

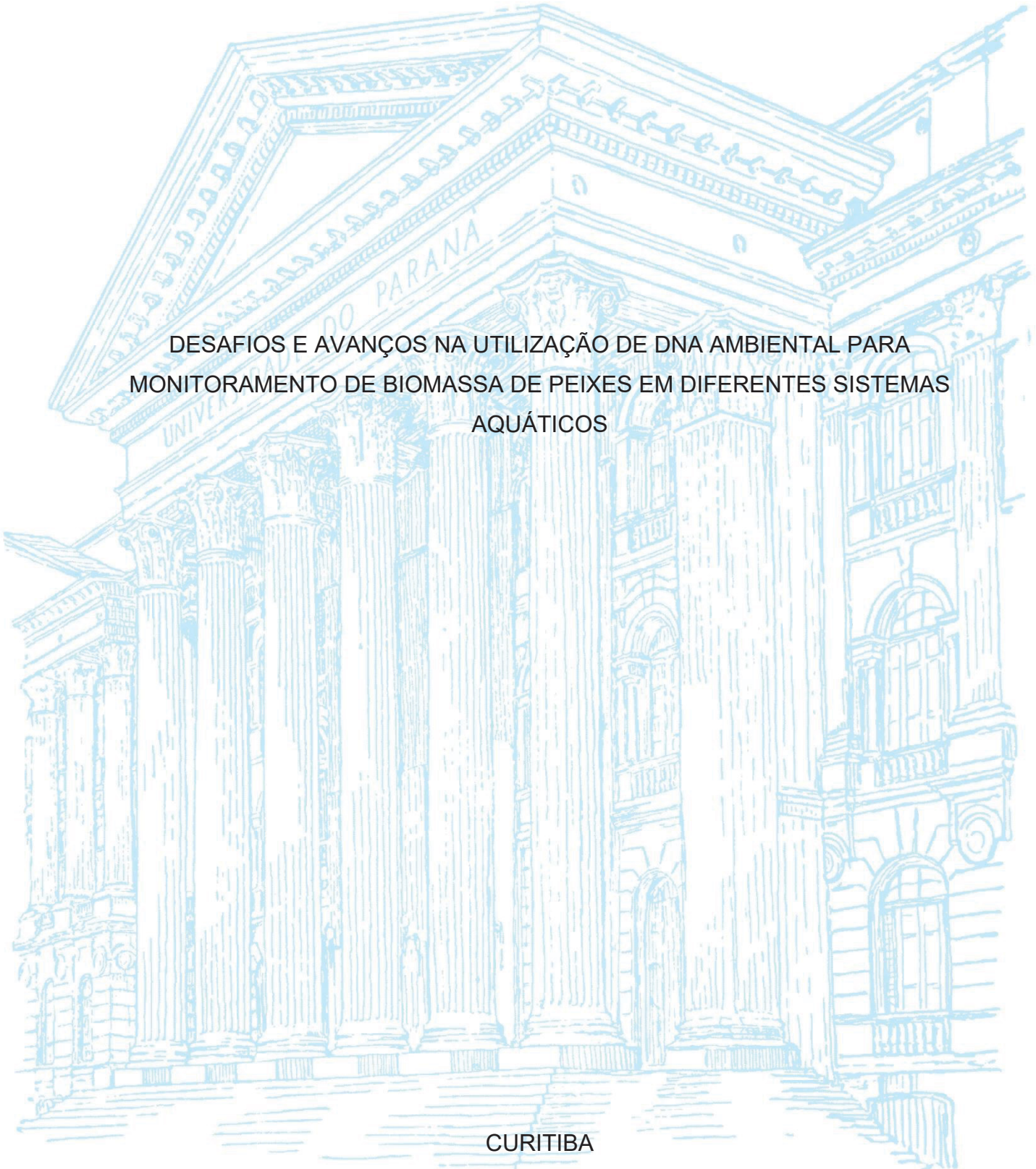
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FABRÍCIO SALVADOR VIDAL

DESAFIOS E AVANÇOS NA UTILIZAÇÃO DE DNA AMBIENTAL PARA
MONITORAMENTO DE BIOMASSA DE PEIXES EM DIFERENTES SISTEMAS
AQUÁTICOS

CURITIBA

2024



FABRÍCIO SALVADOR VIDAL

DESAFIOS E AVANÇOS NA UTILIZAÇÃO DE DNA AMBIENTAL PARA
MONITORAMENTO DE BIOMASSA DE PEIXES EM DIFERENTES SISTEMAS
AQUÁTICOS

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

Orientador: Prof. Dr. Antonio Ostrensky

CURITIBA

2024

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

Vidal, Fabrício Salvador

Desafios e avanços na utilização de DNA ambiental para monitoramento de biomassa de peixes em diferentes sistemas aquáticos / Fabrício Salvador Vidal. – Curitiba, 2024. 1 recurso online: PDF.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Orientador: Prof. Dr. Antonio Ostrensky

1. Organismo Aquático. 2. Biomassa. 3. Aquicultura. 4. DNA. I. Ostrensky, Antonio. II. Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. III. Título.



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 ZOOTECNIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **FABRÍCIO SALVADOR VIDAL** intitulada: **Desafios e avanços na utilização de DNA ambiental para monitoramento de biomassa de peixes em diferentes sistemas aquáticos**, sob orientação do Prof. Dr. ANTONIO OSTRENSKY NETO, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de doutor 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, 02 de Setembro de 2024.

Documento assinado digitalmente
 **ANTONIO OSTRENSKY NETO**
Data: 21/11/2024 18:13:26-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

ANTONIO OSTRENSKY NETO
Presidente da Banca Examinadora

Documento assinado digitalmente
 **FABIO MEURER**
Data: 21/11/2024 13:57:12-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

FÁBIO MEURER
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Documento assinado digitalmente
 **JOSENILDO DE SOUZA E SILVA**
Data: 21/11/2024 13:39:05-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

JOSENILDO DE SOUZA E SILVA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO DELTA DO

PARNÁIBA)
Documento assinado digitalmente
 **MARCIO ROBERTO PIE**
Data: 21/11/2024 17:15:05-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

MARCIO ROBERTO PIE
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

A conclusão desta tese de doutorado representa não apenas o encerramento de um ciclo acadêmico, mas também a realização de um sonho construído com o apoio inestimável de muitas pessoas e instituições que, de diferentes formas, se dedicam para esta jornada.

Primeiramente, expresso minha mais profunda gratidão aos meus Guias, que foram essenciais para superar os desafios e alcançar os objetivos propostos. Este trabalho é reflexo direto da inspiração e do suporte que recebi de vocês.

Agradeço imensamente à minha família, cuja presença constante foi fundamental para alcançar os meus objetivos, especialmente nos momentos mais desafiadores. O amor e a compreensão de vocês foram essenciais para que eu pudesse seguir em frente e realizar este sonho.

À Engie Brasil Energia, minha gratidão pelo suporte técnico, científico e financeiro que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho. A confiança em minha pesquisa e o acesso às condições necessárias foram fundamentais para a realização desta tese.

À Cooperativa Agroindustrial Consolata Copacol, agradeço pela parceria e pelo apoio indispensável ao longo deste processo. A colaboração e o suporte técnico fornecido demonstram o quanto a ciência e o setor produtivo podem caminhar juntos na busca de soluções inovadoras e sustentáveis.

Por fim, agradeço à equipe da ATGC - Genética Ambiental LTDA, cujo suporte técnico-científico foi essencial para a execução de partes importantes deste estudo. A expertise compartilhada e os recursos disponibilizados foram desenvolvidos de forma significativa para a qualidade deste trabalho.

A todos vocês, meus mais sinceros agradecimentos. Sem o suporte de cada um, direta ou indiretamente, este trabalho não seria possível. Que este esforço conjunto inspire novos projetos e colaborações futuras.

Kao Kabecilê Xangô, Laroîê Exu

A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido e não na vitória propriamente dita.

Mahatma Gandhi

RESUMO

A estimativa precisa da biomassa de organismos aquáticos é fundamental para o manejo eficaz de ecossistemas aquáticos. Tradicionalmente, essa estimativa tem sido realizada por métodos invasivos e custosos. Neste contexto, o DNA ambiental (eDNA) emerge como uma ferramenta promissora, não invasiva e com potencial para revolucionar o monitoramento de ecossistemas aquáticos. Esta tese teve como objetivo avaliar a eficácia do eDNA na estimativa da biomassa de organismos aquáticos, identificando as principais variáveis que influenciam sua detecção e quantificação. Para tanto, foram realizados uma revisão sistemática da literatura e dois estudos de caso. A revisão sistemática abrangeu uma ampla gama de estudos, desde microcosmos até grandes ecossistemas marinhos, evidenciando a versatilidade do eDNA em diferentes ambientes. No entanto, a revisão também identificou a necessidade de padronização dos protocolos de coleta, preservação e análise do eDNA, bem como a importância de considerar as características hidrológicas e ambientais de cada sistema. Os estudos de caso, por sua vez, aprofundaram a investigação sobre a relação entre a concentração de eDNA e a biomassa de peixes em diferentes condições experimentais. O primeiro estudo de caso avaliou a influência da densidade de peixes e das condições ambientais na detecção e quantificação do eDNA, enquanto o segundo estudo investigou a aplicabilidade do eDNA em um ambiente de cultivo comercial. Os resultados dos estudos de caso corroboraram com os achados da revisão sistemática, evidenciando a importância de considerar as características específicas de cada sistema para a interpretação dos dados de eDNA. Em suma, esta tese demonstra o grande potencial do eDNA como ferramenta para a estimativa de biomassa em ambientes aquáticos. No entanto, para a aplicação eficaz da técnica, é fundamental o desenvolvimento de protocolos padronizados e a consideração das características específicas de cada sistema. Os resultados desta pesquisa contribuem para o avanço do conhecimento sobre o uso do eDNA em ecologia aquática e podem ser utilizados para o desenvolvimento de ferramentas de monitoramento mais eficientes e precisas.

Palavras-chave: DNA ambiental; eDNA; biomassa; ecossistemas aquáticos; metabarcoding; qPCR; monitoramento ambiental.

ABSTRACT

Accurate estimation of aquatic organism biomass is crucial for effective management of aquatic ecosystems. Traditionally, this estimation has been conducted using invasive and costly methods. In this context, environmental DNA (eDNA) emerges as a promising, non-invasive tool with the potential to revolutionize aquatic ecosystem monitoring. This thesis aimed to evaluate the effectiveness of eDNA in estimating aquatic organism biomass, identifying the main variables influencing its detection and quantification. To achieve this, a systematic literature review and two case studies were conducted. The systematic review covered a wide range of studies, from microcosms to large marine ecosystems, highlighting the versatility of eDNA in different environments. However, the review also identified the need for standardization of eDNA collection, preservation, and analysis protocols, as well as the importance of considering the hydrological and environmental characteristics of each system. The case studies, in turn, delved deeper into the relationship between eDNA concentration and fish biomass under different experimental conditions. The first case study assessed the influence of fish density and environmental conditions on eDNA detection and quantification, while the second investigated the applicability of eDNA in a commercial aquaculture environment. The results of the case studies corroborated the findings of the systematic review, highlighting the importance of considering the specific characteristics of each system for the interpretation of eDNA data. In summary, this thesis demonstrates the great potential of eDNA as a tool for estimating biomass in aquatic environments. However, for the effective application of the technique, the development of standardized protocols and the consideration of the specific characteristics of each system are essential. The results of this research contribute to advancing knowledge about the use of eDNA in aquatic ecology and can be used to develop more efficient and accurate monitoring tools.

Keywords: environmental; DNA; eDNA; biomass; aquatic ecosystems; metabarcoding; qPCR; environmental monitoring.

LISTA DE FIGURAS

- Figure 1. Mapping the evolution of eDNA aquatic research: a Sankey Diagram overview of taxonomy, publication timeline, and research sources....21
- Figure 2. The word association graph was obtained from the co-occurrence analysis of words in the Materials and Methods section of the selected scientific articles.....22
- Figure 3. The frequency of the time gap from collection to preservation of eDNA is present in the samples of each study. NS = Non-specified.23
- Figure 4. Distribution of filter types across freshwater and marine habitats in eDNA studies. The numbers on each bar reflect the quantity of research conducted in each water category.....24
- Figure 5. Relationship between filter pore size and analysed volume across different studies.....27
- Figure 6. Sankey Diagram of eDNA extraction techniques, genetic marking, and analysis techniques and methods.29
- Figure 7. Schematic representation: A) Of the factors that act on the production, decomposition, and transport of eDNA. B) Of the degradation, eDNA suffered from physical, chemical, and biotic factors (microbial community and extracellular enzymes). C) Different DNA types from environmental samples. exDNA - external DNA; iDNA - internal DNA; f-exDNA - free extracellular DNA, tb-exDNA - tightly bound extracellular DNA; wb-exDNA - weakly bound.35
- Figure 8. Methodologies Applied in eDNA Analysis: A) Molecular markers used in the selected studies and main identifiable taxonomic groups; B) and C) Monitoring strategies for specific species and the broad assessment of local biodiversity.....41
- Figura 9. Representação esquemática dos tanques de polietileno (três réplicas por tratamento) utilizados nos experimentos de mesocosmo em laboratório. O experimento visou validar a eficiência de detecção e quantificação das concentrações de eDNA liberadas por *Rhamdia quelen*, *Astyanax altiparanae*, *Piaractus mesopotamicus* e *Oreochromis niloticus*, bem como calcular as suas respectivas taxas de degradação.72
- Figura 10. Variação temporal (dados, tendência e intervalo de confiança) do número de reads de eDNA de *Astyanax altiparanae* em diferentes volumes de

<p>água (100 L, 1,000 L, 10.000 L e no controle), durante as fases de sheeding e de degradation do eDNA, em experimento de mesocosmos. </p>	78
<p>Figura 11. Variação temporal (dados, tendência e intervalo de confiança) do número de reads de eDNA de <i>Oreochromis niloticus</i> em diferentes volumes de água (100 L, 1,000 L, 10.000 L e no controle), durante as fases de sheeding e de degradation do eDNA, em experimento de mesocosmos. </p>	79
<p>Figura 12. Variação temporal (dados, tendência e intervalo de confiança) do número de reads de eDNA de <i>Piaractus mesopotamicus</i> em diferentes volumes de água (100 L, 1,000 L, 10.000 L e no controle), durante as fases de sheeding e de degradation do eDNA, em experimento de mesocosmos. </p>	80
<p>Figura 13. Variação temporal (dados, tendência e intervalo de confiança) do número de reads de eDNA de <i>Rhamdia quelen</i> em diferentes volumes de água, durante as fases de sheeding e de degradation do eDNA, em experimento de mesocosmos.</p>	81
<p>Figura 14. Delineamento temporal com a identificação dos tempos de cultivo de Tilápia-do-Nilo em que foram realizados os procedimentos de coleta de amostras de DNA ambiental. No esquema, fica claro que os procedimentos de coleta de água estão sempre associados a realização de biometria (com exceção da primeira coleta que foi realizada antes do alojamento dos peixes no viveiro).</p>	104
<p>Figura 15. Variação da taxa de mortalidade ao longo dos cultivos (viveiros 1-5: Propriedade 1; viveiro 6: Propriedade 2).</p>	110
<p>Figura 16. Variação do número de peixes nos viveiros ao longo dos cultivos (viveiros 1-5: Propriedade 1; viveiro 6: Propriedade 2).</p>	110
<p>Figura 17. Variação do peso médio dos peixes ao longo dos cultivos (viveiros 1-5: Propriedade 1; viveiro 6: Propriedade 2).</p>	112
<p>Figura 18. Curva polinomial de segunda ordem relacionando o ganho de peso diário ao longo do tempo nos diferentes viveiros monitorados (viveiros 1-5: Propriedade 1; viveiro 6: Propriedade 2).</p>	112
<p>Figura 19. Variação da biomassa presente nos viveiros ao longo dos cultivos (viveiros 1-5: Propriedade 1; viveiro 6: Propriedade 2).</p>	113

Figura 20. Variação temporal da mediana das concentrações de DNA (em ng/L) de tilápia nos viveiros monitorados.	114
Figura 21. Regressão quantílica coletiva para [DNA] (ng/L) com GPD, pH, Amônia e Oxigênio.....	117
Figura 22. Importância relativa das variáveis na revisão da concentração de eDNA de tilápia utilizando Random Forest e Gradient Bossting.....	118
Figura 23. Relação entre valores observados e previstos de concentração de eDNA de tilápia utilizando o modelo Random Forest e Gradient Boosting.	120

LISTA DE TABELAS

Table 1. Uses and applications of eDNA in aquatic ecosystems.....	11
Table 2. Search terms applied in identifying scientific literature and articles concerning the application of environmental DNA in assessing biomass and population levels of aquatic species.....	13
Table 3. Sequential selection stages adopt the Prisma framework for identifying methods and strategies in utilizing eDNA to gauge diverse aquatic organism groups' quantity, abundance, or biomass.	14
Table 4. Synthesis of eDNA approaches for biomass and abundance estimation in aquatic ecosystems.....	15
Table 5. Procedures adopted for the conservation of eDNA in collected samples.	25
Tabela 6. Condições da PCR Endpoint.....	74
Tabela 7. Sequência dos primers da PCR <i>endpoint</i> (Miya, Sato et al. 2015).....	74
Tabela 8. Condições da PCR de fusão.	74
Tabela 9. Estrutura e sequência dos primers de fusão para a adição dos adaptadores. Amarelo – Adaptador da célula de fluxo (i5 e i7), Verde – Índices degenerados para a detecção de duplicatas de PCR, Azul – Índice de identificação de amostra, Rosa – Primer de sequenciamento.	74
Tabela 10. Índices utilizados na preparação da biblioteca e suas respectivas sequências para posterior decodificação.	75
Tabela 11. Oxigênio dissolvido e temperatura nas fases de sheeding e degradation durante o experimento com eDNA de peixes realizados em sistema de mesocosmos. Letras em sobrescrito indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre fases. Não houve diferenças entre os parâmetros analisados em diferentes volumes.	76
Tabela 12. Parâmetros biométricos das espécies utilizadas e densidades empregadas no experimento em mesocosmos.	77
Tabela 13. Resultados da ANOVA para o número de reads de eDNA	81
Tabela 14. Resultados do modelo de regressão linear múltipla para o número de reads de Edna.....	82
Tabela 15. Dados iniciais dos sistemas de cultivo das fazendas monitoradas.	102
Tabela 16. Variação da qualidade da água nos viveiros monitorados durante os cultivos. Mediana e intervalo interquartis (entre parênteses). Letras	

diferentes indicam diferenças significativas entre os viveiros monitorados de acordo com o teste de Kruskal-Wallis e teste a posteriori de Dunn.....	109
Tabela 17. Dados relativos aos cultivos realizados nos viveiros de tilápia monitorados.	109
Tabela 18. Correlação de Spearman entre a mediana mensal da concentração de DNA (ng/L) e as variáveis independentes monitoradas nos cultivos.	115
Tabela 19. Resultados das regressões quantílicas individuais e coletivas para [DNA] (ng/μL) com GPD, pH, amônia e oxigênio.....	116
Tabela 20. Métricas de desempenho dos modelos Random Forest e Gradient Boosting	117

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO GERAL	1
2 CAPÍTULO I: SYSTEMATIC REVIEW OF ADVANCEMENTS AND LIMITATIONS IN AQUATIC EDNA ANALYSIS: A PRISMA APPROACH	7
2.1 INTRODUCTION	8
2.1.1 eDNA: a gateway to aquatic biodiversity	8
2.1.2 Techniques involved in eDNA studies	9
2.1.3 Applications of eDNA in aquatic environment studies	10
2.1.4 Objective	13
2.2 METHODS	13
2.3 PRISMA RESULTS	15
2.3.1 Study characterization	15
2.3.2 Keywords.....	21
2.3.3 Sample collection	22
2.3.4 Filters and filtration	23
2.3.5 Extraction and eDNA method	27
2.4 CRITICAL ASSESSMENT OF EDNA STUDIES TO DATE.....	29
2.4.1 Sample collection	29
2.4.2 eDNA Stabilisation	31
2.4.3 eDNA Concentration.....	32
2.4.4 eDNA Extraction	36
2.4.5 Molecular markers and primers	38
2.4.6 Analytical methods	42
2.5 ADVANCES AND LIMITATIONS - INTEGRATED ANALYSIS	43
2.6 CONCLUSIONS	47
2.6.1 Relevance of eDNA in Research and Conservation.....	47
2.6.2 eDNA Collection Challenges	47
2.6.3 eDNA's potential to address environmental challenges.....	48
2.7 ACKNOWLEDGEMENTS.....	48
2.8 REFERENCES	48
3 CAPÍTULO II - AVALIAÇÃO DA DINÂMICA DE LIBERAÇÃO E DEGRADAÇÃO DE DNA DE PEIXES EM CONDIÇÕES CONTROLADAS DE MESOCOSMO	67
3.2 INTRODUÇÃO	68
3.3 MATERIAL E MÉTODOS	70

3.3.1 Aprovação no comitê de ética	70
3.3.2 Definição das espécies, obtenção e manutenção de peixes em condições laboratoriais.....	71
3.3.3 Preparo dos sistemas experimentais e agrupamento dos peixes	71
3.3.4 Experimento	72
3.3.5 Processamento das amostras	72
3.3.6 Análise por sequenciamento e metagenômica.....	73
3.3.7 Análises estatísticas	75
3.4 RESULTADOS	76
3.5 DISCUSSÃO	82
3.5.1 Impacto do Volume de Água na Detecção de eDNA.....	82
3.5.2 Variabilidade dos Dados e Intervalo de Confiança	84
3.5.3 Fases de Liberação e Degradação	85
3.5.4 Correlação entre DNA Detectado e Biomassa de Peixes	86
3.5.5 Análise em Contexto com Estudos Prévios.....	87
3.6 CONCLUSÃO.....	88
3.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

4 CAPÍTULO III – UTILIZAÇÃO DE DNA AMBIENTAL PARA MONITORAMENTO DA BIOMASSA RELATIVA DE TILÁPIA-DO-NILO EM VIVEIROS COMERCIAIS

100

4.1 INTRODUÇÃO	100
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	102
4.2.1 Área de estudo	102
4.2.2 Práticas de cultivo e monitoramento	103
4.2.3 Coleta e filtração das amostras	103
4.2.4 Extração e purificação de amostras de eDNA.....	105
4.2.5 Quantificação do eDNA por PCR em tempo real	105
4.2.6 Análise estatística	106
4.3 RESULTADOS	107
4.3.1 Qualidade da água	107
4.3.2 Mortalidade.....	108
4.3.3 Número de peixes	108
4.3.4 Peso médio	111
4.3.5 Ganho de peso diário	111

4.3.6 Biomassa.....	111
4.3.7 Concentração de DNA.....	113
4.3.8 Análises estatísticas	114
4.3.8.1 Correlação de Spearman.....	114
4.3.8.2 Regressão quantílica	115
4.3.8.3 Outros modelos preditivos	117
4.4 DISCUSSÃO	121
4.5 CONCLUSÃO E DIREÇÕES FUTURAS.....	125
4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	126
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	133
6 REFERÊNCIAS GERAIS	136

1 APRESENTAÇÃO GERAL

O DNA ambiental (eDNA) tem sido reconhecido como uma ferramenta revolucionária para o estudo da biodiversidade aquática. Definido inicialmente por Ficetola *et al.* (2008), o eDNA consiste em material genético presente em amostras ambientais que reflete a diversidade de organismos que habitam ecossistemas específicos. Este material inclui DNA de vírus, bactérias, protistas, zooplâncton, mesofauna, plantas, invertebrados e vertebrados oceânicos (Zhang, P. *et al.*, 2020). O eDNA pode ser liberado por organismos através de diversas vias como advecção, excreção, reprodução, crescimento ou decomposição pós-morte (Foote *et al.*, 2012; Thomsen *et al.*, 2012). Este DNA pode ser extraído de diversas matrizes ambientais, como água, sedimentos, gelo, ar e solo (Thomsen and Willerslev, 2015; Danziger and Frederich, 2022).

A análise de eDNA oferece uma abordagem não invasiva e sensível para o monitoramento de organismos, permitindo a detecção de espécies invasoras, raras ou ameaçadas, além de possibilitar a estimativa de biomassa e abundância (Andruszkiewicz, 2019; Doi and Nakamura, 2022). A persistência do eDNA no ambiente varia de algumas horas a milênios, demonstrando seu potencial para fornecer dados ambientais previamente inacessíveis (Thomsen and Willerslev, 2015).

Quantificar precisamente a biomassa ou abundância de organismos aquáticos através do eDNA é desafiador devido à heterogeneidade dos parâmetros ambientais que podem afetar a concentração e integridade do eDNA (Yang *et al.*, 2023). Avanços tecnológicos significativos em sequenciamento de DNA, como o método de Sanger e a reação em cadeia da polimerase (PCR), têm melhorado a precisão e sensibilidade da detecção de eDNA (Higuchi *et al.*, 1992; Higuchi *et al.*, 1993). Tecnologias de sequenciamento de nova geração, como Ion Torrent e Nanopore Sequencing, revolucionaram a capacidade de identificar material genético em amostras ambientais, expandindo a aplicabilidade do eDNA em monitoramentos ambientais (Ambardar *et al.*, 2016; Slatko *et al.*, 2018).

O uso do eDNA iniciou com a detecção de comunidades bacterianas em sedimentos marinhos em meados de 1980 (Ogram *et al.*, 1987) e evoluiu para um método não invasivo para detecção e mapeamento de distribuição de espécies (Jerde *et al.*, 2011). Isso gerou diversas aplicações, como o sequenciamento completo de metagenomas, assim as amostras de eDNA expandiu significativamente no qual o material genético pode ser avaliado e identificado com eficiência (Venter *et al.*, 2004).

Os avanços recentes em tecnologias de sequenciamento de DNA têm impulsionado as técnicas baseadas em eDNA, reconhecendo-as como ferramentas sofisticadas para a detecção e monitoramento de espécies em diversos ambientes (Minamoto, 2022; Nakamura, 2023). Estas metodologias aumentam a eficiência, permitindo a detecção rotineira e o potencial de quantificação de milhares de espécies, ampliando significativamente o escopo de diversas pesquisas (Hartig *et al.*, 2024).

As aplicações do eDNA são diversas, abrangendo o monitoramento da biodiversidade, gestão de espécies invasoras, biomonitoramento ambiental, vigilância de patógenos, desenvolvimento tecnológico entre outros. Essas aplicações demonstram a evolução contínua e o refinamento das metodologias de eDNA, tanto em novas aplicações quanto no aprimoramento das existentes (Takahara *et al.*, 2012; Pawlowski *et al.*, 2018).

Apesar do grande potencial do eDNA, a técnica enfrenta desafios significativos. A quantificação precisa da biomassa em ecossistemas complexos é dificultada pela interação de fatores que influenciam a dinâmica do eDNA, como características biológicas da espécie, condições ambientais e hidrodinâmica local (Lance *et al.*, 2017; Thalinger, Rieder, *et al.*, 2021). A alta sensibilidade da técnica pode dificultar a quantificação precisa da biomassa de uma espécie em ecossistemas diversos, especialmente aqueles com alta biodiversidade (Pont *et al.*, 2023).

Experimentos em mesocosmos têm sido valiosos para aprimorar a compreensão da dinâmica do eDNA em ambientes aquáticos, permitindo a avaliação da influência de diferentes fatores na liberação, persistência, degradação e detecção do eDNA (Benoit *et al.*, 2023). Estes estudos fornecem informações valiosas para a aplicação futura e validação da metodologia de eDNA em campo, especialmente atrelado a produção de organismos como na aquicultura.

A aquicultura desempenha um papel crucial na oferta de alimentos à crescente população global, com mais de 50% do pescado consumido mundialmente proveniente dessa atividade (Fao, 2020). A tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) destaca-se como uma das espécies mais cultivadas globalmente devido à sua rápida taxa de crescimento e adaptabilidade a diferentes ambientes (Fao, 2021). No estado do Paraná, Brasil, a tilapicultura é uma atividade proeminente, contribuindo significativamente para a oferta de proteína animal (Fao, 2019).

A aplicação do eDNA nesta área permite o monitoramento preciso da biomassa relativa de peixes, promovendo uma abordagem mais sustentável e eficiente na produção aquícola (Deiner and Bik, 2017).

A metodologia de metabarcoding será empregada para analisar a comunidade de peixes presente nos mesocosmos, enquanto a qPCR será utilizada para quantificar o eDNA de espécies específicas, estabelecendo uma correlação entre a quantidade de eDNA detectado e a biomassa de peixes.

A utilização do eDNA na aquicultura representa um avanço significativo na aquicultura de precisão, proporcionando uma abordagem não invasiva e precisa para monitorar a presença de organismos. Este estudo contribui para o desenvolvimento de metodologias mais eficientes e não invasivas para o monitoramento e gestão de recursos pesqueiros, promovendo uma produção aquícola mais sustentável e eficiente.

De modo a cumprir esse objetivo, a tese foi organizada em três capítulos, que são:

Capítulo I: Systematic Review of Advancements and Limitations in Aquatic eDNA Analysis: a PRISMA Approach

Este estudo teve como objetivo realizar uma revisão sistemática utilizando as diretrizes PRISMA para avaliar os métodos e parâmetros empregados na estimativa de biomassa e abundância de organismos aquáticos através de técnicas de DNA ambiental (eDNA). A relevância desse trabalho surge a partir das limitações sobre os fatores que influenciam a eficácia dessas técnicas na predição da biomassa e abundância de organismos. Diante do crescente uso do eDNA em ecologia e conservação, identificar avanços recentes e lacunas de conhecimento torna-se crucial para aprimorar tais metodologias. Através da análise detalhada de 43 documentos científicos, este estudo explora a eficácia das técnicas de análise de eDNA, destacando seu potencial em diversos ambientes aquáticos, incluindo micro e mesocosmos, ambientes de cultivo em escala comercial, grandes rios, sistemas de canais complexos e áreas costeiras e marinhas. A pesquisa revelou a importância crescente e o amplo potencial do eDNA, introduzindo abordagens inovadoras para a detecção, monitoramento e estimativa da biomassa de espécies. Metodologias de eDNA foram utilizadas eficientemente em diferentes ambientes aquáticos, evidenciando a necessidade de aprimoramento contínuo para superar as limitações atuais e maximizar o potencial dessas técnicas na ciência aquática.

Capítulo II: Avaliação da relação entre a biomassa relativa de peixes e a concentração de DNA ambiental em sistema de mesocosmo.

O estudo teve como objetivo avaliar a relação entre a biomassa relativa de peixes e a concentração de DNA ambiental (eDNA) em sistemas de mesocosmo. A motivação para realizar este artigo surgiu das limitações dos métodos tradicionais de amostragem de biomassa, que são dispendiosos, invasivos e logisticamente desafiadores. No contexto atual, a técnica de eDNA apresenta-se como uma alternativa promissora, não invasiva e econômica, capaz de superar essas limitações e oferecer uma estimativa mais precisa da biomassa. O estudo é relevante devido à crescente necessidade de métodos eficientes para monitoramento e gestão de ecossistemas aquáticos, especialmente em face das mudanças ambientais. A pesquisa foi conduzida utilizando mesocosmos para controlar variáveis ambientais e testar diferentes densidades de estocagem de espécies de peixes, como *Oreochromis niloticus* (tilápia-do-Nilo), *Rhamdia quelen* (jundiá), *Astyanax altiparanae* (lambari-do-rabo-amarelo) e *Piaractus mesopotamicus* (pacu). Amostras de água foram coletadas em intervalos regulares, seguidas pela extração e quantificação de eDNA usando qPCR e metabarcoding. Os resultados forneceram dados sobre a taxa de liberação e degradação de eDNA, permitindo a análise da correlação entre a concentração de eDNA e a biomassa de peixes, e destacando o potencial da técnica de eDNA para monitorar ecossistemas aquáticos de maneira mais eficiente e sustentável.

Capítulo III: O objetivo deste estudo foi analisar a correlação entre a biomassa de *Oreochromis niloticus* e a quantidade de DNA ambiental (eDNA) monitorado ao longo de oito meses em seis viveiros de cultivo. Este artigo é relevante no contexto atual, pois a aquicultura tem se tornado uma importante fonte de proteína animal, e métodos precisos de monitoramento da biomassa são essenciais para a gestão sustentável dos recursos aquáticos. A utilização de eDNA para monitorar a biomassa de peixes oferece uma abordagem não invasiva e eficiente, complementando os métodos tradicionais de biometria. Para a realização deste estudo, foram coletados dados mensais de biomassa, ganho de peso diário, taxa de mortalidade e concentrações de eDNA utilizando técnicas de rtPCR em seis viveiros distintos. A análise integrada dos dados permitiu identificar uma correlação positiva moderada a forte entre a biomassa e o eDNA, destacando o potencial do uso de eDNA como uma ferramenta valiosa para o monitoramento ambiental na aquicultura.

Referências

- AMBARDAR, S. et al. High throughput sequencing: an overview of sequencing chemistry. *Indian journal of microbiology*, v. 56, p. 394-404, 2016. ISSN 0046-8991.
- ANDRUSZKIEWICZ, E. Environmental DNA as a Biomonitoring Tool: Investigating Persistence and Transport of eDNA in Marine Water. 2019.
- BENOIT, N. P. et al. Using qPCR of environmental DNA (eDNA) to estimate the biomass of juvenile Pacific salmon (*Oncorhynchus* spp.). *Environmental DNA*, 2023. ISSN 2637-4943.
- DANZIGER, A. M.; FREDERICH, M. Challenges in eDNA detection of the invasive European green crab, *Carcinus maenas*. *Biological Invasions*, v. 24, n. 6, p. 1881-1894, 2022. ISSN 1387-3547.
- DEINER, K.; BIK, E. A. Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Molecular ecology*, v. 26, n. 21, p. 5872-5895, 2017. ISSN 0962-1083.
- DOI, H.; NAKAMURA, K. Environmental DNA as a practical tool for aquatic conservation and restoration. *Landscape and Ecological Engineering*, p. 1-2, 2022. ISSN 1860-1871.
- FAO. The state of world fisheries and aquaculture. 2018. 2019.
- _____. The State of World Fisheries and Aquaculture, 2020. Food & Agriculture Org., 2020. ISBN 9251044929.
- _____. Cultured aquatic species information programme, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2021.
- FICETOLA, G. F. et al. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology letters*, v. 4, n. 4, p. 423-425, 2008. ISSN 1744-9561.
- FOOTE, A. D. et al. Investigating the potential use of environmental DNA (eDNA) for genetic monitoring of marine mammals. 2012. ISSN 1932-6203.
- HARTIG, F. et al. Novel community data in ecology-properties and prospects. *Trends in Ecology & Evolution*, 2024. ISSN 0169-5347.
- HIGUCHI, R. et al. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio/technology*, v. 10, n. 4, p. 413-417, 1992. ISSN 0733-222X.
- HIGUCHI, R. et al. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/technology*, v. 11, n. 9, p. 1026-1030, 1993. ISSN 0733-222X.
- JERDE, C. L. et al. "Sight-unseen" detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conservation letters*, v. 4, n. 2, p. 150-157, 2011. ISSN 1755-263X.

LANCE, R. F. et al. Experimental observations on the decay of environmental DNA from bighead and silver carps. *Management of Biological Invasions*, v. 8, n. 3, 2017. ISSN 1989-8649.

MINAMOTO, T. Environmental DNA analysis for macro-organisms: species distribution and more. *DNA Research*, v. 29, n. 3, p. dsac018, 2022. ISSN 1340-2838.

NAKAMURA, K. Dominant barriers and the solutions to the social application of environmental DNA. *Landscape and Ecological Engineering*, p. 1-8, 2023. ISSN 1860-188X.

OGRAM, A.; SAYLER, G. S.; BARKAY, T. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *Journal of microbiological methods*, v. 7, n. 2-3, p. 57-66, 1987. ISSN 0167-7012.

PAWLOWSKI, J. et al. The future of biotic indices in the ecogenomic era: Integrating (e) DNA metabarcoding in biological assessment of aquatic ecosystems. *Science of the Total Environment*, v. 637, p. 1295-1310, 2018. ISSN 0048-9697.

PONT, D. et al. Quantitative monitoring of diverse fish communities on a large scale combining eDNA metabarcoding and qPCR. *Molecular Ecology Resources*, v. 23, n. 2, p. 396-409, 2023. ISSN 1755-098X.

SLATKO, B. E.; GARDNER, A. F.; AUSUBEL, F. M. Overview of next-generation sequencing technologies. *Current protocols in molecular biology*, v. 122, n. 1, p. e59, 2018. ISSN 1934-3639.

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

THALINGER, B. et al. The effect of activity, energy use, and species identity on environmental DNA shedding of freshwater fish. *Frontiers in Ecology and Evolution*, v. 9, p. 623718, 2021. ISSN 2296-701X.

THOMSEN, P. F. et al. Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. 2012. ISSN 1932-6203.

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.

VENTER, J. C. et al. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *science*, v. 304, n. 5667, p. 66-74, 2004. ISSN 0036-8075.

YANG, J. et al. Unsupervised biological integrity assessment by eDNA biomonitoring of multi-trophic aquatic taxa. *Environment International*, v. 175, p. 107950, 2023. ISSN 0160-4120.

ZHANG, P. et al. Species range shifts in response to climate change and human pressure for the world's largest amphibian. *Science of the Total Environment*, v. 735, p. 139543, 2020. ISSN 0048-9697.

2 CAPÍTULO I: Systematic Review of Advancements and Limitations in Aquatic eDNA Analysis: A Prisma Approach

Fabricio S. Vidal^{1*}, Raissa V. V. Leite^{1,2}, Ana Paula da S. Bertão¹, Giorgi Dal Pont^{1,2}, Aline Horodesky², Otto S. M. Netto², Andréia Szortyka⁴, Adriano Baldissera⁴, Gisela G. C. Westphal⁵, Marcio R. Pie³, Antonio Ostrensky¹

1 Federal University of Paraná, Brazil – Postgraduate Program in Animal Science. Rua dos Funcionários, 1540, Juvevê, Curitiba, PR, Brazil;

2 ATGC Genética Ambiental Ltda. Rua dos Funcionários, 1540, Juvevê, Curitiba, PR, Brazil;

3 Edge Hill University – Biology Department, Ormskirk, Lancashire, UK;

4 Engie Brasil Energia S.A. Rua Paschoal Apóstolo Pítsica, Agrônômica, Florianópolis, SC, Brazil.

5 Universidade Positivo, Campus Ecoville. Rua Professor Pedro Viriato Parigot de Souza, Cidade Industrial, Curitiba, PR, Brazil.

Artigo elaborado segundo as normas da revista *Biological Reviews*.

(Obs: encontra-se em revisão)

Abstract

Environmental DNA (eDNA) techniques are becoming increasingly used worldwide, yet our understanding of the factors determining their performance in predicting organism biomass and abundance is still limited. In this systematic review, conducted under the PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) guidelines, we evaluate methods and parameters employed to estimate the biomass and abundance of aquatic organisms through eDNA. Through detailed analysis of 43 scientific documents, our study explores the efficacy of eDNA analysis techniques, identifies recent advances, and highlights knowledge gaps. We found the growing importance and broad potential of eDNA in ecology and conservation, introducing innovative approaches for detection, monitoring, and estimating the biomass of species. Methodologies of eDNA were efficiently used in various aquatic environments, including micro and mesocosms, commercial-scale cultivation

environments, large rivers, complex canal systems, and coastal and marine areas. However, there is a need for improvement in the phases of collection, preservation, and concentration of eDNA samples, critical steps in the analytical process that require special attention to ensure the original integrity of the eDNA. Thorough documentation of the entire methodologies, from collection to sample processing, was identified as essential to ensure the comparability and reproducibility of results. Moreover, the complexity of aquatic systems seems to require a deeper understanding of hydrology and specific environmental characteristics to apply eDNA techniques and discuss eDNA data effectively. Finally, our review emphasises that eDNA complements traditional sampling methods and taxonomic knowledge, opening a new horizon for ecological studies and managing aquatic ecosystems.

Keywords: biomass, qPCR, metabarcoding, aquatic environment, metagenomic, eDNA

2.1 INTRODUCTION

2.1.1 eDNA: a gateway to aquatic biodiversity

FICETOLA; MIAUD; POMPANON e TABERLET (2008) initially defined environmental DNA (eDNA) as an extensive genomic archive reflecting the diverse organisms inhabiting specific environments and aquatic ecosystems. eDNA includes genetic material ranging from microorganisms such as viruses, bacteria, and protists to remnants of larger multicellular life forms, encompassing zooplankton, meiofauna, plants, invertebrates, and substantial oceanic vertebrates (ZHANG; PAVLOVSKA; STOICA; PREKRASNA et al., 2020). eDNA also can be comprised of all DNA released by an organism, whether as part of membrane-bound cells or organelles or as extracellular DNA, all of which can be isolated from environmental samples (DANZIGER; FREDERICH, 2022; THOMSEN; WILLERSLEV, 2015). Through advection, excretion, reproduction, growth, or post-mortem decomposition (FOOTE; THOMSEN; SVEEGAARD; WAHLBERG et al., 2012; THOMSEN; KIELGAST; IVERSEN; MØLLER et al., 2012), organisms release their DNA into their environment, creating a complex mosaic of biological signatures. These signatures can be in various forms, such as faeces, urine, mucus, and other bodily secretions, as well as through hairs, skin, feathers, scales, and exuviae (BYLEMANS; FURLAN; GLEESON; HARDY et al., 2018; DOI; NAKAMURA, 2022; USHIO; FUKUDA; INOUE; MAKOTO et al.,

2017; VEILLEUX; MISUTKA; GLOVER, 2021; ZHANG; ZHOU; JIAO; XIE et al., 2024). This intricate mix of genomic material can be used as a collective genetic signature of individuals thriving in a specific ecosystem. This genetic footprint can be sampled, extracted, and analysed from identified in different environmental matrices such as water, sediment, ice, air, or soil (ZHANG; PAVLOVSKA; STOICA; PREKRASNA et al., 2020).

In aquatic environments, whether suspended in the water column or settling down in the sediment, eDNA offers a non-invasive, sensitive, and versatile approach for monitoring species presence, deciphering population compositions, and estimating biomass and abundance of species, including those that are invasive, rare, or endangered (ANDRUSZKIEWICZ, 2019; DÍAZ-FERGUSON; MOYER, 2014; DOI; NAKAMURA, 2022; PONT; MEULENBROEK; BAMMER; DEJEAN et al., 2023; REES; MADDISON; MIDDLEDITCH; PATMORE et al., 2014; THOMSEN; WERNBERG; SCHIEL, 2015). The persistence of these genetic remnants in various environments, from a few hours to millennia, underscores eDNA's role as a powerful tool in generating previously inaccessible or undetectable environmental data.

2.1.2 Techniques involved in eDNA studies

Accurately quantifying the biomass or abundance of aquatic organisms through eDNA analysis is a big challenge. First, the heterogeneity of environmental parameters that can affect the concentration and integrity of eDNA poses difficulties in accurately quantifying biomass or abundance of organisms that generated the DNA (YANG; ZHANG; MU; WANG et al., 2023). Variations in the concentration and integrity of eDNA make it challenging to correlate it directly with organismal biomass (JOSEPH; FAIQ; LI; CHEN, 2022). Methodological processes for using eDNA as a quantitative biodiversity indicator are continually refined to address these questions, underscoring the importance of considering these factors and improving analytical methods to quantify aquatic biodiversity accurately. Significant advancements in eDNA technology are attributed to DNA sequencing, particularly the Sanger method (SANGER; COULSON, 1975; SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977), and polymerase chain reaction (PCR) technologies, notably real-time quantitative PCR (qPCR), which has evolved rapidly due to its precision and sensitivity (HIGUCHI; DOLLINGER; WALSH; GRIFFITH, 1992; HIGUCHI; FOCKLER; DOLLINGER; WATSON, 1993; NAVARRO; SERRANO-HERAS; CASTAÑO; SOLERA, 2015).

The application of eDNA in detecting bacterial communities in marine sediments began in the late 1980s (OGRAM; SAYLER; BARKAY, 1987) and has evolved into a non-invasive method for species detection and distribution mapping (JERDE; MAHON; CHADDERTON; LODGE, 2011; TABERLET; WAITS; LUIKART, 1999). It was also used for monitoring changes in bacterial community biomass and blooms (Bailiff and Karl, 1991; Paul et al., 1996; Weinbauer et al., 1993), with eDNA classified based on particle size into particulate DNA (P-DNA) and dissolved DNA (D-DNA) (PAUL; KELLOGG; JIANG, 1996). The application of complete metagenome sequencing to eDNA samples significantly expanded the identifiable genetic material (VENTER; REMINGTON; HEIDELBERG; HALPERN et al., 2004).

The introduction of second and third-generation sequencing platforms after 2005 marked a revolution in life sciences, including Ion Torrent, Roche, 454 Life Sciences/Roche Diagnostics GS FLX, Genome Analyzer, HiSeq, MiSeq, NextSeq by Illumina, Inc., and SOLiD by ABI (AMBARDAR; GUPTA; TRAKROO; LAL et al., 2016; SLATKO; GARDNER; AUSUBEL, 2018), along with subsequent developments like the Helicos Genetic Analysis System, SMRT Sequencing by Pacific Biosciences, Nanopore Sequencing by Oxford Nanopore, and Complete Genomics (AMBARDAR; GUPTA; TRAKROO; LAL et al., 2016). These technologies have improved detection rates and reduced errors, albeit eDNA analysis techniques are still developing. The initial use of eDNA to confirm the presence of an invasive species in 2008 (FICETOLA; MIAUD; POMPANON; TABERLET, 2008) and subsequent applications in marine environments for genetic monitoring and biodiversity estimation have rapidly expanded, with significant reviews and studies published since then (FOOTE; THOMSEN; SVEEGAARD; WAHLBERG et al., 2012; THOMSEN; KIELGAST; IVERSEN; WIUF et al., 2012; YOCCOZ, 2012), underscoring the field's dynamic nature and the continual need for innovation and refinement.

2.1.3 Applications of eDNA in aquatic environment studies

Recent advancements in DNA sequencing technology have boosted the proliferation of eDNA-based techniques, leading the field to be recognized as a sophisticated tool of molecular biology to detect and monitor species in various environments (Smith, 2017; Sigsgaard *et al.*, 2020; Minamoto, 2022; Nakamura, 2023). These methodologies enhance efficiency, enabling routine detection and potential quantification of hundreds or thousands of species, significantly broadening

the scope of biodiversity surveys (Hartig *et al.*, 2024). Recent innovations have expanded the potential applications of eDNA in environmental sciences in less than four decades. In (Table 1), we categorized these applications into five key areas relevant to the research and development of aquatic environments: "Biodiversity Monitoring and Assessment", "Invasive Species Management and Conservation", "Environmental Impact and Biomonitoring", "Pathogen Surveillance and Disease Vector Tracking", and "Technological Development and Methodological Advancements", highlighting the continuous progress and refinement of eDNA methodologies and assays, both in expanding new applications and enhancing existing ones.

Table 1. Uses and applications of eDNA in aquatic ecosystems.

Primary purposes	Applications	References
Biodiversity monitoring and assessment	Detection and quantification of organisms in natural or artificial aquatic habitats	Takahara <i>et al.</i> (2012); Peters <i>et al.</i> (2018); Murienne <i>et al.</i> (2019); Milhau <i>et al.</i> (2021); (Rourke <i>et al.</i> , 2021); Spear <i>et al.</i> (2021)
	Analysis of species diversity, richness, and population structure.	Beng and Corlett (2020); Andres <i>et al.</i> (2023); Cheng <i>et al.</i> (2023); Zhang <i>et al.</i> (2024);
	Global species diversity census.	Marques <i>et al.</i> (2021); Juhel <i>et al.</i> (2022)
	Monitoring of aquatic plants and microorganism communities.	Scriver <i>et al.</i> (2015); Matsushashi <i>et al.</i> (2016); Solarz <i>et al.</i> (2020); Li <i>et al.</i> (2023)
	Understanding of ecological and behavioural interactions	De Sousa <i>et al.</i> (2019); Harper <i>et al.</i> (2019); Riaz <i>et al.</i> (2023)
Invasive species, management, and conservation	Detection and monitoring of invasive species.	Boeger <i>et al.</i> (2007); Pie <i>et al.</i> (2017); King <i>et al.</i> (2022); Sepulveda <i>et al.</i> (2020)

Primary purposes	Applications	References
	Identification, monitoring, and protection of rare or endangered aquatic organisms.	Rees <i>et al.</i> (2014); Ma <i>et al.</i> (2016); (Senapati <i>et al.</i> , 2019)
	Monitoring the distribution of invasive species in large riverine or marine systems.	Hanxi <i>et al.</i> (2019); Leblanc <i>et al.</i> (2020); Dubreuil <i>et al.</i> (2022); Fonseca <i>et al.</i> (2023)
	Study of specific species and subspecies.	Hunter <i>et al.</i> (2018); Takeuchi <i>et al.</i> (2019)
Environmental impact and biomonitoring	Understanding the impacts of human activities on aquatic biodiversity.	Pukk <i>et al.</i> (2021); Cheng <i>et al.</i> (2023); Papaioannou <i>et al.</i> (2023)
	Ecological biomonitoring in rivers, lakes, and bays.	Stat <i>et al.</i> (2017); Carraro <i>et al.</i> (2021); Zhang, L. <i>et al.</i> (2022); Schenekar (2023)
	Development of biotic indices based on eDNA for water quality assessment.	Pawlowski <i>et al.</i> (2018); Uchida <i>et al.</i> (2020)
Pathogen surveillance and disease vector tracking	Detection of disease vectors.	Alzaylaee <i>et al.</i> (2020); Amarasiri <i>et al.</i> (2021); (Sakata <i>et al.</i> , 2022)
	Tracking of pathogens and parasites in aquatic environments.	Huver <i>et al.</i> (2015); Sieber <i>et al.</i> (2020); Bass <i>et al.</i> (2023)
	Identification of species in sediments.	Bass <i>et al.</i> (2015); Douchet <i>et al.</i> (2022); Liao <i>et al.</i> (2023)
Technological development and Methodological advancements:	Develop, test, and validate eDNA assays for specific species.	Troth <i>et al.</i> (2020); Thalinger, Deiner, <i>et al.</i> (2021)
	Estimation of biomass of aquatic species using non-invasive methods.	Chimienti <i>et al.</i> (2019); Wang <i>et al.</i> (2021)
	Development of new methods using eDNA and next-generation sequencing.	Othman <i>et al.</i> (2023); Sahu <i>et al.</i> (2023)

Primary purposes	Applications	References
	Development of equipment for <i>in situ</i> measurements	Hansen <i>et al.</i> (2020); Hendricks <i>et al.</i> (2023); Elumalai <i>et al.</i> (2024)

2.1.4 Objective

In this study, we conducted a systematic review following PRISMA guidelines to examine the methods and parameters used in eDNA studies, with a particular interest in studies that used this technique to determine the biomass/abundance of aquatic organisms. We aim to elucidate the efficacy of eDNA analysis techniques, identify and incorporate recent advancements, and pinpoint knowledge gaps, thus contributing to advancing more accurate and sophisticated methodologies in aquatic science.

2.2 METHODS

A systematic literature search was conducted based on the PRISMA methodology - Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-Analyses (Page *et al.*, 2021), with Google Scholar and Semantic Scholar being the leading search platforms. Scientific articles, technical reports, books, book chapters, case studies, dissertations and theses published up to March 2023 and containing in their title, abstract and/or keywords the terms listed in (Table 2) were examined.

Table 2. Search terms applied in identifying scientific literature and articles concerning the application of environmental DNA in assessing biomass and population levels of aquatic species.

Group	Combinations
I	"biomass" AND "environmental DNA" AND "aquatic organisms".
II	"eDNA" AND "metagenomics" AND biomass AND "aquatic organisms".
III	"environmental DNA" AND "biomass" AND "aquatic organisms" AND "polymerase chain reaction".

The subsequent step was to identify the articles and sort the documents according to criteria based on the results obtained. For selection, the studies needed to:

- (i) Relate to the use of eDNA in monitoring or quantifying aquatic organisms;

- (ii) Show the relationship between the amount of environmental DNA and the abundance or biomass (total or relative) of aquatic organisms, and;
- (iii) Present the methods and techniques used to determine the relative biomass of aquatic organisms based on the number of environmental DNA sequences sampled for a given species.

The studies were selected based on these criteria and evaluated with the Mendeley Reference Manager software 2021 version 2.54.0 (Elsevier, Netherlands).

At the end of this step, the documents identified during the search were preselected, and duplicate files were eliminated. In the following round, the studies were evaluated and selected based on the title's relevance, followed by the abstract and complete reading of the document. The entire selection and review process is summarized in (Table 3).

Table 3. Sequential selection stages adopt the Prisma framework for identifying methods and strategies in utilizing eDNA to gauge diverse aquatic organism groups' quantity, abundance, or biomass.

Phase 1: Pre-identification	Number of documents
Number of identified documents	2,979
Documents from another source	0
Total number of identified documents	2,979
Duplicate documents	844
Phase 2: Selection	Number of documents
Documents selected after the exclusion of duplicates	2,135
Exclusion of documents not meeting the defined criteria	974
Phase 3: Eligibility	Number of documents
Documents assessed for eligibility	127
Excluded documents	43
Documents evaluated through full reading	43
Final Result: Total number of included documents	43

Upon completing the final phase of document selection, categorical and numerical data were organized into tables. The data used included a variety of parameters such as the type of environment (marine or freshwater) where eDNA analysis techniques were used; experimental design, whether in controlled environment or situ; details on filtration methods including filter material, pore size, and the interval between collecting water and filtration; approaches used for DNA

extraction; primers employed; and the techniques used to quantify the abundance or biomass of eDNA in water samples. These compiled tables formed the basis for undertaking our review.

