive Self-Organization of Metal-Binding Protein Motifs from Biomolecular Junctions in

Mussel Byssus. **Advanced Materials Interfaces**, v. 4, n. 1, p. 1600416, 2017. ISSN 2196-7350.

RICCIARDI, A. Global range expansion of the Asian mussel *Limnoperna fortunei* (Mytilidae): another fouling threat to freshwater systems. **Biofouling**, v. 13, n. 2, p. 97-106, 1998. ISSN 0892-7014.

RICCIARDI, A.; REISWIG, H. M. Taxonomy, distribution, and ecology of the freshwater bryozoans (Ectoprocta) of eastern Canada. **Canadian journal of zoology**, v. 72, n. 2, p. 339-359, 1994. ISSN 0008-4301.

ROOS, P. Two-stage life cycle of a *Cordylophora* population in the Netherlands. **Hydrobiologia**, v. 62, n. 3, p. 231-239, 1979. ISSN 0018-8158.

SARDIÑA, P.; ..., D. C.-F. A. A.; 2008, U. The effects of the invasive mussel, *Limnoperna fortunei*, on associated fauna in South American freshwaters: importance of physical structure and food supply. **ingentaconnect.com**, 2008.

SASTRE, A. V. et al. First record of the invasive diatom *Didymosphenia geminata* (Lyngbye) Schmidt in a Patagonian Andean river of Argentina. 2013. ISSN 2242-1300.

SCARABINO, F.; VERDE, M. ***Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) en la costa uruguaya del Rio de La Plata (Bivalvia; Mytilidae)**. 1994

SCHLOESSER, D. W.; NALEPA, T. F. Dramatic decline of unionid bivalves in offshore waters of western Lake Erie after infestation by the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 51, n. 10, p. 2234-2242, 1994. ISSN 0706-652X.

SEGURA, P. **A slimy invader blooms in the rivers of Patagonia**: American Association for the Advancement of Science 2011.

SILVA, D. P. D. Aspectos bioecológicos do mexilhão dourado *Limnoperna fortunei* (Bivalvia, Mytilidae)(Dunker, 1857). 2006.

SILVEIRA, F.; BOSCOLO, H. Primeira ocorrência de *Cordylophora caspia* (Pallas, 1771)(Hydrozoa, Clavidae) para o estado de São Paulo. XIV Congresso Brasileiro de Zoologia, 1996.

SMITH, D. G.; WERLE, S. F.; KLEKOWSKI, E. The rapid colonization and emerging biology of *Cordylophora caspia* (Pallas, 1771)(Cnidaria: Clavidae) in the Connecticut River. **Journal of Freshwater Ecology**, v. 17, n. 3, p. 423-430, 2002. ISSN 0270-5060.

SOUSA, R.; ANTUNES, C.; GUILHERMINO, L. Ecology of the invasive Asian clam *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) in aquatic ecosystems: an overview. *Annales de Limnologie-International Journal of Limnology*, 2008, EDP Sciences. p.85-94.

SPAULDING, S.; ELWELL, L. Increase in nuisance blooms and geographic expansion of the freshwater diatom *Didymosphenia geminata*: recommendations for response. **White Paper. USEPA Region**, v. 8, 2007.

STEPHENS, J. C. 18 Assessing resilience in energy system change through an energy democracy lens. **Handbook on Resilience of Socio-Technical Systems**, p. 341, 2019. ISSN 1786439379.

STOECKMANN, A. Physiological energetics of Lake Erie dreissenid mussels: a basis for the displacement of *Dreissena polymorpha* by *Dreissena bugensis*. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 60, n. 2, p. 126-134, 2003. ISSN 0706-652X.

SURIANI, A. L.; FRANÇA, R. S.; ROCHA, O. A malacofauna bentônica das represas do médio rio Tietê (São Paulo, Brasil) e uma avaliação ecológica das

espécies exóticas invasoras, *Melanoides tuberculata* (Müller) e *Corbicula fluminea* (Müller). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 24, n. 1, p. 21-32, 2007.

SYLVESTER, F. et al. Filtration rates of the invasive pest bivalve *Limnoperna fortunei* as a function of size and temperature. **Hydrobiologia**, v. 534, n. 1-3, p. 71-80, 2005. ISSN 0018-8158.

THOMPSON, S. E. et al. THE ROLE OF NITRIC OXIDE IN DIATOM ADHESION IN RELATION TO SUBSTRATUM PROPERTIES 1. **Journal of phycology**, v. 44, n. 4, p. 967-976, 2008. ISSN 0022-3646.

TUCHMAN, N. C. et al. Differential heterotrophic utilization of organic compounds by diatoms and bacteria under light and dark conditions. In: (Ed.). **Advances in Algal Biology: A Commemoration of the Work of Rex Lowe**: Springer, 2006. p.167-177.

ULIANO-SILVA, M. et al. Invasive species as a threat to biodiversity: The golden mussel *Limnoperna fortunei* approaching the Amazon River basin. **Exploring Themes on Aquatic Toxicology. Kerala. P135–148**, 2013.

VAN VLIET, M. T.; VÖGELE, S.; RÜBBELKE, D. Water constraints on European power supply under climate change: impacts on electricity prices. **Environmental Research Letters**, v. 8, n. 3, p. 035010, 2013. ISSN 1748-9326.

VAN VLIET, M. T. et al. Power-generation system vulnerability and adaptation to changes in climate and water resources. **Nature Climate Change**, v. 6, n. 4, p. 375, 2016. ISSN 1758-6798.

VELDE, G.; PLATVOET, D. Quagga mussels *Dreissena rostriformis burgensis* (Andrusov, 1897) in the Main River (Germany). 2007.

VITOUSEK, P. M.; LOOPE, L. L.; WESTBROOKS, R. Biological invasions as global environmental change. 2017.

VON RUCKERT, G.; CAMPOS, M. D. C. S.; ROLLA, M. E. Alimentação de *Limnoperna fortunei* (Dunker 1857): taxas de filtração com ênfase ao uso de Cyanobacteria. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 26, n. 4, p. 421-429, 2004. ISSN 1807-863X.

VROUWENVELDER, J. et al. Tools for fouling diagnosis of NF and RO membranes and assessment of the fouling potential of feed water. **Desalination**, v. 157, n. 1-3, p. 361-365, 2003. ISSN 0011-9164.

WETHERBEE, R. et al. Minireview—the first kiss: establishment and control of initial adhesion by raphid diatoms. **Journal of Phycology**, v. 34, n. 1, p. 9-15, 1998. ISSN 0022-3646.

WHITTON, B.; ELLWOOD, N.; KAWECKA, B. Biology of the freshwater diatom *Didymosphenia*: a review. **Hydrobiologia**, v. 630, n. 1, p. 1-37, 2009. ISSN 0018-8158.

WOOD, T. Freshwater bryozoans: a zoogeographical reassessment. **Bryozoan studies**, p. 339-345, 2001.

WOOD, T. S. *Plumatella nitens*, a new species of freshwater bryozoan from North America (Ectoprocta: Phylactolaemata), previously misidentified. **Hydrobiologia**, v. 328, n. 2, p. 147-153, 1996. ISSN 0018-8158.

WOOD, T. S.; OKAMURA, B. A new key to the freshwater bryozoans of Britain, Ireland and Continental Europe, with notes on their ecology. **Sci. publ./Freshwater biol. assoc.**, 2005.

ZAMPONI, M. Los cnidária de la Republica Argentina. **Fauna de Agua Dulce de la República Argentina. PROFADU (CONICET). La Plata**, 1991.

ZAMPONI, M. O.; ESCALANTE, A. H. El grupo Hydra en el foco de una tesis doctoral.

ZHANG, R. et al. Feeding ecology of *Limnoperna fortunei* in southern China: insights from stable isotopes and fatty-acid biomarkers. **Journal of Freshwater Ecology**, v. 32, n. 1, p. 761-772, 2017. ISSN 0270-5060.

ZHULIDOV, A. et al. Invasion history, distribution, and relative abundances of *Dreissena bugensis* in the old world: a synthesis of data. **Biological Invasions**, v. 12, n. 7, p. 1923-1940, 2010. ISSN 1387-3547.

ZHURAVEL, P. *Dreissena bugensis* of the Dnepr and its recent appearance in the Dnepr reservoir. **Zoologicheskii zhurnal**, v. 30, n. 2, p. 186, 1951. ISSN 0044-5134.

CAPÍTULO II. AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE MÉTODOS QUANTITATIVOS PARA ANÁLISES DE DNA AMBIENTAL DO MEXILHÃO-DOURADO *LIMNOPERNA FORTUNEI* (DUNKER, 1857)

Resumo:

Bioinvasões são uma das principais ameaças à biodiversidade global, pois as espécies invasoras apresentam facilidade para superar barreiras ecológicas, rápido crescimento populacional e dispersão geográfica acelerada. Métodos de gestão para o controle de espécies invasoras, como mexilhão-dourado, *Limnoperna fortunei*, são particularmente desafiadores devido às grandes limitações na detecção, quantificação e identificação precoce do processo de bioinvasão. Técnicas baseadas em DNA ambiental (eDNA) são eficientes ferramentas metodológicas para a detecção precoce dessas espécies até mesmo quando sua abundância relativa é baixa. O presente estudo, realizado com base em processos de diluição serial de amostras de eDNA de *L. fortunei* em condições laboratoriais, teve como objetivo avaliar a sensibilidade e acurácia de dois métodos fluorométricos de quantificação da biomassa de *L. fortunei*: através do uso de fluorômetro Qubit® e de PCR em tempo real (rtPCR). Constatou-se que o método quantitativo por rtPCR mostrou-se muito mais sensível quando comparado ao fluorômetro Qubit®. Através do método de rtPCR foi possível identificar até 10^{-6} ng/ μ L de DNA de *L. fortunei* em amostras de água, o que equivale a identificar a presença de um animal adulto de 10,1 g, em 920.000 L de água.

Palavras chaves: eDNA; diluição; detecção; invasão; biomassa; quantificação

1.7 INTRODUÇÃO

Bioinvasões são consideradas uma das maiores ameaças à biodiversidade global, ficando atrás apenas da destruição de habitats naturais (Mcgeoch *et al.*, 2010; Vitousek *et al.*, 2017). Durante um processo de bioinvasão, uma ou mais espécies passam a colonizar ambientes geograficamente distintos de sua distribuição original (Fernandes *et al.*, 2012; Boltovskoy, 2015), causando tantos impactos ambientais quanto econômicos na

região invadida (Latini *et al.*, 2016; Mansur *et al.*, 2016). Espécies invasoras caracterizam-se pela facilidade em quebrar barreiras ecológicas, por possuírem alta eficiência reprodutiva, rápido crescimento populacional e dispersão geográfica acelerada (Mansur *et al.*, 2012; Pombo, 2016). A magnitude dos impactos ocasionados pelas espécies invasoras está, na maioria das vezes, associada aos seus mecanismos de dispersão, às suas características biológicas e à susceptibilidade dos habitats invadidos (Belz, 2006; Espinola e Júlio, 2007; Darrigran e Damborenea, 2011).

Os macroinvertebrados bentônicos, com destaque para os Mollusca das classes Gastropoda e Bivalvia, são considerados os organismos invasores que mais causam impactos em ambientes límnicos (Callil, 2003; Darrigran e Damborenea, 2011; Silva e Barros, 2011; Santos *et al.*, 2012). Um desses invertebrados bentônicos, em especial, o mexilhão-dourado *Limnoperna fortunei*, um bivalve nativo do sudeste asiático, tem expandido sua distribuição por ecossistemas de água doce do leste da Ásia e da América do Sul nos últimos 30 anos (Boltovskoy, 2015; Morton, 2015; Xu *et al.*, 2015; Monteiro De Rezende Ayroza *et al.*, 2019). De acordo com Boltovskoy (2015), essa espécie tolera grandes variações ambientais, tendo colonizado regiões com amplitude térmica de 14 a 32° C. O mexilhão-dourado foi registrado pela primeira vez na América do Sul por volta de 1991, tendo sido possivelmente introduzido na região estuarina do Rio da Prata (Argentina) através de água de lastro de navios cargueiros (Pastorino *et al.*, 1993; Mansur *et al.*, 2012). Estudos recentes relatam que a espécie já está presente em algumas das principais bacias hidrográficas da América do Sul, tais como as bacias dos rios Paraguai, Paraná, Uruguai (Pessotto e Nogueira, 2018) e até mesmo do rio São Francisco, na região Nordeste do Brasil (Mansur *et al.*, 2012; Barbosa *et al.*, 2016). Segundo Monteiro De Rezende Ayroza *et al.* (2019), a dispersão dessa espécie se dá de várias maneiras e pode envolver as mais diferentes fases do seu ciclo ontogenético. Larvas com tamanho entre 220 a 250 µm desenvolvem uma estrutura proteica, chamada de bisso, que é secretada pelas glândulas dos pés, permitindo que o animal se fixe a qualquer substrato subaquático, formando colônias extremamente densas, causando sérios problemas de incrustações (Darrigran e Damborenea, 2011; Cataldo, 2015; Li *et al.*, 2018).

Há registros de incrustações por *L. fortunei* em sistemas de abastecimento de água, no sistema hidráulico de usinas hidrelétricas, térmicas e nucleares, em refinarias de petróleo, em fábricas de papel, entre outros setores industriais (Darrigran e Damborenea, 2005; Mansur *et al.*, 2016; Castro, 2018). Os sistemas de resfriamento, canais, grades e tubulações de usinas hidrelétricas, entretanto, são as estruturas que mais têm sido afetadas pela presença da espécie (Grohmann, 2008; Karatayev *et al.*, 2015; Pucherelli *et al.*, 2018). Em casos extremos, incrustações provocam a redução no volume e na velocidade do fluxo de água no interior desses sistemas hidráulicos (Darrigran, 2002), oclusão de filtros e aumento da corrosão estrutural (Nakano e Strayer, 2014). Além disso, há também diversos registros de impactos ecológicos causados por *L. fortunei* nos ambientes invadidos (Darrigran *et al.*, 2004; Clavero e García-Berthou, 2005; Burlakova *et al.*, 2014; Iacarella *et al.*, 2015). A espécie interfere nas condições físicas dos habitats, na ciclagem de nutrientes e no nicho ecológico, além de estabelecer relações ecológicas facilitadoras para o estabelecimento de outras espécies invasoras (Simberloff e Von Holle, 1999). Identificar correta e precocemente a presença e definir a evolução da abundância da espécie em ambientes aquáticos são fatores essenciais não apenas para monitorar o processo de bioinvasão e de dispersão da espécie, mas também para se estabelecer métodos mais eficientes de gestão de riscos ambientais e industriais (Mehta *et al.*, 2007; Simpson *et al.*, 2009; Pie *et al.*, 2017).