Graphs (Sankey diagram, scatter plot, bar chart, and co-occurrence graph) were generated from the tabulated data using Python language (and libraries such as pandas, nltk, sklearn.cluster, prince, matplotlib.pyplot, and plotly.graph_objects) (Python Software Foundation, 2023). The word co-occurrence graph was generated exclusively using texts from the Materials and Methods section of the previously selected articles. Multiple Correspondence Analysis (MCA) was employed with K-means clustering (Hwang *et al.*, 2006).

2.3 PRISMA RESULTS

2.3.1 Study characterization

Table 4 compiles a comprehensive list of 43 studies (including 6 theses, 4 dissertations, and 33 articles published across 19 scientific journals) focusing on the application of eDNA for monitoring and estimating the biomass and abundance of various aquatic organisms. The collection encompasses a range of investigative goals, from the early work of ABATO (2010), focusing on using eDNA to detect and monitor jellyfish populations, to more recent studies like GEORGE; BALDIGO; REES; BARTRON *et al.* (2023), assessing the distribution and abundance of American Eels.

The goals of the studies in question vary, encompassing the development of non-invasive eDNA methods for biomass estimation, understanding the dynamics of eDNA in different environmental compartments, and enhancing the precision and reliability of eDNA for monitoring various aquatic species. Methodologically, these studies use a range of approaches, such as optimizing qPCR assays, assessing the influence of environmental factors on the capture and degradation of eDNA, and developing innovative techniques like droplet digital PCR and next-generation sequencing to improve detection and quantification. The complete data underpinning this and other analyses are available online as supplementary material.

Table 4. Synthesis of eDNA approaches for biomass and abundance estimation in aquatic ecosystems.

ID	Reference	Main objective
1	Abato (2010)	Use eDNA to detect and monitor the distribution and abundance of <i>Chrysaora hysoscella</i> (compass jellyfish) in the North Sea, enhancing

ID	Reference	Main objective
		the understanding of jellyfish population dynamics using a novel approach in marine ecosystem monitoring.
2	Takahara <i>et al.</i> (2012)	To develop a non-invasive eDNA method to estimate fish biomass, focusing on the common carp as a model, optimising methods in various conditions, and validating the approach in a natural lagoon setting.
3	Maruyama <i>et al.</i> (2014b)	To determine the effect of the fish developmental stage on eDNA release rate using bluegill sunfish, equilibrium times and degradation rates were examined to inform accurate eDNA-based biomass estimations.
4	Everhart <i>et al.</i> (2015)	To understand the fate and transport of vertebrate eDNA in aquatic environments, investigate its partitioning in different compartments like sediment and water, and correlate eDNA concentration with the biomass or population size of the organisms. The goal is to enhance the application of eDNA monitoring for environmental engineering.
5	Hinkle (2015)	To develop and validate eDNA methods for monitoring Atlantic Sturgeon in the James River, Virginia, using genetic markers to distinguish them from co-occurring fish taxa and to assess the presence and potential relative abundance through qPCR. The study also aims to provide recommendations for future eDNA monitoring in large river systems.
6	Lacoursière-Roussel <i>et al.</i> (2016)	To enhance understanding of eDNA's relationship with fish abundance/biomass, examining effects of water temperature and filter efficacy in eDNA capture, using Brook Charr as a model. Their goal is to optimize eDNA methods for accurate fish population assessments.
7	Odero (2016)	To develop and validate eDNA techniques for detecting and quantifying <i>Anopheles gambiae</i> mosquito larvae in artificial aquatic habitats, comparing extraction methods, and optimizing qPCR assays for accurate species identification and abundance correlation. The goal is to enhance larval sampling in mosquito monitoring and control.
8	Baldigo <i>et al.</i> (2017)	To evaluate the efficacy of eDNA analysis for assessing Brook Trout populations in headwater streams, focusing on refining sampling methods, determining the accuracy of presence/absence predictions, and exploring eDNA's capability in predicting fish density and biomass.

ID	Reference	Main objective
9	Kamoroff and Goldberg (2018)	<p>The goal is to enhance population assessment tools in ecological studies.</p> <p>To understand the relationship between eDNA quantity and fish abundance/biomass, particularly assessing how well eDNA quantification reflects fish population changes in a spatial and temporal context during a fish removal project. They focus on the potential of eDNA quantification for species management and conservation, acknowledging the need for further research for its application in management contexts.</p>
10	Mizumoto <i>et al.</i> (2018)	<p>To develop an eDNA method for detecting and estimating the biomass of the critically endangered Sakhalin taimen, utilizing species-specific primers and probes. The study tests the correlation of eDNA concentration with fish density and body size in aquarium settings and seeks to understand the viability of eDNA as an indicator of biomass for the conservation and monitoring of this endangered species.</p>
11	Nevers <i>et al.</i> (2018)	<p>Focus on quantifying the elusive round goby (<i>Neogobius melanostomus</i>) using eDNA to determine DNA shedding rates decay time in mesocosms and validate eDNA as a monitoring tool against traditional sampling methods.</p>
12	Nygaard (2018)	<p>To investigate the potential of eDNA for detecting and quantifying salmon lice in salmon farms, comparing eDNA to manual counting and aiming to reduce fish handling and stress.</p>
13	Bylemans <i>et al.</i> (2018)	<p>To understand the relative abundance and decay rates of different lengths of mitochondrial and nuclear eDNA fragments in water samples, focusing on improving aquatic biodiversity monitoring using eDNA.</p>
14	Schloesser <i>et al.</i> (2012)	<p>To validate eDNA to correlate with sea lamprey density in laboratory settings, with potential application to improve stream population assessments and invasive species control efforts.</p>
15	Tillotson <i>et al.</i> (2018)	<p>To determine if eDNA concentrations reliably indicate sockeye salmon abundance, studying eDNA's spatial-temporal dynamics and its potential as a conservation tool.</p>
16	Capo <i>et al.</i> (2019)	<p>To link eDNA concentrations with fish populations in lakes using droplet digital PCR, assessing the method's reliability against traditional gillnetting and examining factors affecting eDNA detection.</p>

ID	Reference	Main objective
17	Knudsen <i>et al.</i> (2019)	To develop species-specific qPCR systems for detecting eDNA from crucial commercial fish species in the Baltic Sea and assess its correlation with traditional fish stock monitoring methods.
18	Yoshitake <i>et al.</i> (2019)	To develop HaCeD-Seq, a novel method using environmental DNA (eDNA) and next-generation sequencing (NGS) to estimate freshwater eel population abundance more accurately.
19	Brys <i>et al.</i> (2020)	To develop and validate a novel eDNA-based digital droplet PCR (ddPCR) method for the reliable detection and quantification of the European weather loach (<i>Misgurnus fossilis</i>) across various habitats.
20	Capo <i>et al.</i> (2020)	To assess the impact of filtration methods and water volume on quantifying eDNA concentrations for brown trout and Arctic char using droplet digital PCR.
21	Fossøy <i>et al.</i> (2020)	To evaluate environmental DNA (eDNA) as a monitoring tool for detecting and assessing the relative abundance of the invasive ectoparasite <i>Gyrodactylus salaris</i> and its host, Atlantic salmon, as well as <i>G. derjavinoides</i> and its host, brown trout, in the River Driva, Norway.
22	Greiner-Ferris (2020)	To design and optimize PCR primers to detect and quantify bottlenose dolphin eDNA in marine environments and assess the correlation between eDNA concentration, dolphin abundance, and seasonality.
23	Johnsen <i>et al.</i> (2020)	To evaluate eDNA against traditional monitoring for noble crayfish presence/absence and to assess if eDNA concentrations reflect crayfish population density.
24	Kanawi (2020)	To compare eDNA and traditional methods for assessing out-migrating Coho Salmon abundance in two Humboldt County watersheds, correlating eDNA concentrations with salmon abundance and water quality.
25	Weldon <i>et al.</i> (2020)	To compare eDNA sampling with traditional fyke-net fishing for detecting European eels in Irish lakes, focusing on its effectiveness in areas with low eel populations.
26	Bergson (2021)	To assess the detectability and distribution of <i>Mysis diluviana</i> eDNA in aquatic ecosystems, aiming to improve eDNA sampling methods for ecological monitoring.
27	Boivin-Delisle <i>et al.</i> (2021)	To compare eDNA metabarcoding with gillnet surveys for monitoring fish communities, focusing on accuracy and cost-effectiveness.

ID	Reference	Main objective
28	Coyne (2021)	To assess eDNA methods for predicting weekly Chinook salmon abundance, compare these to traditional Klamath River trapping techniques.
29	Fu'adil Amin <i>et al.</i> (2021)	To develop a quantitative PCR (qPCR) assay for monitoring four salmon species in Korean rivers using environmental DNA (eDNA). The study focused on designing species-specific primers, evaluating their performance and reliability, and introducing a standardized method for quantifying eDNA concentrations.
30	Fukaya <i>et al.</i> (2021)	To estimate fish population abundance by integrating eDNA data and hydrodynamic modelling, focusing on the Japanese jack mackerel in Maizuru Bay, Japan.
31	Kirtane <i>et al.</i> (2021)	To develop qPCR assays for three fish species, determine their eDNA shedding and decay rates, and compare eDNA analysis with traditional trawl surveys for fisheries management.
32	Miyazono <i>et al.</i> (2021)	To evaluate the effectiveness of eDNA methods for detecting and estimating the abundance of the invasive aquatic plant <i>Egeria densa</i> in flowing water habitats, finding eDNA more effective than traditional sampling methods.
33	Sato <i>et al.</i> (2021)	To use eDNA metabarcoding to assess fish distributions around artificial reefs in Tateyama Bay, Japan.
34	Sepulveda <i>et al.</i> (2021)	To investigate the relationship between eDNA concentration and trout abundance in streams, finding variable correlations across species and sites and suggesting further refinement in eDNA methodologies for reliable fish abundance estimation.
35	Tian (2021)	To use UAV imaging and eDNA to study harmful cyanobacterial algal blooms in Dog Lake, finding critical environmental factors influencing bloom distribution and intensity and demonstrating the effectiveness of these techniques for monitoring blooms.
36	Trimbos <i>et al.</i> (2021)	To explore the relationship between environmental DNA (eDNA) concentrations and the densities of exoskeleton-shedding invertebrates, specifically <i>Daphnia magna</i> , and assess the impact of water homogenization on this relationship.
37	Yates, Matthew C. <i>et al.</i> (2021)	To enhance the predictive accuracy of models linking eDNA concentrations to organism abundance by incorporating allometric

ID	Reference	Main objective
38	Yoshitake <i>et al.</i> (2021)	scaling coefficients, addressing variations in organism size and biomass distribution. To enhance the precision of models connecting eDNA concentrations with organism abundance. They achieved this by integrating allometric scaling coefficients, considering variations in organisms' size and biomass distribution.
39	Bradley <i>et al.</i> (2022)	To assess the effectiveness of environmental DNA (eDNA) methods in detecting early life stage fish at an industrial site's outflow, comparing eDNA detections with standard monitoring techniques and evaluating their utility for relative abundance assessments.
40	Tsuji <i>et al.</i> (2022)	To assess the qMiSeq approach for quantitative environmental DNA metabarcoding as a tool for fish community monitoring, comparing it with traditional fish capture survey data.
41	Yates <i>et al.</i> (2022)	To investigate interspecific allometric scaling in eDNA production among Atlantic fishes and develop an online tool to integrate allometry in eDNA/abundance relationships, finding that considering allometry improves correlations between eDNA data and organism abundance.
42	Zhang, J. <i>et al.</i> (2022)	To study the effects of water pH and temperature on environmental DNA (eDNA) concentration and to explore the relationship between eDNA concentration and biomass of <i>Schizothorax prenanti</i> in still water, considering varying body sizes and compositions.
43	George <i>et al.</i> (2023)	To evaluate the distribution and abundance of American Eels in the Mohawk River watershed, identify barriers to their upstream movement, and inform conservation efforts.

About 23.8% of the selected documents are theses and dissertations, i.e., academic works of a scientific nature that differ from traditional scientific publications, mainly in terms of the peer review process. Among the scientific articles analysed, "Environmental DNA" was the journal chosen to publish 19.0% of the selected articles. Following, in order, were "PloS One" (9.5%), "Limnology" and "Scientific Reports" (7.1%), "Molecular Ecology" and "Transactions of the American Fisheries Society" (4.8%), with the rest contributing one article each (2.4%) in the selection made. The studies encompass a wide array of taxonomic groups, with Actinopterygii constituting the majority (73.8%), followed by Cnidaria, Insecta, Copepoda, Cephalaspidomorpha, Platyhelminthes, Mammalia, Malacostraca, and Angiosperms, each with one study

(2.4%). In total, the selected articles cite more than 60 species. The majority of the selected works are from 2021 (30.9%), followed by 2020 (16.7%) and 2018 (14.3%). In (Figure 1), it is possible to see how these factors relate to each other and the year of publication.

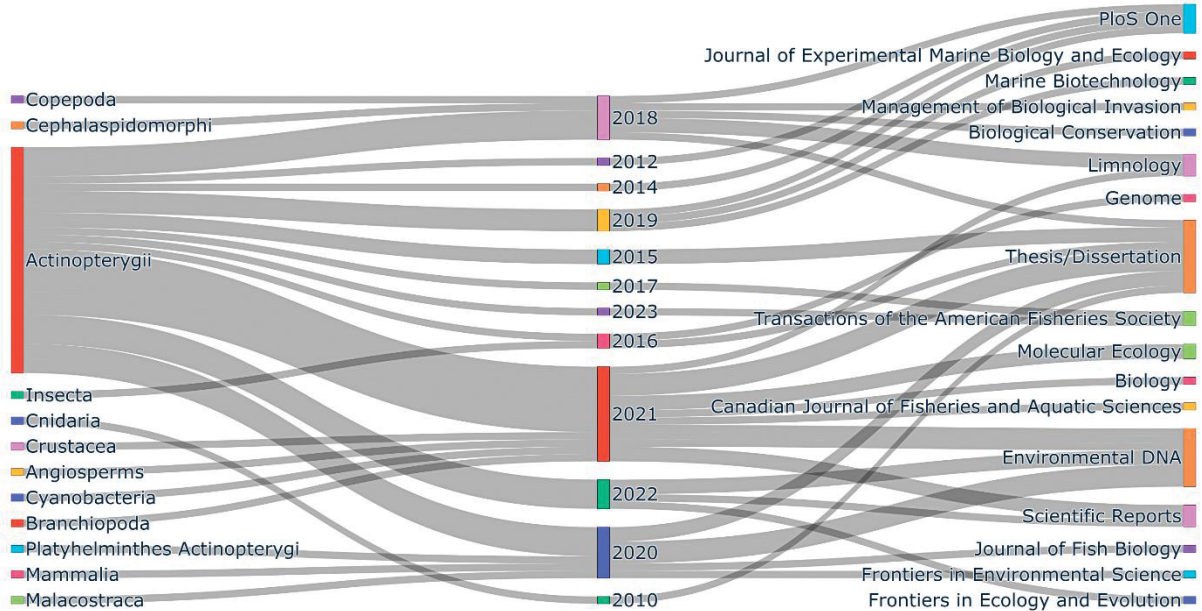


Figure 1. Mapping the evolution of eDNA aquatic research: a Sankey Diagram overview of taxonomy, publication timeline, and research sources.

A significant prevalence of studies was conducted in freshwater environments (78.6%), as opposed to marine environments (21.4%), although not all authors were consistently clear in presenting the studied environment or its salinity. Approximately 33.3% of the studies were conducted under controlled conditions, 59.5% under uncontrolled conditions, and 7.1% under a combination of controlled and uncontrolled conditions.

2.3.2 Keywords

Figure 2 illustrates the interactions among the key terms used in the materials and methods section of the 43 documents through a complex co-occurrence network graph. In this graph, nodes represent unique words categorized as special (terms of interest selected by the authors) or keywords (most cited in the analysed articles). Connections, or edges, indicate the co-occurrence between these words, with the thickness of the edges reflecting the frequency of co-occurrence and being adjusted for clarity of visualization. The colour bar, or colour scale, to the network's right represents a third dimension of data in a two-dimensional form. Within this network

context, the scale titled "Edge Weight Proportionality" indicates the relevance of a term, not just by the number of its connections but also by the significance of these connections. Darker tones on the scale correspond to higher centrality, with numerical values ranging from 0 to 10, representing the quantification of centrality measurement.

Some relationships are particularly notable. For instance, the term "eDNA" stands out as a central point in the analysis and is strongly linked to "abundance", "fish", and "tank" since a significant portion of the articles dealt with the analysis of eDNA generated by fish in experimental or cultivation conditions. Other evident thematic areas include water quality ("water", "pollution", "contamination", "eutrophication"), salmon health ("salmon", "disease", "parasite", "mortality"), DNA analysis ("DNA", "qPCR", "sequencing"), and environmental monitoring ("monitoring", "biomonitoring", "indicator"). It is also observed that some keywords are central to the network. "Water", for instance, links all groups, which is pertinent given that the exclusive focus was on aquatic environments. "DNA" and "eDNA" connect to groups related to "water quality", "salmon health", and "DNA analysis", highlighting their critical roles in the overarching research themes.

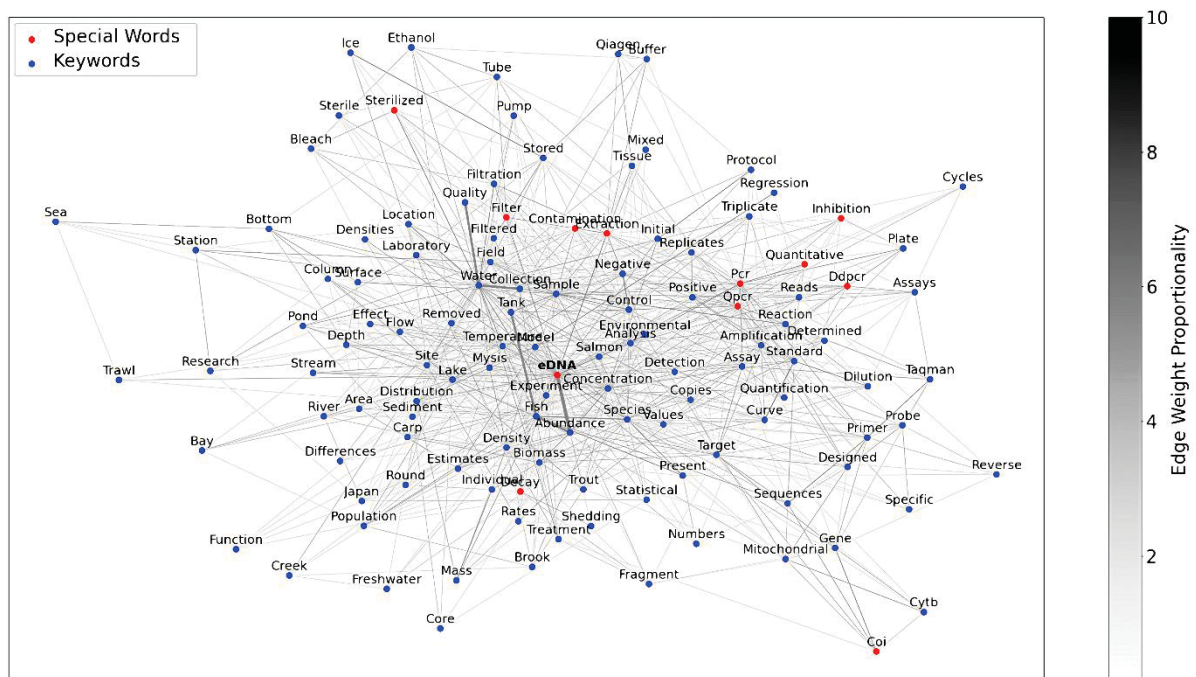


Figure 2. The word association graph was obtained from the co-occurrence analysis of words in the Materials and Methods section of the selected scientific articles.

2.3.3 Sample collection

In the selected studies, the depths at which samples were collected varied from 0 m (characterized when authors explicitly stated that collections were made at

the surface of the water column when laboratory studies were conducted using containers less than 1 m in height or when collections were made in systems maintained under constant aeration/agitation) to depths of over 90 m. In most cases (53.5%), collections were made at depths between 0 and 1 m (Table 2S).

As shown in (Figure 3), about half of the researchers reported adopting immediate procedures to preserve eDNA post-collection. Approximately 22% of the analysed studies did not detail the time interval between sample collection and fixation, an essential process to prevent the natural degradation of the genetic material in the eDNA samples. In some cases, preservation was limited to cooling for up to 24 hours, a method insufficient to prevent degradation and loss of the original DNA concentration.

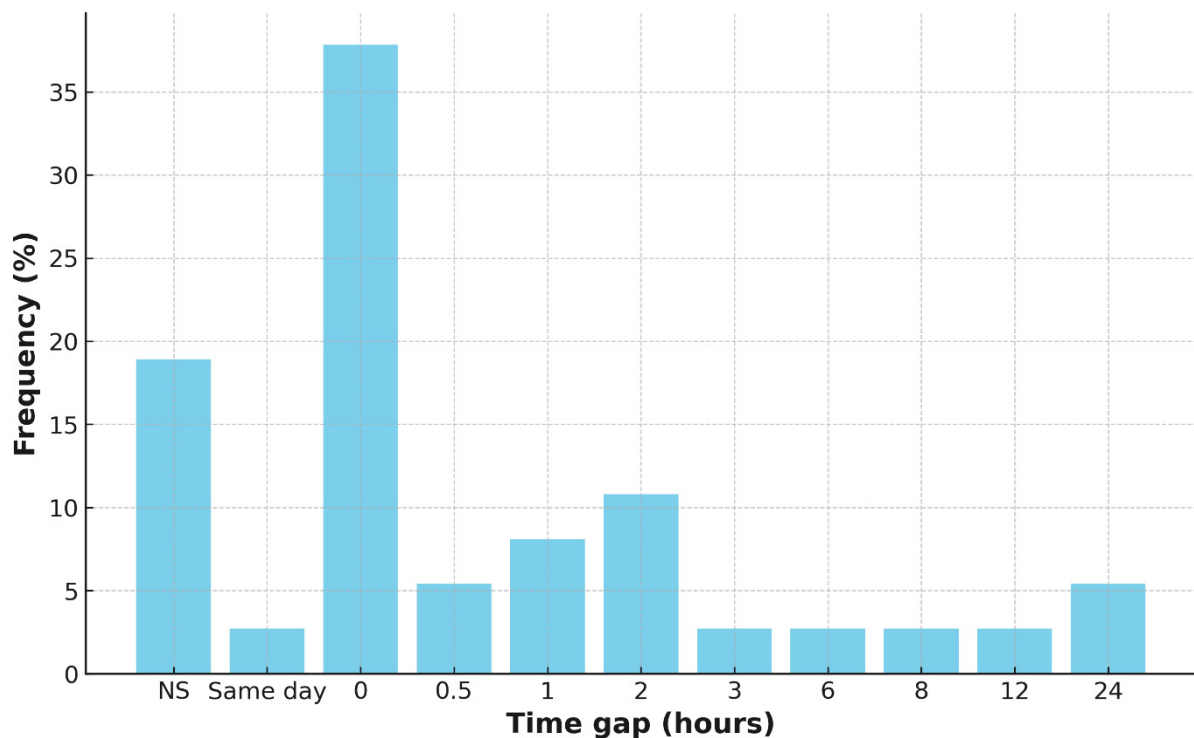


Figure 3. The frequency of the time gap from collection to preservation of eDNA is present in the samples of each study. NS = Non-specified.

2.3.4 Filters and filtration

Samples were collected from diverse environments (lakes, rivers, aquaculture systems, microcosms, and mesocosms) at various depths - from the surface to 92 metres; and subjected to different procedures until DNA extraction. This procedure involves varying time intervals and conditions that affect the decay of original eDNA concentrations. For example, at least six types of filters – in order, Glass Microfiber Filters (GF), Polyethersulfone (PES), Cellulose Nitrate (CN), Mixed Cellulose Ester

(MCE), Polycarbonate (PCTE), and Sterivex Filter Cartridge (PVDF), in addition to two other methods (precipitation and centrifugation), were utilised in the studies. Only the latter filter was not used in freshwater habitats, and the CN was not employed in marine waters, indicating that salinity does not appear to be a limiting factor concerning the filter to be used. The GF Filters were the most frequently used, mentioned 22 times in freshwater and twice in marine water. The PES filters followed, with 7 mentions in freshwater and three in marine applications, followed by MCE and PCTE (Figure 4).

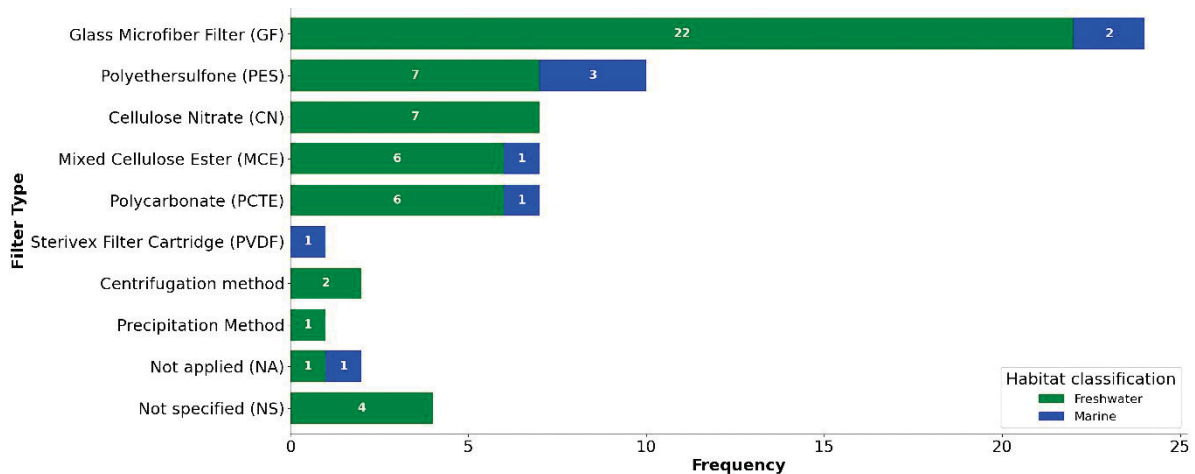


Figure 4. Distribution of filter types across freshwater and marine habitats in eDNA studies. The numbers on each bar reflect the quantity of research conducted in each water category.

At least 16 procedures have been identified regarding the preservation of eDNA from the moment of collection until the samples are ready for extraction. These methods include preserving samples on ice until laboratory arrival, freezing samples on dry ice, and freezing filters on dry ice after filtration. Some protocols involve using benzalkonium chloride (BAC) for sample preservation and storage in a thermal box. Filtration followed by maintenance of filters on ice and subsequent transfer to freezers at temperatures ranging from -16 to -80 °C was also documented. Transferring filters to sterile plastic bags with desiccant silica for refrigeration and maintaining filters in storage buffer vials at room temperature are additional noted methods. Techniques such as the direct freezing of filters at -20 °C, preservation in ethanol or absolute ethanol with sodium acetate, the use of RNAlater, and 2% cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) extraction solution for freezer storage are also included (Table 5).

Table 5. Procedures adopted for the conservation of eDNA in collected samples.

References	Sample handling procedures
Fu'adil Amin <i>et al.</i> (2021); Fukaya <i>et al.</i> (2021); Hinkle (2015); Greiner-Ferris (2020); Lacoursière-Roussel <i>et al.</i> (2016); Yates <i>et al.</i> (2022); Yates, Matthew C <i>et al.</i> (2021)	Preservation of samples on ice until arrival at the laboratory.
Everhart <i>et al.</i> (2015)	Freezing of samples on dry ice.
Baldigo <i>et al.</i> (2017); Bergson (2021); Boivin-Delisle <i>et al.</i> (2021); Kirtane <i>et al.</i> (2021); Yates, Matthew C <i>et al.</i> (2021)	Filtration and freezing of filters on dry ice.
Miyazono <i>et al.</i> (2021); Tsuji <i>et al.</i> (2022)	Preservation of samples with benzalkonium chloride (BAC) and storage in a thermal box.
George <i>et al.</i> (2023); Greiner-Ferris (2020); Johnsen <i>et al.</i> (2020)	Filtration, maintenance of filters on ice, transfer to a freezer (-16 to -20 °C).
Nygaard (2018)	Filtration, maintenance of filters on ice, transfer to a freezer at -80 °C.
Hansen <i>et al.</i> (2020); Nevers <i>et al.</i> (2018); Yoshitake <i>et al.</i> (2019)	Filtration, freezing of filters in a freezer between -20 and -25 °C.
Sepulveda <i>et al.</i> (2021)	Filtration; transfer filters to sterile plastic bags with desiccant silica storage in a refrigerator.
Fossøy <i>et al.</i> (2020); Fu'adil Amin <i>et al.</i> (2021); Weldon <i>et al.</i> (2020)	Filtration, transfer of filters to storage buffer vials, and maintenance at room temperature.
Abato (2010); Capo <i>et al.</i> (2019); Coyne (2021); Kanawi (2020)	Filtration and direct freezing of filters at -20 °C.
Bradley <i>et al.</i> (2022); Mizumoto <i>et al.</i> (2018); Odero (2016); Schloesser <i>et al.</i> (2012); Tillotson <i>et al.</i> (2018); Trimpos <i>et al.</i> (2021); Yoshitake <i>et al.</i> (2021)	Filtration and preservation of filters in ethanol (ethanol solutions from 70 to 100%).
Maruyama <i>et al.</i> (2014b)	Filtration and preservation of filters in absolute ethanol and sodium acetate.

References	Sample handling procedures
Sato <i>et al.</i> (2021); Takahara <i>et al.</i> (2012)	Filtration, preservation of filters in RNAlater and storage in a freezer.
Tian (2021)	Filtration and preservation of filters in 2% cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) extraction solution and storage in a freezer.
Brys <i>et al.</i> (2020)	Air drying of filter storage at -21°C in BlueLine boxes until DNA extraction.
Bergson (2021)	Storage of filters in sterilized bottles from Your Science Hub.

A range of pore sizes - from 0.22 μm to 3 μm ; varying volumes - from 15 mL up to 20,000 mL were employed. Analysing the data from (Figure 5. Relationship between filter pore size and analysed volume across different studies., through a scatter diagram with a Loess curve (locally estimated scatterplot smoothing) and Spearman and Kendall correlation (whose coefficients do not require normality and are less affected by outliers and skewed distributions), in general, there seemed to be a positive relationship between filter pore size and analysed volume. In other words, the authors tended to filter larger volumes using filters with larger pores. However, this trend was weak and not statistically significant (Spearman correlation coefficient = 0.13, $p > 0.05$).

species identification, was utilized in 27.3% of the cases. Both markers are widely recognized for their high variability and efficacy in differentiating closely related species. Other markers, such as the D-loop, used at 7.3%, and 12S rRNA, at 3.6%, demonstrated their utility in specific contexts. Additional markers, including MiFish-U and ND2, each used in 3.6% of studies, along with 16S rRNA, BRK2, CoxII, CytC, IGS, mcyE, mtDNA-nd4, ND1, all at 1.8%, and species-specific segments, chosen for their particular advantages in identifying specific species or groups of organisms, underscore their significance. Notably, species-specific segments, employed in 7.3% of the studies, highlight their critical role in targeted species identification.

Several eDNA analysis methods were employed in the selected studies, highlighting the diversity of approaches in this field. The most used method was qPCR, which was featured in approximately 72.2% of the cases and was chosen for its high sensitivity and specificity, essential for detecting and quantifying trace amounts of DNA. Metabarcoding followed, utilized in about 14.8% of the studies, valued for its capability to identify and characterize a wide array of species from environmental samples through the analysis of multiple DNA sequences simultaneously. Digital droplet PCR (ddPCR) was applied in around 13.0% of the studies, preferred for its precision in the absolute quantification of target DNA, offering accurate measurements without the necessity for standard curves. This variety underscores the strategic selection of methods tailored to each study's specific goals and requirements in the evolving field of eDNA analysis. Techniques such as HaCeDSeq Metabarcoding, accounting for 3.6%, indicated their particular applications in eDNA analysis for identifying and characterizing a wide range of species from environmental samples. Less commonly used methods, each with a frequency of 1.8%, included Multiplex ddPCR, qMiSeq Metabarcoding, and UMI-MiSeq, representing more specialized approaches that catered to particular needs such as multiplexing capability or enhanced accuracy in sequencing.

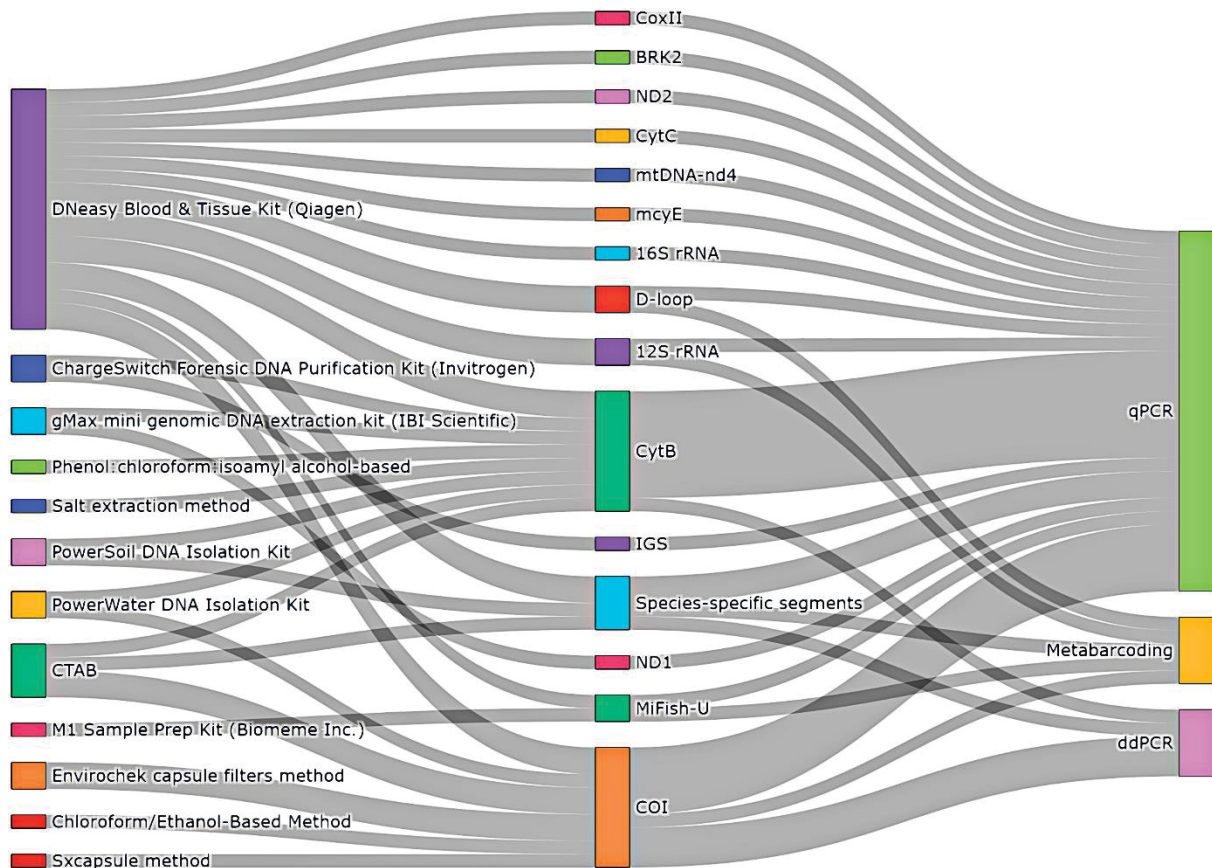


Figure 6. Sankey Diagram of eDNA extraction techniques, genetic marking, and analysis techniques and methods.

2.4 CRITICAL ASSESSMENT OF EDNA STUDIES TO DATE

2.4.1 Sample collection

Fish were the most studied group of microorganisms in aquatic ecosystems using eDNA (TSUJI; TAKAHARA; DOI; SHIBATA et al., 2019), a finding corroborated by the results obtained herein. However, among the 43 selected studies, a wide range of research goals, methods, and materials used to study eDNA were observed. The explored topics ranged from methodological aspects of using and applying eDNA techniques to species detection and large-scale quantitative biodiversity analyses. This variety underscores both the utility and challenges of eDNA, especially in standardising protocols for comparative studies and meta-analyses (KAMOROFF; GOLDBERG, 2018; RAHIM; BODNAR; QASIM; JAWAD et al., 2023).

Standardising sampling, preservation, extraction, or analytical methods to study aquatic eDNA presents a significant challenge, perhaps even an impossibility, due to the unique characteristics inherent to each environment, as highlighted by DEINER; LOPEZ; BOURNE; HOLMAN et al. (2018) while there are general guidelines

concerning the volume of samples, collection depths, and quantities of water to be sampled (DE BRAUWER; CLARKE; CHARITON; COOPER et al., 2023; MINAMOTO; MIYA; SADO; SEINO et al., 2021; SHU; LUDWIG; PENG, 2020), in practice, these parameters are often tailored to fit the specific objectives of the study, the dimensions and physicochemical characteristics of the water body, the estimated abundance of the target species, and the requirements of subsequent eDNA analysis stages.

In the studies analysed here, the depths at which samples were collected ranged from 0 m (surface) to over 90 m. However, in some cases, collections can be carried out in mesopelagic (CANALS; MENDIBIL; SANTOS; IRIGOIEN et al., 2021) or bathyal zones (ZHAO; FILKER; WANG; XU, 2021) at depths between 1,000 and over 6,000 m. This variation prevents the standardisation of collection methods and, at the same time, suggests that different techniques or equipment might yield varied results.

According to DJURHUUS; PORT; CLOSEK; YAMAHARA et al. (2017), it would be possible to mitigate the effects of this lack of standardisation through broad and representative samplings of biological communities. More samples should be collected in extensive water bodies like large lakes or marine regions to include more eDNA molecules (HÄNFLING; LAWSON HANDLEY; READ; HAHN et al., 2016; YAMAMOTO; MASUDA; SATO; SADO et al., 2017). In cases where the target species has a wide geographical distribution or occurs in low abundance, expanding the sample range and increasing sampling volume is encouraged. This strategy increases the chances of capturing a more significant number of DNA molecules of the target species (JERDE; MAHON; CHADDERTON; LODGE, 2011). Another recommended procedure is expanding the number of collected replicates (DAVISON; COPP; CRÉACH; VILIZZI et al., 2017; HINLO; LINTERMANS; GLEESON; BROADHURST et al., 2018).

Additionally, it is essential to incorporate information about the species' ecology, such as feeding areas or spawning sites, into the sampling plan to optimise efficiency and precision in detecting these species (SHU; LUDWIG; PENG, 2020). However, even with all these measures, there will still be risks that the diversity of protocols and materials used will interfere with the amount of DNA recovered, leading to inconsistencies in sample handling and limiting the comparability of studies (CAPO; SPONG; KÖNIGSSON; BYSTRÖM, 2020; THOMAS; HOWARD; NGUYEN; SEIMON et al., 2018). Additional problems are related to logistical challenges in storing and

transporting samples, which can compromise the integrity of the eDNA and affect the results (DEHART; GASSER; DIXON; THIELEN, 2023).

2.4.2 eDNA Stabilisation

Another problem regarding the analysed articles is the lack of detail on the adopted methodological procedures. The presentation of the time interval between the collection and stabilisation/preservation of eDNA, for example, is fundamental due to its direct influence on DNA degradation. However, approximately 22.2% of the analysed documents did not cite this time, highlighting a significant methodological gap.

The inconsistency in detailed identification and the lack of minimum standardisation of the methods used also posed challenges regarding preventing degradation of the original eDNA in the samples. Water filtration of collected samples can occur in the field or immediately upon return to the laboratory, but ideally, it should take place as soon as possible to limit eDNA degradation. When immediate filtration is not feasible, it is recommended to process all samples similarly to minimise extrinsic variables (COWART; MURPHY; CHENG, 2022). In terms of this issue, a wide range of approaches was observed. The most straightforward procedure involves cooling the samples after collection and keeping them in isothermal boxes until they arrive at the laboratory (FU'ADIL AMIN; LEE; KIM; KIM et al., 2021; FUKAYA; MURAKAMI; YOON; MINAMI et al., 2021). In at least one case analysed here (YATES; WILCOX; STOECKLE; HEATH, 2022), the samples were refrigerated for 24 hours before being filtered. More complex procedures may involve immediate filtration of samples, followed by immersion of the filters in absolute ethanol and sodium acetate and subsequent freezing until the extraction stage (SATO; INOUE; NAMBU; FURUICHI et al., 2021; TAKAHARA; MINAMOTO; YAMANAKA; DOI et al., 2012). According to MAJANEVA; DISERUD; EAGLE; BOSTRÖM et al. (2018), the use of preserved filters, either dry (at -80 °C or in silica gel) or lysis buffer (such as QIAGEN's ATL buffer or Longmire's buffer), provides the most consistent identification of communities, as well as stabilising the DNA and limiting its degradation, allowing prolonged storage even at room temperature (COWART; MURPHY; CHENG, 2022).

The literature suggests that eDNA concentrations exhibit an exponential decline over time (BARNES; TURNER; JERDE; RENSHAW et al., 2014; BRANDÃO-DIAS; HALLACK; SNYDER; TANK et al., 2023; JO; ARIMOTO; MURAKAMI; MASUDA et al., 2020; JO; MINAMOTO, 2021). eDNA interacts with particles and surfaces in the

environment (HARRISON; SUNDAY; ROGERS, 2019; JOSEPH; FAIQ; LI; CHEN, 2022; TABERLET; BONIN; ZINGER; COISSAC, 2018) while also being affected by the water's physical, chemical, and biological conditions. These interactions, which may either safeguard or expedite the degradation of DNA fragments, provide valuable insights into the reasons eDNA can be entirely degraded in less than a day or persist for up to three weeks after being released into the aquatic environment (BARNES; CHADDERTON; JERDE; MAHON et al., 2021; JAYASANKAR, 2017; JIANG; ZHANG; XU; XIONG et al., 2023). Environmental factors such as temperature, salinity, dissolved oxygen concentration, UV radiation, turbidity, chlorophyll concentration, substrate composition, microbial community composition (or the related biotic conditions) also affect species detection and thus play a central role in eDNA degradation (HARRISON; SUNDAY; ROGERS, 2019; HOLMES; BAERWALD; RODZEN; SCHREIER et al., 2024; JOSEPH; FAIQ; LI; CHEN, 2022; MCCARTIN; VOHSEN; AMBROSE; LAYDEN et al., 2022; TABERLET; BONIN; ZINGER; COISSAC, 2018) (Figure 7). In cold and shaded environments with neutral pH, such as some streams, eDNA tends to persist longer, while in warmer and more acidic areas, its degradation is accelerated (SAHU; KUMAR; SINGH; SINGH, 2023). In this context, it is paramount that the phase of obtaining and treating samples is conducted in the shortest possible time. Simultaneously, once trapped in ice or sediments, DNA can be preserved for thousands of years (GREGORY-EAVES; SMOL, 2024).

2.4.3 eDNA Concentration

Direct filtration, ethanol precipitation, and centrifugation are the primary initial-stage methods to concentrate eDNA from aquatic environments. The process of eDNA precipitation in water samples is generally effective only for small volumes (up to 30 ml), a limitation that may affect the detection of rare or invasive species. The concentrated eDNA can be maintained in a solution of ethanol and sodium acetate for up to seven days at room temperature (LI; LAWSON HANDLEY; READ; HÄNFLING, 2018). The water volumes of the samples also pose a limitation for using the centrifugation method (ATTEIA; BEC; GIANAROLI; SERAIS et al., 2024; TSUJI; TAKAHARA; DOI; SHIBATA et al., 2019). Methods combining precipitation with ultrafiltration or filtration have proven to be more efficient, increasing the yield of eDNA in various types of aquatic ecosystems (MINAMOTO; NAKA; MOJI; MARUYAMA, 2016; MUHA; ROBINSON; GARCIA DE LEANIZ; CONSUEGRA, 2019).

In most cases studied here, eDNA was collected through water filtration, a method recognised as more efficient than precipitation (DEINER; LOPEZ; BOURNE; HOLMAN et al., 2018; SPENS; EVANS; HALFMAERTEN; KNUDSEN et al., 2017) for capturing eDNA. Meanwhile, centrifugation emerges as a promising alternative method (ATTEIA; BEC; GIANAROLI; SERAIS et al., 2024), but it still needs more thorough testing.

Field water filtration is a logistical advantage compared to transporting the water to the laboratory, and thus, proper preservation of the filter becomes crucial for maximum DNA recovery (MAJANEVA; DISERUD; EAGLE; BOSTRÖM et al., 2018). Nevertheless, despite its widespread use, filtration involves a series of technical, operational, and economic issues, including the choice of materials and equipment (for example, type and power of pumps and filter supports) and type of filter membrane (for example, porosity, chemical composition), factors that directly impact the quality of the captured DNA (ATTEIA; BEC; GIANAROLI; SERAIS et al., 2024; GOLDBERG; TURNER; DEINER; KLYMUS et al., 2016; MAJANEVA; DISERUD; EAGLE; BOSTRÖM et al., 2018), as well as the time required to process the sample (TABERLET; BONIN; ZINGER; COISSAC, 2018).

The amount of eDNA in water is determined by the rates of eDNA release and degradation (BYLEMANS; GLEESON; HARDY; FURLAN, 2018). However, neither the release nor degradation are homogeneous processes, as eDNA represents a spectrum of physical states, ranging from whole organisms to free molecules from various organisms (MAUVISSEAU; HARPER; SANDER; HANNER et al., 2022; MINAMOTO; YAMANAKA; TAKAHARA; HONJO et al., 2012). NAGLER; PODMIRSEG; ASCHER-JENULL; SINT et al. (2022) describe eDNA as a diverse collection of DNA particles, which can be single-stranded (ssDNA) or double-stranded (dsDNA), originating from various sources such as genomic mitochondrial, plastidial, or exosomal. This heterogeneity, reflected in the location of the DNA, both inside (iDNA) and outside (exDNA) cells, directly influences its function, stability, and informational quality. The existence of free extracellular DNA (f-exDNA), weakly bound (wb-exDNA), or tightly bound (tb-exDNA) to cells and organic and inorganic particles adds additional layers of complexity, depending on the interaction of the eDNA with the extracellular matrix or membrane proteins. Therefore, it is noteworthy that none of the studies analysed here focused on the specific physical fractions of eDNA or even considered the

heterogeneous nature of eDNA in the analyses conducted, which may limit the understanding of the physical behaviour of eDNA and the efficiency of sampling itself.

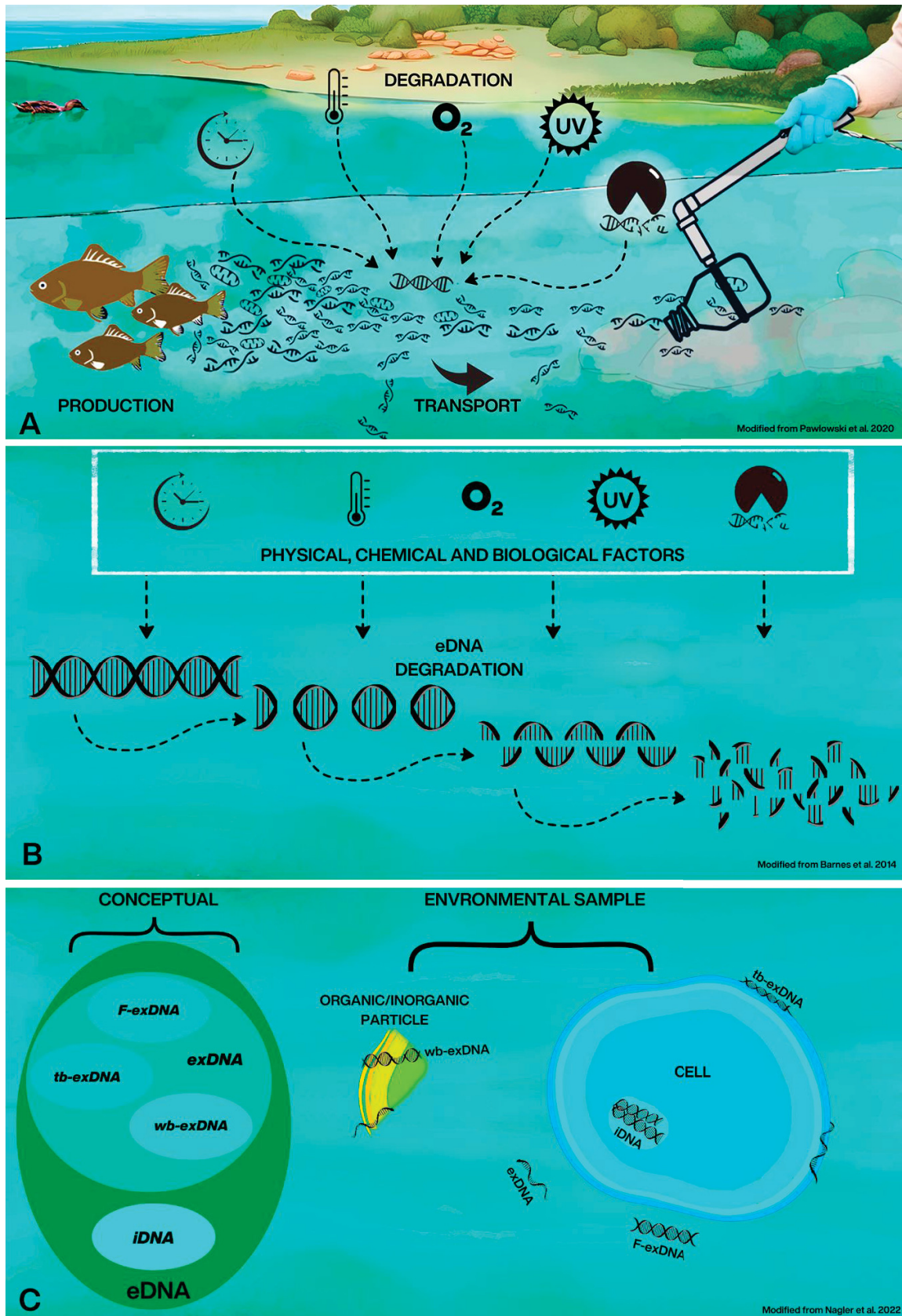


Figure 7. Schematic representation: A) Of the factors that act on the production, decomposition, and transport of eDNA. B) Of the degradation, eDNA suffered from physical, chemical, and biotic factors (microbial community and extracellular enzymes). C) Different DNA types from environmental samples. exDNA - external DNA; iDNA - internal DNA; f-exDNA - free extracellular DNA, tb-exDNA - tightly bound extracellular DNA; wb-exDNA - weakly bound.

The potential variations in methodology make quantitative biodiversity analyses more complex and offer more detailed environmental monitoring opportunities. Thus, the diversity in size and composition of eDNA molecules demands adaptations in sampling and filtration methods. For instance, in eDNA samples of fish, the typical length of DNA particles varies from 1 to 10 μm (Turner *et al.*, 2014; Zhang, S. *et al.*, 2020), suggesting that selecting appropriate pore sizes may be crucial for successfully capturing fish eDNA. Filters with smaller pores are necessary to capture free extracellular ssDNA, although they may face limitations such as clogging and high cost (Holmes *et al.*, 2024). Moreover, studies indicate that larger pore filters or pre-filtration of samples can be beneficial in turbid waters, reducing filtration time, although this may also decrease DNA recovery (Liang and Keeley, 2013; Eichmiller *et al.*, 2016). Pre-filtration, involving particle size separation, has been observed to reduce the amount of target species eDNA (Turner *et al.*, 2014), but it is still unclear how this technique influences the detected community composition (Majaneva *et al.*, 2018). Wilcox *et al.* (2018) emphasised that the filtration of small volumes of samples may be insufficient for quantitative analyses. Kawakami *et al.* (2023) suggest the implementation of replicated samplings at the same site to address this type of issue. Tillotson *et al.* (2018) propose an increase in the frequency of samplings for more accurate monitoring.

Thus, eDNA concentration is directly dependent on methodological, logistical and economic aspects such as the time until eDNA stabilisation, the selection of filter materials (see below) and pore sizes, and the cost-benefit of the selected analytical method (Jo, 2023; Kawakami *et al.*, 2023; Holmes *et al.*, 2024).