Uma das formas mais modernas de detecção precoce de espécies invasoras é através do DNA ambiental (eDNA). De acordo com Taberlet *et al.* (2012), todos os organismos liberam fragmentos de DNA nos ambientes em que vivem, deixando "rastros" compostos por pele, escamas, fezes, mucos, gametas sexuais e vários outros tecidos, referidos genericamente como eDNA. Em ambientes aquáticos, o eDNA tende a ficar em suspensão na água, onde ele pode ser recolhido, extraído e sequenciado/amplificado, permitindo a identificação da composição e até a estimativa da biomassa das espécies monitoradas (Díaz-Ferguson *et al.*, 2014; Rees *et al.*, 2014; Thomsen e Willerslev, 2015). Nos últimos anos, métodos de quantificação por meio de fluorimetria foram desenvolvidos para determinar a concentração de DNA presente em diferentes tipos de amostras a partir do eDNA (Nakayama *et al.*,

2016; Pie *et al.*, 2017; Xia, Zhan, *et al.*, 2018). O presente estudo, realizado a partir de um processo de diluição serial de amostras de eDNA de *L. fortunei*, em condições laboratoriais, tem como objetivo avaliar a sensibilidade e acurácia de dois métodos fluorométricos de quantificação da biomassa de *L. fortunei* a partir de eDNA: através do uso de Qubit® e de PCR em tempo real (rtPCR).

1.8 MATERIAL E MÉTODOS

1.8.1 Coleta e manutenção dos animais em laboratório

Espécimes de *L. fortunei* foram coletados no reservatório da Usina Hidrelétrica Governador José Richa (Salto Caxias) (Lat. 25°32'34.99"S, Long. 53°29'45.82"O), localizada no trecho do Baixo Rio Iguaçu, estado do Paraná, Brasil. Os organismos foram coletados por meio de raspagens no *log boom* (estrutura flutuante utilizada para contenção de troncos) da usina.

Os animais coletados foram acondicionados em caixas térmicas de 30 L, contendo 15 L de água, e transportados vivos até o Laboratório de Pesquisas com Organismos Aquáticos, do Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil. O tempo total de transporte dos indivíduos coletados até o laboratório foi de cerca de 8 horas.

Em laboratório, os indivíduos foram mantidos em tanques plásticos com capacidade para até 500 L, preenchidos com 300 L de água, e conectados a um sistema de filtração física e biológica da água. A água dos sistemas era livre de cloro e foi mantida em pH $7,0 \pm 0,5$ e temperatura de $25 \pm 1,0$ °C. Os animais eram alimentados uma vez ao dia com 20 g de microalga desidratada (*Chlorella* sp.). Antes de serem submetidos a qualquer tipo de teste, as conchas desses organismos foram limpas manualmente para a remoção de sujidades e de outros eventuais organismos associados. Para isso, utilizou-se uma escova de cerdas moles e hipoclorito de sódio à 5%, seguido por enxague utilizando-se a água livre de cloro.

1.8.2 Experimento

A água utilizada no experimento passou previamente por um processo de cloração com hipoclorito de sódio (10 - 12%), seguida por neutralização com

tiosulfato de sódio, em presença de aeração constante. Os organismos, escolhidos ao acaso, foram separados em grupos com biomassa viva aproximada de 10 g/L e acondicionados em 9 béqueres (D0_A a D0_I) de 2 L, contendo 1 L de água. Como controle negativo (NC), foram utilizados 9 béqueres (NC_A a NC_I) de 2 L, contendo 1 L de água ultrapurificada (Evoqua Water Technologies, EUA), sem a presença de animais. Todos os béqueres foram mantidos no interior de um sistema de banho-maria, em sala com temperatura controlada a 25 ± 0,5 °C, durante 24 horas, para aclimação dos organismos às condições laboratoriais. Ao final deste período, a água de cada béquer foi 100% renovada e os organismos mantidos nos respectivos béqueres, nas mesmas condições, por mais 24 horas. Após este período, todos os indivíduos foram cuidadosamente retirados dos béqueres, com o auxílio de pinças esterilizadas, para que a água pudesse ser submetida a diferentes diluições sequenciais. Utilizando-se água ultrapurificada como diluente, foram preparadas, em balões volumétricos de 1.000 mL, concentrações equivalentes à 100, 10, 1, 0,1, 0,01 e 0,001 e 0,0001% da amostra original (D₁ a D₆) (Figura 3).

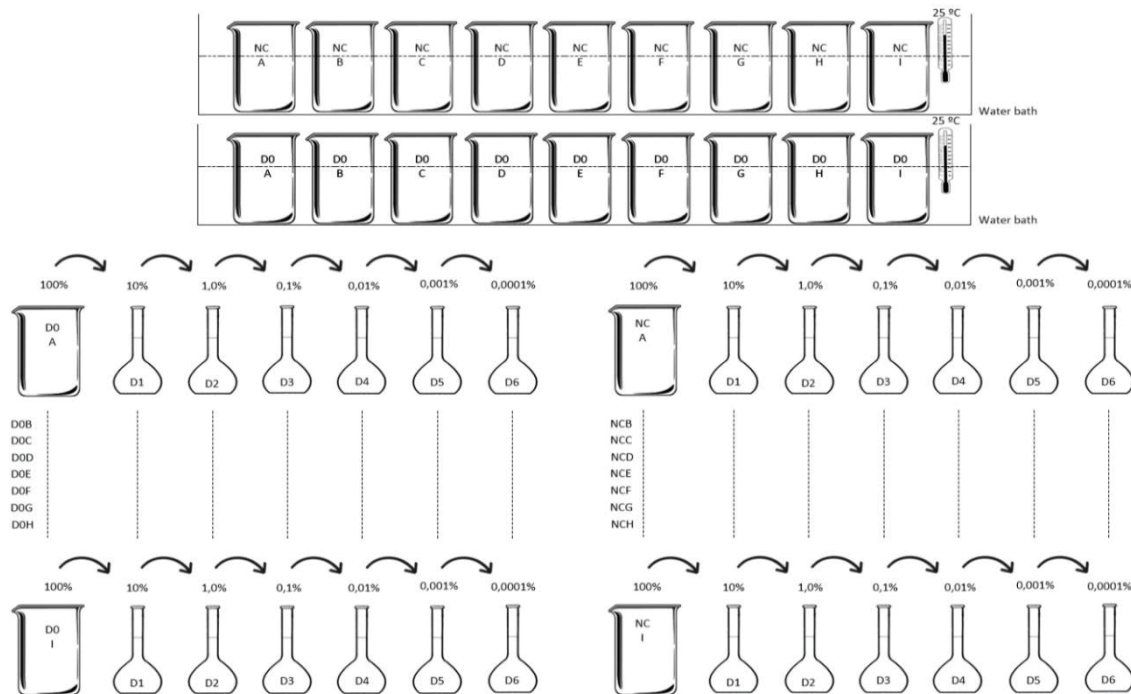


Figura 3. Representação esquemática do delineamento experimental adotado, sendo D0_A a D0_I – os tratamentos (exposição dos animais em banho-maria, a 25 ± 0,5 °C, por 24 horas, para liberação de DNA; D₁ a D₆ as diluições seriais de cada tratamento; e NC_A a NC_I – controle negativo (apenas água ultrapurificada).

1.8.3 Biometria e avaliação da mortalidade

Finalizado o período de 24 horas, os animais foram retirados dos béqueres, com o auxílio de pinças esterilizadas, em seguida realizada a identificação e quantificação dos indivíduos que se encontravam mortos ao final do experimento. A constatação da morte foi realizada a partir da abertura natural de suas valvas e ausência de resposta ao toque. Em seguida, os animais foram pesados (P1) em uma balança (Bell Engineering, S2202h–2.200g, Itália) e, em seguida, envoltos em tiras de papel alumínio, devidamente identificadas, e mantidas em estufa à 60° C, por 48 horas. Após este período, foram novamente pesados (P2) para cálculo do peso seco (Peso Seco = P1-P2).

1.8.4 Coleta, preparação, extração e purificação de DNA das amostras

Após a retirada dos organismos dos béqueres, a água contida nos balões volumétricos D0 (D₁ a D₆) e NC (D₁ a D₆) foi individualmente homogeneizada e, em seguida, filtrada em membrana de nitrato de celulose (Unifil, Alemanha), com 47 mm de diâmetro e 0,45 µm de poro, com auxílio de uma bomba à vácuo (Femic, Brasil). Devido à alta concentração de material orgânico liberado pelos mexilhões presentes nos tratamentos (D0), foi possível apenas a filtração de 100 ml da água contida nesses béqueres. Em todas as demais diluições, a totalidade (100%) do volume de água contida nos balões volumétricos foi filtrada. Para fixação do DNA presente nas amostras, os filtros contendo o material retido foram acondicionados individualmente em microtubos de 1,5 mL, preenchidos com etanol absoluto (99,9 %) PA (Emsure Merck[®], Alemanha), que foram armazenados em freezer (Electrolux, Brasil), a -20°C, até o momento da extração.

Para a extração do DNA, os filtros foram retirados dos microtubos, mantidos em temperatura ambiente, para que o etanol residual evaporasse por completo, e então processados. O processamento foi feito utilizando-se beads magnéticas (microesferas envolvidas por magnetita e carboxila), que se ligam ao DNA (ligação carboxila – DNA) pelo processo de Imobilização Reversível de Fase Sólida (SPRI). Após esse processo, foi possível separar as partículas de DNA das não-DNA. Após a extração, o extrato do DNA foi então armazenado em microtubos de 1,5 ml, e estes congelados em freezer a -20°C, até o momento das análises. Para a garantia dos resultados, os processos de extração e de

quantificação foram realizados em salas separadas, como recomendado por Pie *et al.* (2017). Para a análise das amostras, foram utilizados os métodos de quantificação por fluorômetro Qubit® e PCR em tempo real (rtPCR).

1.8.5 Quantificação do DNA por fluorômetro Qubit®

Inicialmente todos os tratamentos (100 a 0,0001%) e suas respectivas réplicas foram submetidos à quantificação utilizando-se o kit fluorométrico High Sensitivity (HS) e leitura em fluorômetro Qubit® 4.0 (Thermo Fisher Scientific®, Brasil), em comprimento de ondas de 260 e 280 nm.

Para a realização dessa etapa, foi preparada previamente uma solução-trabalho (WS) contendo uma sonda de DNA e o buffer fluorométrico, em uma proporção de 1:200 (199 µL do buffer de fluorometria e 1 µL da sonda). Para a análise, foram adicionados 5 µL do extrato do DNA de *L. fortunei*, em microtubos de 0,6 mL de parede fina e 195 µL da WS, totalizando 200 µL da amostra do ensaio. As amostras preparadas foram homogeneizadas em vórtex (Loccus, Brasil) e incubadas em temperatura ambiente por dois minutos. Após este procedimento, cada amostra foi quantificada individualmente, utilizando-se o Qubit®.

As concentrações de DNA nas amostras correspondentes aos tratamentos 100 e 10% ficaram acima do limite superior de detecção do método, quando analisadas através do kit HS. Essas amostras foram analisadas e quantificadas utilizando o kit fluorométrico Broad Range (BR), indicado para amostras que apresentem altas concentrações de DNA. A solução-trabalho e o buffer específico para a execução da fluorometria foram aplicados nas mesmas proporções de 1:200, como no caso do uso do kit HS. O volume final do ensaio foi de 200 µL, sendo 195 µL da WS e 5 µL do extrato da amostra. As análises quantitativas foram realizadas individualmente através do Qubit®.

1.8.6 Quantificação do DNA por PCR em tempo real

Todas as amostras foram também quantificadas através da PCR em tempo real (rtPCR), a partir do uso de sondas de hidrólise (TaqMan), com o auxílio de um Rotor - Gene Q (Qiagen, Alemanha). Antes das análises, uma curva de sensibilidade para determinar o limite de detecção do ensaio foi gerada. Para isso, uma amostra de tecido muscular de *L. fortunei* foi coletada. Em

seguida, o tecido passou pelo processo de digestão, utilizando-se 200 µL de buffer de digestão e 20 µL de proteinase K, seguido por 12 horas de incubação em temperatura de 56° C (temperatura ótima para a ação da enzima). Após o tecido passar por todo processo de extração utilizando o método SPRI, descrito anteriormente, o extrato foi quantificado utilizando o kit dsDNA BR, no Qubit® 4.0.

Antes da adição do extrato de DNA das amostras, foi preparada uma mistura de reagentes (Master Mix), utilizando-se 0,75 µL do primer específico da espécie e 0,25 µL da sonda de hidrólise, ambos em uma concentração final de 10 uM. Para finalizar, foram distribuídos 6 µL do mix em cada poço da placa, 3 µL do extrato de DNA e, em seguida, realizou-se a quantificação. Ao final de todo o processo, as curvas de amplificação foram analisadas e foi determinado o *cycle threshold* (Ct) da reação (o momento exato em que o DNA é identificado e o processo de amplificação começa a acontecer após o Background).

1.8.7 Análise dos dados

Os resultados obtidos foram submetidos a análise de regressão (simples e múltipla), utilizando-se como variável dependente a concentração de DNA (ng/µL/g) e como variáveis independentes a diluição, o número de indivíduos e cada tratamento e taxa de mortalidade quantificada ao final do experimento. Para facilitar a análise, todos os dados foram transformados (pelo log de base 10). As análises foram realizadas utilizando-se o software Statistica 10.0 (StatSoft®).

1.9 RESULTADOS

O número de animais utilizado em cada repetição variou entre 7 e 13 e, apesar da tentativa de se padronizar em exatamente 10 g a biomassa viva de *L. fortunei* em cada unidade experimental, houve uma variação total de 0,3 g em torno desse valor (desvio padrão = 0,1 g). Cada indivíduo utilizado no experimento pesava, em média, 0,93 g e as taxas de mortalidade durante a fase de obtenção do DNA ambiental variaram de 0 a 57,1% (Tabela 7).

Tabela 7. Síntese dos dados (valores totais, médias e desvio padrão) relativos à fase de obtenção experimental de DNA ambiental de *Limnoperna fortunei*.

Repetição	Nº inicial	Biomassa viva (g)	Peso seco (g)	Nº de mortos	Mortalidade (%)
D0 A	12	10,0	3,3	2	16,7
D0 B	7	10,0	3,2	4	57,1
D0 C	13	10,1	3,4	3	23,1
D0 D	12	10,1	3,1	1	08,3
D0 E	12	10,1	3,2	4	33,3
D0 F	11	9,9	3,1	1	09,0
D0 G	10	10,1	3,4	1	10,0
D0 H	11	10,2	3,1	0	0,0
D0 I	10	10,2	2,9	1	10,0
x	10,9	10,1	3,2	1,9	18,6
(±dp)	(±1,8)	(±0,1)	(±0,2)	(±1,5)	(±17,4)

Em todas as diluições analisadas, o DNA de *L. fortunei* foi detectado e quantificado através da rtPCR. Por outro lado, isso aconteceu com apenas 40% das amostras analisadas através dos kits fluorométrico associados à quantificação pelo Qubit® (Tabela 8).

Tabela 8. Capacidade de detecção e quantificação de DNA ambiental (eDNA) a partir de análises por meio de fluorômetro Qubit (HS e BR) e PCR em tempo real (rtPCR).

Diluições	Log da diluição	Broad Range (BR)	High Sensitivity (HS)	PCR em tempo real (rtPCR)
D0 - 100%	2	Q	LS **	Q
D1 -10%	1	Q	LS**	Q
D2 -1.0%	0	LI*	Q	Q
D3 - 0.1%	-1	LI*	Q	Q
D4 - 0.01%	-2	LI*	LI*	Q
D5 - 0.001%	-3	LI*	LI*	Q
D6 - 0.0001%	-4	LI*	LI*	Q

** LS - Concentração de DNA superior ao limite de quantificação; * LI - Concentração de DNA inferior ao limite de quantificação; Q – Quantificado.

Ao se compararem os resultados obtidos pelo Qubit® (HS e BR) e pela rtPCR, observou-se que as concentrações de DNA quantificadas foram proporcionais às razões das diluições utilizadas. Nos dois casos, o modelo obtido a partir das curvas de regressão entre essas variáveis apresentaram coeficientes de determinação relativamente elevados ($R^2 = 0,85$ e $0,86$, respectivamente). No entanto, o maior número de pontos válidos obtidos através da análise por rtPCR fazem com que os resultados evidenciem a maior sensibilidade da rtPCR em

relação às análises realizadas através do Qubit®. Mas, mesmo assim, observou-se uma tendência de aumento da dispersão dos resultados com o aumento da diluição das amostras (Figura 4 e Figura 5).

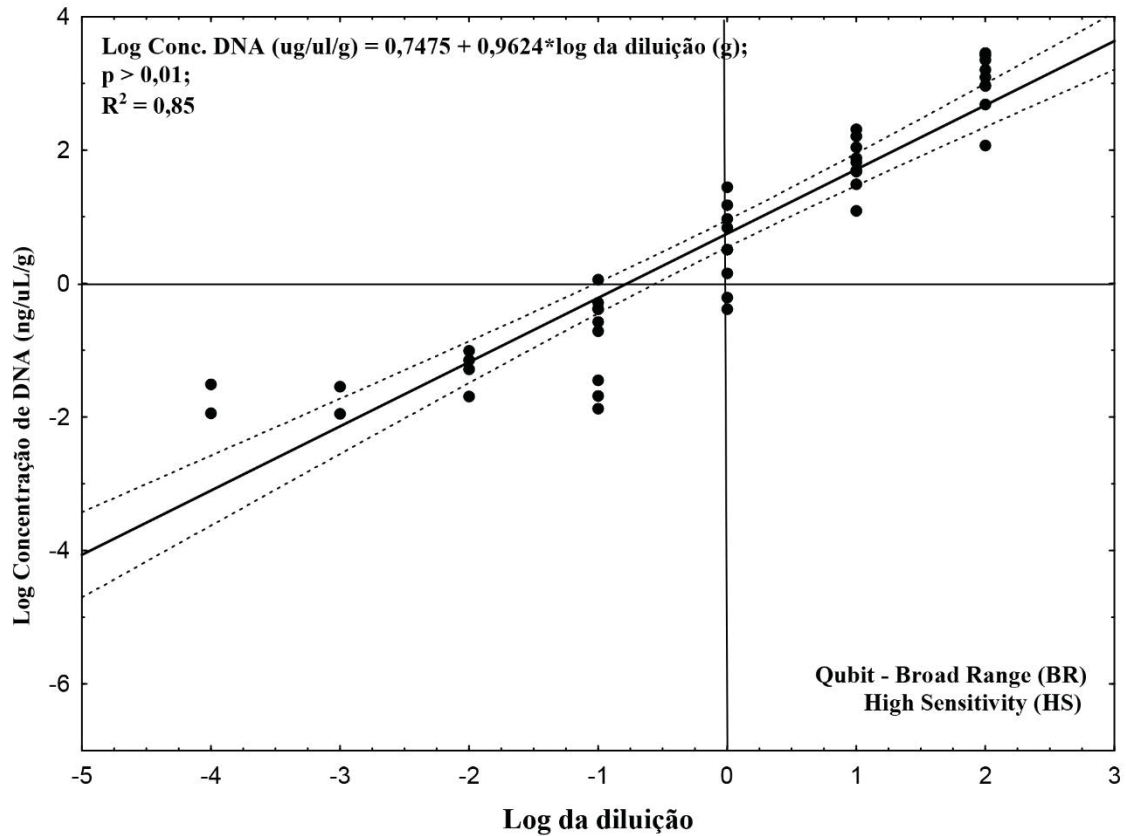


Figura 4. Relação entre as concentrações de DNA ambiental de *Limnoperna fortunei*, quantificadas através de fluorômetro Qubit, utilizando os kits fluorométricos BR – Broad Range (log da diluição 2 e 1) e HS – High Sensitivity (0 a -4), e a diluição serial aplicada às amostras.

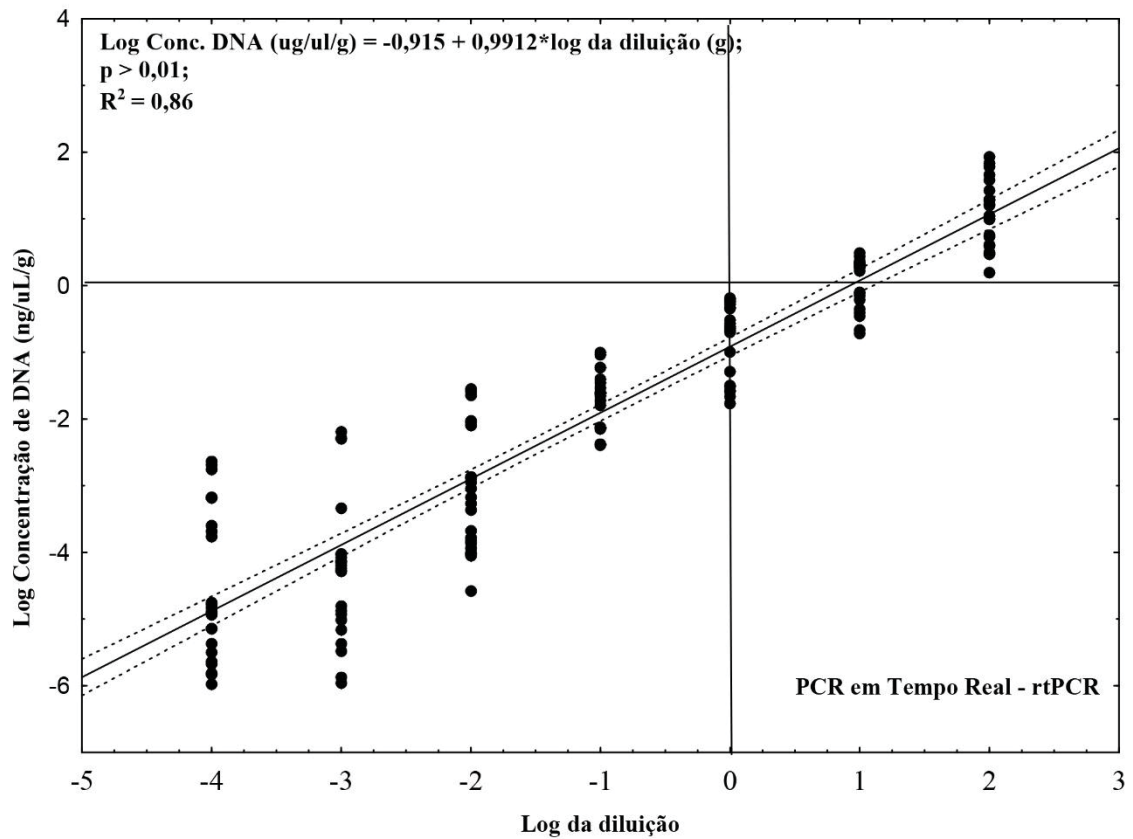


Figura 5. Relação entre as concentrações de DNA ambiental de *Limnoperna fortunei*, quantificadas através da técnica de PCR em tempo real (rtPCR) e a diluição serial aplicada às amostras.

Os Ct obtidos nos ensaios com a rtPCR variaram de forma inversamente proporcional às diluições realizadas, com limites entre 12,48 e 35,76, referente às concentrações 32,13 ($\log = 1$) e $9,66^{-6}$ ($\log = -5$) ng/uL/g, respectivamente. O coeficiente de determinação (R^2) da curva obtida foi de 0,92 (Figura 6).

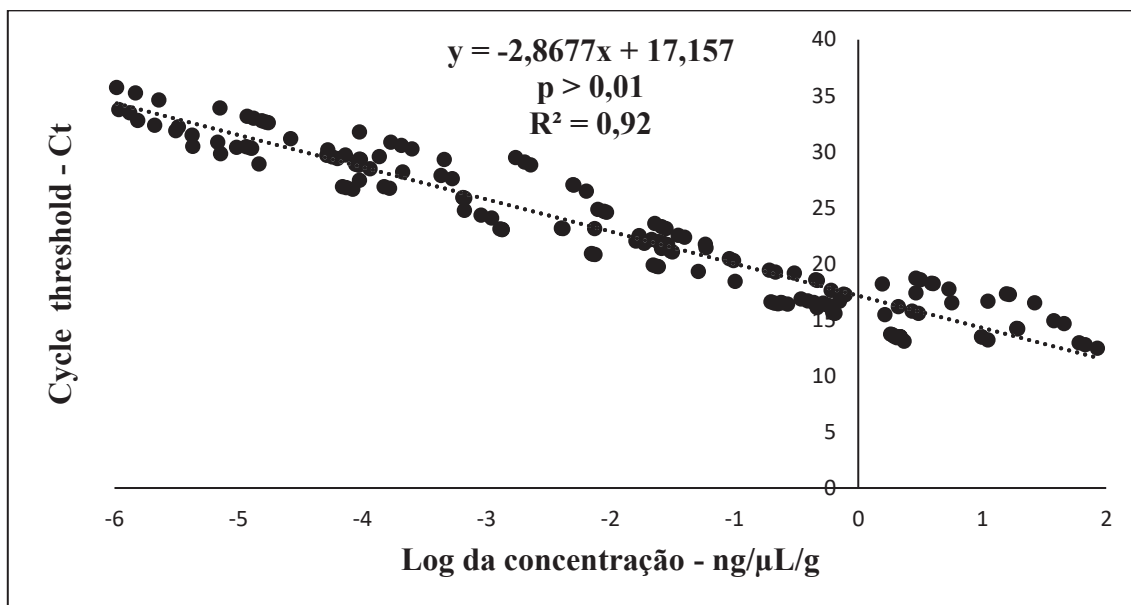
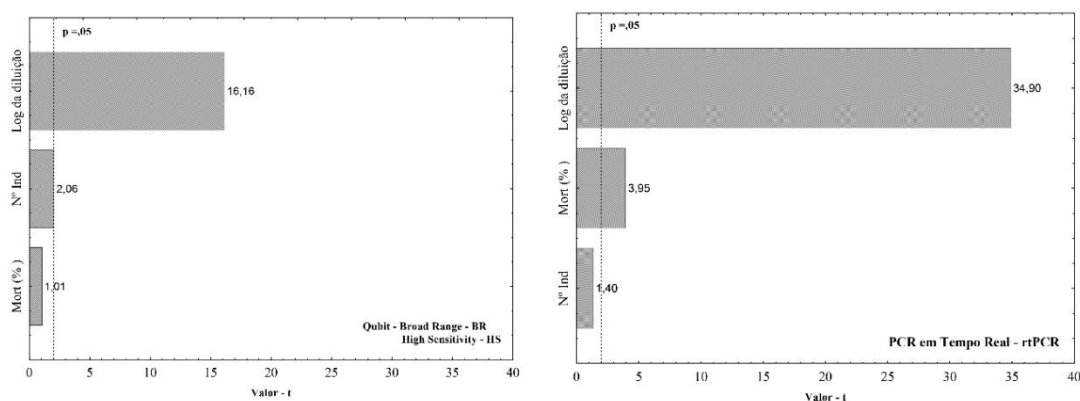


Figura 6. Relação entre o log da concentração de DNA (ng/uL/g) e o *cycle threshold* (Ct) da reação obtida a partir da análise de rtPCR.