2.4.4 eDNA Extraction

Regarding filter materials, glass fibre (GF) filters were the most frequently used in the selected studies. Nevertheless, it has been suggested that various types of filters, such as cellulose acetate (CA), cellulose nitrate (CN), mixed cellulose ester (MCE), mixed cellulose nitrate (MCN), polycarbonate (PC), track-etched polycarbonate (PCTE), polyethersulfone (PES), and nylon filters, are effective in collecting eDNA (SHU; LUDWIG; PENG, 2020). Results show, for example, that mixed cellulose ester filters exhibit a more uniform composition than polyethersulfone filters (MAJANEVA; DISERUD; EAGLE; BOSTRÖM *et al.*, 2018). In terms of DNA yield, CN filters demonstrated greater efficacy compared to PES, PVDF, PC (LIANG; KEELEY, 2013),

and microfiber glass filters (GMF) – with GMF performing better than PC filters (EICHMILLER; MILLER; SORENSEN, 2016). RENSHAW; OLDS; JERDE; MCVEIGH et al. (2015) showed that CN and PES filters concentrated higher amounts of DNA than track-etched polycarbonate (PCTE) and GMF membrane filters. Additionally, the structure of the filter itself can influence the efficiency of DNA collection. It was observed that Sterivex-GP capsule filters, compared to standard filters, performed better than PCTE and GMF, but not CN, when the DNA extraction was conducted within 25 h after sampling (SPENS; EVANS; HALFMAERTEN; KNUDSEN et al., 2017). A general guideline, however, cannot be established due to variations in water conditions, study goals, and target species.

The efficiency of the technologies based on eDNA analysis significantly depends on the quality of the DNA obtained by extraction methodologies – either laboratory protocols or commercially developed kits for sample preparation. There is no universally accepted DNA extraction/purification method for water samples. This standardization could theoretically facilitate comparison between studies, minimise biases, and increase the efficacy and applicability of eDNA-based monitoring in aquatic environments (WALDEN; CARBONERO; ZHANG, 2017). Therefore, different extraction techniques and methods can lead to variations in the amount and quality of eDNA, affecting the detection and quantification of biodiversity (COUTANT; CANTERA; CILLEROS; DEJEAN et al., 2021; JEUNEN; KNAPP; SPENCER; TAYLOR et al., 2019; RUAN; WANG; LI; LIU et al., 2022; WITTEWER; NOWAK; STRAND; VRÅLSTAD et al., 2018). Thus, understanding how different extraction protocols impact DNA yields is fundamental for the success of biodiversity studies in aquatic ecosystems.

For fish eDNA detection, in addition to cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), phenol-chloroform-isoamyl alcohol (PCI), or salt DNA extraction protocols, most studies have been using commercial DNA extraction kits for eDNA extraction. These commercial kits represent a less toxic alternative to traditional phenol-chloroform DNA extraction (SILVA; SOUZA; HONORATO; MARTINS et al., 2020). They combine techniques to reduce DNA loss and maximise the removal of PCR inhibitors, such as spin column purification and bead beating (WALDEN; CARBONERO; ZHANG, 2017).

In the reviewed studies, at least 12 DNA extraction methods were identified, with DNeasy Blood & Tissue Kits (Qiagen) being the most widely used (64%

of the cases). In the work of SHU; LUDWIG e PENG (2020), the authors identified a similar number of extraction methods specifically for fish (14), with the DNeasy Blood & Tissue Kits (Qiagen) accounting for 50%. Commercial kits stand out for their rapid purification of total DNA from various sources, such as animal tissues and cells, blood, and bacteria, non-toxicity, simplicity, and relatively lower cost (TSUJI; TAKAHARA; DOI; SHIBATA et al., 2019). The DNeasy Blood & Tissue Kits technology is based on silica membranes, available in spin columns or 96-well plates, allowing efficient and consistent DNA purification. DNA binding to the silica membrane occurs in the presence of chaotropic salt, dehydrating the molecules, promoting specific DNA adsorption and the removal of contaminants and enzymatic inhibitors (Qiagen, 2024). However, according to EICHMILLER; BEST e SORENSEN (2016), the DNeasy Blood & Tissue Kit can suffer PCR inhibition and is not ideal for quantitative studies. The authors suggest that the PowerWater kit (Qiagen) would show the lowest yield with inhibition, contrasting with the recommendation of KELLY; SHELTON e GALLEGO (2019), who, despite being more expensive, would effectively remove PCR inhibitors, improving amplification and data quality. EICHMILLER; BEST e SORENSEN (2016) suggest that the FastDNA Spin Kit (MP Biomedicals) and the PowerSoil DNA (Qiagen) Isolation Kit would be the most recommendable for DNA detection and quantification, respectively.

2.4.5 Molecular markers and primers

Molecular markers, DNA sequences that vary among individuals or species, are essential for identifying specific genetic characteristics and analysing genetic diversity (ANDRES; LODGE; SETHI; ANDRÉS, 2023). There are specific markers for species, populations, or communities. Generic markers are used for various rate assessments (SHU; LUDWIG; PENG, 2020). The most used markers include mitochondrial genes, due to their high rate of variation and specificity, and nuclear genes (GOLI; SUKHIJA; RATHI; CHISHI et al., 2024; LIN; DANFORTH, 2004; NICOLIA; SCOTTI; D'AGOSTINO; FESTA et al., 2024). Primers play a central role in eDNA quantification techniques, ensuring specificity and efficiency in DNA amplification (ZHANG; ZHAO; YAO, 2020). This function is crucial for the precise identification of species, detailed analyses of genetic diversity, and composition of biological communities. Primers are short oligonucleotides designed to bind to specific DNA regions, facilitate amplification, and allow sensitive detection and quantification

of DNA (PORTER; HAJIBABAEI, 2018). There are specific primers for detecting single species and generic ones for analysing multiple taxa through metabarcoding (WANG; LIU; LIANG; WANG et al., 2023; YANG; DING; LIN; XIE et al., 2023). In eDNA studies, mitochondrial genes are often the preferred choice due to their rapid evolution and efficacy in describing biodiversity (SUN; NI; WANG; SHA et al., 2023). They are reliable in assessing degraded DNA and excellent in discriminating vertebrate species, which is particularly useful in studies on fish diversity. Choosing the most suitable primer set requires considering the local biodiversity history and the study objectives.

At least 15 types of molecular markers were used in the selected studies see (Figure 8), with the highest frequency for COI (Cytochrome Oxidase Subunit I) and CytB (Cytochrome B). Used for a wide range of taxonomic groups, including animals, plants, and fungi, COI is a mitochondrial marker that encodes Cytochrome c oxidase subunit I, part of the mitochondrial DNA, known for its high rate of evolution and specificity (GÜNTHER; KNEBELSBERGER; NEUMANN; LAAKMANN et al., 2018). The COI gene is highly conserved among species but possesses enough variation to distinguish different species, making it ideal for species identification and diversity studies (SOUZA; MARCHESIN; ITOYAMA, 2016). In the mitochondrial DNA, CytB is crucial for the electron transport chain, being highly conserved among species but with specific variations that allow the identification and differentiation between different organisms (LOPEZ-OCEJA; GAMARRA; BORRAGAN; JIMÉNEZ-MORENO et al., 2016; MA; HE; WANG; JIANG et al., 2020). Primers designed for CytB can amplify specific regions of this gene, facilitating species identification, especially in fish, insects, and other vertebrates (LOPEZ-OCEJA; GAMARRA; BORRAGAN; JIMÉNEZ-MORENO et al., 2016). Its usefulness extends to phylogeny, evolution, and conservation studies, where CytB's ability to provide detailed information about the diversity and evolutionary relationships between species makes it a valuable tool.

Among other markers used by the authors, primers for specific DNA segments stand out, such as the D-loop, a variable region of mitochondrial DNA crucial for phylogeny and evolution studies (BRONSTEIN; KROH; HARING, 2018; HUANG; XU; TANG; ZHANG et al., 2009; YOSHITAKE; YOSHINAGA; TANAKA; MIZUSAWA et al., 2019), especially in mammals. The genes for NADH dehydrogenase subunit 2 (ND2) and subunit 1 (nd1) are part of the complex I of the mitochondrial electron transport chain and are helpful for phylogenetic analyses (FENG; LI; LI; WANG et al., 2012). The Cytochrome c oxidase subunit III gene, part of complex IV of the mitochondrial

respiratory chain, was another marker used (TILLOTSON; KELLY; DUDA; HOY et al., 2018). Specific primers for qPCR assays, such as BRK2, are used for quantitative species detection (KAMOROFF; GOLDBERG, 2018). The mitochondrial 12S rRNA gene and the 12S V5 region are equally crucial for biodiversity studies, offering a comprehensive view of genetic diversity (YATES; WILCOX; STOECKLE; HEATH, 2022). The 16S rRNA gene, for which these regions serve as universal markers, is highly conserved among living organisms (LAN; ROSEN; HERSHBERG, 2016). Primers MiFish-U, designed for eDNA metabarcoding, aim to detect fish communities efficiently (BOIVIN-DELISLE; LAPORTE; BURTON; DION et al., 2021).

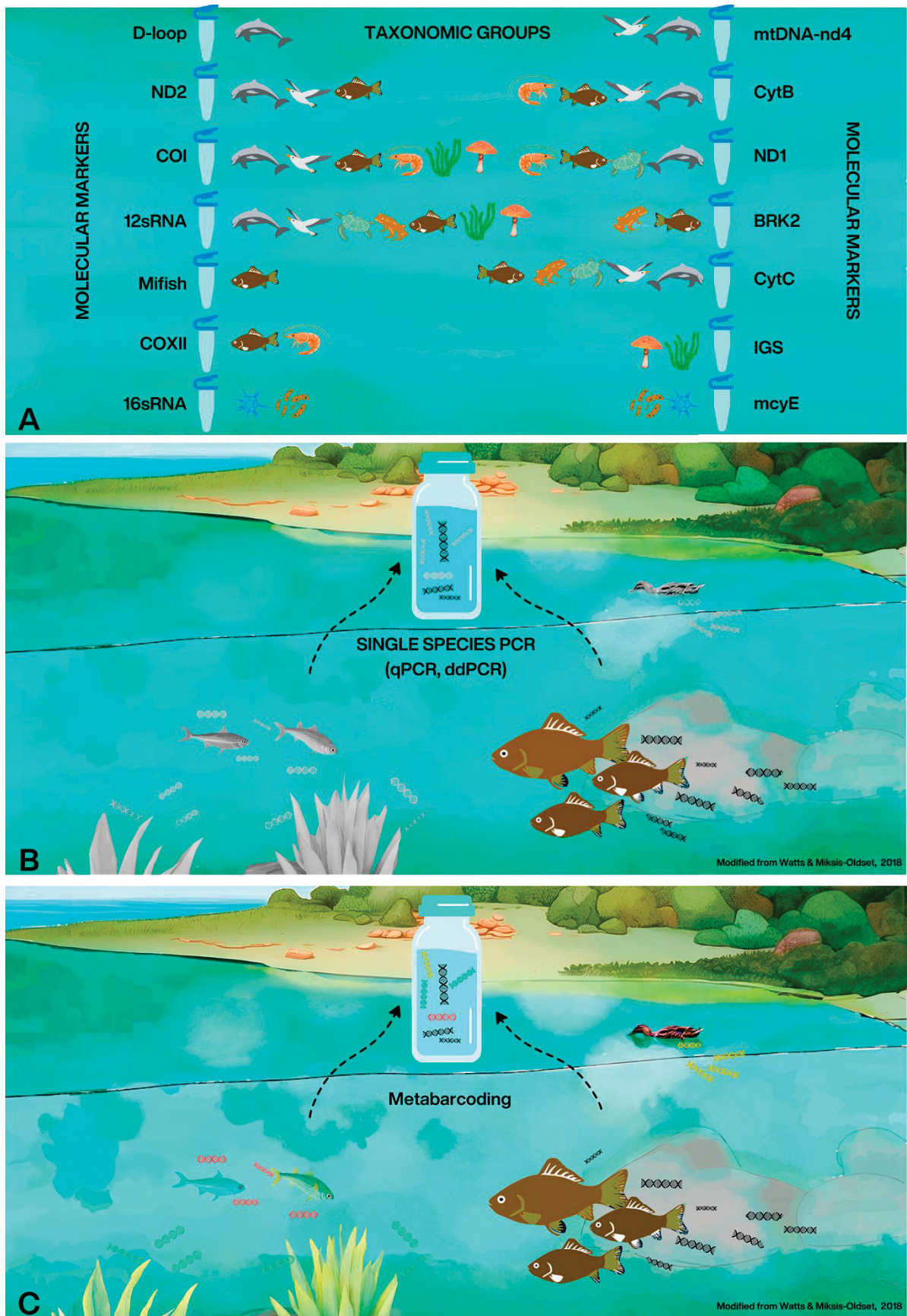


Figure 8. Methodologies Applied in eDNA Analysis: A) Molecular markers used in the selected studies and main identifiable taxonomic groups; B) and C) Monitoring strategies for specific species and the broad assessment of local biodiversity.

2.4.6 Analytical methods

According to WATTS e MIKSIS-OLDS (2018), the approach to eDNA can be categorized into two main strategies: eDNA barcoding for specific species and eDNA metabarcoding for multiple species, as illustrated in Figure 8 B e C. DNA barcoding employs high-precision techniques such as quantitative PCR (qPCR) and Droplet Digital PCR (ddPCR) for the specific detection and quantification of species (BAKER; CLARIDGE; DUNN; FETHERSTON et al., 2023; SHASHANK; PARKER; RANANAWARE; PLOTKIN et al., 2024). These techniques are notable for their sensitivity and specificity, with qPCR effective in the simultaneous amplification and quantification of target DNA (FEIST; LANCE, 2021), while ddPCR enables absolute quantification, dividing the sample into thousands of microscopic droplets, each analysed individually (YANG; YU; JIN; ZHAO et al., 2023). Additionally, unlike conventional quantitative qPCR, ddPCR allows for direct quantification without standard curves, eliminating variation associated with standard generation for each run (CAO; GRIFFITH; WEISBERG, 2016). It is believed that ddPCR also exhibits an increased tolerance to inhibitors, rendering it an attractive alternative to qPCR for detecting and quantifying eDNA, as suggested by DINGLE; SEDLAK; COOK e JEROME (2013). However, in the selected studies, qPCR remained the analytical method predominantly employed by researchers.

In the context of Metabarcoding, qMiSeq Metabarcoding combines qPCR to amplify specific genetic markers (e.g., COI) with next-generation massive sequencing using the Illumina MiSeq platform. Sato et al. (2021) elucidated that this technique enables the simultaneous quantification and identification of multiple species. The MiSeq system generates short DNA sequences (approximately 300 base pairs) from a single sample, essential for detailed analyses in metabarcoding, RNA-seq, and microbial diversity studies (ILLUMINA, 2024). More recently, discussions have emerged regarding the transition from MiSeq to NovaSeq metabarcoding, an even more advanced platform from Illumina. This shift is attributed to NovaSeq's increased sequencing capacity and ability to detect a more significant biological diversity (FIELDS; MOESKJAER; FRIMAN; ANDERSEN et al., 2021).

The application of Unique Molecular Identifiers (UMIs) to DNA molecules in UMI-MiSeq before sequencing (as demonstrated by BRADLEY; MOREY; BOURQUE; FOST et al. (2022)) enhances sequencing accuracy and reduces amplification errors. This approach is particularly efficient in gene expression and quantitative metagenomic

studies, where precision and error reduction are paramount. This technology has been widely utilized in various sequencing applications, distinguishing identical copies originating from different molecules from those arising through PCR amplification of the same molecule (SMITH; HEGER; SUDBERY, 2017).

Cited as part of the metabarcoding data analysis, the HaCeDseq (Highly Accurate and Cost-Effective Deep Sequencing) is a method for accurately calculating the number of eels in different populations (YOSHITAKE; YOSHINAGA; TANAKA; MIZUSAWA et al., 2019). This method involves sequencing a mitochondrial D-loop region from a mixed DNA solution using Next Generation Sequencing (NGS) and counting the number of haplotypes in the D-loop sequence. According to the authors, the method allows for a more precise calculation of individual numbers than conventional methods. HaCeD-Seq, a variant of metabarcoding, is distinguished by its use of shorter genetic markers combined with high-depth sequencing. This approach is particularly effective in enhancing species identification accuracy, especially for taxonomically complex groups. One of the main advantages of HaCeDseq is its high accuracy in species identification and cost-effectiveness compared to other high-depth sequencing techniques.

All these methods, contributing to the revolution of molecular biology and genomics, are derivatives of the Polymerase Chain Reaction (PCR), developed initially in a 1983 work by Kary Mullis, for which he was later awarded the Nobel Prize in Chemistry in 1993 (RAHMAN; UDDIN; SULTANA; MOUE et al., 2013).

2.5 ADVANCES AND LIMITATIONS - INTEGRATED ANALYSIS

As seen throughout this review, the eDNA technique has been established as a research field of great importance and vast potential for application in various areas of ecology and conservation, offering innovative methods for the detection, monitoring, and estimation of the abundance and biomass of aquatic species (BALDIGO; SPORN; GEORGE; BALL, 2017; KAMOROFF; GOLDBERG, 2018; MARUYAMA; NAKAMURA; YAMANAKA; KONDOH et al., 2014; MIZUMOTO; URABE; KANBE; FUKUSHIMA et al., 2018; SEPULVEDA; AL-CHOKHACHY; LARAMIE; CRAPSTER et al., 2021; TAKAHARA; MINAMOTO; YAMANAKA; DOI et al., 2012; TILLOTSON; KELLY; DUDA; HOY et al., 2018). However, the journey from detecting an organism's presence to quantitatively estimating its population biomass through eDNA analysis is a complex and indirect scientific endeavour, mainly due to the concentration of eDNA being

subject to various physical, chemical, and biological factors that affect its production, persistence, and transport within aquatic ecosystems (HANSEN; BEKKEVOLD; CLAUSEN; NIELSEN, 2018).

Several authors have found positive correlations between eDNA concentration and the density, biomass, or abundance of different organisms, such as fish (KNUDSEN; EBERT; HESSELSØE; KUNTKE et al., 2019; LACOURSIÈRE-ROUSSEL; DUBOIS; NORMANDEAU; BERNATCHEZ, 2016; TAKAHARA; MINAMOTO; YAMANAKA; DOI et al., 2012; TSUJI; INUI; NAKAO; MIYAZONO et al., 2022), invertebrates (TRIMBOS; CIERAAD; SCHRAMA; SAARLOOS et al., 2021), aquatic plants (MIYAZONO; KODAMA; AKAMATSU; NAKAO et al., 2021), and even parasites (NYGAARD, 2018; SCHLOESSER; RESEARCH; 2012, 2012). However, the strength and consistency of these relationships vary among species and environments, being influenced by several biotic and abiotic factors (LACOURSIÈRE-ROUSSEL; DUBOIS; NORMANDEAU; BERNATCHEZ, 2016; SEPULVEDA; AL-CHOKHACHY; LARAMIE; CRAPSTER et al., 2021).

Moreover, eDNA is subject to degradation, loss, and contamination due to improper handling, factors that influence the outcome and validation of an eDNA study (COWART; MURPHY; CHENG, 2022). These problems can be caused by a series of methodological factors, such as: a) imperfect detection, as eDNA analytical techniques may not always detect the presence of all species in a sample, leading to a possible underestimation of biodiversity (BENG; CORLETT, 2020); b) challenges in quantifying abundance, particularly those involving complex processes that may not accurately reflect the actual numbers due to variable rates of DNA release and degradation among species (YATES; CRISTESCU; DERRY, 2021); c) difficulties in taxonomic assignment, as attributing detected DNA to specific taxa can be problematic, especially when reference databases are incomplete or closely related species are present (MATHIEU; HERMANS; LEAR; BUCKLEY et al., 2020); d) understanding the spatial and temporal dynamics of eDNA, as factors related to the transport and degradation of eDNA vary in different environments, potentially affecting detection and quantification (JOSEPH; FAIQ; LI; CHEN, 2022; TROTH; SWEET; NIGHTINGALE; BURIAN, 2021); e) issues related to data analysis and interpretation, as this step requires careful consideration of bioinformatics workflows and possible biases in processing and interpreting the data (BENG; CORLETT, 2020; BURIAN; MAUVISSEAU; BULLING; DOMISCH et al., 2021); f) assessment of ecological status,

given that eDNA provides limited information about the ecological status of organisms, such as their life history traits, sex ratios, or health status, which are essential for conservation and management (SIGSGAARD; JENSEN; WINKELMANN; MØLLER et al., 2020). Furthermore, other issues include biases in PCR primers and sequencing, sample contamination, the presence of eDNA from dead organisms, and challenges in distinguishing eDNA from ancient DNA (BENG; CORLETT, 2020; PEDERSEN; OVERBALLE-PETERSEN; ERMINI; SARKISSIAN et al., 2015; THOMSEN; WILLERSLEV, 2015).

Environmental variables, such as temperature, pH, water flow, and population age structure, can affect the production, release, degradation, and detection of eDNA (LACOURSIÈRE-ROUSSEL; DUBOIS; NORMANDEAU; BERNATCHEZ, 2016; MARUYAMA; NAKAMURA; YAMANAKA; KONDOH et al., 2014; NEVERS; BYAPPANAHALLI; MORRIS; SHIVELY et al., 2018). Additionally, the choice of sampling, extraction, and analysis methods also influences the effectiveness of the technique (BRYIS; HALFMAERTEN; NEYRINCK; MAUVISSEAU et al., 2020; CAPO; SPONG; KÖNIGSSON; BYSTRÖM, 2020).

Despite these limitations, eDNA demonstrates some significant advantages compared to conventional methods, such as higher sensitivity in detecting rare or low-density species (BRYIS; HALFMAERTEN; NEYRINCK; MAUVISSEAU et al., 2020; WELDON; O'LEARY; STEER; NEWTON et al., 2020), lower invasiveness (BOIVIN-DELISLE; LAPORTE; BURTON; DION et al., 2021), and cost-effectiveness (BALDIGO; SPORN; GEORGE; BALL, 2017). Recent methodological advances have contributed to improving the accuracy and utility of the technique, such as the application of droplet digital PCR (ddPCR) (BRYIS; HALFMAERTEN; NEYRINCK; MAUVISSEAU et al., 2020), the use of unique molecular identifiers (UMIs) (YOSHITAKE; FUJIWARA; MATSUURA; SEKINO et al., 2021), and the combination with hydrodynamic modelling (FUKAYA; MURAKAMI; YOON; MINAMI et al., 2021) and occupancy modelling (BRYIS; HALFMAERTEN; NEYRINCK; MAUVISSEAU et al., 2020).

However, despite the successes achieved in most of the analysed studies, authors frequently emphasise the need for continuous improvement in eDNA collection, analysis, and data interpretation techniques. This need is reinforced by the integration of different methods to overcome existing limitations and expand the applicability of eDNA (FUKAYA; MURAKAMI; YOON; MINAMI et al., 2021; KIRTANE;

WIECZOREK; NOJI; BASKIN et al., 2021). The optimisation of sampling and analysis methods is a frequent concern, as well as the need to improve the sensitivity and specificity of the methods, acknowledging the challenges in accurately quantifying biomass and the risks of false negatives (ABATO, 2010; BALDIGO; SPORN; GEORGE; BALL, 2017; BRYNS; HALFMAERTEN; NEYRINCK; MAUVISSEAU et al., 2020).

The influence of environmental and abiotic factors on the rate of eDNA release and degradation is highlighted in the research of MARUYAMA; NAKAMURA; YAMANAKA; KONDOH et al. (2014), LACOURSIÈRE-ROUSSEL; DUBOIS; NORMANDEAU e BERNATCHEZ (2016), and MIZUMOTO; URABE; KANBE; FUKUSHIMA et al. (2018). These studies emphasise the importance of considering how different environmental conditions, including temperature, current, UV radiation, pH, and salinity, affect the dynamics of eDNA. The complexity and variability of aquatic systems demonstrate the need for a better understanding of the hydrology and specificities of different aquatic environments in eDNA collection and analysis, which is crucial for the interpretation and application of eDNA data in natural environments (BYLEMANS; FURLAN; GLEESON; HARDY et al., 2018; KAMOROFF; GOLDBERG, 2018; ODERO, 2016; TAKAHARA; MINAMOTO; YAMANAKA; DOI et al., 2012).

Other technical and methodological limitations include challenges such as PCR efficiency and the need for specific calibration for different systems and species (CAPO; SPONG; NORMAN; KÖNIGSSON et al., 2019; KNUDSEN; EBERT; HESSELSØE; KUNTKE et al., 2019; YOSHITAKE; YOSHINAGA; TANAKA; MIZUSAWA et al., 2019). The integration of eDNA monitoring with conventional methods is recognised as essential for a more accurate and robust estimation (JOHNSEN; STRAND; RUSCH; VRÅLSTAD, 2020; WELDON; O'LEARY; STEER; NEWTON et al., 2020). Furthermore, the specificity of assays and the variation in eDNA efficacy according to species and season require constant validations and a deeper understanding of the factors influencing eDNA release and degradation (LACOURSIÈRE-ROUSSEL; DUBOIS; NORMANDEAU; BERNATCHEZ, 2016; ODERO, 2016). The relationship between eDNA concentration and the abundance or biomass of organisms, influenced by environmental and technical variables, is an area of growing interest (NEVERS; BYAPPANAHALLI; MORRIS; SHIVELY et al., 2018).

Methodological challenges, ranging from eDNA collection and extraction to its quantification and interpretation, are a constant (BALDIGO; SPORN; GEORGE; BALL,

2017; MIZUMOTO; URABE; KANBE; FUKUSHIMA et al., 2018). The presence of variable inhibition rates in field samples (FU'ADIL AMIN; LEE; KIM; KIM et al., 2021) and the difficulty in estimating local variations in fish density (FUKAYA; MURAKAMI; YOON; MINAMI et al., 2021) are also critical aspects to be considered.

Therefore, recognising and addressing these limitations, as evidenced by the studies, is fundamental to advancing the application of eDNA as a robust and reliable tool. The continuation of research and the development of more precise and adapted methods will significantly contribute to the effectiveness of eDNA in environmental monitoring, biodiversity conservation, and other areas of study. Despite the remaining challenges, eDNA is a promising tool for monitoring and managing aquatic populations, complementing or replacing conventional methods in specific contexts.

2.6 CONCLUSIONS

2.6.1 Relevance of eDNA in Research and Conservation

The prospects for using eDNA are up-and-coming, marking an emerging and expanding field of research with increasing relevance in areas such as conservation, environmental monitoring, and understanding of biodiversity. This advancement is supported by a continuous process of technological innovation bolstered by interdisciplinary collaboration and the integration of new scientific discoveries and advanced technologies. These elements are crucial for overcoming challenges and broadening eDNA's contribution to increasing scientific knowledge in the different fields of environmental research.

2.6.2 eDNA Collection Challenges

However, it is essential to recognize that, despite rapid progress in eDNA extraction protocols, development of primers and molecular markers, and analytical techniques, these advancements are insufficient to overcome the frailties still associated with the phases of eDNA collection, preservation, and concentration. These stages, identified as the most vulnerable in the analytical chain, require special attention to ensure the integrity of eDNA in samples, especially in analyses aimed at estimating the abundance and biomass of aquatic organisms. Detailed documentation of the entire process by researchers, from collection to sample processing, is also fundamental to ensure comparability and reproducibility of results.

2.6.3 eDNA's potential to address environmental challenges

Considering current scientific advancements, it is imperative not to confuse eDNA with traditional sampling methods and taxonomic knowledge. eDNA offers distinct and complementary responses, enriching existing techniques with new perspectives. This molecular tool opens new pathways for rapid and efficient approaches to data acquisition on biodiversity, providing valuable insights for ecological studies and the management of aquatic ecosystems. Combining eDNA with traditional methods is fundamental in increasing environmental knowledge, allowing for a more holistic and detailed view, and is vital for informed decisions in conservation and environmental management.

2.7 ACKNOWLEDGEMENTS

Engie Brasil Energia S.A. funded AO, MRP, AH and OSMN (PD-00403-0051/2020). AO receives a research fellowship from Brazil/CNPq (#304451/2021-5).

2.8 REFERENCES

ABATO, J. Monitoring *Chrysaora hysoscella* (Cnidaria, Scyphozoa) in the Belgian part of the North Sea using eDNA. 2010. 110 f. (Master's Dissertation) - Environmental Sanitation, Ghent University.

ALZAYLAEE, H.; COLLINS, R. A.; SHECHONGE, A.; NGATUNGA, B. P. et al. Environmental DNA-based xenomonitoring for determining *Schistosoma* presence in tropical freshwaters. *Parasites & vectors*, 13, n. 1, p. 1-11, 2020.

AMARASIRI, M.; FURUKAWA, T.; NAKAJIMA, F.; SEI, K. Pathogens and disease vectors/hosts monitoring in aquatic environments: Potential of using eDNA/eRNA based approach. *Science of the Total Environment*, 796, p. 148810, 2021.

AMBARDAR, S.; GUPTA, R.; TRAKROO, D.; LAL, R. et al. High throughput sequencing: an overview of sequencing chemistry. *Indian journal of microbiology*, 56, p. 394-404, 2016.

ANDRES, K. J.; LODGE, D. M.; ANDRÉS, J. Environmental DNA reveals the genetic diversity and population structure of an invasive species in the Laurentian Great Lakes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120, n. 37, p. e2307345120, 2023.

ANDRES, K. J.; LODGE, D. M.; SETHI, S. A.; ANDRÉS, J. Detecting and analysing intraspecific genetic variation with eDNA: From population genetics to species abundance. *Molecular Ecology*, 2023.

ANDRUSZKIEWICZ, E. Environmental DNA as a Biomonitoring Tool: Investigating Persistence and Transport of eDNA in Marine Water. 2019.

ATTEIA, A.; BEC, B.; GIANAROLI, C.; SERAIS, O. et al. Evaluation of sequential filtration and centrifugation to capture environmental DNA and survey microbial eukaryotic communities in aquatic environments. *Molecular Ecology Resources*, 24, n. 1, p. e13887, 2024.

BAKER, C. S.; CLARIDGE, D.; DUNN, C.; FETHERSTON, T. et al. Quantification by droplet digital PCR and species identification by metabarcoding of environmental (e) DNA from Blainville's beaked whales, with assisted localization from an acoustic array. *Plos one*, 18, n. 9, p. e0291187, 2023.

BALDIGO, B. P.; SPORN, L. A.; GEORGE, S. D.; BALL, J. A. Efficacy of environmental DNA to detect and quantify brook trout populations in headwater streams of the Adirondack Mountains, New York. *Transactions of the American Fisheries Society*, 146, n. 1, p. 99-111, 2017.

BARNES, M. A.; CHADDERTON, W. L.; JERDE, C. L.; MAHON, A. R. et al. Environmental conditions influence eDNA particle size distribution in aquatic systems. *Environmental DNA*, 3, n. 3, p. 643-653, 2021.

BARNES, M. A.; TURNER, C. R.; JERDE, C. L.; RENSHAW, M. A. et al. Environmental conditions influence eDNA persistence in aquatic systems. *Environmental science & technology*, 48, n. 3, p. 1819-1827, 2014.

BASS, D.; CHRISTISON, K. W.; STENTIFORD, G. D.; COOK, L. S. et al. Environmental DNA/RNA for pathogen and parasite detection, surveillance, and ecology. *Trends in Parasitology*, 2023.

BASS, D.; STENTIFORD, G. D.; LITTLEWOOD, D.; HARTIKAINEN, H. Diverse applications of environmental DNA methods in parasitology. *Trends in parasitology*, 31, n. 10, p. 499-513, 2015.

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

BERGSON, S. Abundance, transportation, and preservation of *Mysis diluviana* eDNA in freshwater ecosystems. 2021.

BOEGER, W. A.; PIE, M. R.; FALLEIROS, R. M.; OSTRENSKY, A. et al. Testing a molecular protocol to monitor the presence of golden mussel larvae (*Limnoperna fortunei*) in plankton samples. *Journal of Plankton Research*, 29, n. 11, p. 1015-1019, 2007.

BOIVIN-DELISLE, D.; LAPORTE, M.; BURTON, F.; DION, R. et al. Using environmental DNA for biomonitoring of freshwater fish communities: Comparison with established gillnet surveys in a boreal hydroelectric impoundment. *Environmental DNA*, 3, p. 105-120, 2021.

BRADLEY, D. L.; MOREY, K. C.; BOURQUE, D. A.; FOST, B. et al. Environmental DNA detection and abundance estimates comparable to conventional methods for

three freshwater larval species at a power plant discharge. *Environmental DNA*, 4, n. 3, p. 700-714, 2022.

BRANDÃO-DIAS, P. F.; HALLACK, D. M.; SNYDER, E. D.; TANK, J. L. et al. Particle size influences decay rates of environmental DNA in aquatic systems. *Molecular Ecology Resources*, 23, n. 4, p. 756-770, 2023.

BRONSTEIN, O.; KROH, A.; HARING, E. Mind the gap! The mitochondrial control region and its power as a phylogenetic marker in echinoids. *BMC evolutionary biology*, 18, n. 1, p. 1-15, 2018.

BRYNS, R.; HALFMAERTEN, D.; NEYRINCK, S.; MAUVISSEAU, Q. et al. Reliable eDNA detection and quantification of the European weather loach (*Misgurnus fossilis*). *Journal of Fish Biology*, 98, n. 2, p. 399-414, 2020.

BURIAN, A.; MAUVISSEAU, Q.; BULLING, M.; DOMISCH, S. et al. Improving the reliability of eDNA data interpretation. *Molecular Ecology Resources*, 21, n. 5, p. 1422-1433, 2021.

BYLEMANS, J.; FURLAN, E. M.; GLEESON, D. M.; HARDY, C. M. et al. Does size matter? An experimental evaluation of the relative abundance and decay rates of aquatic environmental DNA. *Environmental Science & Technology*, 52, n. 11, p. 6408-6416, 2018.

BYLEMANS, J.; GLEESON, D. M.; HARDY, C. M.; FURLAN, E. Toward an ecoregion scale evaluation of eDNA metabarcoding primers: A case study for the freshwater fish biodiversity of the Murray–Darling Basin (Australia). *Ecology and evolution*, 8, n. 17, p. 8697-8712, 2018.

CANALS, O.; MENDIBIL, I.; SANTOS, M.; IRIGOIEN, X. et al. Vertical stratification of environmental DNA in the open ocean captures ecological patterns and behavior of deep-sea fishes. *Limnology and Oceanography Letters*, 6, n. 6, p. 339-347, 2021.

CAO, Y.; GRIFFITH, J. F.; WEISBERG, S. B. The next-generation PCR-based quantification method for ambient waters: Digital PCR. In: BOURLAT S (Ed.). *Marine Genomics: Methods and Protocols* New York: Springer, 2016. p. 113-130.

CAPO, E.; SPONG, G.; KÖNIGSSON, H.; BYSTRÖM, P. Effects of filtration methods and water volume on the quantification of brown trout (*Salmo trutta*) and Arctic char (*Salvelinus alpinus*) eDNA concentrations via droplet digital PCR. *Environmental DNA*, 2, n. 2, p. 152-160, 2020.

CAPO, E.; SPONG, G.; NORMAN, S.; KÖNIGSSON, H. et al. Droplet digital PCR assays for the quantification of brown trout (*Salmo trutta*) and Arctic char (*Salvelinus alpinus*) from environmental DNA collected in the water of mountain lakes. *PLoS One*, 14, n. 12, p. e0226638, 2019.

CARRARO, L.; STAUFFER, J. B.; ALTERMATT, F. How to design optimal eDNA sampling strategies for biomonitoring in river networks. *Environmental DNA*, 3, n. 1, p. 157-172, 2021.

CHENG, R.; LUO, Y.; ZHANG, Y.; LI, Q. et al. eDNA metabarcoding reveals differences in fish diversity and community structure in heterogeneous habitat areas shaped by cascade hydropower. *Ecology and Evolution*, 13, n. 7, p. e10275, 2023.

CHIMIENTI, G.; DI NISIO, A.; LANZOLLA, A. M.; ANDRIA, G. et al. Towards non-invasive methods to assess population structure and biomass in vulnerable sea pen fields. *Sensors*, 19, n. 10, p. 2255, 2019.

COUTANT, O.; CANTERA, I.; CILLEROS, K.; DEJEAN, T. et al. Detecting fish assemblages with environmental DNA: Does protocol matter? Testing eDNA metabarcoding method robustness. *Environmental DNA*, 3, n. 3, p. 619-630, 2021.

COWART, D. A.; MURPHY, K. R.; CHENG, C.-H. C. Environmental DNA from Marine Waters and Substrates: Protocols for Sampling and eDNA Extraction. In: *Marine Genomics: Methods and Protocols*: Springer, 2022. p. 225-251.

COYNE, D. J. Comparison of standard and environmental DNA methods for estimating Chinook salmon smolt abundance in the Klamath River, California. 2021.

DANZIGER, A. M.; FREDERICH, M. Challenges in eDNA detection of the invasive European green crab, *Carcinus maenas*. *Biological Invasions*, 24, n. 6, p. 1881-1894, 2022.

DAVISON, P. I.; COPP, G. H.; CRÉACH, V.; VILIZZI, L. et al. Application of environmental DNA analysis to inform invasive fish eradication operations. *The Science of Nature*, 104, p. 1-7, 2017.

DE BRAUWER, M.; CLARKE, L. J.; CHARITON, A.; COOPER, M. K. et al. Best practice guidelines for environmental DNA biomonitoring in Australia and New Zealand. *Environmental DNA*, 2023.

DE SOUSA, L. L.; SILVA, S. M.; XAVIER, R. DNA metabarcoding in diet studies: Unveiling ecological aspects in aquatic and terrestrial ecosystems. *Environmental DNA*, 1, n. 3, p. 199-214, 2019.

DEHART, H. M.; GASSER, M. T.; DIXON, J.; THIELEN, P. An aquatic environmental DNA filtration system to maximize recovery potential and promote filtration approach standardization. *PeerJ*, 11, p. e15360, 2023.

DEINER, K.; LOPEZ, J.; BOURNE, S.; HOLMAN, L. E. 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*, 2, p. e28963, 2018.

DÍAZ-FERGUSON, E. E.; MOYER, G. R. History, applications, methodological issues and perspectives for the use environmental DNA (eDNA) in marine and freshwater environments. *Revista de biologia tropical*, 62, n. 4, p. 1273-1284, 2014.

DINGLE, T. C.; SEDLAK, R. H.; COOK, L.; JEROME, K. R. Tolerance of droplet-digital PCR vs real-time quantitative PCR to inhibitory substances. *Clinical chemistry*, 59, n. 11, p. 1670-1672, 2013.

DJURHUUS, A.; PORT, J.; CLOSEK, C. J.; YAMAHARA, K. M. et al. Evaluation of filtration and DNA extraction methods for environmental DNA biodiversity assessments across multiple trophic levels. *Frontiers in Marine Science*, 4, p. 314, 2017.

DOI, H.; NAKAMURA, K. Environmental DNA as a practical tool for aquatic conservation and restoration. *Landscape and Ecological Engineering*, p. 1-2, 2022.

DOUCHET, P.; BOISSIER, J.; MULERO, S.; FERTÉ, H. et al. Make visible the invisible: Optimized development of an environmental DNA metabarcoding tool for the characterization of trematode parasitic communities. *environmental DNA*, 4, n. 3, p. 627-641, 2022.

DUBREUIL, T.; BAUDRY, T.; MAUVISSEAU, Q.; ARQUÉ, A. et al. The development of early monitoring tools to detect aquatic invasive species: eDNA assay development and the case of the armored catfish *Hypostomus robinii*. *Environmental DNA*, 4, n. 2, p. 349-362, 2022.

EICHMILLER, J. J.; BEST, S. A. E.; SORENSEN, P. W. Effects of temperature and trophic state on degradation of environmental DNA in lake water. *Environmental science & technology*, 50, n. 4, p. 1859-1867, 2016.

EICHMILLER, J. J.; MILLER, L. M.; SORENSEN, P. W. Optimizing techniques to capture and extract environmental DNA for detection and quantification of fish. *Molecular ecology resources*, 16, n. 1, p. 56-68, 2016.

ELUMALAI, M.; IPATOV, A.; GUERREIRO, J.; PRADO, M. Automated lab-on-chip for the specific detection of invasive species through environmental DNA. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 398, p. 134722, 2024.

EVERHART, R.; ROBERT EVERHART, B. C.; BELINDA M STURM, C. S.; DONALD HUGGINS, C.-C. G. et al. Fate and Transport of Vertebrate DNA in Surface Water Environments: Developing a Basis for Quantification through Environmental DNA Monitoring. 2015.

FEIST, S. M.; LANCE, R. F. Genetic detection of freshwater harmful algal blooms: a review focused on the use of environmental DNA (eDNA) in *Microcystis aeruginosa* and *Prymnesium parvum*. *Harmful Algae*, 110, p. 102124, 2021.

FENG, Y.; LI, W.; LI, J.; WANG, J. et al. Structural insight into the type-II mitochondrial NADH dehydrogenases. *Nature*, 491, n. 7424, p. 478-482, Nov 15 2012.

FICETOLA, G. F.; MIAUD, C.; POMPANON, F.; TABERLET, P. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology letters*, 4, n. 4, p. 423-425, 2008.

FIELDS, B.; MOESKJAER, S.; FRIMAN, V. P.; ANDERSEN, S. U. et al. MAUI-seq: Metabarcoding using amplicons with unique molecular identifiers to improve error correction. *Mol Ecol Resour*, 21, n. 3, p. 703-720, Apr 2021.

FONSECA, V. G.; DAVISON, P. I.; CREACH, V.; STONE, D. et al. The Application of eDNA for Monitoring Aquatic Non-Indigenous Species: Practical and Policy Considerations. *Diversity*, 15, n. 5, p. 631, 2023.

FOOTE, A. D.; THOMSEN, P. F.; SVEEGAARD, S.; WAHLBERG, M. et al. Investigating the potential use of environmental DNA (eDNA) for genetic monitoring of marine mammals. 2012.

FOSSØY, F.; BRANDSEGG, H.; SIVERTSGÅRD, R.; PETTERSEN, O. et al. Monitoring presence and abundance of two gyrodactylid ectoparasites and their salmonid hosts using environmental DNA. *Environmental DNA*, 2, n. 1, p. 53-62, 2020.

FU'ADIL AMIN, M. H.; LEE, J.-H.; KIM, A. R.; KIM, J.-K. et al. Development of a Quantitative PCR Assay for Four Salmon Species Inhabiting the Yangyangnamdae River Using Environmental DNA. *Biology*, 10, n. 9, p. 899, 2021.

FUKAYA, K.; MURAKAMI, H.; YOON, S.; MINAMI, K. et al. Estimating fish population abundance by integrating quantitative data on environmental DNA and hydrodynamic modelling. *Molecular Ecology*, 30, n. 13, p. 3057-3067, 2021.

GEORGE, S. D.; BALDIGO, B. P.; REES, C. B.; BARTRON, M. L. et al. Use of environmental DNA to assess American Eel distribution, abundance, and barriers in a river–canal system. *Transactions of the American Fisheries Society*, 2023.

GOLDBERG, C. S.; TURNER, C. R.; DEINER, K.; KLYMUS, K. E. et al. Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods in ecology and evolution*, 7, n. 11, p. 1299-1307, 2016.

GOLI, R. C.; SUKHIJA, N.; RATHI, P.; CHISHI, K. G. et al. Unraveling the genetic tapestry of Indian chicken: A comprehensive study of molecular variations and diversity. *Ecological Genetics and Genomics*, p. 100220, 2024.

GREGORY-EAVES, I.; SMOL, J. P. Paleolimnology: Approaches and Applications. In: *Wetzel's Limnology*: Elsevier, 2024. p. 1015-1043.

GREINER-FERRIS, K. Testing the Potential of Environmental DNA: Genetic Monitoring of Estuarine and Coastal Bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*) Stocks in South Carolina. 2020.

GÜNTHER, B.; KNEBELSBERGER, T.; NEUMANN, H.; LAAKMANN, S. et al. Metabarcoding of marine environmental DNA based on mitochondrial and nuclear genes. *Scientific Reports*, 8, n. 1, p. 14822, 2018/10/04 2018.

HÄNFLING, B.; LAWSON HANDLEY, L.; READ, D. S.; HAHN, C. et al. Environmental DNA metabarcoding of lake fish communities reflects long-term data from established survey methods. *Molecular ecology*, 25, n. 13, p. 3101-3119, 2016.

HANSEN, B. K.; BEKKEVOLD, D.; CLAUSEN, L. W.; NIELSEN, E. E. The sceptical optimist: challenges and perspectives for the application of environmental DNA in marine fisheries. *Fish and fisheries*, 19, n. 5, p. 751-768, 2018.

HANSEN, B. K.; JACOBSEN, M. W.; MIDDELBOE, A. L.; PRESTON, C. M. et al. Remote, autonomous real-time monitoring of environmental DNA from commercial fish. *Scientific Reports*, 10, n. 1, p. 13272, 2020.

HANXI, L.; XUENA, H.; SHIGUO, L.; AIBIN, Z. Environmental DNA (eDNA)-metabarcoding-based early monitoring and warning for invasive species in aquatic ecosystems. *Biodiversity Science*, 27, n. 5, p. 491, 2019.

HARPER, L. R.; HANDLEY, L. L.; CARPENTER, A. I.; GHAZALI, M. et al. Environmental DNA (eDNA) metabarcoding of pond water as a tool to survey conservation and management priority mammals. *Biological conservation*, 238, p. 108225, 2019.

HARRISON, J. B.; SUNDAY, J. M.; ROGERS, S. M. Predicting the fate of eDNA in the environment and implications for studying biodiversity. *Proceedings of the Royal Society B*, 286, n. 1915, p. 20191409, 2019.

HARTIG, F.; ABREGO, N.; BUSH, A.; CHASE, J. M. et al. Novel community data in ecology-properties and prospects. *Trends in Ecology & Evolution*, 2024.

HENDRICKS, A.; MACKIE, C. M.; LUY, E.; SONNICHSEN, C. et al. Compact and automated eDNA sampler for in situ monitoring of marine environments. *Scientific Reports*, 13, n. 1, p. 5210, 2023.

HIGUCHI, R.; DOLLINGER, G.; WALSH, P. S.; GRIFFITH, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio/technology*, 10, n. 4, p. 413-417, 1992.

HIGUCHI, R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, G.; WATSON, R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/technology*, 11, n. 9, p. 1026-1030, 1993.

HINKLE, J. Proof-of-concept of environmental DNA tools for atlantic sturgeon management. 2015.

HINLO, R.; LINTERMANS, M.; GLEESON, D.; BROADHURST, B. et al. Performance of eDNA assays to detect and quantify an elusive benthic fish in upland streams. *Biological Invasions*, 20, n. 11, p. 3079-3093, 2018.

HOLMES, A. E.; BAERWALD, M. R.; RODZEN, J.; SCHREIER, B. M. et al. Evaluating environmental DNA detection of a rare fish in turbid water using field and experimental approaches. *PeerJ*, 11, p. e16453, 2024.

HUANG, Z.; XU, X.; TANG, J.; ZHANG, J. et al. Application and primer design of mitochondrial DNA D-loop of freshwater fishes. *Zhongshan Daxue Xuebao/Acta Scientiarum Natralium Universitatis Sunyatseni*, 48, p. 84-88, 07/01 2009.

HUNTER, M. E.; MEIGS-FRIEND, G.; FERRANTE, J. A.; KAMLA, A. T. et al. Surveys of environmental DNA (eDNA): a new approach to estimate occurrence in Vulnerable manatee populations. *Endangered Species Research*, 35, p. 101-111, 2018.

HUVER, J.; KOPRIVNIKAR, J.; JOHNSON, P.; WHYARD, S. Development and application of an eDNA method to detect and quantify a pathogenic parasite in aquatic ecosystems. *Ecological Applications*, 25, n. 4, p. 991-1002, 2015.

HWANG, H.; DILLON, W. R.; TAKANE, Y. An extension of multiple correspondence analysis for identifying heterogeneous subgroups of respondents. *Psychometrika*, 71, n. 1, p. 161-171, 2006.

ILLUMINA. Focused power on the MiSeq System. 2024. Disponível em: <https://www.illumina.com/systems/sequencing-platforms/miseq.html>. Acesso em: 01/15/24.

JAYASANKAR, P. Environmental DNA (eDNA) metabarcoding-based estimation of marine stocks. 2017.

JERDE, C. L.; MAHON, A. R.; CHADDERTON, W. L.; LODGE, D. M. "Sight-unseen" detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conservation letters*, 4, n. 2, p. 150-157, 2011.

JEUNEN, G. J.; KNAPP, M.; SPENCER, H. G.; TAYLOR, H. R. et al. Species-level biodiversity assessment using marine environmental DNA metabarcoding requires protocol optimization and standardization. *Ecology and evolution*, 9, n. 3, p. 1323-1335, 2019.

JIANG, P.; ZHANG, S.; XU, S.; XIONG, P. et al. Comparison of environmental DNA metabarcoding and bottom trawling for detecting seasonal fish communities and habitat preference in a highly disturbed estuary. *Ecological Indicators*, 146, p. 109754, 2023.

JO, T.; ARIMOTO, M.; MURAKAMI, H.; MASUDA, R. et al. Estimating shedding and decay rates of environmental nuclear DNA with relation to water temperature and biomass. *Environmental DNA*, 2, n. 2, p. 140-151, 2020.

JO, T.; MINAMOTO, T. Complex interactions between environmental DNA (eDNA) state and water chemistries on eDNA persistence suggested by meta-analyses. *Molecular Ecology Resources*, 21, n. 5, p. 1490-1503, 2021.

JO, T. S. Utilizing the state of environmental DNA (eDNA) to incorporate time-scale information into eDNA analysis. *Proceedings of the Royal Society B*, 290, n. 1999, p. 20230979, 2023.

JOHNSEN, S. I.; STRAND, D. A.; RUSCH, J. C.; VRÅLSTAD, T. Environmental DNA (eDNA) monitoring of noble crayfish *Astacus astacus* in lentic environments offers reliable presence-absence surveillance—but fails to predict population density. *Frontiers in Environmental Science*, p. 251, 2020.

JOSEPH, C.; FAIQ, M. E.; LI, Z.; CHEN, G. Persistence and degradation dynamics of eDNA affected by environmental factors in aquatic ecosystems. *Hydrobiologia*, 849, n. 19, p. 4119-4133, 2022.

JUHEL, J. B.; MARQUES, V.; UTAMA, R. S.; VIMONO, I. B. et al. Estimating the extended and hidden species diversity from environmental DNA in hyper-diverse regions. *Ecography*, 2022, n. 10, p. e06299, 2022.

KAMOROFF, C.; GOLDBERG, C. S. Environmental DNA quantification in a spatial and temporal context: a case study examining the removal of brook trout from a high alpine basin. *Limnology*, 19, p. 335-342, 2018.

KANAWI, E. A. Comparing environmental DNA and traditional monitoring approaches to assess the abundance of outmigrating coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in California coastal streams. 2020.

KAWAKAMI, T.; YAMAZAKI, A.; ASAMI, M.; GOTO, Y. et al. Evaluating the sampling effort for the metabarcoding-based detection of fish environmental DNA in the open ocean. *Ecology and evolution*, 13, n. 3, p. e9921, 2023.

KELLY, R. P.; SHELTON, A. O.; GALLEGO, R. Understanding PCR processes to draw meaningful conclusions from environmental DNA studies. *Scientific reports*, 9, n. 1, p. 12133, 2019.

KING, A. C.; KRIEG, R.; WESTON, A.; ZENKER, A. K. Using eDNA to simultaneously detect the distribution of native and invasive crayfish within an entire country. *Journal of Environmental Management*, 302, p. 113929, 2022.

KIRTANE, A.; WIECZOREK, D.; NOJI, T.; BASKIN, L. et al. Quantification of Environmental DNA (eDNA) shedding and decay rates for three commercially harvested fish species and comparison between eDNA detection and trawl catches. *Environmental DNA*, 2021.

KNUDSEN, S. W.; EBERT, R. B.; HESSELSØE, M.; KUNTKE, F. et al. Species-specific detection and quantification of environmental DNA from marine fishes in the Baltic Sea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 510, p. 31-45, 2019.

LACOURSIÈRE-ROUSSEL, A.; DUBOIS, Y.; NORMANDEAU, E.; BERNATCHEZ, L. Improving herpetological surveys in eastern North America using the environmental DNA method. *Genome*, 59, n. 11, p. 991-1007, 2016.

LAN, Y.; ROSEN, G.; HERSHBERG, R. Marker genes that are less conserved in their sequences are useful for predicting genome-wide similarity levels between closely related prokaryotic strains. *Microbiome*, 4, n. 1, p. 18, 2016/05/03 2016.

LEBLANC, F.; BELLIVEAU, V.; WATSON, E.; COOMBER, C. et al. Environmental DNA (eDNA) detection of marine aquatic invasive species (AIS) in Eastern Canada using a targeted species-specific qPCR approach. *Management of Biological Invasions*, 11, n. 2, 2020.

LI, J.; LAWSON HANDLEY, L. J.; READ, D. S.; HÄNFLING, B. The effect of filtration method on the efficiency of environmental DNA capture and quantification via metabarcoding. *Molecular Ecology Resources*, 18, n. 5, p. 1102-1114, 2018.

LI, X.; LI, F.; MIN, X.; XIE, Y. et al. Embracing eDNA and machine learning for taxonomy-free microorganisms biomonitoring to assess the river ecological status. *Ecological Indicators*, 155, p. 110948, 2023.

LIANG, Z.; KEELEY, A. Filtration recovery of extracellular DNA from environmental water samples. *Environmental science & technology*, 47, n. 16, p. 9324-9331, 2013.

LIAO, Y.; LIU, Z.; ZHANG, Y.; LU, P. et al. High-throughput and high-sensitivity full-length single-cell RNA-seq analysis on third-generation sequencing platform. *Cell Discovery*, 9, n. 1, p. 5, 2023.