Através de análise de regressão múltipla, observou-se que a diluição foi o fator determinante das concentrações de eDNA quantificadas nas amostras analisadas pelos dois métodos. A mortalidade de mexilhões registrada durante a fase experimental efetivamente contribuiu (mas, apenas de forma marginal) nos resultados da rtPCR. Já o número de indivíduos utilizados em cada repetição não apresentou relação com os resultados obtidos. Nas análises realizadas pelo Qubit®, apenas a diluição foi o fator determinante das concentrações de DNA quantificadas nas amostras (Figura 7).



Qubit	Parâm.	EP	t	p	-95,00%	95,00%	(β)	EP (β)	-95,00%	95,00%
Intercep.	-1,131	0,934	-1,211	0,233	-3,019	0,757	-	-	-	-
Log diluição	0,990	0,061	16,164	0	0,866	1,114	0,951	0,059	0,832	1,070
Mort (%)	0,008	0,007	1,065	0,293	-0,007	0,023	0,075	0,070	-0,067	0,218
N° ind	0,159	0,077	2,060	0,046	0,003	0,314	0,146	0,071	0,003	0,290
rtPCR	Parâm.	EP	t	p	-95,00%	95,00%	(β)	EP (β)	-95,00%	95,00%
Intercep.	-0,708	0,479	-1,474	0,142	-1,655	0,240	-	-	-	-
Log diluição	0,99	0,028	34,89	0	0,934	1,047	0,929	0,027	0,877	0,982
Mort (%)	0,017	0,004	3,951	0	0,008	0,025	0,127	0,032	0,064	0,191
N° ind	-0,052	0,038	-1,364	0,175	-0,128	0,023	-0,044	0,032	-0,108	0,020

Figura 7. Resultado das análises de regressão múltipla comparando os efeitos de três fatores (diluição das amostras, taxa de mortalidade e número de indivíduos utilizados em cada tratamento) sobre as concentrações de DNA ambiental de *Limnoperna fortunei*.

1.10 DISCUSSÃO

Algumas características relacionadas aos métodos analíticos aqui empregados já são bem conhecidas na literatura. Tanto o rtPCR quanto o fluorômetro Qubit® são considerados métodos adequados para a quantificação de DNA ambiental. Porém, enquanto a rtPCR é suficientemente robusta para detectar uma única cópia de DNA em uma dada amostra (Arya *et al.*, 2005), o Qubit® apresenta menor sensibilidade (Li *et al.*, 2015), o que pode dificultar a detecção de DNA em amostras ambientais que apresentem concentrações extremamente baixas de material genético. Além disso, as análises realizadas através do Qubit® permitem apenas a quantificação do DNA total presente em uma amostra, sem possibilitar a medição da qualidade desse DNA ou a quantificação seletiva do material genético de acordo com a(s) espécie(s)-alvo. Usualmente, as razões para se utilizar os métodos fluorométricos associados ao

Qubit® estão relacionadas à facilidade de uso, a rapidez na obtenção de resultados e a possibilidade, de acordo com o fabricante, de detecção de concentrações tão baixas de DNA quanto 10 pg. Por isso, era importante avaliar a viabilidade do uso desse método em estudos de monitoramento ambiental de *L. fortunei*. Os resultados obtidos, entretanto, não recomendam o método.

No presente caso, ficou também evidenciada a maior sensibilidade e os menores limites de detecção alcançados a partir do uso da rtPCR, embora tenha havido uma tendência de dispersão dos valores quantificados nas maiores diluições. Os resultados obtidos indicam o potencial do método em estudos utilizando DNA ambiental, mas também apontam a necessidade de se avançar na compreensão e no domínio de fatores que podem afetar os resultados.

Fatores como o metabolismo, a taxa de liberação de DNA de cada indivíduo, a taxa de degradação do DNA durante o experimento e a forma com que cada método é aplicado podem, ao menos em teoria, afetar os resultados de um experimento como o aqui realizado (Barnes *et al.*, 2014; Strickler *et al.*, 2015). Há também fatores analíticos que ainda precisam ser melhor compreendidos. De acordo com Lacoursière-Roussel *et al.* (2016), as características dos filtros utilizados no processamento das amostras de água contendo DNA ambiental pode afetar os resultados, visto que o tamanho das partículas de DNA liberadas varia mesmo entre indivíduos de uma mesma espécie. Para Turner *et al.* (2014), a utilização de filtros de matriz de tamanho regular de poro leva à retenção apenas daquelas partículas maiores que o tamanho do poro, permitindo a passagem das partículas menores do DNA. Já Deiner *et al.* (2018) relataram a falta de uniformidade e espessura da matriz do poro dos filtros de alguns tipos de materiais, fazendo com que a retenção das partículas não seja realizada uniformemente. De Lambert *et al.* (2005), utilizando sondas oligonucleotídicas, constataram que as mesmas são facilmente aderidas covalentemente à superfícies sólidas, como por exemplo, a superfície de vidros. Essa observação foi corroborada por Filho *et al.* (1997), os autores testaram a adesão de moléculas de DNA em substrato de mica e de vidro e concluíram que o vidro retinha partículas de DNA de maior tamanho que a mica. Nakayama *et al.* (2016), avaliaram diferentes métodos de quantificação e constataram que concentrações abaixo de um valor específico induzem a mudanças estruturais

no dsDNA (DNA de fita dupla), resultando em uma segunda estrutura estável com baixa afinidade pelo corante fluorescente.

Os resultados aqui obtidos apontam que a sensibilidade do método rtPCR avaliada nesse experimento em laboratório foi maior que a estimada em estudo desenvolvido a campo por Xia, Johansson, *et al.* (2018). Em seu estudo, os autores compararam o limite de detecção a partir de uma biomassa de 12 indivíduos de *L. fortunei* utilizando métodos de rtPCR e PCR convencional (cPCR). Os autores obtiveram seu limite de detecção em condições laboratoriais em um log da concentração -3,3, em um Ct de 31,5. Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisa publicou resultados de detecção do mexilhão-dourado em uma diluição de 10^{-5} , a partir de um extrato com concentração inicial de 40,0 ng/ μ L (Xia, Zhan, *et al.*, 2018). No presente estudo, o log mínimo da concentração quantificado foi de -5 ($9,67^{-6}$ ng/ μ L/g), em um Ct de 35. Ressalta-se, porém, que a alta sensibilidade aqui alcançada em laboratório possa ser reduzida quando a técnica vier a ser aplicada em campo. Isso porque a sensibilidade das técnicas de DNA ambiental pode sofrer interferência de fatores como sazonalidade, exposição do DNA a raios UV, pH, temperatura, tipo de substrato, transporte a jusante (Jane *et al.*, 2015; Strickler *et al.*, 2015; Buxton *et al.*, 2017). Além disso, a presença de impurezas e interferentes nas amostras pode inibir a amplificação e resultar em menor eficiência do método (Pedersen *et al.*, 2015).

No presente caso, ao contrário do que supúnhamos pudesse ter ocorrido, a mortalidade dos indivíduos durante o experimento não apresentou influência expressiva sobre as concentrações finais de DNA quantificadas. Em um experimento realizado por Tillotson *et al.* (2018), utilizando uma espécie de salmão, os autores observaram que a concentração de DNA aumentava significativamente à medida que a mortalidade dos organismos acontecia, sendo que a cada indivíduo morto o número de cópias de DNA liberada na água aumentava entre $0.31 (\pm 1,18) \times 10^3$ cópias. Por outro lado, de acordo com Thomsen *et al.* (2012) e Goldberg *et al.* (2016), a concentração de eDNA começa a decair de forma imediata assim que liberado no ambiente, sendo que a atividade microbiana (nucleases), oriunda da mortalidade dos organismos constitui um dos fatores que levam a uma rápida degradação do eDNA. A

combinação entre o desenho experimental adotado (duração de apenas 24 h), o tamanho reduzido dos indivíduos e a indeterminação do momento em que as mortes aconteceram, podem ter influenciado nos resultados obtidos.

Com todas limitações e incertezas ainda típicas de uma metodologia que se encontra na fronteira do conhecimento científico, os resultados aqui obtidos são especialmente importantes e dignos de nota por duas razões principais: 1) atualmente não existe nenhum método convencional minimamente eficiente, rápido e funcional para quantificação de populações de *L. fortunei*. O método aqui empregado, possibilitou a obtenção de resultados robustos de quantificação das concentrações de DNA, com suficiente grau de predição para o fim a que se destina. 2) Pela elevada sensibilidade do método analítico (rtPCR) empregado. Como utilizamos, em média, 10,9 mexilhões para atingirmos 10 g de biomassa viva (0,92 g/mexilhão) e como a análise por rtPCR possibilitou a identificação e quantificação de DNA liberado pelos animais em uma diluição da ordem de 10^6 em relação ao tratamento inicial, o método testado foi robusto o suficiente para detectar o DNA liberado em 24 h pelo equivalente a um indivíduo de *L. fortunei* em um volume de 920.000 L de água, algo imaginável de ser alcançado por qualquer outro método conhecido.

1.11 REFERÊNCIAS

Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR. 2005. Basic principles of real-time quantitative PCR. Expert review of molecular diagnostics 5:209-219.

Barbosa NP, Silva FA, de Oliveira MD, dos Santos Neto MA, de Carvalho MD, Cardoso AV. 2016. *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857)(Mollusca, Bivalvia, Mytilidae): first record in the São Francisco River basin, Brazil. Embrapa Pantanal-Artigo em periódico indexado (ALICE).

Barnes MA, Turner CR, Jerde CL, Renshaw MA, Chadderton WL, Lodge DM. 2014. Environmental conditions influence eDNA persistence in aquatic systems. Environ. Sci. Technol 48:1819-1827.

Belz CE. 2006. Análise de risco de bioinvasão por *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857): um modelo para a bacia do rio Iguaçu, Paraná.

Boltovskoy D. 2015. *Limnoperna fortunei*: the ecology, distribution and control of a swiftly spreading invasive fouling mussel: Springer.

Burlakova LE, Tulumello BL, Karatayev AY, Krebs RA, Schloesser DW, Paterson WL, Griffith TA, Scott MW, Crail T, Zanatta DT. 2014. Competitive replacement of invasive congeners may relax impact on native species: interactions among zebra, quagga, and native unionid mussels. *PLoS One* 9:e114926.

Buxton AS, Groombridge JJ, Zakaria NB, Griffiths RA. 2017. Seasonal variation in environmental DNA in relation to population size and environmental factors. *Scientific reports* 7:1-9.

Callil CT. 2003. Base de dados direcionada à elaboração de um programa de monitoramento de águas continentais utilizando moluscos bivalves.

Cataldo D. 2015. Trophic relationships of *Limnoperna fortunei* with adult fishes. In. *Limnoperna Fortunei*: Springer. p. 231-248.

Clavero M, García-Berthou E. 2005. Invasive species are a leading cause of animal extinctions. *Trends in ecology & evolution* 20:110.

Darrigran G. 2002. Potential impact of filter-feeding invaders on temperate inland freshwater environments. *Biological Invasions* 4:145-156.

Darrigran G, Damborenea C. 2011. Ecosystem engineering impact of *Limnoperna fortunei* in South America. *Zoological science* 28:1-8.

Darrigran G, Damborenea C. 2005. A South American bioinvasion case history: *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857), the golden mussel. *American Malacological Bulletin* 20:105.

Darrigran GA, Maroñas ME, Colautti DC. 2004. Air exposure as a control mechanism for the golden mussel, *Limnoperna fortunei*, (Bivalvia: Mytilidae). *Journal of Freshwater Ecology* 19:461-464.

de Castro ALP. 2018. Estudo da abrasividade da concha de (*Limnoperna fortunei*) com enfoque no labirinto superior em turbina hidráulicas.

de Lambert B, Chaix C, Charreyrex M-T, Laurent A, Aigoui A, Perrin-Rubens A, Pichot C. 2005. Polymer- Oligonucleotide Conjugate Synthesis from an Amphiphilic Block Copolymer. Applications to DNA Detection on Microarray. *Bioconjugate chemistry* 16:265-274.

Deiner K, Lopez J, Bourne S, Holman L, Seymour M, Grey EK, Lacoursière A, Li Y, Renshaw MA, Pfrender ME. 2018. Optimising the detection of marine taxonomic richness using environmental DNA metabarcoding: the effects of filter material, pore size and extraction method. *Metabarcoding and Metagenomics* 2:e28963.

Díaz-Ferguson E, Herod J, Galvez J, Moyer G. 2014. Development of molecular markers for eDNA detection of the invasive African jewelfish (*Hemichromis letourneuxi*): a new tool for monitoring aquatic invasive species in National Wildlife Refuges. *Management of Biological Invasions* 5:121-131.

Espinola LA, Júlio J. 2007. Invader species: concepts, models and attributes. *Interciencia* 32:580-585.

Fernandes FdC, Mansur MCD, Pereira D, de Godoy Fernandes LV, Campos SC, Danelon OM. 2012. Abordagem conceitual dos moluscos invasores nos ecossistemas límnicos brasileiros.

Filho BR, Osiro D, Colnago LA. 1997. Preparação de amostras de DNA em vidro e mica para realização de microscopia de força atômica. São Carlos: EMBRAPA-CNPDIA.

Goldberg CS, Turner CR, Deiner K, Klymus KE, Thomsen PF, Murphy MA, Spear SF, McKee A, Olyer-McCance SJ, Cornman RS. 2016. Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods in Ecology and Evolution* 7:1299-1307.

Grohmann PA. 2008. BIOINCRUSTATION CAUSED BY A HYDROID SPECIES IN THE TURBINE COOLING SYSTEM AT THE FUNIL HYDROELECTRIC POWER PLANT, ITATIAIA. *Naturalia, Rio Claro* 31:16-21.

Iacarella JC, Dick JT, Alexander ME, Ricciardi A. 2015. Ecological impacts of invasive alien species along temperature gradients: testing the role of environmental matching. *Ecological Applications* 25:706-716.