LIN, C.-P.; DANFORTH, B. N. How do insect nuclear and mitochondrial gene substitution patterns differ? Insights from Bayesian analyses of combined datasets. *Molecular phylogenetics and evolution*, 30, n. 3, p. 686-702, 2004.

LOPEZ-OCEJA, A.; GAMARRA, D.; BORRAGAN, S.; JIMÉNEZ-MORENO, S. et al. New cyt b gene universal primer set for forensic analysis. *Forensic Sci Int Genet*, 23, p. 159-165, Jul 2016.

MA, H.; STEWART, K.; LOUGHEED, S.; ZHENG, J. et al. Characterization, optimization, and validation of environmental DNA (eDNA) markers to detect an endangered aquatic mammal. *Conservation Genetics Resources*, 8, p. 561-568, 2016.

MA, Q.; HE, K.; WANG, X.; JIANG, J. et al. Better Resolution for Cytochrome b than Cytochrome c Oxidase Subunit I to Identify Schizothorax Species (Teleostei: Cyprinidae) from the Tibetan Plateau and Its Adjacent Area. *DNA Cell Biol*, 39, n. 4, p. 579-598, Apr 2020.

MAJANEVA, M.; DISERUD, O. H.; EAGLE, S. H.; BOSTRÖM, E. et al. Environmental DNA filtration techniques affect recovered biodiversity. *Scientific reports*, 8, n. 1, p. 4682, 2018.

MARQUES, V.; MILHAU, T.; ALBOUY, C.; DEJEAN, T. et al. GAPeDNA: Assessing and mapping global species gaps in genetic databases for eDNA metabarcoding. *Diversity and Distributions*, 27, n. 10, p. 1880-1892, 2021.

MARUYAMA, A.; NAKAMURA, K.; YAMANAKA, H.; KONDOH, M. et al. The release rate of environmental DNA from juvenile and adult fish. *PLoS One*, 9, n. 12, p. e114639, 2014.

MATHIEU, C.; HERMANS, S. M.; LEAR, G.; BUCKLEY, T. R. et al. A systematic review of sources of variability and uncertainty in eDNA data for environmental monitoring. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 8, p. 135, 2020.

MATSUHASHI, S.; DOI, H.; FUJIWARA, A.; WATANABE, S. et al. Evaluation of the environmental DNA method for estimating distribution and biomass of submerged aquatic plants. *PLoS One*, 11, n. 6, p. e0156217, 2016.

MAUVISSEAU, Q.; HARPER, L. R.; SANDER, M.; HANNER, R. H. et al. The multiple states of environmental DNA and what is known about their persistence in aquatic environments. *Environmental Science & Technology*, 56, n. 9, p. 5322-5333, 2022.

MCCARTIN, L. J.; VOHSEN, S. A.; AMBROSE, S. W.; LAYDEN, M. et al. Temperature controls eDNA persistence across physicochemical conditions in seawater. *Environmental Science & Technology*, 56, n. 12, p. 8629-8639, 2022.

MILHAU, T.; VALENTINI, A.; POULET, N.; ROSET, N. et al. Seasonal dynamics of riverine fish communities using eDNA. *Journal of fish biology*, 98, n. 2, p. 387-398, 2021.

MINAMOTO, T. Environmental DNA analysis for macro-organisms: species distribution and more. *DNA Research*, 29, n. 3, p. dsac018, 2022.

MINAMOTO, T.; MIYA, M.; SADO, T.; SEINO, S. et al. An illustrated manual for environmental DNA research: Water sampling guidelines and experimental protocols. *Environmental DNA*, 3, n. 1, p. 8-13, 2021.

MINAMOTO, T.; NAKA, T.; MOJI, K.; MARUYAMA, A. Techniques for the practical collection of environmental DNA: filter selection, preservation, and extraction. *Limnology*, 17, p. 23-32, 2016.

MINAMOTO, T.; YAMANAKA, H.; TAKAHARA, T.; HONJO, M. N. et al. Surveillance of fish species composition using environmental DNA. *Limnology*, 13, n. 2, p. 193-197, 2012.

MIYAZONO, S.; KODAMA, T.; AKAMATSU, Y.; NAKAO, R. et al. Application of environmental DNA methods for the detection and abundance estimation of invasive aquatic plant *Egeria densa* in lotic habitats. *Limnology*, 22, p. 81-87, 2021.

MIZUMOTO, H.; URABE, H.; KANBE, T.; FUKUSHIMA, M. et al. Establishing an environmental DNA method to detect and estimate the biomass of Sakhalin taimen, a critically endangered Asian salmonid. *Limnology*, 19, p. 219-227, 2018.

MUHA, T. P.; ROBINSON, C. V.; GARCIA DE LEANIZ, C.; CONSUEGRA, S. An optimised eDNA protocol for detecting fish in lentic and lotic freshwaters using a small water volume. *PLoS One*, 14, n. 7, p. e0219218, 2019.

MURIENNE, J.; CANTERA, I.; CERDAN, A.; CILLEROS, K. et al. Aquatic eDNA for monitoring French Guiana biodiversity. *Biodiversity Data Journal*, 7, 2019.

NAGLER, M.; PODMIRSEG, S. M.; ASCHER-JENULL, J.; SINT, D. et al. Why eDNA fractions need consideration in biomonitoring. *Molecular ecology resources*, 22, n. 7, p. 2458-2470, 2022.

NAKAMURA, K. Dominant barriers and the solutions to the social application of environmental DNA. *Landscape and Ecological Engineering*, p. 1-8, 2023.

NAVARRO, E.; SERRANO-HERAS, G.; CASTAÑO, M. J.; SOLERA, J. Real-time PCR detection chemistry. *Clinica Chimica Acta*, 439, p. 231-250, 2015/01/15/ 2015.

NEVERS, M. B.; BYAPPANAHALLI, M. N.; MORRIS, C. C.; SHIVELY, D. et al. Environmental DNA (eDNA): A tool for quantifying the abundant but elusive round goby (*Neogobius melanostomus*). *PloS one*, 13, n. 1, p. e0191720, 2018.

NICOLIA, A.; SCOTTI, N.; D'AGOSTINO, N.; FESTA, G. et al. Mitochondrial DNA editing in potato through mitoTALEN and mitoTALECD: molecular characterization and stability of editing events. *Plant Methods*, 20, n. 1, p. 4, 2024.

NYGAARD, M. Environmental DNA for assessing abundance of salmon lice (*Lepeophtheirus salmonis*) in salmon (*Salmo salar*) farms. 2018. -, UiT The Arctic University of Norway.

ODERO, J. Application of Environmental DNA (eDNA) in the Detection and Quantification of Anopheles Mosquito Larvae in Artificial Aquatic Habitats. 2016. 65 f. (Master) -, Liverpool School of Tropical Medicine, Liverpool, England.

OGRAM, A.; SAYLER, G. S.; BARKAY, T. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *Journal of microbiological methods*, 7, n. 2-3, p. 57-66, 1987.

OTHMAN, N.; MUNIAN, K.; HARIS, H.; RAMLI, F. F. et al. A Review on Next-Generation Wildlife Monitoring using Environmental DNA (eDNA) Detection and Next-Generation Sequencing in Malaysia. *Sains Malaysiana*, 52, n. 1, p. 17-33, 2023.

PAGE, M. J.; MCKENZIE, J. E.; BOSSUYT, P. M.; BOUTRON, I. et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *Bmj*, 372, 2021.

PAPAIIOANNOU, C.; GELADAKIS, G.; KOMMATA, V.; BATARGIAS, C. et al. Insights in Pharmaceutical Pollution: The Prospective Role of eDNA Metabarcoding. *Toxics*, 11, n. 11, p. 903, 2023.

PAUL, J. H.; KELLOGG, C. A.; JIANG, S. C. Viruses and DNA in marine environments. *Microbial diversity in time and space*, p. 115-124, 1996.

PAWLOWSKI, J.; KELLY-QUINN, M.; ALTERMATT, F.; APOTHÉLOZ-PERRET-GENTIL, L. et al. The future of biotic indices in the ecogenomic era: Integrating (e) DNA metabarcoding in biological assessment of aquatic ecosystems. *Science of the Total Environment*, 637, p. 1295-1310, 2018.

PEDERSEN, M. W.; OVERBALLE-PETERSEN, S.; ERMINI, L.; SARKISSIAN, C. D. et al. Ancient and modern environmental DNA. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370, n. 1660, p. 20130383, 2015.

PETERS, L.; SPATHARIS, S.; DARIO, M. A.; DWYER, T. et al. Environmental DNA: A new low-cost monitoring tool for pathogens in salmonid aquaculture. *Frontiers in Microbiology*, 9, p. 3009, 2018.

PIE, M. R.; STRÖHER, P. R.; AGOSTINIS, A. O.; BELMONTE-LOPES, 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*, 89, p. 1041-1045, 2017.

PONT, D.; MEULENBROEK, P.; BAMMER, V.; DEJEAN, T. et al. Quantitative monitoring of diverse fish communities on a large scale combining eDNA metabarcoding and qPCR. *Molecular Ecology Resources*, 23, n. 2, p. 396-409, 2023.

PORTER, T. M.; HAJIBABAEI, M. Scaling up: A guide to high-throughput genomic approaches for biodiversity analysis. *Molecular ecology*, 27, n. 2, p. 313-338, 2018.

PUKK, L.; KANEFSKY, J.; HEATHMAN, A. L.; WEISE, E. M. et al. eDNA metabarcoding in lakes to quantify influences of landscape features and human activity on aquatic invasive species prevalence and fish community diversity. *Diversity and Distributions*, 27, n. 10, p. 2016-2031, 2021.

PYTHON SOFTWARE FOUNDATION. Python 3.12.1 documentation. 2023.

RAHIM, F.; BODNAR, N.; QASIM, N. H.; JAWAD, A. M. et al. Integrating Machine Learning in Environmental DNA Metabarcoding for Improved Biodiversity Assessment: A Review and Analysis of Recent Studies. 2023.

RAHMAN, M. T.; UDDIN, M. S.; SULTANA, R.; MOUE, A. et al. Polymerase chain reaction (PCR): a short review. *Anwer Khan Modern Medical College Journal*, 4, n. 1, p. 30-36, 2013.

REES, H. C.; MADDISON, B. C.; MIDDLEDITCH, D. J.; PATMORE, J. R. 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*, 51, n. 5, p. 1450-1459, 2014.

RENSHAW, M. A.; OLDS, B. P.; JERDE, C. L.; MCVEIGH, M. M. et al. The room temperature preservation of filtered environmental DNA samples and assimilation into a phenol–chloroform–isoamyl alcohol DNA extraction. *Molecular ecology resources*, 15, n. 1, p. 168-176, 2015.

RIAZ, M.; WARREN, D.; WITTEWER, C.; COCCHIARARO, B. et al. Using eDNA to understand predator–prey interactions influenced by invasive species. *Oecologia*, 202, n. 4, p. 757-767, 2023.

ROURKE, M. L.; FOWLER, A. M.; HUGHES, J. M.; BROADHURST, M. K. et al. Environmental DNA (eDNA) as a tool for assessing fish biomass: A review of

approaches and future considerations for resource surveys. *Environmental DNA*, 2021.

RUAN, H. T.; WANG, R. L.; LI, H. T.; LIU, L. et al. Effects of sampling strategies and DNA extraction methods on eDNA metabarcoding: A case study of estuarine fish diversity monitoring. *Zool Res*, 43, n. 2, p. 192-204, Mar 18 2022.

SAHU, A.; KUMAR, N.; SINGH, C. P.; SINGH, M. Environmental DNA (eDNA): Powerful technique for biodiversity conservation. *Journal for Nature Conservation*, 71, p. 126325, 2023.

SAKATA, M. K.; SATO, M.; SATO, M. O.; WATANABE, T. et al. Detection and persistence of environmental DNA (eDNA) of the different developmental stages of a vector mosquito, *Culex pipiens pallens*. *Plos one*, 17, n. 8, p. e0272653, 2022.

SANGER, F.; COULSON, A. R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of molecular biology*, 94, n. 3, p. 441-448, 1975.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*, 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SATO, M.; INOUE, N.; NAMBU, R.; FURUICHI, N. et al. Quantitative assessment of multiple fish species around artificial reefs combining environmental DNA metabarcoding and acoustic survey. *Scientific reports*, 11, n. 1, p. 1-14, 2021.

SCHENEKAR, T. The current state of eDNA research in freshwater ecosystems: are we shifting from the developmental phase to standard application in biomonitoring? *Hydrobiologia*, 850, n. 6, p. 1263-1282, 2023.

SCHLOESSER, D.; RESEARCH, C. S.-J. O. S.; 2012, U. Bibliography of *Dreissena polymorpha* (Zebra Mussels) and *Dreissena rostriformis Bugensis* (QUAGGA Mussels): 1989 to 2011. *BioOne*, 2012.

SCRIVER, M.; MARINICH, A.; WILSON, C.; FREELAND, J. Development of species-specific environmental DNA (eDNA) markers for invasive aquatic plants. *Aquatic botany*, 122, p. 27-31, 2015.

SENAPATI, D.; BHATTACHARYA, M.; KAR, A.; CHINI, D. S. et al., 2019, Environmental DNA (eDNA): A promising biological survey tool for aquatic species detection. *Springer*. 211-228.

SEPULVEDA, A. J.; AL-CHOKHACHY, R.; LARAMIE, M. B.; CRAPSTER, K. et al. It's complicated... environmental DNA as a predictor of trout and char abundance in streams. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 78, n. 4, p. 422-432, 2021.

SEPULVEDA, A. J.; NELSON, N. M.; JERDE, C. L.; LUIKART, G. Are environmental DNA methods ready for aquatic invasive species management? *Trends in ecology & evolution*, 35, n. 8, p. 668-678, 2020.

SHASHANK, P. R.; PARKER, B. M.; RANANAWARE, S. R.; PLOTKIN, D. et al. CRISPR-based diagnostics detects invasive insect pests. *Molecular Ecology Resources*, 24, n. 1, p. e13881, 2024.

SHU, L.; LUDWIG, A.; PENG, Z. Standards for methods utilizing environmental DNA for detection of fish species. *Genes*, 11, n. 3, p. 296, 2020.

SIEBER, N.; HARTIKAINEN, H.; VORBURGER, C. Validation of an eDNA-based method for the detection of wildlife pathogens in water. *Diseases of Aquatic Organisms*, 141, p. 171-184, 2020.

SIGSGAARD, E. E.; JENSEN, M. R.; WINKELMANN, I. E.; MØLLER, P. R. et al. Population-level inferences from environmental DNA—Current status and future perspectives. *Evolutionary Applications*, 13, n. 2, p. 245-262, 2020.

SILVA, A. N. B. D.; SOUZA, R. D. C. M. D.; HONORATO, N. R. M.; MARTINS, R. R. et al. Comparison of phenol-chloroform and a commercial deoxyribonucleic acid extraction kit for identification of bloodmeal sources from triatomines (Hemiptera: Reduviidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 53, 2020.

SLATKO, B. E.; GARDNER, A. F.; AUSUBEL, F. M. Overview of next-generation sequencing technologies. *Current protocols in molecular biology*, 122, n. 1, p. e59, 2018.

SMITH, L. Biodiversity monitoring using environmental DNA: Can it detect all fish species in a waterbody and is it cost effective for routine monitoring? 2017.

SMITH, T.; HEGER, A.; SUDBERY, I. UMI-tools: modeling sequencing errors in Unique Molecular Identifiers to improve quantification accuracy. *Genome Res*, 27, n. 3, p. 491-499, Mar 2017.

SOLARZ, W.; NAJBEREK, K.; WILK-WOŹNIAK, E.; BIEDRZYCKA, A. Raccoons foster the spread of freshwater and terrestrial microorganisms—Mammals as a source of microbial eDNA. *Diversity and Distributions*, 26, n. 4, p. 453-459, 2020.

SOUZA, H. V.; MARCHESIN, S. R.; ITOYAMA, M. M. Analysis of the mitochondrial COI gene and its informative potential for evolutionary inferences in the families Coreidae and Pentatomidae (Heteroptera). *Genet Mol Res*, 15, n. 1, Feb 5 2016.

SPEAR, M. J.; EMBKE, H. S.; KRYSAN, P. J.; VANDER ZANDEN, M. J. Application of eDNA as a tool for assessing fish population abundance. *Environmental DNA*, 3, n. 1, p. 83-91, 2021.

SPENS, J.; EVANS, A. R.; HALFMAERTEN, D.; KNUDSEN, S. W. et al. Comparison of capture and storage methods for aqueous microbial eDNA using an optimized

extraction protocol: advantage of enclosed filter. *Methods in Ecology and Evolution*, 8, n. 5, p. 635-645, 2017.

STAT, M.; HUGGETT, M. J.; BERNASCONI, R.; DIBATTISTA, J. D. et al. Ecosystem biomonitoring with eDNA: metabarcoding across the tree of life in a tropical marine environment. *Scientific reports*, 7, n. 1, p. 12240, 2017.

SUN, S. E.; NI, G.; WANG, W.; SHA, Z. et al. Highly rearranged gene orders and rapid evolutionary rates in the mitochondrial genomes of Apodida (Echinodermata: Holothuroidea). *Frontiers in Marine Science*, 2023.

TABERLET, P.; BONIN, A.; ZINGER, L.; COISSAC, E. *Environmental DNA: For biodiversity research and monitoring*. Oxford University Press, 2018. 0198767226.

TABERLET, P.; WAITS, L. P.; LUIKART, G. Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends in ecology & evolution*, 14, n. 8, p. 323-327, 1999.

TAKAHARA, T.; MINAMOTO, T.; YAMANAKA, H.; DOI, H. et al. Estimation of fish biomass using environmental DNA. *PloS one*, 7, n. 4, p. e35868, 2012.

TAKEUCHI, A.; SADO, T.; GOTOH, R. O.; WATANABE, S. et al. New PCR primers for metabarcoding environmental DNA from freshwater eels, genus *Anguilla*. *Scientific Reports*, 9, n. 1, p. 7977, 2019.

THALINGER, B.; DEINER, K.; HARPER, L. R.; REES, H. C. et al. A validation scale to determine the readiness of environmental DNA assays for routine species monitoring. *Environmental DNA*, 3, n. 4, p. 823-836, 2021.

THOMAS, A. C.; HOWARD, J.; NGUYEN, P. L.; SEIMON, T. A. et al. eDNA Sampler: A fully integrated environmental DNA sampling system. *Methods in ecology and evolution*, 9, n. 6, p. 1379-1385, 2018.

THOMSEN, M. S.; WERNBERG, T.; SCHIEL, D. Invasions by non-indigenous species. In: FRID, T. P. C. A. C. L. J. (Ed.). *Marine Ecosystems: Human Impacts on Biodiversity, Functioning and Services*: Cambridge University Press, 2015. p. 274 - 330.

THOMSEN, P. F.; KIELGAST, J.; IVERSEN, L. L.; MØLLER, P. R. et al. Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. 2012.

THOMSEN, P. F.; KIELGAST, J.; IVERSEN, L. L.; WIUF, C. et al. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular ecology*, 21, n. 11, p. 2565-2573, 2012.

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

TIAN, H. A. Assessing the biotic and abiotic factors influencing the distribution and intensity of cyanobacterial harmful algal blooms in Dog Lake, South Frontenac using UAV imaging and eDNA. 2021. -, Queen's University (Canada).

TILLOTSON, M. D.; KELLY, R. P.; DUDA, J. J.; HOY, M. et al. Concentrations of environmental DNA (eDNA) reflect spawning salmon abundance at fine spatial and temporal scales. *Biological Conservation*, 220, p. 1-11, 2018.

TRIMBOS, K. B.; CIERAAD, E.; SCHRAMA, M.; SAARLOOS, A. I. et al. Stirring up the relationship between quantified environmental DNA concentrations and exoskeleton-shedding invertebrate densities. *Environmental DNA*, 3, n. 3, p. 605-618, 2021.

TROTH, C. R.; BURIAN, A.; MAUVISSEAU, Q.; BULLING, M. et al. Development and application of eDNA-based tools for the conservation of white-clawed crayfish. *Science of the Total Environment*, 748, p. 141394, 2020.

TROTH, C. R.; SWEET, M. J.; NIGHTINGALE, J.; BURIAN, A. Seasonality, DNA degradation and spatial heterogeneity as drivers of eDNA detection dynamics. *Science of the Total Environment*, 768, p. 144466, 2021.

TSUJI, S.; INUI, R.; NAKAO, R.; MIYAZONO, S. et al. Quantitative environmental DNA metabarcoding shows high potential as a novel approach to quantitatively assess fish community. *Scientific Reports*, 12, n. 1, p. 21524, 2022.

TSUJI, S.; TAKAHARA, T.; DOI, H.; SHIBATA, N. et al. The detection of aquatic macroorganisms using environmental DNA analysis—A review of methods for collection, extraction, and detection. *Environmental DNA*, 1, n. 2, p. 99-108, 2019.

TURNER, C. R.; BARNES, M. A.; XU, C. C.; JONES, S. E. et al. Particle size distribution and optimal capture of aqueous microbial eDNA. *Methods in Ecology and Evolution*, 5, n. 7, p. 676-684, 2014.

UCHIDA, N.; KUBOTA, K.; AITA, S.; KAZAMA, S. Aquatic insect community structure revealed by eDNA metabarcoding derives indices for environmental assessment. *PeerJ*, 8, p. e9176, 2020.

USHIO, M.; FUKUDA, H.; INOUE, T.; MAKOTO, K. et al. Environmental DNA enables detection of terrestrial mammals from forest pond water. *Molecular Ecology Resources*, 17, n. 6, p. e63-e75, 2017.

VEILLEUX, H. D.; MISUTKA, M. D.; GLOVER, C. N. Environmental DNA and environmental RNA: Current and prospective applications for biological monitoring. *Science of the Total Environment*, 782, p. 146891, 2021.

VENTER, J. C.; REMINGTON, K.; HEIDELBERG, J. F.; HALPERN, A. L. et al. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *science*, 304, n. 5667, p. 66-74, 2004.

WALDEN, C.; CARBONERO, F.; ZHANG, W. Assessing impacts of DNA extraction methods on next generation sequencing of water and wastewater samples. *Journal of microbiological methods*, 141, p. 10-16, 2017.

WANG, S.; YAN, Z.; HÄNFLING, B.; ZHENG, X. et al. Methodology of fish eDNA and its applications in ecology and environment. *Science of the Total Environment*, 755, p. 142622, 2021.

WANG, Z.; LIU, X.; LIANG, D.; WANG, Q. et al. VertU: universal multilocus primer sets for eDNA metabarcoding of vertebrate diversity, evaluated by both artificial and natural cases. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 11, 2023-June-19 2023. Original Research.

WATTS, A. W.; MIKSIS-OLDS, J., 2018, The ocean as a living sensor: environmental DNA and acoustics for detecting marine life.

WELDON, L.; O'LEARY, C.; STEER, M.; NEWTON, L. et al. A comparison of European eel *Anguilla anguilla* eDNA concentrations to fyke net catches in five Irish lakes. *Environmental DNA*, 2, p. 587-600, 2020.

WILCOX, T.; CARIM, K.; FRANKLIN, T. W.; MCKELVEY, K. S. et al. The importance of sound methodology in environmental DNA sampling. 2018.

WITWERT, C.; NOWAK, C.; STRAND, D. A.; VRÅLSTAD, T. et al. Comparison of two water sampling approaches for eDNA-based crayfish plague detection. *Limnologica*, 70, p. 1-9, 2018.

YAMAMOTO, S.; MASUDA, R.; SATO, Y.; SADO, T. et al. Environmental DNA metabarcoding reveals local fish communities in a species-rich coastal sea. *Scientific reports*, 7, n. 1, p. 40368, 2017.

YANG, H.; YU, J.; JIN, L.; ZHAO, Y. et al. A deep learning based method for automatic analysis of high-throughput droplet digital PCR images. *Analyst*, 148, n. 2, p. 239-247, 2023.

YANG, J.; ZHANG, L.; MU, Y.; WANG, J. et al. Unsupervised biological integrity assessment by eDNA biomonitoring of multi-trophic aquatic taxa. *Environment International*, 175, p. 107950, 2023.

YANG, L.; DING, F.; LIN, Q.; XIE, J. et al. A tool to automatically design multiplex PCR primer pairs for specific targets using diverse templates. *Scientific Reports*, 13, n. 1, p. 16451, 2023/09/30 2023.

YATES, M. C.; CRISTESCU, M. E.; DERRY, A. M. Integrating physiology and environmental dynamics to operationalize environmental DNA (eDNA) as a means to monitor freshwater macro-organism abundance. *Molecular Ecology*, 30, n. 24, p. 6531-6550, 2021.

YATES, M. C.; DERRY, A. M.; CRISTESCU, M. E. Environmental RNA: A Revolution in Ecological Resolution? *Trends in Ecology and Evolution*. 36: 601-609 p. 2021.

YATES, M. C.; GLASER, D.; POST, J. R.; CRISTESCU, M. E. et al. The relationship between eDNA particle concentration and organism abundance in nature is strengthened by allometric scaling. *Molecular Ecology*, 30, n. 13, p. 3068-3082, 2021.

YATES, M. C.; WILCOX, T. M.; STOECKLE, M.; HEATH, D. D. Interspecific allometric scaling in eDNA production among northwestern Atlantic bony fishes reflects physiological allometric scaling. *Environmental DNA*, 2022.

YOCCOZ, N. G. The future of environmental DNA in ecology. *Molecular ecology*, 21, n. 8, p. 2031-2038, 2012.

YOSHITAKE, K.; FUJIWARA, A.; MATSUURA, A.; SEKINO, M. et al. Estimation of tuna population by the improved analytical pipeline of unique molecular identifier-assisted HaCeD-Seq (haplotype count from eDNA). *Scientific Reports*, 11, n. 1, p. 7031, 2021.

YOSHITAKE, K.; YOSHINAGA, T.; TANAKA, C.; MIZUSAWA, N. et al. HaCeD-Seq: a Novel Method for Reliable and Easy Estimation About the Fish Population Using Haplotype Count from eDNA. *Marine Biotechnology*, 21, p. 813-820, 2019.

ZHANG, J.; DING, R.; WANG, Y.; WEN, J. Experimental study on the response relationship between environmental DNA concentration and biomass of *Schizothorax prenanti* in still water. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 10, p. 972680, 2022.

ZHANG, L.; YANG, J.; ZHANG, Y.; SHI, J. et al. eDNA biomonitoring revealed the ecological effects of water diversion projects between Yangtze River and Tai Lake. *Water Research*, 210, p. 117994, 2022.

ZHANG, L.; ZHOU, W.; JIAO, M.; XIE, T. et al. Use of passive sampling in environmental DNA metabarcoding technology: Monitoring of fish diversity in the Jiangmen coastal waters. *Science of The Total Environment*, 908, p. 168298, 2024.

ZHANG, S.; LU, Q.; WANG, Y.; WANG, X. et al. Assessment of fish communities using environmental DNA: Effect of spatial sampling design in lentic systems of different sizes. *Molecular Ecology Resources*, 20, n. 1, p. 242-255, 2020.

ZHANG, S.; ZHAO, J.; YAO, M. A comprehensive and comparative evaluation of primers for metabarcoding eDNA from fish. *Methods in Ecology and Evolution*, 11, n. 12, p. 1609-1625, 2020.

ZHANG, Y.; PAVLOVSKA, M.; STOICA, E.; PREKRASNA, I. et al. Holistic pelagic biodiversity monitoring of the Black Sea via eDNA metabarcoding approach: From bacteria to marine mammals. *Environment International*, 135, p. 105307, 2020.

ZHAO, F.; FILKER, S.; WANG, C.; XU, K. Bathymetric gradient shapes the community composition rather than the species richness of deep-sea benthic ciliates. *Science of the Total Environment*, 755, p. 142623, 2021.

3 CAPÍTULO II - Avaliação da dinâmica de liberação e degradação de DNA de peixes em condições controladas de mesocosmo

Resumo

A biomassa de peixes, vital para avaliação de ecossistemas aquáticos, depende historicamente de métodos dispendiosos e invasivos. Uma alternativa promissora é a análise de DNA ambiental (eDNA), utilizando metabarcoding e qPCR. Essa técnica, não invasiva e econômica, supera desafios de métodos tradicionais. Contudo, os desafios persistem, incluindo a influência de fatores ambientais na liberação e degradação do eDNA. Mesocosmos emergem como ferramentas cruciais para entender esses processos. Este estudo avalia a eficácia do metabarcoding na detecção de eDNA de peixes, focando nas espécies: *Oreochromis niloticus* (tilápia-do-Nilo), *Rhamdia quelen* (jundiá), *Astyanax altiparanae* (lambari-do-rabo-amarelo) e *Piaractus mesopotamicus* (pacu), contribuindo para o refinamento e aplicação prática desta abordagem inovadora. O estudo abordou a definição e manutenção de peixes em condições laboratoriais para testes, seguindo protocolos éticos. As espécies foram escolhidas com base em características biológicas e foram testadas diferentes densidades de estocagem. Durante todo o experimento, amostras de água foram coletadas, seguidas pela extração de DNA, e a presença de cada uma das espécies foi detectada por sequenciamento de nova geração (metabarcoding). A eficácia e sensibilidade dos primers foram validadas, possibilitando as análises de sequenciamento e metagenômica. O estudo investigou a liberação e degradação de eDNA para diferentes espécies de peixes em diferentes densidades. Os resultados destacam a influência da densidade na dinâmica do eDNA, com variações significativas nas sequências obtidas. A análise pós-remoção dos peixes indica que densidades mais baixas são críticas para a preservação do eDNA. As taxas variáveis entre espécies ressaltam a complexidade desses processos. A relação entre leituras de DNA e abundância relativa sugere o potencial do metabarcoding na inferência de biomassa, embora desafios técnicos e logísticos exijam atenção futura. Refinar esses aspectos pode tornar o metabarcoding uma ferramenta útil para monitorar ecossistemas aquáticos.

Palavras-chave: eDNA; Metabarcoding; Biomassa de peixes; Monitoramento ambiental; Ecossistemas aquáticos; qPCR.

3.2 INTRODUÇÃO

Métodos aplicados à estimação da abundância (relativa ou absoluta) de diferentes espécies de peixes em uma determinada área ou ambiente constituem ferramentas essenciais para a avaliação e monitoramento da saúde e sustentabilidade dos ecossistemas aquáticos (Pinna *et al.*, 2023; Kumar *et al.*, 2024). Eles permitem a pesquisadores, gestores de recursos naturais e formuladores de políticas públicas obter uma visão detalhada da estrutura da comunidade e do estado geral do ecossistema (Jennings and Blanchard, 2004; Wiyono *et al.*, 2024), e dos impactos provocados por alterações ambientais (Privitera-Johnson and Punt, 2020; Durant *et al.*, 2024; Huang *et al.*, 2024). Além disso, esses métodos são fundamentais para a proposição de programas de gestão sustentável da pesca e a implementação de estratégias de manejo adaptativo dos recursos pesqueiros (Hilborn and Walters, 2013; Fatima *et al.*, 2023). Eles também servem como ponto de partida para a compreensão da eficiência de transferência de energia dentro do ecossistema e da dinâmica dos fluxos de energia e matéria (Van Denderen *et al.*, 2023; De Guzmán Martínez *et al.*, 2024). Ademais, podem ser utilizados até mesmo para o manejo e gestão de empreendimentos aquícolas (Løvik, 1987; Li *et al.*, 2020; Iskandar *et al.*, 2024; Sauphar *et al.*, 2024).

Historicamente, a determinação da biomassa de peixes em ecossistemas aquáticos tem sido realizada por meio de amostragens diretas, envolvendo captura, biometria e identificação morfológica dos peixes coletados (Fausch *et al.*, 1990; Pawson and Jennings, 1996; Hill, 2005; Bonar *et al.*, 2009). No entanto, essas abordagens, apesar de amplamente utilizadas, apresentam diversas limitações. A captura e o manuseio dos peixes podem causar estresse, ferimentos e até mesmo a morte, especialmente em espécies mais sensíveis (Brown and Dorey, 2019). Além disso, a identificação morfológica pode ser dificultada em espécies com características semelhantes ou em estágios iniciais de desenvolvimento, levando a erros na estimativa da diversidade e biomassa (Webb and Weihs, 1986; Wootton, 2012; Chen *et al.*, 2022; Kotsanopoulos *et al.*, 2024). As amostragens diretas também podem ser onerosas e logisticamente desafiadoras, especialmente em grandes corpos d'água ou áreas remotas (Meador, 2012; Devine, 2017; Cao *et al.*, 2019), e podem introduzir vieses devido à variação na eficiência de captura entre espécies, tamanhos e habitats (Kjelson and Colby, 1977; Naismith and Knights, 1990; Bacon and Youngson, 2007; Biro and Dingemans, 2009; França and Cabral, 2019; Hammerl *et al.*, 2024).

Limitações de escala temporal e espacial também podem resultar em uma representação incompleta da comunidade de peixes (Granger *et al.*, 2015; Cao *et al.*, 2020). Em alguns casos, a amostragem direta pode até mesmo causar danos aos habitats e impactar negativamente as populações de peixes (Chesney *et al.*, 2000; Portt *et al.*, 2006; Saha *et al.*, 2024).

Diante das limitações das amostragens diretas, o uso de DNA ambiental (eDNA) tem se destacado como uma alternativa promissora para a estimativa da biomassa de peixes (Letessier *et al.*, 2022; Rourke *et al.*, 2022; Rourke *et al.*, 2024). Essa técnica não invasiva, mais rápida e econômica (Takahara *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2020; Kelly *et al.*, 2024) consiste na detecção e análise do DNA liberado pelos peixes no ambiente aquático, presente em células, fragmentos de tecidos, escamas, fezes e gametas (Mauvisseau *et al.*, 2022; Sahu *et al.*, 2022; Wilder *et al.*, 2023). O crescente interesse no uso de eDNA para estimar a biomassa de peixes é evidenciado pelo aumento do número de estudos sobre o tema nos últimos anos (Takahara *et al.*, 2012; Lacoursière-Roussel *et al.*, 2016; Sassoubre *et al.*, 2016; Kirtane *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2021; Rourke *et al.*, 2022; Sahu *et al.*, 2022; Benoit *et al.*, 2023; Senapati *et al.*, 2024). Todavia, o potencial do eDNA vai além da estimativa de biomassa, abrangendo diversas aplicações em ecologia e conservação. Essa técnica permite o monitoramento de populações de peixes em locais inacessíveis à captura direta (Bohmann *et al.*, 2014; Kelly *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2021; Ribolli *et al.*, 2021); o estudo da captura acidental em pescarias (Urban *et al.*, 2022; Urban *et al.*, 2024); a detecção de espécies invasoras (Klymus *et al.*, 2015; Sepulveda *et al.*, 2019; Tsuji *et al.*, 2024); a investigação de espécies crípticas (Nester *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2024); e a avaliação da abundância em viveiros (Di Muri *et al.*, 2020; Senapati *et al.*, 2024).

Apesar do grande potencial do eDNA para a avaliação não invasiva da biomassa e da rápida evolução em direção a estimativas quantitativas de abundância (Naman *et al.*, 2022; Senapati *et al.*, 2024), a técnica ainda enfrenta desafios metodológicos significativos. A quantificação precisa da biomassa em ecossistemas complexos (Lacoursière-Roussel *et al.*, 2016) é dificultada pela interação entre os fatores que influenciam a dinâmica do eDNA. A quantidade de eDNA liberada, por exemplo, varia conforme características da espécie (tamanho, dieta, taxa metabólica, fisiologia e comportamento) e condições ambientais (Lance *et al.*, 2017; Stewart, 2019; Thalinger *et al.*, 2021; Rourke *et al.*, 2022). A persistência do eDNA no ambiente aquático também é afetada por fatores físicos, químicos e biológicos, além de variar

conforme o estado do eDNA (dissolvido, adsorvido, intracelular) (Saito and Doi, 2021; Mauvisseau *et al.*, 2022; Jo *et al.*, 2023; Kirtane *et al.*, 2023; Pont, 2024; Xiong *et al.*, 2024). Adicionalmente, a hidrodinâmica local e o ciclo de vida dos peixes influenciam a distribuição e concentração do eDNA (Laporte *et al.*, 2020; Collins *et al.*, 2022; Ostberg and Chase, 2022; Abileva *et al.*, 2024).

A alta sensibilidade da técnica, embora vantajosa para detectar múltiplas espécies, pode dificultar a quantificação precisa da biomassa de uma espécie específica em ecossistemas diversos, especialmente aqueles com alta biodiversidade. A validação dos resultados de eDNA, atualmente dependente da comparação com métodos tradicionais (Li *et al.*, 2022; Pont *et al.*, 2023), também representa um desafio a ser superado. Neste contexto, experimentos em mesocosmo surgem como ferramentas valiosas para aprimorar a compreensão da dinâmica do eDNA em ambientes aquáticos controlados, permitindo a avaliação da influência de diferentes fatores (bióticos e abióticos) na liberação, persistência, degradação e detecção do eDNA (Skinner *et al.*, 2020; Benoit *et al.*, 2023).

O presente estudo visa contribuir para o avanço do conhecimento sobre a aplicação do eDNA na estimativa da biomassa de peixes, utilizando um sistema de mesocosmo para avaliar as taxas de liberação e degradação do DNA em diferentes densidades de peixes. A metodologia de metabarcoding foi empregada para analisar a comunidade de peixes presente nos mesocosmos *Oreochromis niloticus* (tilápia-do-Nilo), *Rhamdia quelen* (jundiá), *Astyanax altiparanae* (lambari) e *Piaractus mesopotamicus* (pacu). Ao estabelecer uma correlação entre a quantidade de eDNA detectado e a biomassa de peixes, este estudo fornecerá informações valiosas para a futura aplicação e validação da metodologia de eDNA em campo, contribuindo para o desenvolvimento de ferramentas mais eficientes e não invasivas para o monitoramento e gestão de recursos pesqueiros.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Aprovação no comitê de ética

Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (UFPR/documento N° 003/2021).

3.3.2 Definição das espécies, obtenção e manutenção de peixes em condições laboratoriais

A escolha das espécies para o estudo considerou a disponibilidade comercial, a posição na coluna d'água, os hábitos alimentares e o comportamento reprodutivo (migratório ou não migratório). As espécies selecionadas foram jundiá (*R. quelen*), lambari (*A. altiparanae*), pacu (*P. mesopotamicus*) e tilápia-do-Nilo (*O. niloticus*). Juvenis dessas espécies foram adquiridos de um fornecedor local e transportados em sacos plásticos com água e oxigênio para o Laboratório de Pesquisa com Organismos Aquáticos (LAPOA/GIA). No laboratório, os peixes foram aclimatados por 30 dias em tanques de 1000 L equipado com filtro biológico, aeração constante, temperatura controlada ($26 \pm 1^\circ\text{C}$) e alimentados duas vezes ao dia com ração comercial (45% de proteína bruta) até a saciedade. O oxigênio dissolvido (OD) e percentual de saturação de oxigênio (OD) foram monitorados diariamente, como rotina durante o experimento, por meio de oxímetro digital Pro20 (YSI®, EUA).

3.3.3 Preparo dos sistemas experimentais e agrupamento dos peixes

Foram utilizados tanques de polietileno de 100, 1.000 e 10.000 L ($n=3/\text{tratamento}$, $n \text{ total}=12$) (Figura 9). Previamente a realização dos experimentos, os tanques foram lavados e descontaminados com solução de hipoclorito de sódio a 12%. Posteriormente, foram preenchidos com água obtida através do sistema de captação pluvial. Para ser utilizada no experimento, a água foi descontaminada com hipoclorito de sódio 12% (0,2 ml/L) e neutralizada com tiosulfato de sódio 50% (0,1 ml L⁻¹). A eficiência da neutralização do cloro foi avaliada com a realização de teste de rápido de cloro mensurada por fotômetro multiparâmetro digital portátil Micro20 (Asko®, Suécia). Cada tanque foi equipado com sistema de aeração e, a fim de garantir condições térmicas adequadas para os organismos, a temperatura da água em cada tanque foi mantida acima de 20 °C. Para tanto, utilizou-se um termômetro analógico BT2 (Jade, Brasil) para monitoramento contínuo e um ebulidor elétrico de 3000 W para aquecimento, quando necessário.

Com o objetivo de formar grupos experimentais homogêneos, cada indivíduo de cada espécie foi pesado e agrupado em um número suficiente para atingir a biomassa viva de, aproximadamente, 10 g. Esses grupos ($n=12$) foram acondicionados em viveiros de nylon e arame (38 cm x 28 cm) com tampa, e mantidos em tanques de 1.000 L por 24 horas para adaptação às novas condições.



Figura 9. Representação esquemática dos tanques de polietileno (três réplicas por tratamento) utilizados nos experimentos de mesocosmo em laboratório. O experimento visou validar a eficiência de detecção e quantificação das concentrações de eDNA liberadas por *Rhamdia quelen*, *Astyanax altiparanae*, *Piaractus mesopotamicus* e *Oreochromis niloticus*, bem como calcular as suas respectivas taxas de degradação.

3.3.4 Experimento

Imediatamente antes do início do experimento, amostras de água foram coletadas logo abaixo da lâmina d'água para a identificação da concentração de DNA no tempo zero. Em seguida, os grupos de peixes foram transferidos para os tanques experimentais, resultando em densidades de estocagem de 0,1, 0,01 e 0,001 g de peixe por litro ($n=3/\text{densidade}$). Amostras de água (250 ml em duplicata) foram coletadas, também logo abaixo da lâmina d'água, em diferentes intervalos de tempo (3, 6, 12, 24, 48, 96 e 192 h) para avaliar a taxa de liberação de DNA. Ao final das 192 h, os grupos de peixes foram removidos dos tanques. A partir desse momento, a coleta de amostras de água, sempre logo abaixo da lâmina d'água, continuou nos mesmos intervalos de tempo (3, 6, 12, 24, 48, 96 e 192 h) para avaliar a taxa de degradação do DNA. Imediatamente após a coleta, as amostras de água foram filtradas e fixadas para garantir a qualidade do DNA. Durante o experimento, a temperatura da água e a concentração de oxigênio dissolvido foram monitoradas diariamente, e os peixes não foram alimentados.

3.3.5 Processamento das amostras

As amostras de água foram filtradas imediatamente após a coleta em membranas de nitrato de celulose (Unifil, Alemanha; 47 mm de diâmetro, poro de 0,45 μm) com o auxílio de uma bomba de vácuo (Femic, Brasil). Os filtros foram

armazenados individualmente em etanol absoluto 99,9% PA (Emsure Merck, Alemanha) e mantidos -20 °C até a extração do DNA. A extração do DNA foi realizada em duas etapas: digestão e purificação.

Para a digestão, os filtros foram secos em temperatura ambiente para evaporação do etanol residual. Na sequência foram adicionados tampão de digestão (30 mM Tris, 10 mM EDTA, 1% SDS) e proteinase K para posterior incubação 24 h a 56 °C. O conteúdo digerido foi centrifugado, e o sobrenadante purificado por Imobilização Reversível em Fase Sólida (SPRI). Uma solução de esferas magnéticas (12,5% polietilenoglicol-8000, 0,7 M NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,05% Tween-20, 0,02 mg/ml GE Healthcare SeraMag Speedbeads) foi adicionada em um volume correspondente a 0,54 vezes o volume da amostra e incubada por 5 minutos à temperatura ambiente. A solução foi submetida a um campo magnético, o sobrenadante descartado, e o agrupamento de esferas lavado duas vezes com 2-propanol 70% (700 µL). Após secagem, as esferas foram ressuspensas em tampão TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA), magnetizadas novamente, e o sobrenadante contendo o DNA puro foi recuperado e armazenado a -20 °C até o momento das análises.

Para garantir qualidade e evitar contaminação cruzada, os processos de extração e quantificação (qPCR e metabarcoding) foram realizados em salas separadas, seguindo as recomendações de Pie *et al.* (2017).

3.3.6 Análise por sequenciamento e metagenômica

As bibliotecas de sequenciamento foram preparadas utilizando a metodologia de PCR de fusão, que envolve uma PCR aninhada. Na segunda etapa, um fragmento extra contendo adaptadores Illumina é incorporado à molécula. Esses adaptadores possuem regiões com funções específicas no sequenciamento, como hibridização com oligonucleotídeos na célula de fluxo, sítio de anelamento para o primer de sequenciamento do índice da amostra, região variável de oito pares de bases para identificação individual da amostra e sítio de anelamento para o primer de sequenciamento do fragmento de interesse.

A primeira PCR foi realizada com as concentrações finais de reagentes listadas na Tabela 6. Condições da PCR Endpoint Tabela 6, em um volume final de 25 µL, utilizando os primers MiFish U-F/R (Tabela 7). As condições do ensaio foram: 94 °C por 4 minutos, 32 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 65 °C por 30 segundos e 70 °C por 30 segundos, seguidos de uma etapa final a 70 °C por 4 minutos. O produto da

PCR foi verificado em gel de agarose 1,5% e diluído 100 vezes para a segunda PCR, seguindo procedimento adotado por Elbrecht *et al.* (2016).

Tabela 6. Condições da PCR Endpoint

Reagente (matriz)	Concentração Final
Cloreto de magnésio	4mm
TaqPlatinum DNA polimerase	1 U
TaqPlatinum PCR Buffer	1 X
Mistura de dNTPs	1mm
Primers MiFish U-F/R	1 uM de cada

Tabela 7. Sequência dos primers da PCR *endpoint* (Miya, Sato et al. 2015).

Primer	Sequência
MiFish U-F	5'-GTCGGTAAACTCGTGCCAGC-3'
MiFish U-R	3'-GTTTGACCCTAATCTATGGGGTGATAC-5'

A PCR aninhada foi realizada com as concentrações finais de reagentes listadas na Tabela 8, em um volume final de 10µL, utilizando primers MiFish U-F/R com adaptadores e índices (Tabela 9). As condições do ensaio foram: 95 °C por 3 minutos, 12 ciclos de 98 °C por 12 segundos e 72 °C por 15 segundos, seguidos de uma etapa final a 72 °C por 5 minutos.

Tabela 8. Condições da PCR de fusão.

Reagente (matriz)	Concentração final
Cloreto de magnésio	4mm
TaqPlatinum DNA polimerase	1 U
TaqPlatinum PCR Buffer	1 X
Mistura de dNTPs	1mm
Primers MiFish U-F/R + Adaptadores + Índice	5 µM de cada

Tabela 9. Estrutura e sequência dos primers de fusão para a adição dos adaptadores. Amarelo – Adaptador da célula de fluxo (i5 e i7), Verde – Índices degenerados para a detecção de duplicatas de PCR, Azul – Índice de identificação de amostra, Rosa – Primer de sequenciamento.

Primer	Sequência
MiFish U-F	5- ATGATACGGCGACCACCGAGATCTACANNNNXXXXXXXXXACACTCTTTCCCT ACACGACGCTCTTCCGATCT-3
MiFish U-R	5- CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATXXXXXXXXXGTGACTGGAGTTCAGACGT GTGCTCTTCCGATCT-3

Cada amostra recebeu uma combinação única de índices (Tabela 10). Para detectar duplicatas de PCR, foram adicionadas quatro bases degeneradas aos

índices. Primers degenerados, com um ou mais nucleotídeos genéricos, foram utilizados para evitar erros sistemáticos de amplificação.

Tabela 10. Índices utilizados na preparação da biblioteca e suas respectivas sequências para posterior decodificação.

Índice	Sequência	Índice	Sequência	Índice	Sequência
i7h 701	TCGCCTTA	i7h 728	TAGCTGCA	i5 E 507	AAGGAGTA
i7h 704	GCTCAGGA	i5 E 501	TAGATCGC	i5 E 508	CTAAGCCT
i7h 705	AGGAGTCC	i5 E 502	CTCTCTAT	i5 E 510	CGTCTAAT
i7h 707	GTAGAGAG	i5 E 503	TATCCTCT	i5 E 511	TCTCTCCG
i7h 710	CAGCCTCG	i5 E 504	AGAGTAGA	i5 E 513	TCGACTAG
i7h 715	CCTGAGAT	i5 E 505	GTAAGGAG	i5 E 515	TTCTAGCT
i7h 723	GAGCGCTA	i5 E 506	ACTGCATA	-	-

Após o sequenciamento, as amostras foram analisadas por bioinformática. Produzimos unidades taxonômicas operacionais (OTUs) utilizando o pipeline de leituras pareadas USEARCH/UPARSE v.11.0.667 para remover *primers*, filtrar qualidade, desreplicar e classificar leituras por abundância, para inferir OTUs e para remover singletons (Edgar, 2013). Filtramos as sequências para descartar quimeras e agrupamos as sequências em OTUs com uma similaridade mínima de 97% usando um algoritmo 'greed' que realiza filtragem de quimera e agrupamento de OTU simultaneamente. Após, classificamos as OTUs obtidas taxonomicamente em espécies também a uma similaridade igual ou superior a 97% com a função "*Blastn*" do programa de mesmo nome com e-value de 0.001 usando sequências disponíveis no GenBank (Benson et al., 2018).

3.3.7 Análises estatísticas

Inicialmente, foi aplicado o método dos intervalos interquartis (IQR) para identificar e eliminar os outliers dos dados experimentais o que garante maior robustez nas análises subsequentes. Esse método define outliers como valores abaixo de $Q1 - 1,5 * IQR$ ou acima de $Q3 + 1,5 * IQR$, onde Q1 e Q3 representam o primeiro e o terceiro quartis, respectivamente. A seguir, os dados foram visualizados graficamente, com gráficos mostrando o número de reads de eDNA ao longo do tempo e em diferentes volumes para cada espécie, diferenciando as fases de liberação ("Shedding") e degradação ("Degradation"). As análises estatísticas foram conduzidas em duas etapas principais:

1) Análise de Variância (ANOVA): Empregada para avaliar o impacto das variáveis categóricas "Espécie" e "Fase do Experimento" no número de reads de eDNA. Os pressupostos da ANOVA (normalidade dos resíduos, homogeneidade das variâncias e relação linear entre resíduos e valores preditos) foram verificados para garantir a validade dos resultados.

2) Regressão Linear Múltipla: Utilizada para investigar a influência de variáveis contínuas e categóricas no número de reads de eDNA. As variáveis incluíram fatores temporais e físicos (tempo, volume, peso, comprimento, altura, densidade e densidade total), além de fatores categóricos (espécie e fase do experimento). Os pressupostos da regressão (ausência de multicolinearidade, normalidade dos resíduos, homocedasticidade e ausência de autocorrelação) foram rigorosamente verificados para garantir a confiabilidade do modelo.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software R (versão 3.6.1) para o tratamento inicial e análises exploratórias, e Python para análises mais complexas, como modelagem estatística e visualizações. No R, foram utilizadas as bibliotecas dplyr para manipulação de dados e ggplot2 para visualizações. No Python, foram utilizadas as bibliotecas Pandas para manipulação de dados, Statsmodels para regressões lineares e intervalos de confiança, e Matplotlib e Seaborn para a criação de gráficos.

3.4 RESULTADOS

Durante o experimento, as concentrações de oxigênio dissolvido (OD) variaram de 4,6 a 5,3 mg/L, com saturação de 80,0% a 90,1% e temperatura de 18,1°C a 24,1°C. Observaram-se diferenças significativas na concentração e saturação de OD entre as fases de liberação e degradação de eDNA, mas não entre os diferentes volumes de água testados (Tabela 11).

Tabela 11. Oxigênio dissolvido e temperatura nas fases de sheeding e degradation durante o experimento com eDNA de peixes realizados em sistema de mesocosmos. Letras em sobrescrito indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre fases. Não houve diferenças entre os parâmetros analisados em diferentes volumes.

Phase	Volume	Dissolved Oxygen (mg L ⁻¹)					Saturation (%)				Temperature(°C)			
		n	Mean	SD	Min	Max	Mean	SD	Min	Max	Mean	SD	Min	Max
Shedding	100	24	4,7	0,4	4,1	5,5	83,3	7,2	73,4	24,1	19,7	2,2	16,7	97,1
	1000	24	5,1	0,3	4,5	5,7	88,7	6,2	77,3	22,1	19,0	2,0	16,3	99,9
	10000	24	4,8	0,9	2,1	5,5	84,5	16,0	36,6	21,8	19,5	1,4	17,2	97,5
	Controle	8	4,9	0,9	3,4	5,6	85,1	14,9	59,1	21,5	18,9	2,0	16,3	98,5
	Total	80	4,9 ^a	0,6	2,1	5,7	85,5	11,3 ^a	36,6	24,1	19,4 ^b	1,9	16,3	99,9

Phase	Volume	Dissolved Oxygen (mg L ⁻¹)					Saturation (%)				Temperature(°C)			
		n	Mean	SD	Min	Max	Mean	SD	Min	Max	Mean	SD	Min	Max
Degradation	100	21	4,6	0,3	4,1	5,3	80,0	3,6	74,1	23,9	22,0	1,3	19,1	87,0
	1000	21	4,8	0,2	4,5	5,3	81,9	2,8	77,3	23,3	21,6	1,5	18,1	87,0
	10000	21	4,7	0,5	3,4	5,3	80,7	9,0	56,1	23,9	21,8	1,5	18,7	94,4
	Controle	7	5,3	0,3	4,7	5,4	90,1	2,5	86,9	23,9	21,7	1,6	18,9	92,2
	Total	70	4,7 ^b	0,4	3,4	5,4	81,8	6,2 ^b	56,1	23,9	21,8 ^a	1,5	18,1	94,4

A (Tabela 12) apresenta os parâmetros biométricos (peso, comprimento e altura) das quatro espécies de peixes utilizadas no experimento, incluindo médias, desvios padrão (DP) e unidades de medida (g para peso, cm para comprimento e altura). O peso médio variou de 19,57 g (*A. altiparanae*) a 104,40 g (*R. quelen*), o comprimento de 8,60 cm (*A. altiparanae*) a 20,41 cm (*R. quelen*), e a altura de 3,21 cm (*A. altiparanae*) a 6,09 cm (*P. mesopotamicus*). Os desvios padrão relativamente altos em relação às médias indicam variabilidade individual nos parâmetros biométricos das espécies.