Jane SF, Wilcox TM, McKelvey KS, Young MK, Schwartz MK, Lowe WH, Letcher BH, Whiteley AR. 2015. Distance, flow and PCR inhibition: e DNA dynamics in two headwater streams. *Molecular Ecology Resources* 15:216-227.

Karatayev AY, Burlakova LE, Padilla DK. 2015. Zebra versus quagga mussels: a review of their spread, population dynamics, and ecosystem impacts. *Hydrobiologia* 746:97-112.

Lacoursière-Roussel A, Rosabal M, Bernatchez L. 2016. Estimating fish abundance and biomass from eDNA concentrations: variability among capture methods and environmental conditions. *Molecular ecology resources* 16:1401-1414.

Latini A, Resende D, Pombo V, Coradin L. 2016. Espécies exóticas invasoras de águas continentais no Brasil. Brasília: MMA.

Li S, Xia Z, Chen Y, Gao Y, Zhan A. 2018. Byssus structure and protein composition in the highly invasive fouling mussel *Limnoperna fortunei*. *Frontiers in Physiology* 9:418.

Li X, Ben-Dov IZ, Mauro M, Williams Z. 2015. Lowering the quantification limit of the Qubit™ RNA HS Assay using RNA spike-in. *BMC molecular biology* 16:9.

Mansur M, Santos C, Pereira D, Bergonci P, Callil C. 2016. Moluscos límnicos-Bivalves. Espécies exóticas invasoras de águas continentais no Brasil. Brasília: Ministério do Meio Ambiente:127-175.

Mansur M, Santos C, Pereira D, Paz IP, Zurita ML, Rodriguez MR, Nehrke M, Bergonci PA. 2012. Moluscos límnicos invasores no Brasil: biologia, prevenção e controle. Porto Alegre: Redes Editora.

McGeoch MA, Butchart SH, Spear D, Marais E, Kleynhans EJ, Symes A, Chanson J, Hoffmann M. 2010. Global indicators of biological invasion: species numbers, biodiversity impact and policy responses. *Diversity and Distributions* 16:95-108.

Mehta SV, Haight RG, Homans FR, Polasky S, Venette RC. 2007. Optimal detection and control strategies for invasive species management. *Ecological Economics* 61:237-245.

Monteiro de Rezende Ayroza DM, Carmo CFd, Monteiro Camargo AF, Oliveira MDd, Petesse ML. 2019. Net cages enhance golden mussel (*Limnoperna fortunei*) larval density and condition factor. *Freshwater Biology*:1593-1602.

Morton B. 2015. The biology and anatomy of *Limnoperna fortunei*, a significant freshwater bioinvader: blueprints for success. In. *Limnoperna Fortunei*: Springer. p. 3-41.

Nakano D, Strayer DL. 2014. Biofouling animals in fresh water: biology, impacts, and ecosystem engineering. *Frontiers in Ecology and the Environment* 12:167-175.

Nakayama Y, Yamaguchi H, Einaga N, Esumi M. 2016. Pitfalls of DNA quantification using DNA-binding fluorescent dyes and suggested solutions. *PLoS One* 11:e0150528.

Pastorino G, Darrigran GA, Lunaschi L, Martín SM. 1993. *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857)(Mytilidae), nuevo bivalvo invasor en aguas del Río de la Plata. In.

Pedersen MW, Overballe-Petersen S, Ermini L, Sarkissian CD, Haile J, Hellstrom M, Spens J, Thomsen PF, Bohmann K, Cappellini E. 2015. Ancient and modern environmental DNA. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 370:20130383.

Pessotto M, Nogueira M. 2018. More than two decades after the introduction of *Limnoperna fortunei* (Dunker 1857) in La Plata Basin. *Brazilian Journal of Biology* 78:773-784.

Pie MR, Stroher PR, Agostinis AO, Belmonte-Lopes R, Tadra-Sfeir MZ, Ostrensky A. 2017. Development of a real-time PCR assay for the detection of the golden mussel (*Limnoperna fortunei*, Mytilidae) in environmental samples. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 89:1041-1045.

Pombo V. 2016. Invasoras de Águas Continentais no Brasil.

Pucherelli SF, Claudi R, Prescott T. 2018. Control of biofouling in hydropower cooling systems using HOD ultraviolet light. *Management of Biological Invasions* 9:451-461.

Rees HC, Maddison BC, Middleditch DJ, Patmore JR, Gough KC. 2014. The detection of aquatic animal species using environmental DNA—a review of eDNA as a survey tool in ecology. *Journal of Applied Ecology* 51:1450-1459.

Santos S, Thiengo S, Fernandez MA, Miyahira I, Gonçalves IB, Ximenes RdF, Mansur M, Pereira D. 2012. Espécies de moluscos límnicos invasores no Brasil. *Moluscos límnicos invasores no Brasil: biologia, prevenção e controle*. Redes Editora, Porto Alegre:25-50.

Silva EC, Barros F. 2011. MACROFAUNA BENTÔNICA INTRODUZIDA DO BRASIL: LISTA DE ESPÉCIES MARINHAS E DULCICOLAS E DISTRIBUIÇÃO ATUAL. *Oecologia Australis* 15:326-344.

Simberloff D, Von Holle B. 1999. Positive interactions of nonindigenous species: invasional meltdown? *Biological Invasions* 1:21-32.

Simpson A, Jarnevich C, Madsen J, Westbrooks R, Fournier C, Mehrhoff L, Browne M, Graham J, Sellers E. 2009. Invasive species information networks: collaboration at multiple scales for prevention, early detection, and rapid response to invasive alien species. *Biodiversity* 10:5-13.

Strickler KM, Fremier AK, Goldberg CS. 2015. Quantifying effects of UV-B, temperature, and pH on eDNA degradation in aquatic microcosms. *Biological Conservation* 183:85-92.

Taberlet P, Coissac E, Pompanon F, Brochmann C, Willerslev E. 2012. Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Molecular ecology* 21:2045-2050.

Thomsen PF, Kielgast J, Iversen LL, Wiuf C, Rasmussen M, Gilbert MTP, Orlando L, Willerslev E. 2012. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular ecology* 21:2565-2573.

Thomsen PF, Willerslev E. 2015. Environmental DNA—An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation* 183:4-18.

Tillotson MD, Kelly RP, Duda JJ, Hoy M, Kralj J, Quinn TP. 2018. Concentrations of environmental DNA (eDNA) reflect spawning salmon abundance at fine spatial and temporal scales. *Biological Conservation* 220:1-11.

Turner CR, Miller DJ, Coyne KJ, Corush J. 2014. Improved methods for capture, extraction, and quantitative assay of environmental DNA from Asian bigheaded carp (*Hypophthalmichthys* spp.). *PLoS One* 9:e114329.

Vitousek PM, Loope LL, Westbrooks R. 2017. Biological invasions as global environmental change.

Xia Z, Johansson ML, Gao Y, Zhang L, Haffner GD, Maclsaac HJ, Zhan A. 2018. Conventional versus real-time quantitative PCR for rare species detection. *Ecology and Evolution* 8:11799-11807.

Xia Z, Zhan A, Gao Y, Zhang L, Haffner GD, Maclsaac HJ. 2018. Early detection of a highly invasive bivalve based on environmental DNA (eDNA). *Biological invasions* 20:437-447.

Xu Z, Huan Y, Zhang Y, Liu Z. 2015. Anesthetic management of a parturient with mirror syndrome: a case report. *International journal of clinical and experimental medicine* 8:14161.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho identificou e caracterizou as principais espécies aquáticas invasoras incrustantes que afetam o funcionamento de UHE. As espécies identificadas nesse estudo demonstraram o potencial que cada uma tem em se incrustarem em diferentes estruturas das UHE's. Embora, mesmo sendo identificadas na literatura oito espécies, *L. fortunei* e *D. polymorpha* são as que apresentaram um maior impacto a esse setor.

Além disso, a partir de ensaios laboratoriais, foi possível avaliar o limite de sensibilidade de dois métodos fluorométricos de quantificação da biomassa de *L. fortunei* a partir de eDNA. Observou-se que a análise por rtPCR possibilitou a identificação e quantificação de DNA liberado pelos animais em uma diluição da ordem de 10^6 em relação ao tratamento inicial, o método testado suficiente para detectar o DNA liberado em 24 h pelo equivalente a um indivíduo de *L. fortunei* em um volume de 920.000 L de água.

REFERÊNCIAS

ACKERMAN, J. D. et al. A review of the early life history of zebra mussels (*Dreissena polymorpha*): comparisons with marine bivalves. **Canadian Journal of Zoology**, v. 72, n. 7, p. 1169-1179, 1994. ISSN 0008-4301.

AKSU, S.; YILDIZ, D.; GÜNGÖR, A. P. How Zebra mussels threaten to water supply security and effects of preventive measures in Turkey. **World Scientific News**, v. 64, p. 99-126, 2017. ISSN 2392-2192.

ALDRIDGE, D. C.; ELLIOTT, P.; MOGGRIDGE, G. D. The recent and rapid spread of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) in Great Britain. **Biological Conservation**, v. 119, n. 2, p. 253-261, 2004. ISSN 0006-3207.

ALDRIDGE, D. W.; MCMAHON, R. F. Growth, fecundity, and bioenergetics in a natural population of the Asiatic freshwater clam, *Corbicula manilensis* Philippi, from North Central Texas. **Journal of Molluscan Studies**, v. 44, p. 49-70, 1978.

ANDREWARTHA, J. et al. Drag force and surface roughness measurements on freshwater biofouled surfaces. **Biofouling**, v. 26, n. 4, p. 487-496, 2010. ISSN 0892-7014.

ANDREWARTHA, J.; SARGISON, J.; PERKINS, K. The effect of gomphonema and filamentous algae streamers on hydroelectric canal capacity and turbulent boundary layer structure. Australasian Fluid Mechanics Conference, 2007, Citeseer. p.241-246.

ANTONY, A. et al. Scale formation and control in high pressure membrane water treatment systems: a review. **Journal of membrane science**, v. 383, n. 1-2, p. 1-16, 2011. ISSN 0376-7388.

APROSI, G. Bryozoans in the cooling water circuits of a power plant: With 4 figures in the text. **Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie: Verhandlungen**, v. 23, n. 3, p. 1542-1547, 1988. ISSN 0368-0770.

ARDURA, A. et al. Environmental DNA evidence of transfer of North Sea molluscs across tropical waters through ballast water. **Journal of Molluscan Studies**, v. 81, n. 4, p. 495-501, 2015. ISSN 0260-1230.

ARMERO, R. A.; HALCÓN, R. M. Á. El mejillón cebra en el Ebro: un grave caso de riesgo ambiental en Aragón. **Naturaleza aragonesa: revista de la Sociedad**

de Amigos del Museo Paleontológico de la Universidad de Zaragoza, n. 8, p. 39-46, 2001. ISSN 1138-8013.

ARYA, M. et al. Basic principles of real-time quantitative PCR. **Expert review of molecular diagnostics**, v. 5, n. 2, p. 209-219, 2005. ISSN 1473-7159.

AVELAR, W. Moluscos Bivalves. **Biodiversidade do Estado de São Paulo**, v. 4, p. 65-68, 1999.

AVELAR, W.; MARTIM, S.; VIANNA, M. A new occurrence of *Limnoperna fortunei* (Dunker 1856)(*Bivalvia*, *Mytilidae*) in the state of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 64, n. 4, p. 739-742, 2004. ISSN 1519-6984.

BARBOSA, N. P. et al. *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857)(*Mollusca*, *Bivalvia*, *Mytilidae*): first record in the São Francisco River basin, Brazil. **Embrapa Pantanal-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2016.

BARNES, M. A. et al. Environmental conditions influence eDNA persistence in aquatic systems. **Environ. Sci. Technol**, v. 48, n. 3, p. 1819-1827, 2014.

BEASLEY, C. R.; TAGLIARO, C. H.; FIGUEIREDO, W. B. The occurrence of the Asian Clam *Corbicula fluminea* in the lowe amazon basin. **Acta Amazonica**, v. 33, n. 2, p. 317-324, 2003. ISSN 0044-5967.

BEHERA, B. K.; VARMA, A. Energy Security. In: (Ed.). **Bioenergy for Sustainability and Security**: Springer, 2019. p.1-77.

BELZ, C. E. Análise de risco de bioinvasão por *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857): um modelo para a bacia do rio Iguaçu, Paraná. 2006.

BENSON, A. et al. ***Dreissena rostriformis bugensis* (Andrusov, 1897): US Geological Survey, Nonindigenous Aquatic Species Database.[updated 2018 May 2; cited 2018 July 6]** 2018.

BINIMELIS, R.; MONTERROSO, I.; RODRÍGUEZ-LABAJOS, B. A social analysis of the bioinvasions of *Dreissena polymorpha* in Spain and *Hydrilla verticillata* in Guatemala. **Environmental Management**, v. 40, n. 4, p. 555-566, 2007. ISSN 0364-152X.

BLANCO, S.; ECTOR, L. Distribution, ecology and nuisance effects of the freshwater invasive diatom *Didymosphenia geminata* (Lyngbye) M. Schmidt: a

literature review. **Nova Hedwigia**, v. 88, n. 3-4, p. 347-422, 2009. ISSN 0029-5035.

BÓDIS, E.; TÓTH, B.; SOUSA, R. Impact of *Dreissena* fouling on the physiological condition of native and invasive bivalves: interspecific and temporal variations. **Biological Invasions**, v. 16, n. 7, p. 1373-1386, 2014. ISSN 1387-3547.

BOHMANN, K. et al. Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. **Trends in ecology & evolution**, v. 29, n. 6, p. 358-367, 2014. ISSN 0169-5347.

BOLTOVSKOY, D. **Limnoperna fortunei: the ecology, distribution and control of a swiftly spreading invasive fouling mussel**. Springer, 2015. ISBN 3319134949.