Tabela 12. Parâmetros biométricos das espécies utilizadas e densidades empregadas no experimento em mesocosmos.

Species	Volume (L)	Weight (g)		Lenght (cm)		High (cm)		Densidade (g/L)	
		Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
<i>Rhamdia quelen</i>	100	100,67	19,50	20,07	0,40	3,80	0,35	1,01	0,20
	1000	100,43	22,78	20,27	1,25	3,83	0,23	0,10	0,02
	10000	112,10	15,16	20,90	0,10	3,97	0,40	0,01	0,00
	Total	104,40	17,77	20,41	0,76	3,87	0,30	0,37	0,49
<i>Astyanax altiparanae</i>	100	21,08	6,05	8,67	1,04	3,33	0,06	0,21	0,06
	1000	19,77	2,08	8,53	0,55	3,20	0,17	0,02	0,00
	10000	17,87	2,02	8,60	0,56	3,10	0,10	0,00	0,00
	Total	19,57	3,63	8,60	0,65	3,21	0,15	0,08	0,10
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	100	66,40	8,55	12,17	0,38	6,23	0,35	0,66	0,09
	1000	66,43	11,83	12,60	0,61	6,07	0,45	0,07	0,01
	10000	59,70	6,60	12,27	0,60	5,97	0,64	0,01	0,00
	Total	64,18	8,69	12,34	0,51	6,09	0,45	0,25	0,32
<i>Oreochromis niloticus</i>	100	25,03	14,96	9,33	2,02	3,53	0,85	0,25	0,15
	1000	30,10	13,39	10,40	1,21	3,87	0,46	0,03	0,01
	10000	20,80	10,58	9,00	1,65	3,47	0,55	0,00	0,00
	Total	25,31	12,04	9,58	1,57	3,62	0,59	0,09	0,14

A Figura 10 ilustra a variação temporal no número de reads de eDNA de *A. altiparanae* nos diferentes volumes testados e no controle. Observou-se uma relação inversa entre volume e a concentração de eDNA, com o tratamento de 100 L apresentando o maior número de reads e o de 10.000 L, o menor. No tratamento de 100 L, houve um aumento inicial na fase de liberação, seguido por uma estabilização

e posterior declínio. O tratamento de 1000 L também mostrou um aumento inicial na fase de liberação, seguido por uma estabilização e um declínio gradual. No tratamento de 10.000 L, houve um aumento inicial nas primeiras 50h, ocorridas na fase de liberação, seguido por um declínio acentuado. O controle negativo apresentou número baixo e estável de reads.

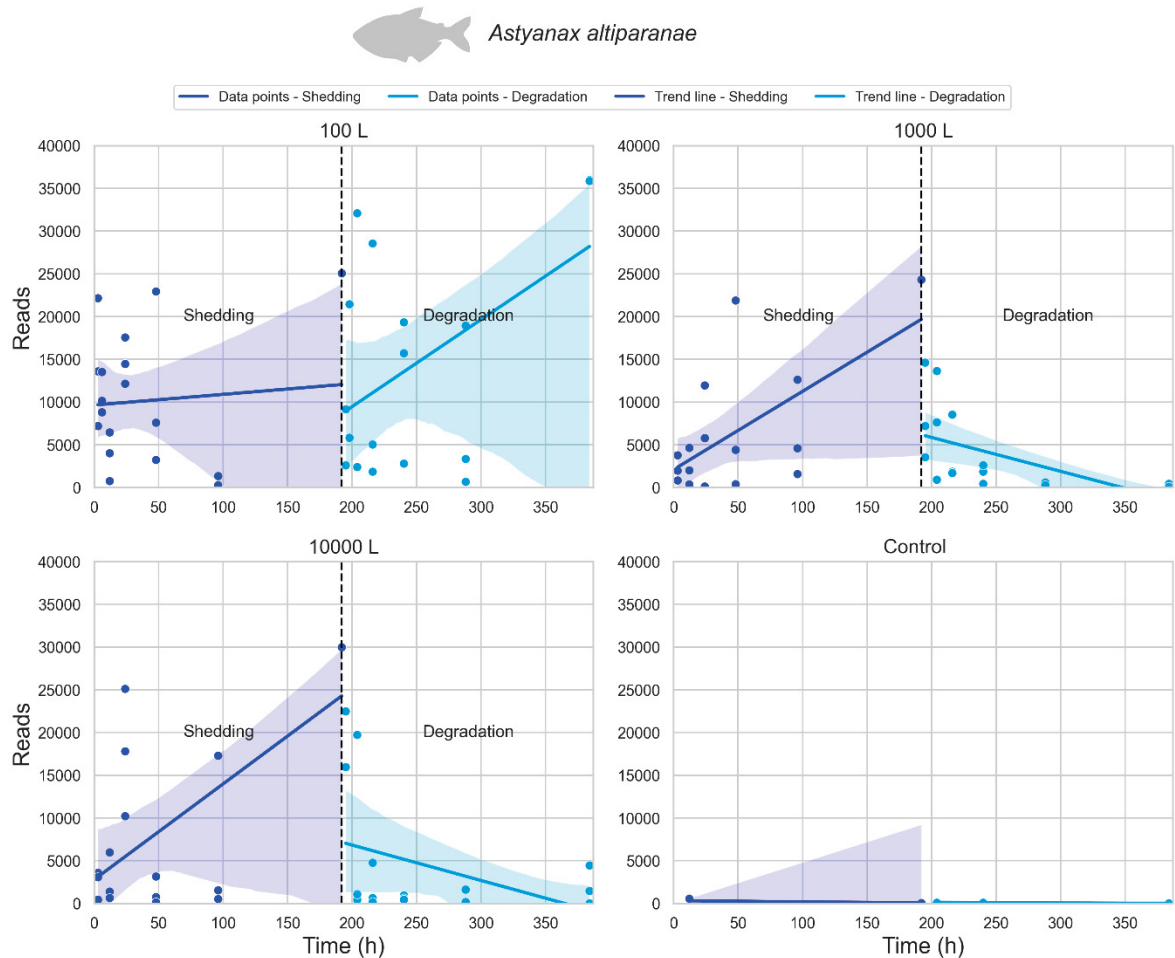


Figura 10. Variação temporal (dados, tendência e intervalo de confiança) do número de reads de eDNA de *Astyanax altiparanae* em diferentes volumes de água (100 L, 1,000 L, 10.000 L e no controle), durante as fases de shedding e de degradation do eDNA, em experimento de mesocosmos.

A Figura 11 ilustra a variação temporal no número de reads de eDNA de *O. niloticus* nos diferentes volumes de água e no controle, durante as fases de liberação e degradação do eDNA. Observou-se um declínio na quantidade de eDNA ao longo do tempo, com maior concentração nos tanques de menor volume durante a fase de liberação, indicando uma relação inversa entre o volume de água e a concentração de eDNA detectável. A degradação do eDNA foi rápida, levando a um número de

reads próximo a zero em todos os tanques após cerca de 200 horas, exceto no controle, no qual o eDNA permaneceu praticamente indetectável. Em tanques de maior volume, a concentração de eDNA foi consistentemente mais baixa.

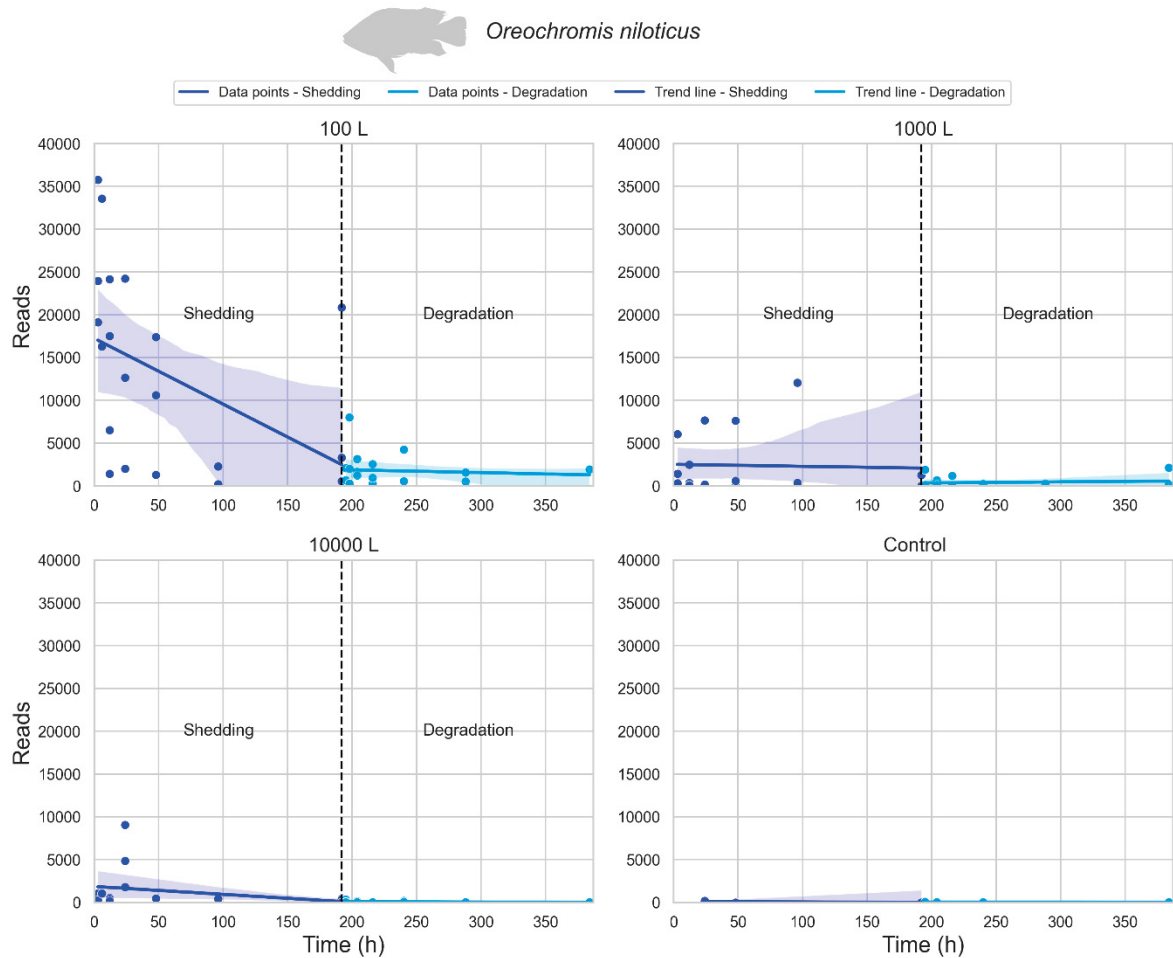


Figura 11. Variação temporal (dados, tendência e intervalo de confiança) do número de reads de eDNA de *Oreochromis niloticus* em diferentes volumes de água (100 L, 1.000 L, 10.000 L e no controle), durante as fases de shedding e de degradation do eDNA, em experimento de mesocosmos.

A Figura 12 ilustra a dinâmica temporal do eDNA de *P. mesopotamicus* nos diferentes volumes de água. O declínio nas reads de eDNA ao longo do tempo foi evidente em todos os volumes, com concentrações iniciais mais elevadas e declínios mais acentuados nos menores volumes. Já no volume de 10.000 L, a concentração de eDNA foi consistentemente baixa, sugerindo a influência da diluição na detecção. A variabilidade nos dados, particularmente notável nos menores volumes durante a fase de liberação, indica a complexidade dos fatores que influenciam a dinâmica do eDNA. O controle negativo, com número de reads consistentemente baixo, reforça a confiabilidade dos resultados obtidos.

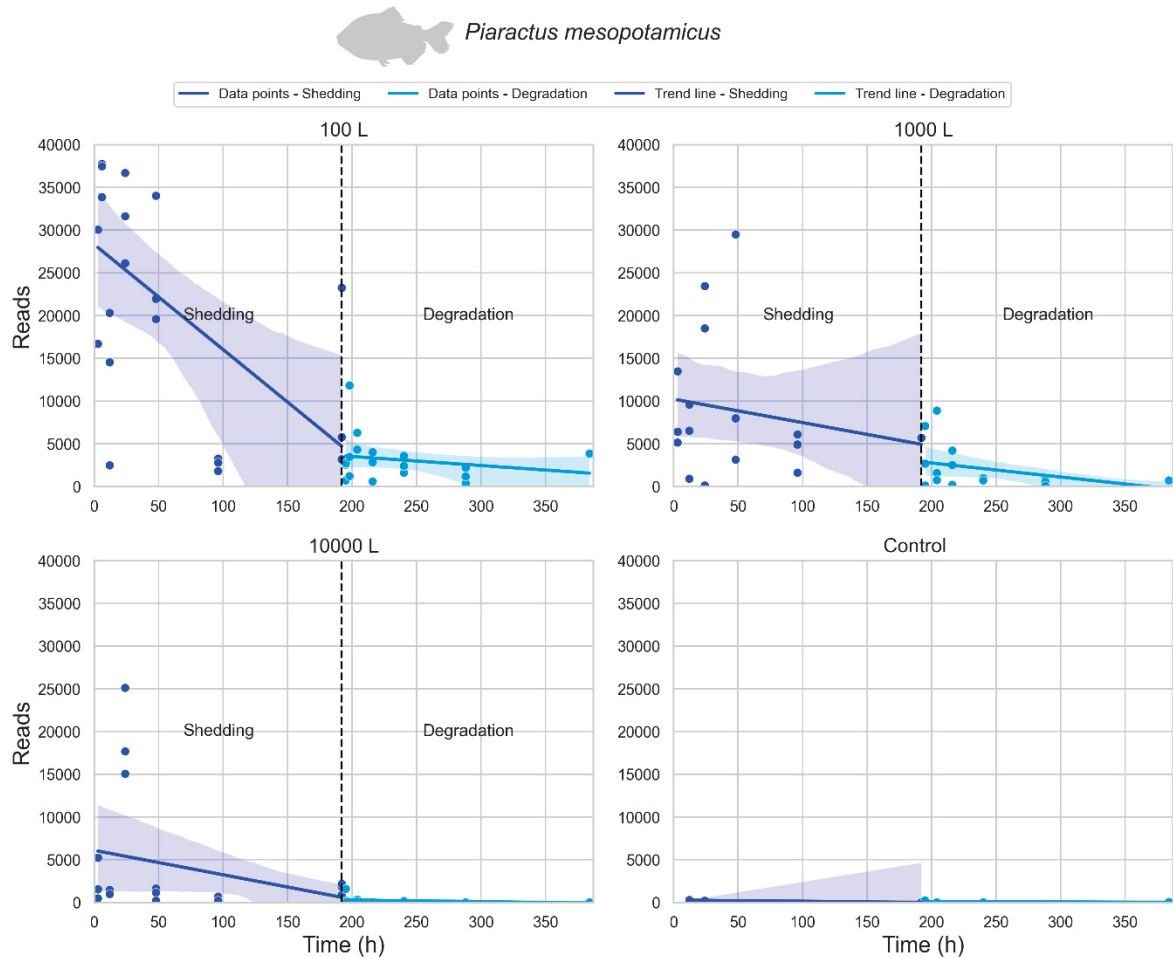


Figura 12. Variação temporal (dados, tendência e intervalo de confiança) do número de reads de eDNA de *Piaractus mesopotamicus* em diferentes volumes de água (100 L, 1.000 L, 10.000 L e no controle), durante as fases de shedding e de degradação do eDNA, em experimento de mesocosmos.

Nos tanques de 100 L e 1000 L com *R. quelen*, observa-se um declínio inicial acentuado no número de reads durante a fase de liberação (shedding), seguido por uma estabilização na fase de degradação (Figura 13). No tanque de 10.000 L, a concentração de eDNA foi consistentemente baixa, com pouca variação entre as fases, sugerindo que a diluição pode ser um fator limitante na detecção de eDNA em grandes volumes de água. No controle, o número de reads de eDNA permaneceu próximo a zero, confirmando a ausência de contaminação.

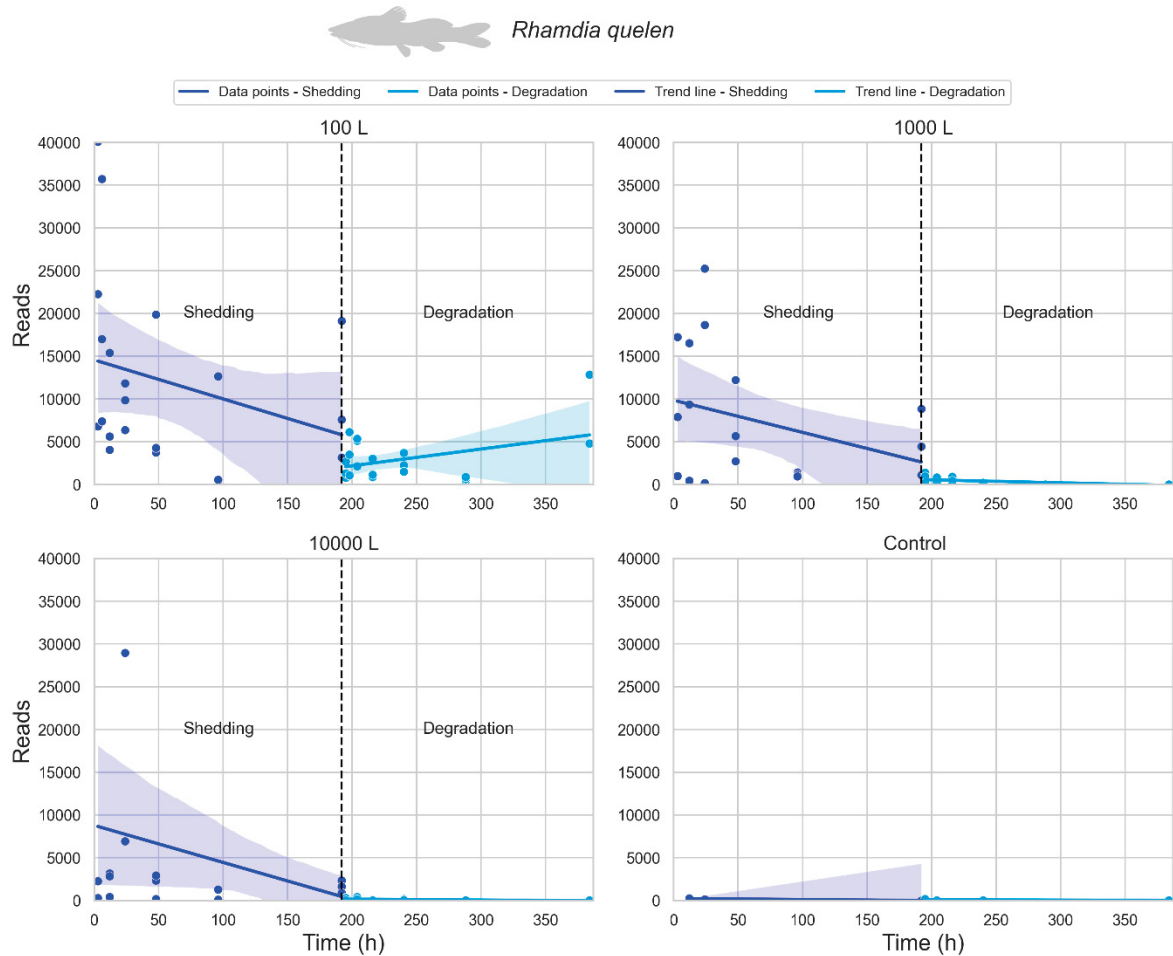


Figura 13. Variação temporal (dados, tendência e intervalo de confiança) do número de reads de eDNA de *Rhamdia quelen* em diferentes volumes de água, durante as fases de shedding e de degradation do eDNA, em experimento de mesocosmos.

A ANOVA demonstrou que tanto a espécie quanto a fase do experimento (liberação ou degradação de eDNA) influenciaram significativamente o número de reads de eDNA identificados (Tabela 13). A interação significativa entre espécie e fase do experimento ($p < 0,05$) indica que o efeito da espécie na quantidade de eDNA varia entre as fases, sugerindo dinâmicas distintas de liberação e degradação para cada espécie.

Tabela 13. Resultados da ANOVA para o número de reads de eDNA

Variante	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	F-statistic	p-valor
Espécies	1.045×10^9	3	4.51	0.0039
Fase experimental	3.934×10^9	1	55.49	< 0.0001
Interação espécie-fase	1.180×10^9	3	5.86	0.00062
Residual	3.194×10^{10}	476	-	-

A regressão linear múltipla revelou que a fase do experimento e a densidade total dos peixes foram os principais preditores do número de reads de eDNA (Tabela 14). A maior quantidade de reads na fase de liberação em relação à fase de degradação era esperada, corroborando a dinâmica de liberação e posterior degradação do eDNA. *Oreochromis niloticus* e *P. mesopotamicus* apresentaram número de reads significativamente menor em relação à espécie escolhida como referência (*A. altiparanae*) para esta análise, indicando diferenças na taxa de liberação ou na persistência do eDNA entre as espécies. A influência do tempo de coleta, com um declínio no número de reads ao longo do tempo foi outro fenômeno registrado nessa análise. As demais variáveis analisadas não apresentaram efeito significativo no modelo, sugerindo que, dentro do escopo deste estudo, não exerceram influência relevante na concentração de eDNA detectada.

Tabela 14. Resultados do modelo de regressão linear múltipla para o número de reads de DNA.

Variável	Coefficiente	Erro padrão	t-Statistic	p-valor	95% Intervalo de confiança
Intercept	-2114.84	5619.14	-0.376	0.707	[-13200, 8929]
Espécie: <i>Oreochromis niloticus</i>	-4922.83	1147.37	-4.291	0.000	[-7178, -2668]
Espécie: <i>Piaractus mesopotamicus</i>	-8590.44	3293.02	-2.609	0.009	[-15100, -2119]
Espécie: <i>Rhamdia quelen</i>	-65.73	7349.75	-0.009	0.993	[-14400, 14400]
Fase experimental: Liberação	2920.10	1307.70	2.233	0.026	[350, 5490]
Tempo	-15.87	5.65	-2.807	0.005	[-27, -5]
Volume	0.02	0.11	0.198	0.843	[-0.195, 0.239]
Peso	-15.62	58.04	-0.269	0.788	[-130, 99]
Comprimento	-288.06	702.24	-0.410	0.682	[-1668, 1092]
Altura	3357.80	1826.71	1.838	0.067	[-232, 6948]
Densidade	1069.96	2295.95	0.466	0.641	[-3442, 5582]
Densidade total	2573.47	764.73	3.365	0.001	[1071, 4076]

3.5 DISCUSSÃO

3.5.1 Impacto do Volume de Água na Detecção de eDNA

Os resultados deste estudo corroboram com pesquisas anteriores sobre a dinâmica do eDNA em ambientes aquáticos, demonstrando a influência crítica do volume de água na detecção e persistência do eDNA. Em volumes menores (100 L e 1000 L), observamos picos acentuados de reads na fase de liberação, seguidos por uma rápida queda durante a fase de degradação. Essa dinâmica é consistente com

as descobertas de Barnes et al. (2014) e Turner et al. (2014) que atribuíram esse padrão à menor diluição e maior concentração de eDNA, facilitando a detecção inicial, mas também acelerando a degradação devido à maior atividade microbiana e outras reações abióticas.

A relação entre a densidade de peixes e a dinâmica do eDNA também se mostrou evidente em nossos resultados. Observamos que a densidade influencia tanto a liberação quanto a degradação do eDNA, corroborando estudos que demonstram a correlação positiva entre a concentração de DNA e a biomassa (Minamoto et al. 2012). A diminuição na liberação de DNA após os primeiros dias, possivelmente devido à aclimatação dos peixes e à redução de suas atividades metabólicas, também está em consonância com estudos anteriores (Dejean *et al.*, 2012; Takahara *et al.*, 2012).

A degradação do eDNA em ambientes aquáticos é um fenômeno bem documentado na literatura (Sassoubre *et al.*, 2016). Fatores como a hidrólise, oxidação, temperatura, (Barnes and Turner, 2016; Moushomi *et al.*, 2019), pH, turbidez, entre outros fatores abióticos (Andruszkiewicz Allan *et al.*, 2020) e bióticos, como atividade microbiana (Kreader, 1998) e nível de estresse dos peixes (Caza-Allard *et al.*, 2022), contribuem para degradação. No entanto, a complexidade da dinâmica do eDNA é evidente no aumento inesperado de reads observadas para *A. altiparanae* no volume de 100 L durante a fase de degradação. Esse aumento pode ser atribuído a uma fonte contínua de eDNA, possivelmente resultante de um evento de predação observado nesse tanque, destacando a importância de considerar fatores biológicos na interpretação dos dados de eDNA (Ficetola *et al.*, 2008). Em contraste, o volume de 1000 L para *A. altiparanae* apresentou um declínio constante nas duas fases, sugerindo uma degradação mais previsível e consistente do eDNA.

Já no volume de 10.000 L, a diluição do eDNA foi mais pronunciada, resultando em baixos níveis de detecção do DNA-alvo desde o início do experimento e pouca variação ao longo do tempo. Essa observação está alinhada com estudos que demonstram a dificuldade de detecção de eDNA em grandes volumes devido à dispersão (Thomsen *et al.*, 2012). A detecção de DNA em grandes volumes pode ser um desafio, e o estudo sugere que a utilização de técnicas de concentração, como filtração de grandes volumes de água, pode ser necessária para aumentar a sensibilidade da detecção de eDNA em ambientes aquáticos extensos (Thomsen *et al.*, 2012; Wilcox *et al.*, 2018).

É importante ressaltar que, mesmo após a remoção dos peixes, a detecção de eDNA pode persistir por um período devido à decomposição de tecidos residuais, como escamas e muco (Harrison et al. 2019). Esse fenômeno destaca a importância de considerar a dinâmica temporal do eDNA em estudos de monitoramento ambiental.

3.5.2 Variabilidade dos Dados e Intervalo de Confiança

A análise dos intervalos de confiança (IC) revelou informações cruciais sobre a variabilidade dos dados de eDNA, fornecendo informações valiosas para a interpretação dos resultados e para o planejamento de estudos futuros. Em volumes menores (100 L e 1000 L), observamos uma maior variabilidade na quantidade de reads durante a fase de liberação, evidenciada por ICs amplos. Essa variabilidade pode ser atribuída a flutuações na liberação de eDNA pelos peixes, influenciada por fatores como o comportamento individual, a taxa metabólica e o estresse, como apontado por Strickler *et al.* (2015). Adicionalmente, a ação de fatores ambientais, como a temperatura da água e a presença de microrganismos, que podem degradar o eDNA em taxas variáveis, também contribui para essa variabilidade.

Em contraste, nos volumes maiores (10000 L), a variabilidade foi significativamente menor, com ICs mais estreitos, sugerindo uma maior homogeneidade na distribuição do eDNA e uma maior consistência nos dados. Essa menor variabilidade pode ser atribuída à diluição mais eficiente do eDNA em volumes maiores, minimizando o impacto de flutuações na liberação e degradação. No entanto, a menor concentração de eDNA em volumes maiores também pode levar a uma menor sensibilidade na detecção, especialmente para espécies presentes em baixas densidades.

Em relação às diferentes espécies, observamos padrões similares de variabilidade, com maiores flutuações em volumes menores e maior consistência em volumes maiores. No entanto, é importante destacar o caso do *R. quelen* no volume de 100 L, quando houve um aumento no número de reads durante a fase de degradação, o que diverge do padrão esperado de declínio.

As implicações da variabilidade dos dados para a interpretação dos resultados são significativas. Em volumes menores, a alta variabilidade na fase de liberação pode dificultar a distinção entre a liberação de eDNA por diferentes espécies, especialmente em comunidades de peixes com alta diversidade. Além disso, a rápida degradação do eDNA em volumes menores pode levar a uma subestimação da biomassa de peixes

se as amostras não forem coletadas em intervalos de tempo adequados. Em contraste, a menor variabilidade em volumes maiores pode aumentar a confiabilidade das estimativas de biomassa, mas a menor sensibilidade na detecção pode levar à omissão de espécies raras ou presentes em baixas densidades.

3.5.3 Fases de Liberação e Degradação

A dinâmica temporal do eDNA, composta pelas fases de liberação e degradação, é um fator crucial na compreensão da detecção do eDNA em ambientes aquáticos e parece variar significativamente com o volume de água e a densidade de peixes.

Durante a fase de liberação, a concentração de eDNA aumenta à medida que os peixes liberam material genético no ambiente. Nossos resultados demonstram que, em volumes menores (100 L e 1000 L), a liberação de eDNA é mais concentrada devido à menor diluição, levando a picos acentuados no número de reads, especialmente no início do experimento. Essa observação corrobora estudos prévios (Thomsen and Willerslev, 2015) e destaca a importância da diluição na dinâmica do eDNA. Além disso, a densidade de peixes também desempenha um papel importante na liberação de eDNA, com maiores densidades resultando em maior concentração de material genético na água. Collins *et al.* (2022) observaram que a liberação de eDNA pode ser altamente variável devido a fatores como comportamento dos peixes e condições ambientais, o que é consistente com a alta variabilidade observada em nossos resultados durante a fase de liberação, especialmente em volumes menores.

Entretanto, a fase de degradação subsequente é marcada por uma diminuição na concentração de eDNA, conforme os fragmentos de DNA são degradados por processos físicos, químicos e biológicos. Em volumes menores, a degradação do eDNA é mais rápida, resultando em uma queda acentuada no número de reads, como observado para *O. niloticus* e *P. mesopotamicus*. Essa rápida degradação pode ser atribuída à maior atividade microbiana e à menor dispersão do eDNA nesses volumes, corroborando igualmente achados de estudos anteriores (Barnes *et al.*, 2014; Klymus *et al.*, 2020; Saito and Doi, 2021; Caza-Allard *et al.*, 2022), além de fatores como a hidrólise, oxidação, temperatura (Moushomi *et al.*, 2019; Saito and Doi, 2020; Barnes *et al.*, 2021; Jo and Minamoto, 2021), pH, turbidez, entre outros fatores abióticos (Andruszkiewicz Allan *et al.*, 2020). Pont *et al.* (2023) destacaram que a degradação rápida do eDNA pode limitar a detectabilidade em ambientes naturais, o que foi

evidente em nossos tratamentos de volumes menores onde a concentração de eDNA caiu rapidamente após a fase de liberação.

Em contraste, em volumes maiores (10.000 L), a detecção de eDNA é desafiada pela maior diluição, que dispersa o eDNA e reduz a concentração detectável. A degradação do eDNA em volumes maiores é mais gradual, refletindo uma dispersão mais uniforme e uma menor concentração inicial de eDNA (Jane *et al.*, 2015). Essa observação está em conformidade com os achados de Goldberg *et al.* (2015), que relatam que a detecção de eDNA em grandes corpos d'água pode exigir métodos de amostragem mais sensíveis e técnicas de concentração para capturar eDNA em níveis detectáveis (Wilcox *et al.*, 2018).

É importante ressaltar que, mesmo após a remoção dos peixes, a detecção de eDNA pode persistir por um período devido à decomposição de tecidos residuais, como escamas e muco (Harrison *et al.*, 2019). Esse fenômeno destaca a importância de considerar a dinâmica temporal do eDNA em estudos de monitoramento ambiental.

Nossos resultados também mostram que a densidade de peixes influencia a taxa de degradação do eDNA. Em densidades mais baixas, a degradação do eDNA parece ser mais lenta, possivelmente devido à menor disponibilidade de material genético para os processos de degradação. Essa observação é relevante para estudos que buscam monitorar populações de peixes em diferentes densidades, pois sugere que a taxa de degradação do eDNA deve ser considerada na interpretação dos resultados.

3.5.4 Correlação entre DNA Detectado e Biomassa de Peixes

Um dos principais objetivos deste estudo foi estabelecer uma correlação entre a quantidade de DNA detectado nas amostras de água e a biomassa de peixes presente no ambiente. Estudos recentes têm demonstrado uma relação positiva entre a concentração de eDNA e a biomassa de peixes, indicando que a quantidade de eDNA pode ser usada como um fator para estimar a biomassa de peixes em ambientes aquáticos (Djurhuus *et al.* 2018; Yates *et al.* 2022).

Os resultados do presente estudo corroboram esses achados, mostrando que volumes menores de água, que apresentaram maiores concentrações de eDNA, refletem uma maior biomassa de peixes presente. Isso foi evidente nos tratamentos de 100 L e 1000 L, onde a quantidade de eDNA detectada foi significativamente maior, indicando uma correlação direta com a biomassa de peixes. Em contraste, nos

volumes de 10000 L, a diluição do eDNA resultou em menores concentrações detectáveis, sugerindo que a diluição pode mascarar a relação direta entre eDNA e biomassa em grandes corpos d'água (Lacoursière-Roussel *et al.*, 2016; Morrison *et al.*, 2023).

Esses resultados destacam a importância de considerar o volume de amostragem ao utilizar eDNA para estimar a biomassa de peixes. Volumes menores podem fornecer uma estimativa mais precisa da biomassa devido à menor diluição, enquanto volumes maiores podem necessitar de técnicas de concentração para melhorar a detecção e a correlação com a biomassa de peixes. Este estudo contribui para o crescente corpo de evidências que suportam o uso de eDNA como uma ferramenta eficaz para o monitoramento da biomassa de peixes, especialmente em ambientes controlados como mesocosmos.

3.5.5 Análise em Contexto com Estudos Prévios

Os resultados obtidos neste estudo se alinham e expandem as descobertas de pesquisas anteriores sobre a dinâmica do eDNA em ambientes aquáticos, fortalecendo o conhecimento existente e abrindo novas perspectivas para pesquisas futuras. Nossos achados corroboram as observações de Pilliod *et al.* (2014) sobre a influência de fatores ambientais, como temperatura e exposição à luz, na persistência e degradação do eDNA. A rápida degradação do eDNA em volumes menores observada em nosso estudo reforça a importância de considerar esses fatores no planejamento de estudos de eDNA e na interpretação dos resultados.

A dificuldade de detecção de eDNA em grandes volumes de água, destacada por (Takahara *et al.*, 2012); Thomsen *et al.* (2012); Wilcox *et al.* (2018) foi confirmada em nossos experimentos, nos quais a concentração de eDNA foi consistentemente baixa. Essa observação reforça a necessidade de técnicas de concentração, como a filtração de maiores volumes de água, para aumentar a sensibilidade da detecção de eDNA em ambientes aquáticos extensos.

A relação positiva entre a biomassa de peixes e a concentração de eDNA encontrada em nosso estudo também foi relatado por Yates *et al.* (2022) e Djurhuus *et al.* (2018). Eles descobriram que uma quantidade de eDNA pode ser usada como uma referência confiável para estimar a biomassa de peixes em corpos d'água. Essa relação é particularmente evidente nos volumes menores de água em nosso estudo,

onde as concentrações de eDNA foram significativamente maiores, refletindo a maior biomassa de peixes presente.

A variabilidade dos dados observada em nossos resultados, especialmente em volumes menores, também está em consonância com estudos anteriores. Strickler *et al.* (2015) destacaram a importância de entender a variabilidade intrínseca dos dados de eDNA para interpretar corretamente os padrões de presença e ausência de espécies. Nossos resultados mostram que a variabilidade pode ser influenciada por fatores como a densidade de peixes, a fase do experimento (liberação ou degradação) e o volume de água, e que o uso de técnicas de amostragem e análise padronizadas pode ser uma abordagem eficaz para melhorar a precisão dos estudos futuros.

3.6 CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou a influência significativa do volume de água e da densidade de peixes na dinâmica do eDNA em sistemas de mesocosmo, corroborando e expandindo achados de pesquisas anteriores. A relação entre a biomassa relativa de peixes e a concentração de eDNA, embora influenciada por fatores bióticos e abióticos, foi confirmada, ressaltando o potencial do uso de ferramentas moleculares como o metabarcoding na avaliação e monitoramento de ecossistemas aquáticos. No entanto, desafios técnicos e logísticos, como a variabilidade na eficiência de amplificação entre espécies e as dificuldades de amostragem em grandes massas de água, precisam ser abordados para aprimorar a precisão e a aplicabilidade dessa abordagem inovadora. Adicionalmente, a variabilidade nas taxas de liberação e degradação de eDNA entre espécies ressalta a necessidade de estudos futuros para refinar o uso dessa ferramenta em diferentes contextos ecológicos. Em última análise, o aprimoramento contínuo das metodologias de eDNA, incluindo o desenvolvimento de protocolos de amostragem mais robustos e a otimização da análise de dados, impulsionará a aplicação do eDNA como uma ferramenta poderosa e versátil na avaliação da biodiversidade e biomassa de peixes em ambientes aquáticos, contribuindo para a gestão sustentável dos recursos pesqueiros e a conservação dos ecossistemas.

3.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABILEVA, G. et al. Environmental DNA reveals the ecology and seasonal migration of a rare sturgeon species in the Ural River. *Environmental DNA*, v. 6, n. 2, p. e535, 2024. ISSN 2637-4943.

ANDRUSZKIEWICZ ALLAN, E. et al. Environmental DNA shedding and decay rates from diverse animal forms and thermal regimes. *Wiley Online Library*, v. 3, n. 2, p. 492-514, 2020/3// 2020. Available at: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/edn3.141> >.

BACON, P. J.; YOUNGSON, A. The application of electro-fishing to produce census estimates of juvenile salmonid populations within defined areas: taking stock of the options. Fisheries Research Services, Marine Laboratory, 2007.

BARNES, M. A. et al. Environmental conditions influence eDNA particle size distribution in aquatic systems. *Environmental DNA*, v. 3, n. 3, p. 643-653, 2021. ISSN 2637-4943.

BARNES, M. A.; TURNER, C. R. The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conservation Genetics*, v. 17, n. 1, p. 1-17, 2016. ISSN 1566-0621.

BARNES, M. A. et al. Environmental conditions influence eDNA persistence in aquatic systems. *Environmental science & technology*, v. 48, n. 3, p. 1819-1827, 2014. ISSN 0013-936X.

BENOIT, N. P. et al. Using qPCR of environmental DNA (eDNA) to estimate the biomass of juvenile Pacific salmon (*Oncorhynchus* spp.). *Environmental DNA*, 2023. ISSN 2637-4943.

BIRO, P. A.; DINGEMANSE, N. J. Sampling bias resulting from animal personality. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 24, n. 2, p. 66-67, 2009. ISSN 0169-5347.

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.

BONAR, S. A.; HUBERT, W. A.; WILLIS, D. W. Standard methods for sampling North American freshwater fishes. 2009.

BROWN, C.; DOREY, C. Pain and Emotion in Fishes—Fish welfare implications for fisheries and aquaculture. *Animal Studies Journal*, v. 8, n. 2, p. 175-201, 2019. ISSN 2201-3008.

CAO, J. et al. A novel spatiotemporal stock assessment framework to better address fine-scale species distributions: development and simulation testing. *Fish and Fisheries*, v. 21, n. 2, p. 350-367, 2020. ISSN 1467-2960.

CAO, Y. et al. Sampling the central channel provides additional information on fish assemblages in a large Boatable River in the US Midwest. *Journal of Fish and Wildlife Management*, v. 10, n. 2, p. 432-441, 2019. ISSN 1944-687X.

CAZA-ALLARD, I. et al. Effect of biotic and abiotic factors on the production and degradation of fish environmental DNA: An experimental evaluation. *Environmental DNA*, v. 4, n. 2, p. 453-468, 2022. ISSN 2637-4943.

CHEN, X. et al. Passive eDNA sampling facilitates biodiversity monitoring and rare species detection. *Environment International*, v. 187, p. 108706, 2024. ISSN 0160-4120.

CHEN, X.; LIU, B.; FANG, Z. Fish Stocks and Discriminant Methods. *Biology of Fishery Resources*, p. 9-53, 2022. ISSN 9811669473.

CHESNEY, E. J.; BALTZ, D. M.; THOMAS, R. G. Louisiana estuarine and coastal fisheries and habitats: perspectives from a fish's eye view. *Ecological Applications*, v. 10, n. 2, p. 350-366, 2000. ISSN 1939-5582.

COLLINS, R. A. et al. Reproduction influences seasonal eDNA variation in a temperate marine fish community. *Limnology and Oceanography Letters*, v. 7, n. 5, p. 443-449, 2022. ISSN 2378-2242.

DE GUZMÁN MARTÍNEZ, M. I. et al. Food-web energy fluxes, energy transfer efficiency, and diversity respond distinctively to pollution and water diversion in rivers. 2024. ISSN 0046-5070.

DEJEAN, T. et al. Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding: the example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus*. *Journal of applied ecology*, v. 49, n. 4, p. 953-959, 2012. ISSN 0021-8901.

DEVINE, M. T. Juvenile river herring in freshwater lakes: sampling approaches for evaluating growth and survival. 2017.

DI MURI, C. et al. Read counts from environmental DNA (eDNA) metabarcoding reflect fish abundance and biomass in drained ponds. *bioRxiv*, p. 2020.07.29.226845, 2020.

DJURHUUS, A. et al. Evaluation of marine zooplankton community structure through environmental DNA metabarcoding. *Limnology and Oceanography: Methods*, v. 16, n. 4, p. 209-221, 2018. ISSN 1541-5856.

DURANT, J. M.; HOLT, R. E.; LANGANGEN, Ø. Large biomass reduction effect on the relative role of climate, fishing, and recruitment on fish population dynamics. *Scientific Reports*, v. 14, n. 1, p. 8995, 2024. ISSN 2045-2322.

ELBRECHT, V. et al. Testing the potential of a ribosomal 16S marker for DNA metabarcoding of insects. *PeerJ*, v. 4, p. e1966, 2016. ISSN 2167-8359.

FATIMA, N.; SHUAIB, S. E.; KONG, J. D. Predicting adaptations of fish and fishing communities to rapid climate velocities in Canadian waters: A systematic review. *Environmental Advances*, v. 14, p. 100452, 2023/12/01/ 2023. ISSN 2666-7657. Available at: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666765723001102> >.

FAUSCH, K. D. et al. Fish communities as indicators of environmental degradation. *American fisheries society symposium*, 1990, Bethesda. p.123-144.

FICETOLA, G. F. et al. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology letters*, v. 4, n. 4, p. 423-425, 2008. ISSN 1744-9561.

FRANÇA, S.; CABRAL, H. N. Distribution models of estuarine fish species: The effect of sampling bias, species ecology and threshold selection on models' accuracy. *Ecological Informatics*, v. 51, p. 168-176, 2019. ISSN 1574-9541.

GOLDBERG, C. S.; STRICKLER, K. M.; PILLIOD, D. S. Moving environmental DNA methods from concept to practice for monitoring aquatic macroorganisms. *Biological Conservation*, v. 183, p. 1-3, 2015. ISSN 0006-3207.

GRANGER, V. et al. Large-scale spatio-temporal monitoring highlights hotspots of demersal fish diversity in the Mediterranean Sea. *Progress in Oceanography*, v. 130, p. 65-74, 2015. ISSN 0079-6611.

HAMMERL, C.; MÖLLMANN, C.; OESTERWIND, D. Identifying fit-for purpose methods for monitoring fish communities. *Frontiers in Marine Science*, 2024. ISSN 2296-7745.

HARRISON, J. B.; SUNDAY, J. M.; ROGERS, S. M. Predicting the fate of eDNA in the environment and implications for studying biodiversity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 286, n. 1915, 2019/11// 2019.

HILBORN, R.; WALTERS, C. J. Quantitative fisheries stock assessment: choice, dynamics and uncertainty. Springer Science & Business Media, 2013. ISBN 1461535980.

HILL, D. Handbook of biodiversity methods: survey, evaluation and monitoring. Cambridge University Press, 2005. ISBN 0521823684.

HUANG, M. et al. Assessing the response of marine fish communities to climate change and fishing. *Conservation Biology*, p. e14291, 2024. ISSN 0888-8892.

ISKANDAR, A. N. et al. Measurement of fisheries provisioning services and its pressure to support sustainability of fisheries in the Jatigede Reservoir, Indonesia. *Environmental and Sustainability Indicators*, v. 22, p. 100405, 2024. ISSN 2665-9727.

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.

JENNINGS, S.; BLANCHARD, J. L. Fish abundance with no fishing: predictions based on macroecological theory. *Journal of Animal Ecology*, p. 632-642, 2004. ISSN 0021-8790.

JO, T.; MINAMOTO, T. Complex interactions between environmental DNA (eDNA) state and water chemistries on eDNA persistence suggested by meta-analyses. *Molecular Ecology Resources*, v. 21, n. 5, p. 1490-1503, 2021. ISSN 1755-098X.

JO, T. et al. Warm temperature and alkaline conditions accelerate environmental RNA degradation. *Environmental DNA*, v. 5, n. 5, p. 836-848, 2023. ISSN 2637-4943.

KELLY, R. P. et al. Toward a national eDNA strategy for the United States. *Environmental DNA*, v. 6, n. 1, p. e432, 2024. ISSN 2637-4943.

KELLY, R. P. et al. Using environmental DNA to census marine fishes in a large mesocosm. *PloS one*, v. 9, n. 1, p. e86175, 2014. ISSN 1932-6203.

KIRTANE, A.; KLEYER, H.; DEINER, K. Sorting states of environmental DNA: Effects of isolation method and water matrix on the recovery of membrane-bound, dissolved, and adsorbed states of eDNA. *Environmental DNA*, 2023. ISSN 2637-4943.

KIRTANE, A. et al. Quantification of Environmental DNA (eDNA) shedding and decay rates for three commercially harvested fish species and comparison between eDNA detection and trawl catches. *Environmental DNA*, v. 3, n. 6, p. 1142-1155, 2021. ISSN 2637-4943.

KJELSON, M. A.; COLBY, D. R. The evaluation and use of gear efficiencies in the estimation of estuarine fish abundance. In: (Ed.). *Estuarine processes*: Elsevier, 1977. p.416-424.

KLYMUS, K. E. et al. Development and testing of species-specific quantitative PCR assays for environmental DNA applications. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, n. 165, p. e61825, 2020. ISSN 1940-087X.

KLYMUS, K. E. et al. Quantification of eDNA shedding rates from invasive bighead carp *Hypophthalmichthys nobilis* and silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*. *Biological conservation*, v. 183, p. 77-84, 2015. ISSN 0006-3207.

KOTSANOPOULOS, K. et al. The use of various statistical methods for authenticity and detection of adulteration in fish and seafood. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 64, n. 6, p. 1553-1571, 2024. ISSN 1040-8398.

KREADER, C. A. Persistence of PCR-detectable *Bacteroides distasonis* from human feces in river water. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, n. 10, p. 4103-4105, 1998. ISSN 1098-5336.

KUMAR, R. et al. Assessment of marine fish stocks within India's Exclusive Economic Zone: Status report 2022. *Indian Journal of Fisheries*, v. 71, n. 1, p. 1-11, 2024. ISSN 0970-6011.

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.

LANCE, R. F. et al. Experimental observations on the decay of environmental DNA from bighead and silver carps. *Management of Biological Invasions*, v. 8, n. 3, 2017. ISSN 1989-8649.

LAPORTE, M. et al. Caged fish experiment and hydrodynamic bidimensional modeling highlight the importance to consider 2D dispersion in fluvial environmental DNA studies. *Environmental DNA*, v. 2, n. 3, p. 362-372, 2020. ISSN 2637-4943.

LETESSIER, T. B. et al. Estimating pelagic fish biomass in a tropical seascape using echosounding and baited stereo-videography. *Ecosystems*, p. 1-18, 2022. ISSN 1432-9840.

LI, D.; HAO, Y.; DUAN, Y. Nonintrusive methods for biomass estimation in aquaculture with emphasis on fish: a review. *Reviews in Aquaculture*, v. 12, n. 3, p. 1390-1411, 2020. ISSN 1753-5123.

LI, H. et al. Environmental DNA metabarcoding of fish communities in a small hydropower dam reservoir: A comparison between the eDNA approach and established fishing methods. *Journal of Freshwater Ecology*, v. 37, n. 1, p. 341-362, 2022. ISSN 0270-5060.

LI, W. et al. Validating eDNA measurements of the richness and abundance of anurans at a large scale. *Journal of Animal Ecology*, v. 90, n. 6, p. 1466-1479, 2021. ISSN 0021-8790.

LØVIK, A. Biomass estimation in aquaculture facilities. *IFAC Proceedings Volumes*, v. 20, n. 7, p. 171-175, 1987. ISSN 1474-6670.

MAUVISSEAU, Q. et al. The multiple states of environmental DNA and what is known about their persistence in aquatic environments. *Environmental Science & Technology*, v. 56, n. 9, p. 5322-5333, 2022. ISSN 0013-936X.

MEADOR, M. R. Effectiveness of seining after electrofishing to characterize stream fish communities. *North American Journal of Fisheries Management*, v. 32, n. 1, p. 177-185, 2012. ISSN 0275-5947.

MINAMOTO, T. et al. Surveillance of fish species composition using environmental DNA. *Limnology*, v. 13, n. 2, p. 193-197, 2012. ISSN 1439-863X.

MORRISON, M. K. et al. Including environmental covariates clarifies the relationship between endangered Atlantic salmon (*Salmo salar*) abundance and environmental DNA. *Environmental DNA*, v. 5, n. 5, p. 987-1003, 2023. ISSN 2637-4943.

MOUSHOMI, R. et al. Environmental DNA size sorting and degradation experiment indicates the state of *Daphnia magna* mitochondrial and nuclear eDNA is subcellular. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 12500, 2019. ISSN 2045-2322.

NAISMITH, I.; KNIGHTS, B. Studies of sampling methods and of techniques for estimating populations of eels, *Anguilla anguilla* L. *Aquaculture research*, v. 21, n. 3, p. 357-368, 1990. ISSN 1355-557X.

NAMAN, S. M. et al. Food web perspectives and methods for riverine fish conservation. *WIREs Water*, v. 9, n. 4, p. e1590, 2022. ISSN 2049-1948. Available at: < <https://wires.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/wat2.1590> >.

NESTER, G. M. et al. Development and evaluation of fish eDNA metabarcoding assays facilitate the detection of cryptic seahorse taxa (family: Syngnathidae). *Environmental DNA*, v. 2, n. 4, p. 614-626, 2020. ISSN 2637-4943.

OSTBERG, C. O.; CHASE, D. M. Ontogeny of eDNA shedding during early development in Chinook Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Environmental DNA*, v. 4, n. 2, p. 339-348, 2022. ISSN 2637-4943.

PAWSON, M. G.; JENNINGS, S. A critique of methods for stock identification in marine capture fisheries. *Fisheries research*, v. 25, n. 3-4, p. 203-217, 1996. ISSN 0165-7836.

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, p. 1041-1045, 2017. ISSN 0001-3765.

PILLIOD, D. S. et al. Factors influencing detection of eDNA from a stream-dwelling amphibian. *Molecular Ecology Resources*, v. 14, n. 1, p. 109-116, 2014. ISSN 1755-098X.

PINNA, M. et al. An overview of ecological indicators of fish to evaluate the anthropogenic pressures in aquatic ecosystems: from traditional to innovative DNA-based approaches. *Water*, v. 15, n. 5, p. 949, 2023. ISSN 2073-4441.

PONT, D. Predicting downstream transport distance of fish eDNA in lotic environments. *Molecular Ecology Resources*, p. e13934, 2024. ISSN 1755-098X.

PONT, D. et al. Quantitative monitoring of diverse fish communities on a large scale combining eDNA metabarcoding and qPCR. *Molecular Ecology Resources*, v. 23, n. 2, p. 396-409, 2023. ISSN 1755-098X.

PORTT, C. B. et al. A review of fish sampling methods commonly used in Canadian freshwater habitats. 2006.

PRIVITERA-JOHNSON, K. M.; PUNT, A. E. A review of approaches to quantifying uncertainty in fisheries stock assessments. *Fisheries Research*, v. 226, p. 105503, 2020. ISSN 0165-7836.

RIBOLLI, J. et al. Optimized and validated protocol to the detection of the invasive bivalve *Limnoperna fortunei* from eDNA plankton samples. *Acta Limnologica Brasiliensia*, v. 33, 2021. ISSN 2179-975X.

ROURKE, M. L. et al. Correlated environmental DNA and electrofished estimates of relative biomass for golden perch, *Macquaria ambigua*. *Frontiers in Fish Science*, v. 2, p. 1358572, 2024. ISSN 2813-9097.

ROURKE, M. L. et al. Environmental DNA (eDNA) as a tool for assessing fish biomass: A review of approaches and future considerations for resource surveys. *Environmental DNA*, v. 4, n. 1, p. 9-33, 2022. ISSN 2637-4943.

SAHA, A. et al. A Study on the Fresh Water Fish Diversity of Mora Dhansiri River, Assam, India. *UTTAR PRADESH JOURNAL OF ZOOLOGY*, v. 45, n. 6, p. 164-171, 2024. ISSN 0256-971X.

SAHU, A. et al. Environmental DNA (eDNA): Powerful technique for biodiversity conservation. *Journal for Nature Conservation*, p. 126325, 2022. ISSN 1617-1381.

SAITO, T.; DOI, H. Environmental DNA degradation simulation from water temperature and DNA fragment length: a meta-analysis approach. *bioRxiv*, p. 2020.10. 30.361980, 2020.

_____. Degradation modeling of water environmental DNA: Experiments on multiple DNA sources in pond and seawater. *Environmental DNA*, v. 3, n. 4, p. 850-860, 2021. ISSN 2637-4943.

SASSOUBRE, L. M. et al. Quantification of environmental DNA (eDNA) shedding and decay rates for three marine fish. *Environmental science & technology*, v. 50, n. 19, p. 10456-10464, 2016. ISSN 0013-936X.

SAUPHAR, C. et al. Atlantic salmon (*Salmo salar*) distribution and vertical size-stratification in a commercial sea cage: A case study. *Aquaculture*, v. 581, p. 740356, 2024. ISSN 0044-8486.

SENAPATI, D. et al. Innovative Edna Approaches For Fish Biomass Estimation In Aquatic Environments. *Journal of Advanced Zoology*, v. 45, 2024. ISSN 0253-7214.

SEPULVEDA, A. J. et al. Improved detection of rare, endangered and invasive trout in using a new large-volume sampling method for eDNA capture. *Environmental DNA*, v. 1, n. 3, p. 227-237, 2019. ISSN 2637-4943.

SKINNER, M. et al. A mesocosm comparison of laboratory-based and on-site eDNA solutions for detection and quantification of striped bass (*Morone saxatilis*) in marine ecosystems. *Environmental DNA*, v. 2, n. 3, p. 298-308, 2020. ISSN 2637-4943.

STEWART, K. A. Understanding the effects of biotic and abiotic factors on sources of aquatic environmental DNA. *Biodiversity and Conservation*, v. 28, n. 5, p. 983-1001, 2019. ISSN 0960-3115.

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.

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

THALINGER, B. et al. The effect of activity, energy use, and species identity on environmental DNA shedding of freshwater fish. *Frontiers in Ecology and Evolution*, v. 9, p. 623718, 2021. ISSN 2296-701X.

THOMSEN, P. F. et al. Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. 2012. ISSN 1932-6203.

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.

TSUJI, S. et al. Rapid assessment of invasion front and biological impact of the invasive fish *Coreoperca herzi* using quantitative eDNA metabarcoding. *Biological Invasions*, p. 1-17, 2024. ISSN 1387-3547.

TURNER, C. R. et al. Particle size distribution and optimal capture of aqueous microbial eDNA. *Methods in Ecology and Evolution*, v. 5, n. 7, p. 676-684, 2014. ISSN 2041-210X.

URBAN, P. et al. Using eDNA to estimate biomass of bycatch in pelagic fisheries. *Environmental DNA*, 2022. ISSN 2637-4943.

URBAN, P. et al. eDNA based bycatch assessment in pelagic fish catches. *Scientific Reports*, v. 14, n. 1, p. 2976, 2024. ISSN 2045-2322.

VAN DENDEREN, D. et al. Demersal fish biomass declines with temperature across productive shelf seas. *Global Ecology and Biogeography*, 2023. ISSN 1466-822X.

WANG, S. et al. Methodology of fish eDNA and its applications in ecology and environment. *Science of the Total Environment*, v. 755, p. 142622, 2021. ISSN 0048-9697.

WEBB, P. W.; WEIHS, D. Functional locomotor morphology of early life history stages of fishes. *Transactions of the American Fisheries Society*, v. 115, n. 1, p. 115-127, 1986. ISSN 0002-8487.

WILCOX, T. M. et al. Fine-scale environmental DNA sampling reveals climate-mediated interactions between native and invasive trout species. *Ecosphere*, v. 9, n. 11, p. e02500, 2018. ISSN 2150-8925.

WILDER, M. L.; FARRELL, J. M.; GREEN, H. C. Estimating eDNA shedding and decay rates for muskellunge in early stages of development. *Environmental DNA*, v. 5, n. 2, p. 251-263, 2023. ISSN 2637-4943.

WIYONO, E. S.; ZAINUDDIN, M.; SYAMSUDDIN, M. L. Measuring indices of fish community structure in Fisheries Management Area 713 (FMA 713), Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, v. 25, n. 5, 2024. ISSN 2085-4722.

WOOTTON, R. J. *Ecology of teleost fishes*. Springer Science & Business Media, 2012. ISBN 9400908296.

XIONG, W.; MACISAAC, H. J.; ZHAN, A. An overlooked source of false positives in eDNA-based biodiversity assessment and management. *Journal of Environmental Management*, v. 358, p. 120949, 2024. ISSN 0301-4797.

YATES, M. et al. Towards a framework to unify the relationship between numerical abundance, biomass, and quantitative eDNA. *bioRxiv*, p. 2022.12.06.519311, 2022.

4 CAPÍTULO III – Utilização de DNA ambiental para monitoramento da biomassa relativa de tilápia-do-Nilo em viveiros comerciais

Abstract

Modern aquaculture faces growing challenges for the effective and sustainable monitoring of biomass, especially in high-value commercial species such as the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). This study investigated the use of environmental DNA (eDNA) as a non-invasive tool to estimate tilapia biomass in commercial ponds in the state of Paraná, Brazil. Water samples were collected monthly over an eight-month cultivation cycle in six ponds, and eDNA was quantified using real-time PCR. The results indicated significant correlations between eDNA concentration and environmental parameters, such as pH, ammonia, nitrite, and dissolved oxygen. In particular, pH was observed to play a crucial role in eDNA stability, with higher pH values associated with lower eDNA concentrations. Furthermore, quantile regression revealed that the daily weight gain of fish and ammonia concentration also significantly influence eDNA levels. Despite the potential of eDNA as a monitoring tool, the applied machine learning models (Random Forest and Gradient Boosting) failed to accurately predict eDNA concentration, suggesting the need for more complex approaches to capture non-linear interactions between variables. It is concluded that, whilst promising, the use of eDNA for biomass monitoring in aquaculture requires further refinement of analytical techniques to overcome the limitations imposed by environmental and management variables.

Palavras-chave: eDNA, PCR, aquicultura, biomassa, monitoramento ambiental.

4.1 INTRODUÇÃO

A aquicultura tem se consolidado como uma das atividades mais relevantes na produção global de proteína animal, desempenhando papel crucial na economia e segurança alimentar de uma população mundial em contínuo crescimento (BJØRNDAL; DEY; TUSVIK, 2024). Sua importância é demonstrada pelo fato de que mais da metade do pescado consumido mundialmente provém desta atividade, o que não apenas contribui significativamente para a nutrição humana, mas também ajuda a reduzir a pressão sobre os estoques pesqueiros naturais (FAO, 2020; MARTINELL, 2024). Neste cenário, o Brasil se destaca como o quinto maior produtor mundial de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (EL-SAYED; FITZSIMMONS, 2023), espécie que integra o segundo grupo de peixes de água doce mais cultivado globalmente, superado apenas pelas carpas (FAO, 2024). Em âmbito nacional, o estado do Paraná lidera a produção de tilápias, contribuindo de forma expressiva para a oferta de proteína animal no mercado doméstico e internacional (FAO, 2019).

O crescimento da demanda por proteínas e a necessidade de práticas cada vez mais eficientes e sustentáveis impõem novos desafios à aquicultura, particularmente no que diz respeito ao monitoramento eficaz da biomassa em sistemas de produção (PASHA; RAGHAVENDRA; NIRANJANAMURTHY, 2024). Métodos convencionais de monitoramento, frequentemente invasivos, apresentam limitações quanto à precisão e ao impacto ambiental, evidenciando a necessidade de tecnologias inovadoras capazes de aprimorar a eficiência e a sustentabilidade das práticas aquícolas (BEVERIDGE, 2013; LUSTOSA-NETO, 2018; TROELL, 2014).

Nesse contexto, o uso do DNA ambiental (eDNA) como ferramenta de monitoramento emerge como uma alternativa promissora, permitindo a avaliação não invasiva e potencialmente mais precisa da biomassa de organismos aquáticos cultivados (LI; HAO; DUAN, 2020; NOBLE; ROBSON; SAUNDERS; JERRY, 2015). O eDNA consiste no material genético liberado por organismos no ambiente aquático, que pode ser coletado diretamente da água e utilizado para identificar e quantificar espécies presentes em um determinado local. Inicialmente empregada em estudos de ecologia e conservação, essa técnica tem demonstrado grande potencial para o monitoramento de biodiversidade e detecção de espécies, inclusive invasoras (DEINER; BIK, 2017; THOMSEN, 2015).

A aplicação do eDNA na aquicultura vem sendo explorada como forma de superar as limitações dos métodos tradicionais de monitoramento de biomassa, possibilitando uma gestão mais precisa e sustentável dos viveiros (GOLDBERG; TURNER; DEINER; KLYMUS *et al.*, 2016; HANSEN; JACOBSEN; MIDDELBOE; PRESTON *et al.*, 2020; STEWART, 2019). O avanço tecnológico e o desenvolvimento de métodos moleculares mais refinados viabilizam seu uso em escala industrial, oferecendo soluções potenciais para os desafios da aquicultura moderna (CHOUHAN; DEKARI; CHOUDHARY; SINGH *et al.*, 2023).

Estudos recentes indicam que o eDNA pode fornecer estimativas mais precisas e em tempo real da biomassa de organismos em viveiros, correlacionando esses dados com variáveis ambientais e de manejo, como pH, oxigênio dissolvido e qualidade da água (FUKAYA; MURAKAMI; YOON; MINAMI *et al.*, 2021; RIEDER, 2023). Ademais, o eDNA permite monitorar as condições do viveiro sem perturbações físicas, reduzindo o estresse nos peixes e os impactos associados às práticas de monitoramento tradicionais (DEINER; BIK, 2017; RIVERA; RIMET; VASSELON; VAUTIER *et al.*, 2022). Dessa forma, a combinação de técnicas moleculares

avançadas com modelos estatísticos robustos poderá proporcionar uma melhor compreensão das dinâmicas de biomassa em sistemas aquaculturais, contribuindo para uma gestão mais informada e adaptativa (ARROYO-ESQUIVEL; KLAUSMEIER; LITCHMAN, 2024; TSUJI; INUI; NAKAO; MIYAZONO et al., 2022). O presente estudo tem como objetivo investigar a aplicação do eDNA como ferramenta para o monitoramento da biomassa relativa de tilápia-do-Nilo em viveiros localizados em propriedades comerciais no estado do Paraná, Brasil.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Área de estudo

O monitoramento foi realizado em duas fazendas de piscicultura especializadas no cultivo de tilápias, ambas integradas à Cooperativa Agroindustrial Consolata – COPACOL. Essas fazendas estão localizadas nos municípios de Cafelândia (24°39'02.0"S 53°15'32.8"W) e Anahy (24°40'06.8"S 53°11'12.2"W), na região oeste do estado do Paraná, região Sul do Brasil. Segundo a classificação climática de Köppen, o clima predominante na região, é classificado como Cfa, ou seja, subtropical úmido, com verões quentes e úmidos (temperatura média do mês mais quente acima de 22°C), invernos amenos com ocorrência de geadas (temperatura média do mês mais frio abaixo de 18°C, mas acima de -3°C), e precipitação bem distribuída ao longo do ano, sem estação seca definida.

Em Cafelândia, foram amostrados cinco viveiros, enquanto em Anahy, foi amostrado um viveiro. A Tabela 15 apresenta informações detalhadas sobre os viveiros, incluindo o período de alojamento inicial e dados sobre os peixes. Os dados abrangem seis viveiros distribuídos em duas fazendas, com áreas variando de 7.500 m² a 19.828 m². O período de alojamento inicial ocorreu em dezembro de 2020, com densidades de estocagem entre 6 e 7 peixes/m². A biomassa total inicial variou consideravelmente entre os viveiros, de 1.185 kg a 7.652 kg, refletindo as diferenças nas áreas dos viveiros e no peso médio inicial dos peixes.

Tabela 15. Dados iniciais dos sistemas de cultivo das fazendas monitoradas.

Viveiros	Fazenda	Período de alojamento	Área (m ²)	Nº total de peixes	Peixes/m ²	Peso médio (kg)	Biomassa total (Kg)
V1	1	03/12/2020	19.828	129.027	6	0,037	4.868
V2	1	01/12/2020	12.945	84.840	7	0,028	2.400
V3	1	02/12/2020	18.796	122.392	6	0,019	2.388
V4	1	02/12/2020	19.232	128.606	7	0,059	7.652

V5	1	02/12/2020	19.720	128.534	6	0,041	5.310
V6	2	15/12/2020	7.500	45.699	6	0,026	1.185

Este estudo foi conduzido em plena conformidade com os protocolos de ética animal e ambiental, bem como com as normativas locais de pesquisa em animais aquáticos. A pesquisa seguiu rigorosamente os padrões estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Agrárias (SCA) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), sob o protocolo 024/2019. Estas considerações éticas asseguram o respeito e o bem-estar dos animais envolvidos no monitoramento, bem como a integridade científica do estudo.

4.2.2 Práticas de cultivo e monitoramento

As técnicas de manejo utilizadas no cultivo de tilápias foram determinadas pela COPACOL, que atua como empresa integradora do sistema de produção nas propriedades monitoradas. A cooperativa é responsável pelo fornecimento de alevinos, rações e pelo custeio dos serviços de extensão aquícola, promovendo orientação e fiscalização para garantir a adesão às práticas produtivas por ela definidas. Os responsáveis por cada propriedade, sob a supervisão direta dos extensionistas, ficaram responsáveis pelas práticas diárias de manejo, biometria e determinação dos índices zootécnicos, além do monitoramento regular dos parâmetros de qualidade da água dos viveiros. Os principais parâmetros monitorados incluíram temperatura, oxigênio dissolvido, pH, amônia, nitrito, alcalinidade e turbidez.

4.2.3 Coleta e filtração das amostras

O delineamento experimental baseia-se em uma amostragem mensal conduzida ao longo de oito meses, abrangendo o ciclo produtivo completo em cada viveiro monitorado. Nesses viveiros foram estabelecidos três pontos de amostragem, com coletas realizadas mensalmente. A primeira amostragem, designada como tempo 0, ocorreu imediatamente antes do alojamento dos peixes. As amostragens subsequentes tiveram início um mês após o alojamento e prosseguiram regularmente durante todo o processo produtivo, culminando no momento da despesca. Este protocolo de amostragem sistemática permite um acompanhamento detalhado da dinâmica populacional e das condições ambientais ao longo de todo o ciclo de produção (Figura 14).

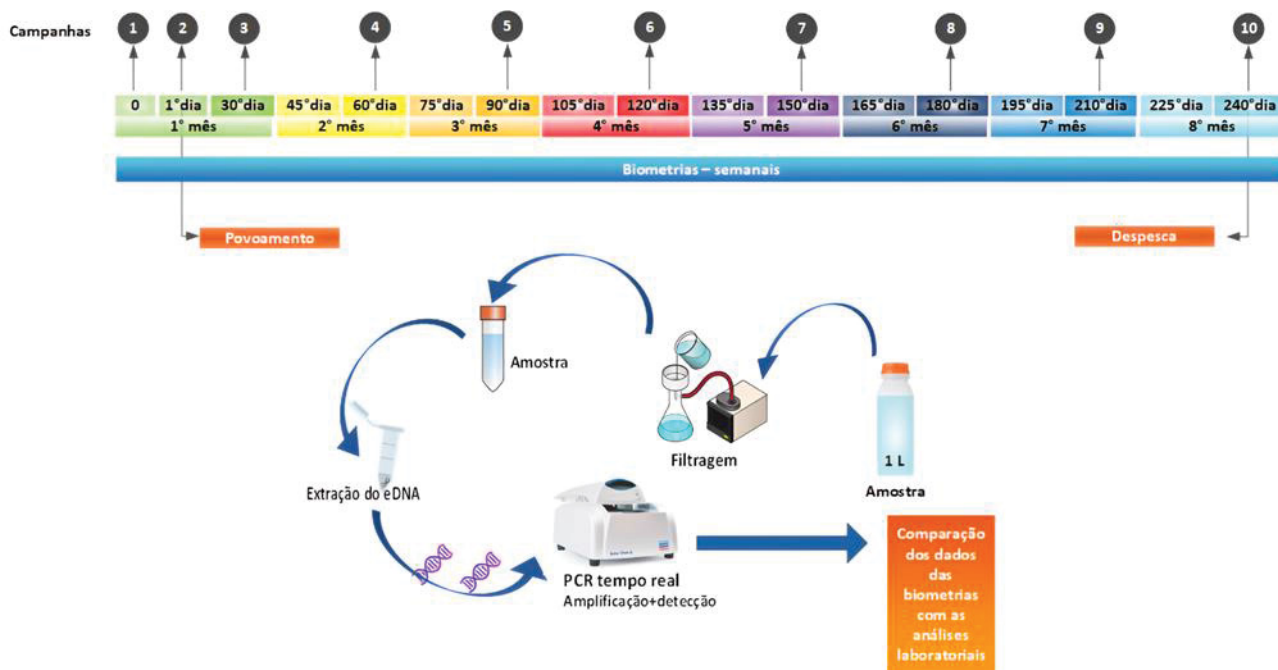


Figura 14. Delineamento temporal com a identificação dos tempos de cultivo de Tilápia-do-Nilo em que foram realizados os procedimentos de coleta de amostras de DNA ambiental. No esquema, fica claro que os procedimentos de coleta de água estão sempre associados a realização de biometria (com exceção da primeira coleta que foi realizada antes do alojamento dos peixes no viveiro).

Durante a fase de amostragem, rigorosos protocolos de assepsia foram implementados para minimizar a contaminação cruzada das amostras. Os equipamentos de campo foram sistematicamente descontaminados com solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 12% para eliminação de DNA residual. Luvas estéreis (Supermax) foram utilizadas e trocadas entre cada ponto de amostragem.

Em cada evento de coleta, duas alíquotas de 500 mL de água foram obtidas de três pontos distintos por viveiro, totalizando seis amostras por viveiro. As coletas foram realizadas manualmente na superfície da água, utilizando frascos de polietileno de alta densidade estéreis de 500 mL (Implast). As amostras foram imediatamente acondicionadas em caixas térmicas com gelo (4 ± 1 °C) para processamento em um intervalo máximo de 1 hora após a coleta.

A filtração *in situ* foi conduzida utilizando membranas de nitrato de celulose (Unifil, Alemanha) com diâmetro de 47 mm e porosidade de 0,45 μm . O processo de filtração foi realizado com o auxílio de uma bomba de vácuo portátil (Femic, Brasil) e unidades de filtração Nalgene™. O procedimento foi interrompido após a filtração de aproximadamente 250 mL ou quando observada a saturação da membrana.

Pós-filtração, as membranas foram imediatamente transferidas para microtubos cônicos, tipo Eppendorf (1,5 mL), contendo etanol absoluto 99,9% PA

(Emsure Merck®, Alemanha). As amostras foram mantidas a 4 ± 1 °C até o transporte ao laboratório para subsequente extração de DNA. Entre as filtrações, todos os equipamentos eram submetidos a um protocolo de descontaminação, incluindo lavagem com solução de NaClO a 12%, seguida de enxágue com água ultrapura (Milli-Q).

4.2.4 Extração e purificação de amostras de eDNA

No laboratório, as amostras foram submetidas a protocolos rigorosos de extração e análise de eDNA, empregando técnicas moleculares específicas para a identificação e quantificação de *Oreochromis niloticus*. A análise foi focada na quantificação e na variação temporal do eDNA da Tilápia-do-Nilo em cada viveiro ao longo do ciclo produtivo, visando também avaliar padrões sazonais e possíveis correlações com eventos específicos do manejo aquícola.

O processo de extração do DNA foi iniciado com a remoção dos filtros dos microtubos. Estes foram mantidos em temperatura ambiente (22 ± 2 °C) até a completa evaporação do etanol residual. Subsequentemente, os filtros foram submetidos aos procedimentos de extração, compreendendo as etapas de digestão e purificação.

A metodologia de extração baseou-se no princípio de Imobilização Reversível de Fase Sólida (SPRI), descrito por DEANGELIS; WANG e HAWKINS (1995). Este método utiliza beads magnéticas revestidas com magnetita e carboxila, que se ligam seletivamente ao DNA através de interações carboxila-DNA. Esta técnica oferece alta eficiência de recuperação e pureza do DNA extraído.

Após a extração, os extratos de DNA foram armazenados a -20 °C (± 1 °C) até o momento das análises subsequentes. Para garantir a integridade dos resultados e minimizar o risco de contaminação cruzada, os processos de extração e quantificação foram realizados em ambientes laboratoriais distintos e fisicamente separados, seguindo as recomendações de PIE; STRÖHER; AGOSTINIS; BELMONTE-LOPES *et al.* (2017).

4.2.5 Quantificação do eDNA por PCR em tempo real

A quantificação do eDNA foi realizada por qPCR utilizando sondas de hidrólise TaqMan em um termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen, Alemanha). O protocolo incluiu controle negativo, água de lavagem dos coletores de amostras e um controle interno da reação (IPC) - uma sequência de DNA sintético para avaliar a presença de inibidores ou outros fatores que pudessem afetar a PCR. Antes das análises,

estabeleceu-se uma curva de sensibilidade para determinar o limite de detecção do ensaio. Para isso, uma amostra de tecido muscular de *O. niloticus* foi digerida com 200 μL de tampão de digestão e 20 μL de proteinase K, incubada a 56°C ($\pm 0,5^\circ\text{C}$) por 12 horas. O DNA extraído foi quantificado usando o kit dsDNA BR no fluorômetro Qubit® 4.0.

A reação de qPCR foi preparada em um volume total de 9 μL , contendo 0,75 μL de primer específico da espécie (concentração final de 10 μM), 0,25 μL de sonda de hidrólise (concentração final de 10 μM) e 3 μL do extrato de DNA. O mix de reação foi distribuído em alíquotas de 6 μL por poço da placa de PCR. O ciclo térmico e as condições de amplificação foram otimizados para maximizar a eficiência e especificidade da reação. As curvas de amplificação foram analisadas para determinar o cycle threshold (Ct), definido como o ciclo no qual o sinal fluorescente ultrapassa o limiar de detecção (background).

A quantificação absoluta do DNA foi realizada comparando os valores de Ct das amostras com uma curva padrão. Esta curva foi construída utilizando diluições seriadas de DNA de *O. niloticus* de concentração conhecida (N=6). A curva padrão foi considerada válida apenas quando apresentou um coeficiente de determinação (R^2) $\geq 0,95$, assegurando a precisão e confiabilidade da quantificação.

4.2.6 Análise estatística

A análise dos dados foi conduzida utilizando os softwares R (versão 4.3.0) e Python. Inicialmente, a normalidade dos dados referentes aos parâmetros de qualidade da água e à concentração de eDNA foi verificada através dos testes de Shapiro-Wilk e D'Agostino-Pearson. A ausência de normalidade nos dados levou à adoção de métodos estatísticos não paramétricos nas análises subsequentes.

Para comparar os parâmetros de qualidade da água entre os diferentes viveiros ao longo do período de cultivo, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis. Quando diferenças significativas foram detectadas, o teste post-hoc de Dunn foi utilizado para identificar quais viveiros apresentavam diferenças específicas.

A correlação entre a concentração de eDNA e os parâmetros ambientais e de cultivo foi investigada por meio da análise de correlação de Spearman. Para assegurar a representatividade dos dados, coletados ao longo de 8 meses em múltiplos viveiros, foram calculadas as medianas mensais de cada parâmetro por viveiro. O procedimento analítico incluiu o agrupamento dos dados, o cálculo das medianas, a

filtragem do conjunto de dados e a aplicação da função Spearman para calcular as correlações e seus respectivos p-valores.

Posteriormente, uma análise de regressão quantílica foi realizada utilizando as variáveis significativas identificadas na análise de correlação. Modelos de regressão quantílica foram ajustados para cada variável independente em relação à concentração de eDNA, com o cálculo dos coeficientes e p-valores. Adicionalmente, uma regressão quantílica coletiva foi conduzida, incorporando todas as variáveis independentes significativas em um único modelo.

Para aprofundar a análise, foram aplicados modelos de regressão avançados, incluindo Random Forest e Gradient Boosting. Os dados foram pré-processados com a imputação de valores ausentes pela média e padronização, sendo posteriormente divididos em conjuntos de treinamento (80%) e teste (20%). O desempenho dos modelos foi avaliado com base no erro quadrático médio (MSE) e no coeficiente de determinação (R^2). A importância das variáveis foi analisada para identificar os parâmetros com maior influência na concentração de eDNA. A robustez do desempenho dos modelos foi verificada por meio de validação cruzada com cinco divisões. Todos os gráficos e visualizações foram gerados utilizando a biblioteca Matplotlib do Python.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Qualidade da água

A análise da qualidade da água nos seis viveiros monitorados revelou diferenças significativas apenas em relação à alcalinidade e transparência. A Tabela 16 resume as variações observadas durante o período de cultivo, com medianas e intervalos interquartis apresentados para cada parâmetro. Os viveiros V3 e V5 apresentaram alcalinidade significativamente maior (54,0 mg/L CaCO_3) quando comparados aos demais viveiros. Em relação à transparência, o viveiro V6 destacou-se com um valor significativamente superior (25,0 cm) em relação aos outros viveiros (21,0 cm). Embora as variações observadas nas concentrações de amônia total (0,5 a 1,0 mg/L) e nitrito (0,5 a 1,0 mg/L NO_2^-) não tenham sido estatisticamente significativas, elas indicam flutuações relevantes entre os viveiros. Outros parâmetros como pH, oxigênio dissolvido e temperatura mantiveram-se relativamente constantes ao longo do estudo, sem variações significativas entre os viveiros.

4.3.2 Mortalidade

Observa-se que, nos primeiros 50 dias, a mortalidade permaneceu baixa em todos os viveiros. A partir desse ponto, viveiros como V4 e V6 apresentaram um aumento acentuado na mortalidade, atingindo cerca de 6% e 8%, respectivamente, enquanto os viveiros V1, V2, V3 e V5 mantiveram taxas mais estáveis e inferiores a 3%. Próximo aos 100 dias, o viveiro V1 registrou um aumento abrupto na mortalidade, superando 12%. Ao final, os viveiros V1 e V2 apresentaram as maiores taxas de mortalidade, atingindo 14% e 12%, respectivamente, enquanto V5 e V6 mantiveram taxas mais baixas e estáveis, em torno de 6-8%. Os viveiros V3 e V4 apresentaram um padrão intermediário, com aumentos mais graduais nas taxas de mortalidade ao longo do tempo (Figura 15).

4.3.3 Número de peixes

Os viveiros V1, V3, V4 e V5 iniciaram com aproximadamente 120.000 peixes, enquanto o viveiro V2 foi povoado com cerca de 80.000 peixes e o viveiro V6 com aproximadamente 40.000 peixes, totalizando mais de 639.000 peixes povoados e monitorados durante o estudo. Observa-se uma leve redução no número de peixes nos viveiros V1, V3, V4 e V5, com uma queda mais acentuada em V5 ao redor dos 100 dias. O viveiro V2 manteve seu número de peixes relativamente constante, e o viveiro V6 apresentou uma redução inicial seguida de estabilidade (Figura 16).

A Tabela 17 apresenta um resumo dos dados dos ciclos de produção realizados nos viveiros monitorados, cujas áreas variaram entre 7.500 e 19.828 m². Os ciclos de produção tiveram início entre 1º e 15 de dezembro de 2020, com término entre 26 de julho e 6 de agosto de 2021, totalizando um tempo de cultivo que variou de 234 a 237 dias. A densidade inicial nos viveiros oscilou entre 6,1 e 6,7 peixes/m², enquanto a densidade final variou entre 5,6 e 6,4 peixes/m², indicando uma leve redução ao longo do período de cultivo. As biometrias foram conduzidas semanalmente, e em algumas ocasiões, quinzenalmente, com a amostragem de aproximadamente 126 a 204 peixes por viveiro em cada evento.

Tabela 16. Variação da qualidade da água nos viveiros monitorados durante os cultivos. Mediana e intervalo interquartis (entre parênteses). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os viveiros monitorados de acordo com o teste de Kruskal-Wallis e teste a posteriori de Dunn.

Viveiro	pH	Amônia (mg/L amônia total)	Alcalinidade (mg/L CaCO ₃)	Nitrito (mg/L NO ₂ -)	Transparência (cm)	Oxigênio dissolvido (mg/L)	Temp. (°C)
V1	7.2 (0.0)	1.0 (2.5)	27.0 ^a (38.7)	0.5 (0.75)	21.0 ^a (2.0)	6.1 (2.6)	24.3 (9.3)
V2	7.2 (0.0)	0.5 (1.25)	36.0 ^a (39.2)	1.0 (0.625)	21.0 ^a (1.5)	6.3 (2.8)	24.3 (9.3)
V3	7.2 (0.0)	1.0 (0.75)	54.0 ^b (9.0)	1.0 (0.75)	21.0 ^a (2.0)	6.2 (2.0)	24.5 (9.2)
V4	7.2 (0.0)	1.0 (1.75)	22.0 ^a (47.7)	0.5 (1.0)	21.0 ^a (2.0)	6.3 (2.7)	24.6 (9.7)
V5	7.2 (0.0)	1.0 (1.25)	54.0 ^b (18.0)	0.5 (0.75)	21.0 ^a (2.0)	6.0 (2.4)	24.5 (9.5)
V6	7.2 (0.2)	0.5 (0.75)	36.0 ^a (9.0)	0.5 (0.75)	25.0 ^b (17.5)	6.2 (3.2)	25.0 (6.0)

Tabela 17. Dados relativos aos cultivos realizados nos viveiros de tilápia monitorados.

Viveiro	Área (m ²)	Data Inicial	Data Final	Tempo de Cultivo (dias)	Densidade Inicial (peixes/m ²)	Densidade Final (peixes/m ²)
V1	19828	03/12/20	26/07/21	235	6,5	6,3
V2	12945	01/12/20	26/07/21	237	6,6	6,4
V3	18796	02/12/20	26/07/21	236	6,5	6,3
V4	19232	02/12/20	26/07/21	236	6,7	6,2
V5	19720	02/12/20	26/07/21	236	6,5	5,6
V6	7500	15/12/20	06/08/21	234	6,1	5,7

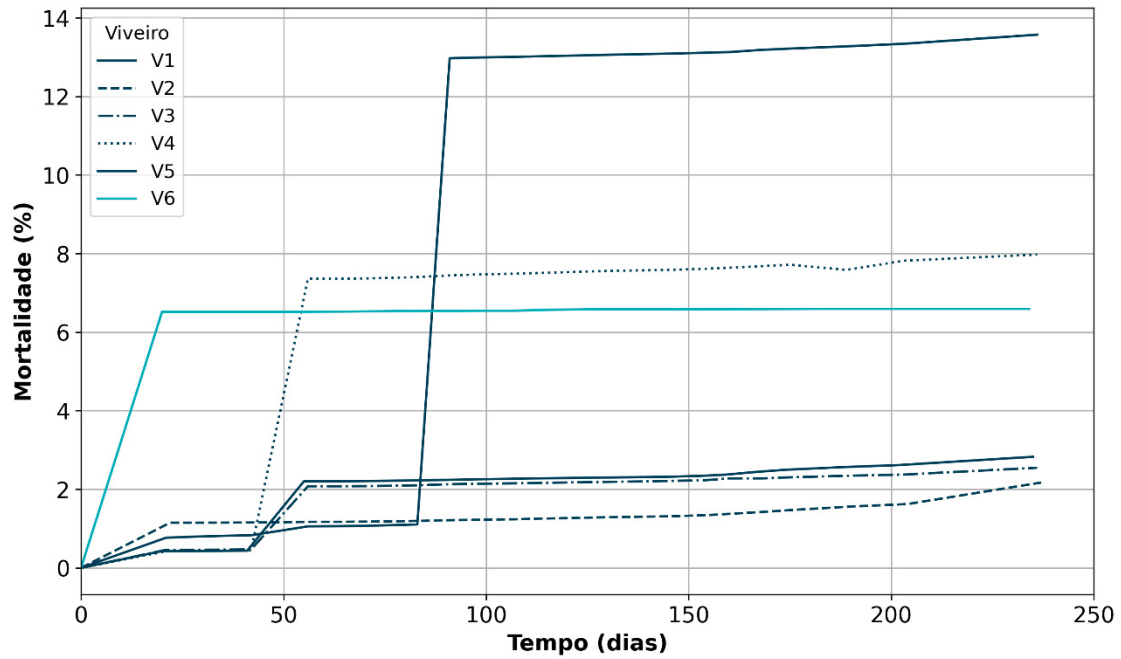


Figura 15. Variação da taxa de mortalidade ao longo dos cultivos (viveiros 1-5: Propriedade 1; viveiro 6: Propriedade 2).

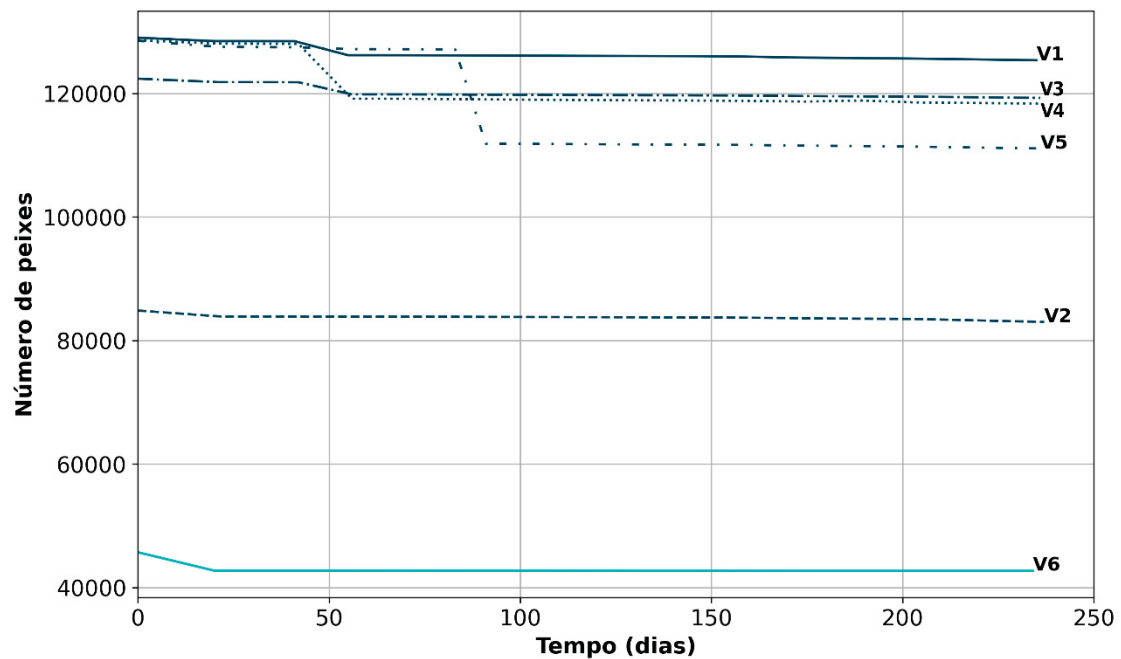


Figura 16. Variação do número de peixes nos viveiros ao longo dos cultivos (viveiros 1-5: Propriedade 1; viveiro 6: Propriedade 2).

4.3.4 Peso médio

O crescimento dos peixes foi consistente em todos os viveiros, com um aumento mais acentuado no peso médio nos primeiros 100 dias. A partir desse período, os peixes dos viveiros V4 e V6 apresentaram os maiores pesos médios, atingindo cerca de 0,75 kg aos 200 dias, enquanto os viveiros V1, V2, V3 e V5 mantiveram um crescimento semelhante, com pesos médios entre 0,6 kg e 0,65 kg ao final do período de cultivo (Figura 17). A análise estatística com o teste de Kruskal-Wallis indicou que não houve diferenças significativas no peso médio dos peixes entre os diferentes viveiros (H-statistic: 3,77, P-value: 0,582).

4.3.5 Ganho de peso diário

A Figura 18 ilustra a variação do ganho de peso diário (GPD, em g/dia) dos peixes ao longo do tempo de cultivo nos seis viveiros monitorados. O GPD, modelado por uma curva polinomial de segunda ordem, demonstra um padrão consistente em todos os viveiros, com um aumento inicial rápido seguido por uma desaceleração gradual e, posteriormente, uma redução. Os viveiros V4 e V5 mostraram os maiores picos de ganho diário de peso, aproximadamente 5,5 g/dia, indicando um crescimento mais eficiente nesse intervalo de tempo. Em contrapartida, o viveiro V6 apresentou um desempenho ligeiramente inferior, com um pico de cerca de 4,5 g/dia. Todos os viveiros seguiram uma tendência semelhante, refletindo uma fase inicial de rápido crescimento, estabilização e posterior declínio no ganho de peso diário, indicando uma resposta comum às condições de cultivo ao longo do tempo.

4.3.6 Biomassa

Observa-se um aumento constante da biomassa em todos os viveiros, com uma taxa de crescimento mais rápida nos primeiros 150 dias. Os viveiros V4 e V5 alcançaram as maiores biomassas totais, aproximando-se de 70.000 kg, enquanto os viveiros V1, V2 e V3 seguiram de perto, com biomassas entre 60.000 kg e 65.000 kg. O viveiro V6, menor em termos de tamanho e povoado com uma menor densidade, apresentou um crescimento mais modesto, atingindo um pico de cerca de 40.000 kg. Após 150 dias, a taxa de crescimento da biomassa começou a estabilizar ou até diminuir levemente (Figura 19).

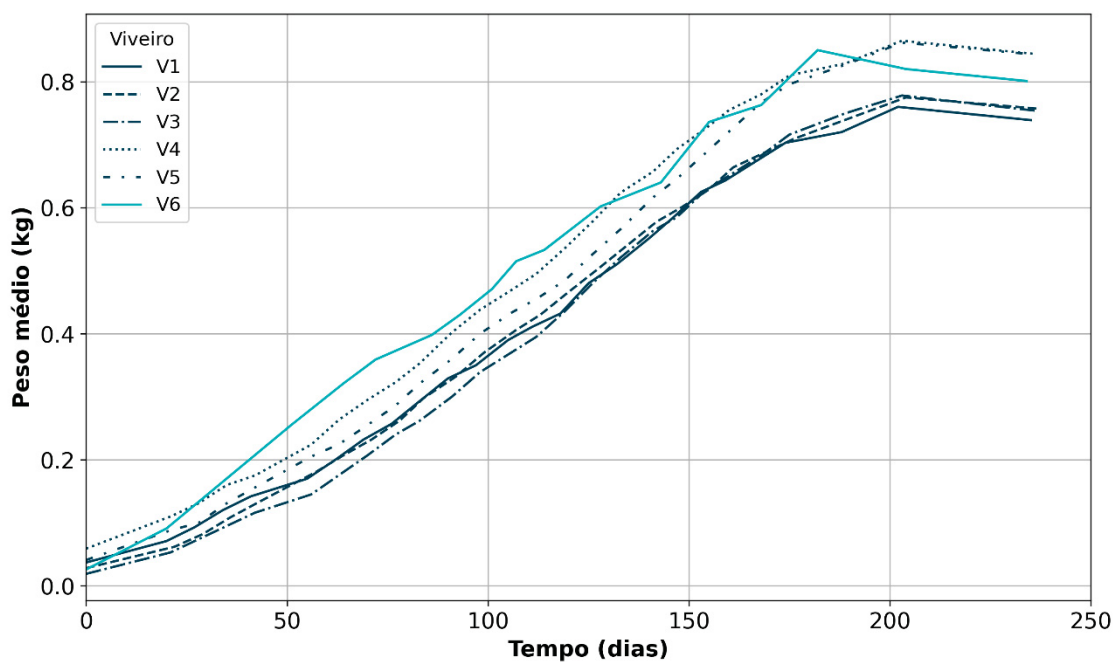


Figura 17. Variação do peso médio dos peixes ao longo dos cultivos (viveiros 1-5: Propriedade 1; viveiro 6: Propriedade 2).

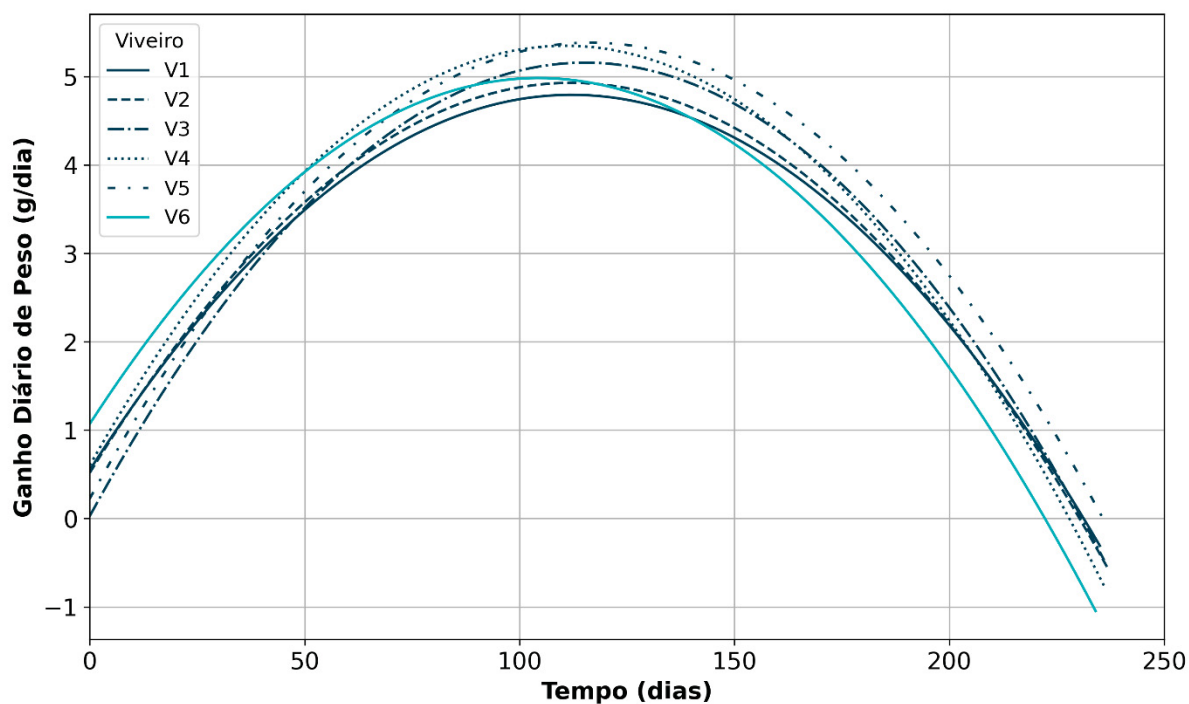


Figura 18. Curva polinomial de segunda ordem relacionando o ganho de peso diário ao longo do tempo nos diferentes viveiros monitorados (viveiros 1-5: Propriedade 1; viveiro 6: Propriedade 2).

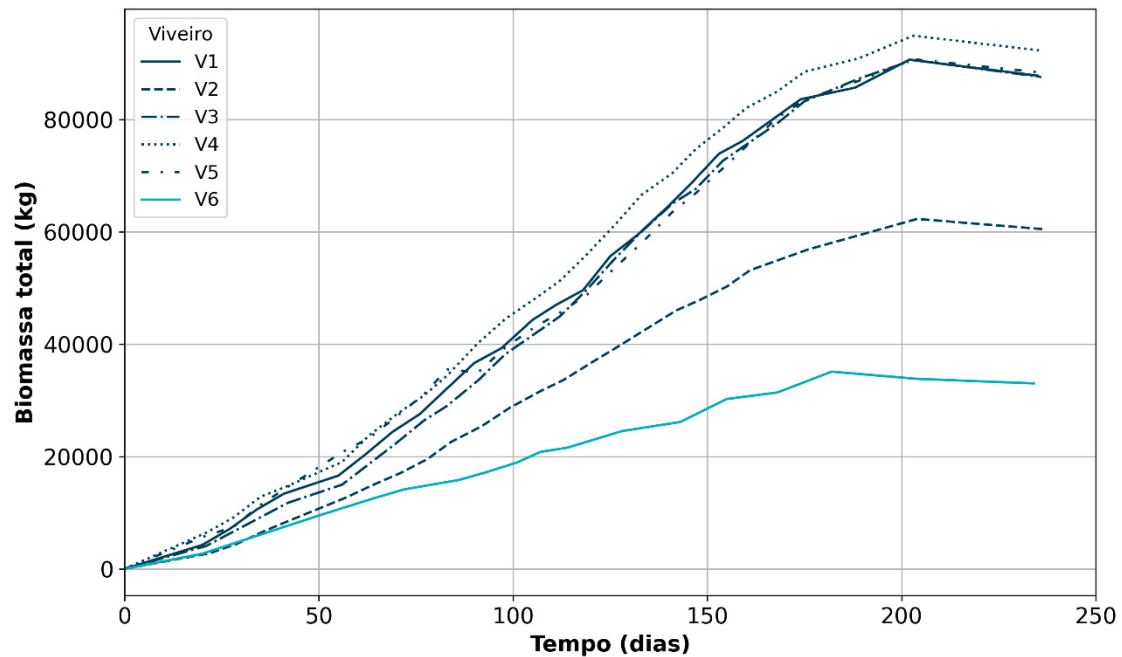


Figura 19. Variação da biomassa presente nos viveiros ao longo dos cultivos (viveiros 1-5: Propriedade 1; viveiro 6: Propriedade 2).

4.3.7 Concentração de DNA

A análise das concentrações de eDNA foi realizada utilizando dados medianos mensais para assegurar uma representação robusta e menos suscetível a influências de valores atípicos. Cada viveiro foi analisado individualmente, e suas concentrações medianas (em $\text{ng}/\mu\text{L}$) de eDNA foram plotadas graficamente (Figura 20). Observa-se uma alta concentração inicial logo após o povoamento, em dezembro de 2020, com valores superiores a $2,0 \text{ ng}/\mu\text{L}$ no V5. Nos meses subsequentes, houve uma queda acentuada nas concentrações, estabilizando em valores inferiores a $0,5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ entre janeiro e março de 2021. A partir de abril de 2021, as concentrações começam a apresentar pequenas flutuações, com picos em junho e julho de 2021, especialmente nos viveiros V6 e V3, que apresentaram valores entre $0,5$ e $1 \text{ ng}/\mu\text{L}$. No entanto, as concentrações de eDNA se mantiveram relativamente baixas durante a maior parte do período monitorado.

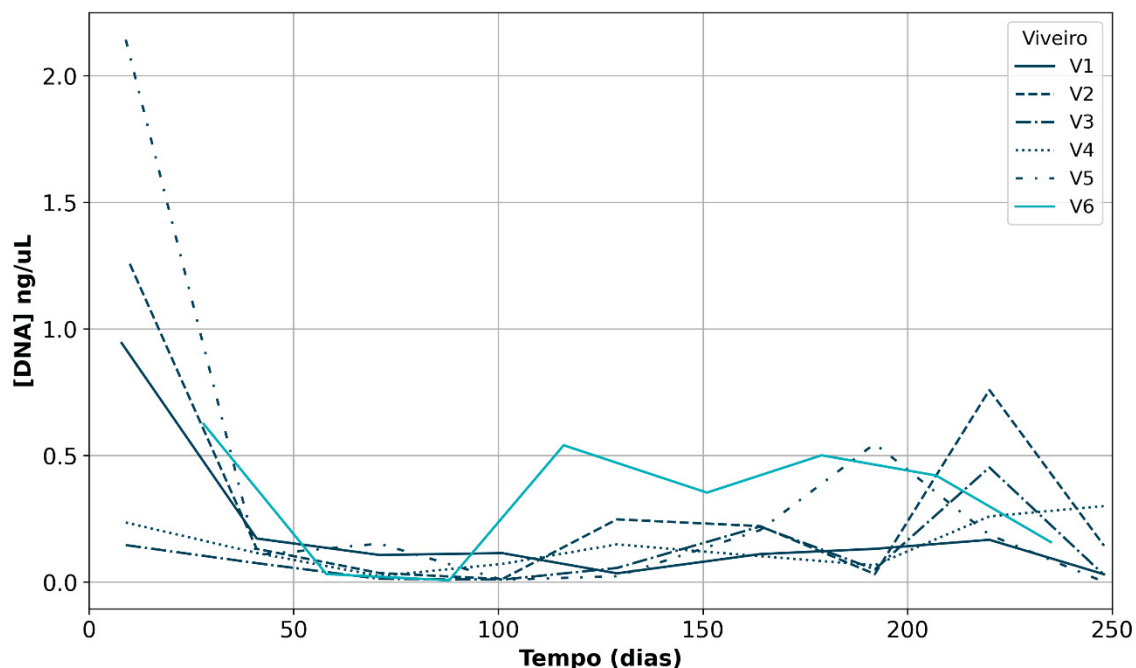


Figura 20. Variação temporal da mediana das concentrações de DNA (em ng/μL) de tilápia nos viveiros monitorados.

4.3.8 Análises estatísticas

Nenhuma das variáveis testadas pelos testes de Shapiro-Wilk e D'Agostino-Pearson seguiu uma distribuição normal ($p < 0.05$). Com isso, optou-se por analisar os resultados através de análises não-paramétricas.

4.3.8.1 Correlação de Spearman

Os resultados revelaram correlações significativas entre a concentração de eDNA e vários parâmetros. Observou-se uma correlação negativa entre a concentração de eDNA e o ganho de peso diário (GPD) ($-0,427$, $p=0,002$), indicando que o aumento do GPD foi associado a uma diminuição na concentração de eDNA. Além disso, houve correlações negativas significativas com o pH ($-0,379$, $p=0,009$), amônia ($-0,483$, $p=0,001$) e nitrito ($-0,405$, $p=0,005$), indicando que concentrações mais altas de eDNA estiveram associadas a menores valores desses parâmetros, refletindo possíveis influências na qualidade da água. A correlação positiva com o oxigênio dissolvido ($0,361$, $p=0,013$) sugere que concentrações mais elevadas de oxigênio estiveram associadas a maiores concentrações de eDNA (Tabela 18).

Tabela 18. Correlação de Spearman entre a mediana mensal da concentração de DNA (ng/L) e as variáveis independentes monitoradas nos cultivos.

Parâmetro	Correlação Spearman	p-Valor
Área (m ²)	-0,08806	0,552
Mortalidade (%)	-0,07691	0,603
Número de peixes	-0,09873	0,504
Densidade (peixes/m ²)	0,008847	0,952
Peso médio (kg)	0,071537	0,629
GPD (g/dia)	-0,4272	0,002
Biomassa (kg)	-0,09813	0,507
Biomassa total (kg)	-0,10041	0,497
pH	-0,37857	0,009
Amônia (mg/L de amônia total)	-0,48336	0,001
Alcalinidade (mg/L de CaCO ₃)	-0,15824	0,288
Nitrito (mg/L NO ₂ ⁻)	-0,40513	0,005
Transparência (cm)	0,125075	0,402
Oxigênio (mg/L)	0,360697	0,013
Temperatura (°C)	-0,27185	0,054

4.3.8.2 Regressão quantílica

A análise regressão quantílica revelou que, individualmente, o GPD apresentou uma relação negativa significativa com a concentração de eDNA (coeficiente: -0,0325, p=0,036), sugerindo que um aumento no GPD está associado a uma diminuição na concentração de eDNA. A amônia também mostrou uma relação negativa marginalmente significativa (coeficiente: -0,0976, p=0,051), indicando que maiores concentrações de amônia podem estar associadas a menores concentrações de eDNA. Embora o pH e o oxigênio dissolvido não apresentassem correlações significativas individualmente (coeficiente: -0,6008, p=0,105 para pH; coeficiente: 0,0328, p=0,072 para oxigênio), a magnitude dos coeficientes sugere possíveis tendências de impacto.

Na análise coletiva, quando todas as variáveis independentes foram consideradas simultaneamente, o pH emergiu como a única variável com uma relação negativa significativa com a concentração de eDNA (coeficiente: -0,9795, p=0,018), sugerindo que um aumento no pH esteve associado a uma diminuição na concentração de eDNA quando outras variáveis foram controladas. As outras variáveis, incluindo GPD, amônia e oxigênio dissolvido, não mostraram relações significativas na análise coletiva (Tabela 19).

Tabela 19. Resultados das regressões quantílicas individuais e coletivas para [DNA] (ng/ μ L) com GPD, pH, amônia e oxigênio.

Variável Independente	Coefficiente	p-Valor	Quantil
Regressões individuais			
GPD (g/dia)	-0,0325	0,036	0,5
pH	-0,60076	0,105	0,5
Amônia (mg/L de amônia total)	-0,0976	0,051	0,5
Oxigenio_mg_L	0,032773	0,072	0,5
Regressões coletivas			
GPD (g/dia)	-0,04583	0,130	0,5
pH	-0,97954	0,018	0,5
Amônia (mg/L de amônia total)	-0,01159	0,811	0,5
Oxigênio (mg/L)	-0,00872	0,791	0,5

Esses resultados indicam que, enquanto o GPD e a amônia apresentaram impactos individuais na concentração de eDNA, o pH desempenhou um papel mais relevante quando todas as variáveis são consideradas juntas. Desta forma, o pH destacou-se como um fator importante na regulação da concentração de eDNA nos viveiros de tilápia, enquanto o impacto de outras variáveis pode ser modulado por interações complexas entre os diferentes parâmetros ambientais e de manejo.