BOLTOVSKOY, D. et al. Dispersion and ecological impact of the invasive freshwater bivalve *Limnoperna fortunei* in the Río de la Plata watershed and beyond. **Biological Invasions**, v. 8, n. 4, p. 947-963, 2006. ISSN 1387-3547.

BOLTOVSKOY, D. et al. Environmental modulation of reproductive activity of the invasive mussel *Limnoperna fortunei*: implications for antifouling strategies. **Austral Ecology**, v. 34, n. 7, p. 719-730, 2009. ISSN 1442-9985.

BORGES, P. D. Aspectos do ciclo de vida da espécie invasora *Cordylophora caspia* (Cnidaria) no reservatório da Usina Hidrelétrica Governador José Richa, Rio Iguaçu, Paraná. 2013.

BOTHWELL, M. et al. Blooms of *Didymosphenia geminata* in rivers on Vancouver Island 1990 to present: a new invasive species. *Journal of Phycology*, 2009, WILEY-BLACKWELL PUBLISHING, INC COMMERCE PLACE, 350 MAIN ST, MALDEN 02148 p.33-33.

BOTHWELL, M. L.; TAYLOR, B. W.; KILROY, C. The Didymo story: the role of low dissolved phosphorus in the formation of *Didymosphenia geminata* blooms. **Diatom Research**, v. 29, n. 3, p. 229-236, 2014. ISSN 0269-249X.

BURLAKOVA, L. E. et al. Competitive replacement of invasive congeners may relax impact on native species: interactions among zebra, quagga, and native unionid mussels. **PLoS One**, v. 9, n. 12, p. e114926, 2014. ISSN 1932-6203.

BUSHNELL, J. H. Environmental relations of Michigan Ectoprocta, and dynamics of natural populations of *Plumatella repens*. **Ecological Monographs**, v. 36, n. 2, p. 95-123, 1966. ISSN 1557-7015.

BUXTON, A. S. et al. Seasonal variation in environmental DNA in relation to population size and environmental factors. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2017. ISSN 2045-2322.

BYETTE, F.; MARCOTTE, I.; PELLERIN, C. Covalently crosslinked mussel byssus protein-based materials with tunable properties. **Peptide Science**, v. 111, n. 1, p. e24053, 2019. ISSN 2475-8817.

CALLIL, C.; MANSUR, M. D. central South America and biometrical data. **Amazoniana**, v. 17, n. 1/2, p. 153-167, 2002.

CALLIL, C. T. Base de dados direcionada à elaboração de um programa de monitoramento de águas continentais utilizando moluscos bivalves. 2003.

CALLOW, M. E. A review of fouling in freshwaters. **Biofouling**, v. 7, n. 4, p. 313-327, 1993. ISSN 0892-7014.

CASTRO, A. L. P. Estudo da abrasividade da concha de (*Limnoperna fortunei*) com enfoque no labirinto superior em turbina hidráulicas. 2018.

CATALDO, D. Trophic relationships of *Limnoperna fortunei* with adult fishes. In: (Ed.). **Limnoperna Fortunei**: Springer, 2015. p.231-248.

CATALDO, D.; BOLTOVSKOY, D.; POSE, M. Toxicity of chlorine and three nonoxidizing molluscicides to the pest mussel *Limnoperna fortunei*. **Journal-American Water Works Association**, v. 95, n. 1, p. 66-78, 2003. ISSN 0003-150X.

CATALDO, D. H.; BOLTOVSKOY, D. Yearly reproductive activity of *Limnoperna fortunei* (Bivalvia) as inferred from the occurrence of its larvae in the plankton of the lower Paraná river and the Río de la Plata estuary (Argentina). **Aquatic Ecology**, v. 34, n. 3, p. 307-317, 2000. ISSN 1386-2588.

CHIESA, F. **Resfriadores Compactos: Uma Proposta de Solução para Trocadores de Calor Ar Solução para Trocadores de Calor Ar-Água**. 2002. Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba

CLAUDI, R.; MACKIE, G. L. **Practical Manual for the Monitoring and Control of Macrofouling Mollusks in Fresh Water Sys.** CRC Press, 1993. ISBN 0873719859.

CLAVERO, M.; GARCÍA-BERTHOU, E. Invasive species are a leading cause of animal extinctions. **Trends in ecology & evolution**, v. 20, n. 3, p. 110, 2005. ISSN 0169-5347.

CLEVE, P. T. **Synopsis of the naviculoid diatoms.** PA Norstedt & söner, 1894.

COHEN, A. N. Literature review of the exotic mussels *Dreissena polymorpha*, *Dreissena bugensis*, *Limnoperna fortunei* and *Mytilopsis leucophaeata*. **San Francisco Estuary Institute Oakland, Richmond, CA**, 2008.

CONDE, A. et al. First record of *Cordylophora caspia* (Hydrozoa: Cnidaria) in the Tagus estuary, central Portugal. **Marine Biodiversity Records**, v. 6, 2013. ISSN 1755-2672.

DA GAMA, B. A.; RENATO, C. **BIOINCRUSTAÇÃO MA.** 2009.

DARRIGRAN, G.; DE DRAGO, I. E. Invasion of the exotic freshwater mussel *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857)(Bivalvia: Mytilidae) in South America. **The Nautilus**, v. 114, p. 69-73, 2000.

DARRIGRAN, G. Potential impact of filter-feeding invaders on temperate inland freshwater environments. **Biological invasions**, v. 4, n. 1-2, p. 145-156, 2002. ISSN 1387-3547.

DARRIGRAN, G.; DAMBORENEA, C. A South American bioinvasion case history: *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857), the golden mussel. **American Malacological Bulletin**, v. 20, n. 1/2, p. 105, 2005. ISSN 0740-2783.

DARRIGRAN, G.; DAMBORENEA, C. Introdução a biologia das invasões o Mexilhão Dourado na América do Sul: biologia, dispersão, impacto, prevenção e controlo. **CUBO Editora, São Carlos**, 2009.

DARRIGRAN, G.; DAMBORENEA, C. Ecosystem engineering impact of *Limnoperna fortunei* in South America. **Zoological science**, v. 28, n. 1, p. 1-8, 2011. ISSN 0289-0003.

DARRIGRAN, G.; DE DRAGO, I. E.; INVERTEBRADOS, D. C. Z. PLATA. REGION NEOTROPICAL. **Medio Ambiente**, v. 13, n. 2, p. 75-79, 2000.

DARRIGRAN, G. et al. Macroinvertebrates associated with *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857)(Bivalvia, Mytilidae) in Río de la Plata, Argentina. **Hydrobiologia**, v. 367, n. 1-3, p. 223-230, 1998. ISSN 0018-8158.

DARRIGRAN, G.; PASTORINO, G. The recent introduction of a freshwater Asiatic bivalve, *Limnoperna fortunei* (Mytilidae) into South America. **Veliger**, v. 38, n. 2, p. 171-175, 1995. ISSN 0042-3211.

DARRIGRAN, G. A.; MAROÑAS, M. E.; COLAUTTI, D. C. Air exposure as a control mechanism for the golden mussel, *Limnoperna fortunei*,(Bivalvia: Mytilidae). **Journal of Freshwater Ecology**, v. 19, n. 3, p. 461-464, 2004. ISSN 0270-5060.

DE LAMBERT, B. et al. Polymer– Oligonucleotide Conjugate Synthesis from an Amphiphilic Block Copolymer. Applications to DNA Detection on Microarray. **Bioconjugate chemistry**, v. 16, n. 2, p. 265-274, 2005. ISSN 1043-1802.

DEINER, K. et al. Optimising the detection of marine taxonomic richness using environmental DNA metabarcoding: the effects of filter material, pore size and extraction method. **Metabarcoding and Metagenomics**, v. 2, p. e28963, 2018. ISSN 2534-9708.

DÍAZ-FERGUSON, E. et al. Development of molecular markers for eDNA detection of the invasive African jewelfish (*Hemichromis letourneuxi*): a new tool for monitoring aquatic invasive species in National Wildlife Refuges. **Management of Biological Invasions**, v. 5, n. 2, p. 121-131, 2014. ISSN 1989-8649.

DUARTE, M. S. C. Efeito de superfícies na aderência de *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857). 2012.

ESPINOLA, L. A.; JÚLIO, J. Invader species: concepts, models and attributes. **Interciencia**, v. 32, n. 9, p. 580-585, 2007. ISSN 0378-1844.

EVERITT, B. Fresh-water Ectoprocta: distribution and ecology of five species in southeastern Louisiana. **Transactions of the American Microscopical Society**, p. 130-134, 1975. ISSN 0003-0023.

FELIX, É. P. **Avaliação de técnicas de controle da incrustação por mexilhão-dourado em hidrogeradores visando minimização da indisponibilidade**. 2011. Universidade de São Paulo

FERNANDES, F. D. C. et al. Abordagem conceitual dos moluscos invasores nos ecossistemas límnicos brasileiros. 2012.

FILHO, B. R.; OSIRO, D.; COLNAGO, L. A. Preparação de amostras de DNA em vidro e mica para realização de microscopia de força atômica. **São Carlos: EMBRAPA-CNPDIA**, 1997.

FOLINO-ROREM, N. C. Phylum Cnidaria. In: (Ed.). **Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates**: Elsevier, 2015. p.159-179.

FOLINO-ROREM, N. C.; INDELICATO, J. Controlling biofouling caused by the colonial hydroid *Cordylophora caspia*. **Water Research**, v. 39, n. 12, p. 2731-2737, 2005. ISSN 0043-1354.

FOLINO, G.; PIZZUTI, C.; SPEZZANO, G. Genetic programming and simulated annealing: A hybrid method to evolve decision trees. European Conference on Genetic Programming, 2000, Springer. p.294-303.

GOLDBERG, C. S. et al. Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. **Methods in ecology and evolution**, v. 7, n. 11, p. 1299-1307, 2016. ISSN 2041-210X.

GRANEY, R. et al. THE INFLUENCE OF THERMAL DISCHARGES AND SUBSTRATE COMPOSITION ON THE POPULATION-STRUCTURE AND DISTRIBUTION OF THE ASIATIC CLAM, *CORBICULA-FLUMINEA*, IN THE NEW RIVER, VIRGINIA. **Nautilus**, v. 94, n. 4, p. 130-135, 1980. ISSN 0028-1344.

GROHMANN, P. A. Bioincrustation caused by a hydroid species in the turbine cooling system at the Funil Hydroelectric Power Plant, Itatiaia. **Naturalia, Rio Claro**, v. 31, p. 16-21, 2008.

GROHMANN, P. A.; BRUM, P. R. *Cordylophora caspia* (HYDROZOA, ANTHOMEDUSAE, CLAVIDAE) em corpos d'água doce no Brasil: um caso de bioincrustação no sistema de resfriamento das turbinas da usina de funil, Itatiaia, RJ. **XII congresso latino-americano de ciências do mar - XII colacmar**, 2007.

GUTIERRE, S. M. M. pH tolerance of the biofouling invasive hydrozoan *Cordylophora caspia*. **Hydrobiologia**, v. 679, n. 1, p. 91-95, 2012. ISSN 0018-8158.

HADDAD, M.; NAKATANI, K. Primeiro registro de *Cordylophora caspia* (Pallas, 1771)(Cnidaria, Hydroida) em águas continentais brasileiras. Resumos XXI Congresso Brasileiro de Zoologia, SBZ, 1996. p.5-9.

HARRINGTON, R. A.; EWEL, J. J. Invasibility of tree plantations by native and non-indigenous plant species in Hawaii. **Forest Ecology and Management**, v. 99, n. 1-2, p. 153-162, 1997. ISSN 0378-1127.

HEBERT, P. D. et al. Demography and ecological impacts of the invading mollusc *Dreissena polymorpha*. **Canadian Journal of Zoology**, v. 69, n. 2, p. 405-409, 1991. ISSN 0008-4301.

HEGER, T.; TREPL, L. Predicting biological invasions. **Biological invasions**, v. 5, n. 4, p. 313-321, 2003. ISSN 1387-3547.

HOPPE, T.; DE VRIES, G. Social Innovation and the Energy Transition. **Sustainability**, v. 11, n. 1, p. 1-13, 2018.

HURLBERT, S.; VILLALOBOS-FIGUEROA, A. Aquatic Biota of Mexico. **Central America and the West**, 1982.

IACARELLA, J. C. et al. Ecological impacts of invasive alien species along temperature gradients: testing the role of environmental matching. **Ecological applications**, v. 25, n. 3, p. 706-716, 2015. ISSN 1939-5582.

INCI, G.; MILLER, C.; YESILLER, N. Design of Zebra Mussel Control Measures for Hydro-Electric Power Projects. 2004.

ITUARTE, C. F. *Corbicula* and *Neocorbicula*(Bivalvia: Corbiculidae) in the Parana, Uruguay, and Rio de La Plata Basins. **Nautilus**, v. 107, n. 4, p. 129-135, 1994. ISSN 0028-1344.

JANE, S. F. et al. Distance, flow and PCR inhibition: e DNA dynamics in two headwater streams. **Molecular ecology resources**, v. 15, n. 1, p. 216-227, 2015. ISSN 1755-098X.

JÓNASSON, P. M. The growth of *Plumatella repens* and *P. fungosa* (Bryozoa Ectoprocta) in relation to external factors in Danish eutrophic lakes. **Oikos**, v. 14, n. 2, p. 121-137, 1963. ISSN 0030-1299.

JONES, R. K. et al. Reliability and Efficiency Benefits of Online Trash Rack Monitoring. *Waterpower'97*, 1997, ASCE. p.1184-1191.

JUNG, C.; TAUBERT, D.; SCHINDLER, D. The temporal variability of global wind energy—Long-term trends and inter-annual variability. **Energy Conversion and Management**, v. 188, p. 462-472, 2019. ISSN 0196-8904.

KAMINSKI, M. Food composition of three bryozoan species (Bryozoa, Phylactolaemata) in a mesotrophic lake. **Polskie Archiwum Hydrobiologii/Polish Archives of Hydrobiology**, v. 31, n. 1, p. 45-53, 1984. ISSN 0032-3764.