A Figura 21 ilustra a regressão quantílica coletiva para a concentração de eDNA em relação às variáveis independentes (GPD, pH, amônia e oxigênio dissolvido). No gráfico, os pontos azuis representam os dados reais observados, enquanto a linha vermelha indica os valores preditos pelo modelo de regressão quantílica. Observa-se que a linha de predição segue a tendência geral dos dados, com variações ao longo do índice. Esse resultado sugere que o modelo de regressão quantílica conseguiu capturar parte das variações na concentração de eDNA em função das variáveis ambientais e de cultivo consideradas, embora existam flutuações nos dados reais que não são totalmente explicadas pelo modelo.

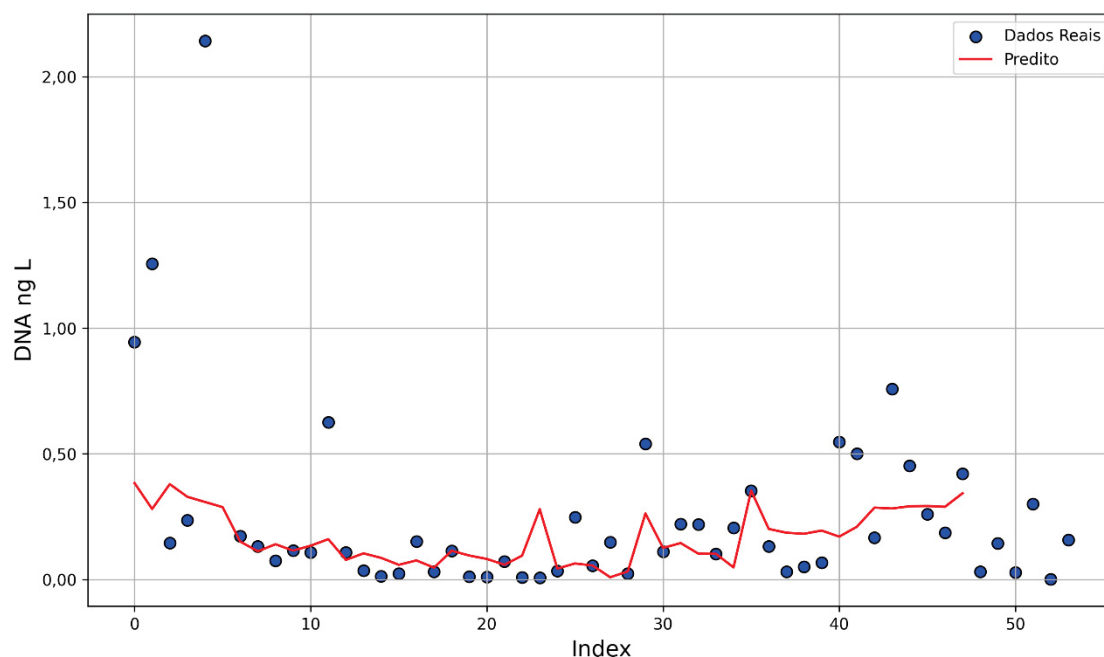


Figura 21. Regressão quantílica coletiva para [DNA] (ng/L) com GPD, pH, Amônia e Oxigênio.

Este gráfico mostra a relação entre a concentração de [DNA] (ng/L) e as variáveis independentes GPD (g/dia), pH, Amônia (mg/L de amônia total), e Oxigênio (mg/L). Os pontos azuis representam os dados reais, enquanto a linha vermelha representa os valores preditos pela regressão quantílica coletiva.

4.3.8.3 Outros modelos preditivos

Dois modelos de aprendizado de máquina, Random Forest (RF) e Gradient Boosting (GB), foram aplicados para prever as concentrações de eDNA. Os resultados das métricas de desempenho são apresentados na Tabela 20.

Tabela 20. Métricas de desempenho dos modelos Random Forest e Gradient Boosting

Modelo	MSE	R ²	CV MSE	CV MSE Std
Random Forest	0,10097	-4,67731	0,11085	0,16202
Gradient Boosting	0,15772	-7,86827	0,12173	0,14385

MSE: Erro Quadrático Médio; R²: Coeficiente de Determinação; CV MSE: MSE da Validação Cruzada; CV MSE Std: Desvio Padrão do CV MSE.

Ambos os modelos apresentaram um desempenho insatisfatório, como evidenciado pelos valores negativos de R² e pelos altos valores de MSE. O modelo Random Forest demonstrou um erro ligeiramente menor (MSE = 0,10097) em comparação com o Gradient Boosting (MSE = 0,15772). Os resultados da validação cruzada foram consistentes com os valores de MSE obtidos, indicando que ambos os modelos têm baixa capacidade preditiva para as concentrações de eDNA nas

condições estudadas. A análise da importância das variáveis revelou diferenças na contribuição relativa de cada característica para os dois modelos (Figura 22).

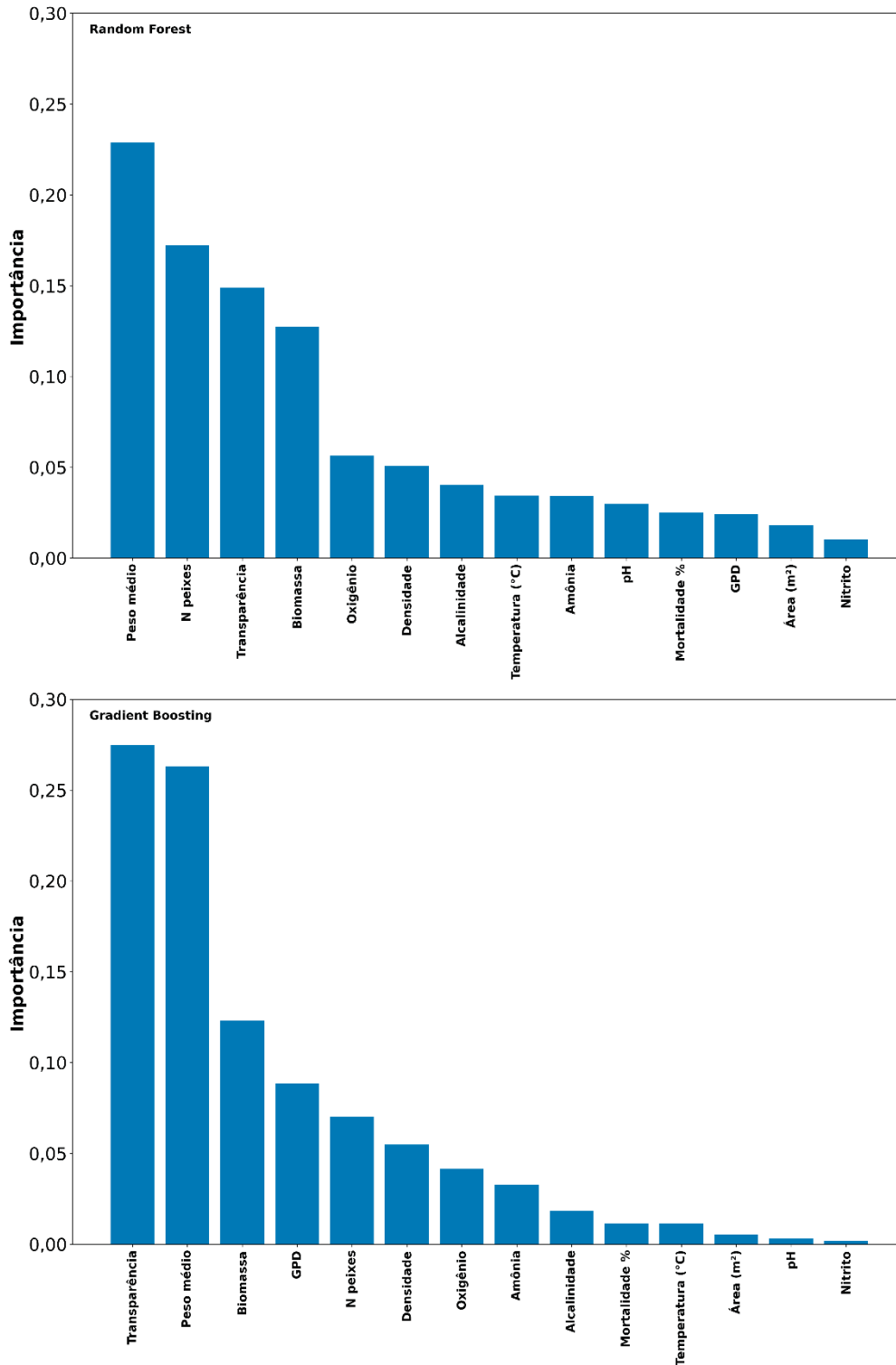


Figura 22. Importância relativa das variáveis na revisão da concentração de eDNA de tilápia utilizando Random Forest e Gradient Bossting.

Para o modelo Random Forest, as cinco variáveis mais importantes foram, pela ordem,) peso médio (0,229); número de peixes (0,172); transparência (0,149);

biomassa (0,127); oxigênio dissolvido (0,056). Para o modelo Gradient Boosting, a ordem de importância foi transparência (0,275); peso médio (0,26321); Ganho de Peso Diário (0,088); biomassa (0,12307); e densidade (0,05479).

Ambos os modelos identificaram "Peso médio" e "Transparência" como características de alta importância, embora com ordens diferentes. Notavelmente, o Random Forest atribuiu maior importância ao "Número de peixes", enquanto o Gradient Boosting priorizou o "GPD".

A Figura 23 apresenta a relação entre os valores reais e previstos de concentração de eDNA para ambos os modelos.

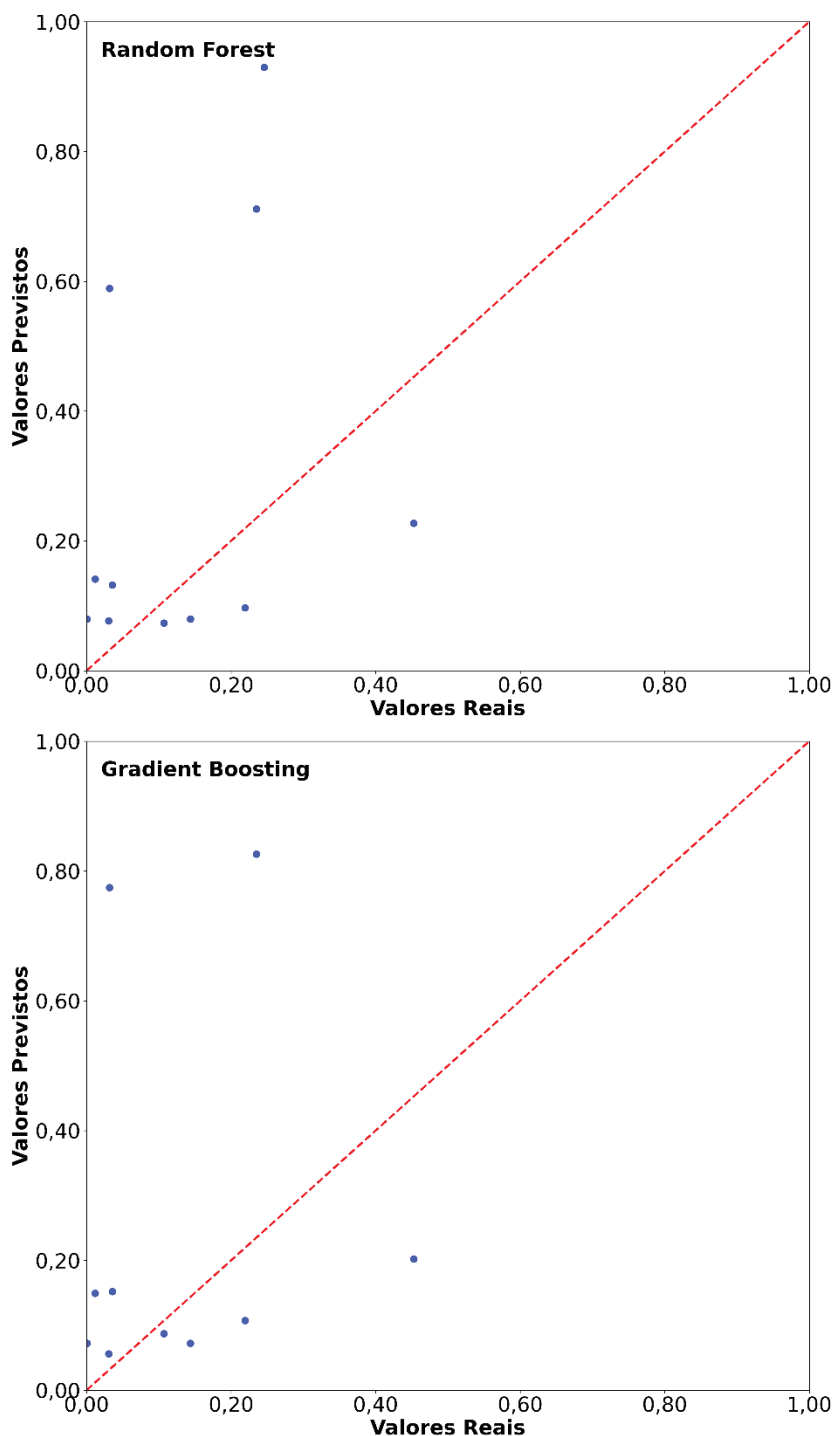


Figura 23. Relação entre valores observados e previstos de concentração de eDNA de tilápia utilizando o modelo Random Forest e Gradient Boosting.

A dispersão dos pontos em ambos os gráficos indica uma baixa correlação entre os valores reais e previstos, corroborando o fraco desempenho dos modelos evidenciado pelas métricas quantitativas. Estes resultados sugerem que a relação entre as variáveis ambientais e de manejo estudadas e a concentração de eDNA é complexa e possivelmente não-linear, demandando uma investigação mais

aprofundada e, potencialmente, a consideração de fatores adicionais não contemplados neste estudo.

4.4 DISCUSSÃO

A hipótese central do nosso estudo postulava que o eDNA poderia fornecer estimativas precisas e não invasivas da biomassa de tilápia ao longo do ciclo de produção em viveiros comerciais, oferecendo uma metodologia inovadora para otimizar as práticas produtivas na aquicultura. Contudo, os resultados obtidos revelaram uma complexidade além da esperada na relação entre o eDNA e diversos fatores ambientais, indicando a necessidade de uma abordagem mais refinada para a aplicação desta técnica em viveiros de terra.

Nossas análises demonstraram um padrão intrigante: as concentrações de eDNA apresentaram patamares iniciais mais elevados, quando os peixes e a biomassa estocada eram menores, seguidos por uma estabilização em níveis inferiores ao longo do tempo, enquanto a biomassa de peixes nos viveiros aumentava continuamente. Esta tendência se alinha parcialmente com as observações de KLYMUS; RICHTER; CHAPMAN e PAUKERT (2015), que associaram a maior liberação inicial de eDNA ao estresse dos animais. Entretanto, diferentemente daquele estudo, não observamos um aumento consistente na liberação de eDNA com o aumento da biomassa dos peixes. Porém, naquele caso, os autores observaram um forte aumento da taxa de liberação de eDNA com o aumento da biomassa dos peixes. No nosso caso, apesar da identificação de correlações significativas entre o eDNA e parâmetros ambientais específicos, não foi possível estabelecer uma relação clara e consistente entre a concentração de eDNA e a biomassa de tilápia ao longo do ciclo de produção. Com isso, no contexto dos viveiros comerciais estudados, o eDNA não proporcionou uma estimativa direta e confiável da densidade de peixes.

A complexidade das interações ambientais e biológicas presentes em ambientes com intensa produção e degradação de matéria orgânica, bem como nos fatores que influenciam a detecção do eDNA, como a presença de inibidores de PCR, parecem ser as principais responsáveis pelos resultados aqui obtidos. Estes elementos, intrínsecos aos sistemas de aquicultura intensiva, podem afetar significativamente tanto a persistência quanto a quantificação do eDNA, tornando a relação entre sua concentração e a biomassa de peixes menos direta do que inicialmente previsto.

É imperativo contextualizar nossos resultados no âmbito mais amplo da pesquisa sobre eDNA. A aplicação desta tecnologia para a avaliação quantitativa de biomassa íctica é um campo de estudo relativamente recente, proposto inicialmente por TAKAHARA; MINAMOTO; YAMANAKA; DOI *et al.* (2012) há pouco mais de uma década. Desde então, diversos estudos têm corroborado correlações positivas entre a biomassa de peixes e a concentração de eDNA (MAHON; JERDE; GALASKA; BERGNER *et al.*, 2013; RAMEY; MCKEEMAN; PETROU; MENNING *et al.*, 2024; ROURKE; FOWLER; HUGHES; BROADHURST *et al.*, 2022; TSUJI; INUI; NAKAO; MIYAZONO *et al.*, 2022; YONAGO; KAWAKAMI; KASAI, 2024).

Não obstante, estudos contemporâneos têm elucidado que as concentrações de eDNA, bem como suas taxas de degradação (que envolvem mudanças físicas na molécula de DNA, afetando sua detecção e análise) e de decaimento (que envolvem redução na quantidade detectável) podem ser influenciadas por uma miríade de fatores, incluindo a degradação celular (HARRISON; SUNDAY; ROGERS, 2019); o tamanho dos fragmentos de eDNA (JO; ARIMOTO; MURAKAMI; MASUDA *et al.*, 2020; MARSHALL; VANDERPLOEG; CHAGANTI, 2021); a dieta ofertada aos peixes (KLYMUS; RICHTER; CHAPMAN; PAUKERT, 2015); o tamanho, número e comportamento dos peixes, além das condições hidrográficas, entre outros (FERNANDEZ; GUTIÉRREZ; DECONINCK; MARTINEZ *et al.*, 2023; KARLSSON; OGONOWSKI; SUNDBLAD; SUNDIN *et al.*, 2022; LACOURSIÈRE-ROUSSEL; CÔTÉ; LECLERC; BERNATCHEZ, 2016; PILLIOD; GOLDBERG; ARKLE; WAITS, 2014).

Recentemente, ROURKE; WALBURN; BROADHURST; FOWLER *et al.* (2023), postularam que as relações entre eDNA e biomassa são específicas para cada espécie, refletindo uma variedade de fatores abióticos e bióticos que requerem compreensão adequada. KLYMUS; RICHTER; CHAPMAN e PAUKERT (2015), foram além. Os autores constataram que a quantidade de eDNA liberada variou entre amostras do mesmo indivíduo, com diferenças de 10 a 100 vezes ao longo de seis semanas. Toda essa complexidade levou LI; HAO e DUAN (2020) a concluir que, apesar de seu potencial significativo para aplicações econômicas na estimativa de biomassa de peixes, é preciso reconhecer que a tecnologia do eDNA ainda se encontra em estágios iniciais de desenvolvimento.

No presente estudo, foram particularmente notáveis as correlações significativas observadas entre a concentração de eDNA e diversos parâmetros

ambientais, especialmente o pH, amônia, nitrito e oxigênio dissolvido. EICHMILLER; BEST e SORENSEN (2016) e BEATTIE; HELBING; IMBERY; KLYMUS *et al.* (2023) destacam a influência significativa da carga microbiana, matéria orgânica dissolvida, partículas suspensas e disponibilidade de nutrientes na degradação do eDNA. A abundância bacteriana e o pH estão positivamente relacionados à degradação do eDNA (ZHAO; VAN BODEGOM; TRIMBOS, 2023), interagindo com outros fatores ambientais (LANCE; KLYMUS; RICHTER; GUAN *et al.*, 2017; VAN BOCHOVE; BAKKER; BEENTJES; HEMERIK *et al.*, 2020). O pH influencia ainda a adsorção do eDNA a argilas e ácidos húmicos, principalmente em ambientes ácidos (GOLDBERG; STRICKLER; PILLIOD, 2015). O eDNA persiste mais em soluções alcalinas e se degrada rapidamente em pH ácido devido à hidrólise e à presença de enzimas carregadas positivamente (SEYMOUR; DURANCE; COSBY; RANSOM-JONES *et al.*, 2018; ZULKEFLI; KIM; HWANG, 2019). Já à presença de amônia pode aumentar a meia-vida do eDNA no ambiente, enquanto a presença de comunidades microbianas nitrificantes, que são comuns na maioria nos ambientes de cultivo, podem limitar sua persistência ambiental (BEATTIE; HELBING; IMBERY; KLYMUS *et al.*, 2023). BARNES; TURNER; JERDE; RENSHAW *et al.* (2014) encontraram resultados que classificaram como “surpreendentes”, pois a taxa de degradação do eDNA diminuiu com o aumento da demanda bioquímica de oxigênio, clorofila e concentração total de eDNA.

JONGJARAUNSUK; TAPARHUDEE; SUWANNASING (2024)
JONGJARAUNSUK; TAPARHUDEE e SUWANNASING (2024) aplicaram modelos de aprendizado de máquina para prever parâmetros de qualidade da água em sistemas de recirculação para aquicultura de tilápia vermelha, demonstrando o potencial da inteligência artificial na gestão de sistemas aquícolas complexos. Embora focado na qualidade da água, este estudo tem implicações metodológicas relevantes para nossa investigação sobre o uso do eDNA na estimativa de biomassa. Os autores enfatizaram a importância da seleção de variáveis-chave e modelos preditivos apropriados, o que sugere que uma abordagem similar poderia beneficiar a análise de dados de eDNA em aquicultura intensiva. Técnicas avançadas de aprendizado de máquina poderiam revelar padrões complexos e não-lineares entre eDNA e biomassa de peixes, não evidentes por métodos estatísticos tradicionais. A integração de múltiplos parâmetros ambientais em um modelo preditivo unificado pode oferecer uma abordagem mais robusta para estimativas baseadas em eDNA. NAKAGAWA; FUKUSHIMA; SAKAI;

WU *et al.* (2022), por sua vez, implementaram um modelo de escala alométrica incorporando variáveis como temperatura da água, volume de descarga e massa corporal média para aprimorar a precisão na estimativa da abundância de *Rhynchocypris oxycephalus*. Em contraste, os modelos preditivos desenvolvidos em nossa investigação não demonstraram capacidade de capturar adequadamente as interações complexas características do ambiente dos viveiros de tilápia.

Adicionalmente, nossas conclusões também contrastam com as de LACOURSIÈRE-ROUSSEL; CÔTÉ; LECLERC e BERNATCHEZ (2016), que não identificaram correlações significativas entre as concentrações de eDNA e parâmetros ambientais como temperatura da água, oxigênio dissolvido, pH e turbidez. Estes autores, no entanto, reportaram uma correlação positiva significativa entre o eDNA e a abundância relativa de peixes, enquanto a relação com a biomassa se mostrou menos pronunciada. Estas disparidades nos resultados enfatizam a necessidade premente de desenvolver abordagens metodológicas específicas para diferentes sistemas aquícolas e espécies-alvo na aplicação do eDNA como ferramenta de monitoramento. A heterogeneidade observada nos resultados sugere que a dinâmica do eDNA pode ser altamente dependente do contexto ecológico e das características específicas do sistema estudado, ressaltando a importância de considerar as particularidades de cada ambiente aquático na interpretação e aplicação dos dados de eDNA.

Os viveiros de cultivo de tilápia constituem um ecossistema singular e complexo para a investigação do eDNA, apresentando condições que simultaneamente podem favorecer ou comprometer sua detecção e estabilidade. A reduzida profundidade destes sistemas os expõe à radiação ultravioleta (UV), conhecida por degradar o eDNA, enquanto a elevada turbidez, paradoxalmente, pode proteger o eDNA mas interferir em sua detecção (BOHARA; YADAV; JOSHI, 2022; HOLMES; BAERWALD; RODZEN; SCHREIER *et al.*, 2024; STOECKLE; BEGGEL; CERWENKA; MOTIVANS *et al.*, 2017). A abundância de sedimentos e matéria orgânica proporciona múltiplos sítios de adsorção para o eDNA, potencialmente reduzindo sua biodisponibilidade na coluna d'água (SIVALINGAM; POTÉ; PRABAKAR, 2020). Adicionalmente, a presença de inibidores de PCR, frequentemente associados a ambientes ricos em matéria orgânica, pode comprometer a eficácia da amplificação e detecção do eDNA (KAGEYAMA; HOOGLAND; TAJJIOUI; SCHREIER *et al.*, 2022; KLYMUS; RICHTER; CHAPMAN;

PAUKERT, 2015; STOECKLE; BEGGEL; CERWENKA; MOTIVANS *et al.*, 2017). As práticas de manejo inerentes à aquicultura intensiva, incluindo regimes de alimentação e tratamentos sanitários, podem influenciar significativamente tanto a liberação quanto a detecção do eDNA. Além disso, a diversidade e variabilidade das comunidades microbianas presentes na água e no sedimento, com sua capacidade de sintetizar enzimas degradadoras de DNA, introduzem uma camada adicional de complexidade à dinâmica do eDNA nestes ecossistemas (GOMES; HUTSON; DOMINGOS; VILLAMIL *et al.*, 2019; HUERLIMANN; COOPER; EDMUNDS; VILLACORTA-RATH *et al.*, 2020).

Assim, nossa investigação corrobora e expande os achados de estudos anteriores, como os conduzidos por GOLDBERG; TURNER; DEINER; KLYMUS *et al.* (2016) e HANSEN; JACOBSEN; MIDDELBOE; PRESTON *et al.* (2020), destacando os desafios significativos na utilização do eDNA para monitoramento de biomassa em ambientes de aquicultura. No contexto específico dos viveiros intensivos de tilápia, nossos resultados enfatizam a complexidade adicional imposta pelas condições extremas características desses ambientes.

4.5 CONCLUSÃO E DIREÇÕES FUTURAS

Embora o eDNA tenha demonstrado sensibilidade às mudanças nas condições ambientais, sua correlação direta com a biomassa foi influenciada por múltiplos fatores, como pH, concentrações de amônia, nitrito e oxigênio dissolvido. Essa complexidade limita seu uso como indicador isolado de biomassa em ambientes de produção intensiva. Apesar dos desafios, o potencial do eDNA como ferramenta de monitoramento ambiental é considerável. A combinação com métodos tradicionais e o desenvolvimento de abordagens analíticas mais sofisticadas podem levar a avanços significativos na gestão sustentável da aquicultura intensiva. Neste contexto, nossos resultados sugerem que:

- 1) A dinâmica de produção e degradação do eDNA em viveiros intensivos é mais complexa do que em sistemas naturais, possivelmente devido à maior atividade microbiana e às rápidas e intensas alterações nas condições ambientais.
- 2) A presença de inibidores de PCR em ambientes ricos em matéria orgânica pode comprometer significativamente a eficácia e a confiabilidade das análises de eDNA.

- 3) As práticas de manejo rotineiras da aquicultura podem introduzir variabilidades adicionais na concentração e distribuição do eDNA.

Direções para pesquisas futuras incluem:

- 1) Desenvolvimento de modelos mais complexos, como redes neurais profundas, para modelar a relação entre o eDNA e a biomassa, considerando mais variáveis ambientais e interações ecológicas.
- 2) Integração do eDNA com outras técnicas de monitoramento para uma visão mais completa do ecossistema dos viveiros.
- 3) Elaboração de protocolos específicos e robustos para a aplicação do eDNA em viveiros intensivos, incorporando técnicas de normalização ou correção para os fatores ambientais mais influentes.

Investigação aprofundada sobre como fatores externos afetam a precisão das estimativas de biomassa baseadas em eDNA e desenvolvimento de métodos para controlar esses efeitos em aplicações práticas.

4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARNES, M. A.; TURNER, C. R.; JERDE, C. L.; RENSHAW, M. A. et al. Environmental conditions influence eDNA persistence in aquatic systems. *Environmental science & technology*, 48, n. 3, p. 1819-1827, 2014.

BEATTIE, R. E.; HELBING, C. C.; IMBERY, J. J.; KLYMUS, K. E. et al. A nitrifier-enriched microbial community contributes to the degradation of environmental DNA. *Environmental DNA*, 5, n. 6, p. 1473-1483, 2023.

BEVERIDGE, M. C. Meeting the food and nutrition needs of the poor: the role of fish and the opportunities and challenges emerging from the rise of aquaculture. *Journal of fish biology*, 83, n. 4, p. 1067-1084, 2013.

BJØRNDAL, T.; DEY, M.; TUSVIK, A. Economic analysis of the contributions of aquaculture to future food security. *Aquaculture*, 578, p. 740071, 2024.

BOHARA, K.; YADAV, A. K.; JOSHI, P. Detection of fish pathogens in freshwater aquaculture using eDNA methods. *Diversity*, 14, n. 12, p. 1015, 2022.

CHOUHAN, N.; DEKARI, D.; CHOUDHARY, B.; SINGH, A. et al. Environmental DNA (eDNA) technology: Fisheries and aquaculture perspectives. *Indian J Anim Health*, 62, n. 2, p. 75-85, 2023.

DEANGELIS, M. M.; WANG, D. G.; HAWKINS, T. L. Solid-phase reversible immobilization for the isolation of PCR products. *Nucleic acids research*, 23, n. 22, p. 4742, 1995.

DEINER, K.; BIK, E. A. Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Molecular ecology*, 26, n. 21, p. 5872-5895, 2017.

EICHMILLER, J. J.; BEST, S. A. E.; SORENSEN, P. W. Effects of temperature and trophic state on degradation of environmental DNA in lake water. *Environmental science & technology*, 50, n. 4, p. 1859-1867, 2016.

EL-SAYED, A. F. M.; FITZSIMMONS, K. From Africa to the world—The journey of Nile tilapia. *Reviews in Aquaculture*, 15, p. 6-21, 2023.

FAO. The state of world fisheries and aquaculture. 2018. 2019.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture, 2020. Food & Agriculture Org., 2020. 9251044929.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2024: Blue Transformation in Action. Rome: 2024.

FERNANDEZ, S.; GUTIÉRREZ, Á.; DECONINCK, D.; MARTINEZ, J. L. et al. Biomass quantification of the critically endangered European eel from running waters using environmental DNA. *Fishes*, 8, n. 6, p. 279, 2023.

FUKAYA, K.; MURAKAMI, H.; YOON, S.; MINAMI, K. et al. Estimating fish population abundance by integrating quantitative data on environmental DNA and hydrodynamic modelling. *Molecular Ecology*, 30, n. 13, p. 3057-3067, 2021.

GOLDBERG, C. S.; STRICKLER, K. M.; PILLIOD, D. S. Moving environmental DNA methods from concept to practice for monitoring aquatic macroorganisms. *Biological Conservation*, 183, p. 1-3, 2015.

GOLDBERG, C. S.; TURNER, C. R.; DEINER, K.; KLYMUS, K. E. et al. Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods in ecology and evolution*, 7, n. 11, p. 1299-1307, 2016.

GOMES, G. B.; HUTSON, K. S.; DOMINGOS, J. A.; VILLAMIL, S. I. et al. Parasitic protozoan interactions with bacterial microbiome in a tropical fish farm. *Aquaculture*, 502, p. 196-201, 2019.

HANSEN, B. K.; JACOBSEN, M. W.; MIDDELBOE, A. L.; PRESTON, C. M. et al. Remote, autonomous real-time monitoring of environmental DNA from commercial fish. *Scientific Reports*, 10, n. 1, p. 13272, 2020.

HARRISON, J. B.; SUNDAY, J. M.; ROGERS, S. M. Predicting the fate of eDNA in the environment and implications for studying biodiversity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 286, n. 1915, p. 20191409, 2019.

HOLMES, A. E.; BAERWALD, M. R.; RODZEN, J.; SCHREIER, B. M. et al. Evaluating environmental DNA detection of a rare fish in turbid water using field and experimental approaches. *PeerJ*, 12, p. e16453, 2024.

HUERLIMANN, R.; COOPER, M. K.; EDMUNDS, R. C.; VILLACORTA-RATH, C. et al. Enhancing tropical conservation and ecology research with aquatic environmental DNA methods: an introduction for non-environmental DNA specialists. *Animal Conservation*, 23, n. 6, p. 632-645, 2020.

JO, T.; ARIMOTO, M.; MURAKAMI, H.; MASUDA, R. et al. Estimating shedding and decay rates of environmental nuclear DNA with relation to water temperature and biomass. *Environmental DNA*, 2, n. 2, p. 140-151, 2020.

JONGJARAUNSUK, R.; TAPARHUDEE, W.; SUWANNASING, P. Comparison of Water Quality Prediction for Red Tilapia Aquaculture in an Outdoor Recirculation System Using Deep Learning and a Hybrid Model. *Water*, 16, n. 6, p. 907, 2024.

KAGEYAMA, S. A.; HOOGLAND, M. R.; TAJJIOUI, T.; SCHREIER, T. M. et al. Validation of a portable eDNA detection kit for invasive carps. *Fishes*, 7, n. 6, p. 363, 2022.

KARLSSON, E.; OGONOWSKI, M.; SUNDBLAD, G.; SUNDIN, J. et al. Strong positive relationships between eDNA concentrations and biomass in juvenile and adult pike (*Esox lucius*) under controlled conditions: Implications for monitoring. *Environmental DNA*, 4, n. 4, p. 881-893, 2022.

KLYMUS, K. E.; RICHTER, C. A.; CHAPMAN, D. C.; PAUKERT, C. Quantification of eDNA shedding rates from invasive bighead carp *Hypophthalmichthys nobilis* and silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*. *Biological conservation*, 183, p. 77-84, 2015.

LACOURSIÈRE-ROUSSEL, A.; CÔTÉ, G.; LECLERC, V.; BERNATCHEZ, L. Quantifying relative fish abundance with eDNA: a promising tool for fisheries management. *Journal of Applied Ecology*, 53, n. 4, p. 1148-1157, 2016.

LANCE, R. F.; KLYMUS, K. E.; RICHTER, C. A.; GUAN, X. et al. Experimental observations on the decay of environmental DNA from bighead and silver carps. *Management of Biological Invasions*, 8, n. 3, 2017.

LI, D.; HAO, Y.; DUAN, Y. Nonintrusive methods for biomass estimation in aquaculture with emphasis on fish: a review. *Reviews in Aquaculture*, 12, n. 3, p. 1390-1411, 2020.

LUSTOSA-NETO, A. D. A indústria de produtos derivados da pesca e aquicultura. *Acta of Fisheries and Aquatic Resources*, 6, n. 2, p. 28-48, 2018.

MAHON, A. R.; JERDE, C. L.; GALASKA, M.; BERGNER, J. L. et al. Validation of eDNA surveillance sensitivity for detection of Asian carps in controlled and field experiments. *PloS one*, 8, n. 3, p. e58316, 2013.

MARSHALL, N. T.; VANDERPLOEG, H. A.; CHAGANTI, S. R. Environmental (e) RNA advances the reliability of eDNA by predicting its age. *Scientific reports*, 11, n. 1, p. 2769, 2021.

MARTINELL, D. P. What is aquaculture? In: *An Introduction to Sustainable Aquaculture*: Routledge, 2024. p. 8-23.

NAKAGAWA, H.; FUKUSHIMA, K.; SAKAI, M.; WU, L. et al. Relationships between the eDNA concentration obtained from metabarcoding and stream fish abundance

estimated by the removal method under field conditions. *Environmental DNA*, 4, n. 6, p. 1369-1380, 2022.

NOBLE, T. H.; ROBSON, H. L. A.; SAUNDERS, R. J.; JERRY, D. R. The utility of eDNA as a tilapia surveillance tool. Queensland, Australia: 2015.

PASHA, M.; RAGHAVENDRA, C.; NIRANJANAMURTHY, M. Comparative Analysis of Biomass Estimation Methods in Aquaculture: A Review. *Journal of Survey in Fisheries Sciences*, p. 01-09, 2024.

PIE, M. R.; STRÖHER, P. R.; AGOSTINIS, A. O.; BELMONTE-LOPES, 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*, 89, p. 1041-1045, 2017.

PILLIOD, D. S.; GOLDBERG, C. S.; ARKLE, R. S.; WAITS, L. P. Factors influencing detection of eDNA from a stream-dwelling amphibian. *Molecular Ecology Resources*, 14, n. 1, p. 109-116, 2014.

RAMEY, A. M.; MCKEEMAN, C. M.; PETROU, E. L.; MENNING, D. M. et al. Environmental DNA as a Tool for Better Understanding the Distribution, Abundance, And Health of Atlantic Salmon and Pacific Salmon. *Fisheries*, 49, n. 4, p. 169-180, 2024.

RIEDER, J. M. The application of environmental DNA (eDNA) methods for the monitoring and detection of aquatic microorganisms in aquaculture. 2023. -, Universität Bern.

RIVERA, S. F.; RIMET, F.; VASSELON, V.; VAUTIER, M. et al. Fish eDNA metabarcoding from aquatic biofilm samples: Methodological aspects. *Molecular Ecology Resources*, 22, n. 4, p. 1440-1453, 2022.

ROURKE, M. L.; FOWLER, A. M.; HUGHES, J. M.; BROADHURST, M. K. et al. Environmental DNA (eDNA) as a tool for assessing fish biomass: A review of approaches and future considerations for resource surveys. *Environmental DNA*, 4, n. 1, p. 9-33, 2022.

ROURKE, M. L.; WALBURN, J. W.; BROADHURST, M. K.; FOWLER, A. M. et al. Poor utility of environmental DNA for estimating the biomass of a threatened freshwater teleost; but clear direction for future candidate assessments. *Fisheries research*, 258, p. 106545, 2023.

SEYMOUR, M.; DURANCE, I.; COSBY, B. J.; RANSOM-JONES, E. et al. Acidity promotes degradation of multi-species environmental DNA in lotic mesocosms. *Communications biology*, 1, n. 1, p. 4, 2018.

SIVALINGAM, P.; POTÉ, J.; PRABAKAR, K. Extracellular DNA (eDNA): Neglected and Potential Sources of Antibiotic Resistant Genes (ARGs) in the Aquatic Environments. *Pathogens*, 9, n. 11, p. 874, 2020.

STEWART, K. A. Understanding the effects of biotic and abiotic factors on sources of aquatic environmental DNA. *Biodiversity and Conservation*, 28, n. 5, p. 983-1001, 2019.

STOECKLE, B. C.; BEGGEL, S.; CERWENKA, A. F.; MOTIVANS, E. et al. A systematic approach to evaluate the influence of environmental conditions on eDNA detection success in aquatic ecosystems. *PLoS One*, 12, n. 12, p. e0189119, 2017.

TAKAHARA, T.; MINAMOTO, T.; YAMANAKA, H.; DOI, H. et al. Estimation of fish biomass using environmental DNA. *PloS one*, 7, n. 4, p. e35868, 2012.

THOMSEN, P. F. Environmental DNA—An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological conservation*, 183, p. 4-18, 2015.

TROELL, E. A. Does aquaculture add resilience to the global food system? *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111, n. 37, p. 13257-13263, 2014.

TSUJI, S.; INUI, R.; NAKAO, R.; MIYAZONO, S. et al. Quantitative environmental DNA metabarcoding shows high potential as a novel approach to quantitatively assess fish community. *Scientific Reports*, 12, n. 1, p. 21524, 2022.

VAN BOCHOVE, K.; BAKKER, F. T.; BEENTJES, K. K.; HEMERIK, L. et al. Organic matter reduces the amount of detectable environmental DNA in freshwater. *Ecology and Evolution*, 10, n. 8, p. 3647-3654, 2020.

YONAGO, T.; KAWAKAMI, T.; KASAI, A. Linkage between spatiotemporal distribution of environmental DNA and phenological activity in an amphidromous fish, ayu *Plecoglossus altivelis altivelis*, in a river located in its northernmost distributional area. *Journal of Fish Biology*, 104, n. 5, p. 1468-1482, 2024.

ZHAO, B.; VAN BODEGOM, P. M.; TRIMBOS, K. B. Bacterial abundance and pH associate with eDNA degradation in water from various aquatic ecosystems in a laboratory setting. *Frontiers in Environmental Science*, 11, p. 1025105, 2023.

ZULKEFLI, N. S.; KIM, K.-H.; HWANG, S.-J. Effects of microbial activity and environmental parameters on the degradation of extracellular environmental DNA from a eutrophic lake. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16, n. 18, p. 3339, 2019.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pesquisa aqui apresentada buscou responder à seguinte questão: "Como o DNA ambiental (eDNA) pode ser utilizado para estimar a biomassa de peixes de maneira não invasiva e eficiente em diferentes sistemas aquáticos?". Os resultados obtidos demonstram o potencial do eDNA como um biomarcador promissor para o monitoramento da biomassa de peixes, mas também revelam a complexidade da técnica e a necessidade de refinamentos metodológicos.

Os objetivos principais foram: (1) Revisar sistematicamente o estado da arte sobre as técnicas de eDNA e suas limitações; (2) Avaliar experimentalmente a relação entre a biomassa de peixes e a concentração de eDNA em condições controladas de mesocosmos; e (3) Investigar a aplicabilidade da técnica em viveiros comerciais de tilápia-do-Nilo.

Os principais resultados deste estudo confirmam a viabilidade do uso de eDNA para estimativa de biomassa em ambientes aquáticos, mas também indicam a necessidade de refinamentos metodológicos. No primeiro capítulo, a revisão sistemática mostrou que, embora a técnica de eDNA tenha grande potencial, diversos fatores ambientais e de manejo influenciam sua eficácia, como o volume de água e a degradação do DNA, o que demanda padronização de protocolos.

No segundo capítulo, o estudo em mesocosmos revelou que a concentração de eDNA é influenciada por fatores como o volume de água e a fase de liberação e degradação do DNA. Embora tenha sido possível detectar uma correlação positiva entre a biomassa de peixes e a concentração de eDNA, a relação foi complexa e dependente do contexto experimental. Em volumes menores, a concentração de eDNA foi mais consistente, enquanto em volumes maiores a diluição afetou a detecção de DNA.

O terceiro capítulo demonstrou que, em viveiros comerciais, o eDNA apresentou correlações com parâmetros ambientais como pH, amônia e oxigênio dissolvido. No entanto, os modelos preditivos empregados (Random Forest e Gradient Boosting) falharam em prever com precisão as concentrações de eDNA, sugerindo a necessidade de abordagens mais sofisticadas para capturar interações não lineares entre as variáveis.

Os resultados contribuem significativamente para o avanço das teorias sobre monitoramento ambiental e estimativa de biomassa em ecossistemas aquáticos. Eles ressaltam a importância de se considerar as interações complexas entre fatores

ambientais e biológicos que influenciam a dinâmica do eDNA. Este estudo complementa a literatura existente, corroborando com achados que indicam que o eDNA pode ser um indicador valioso de biomassa, especialmente em sistemas controlados como mesocosmos, e amplia o entendimento sobre suas limitações em sistemas comerciais.

Do ponto de vista prático, a aplicação do eDNA em aquicultura, conforme demonstrado neste estudo, tem potencial para revolucionar o monitoramento da biomassa de peixes, promovendo práticas mais sustentáveis. No entanto, para que a técnica seja amplamente aplicada em viveiros comerciais, é necessário refinar as metodologias de coleta, concentração e análise do eDNA, além de desenvolver modelos preditivos mais robustos. Isso pode ter um impacto significativo no manejo sustentável da produção aquícola, permitindo um monitoramento mais preciso e menos invasivo.

Este estudo apresentou algumas limitações que merecem ser destacadas. A primeira delas diz respeito ao impacto do volume de água na detecção de eDNA, o que foi particularmente evidente em volumes maiores, onde a diluição afetou a correlação entre a concentração de DNA e a biomassa. Além disso, os modelos preditivos testados não foram capazes de capturar completamente a variabilidade dos dados de eDNA, indicando a necessidade de abordagens analíticas mais complexas. Finalmente, fatores ambientais, como o pH e a presença de inibidores de PCR, também influenciaram a precisão das estimativas de biomassa, destacando a importância de controles rigorosos desses parâmetros em futuros estudos.

Pesquisas futuras devem focar no desenvolvimento de técnicas que aumentem a sensibilidade da detecção de eDNA, especialmente em grandes volumes de água. Estudos adicionais sobre a interação entre fatores ambientais e a dinâmica do eDNA também são essenciais. Além disso, é recomendável explorar modelos de aprendizado de máquina mais avançados para melhorar a capacidade preditiva das concentrações de eDNA em diferentes condições ambientais.

Esta tese representa uma contribuição significativa para o campo de estudo do DNA ambiental e sua aplicação no monitoramento de biomassa de peixes. Os resultados obtidos não apenas reforçam o potencial do eDNA como uma ferramenta de monitoramento ambiental, mas também elucidam as limitações e desafios técnicos que devem ser superados para que essa técnica se torne amplamente aplicável em diferentes contextos.

O desenvolvimento de protocolos padronizados para coleta e análise de eDNA, bem como a consideração das variáveis ambientais que influenciam sua detecção, são passos cruciais para que o eDNA seja eficazmente utilizado na aquicultura e em outros campos da ecologia aquática. Em última análise, este estudo contribui para o avanço do conhecimento e oferece direções claras para a melhoria das práticas de monitoramento ambiental.

6 REFERÊNCIAS GERAIS

_____. Cultured aquatic species information programme, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2021.

_____. Degradation modeling of water environmental DNA: Experiments on multiple DNA sources in pond and seawater. *Environmental DNA*, v. 3, n. 4, p. 850-860, 2021. ISSN 2637-4943.

_____. *The State of World Fisheries and Aquaculture, 2020*. Food & Agriculture Org., 2020. ISBN 9251044929.

ABATO, J. Monitoring *Chrysaora hysoscella* (Cnidaria, Scyphozoa) in the Belgian part of the North Sea using eDNA. 2010. 110 f. (Master's Dissertation) - Environmental Sanitation, Ghent University.

ABILEVA, G. et al. Environmental DNA reveals the ecology and seasonal migration of a rare sturgeon species in the Ural River. *Environmental DNA*, v. 6, n. 2, p. e535, 2024. ISSN 2637-4943.

ALZAYLAEE, H.; COLLINS, R. A.; SHECHONGE, A.; NGATUNGA, B. P. et al. Environmental DNA-based xenomonitoring for determining *Schistosoma* presence in tropical freshwaters. *Parasites & vectors*, 13, n. 1, p. 1-11, 2020.

AMARASIRI, M.; FURUKAWA, T.; NAKAJIMA, F.; SEI, K. Pathogens and disease vectors/hosts monitoring in aquatic environments: Potential of using eDNA/eRNA based approach. *Science of the Total Environment*, 796, p. 148810, 2021.

AMBARDAR, S. et al. High throughput sequencing: an overview of sequencing chemistry. *Indian journal of microbiology*, v. 56, p. 394-404, 2016. ISSN 0046-8991.

ANDRES, K. J.; LODGE, D. M.; ANDRÉS, J. Environmental DNA reveals the genetic diversity and population structure of an invasive species in the Laurentian Great Lakes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120, n. 37, p. e2307345120, 2023.

ANDRES, K. J.; LODGE, D. M.; SETHI, S. A.; ANDRÉS, J. Detecting and analysing intraspecific genetic variation with eDNA: From population genetics to species abundance. *Molecular Ecology*, 2023.

ANDRUSZKIEWICZ ALLAN, E. et al. Environmental DNA shedding and decay rates from diverse animal forms and thermal regimes. *Wiley Online Library*, v. 3, n. 2, p. 492-514, 2020/3// 2020. Available at: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/edn3.141> >.

ANDRUSZKIEWICZ, E. *Environmental DNA as a Biomonitoring Tool: Investigating Persistence and Transport of eDNA in Marine Water*. 2019.

ANDRUSZKIEWICZ, E. *Environmental DNA as a Biomonitoring Tool: Investigating Persistence and Transport of eDNA in Marine Water*. 2019.

ATTEIA, A.; BEC, B.; GIANAROLI, C.; SERAIS, O. et al. Evaluation of sequential filtration and centrifugation to capture environmental DNA and survey microbial

eukaryotic communities in aquatic environments. *Molecular Ecology Resources*, 24, n. 1, p. e13887, 2024.

BACON, P. J.; YOUNGSON, A. The application of electro-fishing to produce census estimates of juvenile salmonid populations within defined areas: taking stock of the options. Fisheries Research Services, Marine Laboratory, 2007.

BAKER, C. S.; CLARIDGE, D.; DUNN, C.; FETHERSTON, T. et al. Quantification by droplet digital PCR and species identification by metabarcoding of environmental (e) DNA from Blainville's beaked whales, with assisted localization from an acoustic array. *Plos one*, 18, n. 9, p. e0291187, 2023.

BALDIGO, B. P.; SPORN, L. A.; GEORGE, S. D.; BALL, J. A. Efficacy of environmental DNA to detect and quantify brook trout populations in headwater streams of the Adirondack Mountains, New York. *Transactions of the American Fisheries Society*, 146, n. 1, p. 99-111, 2017.

BARNES, M. A. et al. Environmental conditions influence eDNA particle size distribution in aquatic systems. *Environmental DNA*, v. 3, n. 3, p. 643-653, 2021. ISSN 2637-4943.

BARNES, M. A. et al. Environmental conditions influence eDNA persistence in aquatic systems. *Environmental science & technology*, v. 48, n. 3, p. 1819-1827, 2014. ISSN 0013-936X.

BARNES, M. A.; TURNER, C. R. The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conservation Genetics*, v. 17, n. 1, p. 1-17, 2016. ISSN 1566-0621.

BASS, D.; CHRISTISON, K. W.; STENTIFORD, G. D.; COOK, L. S. et al. Environmental DNA/RNA for pathogen and parasite detection, surveillance, and ecology. *Trends in Parasitology*, 2023.

BASS, D.; STENTIFORD, G. D.; LITTLEWOOD, D.; HARTIKAINEN, H. Diverse applications of environmental DNA methods in parasitology. *Trends in parasitology*, 31, n. 10, p. 499-513, 2015.

BEATTIE, R. E.; HELBING, C. C.; IMBERY, J. J.; KLYMUS, K. E. et al. A nitrifier-enriched microbial community contributes to the degradation of environmental DNA. *Environmental DNA*, 5, n. 6, p. 1473-1483, 2023.

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

BENOIT, N. P. et al. Using qPCR of environmental DNA (eDNA) to estimate the biomass of juvenile Pacific salmon (*Oncorhynchus* spp.). *Environmental DNA*, 2023. ISSN 2637-4943.

BERGSON, S. Abundance, transportation, and preservation of *Mysis diluviana* eDNA in freshwater ecosystems. 2021.

BEVERIDGE, M. C. Meeting the food and nutrition needs of the poor: the role of fish and the opportunities and challenges emerging from the rise of aquaculture. *Journal of fish biology*, 83, n. 4, p. 1067-1084, 2013.

BIRO, P. A.; DINGEMANSE, N. J. Sampling bias resulting from animal personality. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 24, n. 2, p. 66-67, 2009. ISSN 0169-5347.

BJØRNDAL, T.; DEY, M.; TUSVIK, A. Economic analysis of the contributions of aquaculture to future food security. *Aquaculture*, 578, p. 740071, 2024.

BOEGER, W. A.; PIE, M. R.; FALLEIROS, R. M.; OSTRENSKY, A. et al. Testing a molecular protocol to monitor the presence of golden mussel larvae (*Limnoperna fortunei*) in plankton samples. *Journal of Plankton Research*, 29, n. 11, p. 1015-1019, 2007.

BOHARA, K.; YADAV, A. K.; JOSHI, P. Detection of fish pathogens in freshwater aquaculture using eDNA methods. *Diversity*, 14, n. 12, p. 1015, 2022.

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.

BOIVIN-DELISLE, D.; LAPORTE, M.; BURTON, F.; DION, R. et al. Using environmental DNA for biomonitoring of freshwater fish communities: Comparison with established gillnet surveys in a boreal hydroelectric impoundment. *Environmental DNA*, 3, p. 105-120, 2021.

BONAR, S. A.; HUBERT, W. A.; WILLIS, D. W. Standard methods for sampling North American freshwater fishes. 2009.

BRADLEY, D. L.; MOREY, K. C.; BOURQUE, D. A.; FOST, B. et al. Environmental DNA detection and abundance estimates comparable to conventional methods for three freshwater larval species at a power plant discharge. *Environmental DNA*, 4, n. 3, p. 700-714, 2022.

BRANDÃO-DIAS, P. F.; HALLACK, D. M.; SNYDER, E. D.; TANK, J. L. et al. Particle size influences decay rates of environmental DNA in aquatic systems. *Molecular Ecology Resources*, 23, n. 4, p. 756-770, 2023.

BRONSTEIN, O.; KROH, A.; HARING, E. Mind the gap! The mitochondrial control region and its power as a phylogenetic marker in echinoids. *BMC evolutionary biology*, 18, n. 1, p. 1-15, 2018.

BROWN, C.; DOREY, C. Pain and Emotion in Fishes—Fish welfare implications for fisheries and aquaculture. *Animal Studies Journal*, v. 8, n. 2, p. 175-201, 2019. ISSN 2201-3008.

BRYNS, R.; HALFMAERTEN, D.; NEYRINCK, S.; MAUVISSEAU, Q. et al. Reliable eDNA detection and quantification of the European weather loach (*Misgurnus fossilis*). *Journal of Fish Biology*, 98, n. 2, p. 399-414, 2020.