KARATAYEV, A. Y. et al. The invasive bivalves *Dreissena polymorpha* and *Limnoperna fortunei*: parallels, contrasts, potential spread and invasion impacts. **Journal of Shellfish Research**, v. 26, n. 1, p. 205-214, 2007. ISSN 0730-8000.

KARATAYEV, A. Y.; BURLAKOVA, L. E.; PADILLA, D. K. Contrasting distribution and impacts of two freshwater exotic suspension feeders, *Dreissena polymorpha* and *Corbicula fluminea*. **NATO Science Series: IV— Earth and Environmental Sciences. Springer, Dordrecht, The Netherlands.**, p. 239–262 2005.

KARATAYEV, A. Y.; BURLAKOVA, L. E.; PADILLA, D. K. Zebra versus quagga mussels: a review of their spread, population dynamics, and ecosystem impacts. **Hydrobiologia**, v. 746, n. 1, p. 97-112, 2015. ISSN 0018-8158.

KAWECKA, B.; SANECKI, J. *Didymosphenia geminata* in running waters of southern Poland—symptoms of change in water quality? **Hydrobiologia**, v. 495, n. 1-3, p. 193-201, 2003. ISSN 0018-8158.

KILROY, C. A new alien diatom, *Didymosphenia geminata* (Lyngbye) Schmidt: its biology, distribution, effects and potential risks for New Zealand fresh waters. **NIWA, CHC2004-128, Christchurch, New Zealand**, 2004.

KINNE, O. Über den Einfluss des Salzgehaltes und der Temperatur auf Wachstum, Form und Vermehrung bei dem Hydroidpolypen *Cordylophora caspia* (Pallas, Athecata, Clavidae). **Zoologische Jahrbucher Abteilung fuer Allgemeine Zoologie und Physiologie der Tiere**, n. 66, p. 565-638, 1956.

KIPP, R. et al. Transoceanic ships as vectors for nonindigenous freshwater bryozoans. **Diversity and Distributions**, v. 16, n. 1, p. 77-83, 2010. ISSN 1366-9516.

KIRKWOOD, A. E. et al. *Didymosphenia geminata* in two Alberta headwater rivers: an emerging invasive species that challenges conventional views on algal

bloom development. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 64, n. 12, p. 1703-1709, 2007. ISSN 0706-652X.

KOCIOLEK, J. P. et al. New Gomphonema (Bacillariophyta) species from Tasmania. **Phycologia**, v. 43, n. 4, p. 427-444, 2004. ISSN 0031-8884.

KRAEMER, L. et al. Biological basis of behavior in *Corbicula fluminea*, II. Functional morphology of reproduction and development and review of evidence for self-fertilization. **American Malacological Bulletin, Special Edition**, v. 2, p. 193-202, 1986.

LACOURSIÈRE-ROUSSEL, A.; ROSABAL, M.; BERNATCHEZ, L. Estimating fish abundance and biomass from eDNA concentrations: variability among capture methods and environmental conditions. **Molecular Ecology Resources**, v. 16, n. 6, p. 1401-1414, 2016. ISSN 1755-098X.

LANCIONI, T.; GAINO, E. The zebra mussel *Dreissena polymorpha*: reproduction and competition with the sponge *Ephydatia fluvia*. In: (Ed.). **Biological invaders in inland waters: Profiles, distribution, and threats**: Springer, 2007. p.597-611.

LARNED, S. T. et al. Interactions between the mat-forming alga *Didymosphenia geminata* and its hydrodynamic environment. **Limnology and Oceanography: Fluids and Environments**, v. 1, n. 1, p. 4-22, 2011. ISSN 2157-3689.

LATINI, A. et al. Espécies exóticas invasoras de águas continentais no Brasil. **Brasília: MMA**, 2016.

LAUXEN, D. H. Avaliação do pré-tratamento eletromagnético para o processo de osmose inversa. 2014.

LAVIN, M. Invasive species compendium. 2016.

LI, S. et al. Byssus structure and protein composition in the highly invasive fouling mussel *Limnoperna fortunei*. **Frontiers in Physiology**, v. 9, p. 418, 2018. ISSN 1664-042X.

LI, X. et al. Lowering the quantification limit of the Qubit™ RNA HS Assay using RNA spike-in. **BMC molecular biology**, v. 16, n. 1, p. 9, 2015. ISSN 1471-2199.

LOPES, A. et al. Aumento da produtividade de geradores de usinas hidroelétricas através da automação do processo de limpeza dos trocadores de

calor do sistema de resfriamento. **Convencion internacional de la ingenieria em Cuba (CIIC 2010)**, 2010.

M., G. J.; M., H. G. The ecology of marine benthic hydroids. **Oceanography and Marine Biology: an Annual Review**, v. 33, p. 351-426, 1998.

MACKIE, G. Biology of the exotic zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, in relation to native bivalves and its potential impact in Lake St. Clair. **Hydrobiologia**, v. 219, n. 1, p. 251-268, 1991. ISSN 0018-8158.

MANSUR, M.; GARCES, L. Ocorrencia e densidade de *Corbicula fluminea* (Mueller, 1774) e *Neocorbicula limosa* (Maton, 1811) na estacao ecologica do Taim e areas adjacentes, Rio Grande do Sul, Brasil (Mollusca, Bivalvia, Corbiculidae). **Iheringia, Série Zoologia**, v. 68, p. 99-115, 1988.

MANSUR, M.; RICHINITTI, L.; SANTOS, C. D. *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) molusco bivalve invasor na bacia do Guaíba, Rio Grande do Sul, Brasil. **Biociências**, v. 7, n. 2, p. 147-149, 1999.

MANSUR, M. et al. Moluscos límnicos-Bivalves. **Espécies exóticas invasoras de águas continentais no Brasil. Brasília: Ministério do Meio Ambiente**, p. 127-75, 2016.

MANSUR, M. et al. Moluscos límnicos invasores no Brasil: biologia, prevençãõ e controle. **Porto Alegre: Redes Editora**, 2012.

MASSARD, J. A.; GEIMER, G. Global diversity of bryozoans (Bryozoa or Ectoprocta) in freshwater: an update. **Bulletin de la Société des naturalistes luxembourgeois**, v. 109, p. 139-148, 2008.

MCCARTHY, T.; FITZGERALD, J.; O'CONNOR, W. The occurrence of the zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771), an introduced biofouling freshwater bivalve in Ireland. **The Irish Naturalists' Journal**, v. 25, n. 11/12, p. 413-416, 1997. ISSN 0021-1311.

MCGEOCH, M. A. et al. Global indicators of biological invasion: species numbers, biodiversity impact and policy responses. **Diversity and Distributions**, v. 16, n. 1, p. 95-108, 2010. ISSN 1366-9516.

MCMAHON, R. Impact of European zebra mussel infestation to the electric power industry. Proceedings of the American Power Conference;(United States), 1990.

MCMAHON, R. F. Quagga mussel (*Dreissena rostriformis bugensis*) population structure during the early invasion of Lakes Mead and Mohave January-March 2007. **Aquatic Invasions**, v. 6, n. 2, p. 131-140, 2011. ISSN 1798-6540.

MCNABB, D. E. Pathways to Water-Smart Power. In: (Ed.). **Global Pathways to Water Sustainability**: Springer, 2019. p.201-215.

MEHTA, S. V. et al. Optimal detection and control strategies for invasive species management. **Ecological Economics**, v. 61, n. 2-3, p. 237-245, 2007. ISSN 0921-8009.

MICU, D.; TELEMBICI, A. First record of *Dreissena bugensis* (Andrusov 1897) from the Romanian stretch of River Danube. international symposium of malacology, 2004. p.19-22.

MILLER, M. P. et al. Factors controlling streambed coverage of *Didymosphenia geminata* in two regulated streams in the Colorado Front Range. **Hydrobiologia**, v. 630, n. 1, p. 207-218, 2009. ISSN 0018-8158.

MILLS, E. L. et al. A review of the biology and ecology of the quagga mussel (*Dreissena bugensis*), a second species of freshwater dreissenid introduced to North America. **American Zoologist**, v. 36, n. 3, p. 271-286, 1996. ISSN 0003-1569.

MINAMOTO, T. et al. Surveillance of fish species composition using environmental DNA. **Limnology**, v. 13, n. 2, p. 193-197, 2012. ISSN 1439-8621.

MIYA, M. et al. 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**, v. 2, n. 7, p. 150088, 2015. ISSN 2054-5703.

MOHER, D. et al. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate health care interventions: explanation and elaboration. **PLoS medicine**, v. 6, n. 7, p. e1000100, 2009. ISSN 1549-1676.

MOLLOY, D. P. et al. Discovery of *Dreissena rostriformis bugensis* (Andrusov 1897) in western Europe. **Biological Invasions**, v. 9, n. 7, p. 871-874, 2007. ISSN 1387-3547.

MONTEIRO DE REZENDE AYROZA, D. M. et al. Net cages enhance golden mussel (*Limnoperna fortunei*) larval density and condition factor. **Freshwater Biology**, p. 1593-1602, 2019. ISSN 0046-5070.

MOORE, J. Interstitial cells in the regeneration of *Cordylophora lacustris*. **Journal of Cell Science**, v. 3, n. 23, p. 269-288, 1952. ISSN 0021-9533.

MORRI, C. Alcune osservazioni sulle *Cordylophora* italiane (Cnidaria, Hydroida). **Atti V. conv. Gr. G. Gadio Varese, Maggio**, p. 151-170, 1980.

MORTON, B. The population dynamics of *Corbicula fluminea* (Bivalvia: Corbiculacea) in Plover Cove Reservoir, Hong Kong. **Journal of Zoology**, v. 181, n. 1, p. 21-42, 1977. ISSN 0952-8369.

_____. The biology and anatomy of *Limnoperna fortunei*, a significant freshwater bioinvader: blueprints for success. In: (Ed.). **Limnoperna Fortunei**: Springer, 2015. p.3-41.

MOUTHON, J. Sur la pre'sence en France et au Portugal de *Corbicula* (Bivalvia, Corbiculidae) originaire d'Asie. p. 109-116, 1981.

NAKANO, D.; STRAYER, D. L. Biofouling animals in fresh water: biology, impacts, and ecosystem engineering. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 12, n. 3, p. 167-175, 2014. ISSN 1540-9309.

NAKAYAMA, Y. et al. Pitfalls of DNA quantification using DNA-binding fluorescent dyes and suggested solutions. **PLoS One**, v. 11, n. 3, p. e0150528, 2016. ISSN 1932-6203.

NETTO, O. S. M. Controle da incrustação de organismos invasores em materiais de sistemas de resfriamento de usinas hidrelétricas. 2012.

OBOLEWSKI, K.; JAROSIEWICZ, A.; OŹGO, M. Invasive ponto-caspian hydrozoan *Cordylophora caspia* (Hydrozoa: Cnidaria) in southern Baltic coastal lakes. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 167, p. 147-153, 2015. ISSN 0272-7714.

OLIVEIRA, M. D. et al. Colonization and spread of *Limnoperna fortunei* in South America. In: (Ed.). **Limnoperna Fortunei**: Springer, 2015. p.333-355.

ORLOVA, M. I. et al. Invasion ecology of quagga mussels (*Dreissena rostriformis bugensis*): a review of evolutionary and phylogenetic impacts. **Aquatic Ecology**, v. 39, n. 4, p. 401-418, 2005. ISSN 1386-2588.

PARK, G.-M.; CHUNG, E.-Y. Histological studies on hermaphroditism, gametogenesis and cyclic changes in the structures of marsupial gills of the introduced Asiatic clam, *Corbicula fluminea*, and the Korean clam, *Corbicula leana*. **Journal of Shellfish Research**, v. 23, n. 1, p. 179-185, 2004. ISSN 0730-8000.

PASTORINO, G. et al. **Limnoperna fortunei (Dunker, 1857)(Mytilidae), nuevo bivalvo invasor en aguas del Río de la Plata**. 1993

PEDERSEN, M. W. et al. Ancient and modern environmental DNA. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 370, n. 1660, p. 20130383, 2015. ISSN 0962-8436.

PERKINS, K.; SARGISON, J.; HALLEGRAEFF, G. DIATOM FOULING PROBLEMS IN A TASMANIAN HYDRO CANAL, INCLUDING THE DESCRIPTION OF GOMPHONEMA TARRALEAHAE SP. NOV. **Diatom Research**, v. 24, n. 2, p. 377-391, 2009. ISSN 0269-249X.

PERKINS, K. J. et al. Succession and physiological health of freshwater microalgal fouling in a Tasmanian hydropower canal. **Biofouling**, v. 26, n. 6, p. 637-644, 2010. ISSN 0892-7014.

PESSOTTO, M.; NOGUEIRA, M. More than two decades after the introduction of *Limnoperna fortunei* (Dunker 1857) in La Plata Basin. **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, n. 4, p. 773-784, 2018. ISSN 1519-6984.

PESTANA, D. et al. Prospecção do molusco invasor *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) nos principais corpos hídricos do estado do Paraná, Brasil. **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 50, n. 34, p. 553-559, 2010. ISSN 0031-1049.

PIE, M. R. et al. Development of a real-time PCR assay for the detection of the golden mussel (*Limnoperna fortunei*, Mytilidae) in environmental samples. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 2, p. 1041-1045, 2017. ISSN 0001-3765.

PIMENTEL, D.; ZUNIGA, R.; MORRISON, D. Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. **Ecological Economics**, v. 52, n. 3, p. 273-288, 2005/02/15/ 2005. ISSN 0921-8009. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921800904003027> >.

PLATVOET, D.; VAN DER VELDE, G.; SONG, Y. Description of the Lateral Line Organ of *Dikerogammarus villosus* (Sowinsky, 1894), With Discussion on its

Function (Peracarida, Amphipoda) Amphipod Pilot Species Project (Ampis)—
Report 4. **Crustaceana**, v. 80, n. 11, p. 1373-1392, 2007. ISSN 1568-5403.

POMBO, V. Invasoras de Águas Continentais no Brasil. 2016. ISSN 978-85-7738-176-0.

POTTER, J.; LIDEN, L. Corbicula control at the Potomac River Steam Electric Station Alexandria, Virginia. **American Malacological Bulletin**. 1986., 1986. ISSN 0740-2783.

POURCHER, A. M.; D'HONDT, J. L. Étude ultrastructurale du sessoblaste et du flottoblaste chez *Plumatella fungosa* (Pallas, 1768) (Bryozoaires, Phylactolaemates). **Nat. Zool**, v. 13°, p. 209-216, 1987.

PUCHERELLI, S. F.; CLAUDI, R.; PRESCOTT, T. Control of biofouling in hydropower cooling systems using HOD ultraviolet light. **Management of Biological Invasions**, v. 9, p. 451-461, 2018.

QING, Z.; GRADINGER, R.; QINGSONG, Z. Competition within the marine microalgae over the polar dark period in the Greenland Sea of high Arctic. **海洋学报 (中文版)**, n. 2, p. 233-242, 2003.

R CORE TEAM. A language and environment for statistical computing (version 3.2. 2). **R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria**, 2015.

RAJAGOPAL, S.; VAN DER VELDE, G. Invasive species: implications for industrial cooling water systems. In: (Ed.). **Operational and Environmental Consequences of Large Industrial Cooling Water Systems**: Springer, 2012. p.127-162.

RAJAGOPAL, S. et al. How effective is intermittent chlorination to control adult mussel fouling in cooling water systems? **Water Research**, v. 37, n. 2, p. 329-338, 2003. ISSN 0043-1354.

RAVIZZA, M. **Stalk forming fouling diatoms: a problem for the hydro-electricity industry**. 2015. University of Tasmania

REES, H. C. et al. The detection of aquatic animal species using environmental DNA—a review of eDNA as a survey tool in ecology. **Journal of Applied Ecology**, v. 51, n. 5, p. 1450-1459, 2014. ISSN 0021-8901.

REINECKE, A.; BREZESINSKI, G.; HARRINGTON, M. J. pH-Responsive Self-Organization of Metal-Binding Protein Motifs from Biomolecular Junctions in Mussel Byssus. **Advanced Materials Interfaces**, v. 4, n. 1, p. 1600416, 2017. ISSN 2196-7350.

RICCIARDI, A. Global range expansion of the Asian mussel *Limnoperna fortunei* (Mytilidae): another fouling threat to freshwater systems. **Biofouling**, v. 13, n. 2, p. 97-106, 1998. ISSN 0892-7014.

RICCIARDI, A.; MACISAAC, H. J. Recent mass invasion of the North American Great Lakes by Ponto–Caspian species. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 15, n. 2, p. 62-65, 2000. ISSN 0169-5347.

RICCIARDI, A.; REISWIG, H. M. Taxonomy, distribution, and ecology of the freshwater bryozoans (Ectoprocta) of eastern Canada. **Canadian journal of zoology**, v. 72, n. 2, p. 339-359, 1994. ISSN 0008-4301.

RICHARDSON, D. M. et al. Naturalization and invasion of alien plants: concepts and definitions. **Diversity and distributions**, v. 6, n. 2, p. 93-107, 2000. ISSN 1366-9516.

ROOS, P. Two-stage life cycle of a *Cordylophora* population in the Netherlands. **Hydrobiologia**, v. 62, n. 3, p. 231-239, 1979. ISSN 0018-8158.

SANTOS, S. et al. Espécies de moluscos límnicos invasores no Brasil. **Moluscos límnicos invasores no Brasil: biologia, prevenção e controle**. **Redes Editora, Porto Alegre**, p. 25-50, 2012.

SARDIÑA, P.; ..., D. C.-F. A. A.; 2008, U. The effects of the invasive mussel, *Limnoperna fortunei*, on associated fauna in South American freshwaters: importance of physical structure and food supply. **ingentaconnect.com**, 2008.

SASTRE, A. V. et al. First record of the invasive diatom *Didymosphenia geminata* (Lyngbye) Schmidt in a Patagonian Andean river of Argentina. 2013. ISSN 2242-1300.

SCARABINO, F.; VERDE, M. ***Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) en la costa uruguaya del Rio de La Plata (Bivalvia; Mytilidae)**. 1994

SCHLOESSER, D. W.; NALEPA, T. F. Dramatic decline of unionid bivalves in offshore waters of western Lake Erie after infestation by the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 51, n. 10, p. 2234-2242, 1994. ISSN 0706-652X.

SEGURA, P. **A slimy invader blooms in the rivers of Patagonia**: American Association for the Advancement of Science 2011.

SILVA, D. P. D. Aspectos bioecológicos do mexilhao dourado *Limnoperna fortunei* (Bivalvia, Mytilidae)(Dunker, 1857). 2006.

SILVA, E. C.; BARROS, F. MACROFAUNA BENTÔNICA INTRODUZIDA DO BRASIL: LISTA DE ESPÉCIES MARINHAS E DULCICOLAS E DISTRIBUIÇÃO ATUAL. **Oecologia Australis**, v. 15, n. 2, p. 326-344, 2011. ISSN 2177-6199.

SILVEIRA, F.; BOSCOLO, H. Primeira ocorrência de *Cordylophora caspia* (Pallas, 1771)(Hydrozoa, Clavidae) para o estado de São Paulo. XIV Congresso Brasileiro de Zoologia, 1996.

SIMBERLOFF, D.; VON HOLLE, B. Positive interactions of nonindigenous species: invasional meltdown? **Biological Invasions**, v. 1, n. 1, p. 21-32, 1999. ISSN 1387-3547.

SIMPSON, A. et al. Invasive species information networks: collaboration at multiple scales for prevention, early detection, and rapid response to invasive alien species. **Biodiversity**, v. 10, n. 2-3, p. 5-13, 2009. ISSN 1488-8386.

SMITH, D. G.; WERLE, S. F.; KLEKOWSKI, E. The rapid colonization and emerging biology of *Cordylophora caspia* (Pallas, 1771)(Cnidaria: Clavidae) in the Connecticut River. **Journal of Freshwater Ecology**, v. 17, n. 3, p. 423-430, 2002. ISSN 0270-5060.

SOUSA, R.; ANTUNES, C.; GUILHERMINO, L. Ecology of the invasive Asian clam *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) in aquatic ecosystems: an overview. *Annales de Limnologie-International Journal of Limnology*, 2008, EDP Sciences. p.85-94.

SOUZA, R. C. C. L. D.; CALAZANS, S. H.; SILVA, E. P. Impacto das espécies invasoras no ambiente aquático. **Ciência e cultura**, v. 61, n. 1, p. 35-41, 2009. ISSN 0009-6725.

SPAULDING, S.; ELWELL, L. Increase in nuisance blooms and geographic expansion of the freshwater diatom *Didymosphenia geminata*: recommendations for response. **White Paper. USEPA Region**, v. 8, 2007.

STEPHENS, J. C. 18 Assessing resilience in energy system change through an energy democracy lens. **Handbook on Resilience of Socio-Technical Systems**, p. 341, 2019. ISSN 1786439379.

STOECKMANN, A. Physiological energetics of Lake Erie dreissenid mussels: a basis for the displacement of *Dreissena polymorpha* by *Dreissena bugensis*. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 60, n. 2, p. 126-134, 2003. ISSN 0706-652X.

STRICKLER, K. M.; FREMIER, A. K.; GOLDBERG, C. S. Quantifying effects of UV-B, temperature, and pH on eDNA degradation in aquatic microcosms. **Biological Conservation**, v. 183, p. 85-92, 2015. ISSN 0006-3207.

SURIANI, A. L.; FRANÇA, R. S.; ROCHA, O. A malacofauna bentônica das represas do médio rio Tietê (São Paulo, Brasil) e uma avaliação ecológica das espécies exóticas invasoras, *Melanoides tuberculata* (Müller) e *Corbicula fluminea* (Müller). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 24, n. 1, p. 21-32, 2007.

SYLVESTER, F. et al. Filtration rates of the invasive pest bivalve *Limnoperna fortunei* as a function of size and temperature. **Hydrobiologia**, v. 534, n. 1-3, p. 71-80, 2005. ISSN 0018-8158.

TABERLET, P. et al. Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. **Molecular ecology**, v. 21, n. 8, p. 2045-2050, 2012. ISSN 0962-1083.

TAKAHARA, T. et al. Estimation of fish biomass using environmental DNA. **PloS one**, v. 7, n. 4, p. e35868, 2012. ISSN 1932-6203.

THOMPSON, S. E. et al. THE ROLE OF NITRIC OXIDE IN DIATOM ADHESION IN RELATION TO SUBSTRATUM PROPERTIES 1. **Journal of phycology**, v. 44, n. 4, p. 967-976, 2008. ISSN 0022-3646.

THOMSEN, P. F. et al. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. **Molecular ecology**, v. 21, n. 11, p. 2565-2573, 2012. ISSN 0962-1083.

THOMSEN, P. F.; WILLERSLEV, E. Environmental DNA—An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. **Biological Conservation**, v. 183, p. 4-18, 2015. ISSN 0006-3207.

TILLOTSON, M. D. et al. Concentrations of environmental DNA (eDNA) reflect spawning salmon abundance at fine spatial and temporal scales. **Biological Conservation**, v. 220, p. 1-11, 2018. ISSN 0006-3207.

TUCHMAN, N. C. et al. Differential heterotrophic utilization of organic compounds by diatoms and bacteria under light and dark conditions. In: (Ed.). **Advances in Algal Biology: A Commemoration of the Work of Rex Lowe**: Springer, 2006. p.167-177.

TURNER, C. R. et al. Improved methods for capture, extraction, and quantitative assay of environmental DNA from Asian bigheaded carp (*Hypophthalmichthys* spp.). **PloS one**, v. 9, n. 12, p. e114329, 2014. ISSN 1932-6203.

ULIANO-SILVA, M. et al. Invasive species as a threat to biodiversity: The golden mussel *Limnoperna fortunei* approaching the Amazon River basin. **Exploring Themes on Aquatic Toxicology. Kerala. P135–148**, 2013.

VAN VLIET, M. T.; VÖGELE, S.; RÜBBELKE, D. Water constraints on European power supply under climate change: impacts on electricity prices. **Environmental Research Letters**, v. 8, n. 3, p. 035010, 2013. ISSN 1748-9326.

VAN VLIET, M. T. et al. Power-generation system vulnerability and adaptation to changes in climate and water resources. **Nature Climate Change**, v. 6, n. 4, p. 375, 2016. ISSN 1758-6798.

VELDE, G.; PLATVOET, D. Quagga mussels *Dreissena rostriformis burgensis* (Andrusov, 1897) in the Main River (Germany). 2007.

VITOUSEK, P. M.; LOOPE, L. L.; WESTBROOKS, R. Biological invasions as global environmental change. 2017.

VON RUCKERT, G.; CAMPOS, M. D. C. S.; ROLLA, M. E. Alimentação de *Limnoperna fortunei* (Dunker 1857): taxas de filtração com ênfase ao uso de Cyanobacteria. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 26, n. 4, p. 421-429, 2004. ISSN 1807-863X.

VROUWENVELDER, J. et al. Tools for fouling diagnosis of NF and RO membranes and assessment of the fouling potential of feed water. **Desalination**, v. 157, n. 1-3, p. 361-365, 2003. ISSN 0011-9164.

WETHERBEE, R. et al. Minireview—the first kiss: establishment and control of initial adhesion by raphid diatoms. **Journal of Phycology**, v. 34, n. 1, p. 9-15, 1998. ISSN 0022-3646.

WHITTON, B.; ELLWOOD, N.; KAWECKA, B. Biology of the freshwater diatom *Didymosphenia*: a review. **Hydrobiologia**, v. 630, n. 1, p. 1-37, 2009. ISSN 0018-8158.

WOOD, T. Freshwater bryozoans: a zoogeographical reassessment. **Bryozoan studies**, p. 339-345, 2001.

WOOD, T. S. *Plumatella nitens*, a new species of freshwater bryozoan from North America (Ectoprocta: Phylactolaemata), previously misidentified. **Hydrobiologia**, v. 328, n. 2, p. 147-153, 1996. ISSN 0018-8158.

WOOD, T. S.; OKAMURA, B. A new key to the freshwater bryozoans of Britain, Ireland and Continental Europe, with notes on their ecology. **Sci. publ./Freshwater biol. assoc.**, 2005.

XIA, Z. et al. Conventional versus real-time quantitative PCR for rare species detection. **Ecology and Evolution**, v. 8, n. 23, p. 11799-11807, 2018. ISSN 2045-7758.

XIA, Z. et al. Early detection of a highly invasive bivalve based on environmental DNA (eDNA). **Biological Invasions**, v. 20, n. 2, p. 437-447, 2018. ISSN 1387-3547.

XU, Z. et al. Anesthetic management of a parturient with mirror syndrome: a case report. **International journal of clinical and experimental medicine**, v. 8, n. 8, p. 14161, 2015.

YAMAMOTO, S. et al. Environmental DNA metabarcoding reveals local fish communities in a species-rich coastal sea. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2017. ISSN 2045-2322.

ZAMPONI, M. Los cnidária de la Republica Argentina. **Fauna de Agua Dulce de la República Argentina. PROFADU (CONICET). La Plata**, 1991.

ZAMPONI, M. O.; ESCALANTE, A. H. El grupo Hydra en el foco de una tesis doctoral.

ZHANG, R. et al. Feeding ecology of *Limnoperna fortunei* in southern China: insights from stable isotopes and fatty-acid biomarkers. **Journal of Freshwater Ecology**, v. 32, n. 1, p. 761-772, 2017. ISSN 0270-5060.

ZHULIDOV, A. et al. Invasion history, distribution, and relative abundances of *Dreissena bugensis* in the old world: a synthesis of data. **Biological Invasions**, v. 12, n. 7, p. 1923-1940, 2010. ISSN 1387-3547.

ZHURAVEL, P. *Dreissena bugensis* of the Dnepr and its recent appearance in the Dnepr reservoir. **Zoologicheskii zhurnal**, v. 30, n. 2, p. 186, 1951. ISSN 0044-5134.