- BURIAN, A.; MAUVISSEAU, Q.; BULLING, M.; DOMISCH, S. et al. Improving the reliability of eDNA data interpretation. *Molecular Ecology Resources*, 21, n. 5, p. 1422-1433, 2021.
- BYLEMANS, J.; FURLAN, E. M.; GLEESON, D. M.; HARDY, C. M. et al. Does size matter? An experimental evaluation of the relative abundance and decay rates of aquatic environmental DNA. *Environmental Science & Technology*, 52, n. 11, p. 6408-6416, 2018.
- BYLEMANS, J.; GLEESON, D. M.; HARDY, C. M.; FURLAN, E. Toward an ecoregion scale evaluation of eDNA metabarcoding primers: A case study for the freshwater fish biodiversity of the Murray–Darling Basin (Australia). *Ecology and evolution*, 8, n. 17, p. 8697-8712, 2018.
- CANALS, O.; MENDIBIL, I.; SANTOS, M.; IRIGOIEN, X. et al. Vertical stratification of environmental DNA in the open ocean captures ecological patterns and behavior of deep-sea fishes. *Limnology and Oceanography Letters*, 6, n. 6, p. 339-347, 2021.
- CAO, J. et al. A novel spatiotemporal stock assessment framework to better address fine-scale species distributions: development and simulation testing. *Fish and Fisheries*, v. 21, n. 2, p. 350-367, 2020. ISSN 1467-2960.
- CAO, Y. et al. Sampling the central channel provides additional information on fish assemblages in a large Boatable River in the US Midwest. *Journal of Fish and Wildlife Management*, v. 10, n. 2, p. 432-441, 2019. ISSN 1944-687X.
- CAO, Y.; GRIFFITH, J. F.; WEISBERG, S. B. The next-generation PCR-based quantification method for ambient waters: Digital PCR. In: BOURLAT S (Ed.). *Marine Genomics: Methods and Protocols* New York: Springer, 2016. p. 113-130.
- CAPO, E.; SPONG, G.; KÖNIGSSON, H.; BYSTRÖM, P. Effects of filtration methods and water volume on the quantification of brown trout (*Salmo trutta*) and Arctic char (*Salvelinus alpinus*) eDNA concentrations via droplet digital PCR. *Environmental DNA*, 2, n. 2, p. 152-160, 2020.
- CAPO, E.; SPONG, G.; NORMAN, S.; KÖNIGSSON, H. et al. Droplet digital PCR assays for the quantification of brown trout (*Salmo trutta*) and Arctic char (*Salvelinus alpinus*) from environmental DNA collected in the water of mountain lakes. *PLoS One*, 14, n. 12, p. e0226638, 2019.
- CARRARO, L.; STAUFFER, J. B.; ALTERMATT, F. How to design optimal eDNA sampling strategies for biomonitoring in river networks. *Environmental DNA*, 3, n. 1, p. 157-172, 2021.
- CAZA-ALLARD, I. et al. Effect of biotic and abiotic factors on the production and degradation of fish environmental DNA: An experimental evaluation. *Environmental DNA*, v. 4, n. 2, p. 453-468, 2022. ISSN 2637-4943.
- CHEN, X. et al. Passive eDNA sampling facilitates biodiversity monitoring and rare species detection. *Environment International*, v. 187, p. 108706, 2024. ISSN 0160-4120.

CHEN, X.; LIU, B.; FANG, Z. Fish Stocks and Discriminant Methods. *Biology of Fishery Resources*, p. 9-53, 2022. ISSN 9811669473.

CHENG, R.; LUO, Y.; ZHANG, Y.; LI, Q. et al. eDNA metabarcoding reveals differences in fish diversity and community structure in heterogeneous habitat areas shaped by cascade hydropower. *Ecology and Evolution*, 13, n. 7, p. e10275, 2023.

CHESNEY, E. J.; BALTZ, D. M.; THOMAS, R. G. Louisiana estuarine and coastal fisheries and habitats: perspectives from a fish's eye view. *Ecological Applications*, v. 10, n. 2, p. 350-366, 2000. ISSN 1939-5582.

CHIMIANTI, G.; DI NISIO, A.; LANZOLLA, A. M.; ANDRIA, G. et al. Towards non-invasive methods to assess population structure and biomass in vulnerable sea pen fields. *Sensors*, 19, n. 10, p. 2255, 2019.

CHOUHAN, N.; DEKARI, D.; CHOUDHARY, B.; SINGH, A. et al. Environmental DNA (eDNA) technology: Fisheries and aquaculture perspectives. *Indian J Anim Health*, 62, n. 2, p. 75-85, 2023.

COLLINS, R. A. et al. Reproduction influences seasonal eDNA variation in a temperate marine fish community. *Limnology and Oceanography Letters*, v. 7, n. 5, p. 443-449, 2022. ISSN 2378-2242.

COUTANT, O.; CANTERA, I.; CILLEROS, K.; DEJEAN, T. et al. Detecting fish assemblages with environmental DNA: Does protocol matter? Testing eDNA metabarcoding method robustness. *Environmental DNA*, 3, n. 3, p. 619-630, 2021.

COWART, D. A.; MURPHY, K. R.; CHENG, C.-H. C. Environmental DNA from Marine Waters and Substrates: Protocols for Sampling and eDNA Extraction. In: *Marine Genomics: Methods and Protocols*: Springer, 2022. p. 225-251.

COYNE, D. J. Comparison of standard and environmental DNA methods for estimating Chinook salmon smolt abundance in the Klamath River, California. 2021.

DANZIGER, A. M.; FREDERICH, M. Challenges in eDNA detection of the invasive European green crab, *Carcinus maenas*. *Biological Invasions*, v. 24, n. 6, p. 1881-1894, 2022. ISSN 1387-3547.

DAVISON, P. I.; COPP, G. H.; CRÉACH, V.; VILIZZI, L. et al. Application of environmental DNA analysis to inform invasive fish eradication operations. *The Science of Nature*, 104, p. 1-7, 2017.

DE BRAUWER, M.; CLARKE, L. J.; CHARITON, A.; COOPER, M. K. et al. Best practice guidelines for environmental DNA biomonitoring in Australia and New Zealand. *Environmental DNA*, 2023.

DE GUZMÁN MARTÍNEZ, M. I. et al. Food-web energy fluxes, energy transfer efficiency, and diversity respond distinctively to pollution and water diversion in rivers. 2024. ISSN 0046-5070.

DE SOUSA, L. L.; SILVA, S. M.; XAVIER, R. DNA metabarcoding in diet studies: Unveiling ecological aspects in aquatic and terrestrial ecosystems. *Environmental DNA*, 1, n. 3, p. 199-214, 2019.

DEANGELIS, M. M.; WANG, D. G.; HAWKINS, T. L. Solid-phase reversible immobilization for the isolation of PCR products. *Nucleic acids research*, 23, n. 22, p. 4742, 1995.

DEHART, H. M.; GASSER, M. T.; DIXON, J.; THIELEN, P. An aquatic environmental DNA filtration system to maximize recovery potential and promote filtration approach standardization. *PeerJ*, 11, p. e15360, 2023.

DEINER, K.; BIK, E. A. Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Molecular ecology*, v. 26, n. 21, p. 5872-5895, 2017. ISSN 0962-1083.

DEINER, K.; LOPEZ, J.; BOURNE, S.; HOLMAN, L. E. 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*, 2, p. e28963, 2018.

DEJEAN, T. et al. Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding: the example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus*. *Journal of applied ecology*, v. 49, n. 4, p. 953-959, 2012. ISSN 0021-8901.

DEVINE, M. T. Juvenile river herring in freshwater lakes: sampling approaches for evaluating growth and survival. 2017.

DI MURI, C. et al. Read counts from environmental DNA (eDNA) metabarcoding reflect fish abundance and biomass in drained ponds. *bioRxiv*, p. 2020.07. 29.226845, 2020.

DÍAZ-FERGUSON, E. E.; MOYER, G. R. History, applications, methodological issues and perspectives for the use environmental DNA (eDNA) in marine and freshwater environments. *Revista de biologia tropical*, 62, n. 4, p. 1273-1284, 2014.

DINGLE, T. C.; SEDLAK, R. H.; COOK, L.; JEROME, K. R. Tolerance of droplet-digital PCR vs real-time quantitative PCR to inhibitory substances. *Clinical chemistry*, 59, n. 11, p. 1670-1672, 2013.

DJURHUUS, A. et al. Evaluation of marine zooplankton community structure through environmental DNA metabarcoding. *Limnology and Oceanography: Methods*, v. 16, n. 4, p. 209-221, 2018. ISSN 1541-5856.

DJURHUUS, A.; PORT, J.; CLOSEK, C. J.; YAMAHARA, K. M. et al. Evaluation of filtration and DNA extraction methods for environmental DNA biodiversity assessments across multiple trophic levels. *Frontiers in Marine Science*, 4, p. 314, 2017.

DOI, H.; NAKAMURA, K. Environmental DNA as a practical tool for aquatic conservation and restoration. *Landscape and Ecological Engineering*, p. 1-2, 2022. ISSN 1860-1871.

DOUCHET, P.; BOISSIER, J.; MULERO, S.; FERTÉ, H. et al. Make visible the invisible: Optimized development of an environmental DNA metabarcoding tool for the characterization of trematode parasitic communities. *environmental DNA*, 4, n. 3, p. 627-641, 2022.

DUBREUIL, T.; BAUDRY, T.; MAUVISSEAU, Q.; ARQUÉ, A. et al. The development of early monitoring tools to detect aquatic invasive species: eDNA assay development and the case of the armored catfish *Hypostomus robinii*. *Environmental DNA*, 4, n. 2, p. 349-362, 2022.

DURANT, J. M.; HOLT, R. E.; LANGANGEN, Ø. Large biomass reduction effect on the relative role of climate, fishing, and recruitment on fish population dynamics. *Scientific Reports*, v. 14, n. 1, p. 8995, 2024. ISSN 2045-2322.

EICHMILLER, J. J.; BEST, S. A. E.; SORENSEN, P. W. Effects of temperature and trophic state on degradation of environmental DNA in lake water. *Environmental science & technology*, 50, n. 4, p. 1859-1867, 2016.

EICHMILLER, J. J.; MILLER, L. M.; SORENSEN, P. W. Optimizing techniques to capture and extract environmental DNA for detection and quantification of fish. *Molecular ecology resources*, 16, n. 1, p. 56-68, 2016.

ELBRECHT, V. et al. Testing the potential of a ribosomal 16S marker for DNA metabarcoding of insects. *PeerJ*, v. 4, p. e1966, 2016. ISSN 2167-8359.

EL-SAYED, A. F. M.; FITZSIMMONS, K. From Africa to the world—The journey of Nile tilapia. *Reviews in Aquaculture*, 15, p. 6-21, 2023.

ELUMALAI, M.; IPATOV, A.; GUERREIRO, J.; PRADO, M. Automated lab-on-chip for the specific detection of invasive species through environmental DNA. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 398, p. 134722, 2024.

EVERHART, R.; ROBERT EVERHART, B. C.; BELINDA M STURM, C. S.; DONALD HUGGINS, C.-C. G. et al. Fate and Transport of Vertebrate DNA in Surface Water Environments: Developing a Basis for Quantification through Environmental DNA Monitoring. 2015.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2024: Blue Transformation in Action. Rome: 2024.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture, 2020. Food & Agriculture Org., 2020. 9251044929.

FAO. The state of world fisheries and aquaculture. 2018. 2019.

FATIMA, N.; SHUAIB, S. E.; KONG, J. D. Predicting adaptations of fish and fishing communities to rapid climate velocities in Canadian waters: A systematic review. *Environmental Advances*, v. 14, p. 100452, 2023/12/01/ 2023. ISSN 2666-7657. Available at: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666765723001102> >.

- FAUSCH, K. D. et al. Fish communities as indicators of environmental degradation. American fisheries society symposium, 1990, Bethesda. p.123-144.
- FEIST, S. M.; LANCE, R. F. Genetic detection of freshwater harmful algal blooms: a review focused on the use of environmental DNA (eDNA) in *Microcystis aeruginosa* and *Prymnesium parvum*. *Harmful Algae*, 110, p. 102124, 2021.
- FENG, Y.; LI, W.; LI, J.; WANG, J. et al. Structural insight into the type-II mitochondrial NADH dehydrogenases. *Nature*, 491, n. 7424, p. 478-482, Nov 15 2012.
- FERNANDEZ, S.; GUTIÉRREZ, Á.; DECONINCK, D.; MARTINEZ, J. L. et al. Biomass quantification of the critically endangered European eel from running waters using environmental DNA. *Fishes*, 8, n. 6, p. 279, 2023.
- FICETOLA, G. F. et al. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology letters*, v. 4, n. 4, p. 423-425, 2008. ISSN 1744-9561.
- FIELDS, B.; MOESKJAER, S.; FRIMAN, V. P.; ANDERSEN, S. U. et al. MAUI-seq: Metabarcoding using amplicons with unique molecular identifiers to improve error correction. *Mol Ecol Resour*, 21, n. 3, p. 703-720, Apr 2021.
- FONSECA, V. G.; DAVISON, P. I.; CREACH, V.; STONE, D. et al. The Application of eDNA for Monitoring Aquatic Non-Indigenous Species: Practical and Policy Considerations. *Diversity*, 15, n. 5, p. 631, 2023.
- FOOTE, A. D. et al. Investigating the potential use of environmental DNA (eDNA) for genetic monitoring of marine mammals. 2012. ISSN 1932-6203.
- FOSSØY, F.; BRANDSEGG, H.; SIVERTSGÅRD, R.; PETTERSEN, O. et al. Monitoring presence and abundance of two gyrodactylid ectoparasites and their salmonid hosts using environmental DNA. *Environmental DNA*, 2, n. 1, p. 53-62, 2020.
- FRANÇA, S.; CABRAL, H. N. Distribution models of estuarine fish species: The effect of sampling bias, species ecology and threshold selection on models' accuracy. *Ecological Informatics*, v. 51, p. 168-176, 2019. ISSN 1574-9541.
- FU'ADIL AMIN, M. H.; LEE, J.-H.; KIM, A. R.; KIM, J.-K. et al. Development of a Quantitative PCR Assay for Four Salmon Species Inhabiting the Yangyangnamdae River Using Environmental DNA. *Biology*, 10, n. 9, p. 899, 2021.
- FUKAYA, K.; MURAKAMI, H.; YOON, S.; MINAMI, K. et al. Estimating fish population abundance by integrating quantitative data on environmental DNA and hydrodynamic modelling. *Molecular Ecology*, 30, n. 13, p. 3057-3067, 2021.
- GEORGE, S. D.; BALDIGO, B. P.; REES, C. B.; BARTRON, M. L. et al. Use of environmental DNA to assess American Eel distribution, abundance, and barriers in a river–canal system. *Transactions of the American Fisheries Society*, 2023.
- GOLDBERG, C. S.; STRICKLER, K. M.; PILLIOD, D. S. Moving environmental DNA methods from concept to practice for monitoring aquatic macroorganisms. *Biological Conservation*, v. 183, p. 1-3, 2015. ISSN 0006-3207.

GOLDBERG, C. S.; TURNER, C. R.; DEINER, K.; KLYMUS, K. E. et al. Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods in ecology and evolution*, 7, n. 11, p. 1299-1307, 2016.

GOLI, R. C.; SUKHIJA, N.; RATHI, P.; CHISHI, K. G. et al. Unraveling the genetic tapestry of Indian chicken: A comprehensive study of molecular variations and diversity. *Ecological Genetics and Genomics*, p. 100220, 2024.

GOMES, G. B.; HUTSON, K. S.; DOMINGOS, J. A.; VILLAMIL, S. I. et al. Parasitic protozoan interactions with bacterial microbiome in a tropical fish farm. *Aquaculture*, 502, p. 196-201, 2019.

GRANGER, V. et al. Large-scale spatio-temporal monitoring highlights hotspots of demersal fish diversity in the Mediterranean Sea. *Progress in Oceanography*, v. 130, p. 65-74, 2015. ISSN 0079-6611.

GREGORY-EAVES, I.; SMOL, J. P. Paleolimnology: Approaches and Applications. In: *Wetzel's Limnology: Elsevier*, 2024. p. 1015-1043.

GREINER-FERRIS, K. Testing the Potential of Environmental DNA: Genetic Monitoring of Estuarine and Coastal Bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*) Stocks in South Carolina. 2020.

GÜNTHER, B.; KNEBELSBERGER, T.; NEUMANN, H.; LAAKMANN, S. et al. Metabarcoding of marine environmental DNA based on mitochondrial and nuclear genes. *Scientific Reports*, 8, n. 1, p. 14822, 2018/10/04 2018.

HAMMERL, C.; MÖLLMANN, C.; OESTERWIND, D. Identifying fit-for purpose methods for monitoring fish communities. *Frontiers in Marine Science*, 2024. ISSN 2296-7745.

HÄNFLING, B.; LAWSON HANDLEY, L.; READ, D. S.; HAHN, C. et al. Environmental DNA metabarcoding of lake fish communities reflects long-term data from established survey methods. *Molecular ecology*, 25, n. 13, p. 3101-3119, 2016.

HANSEN, B. K.; BEKKEVOLD, D.; CLAUSEN, L. W.; NIELSEN, E. E. The sceptical optimist: challenges and perspectives for the application of environmental DNA in marine fisheries. *Fish and fisheries*, 19, n. 5, p. 751-768, 2008.

HANSEN, B. K.; JACOBSEN, M. W.; MIDDELBOE, A. L.; PRESTON, C. M. et al. Remote, autonomous real-time monitoring of environmental DNA from commercial fish. *Scientific Reports*, 10, n. 1, p. 13272, 2020.

HANXI, L.; XUENA, H.; SHIGUO, L.; AIBIN, Z. Environmental DNA (eDNA)-metabarcoding-based early monitoring and warning for invasive species in aquatic ecosystems. *Biodiversity Science*, 27, n. 5, p. 491, 2019.

HARPER, L. R.; HANDLEY, L. L.; CARPENTER, A. I.; GHAZALI, M. et al. Environmental DNA (eDNA) metabarcoding of pond water as a tool to survey conservation and management priority mammals. *Biological conservation*, 238, p. 108225, 2019.

HARRISON, J. B.; SUNDAY, J. M.; ROGERS, S. M. Predicting the fate of eDNA in the environment and implications for studying biodiversity. *Proceedings of the Royal Society B*, 286, n. 1915, p. 20191409, 2019.

HARRISON, J. B.; SUNDAY, J. M.; ROGERS, S. M. Predicting the fate of eDNA in the environment and implications for studying biodiversity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 286, n. 1915, p. 20191409, 2019.

HARTIG, F. et al. Novel community data in ecology-properties and prospects. *Trends in Ecology & Evolution*, 2024. ISSN 0169-5347.

HENDRICKS, A.; MACKIE, C. M.; LUY, E.; SONNICHSEN, C. et al. Compact and automated eDNA sampler for in situ monitoring of marine environments. *Scientific Reports*, 13, n. 1, p. 5210, 2023.

HIGUCHI, R. et al. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/technology*, v. 11, n. 9, p. 1026-1030, 1993. ISSN 0733-222X.

HIGUCHI, R. et al. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio/technology*, v. 10, n. 4, p. 413-417, 1992. ISSN 0733-222X.

HIGUCHI, R.; DOLLINGER, G.; WALSH, P. S.; GRIFFITH, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio/technology*, 10, n. 4, p. 413-417, 1992.

HILBORN, R.; WALTERS, C. J. *Quantitative fisheries stock assessment: choice, dynamics and uncertainty*. Springer Science & Business Media, 2013. ISBN 1461535980.

HILL, D. *Handbook of biodiversity methods: survey, evaluation and monitoring*. Cambridge University Press, 2005. ISBN 0521823684.

HINKLE, J. *Proof-of-concept of environmental DNA tools for atlantic sturgeon management*. 2015.

HINLO, R.; LINTERMANS, M.; GLEESON, D.; BROADHURST, B. et al. Performance of eDNA assays to detect and quantify an elusive benthic fish in upland streams. *Biological Invasions*, 20, n. 11, p. 3079-3093, 2018.

HOLMES, A. E.; BAERWALD, M. R.; RODZEN, J.; SCHREIER, B. M. et al. Evaluating environmental DNA detection of a rare fish in turbid water using field and experimental approaches. *PeerJ*, 11, p. e16453, 2024.

HUANG, M. et al. Assessing the response of marine fish communities to climate change and fishing. *Conservation Biology*, p. e14291, 2024. ISSN 0888-8892.

HUANG, Z.; XU, X.; TANG, J.; ZHANG, J. et al. Application and primer design of mitochondrial DNA D-loop of freshwater fishes. *Zhongshan Daxue Xuebao/Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 48, p. 84-88, 07/01 2009.

HUERLIMANN, R.; COOPER, M. K.; EDMUNDS, R. C.; VILLACORTA-RATH, C. et al. *Enhancing tropical conservation and ecology research with aquatic environmental*

DNA methods: an introduction for non-environmental DNA specialists. *Animal Conservation*, 23, n. 6, p. 632-645, 2020.

HUNTER, M. E.; MEIGS-FRIEND, G.; FERRANTE, J. A.; KAMLA, A. T. et al. Surveys of environmental DNA (eDNA): a new approach to estimate occurrence in Vulnerable manatee populations. *Endangered Species Research*, 35, p. 101-111, 2018.

HUVER, J.; KOPRIVNIKAR, J.; JOHNSON, P.; WHYARD, S. Development and application of an eDNA method to detect and quantify a pathogenic parasite in aquatic ecosystems. *Ecological Applications*, 25, n. 4, p. 991-1002, 2015.

HWANG, H.; DILLON, W. R.; TAKANE, Y. An extension of multiple correspondence analysis for identifying heterogeneous subgroups of respondents. *Psychometrika*, 71, n. 1, p. 161-171, 2006.

ILLUMINA. Focused power on the MiSeq System. 2024. Disponível em: <https://www.illumina.com/systems/sequencing-platforms/miseq.html>. Acesso em: 01/15/24.

ISKANDAR, A. N. et al. Measurement of fisheries provisioning services and its pressure to support sustainability of fisheries in the Jatigede Reservoir, Indonesia. *Environmental and Sustainability Indicators*, v. 22, p. 100405, 2024. ISSN 2665-9727.

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

JAYASANKAR, P. Environmental DNA (eDNA) metabarcoding-based estimation of marine stocks. 2017.

JENNINGS, S.; BLANCHARD, J. L. Fish abundance with no fishing: predictions based on macroecological theory. *Journal of Animal Ecology*, p. 632-642, 2004. ISSN 0021-8790.

JERDE, C. L. et al. "Sight-unseen" detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conservation letters*, v. 4, n. 2, p. 150-157, 2011. ISSN 1755-263X.

JEUNEN, G. J.; KNAPP, M.; SPENCER, H. G.; TAYLOR, H. R. et al. Species-level biodiversity assessment using marine environmental DNA metabarcoding requires protocol optimization and standardization. *Ecology and evolution*, 9, n. 3, p. 1323-1335, 2019.

JIANG, P.; ZHANG, S.; XU, S.; XIONG, P. et al. Comparison of environmental DNA metabarcoding and bottom trawling for detecting seasonal fish communities and habitat preference in a highly disturbed estuary. *Ecological Indicators*, 146, p. 109754, 2023.

JO, T. et al. Warm temperature and alkaline conditions accelerate environmental RNA degradation. *Environmental DNA*, v. 5, n. 5, p. 836-848, 2023. ISSN 2637-4943.

JO, T. S. Utilizing the state of environmental DNA (eDNA) to incorporate time-scale information into eDNA analysis. *Proceedings of the Royal Society B*, 290, n. 1999, p. 20230979, 2023.

JO, T.; ARIMOTO, M.; MURAKAMI, H.; MASUDA, R. et al. Estimating shedding and decay rates of environmental nuclear DNA with relation to water temperature and biomass. *Environmental DNA*, 2, n. 2, p. 140-151, 2020.

JO, T.; MINAMOTO, T. Complex interactions between environmental DNA (eDNA) state and water chemistries on eDNA persistence suggested by meta-analyses. *Molecular Ecology Resources*, v. 21, n. 5, p. 1490-1503, 2021. ISSN 1755-098X.

JOHNSEN, S. I.; STRAND, D. A.; RUSCH, J. C.; VRÅLSTAD, T. Environmental DNA (eDNA) monitoring of noble crayfish *Astacus astacus* in lentic environments offers reliable presence-absence surveillance—but fails to predict population density. *Frontiers in Environmental Science*, p. 251, 2020.

JONGJARAUNSUK, R.; TAPARHUDEE, W.; SUWANNASING, P. Comparison of Water Quality Prediction for Red Tilapia Aquaculture in an Outdoor Recirculation System Using Deep Learning and a Hybrid Model. *Water*, 16, n. 6, p. 907, 2024.

JOSEPH, C.; FAIQ, M. E.; LI, Z.; CHEN, G. Persistence and degradation dynamics of eDNA affected by environmental factors in aquatic ecosystems. *Hydrobiologia*, 849, n. 19, p. 4119-4133, 2022.

JUHEL, J. B.; MARQUES, V.; UTAMA, R. S.; VIMONO, I. B. et al. Estimating the extended and hidden species diversity from environmental DNA in hyper-diverse regions. *Ecography*, 2022, n. 10, p. e06299, 2022.

KAGEYAMA, S. A.; HOOGLAND, M. R.; TAJJIOUI, T.; SCHREIER, T. M. et al. Validation of a portable eDNA detection kit for invasive carps. *Fishes*, 7, n. 6, p. 363, 2022.

KAMOROFF, C.; GOLDBERG, C. S. Environmental DNA quantification in a spatial and temporal context: a case study examining the removal of brook trout from a high alpine basin. *Limnology*, 19, p. 335-342, 2018.

KANAWI, E. A. Comparing environmental DNA and traditional monitoring approaches to assess the abundance of outmigrating coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in California coastal streams. 2020.

KARLSSON, E.; OGONOWSKI, M.; SUNDBLAD, G.; SUNDIN, J. et al. Strong positive relationships between eDNA concentrations and biomass in juvenile and adult pike (*Esox lucius*) under controlled conditions: Implications for monitoring. *Environmental DNA*, 4, n. 4, p. 881-893, 2022.

KAWAKAMI, T.; YAMAZAKI, A.; ASAMI, M.; GOTO, Y. et al. Evaluating the sampling effort for the metabarcoding-based detection of fish environmental DNA in the open ocean. *Ecology and evolution*, 13, n. 3, p. e9921, 2023.

KELLY, R. P. et al. Toward a national eDNA strategy for the United States. *Environmental DNA*, v. 6, n. 1, p. e432, 2024. ISSN 2637-4943.

KELLY, R. P. et al. Using environmental DNA to census marine fishes in a large mesocosm. *PloS one*, v. 9, n. 1, p. e86175, 2014. ISSN 1932-6203.

KELLY, R. P.; SHELTON, A. O.; GALLEGO, R. Understanding PCR processes to draw meaningful conclusions from environmental DNA studies. *Scientific reports*, 9, n. 1, p. 12133, 2019.

KING, A. C.; KRIEG, R.; WESTON, A.; ZENKER, A. K. Using eDNA to simultaneously detect the distribution of native and invasive crayfish within an entire country. *Journal of Environmental Management*, 302, p. 113929, 2022.

KIRTANE, A. et al. Quantification of Environmental DNA (eDNA) shedding and decay rates for three commercially harvested fish species and comparison between eDNA detection and trawl catches. *Environmental DNA*, v. 3, n. 6, p. 1142-1155, 2021. ISSN 2637-4943.

KIRTANE, A.; KLEYER, H.; DEINER, K. Sorting states of environmental DNA: Effects of isolation method and water matrix on the recovery of membrane-bound, dissolved, and adsorbed states of eDNA. *Environmental DNA*, 2023. ISSN 2637-4943.

KIRTANE, A.; WIECZOREK, D.; NOJI, T.; BASKIN, L. et al. Quantification of Environmental DNA (eDNA) shedding and decay rates for three commercially harvested fish species and comparison between eDNA detection and trawl catches. *Environmental DNA*, 2021.

KJELSON, M. A.; COLBY, D. R. The evaluation and use of gear efficiencies in the estimation of estuarine fish abundance. In: (Ed.). *Estuarine processes*: Elsevier, 1977. p.416-424.

KLYMUS, K. E. et al. Development and testing of species-specific quantitative PCR assays for environmental DNA applications. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, n. 165, p. e61825, 2020. ISSN 1940-087X.

KLYMUS, K. E. et al. Quantification of eDNA shedding rates from invasive bighead carp *Hypophthalmichthys nobilis* and silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*. *Biological conservation*, v. 183, p. 77-84, 2015. ISSN 0006-3207.

KNUDSEN, S. W.; EBERT, R. B.; HESSELSØE, M.; KUNTKE, F. et al. Species-specific detection and quantification of environmental DNA from marine fishes in the Baltic Sea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 510, p. 31-45, 2019.

KOTSANOPOULOS, K. et al. The use of various statistical methods for authenticity and detection of adulteration in fish and seafood. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 64, n. 6, p. 1553-1571, 2024. ISSN 1040-8398.

KREADER, C. A. Persistence of PCR-detectable *Bacteroides distasonis* from human feces in river water. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, n. 10, p. 4103-4105, 1998. ISSN 1098-5336.

KUMAR, R. et al. Assessment of marine fish stocks within India's Exclusive Economic Zone: Status report 2022. *Indian Journal of Fisheries*, v. 71, n. 1, p. 1-11, 2024. ISSN 0970-6011.

LACOURSIÈRE-ROUSSEL, A.; CÔTÉ, G.; LECLERC, V.; BERNATCHEZ, L. Quantifying relative fish abundance with eDNA: a promising tool for fisheries management. *Journal of Applied Ecology*, 53, n. 4, p. 1148-1157, 2016.

LACOURSIÈRE-ROUSSEL, A.; DUBOIS, Y.; NORMANDEAU, E.; BERNATCHEZ, L. Improving herpetological surveys in eastern North America using the environmental DNA method. *Genome*, 59, n. 11, p. 991-1007, 2016.

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.

LAN, Y.; ROSEN, G.; HERSHBERG, R. Marker genes that are less conserved in their sequences are useful for predicting genome-wide similarity levels between closely related prokaryotic strains. *Microbiome*, 4, n. 1, p. 18, 2016/05/03 2016.

LANCE, R. F. et al. Experimental observations on the decay of environmental DNA from bighead and silver carps. *Management of Biological Invasions*, v. 8, n. 3, 2017. ISSN 1989-8649.

LAPORTE, M. et al. Caged fish experiment and hydrodynamic bidimensional modeling highlight the importance to consider 2D dispersion in fluvial environmental DNA studies. *Environmental DNA*, v. 2, n. 3, p. 362-372, 2020. ISSN 2637-4943.

LEBLANC, F.; BELLIVEAU, V.; WATSON, E.; COOMBER, C. et al. Environmental DNA (eDNA) detection of marine aquatic invasive species (AIS) in Eastern Canada using a targeted species-specific qPCR approach. *Management of Biological Invasions*, 11, n. 2, 2020.

LETESSIER, T. B. et al. Estimating pelagic fish biomass in a tropical seascape using echosounding and baited stereo-videography. *Ecosystems*, p. 1-18, 2022. ISSN 1432-9840.

LI, D.; HAO, Y.; DUAN, Y. Nonintrusive methods for biomass estimation in aquaculture with emphasis on fish: a review. *Reviews in Aquaculture*, v. 12, n. 3, p. 1390-1411, 2020. ISSN 1753-5123.

LI, H. et al. Environmental DNA metabarcoding of fish communities in a small hydropower dam reservoir: A comparison between the eDNA approach and established fishing methods. *Journal of Freshwater Ecology*, v. 37, n. 1, p. 341-362, 2022. ISSN 0270-5060.

LI, J.; LAWSON HANDLEY, L. J.; READ, D. S.; HÄNFLING, B. The effect of filtration method on the efficiency of environmental DNA capture and quantification via metabarcoding. *Molecular Ecology Resources*, 18, n. 5, p. 1102-1114, 2018.

LI, W. et al. Validating eDNA measurements of the richness and abundance of anurans at a large scale. *Journal of Animal Ecology*, v. 90, n. 6, p. 1466-1479, 2021. ISSN 0021-8790.

- LI, X.; LI, F.; MIN, X.; XIE, Y. et al. Embracing eDNA and machine learning for taxonomy-free microorganisms biomonitoring to assess the river ecological status. *Ecological Indicators*, 155, p. 110948, 2023.
- LIANG, Z.; KEELEY, A. Filtration recovery of extracellular DNA from environmental water samples. *Environmental science & technology*, 47, n. 16, p. 9324-9331, 2013.
- LIAO, Y.; LIU, Z.; ZHANG, Y.; LU, P. et al. High-throughput and high-sensitivity full-length single-cell RNA-seq analysis on third-generation sequencing platform. *Cell Discovery*, 9, n. 1, p. 5, 2023.
- LIN, C.-P.; DANFORTH, B. N. How do insect nuclear and mitochondrial gene substitution patterns differ? Insights from Bayesian analyses of combined datasets. *Molecular phylogenetics and evolution*, 30, n. 3, p. 686-702, 2004.
- LOPEZ-OCEJA, A.; GAMARRA, D.; BORRAGAN, S.; JIMÉNEZ-MORENO, S. et al. New cyt b gene universal primer set for forensic analysis. *Forensic Sci Int Genet*, 23, p. 159-165, Jul 2016.
- LØVIK, A. Biomass estimation in aquaculture facilities. *IFAC Proceedings Volumes*, v. 20, n. 7, p. 171-175, 1987. ISSN 1474-6670.
- LUSTOSA-NETO, A. D. A indústria de produtos derivados da pesca e aquicultura. *Acta of Fisheries and Aquatic Resources*, 6, n. 2, p. 28-48, 2018.
- MA, H.; STEWART, K.; LOUGHEED, S.; ZHENG, J. et al. Characterization, optimization, and validation of environmental DNA (eDNA) markers to detect an endangered aquatic mammal. *Conservation Genetics Resources*, 8, p. 561-568, 2006.
- MA, Q.; HE, K.; WANG, X.; JIANG, J. et al. Better Resolution for Cytochrome b than Cytochrome c Oxidase Subunit I to Identify *Schizothorax* Species (Teleostei: Cyprinidae) from the Tibetan Plateau and Its Adjacent Area. *DNA Cell Biol*, 39, n. 4, p. 579-598, Apr 2020.
- MAHON, A. R.; JERDE, C. L.; GALASKA, M.; BERGNER, J. L. et al. Validation of eDNA surveillance sensitivity for detection of Asian carps in controlled and field experiments. *PloS one*, 8, n. 3, p. e58316, 2013.
- MAJANEVA, M.; DISERUD, O. H.; EAGLE, S. H.; BOSTRÖM, E. et al. Environmental DNA filtration techniques affect recovered biodiversity. *Scientific reports*, 8, n. 1, p. 4682, 2018.
- MARQUES, V.; MILHAU, T.; ALBOUY, C.; DEJEAN, T. et al. GAPeDNA: Assessing and mapping global species gaps in genetic databases for eDNA metabarcoding. *Diversity and Distributions*, 27, n. 10, p. 1880-1892, 2021.
- MARSHALL, N. T.; VANDERPLOEG, H. A.; CHAGANTI, S. R. Environmental (e) RNA advances the reliability of eDNA by predicting its age. *Scientific reports*, 11, n. 1, p. 2769, 2021.
- MARTINELL, D. P. What is aquaculture? In: *An Introduction to Sustainable Aquaculture*: Routledge, 2024. p. 8-23.

MARUYAMA, A.; NAKAMURA, K.; YAMANAKA, H.; KONDOH, M. et al. The release rate of environmental DNA from juvenile and adult fish. *PLoS One*, 9, n. 12, p. e114639, 2014.

MATHIEU, C.; HERMANS, S. M.; LEAR, G.; BUCKLEY, T. R. et al. A systematic review of sources of variability and uncertainty in eDNA data for environmental monitoring. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 8, p. 135, 2020.

MATSUHASHI, S.; DOI, H.; FUJIWARA, A.; WATANABE, S. et al. Evaluation of the environmental DNA method for estimating distribution and biomass of submerged aquatic plants. *PLoS One*, 11, n. 6, p. e0156217, 2016.

MAUVISSEAU, Q. et al. The multiple states of environmental DNA and what is known about their persistence in aquatic environments. *Environmental Science & Technology*, v. 56, n. 9, p. 5322-5333, 2022. ISSN 0013-936X.

MCCARTIN, L. J.; VOHSEN, S. A.; AMBROSE, S. W.; LAYDEN, M. et al. Temperature controls eDNA persistence across physicochemical conditions in seawater. *Environmental Science & Technology*, 56, n. 12, p. 8629-8639, 2022.

MEADOR, M. R. Effectiveness of seining after electrofishing to characterize stream fish communities. *North American Journal of Fisheries Management*, v. 32, n. 1, p. 177-185, 2012. ISSN 0275-5947.

MILHAU, T.; VALENTINI, A.; POULET, N.; ROSET, N. et al. Seasonal dynamics of riverine fish communities using eDNA. *Journal of fish biology*, 98, n. 2, p. 387-398, 2021.

MINAMOTO, T. et al. Surveillance of fish species composition using environmental DNA. *Limnology*, v. 13, n. 2, p. 193-197, 2012. ISSN 1439-863X.

MINAMOTO, T. Environmental DNA analysis for macro-organisms: species distribution and more. *DNA Research*, v. 29, n. 3, p. dsac018, 2022. ISSN 1340-2838.

MINAMOTO, T.; MIYA, M.; SADO, T.; SEINO, S. et al. An illustrated manual for environmental DNA research: Water sampling guidelines and experimental protocols. *Environmental DNA*, 3, n. 1, p. 8-13, 2021.

MINAMOTO, T.; NAKA, T.; MOJI, K.; MARUYAMA, A. Techniques for the practical collection of environmental DNA: filter selection, preservation, and extraction. *Limnology*, 17, p. 23-32, 2016.

MIYAZONO, S.; KODAMA, T.; AKAMATSU, Y.; NAKAO, R. et al. Application of environmental DNA methods for the detection and abundance estimation of invasive aquatic plant *Egeria densa* in lotic habitats. *Limnology*, 22, p. 81-87, 2021.

MIZUMOTO, H.; URABE, H.; KANBE, T.; FUKUSHIMA, M. et al. Establishing an environmental DNA method to detect and estimate the biomass of Sakhalin taimen, a critically endangered Asian salmonid. *Limnology*, 19, p. 219-227, 2018.

MORRISON, M. K. et al. Including environmental covariates clarifies the relationship between endangered Atlantic salmon (*Salmo salar*) abundance and environmental DNA. *Environmental DNA*, v. 5, n. 5, p. 987-1003, 2023. ISSN 2637-4943.

MOUSHOMI, R. et al. Environmental DNA size sorting and degradation experiment indicates the state of *Daphnia magna* mitochondrial and nuclear eDNA is subcellular. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 12500, 2019. ISSN 2045-2322.

MUHA, T. P.; ROBINSON, C. V.; GARCIA DE LEANIZ, C.; CONSUEGRA, S. An optimised eDNA protocol for detecting fish in lentic and lotic freshwaters using a small water volume. *PLoS One*, 14, n. 7, p. e0219218, 2019.

MURIENNE, J.; CANTERA, I.; CERDAN, A.; CILLEROS, K. et al. Aquatic eDNA for monitoring French Guiana biodiversity. *Biodiversity Data Journal*, 7, 2019.

NAGLER, M.; PODMIRSEG, S. M.; ASCHER-JENULL, J.; SINT, D. et al. Why eDNA fractions need consideration in biomonitoring. *Molecular ecology resources*, 22, n. 7, p. 2458-2470, 2022.

NAISMITH, I.; KNIGHTS, B. Studies of sampling methods and of techniques for estimating populations of eels, *Anguilla anguilla* L. *Aquaculture research*, v. 21, n. 3, p. 357-368, 1990. ISSN 1355-557X.

NAKAGAWA, H.; FUKUSHIMA, K.; SAKAI, M.; WU, L. et al. Relationships between the eDNA concentration obtained from metabarcoding and stream fish abundance estimated by the removal method under field conditions. *Environmental DNA*, 4, n. 6, p. 1369-1380, 2022.

NAKAMURA, K. Dominant barriers and the solutions to the social application of environmental DNA. *Landscape and Ecological Engineering*, p. 1-8, 2023. ISSN 1860-188X.

NAMAN, S. M. et al. Food web perspectives and methods for riverine fish conservation. *WIREs Water*, v. 9, n. 4, p. e1590, 2022. ISSN 2049-1948. Available at: < <https://wires.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/wat2.1590> >.

NAVARRO, E.; SERRANO-HERAS, G.; CASTAÑO, M. J.; SOLERA, J. Real-time PCR detection chemistry. *Clínica Chimica Acta*, 439, p. 231-250, 2015/01/15/ 2015.

NESTER, G. M. et al. Development and evaluation of fish eDNA metabarcoding assays facilitate the detection of cryptic seahorse taxa (family: Syngnathidae). *Environmental DNA*, v. 2, n. 4, p. 614-626, 2020. ISSN 2637-4943.

NEVERS, M. B.; BYAPPANAHALLI, M. N.; MORRIS, C. C.; SHIVELY, D. et al. Environmental DNA (eDNA): A tool for quantifying the abundant but elusive round goby (*Neogobius melanostomus*). *PloS one*, 13, n. 1, p. e0191720, 2018.

NICOLIA, A.; SCOTTI, N.; D'AGOSTINO, N.; FESTA, G. et al. Mitochondrial DNA editing in potato through mitoTALEN and mitoTALECD: molecular characterization and stability of editing events. *Plant Methods*, 20, n. 1, p. 4, 2024.

- NOBLE, T. H.; ROBSON, H. L. A.; SAUNDERS, R. J.; JERRY, D. R. The utility of eDNA as a tilapia surveillance tool. Queensland, Australia: 2015.
- NYGAARD, M. Environmental DNA for assessing abundance of salmon lice (*Lepeophtheirus salmonis*) in salmon (*Salmo salar*) farms. 2018. -, UiT The Arctic University of Norway.
- ODERO, J. Application of Environmental DNA (eDNA) in the Detection and Quantification of Anopheles Mosquito Larvae in Artificial Aquatic Habitats. 2016. 65 f. (Master) -, Liverpool School of Tropical Medicine, Liverpool, England.
- OGRAM, A.; SAYLER, G. S.; BARKAY, T. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *Journal of microbiological methods*, v. 7, n. 2-3, p. 57-66, 1987. ISSN 0167-7012.
- OSTBERG, C. O.; CHASE, D. M. Ontogeny of eDNA shedding during early development in Chinook Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Environmental DNA*, v. 4, n. 2, p. 339-348, 2022. ISSN 2637-4943.
- OTHMAN, N.; MUNIAN, K.; HARIS, H.; RAMLI, F. F. et al. A Review on Next-Generation Wildlife Monitoring using Environmental DNA (eDNA) Detection and Next-Generation Sequencing in Malaysia. *Sains Malaysiana*, 52, n. 1, p. 17-33, 2023.
- PAGE, M. J.; MCKENZIE, J. E.; BOSSUYT, P. M.; BOUTRON, I. et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *Bmj*, 372, 2021.
- PAPAIOANNOU, C.; GELADAKIS, G.; KOMMATA, V.; BATARGIAS, C. et al. Insights in Pharmaceutical Pollution: The Prospective Role of eDNA Metabarcoding. *Toxics*, 11, n. 11, p. 903, 2023.
- PASHA, M.; RAGHAVENDRA, C.; NIRANJANAMURTHY, M. Comparative Analysis of Biomass Estimation Methods in Aquaculture: A Review. *Journal of Survey in Fisheries Sciences*, p. 01-09, 2024.
- PAUL, J. H.; KELLOGG, C. A.; JIANG, S. C. Viruses and DNA in marine environments. *Microbial diversity in time and space*, p. 115-124, 1996.
- PAWLOWSKI, J. et al. The future of biotic indices in the ecogenomic era: Integrating (e) DNA metabarcoding in biological assessment of aquatic ecosystems. *Science of the Total Environment*, v. 637, p. 1295-1310, 2018. ISSN 0048-9697.
- PAWSON, M. G.; JENNINGS, S. A critique of methods for stock identification in marine capture fisheries. *Fisheries research*, v. 25, n. 3-4, p. 203-217, 1996. ISSN 0165-7836.
- PEDERSEN, M. W.; OVERBALLE-PETERSEN, S.; ERMINI, L.; SARKISSIAN, C. D. et al. Ancient and modern environmental DNA. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370, n. 1660, p. 20130383, 2015.
- PETERS, L.; SPATHARIS, S.; DARIO, M. A.; DWYER, T. et al. Environmental DNA: A new low-cost monitoring tool for pathogens in salmonid aquaculture. *Frontiers in Microbiology*, 9, p. 3009, 2018.

- 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, p. 1041-1045, 2017. ISSN 0001-3765.
- PILLIOD, D. S. et al. Factors influencing detection of eDNA from a stream-dwelling amphibian. *Molecular Ecology Resources*, v. 14, n. 1, p. 109-116, 2014. ISSN 1755-098X.
- PINNA, M. et al. An overview of ecological indicators of fish to evaluate the anthropogenic pressures in aquatic ecosystems: from traditional to innovative DNA-based approaches. *Water*, v. 15, n. 5, p. 949, 2023. ISSN 2073-4441.
- PONT, D. et al. Quantitative monitoring of diverse fish communities on a large scale combining eDNA metabarcoding and qPCR. *Molecular Ecology Resources*, v. 23, n. 2, p. 396-409, 2023. ISSN 1755-098X.
- PONT, D. Predicting downstream transport distance of fish eDNA in lotic environments. *Molecular Ecology Resources*, p. e13934, 2024. ISSN 1755-098X.
- PORTER, T. M.; HAJIBABAEI, M. Scaling up: A guide to high-throughput genomic approaches for biodiversity analysis. *Molecular ecology*, 27, n. 2, p. 313-338, 2018.
- PORTT, C. B. et al. A review of fish sampling methods commonly used in Canadian freshwater habitats. 2006.
- PRIVITERA-JOHNSON, K. M.; PUNT, A. E. A review of approaches to quantifying uncertainty in fisheries stock assessments. *Fisheries Research*, v. 226, p. 105503, 2020. ISSN 0165-7836.
- PUKK, L.; KANEFSKY, J.; HEATHMAN, A. L.; WEISE, E. M. et al. eDNA metabarcoding in lakes to quantify influences of landscape features and human activity on aquatic invasive species prevalence and fish community diversity. *Diversity and Distributions*, 27, n. 10, p. 2016-2031, 2021.
- PYTHON SOFTWARE FOUNDATION. Python 3.12.1 documentation. 2023.
- RAHIM, F.; BODNAR, N.; QASIM, N. H.; JAWAD, A. M. et al. Integrating Machine Learning in Environmental DNA Metabarcoding for Improved Biodiversity Assessment: A Review and Analysis of Recent Studies. 2023.
- RAHMAN, M. T.; UDDIN, M. S.; SULTANA, R.; MOUE, A. et al. Polymerase chain reaction (PCR): a short review. *Anwer Khan Modern Medical College Journal*, 4, n. 1, p. 30-36, 2013.
- RAMEY, A. M.; MCKEEMAN, C. M.; PETROU, E. L.; MENNING, D. M. et al. Environmental DNA as a Tool for Better Understanding the Distribution, Abundance, And Health of Atlantic Salmon and Pacific Salmon. *Fisheries*, 49, n. 4, p. 169-180, 2024.
- REES, H. C.; MADDISON, B. C.; MIDDLEDITCH, D. J.; PATMORE, J. R. 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*, 51, n. 5, p. 1450-1459, 2014.

RENSHAW, M. A.; OLDS, B. P.; JERDE, C. L.; MCVEIGH, M. M. et al. The room temperature preservation of filtered environmental DNA samples and assimilation into a phenol–chloroform–isoamyl alcohol DNA extraction. *Molecular ecology resources*, 15, n. 1, p. 168-176, 2015.

RIAZ, M.; WARREN, D.; WITTEWER, C.; COCCHIARARO, B. et al. Using eDNA to understand predator–prey interactions influenced by invasive species. *Oecologia*, 202, n. 4, p. 757-767, 2023.

RIBOLLI, J. et al. Optimized and validated protocol to the detection of the invasive bivalve *Limnoperna fortunei* from eDNA plankton samples. *Acta Limnologica Brasiliensia*, v. 33, 2021. ISSN 2179-975X.

RIEDER, J. M. The application of environmental DNA (eDNA) methods for the monitoring and detection of aquatic microorganisms in aquaculture. 2023. -, Universität Bern.

RIVERA, S. F.; RIMET, F.; VASSELON, V.; VAUTIER, M. et al. Fish eDNA metabarcoding from aquatic biofilm samples: Methodological aspects. *Molecular Ecology Resources*, 22, n. 4, p. 1440-1453, 2022.

ROURKE, M. L. et al. Correlated environmental DNA and electrofished estimates of relative biomass for golden perch, *Macquaria ambigua*. *Frontiers in Fish Science*, v. 2, p. 1358572, 2024. ISSN 2813-9097.

ROURKE, M. L. et al. Environmental DNA (eDNA) as a tool for assessing fish biomass: A review of approaches and future considerations for resource surveys. *Environmental DNA*, v. 4, n. 1, p. 9-33, 2022. ISSN 2637-4943.

ROURKE, M. L.; FOWLER, A. M.; HUGHES, J. M.; BROADHURST, M. K. et al. Environmental DNA (eDNA) as a tool for assessing fish biomass: A review of approaches and future considerations for resource surveys. *Environmental DNA*, 4, n. 1, p. 9-33, 2022.

ROURKE, M. L.; WALBURN, J. W.; BROADHURST, M. K.; FOWLER, A. M. et al. Poor utility of environmental DNA for estimating the biomass of a threatened freshwater teleost; but clear direction for future candidate assessments. *Fisheries research*, 258, p. 106545, 2023.

RUAN, H. T.; WANG, R. L.; LI, H. T.; LIU, L. et al. Effects of sampling strategies and DNA extraction methods on eDNA metabarcoding: A case study of estuarine fish diversity monitoring. *Zool Res*, 43, n. 2, p. 192-204, Mar 18 2022.

SAHA, A. et al. A Study on the Fresh Water Fish Diversity of Mora Dhansiri River, Assam, India. *UTTAR PRADESH JOURNAL OF ZOOLOGY*, v. 45, n. 6, p. 164-171, 2024. ISSN 0256-971X.

SAHU, A. et al. Environmental DNA (eDNA): Powerful technique for biodiversity conservation. *Journal for Nature Conservation*, p. 126325, 2022. ISSN 1617-1381.

SAHU, A.; KUMAR, N.; SINGH, C. P.; SINGH, M. Environmental DNA (eDNA): Powerful technique for biodiversity conservation. *Journal for Nature Conservation*, 71, p. 126325, 2023.

SAITO, T.; DOI, H. Environmental DNA degradation simulation from water temperature and DNA fragment length: a meta-analysis approach. *bioRxiv*, p. 2020.10.30.361980, 2020.

SAKATA, M. K.; SATO, M.; SATO, M. O.; WATANABE, T. et al. Detection and persistence of environmental DNA (eDNA) of the different developmental stages of a vector mosquito, *Culex pipiens pallens*. *Plos one*, 17, n. 8, p. e0272653, 2022.

SANGER, F.; COULSON, A. R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of molecular biology*, 94, n. 3, p. 441-448, 1975.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*, 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SASSOUBRE, L. M. et al. Quantification of environmental DNA (eDNA) shedding and decay rates for three marine fish. *Environmental science & technology*, v. 50, n. 19, p. 10456-10464, 2016. ISSN 0013-936X.

SATO, M.; INOUE, N.; NAMBU, R.; FURUICHI, N. et al. Quantitative assessment of multiple fish species around artificial reefs combining environmental DNA metabarcoding and acoustic survey. *Scientific reports*, 11, n. 1, p. 1-14, 2021.

SAUPHAR, C. et al. Atlantic salmon (*Salmo salar*) distribution and vertical size-stratification in a commercial sea cage: A case study. *Aquaculture*, v. 581, p. 740356, 2024. ISSN 0044-8486.

SCHENEKAR, T. The current state of eDNA research in freshwater ecosystems: are we shifting from the developmental phase to standard application in biomonitoring? *Hydrobiologia*, 850, n. 6, p. 1263-1282, 2023.

SCHLOESSER, D.; RESEARCH, C. S.-J. O. S.; 2012, U. Bibliography of *Dreissena polymorpha* (Zebra Mussels) and *Dreissena rostriformis Bugensis* (QUAGGA Mussels): 1989 to 2011. *BioOne*, 2012.

SCRIVER, M.; MARINICH, A.; WILSON, C.; FREELAND, J. Development of species-specific environmental DNA (eDNA) markers for invasive aquatic plants. *Aquatic botany*, 122, p. 27-31, 2015.

SENAPATI, D. et al. Innovative Edna Approaches For Fish Biomass Estimation In Aquatic Environments. *Journal of Advanced Zoology*, v. 45, 2024. ISSN 0253-7214.

SENAPATI, D.; BHATTACHARYA, M.; KAR, A.; CHINI, D. S. et al., 2019, Environmental DNA (eDNA): A promising biological survey tool for aquatic species detection. *Springer*. 211-228.

SEPULVEDA, A. J. et al. Improved detection of rare, endangered and invasive trout in using a new large-volume sampling method for eDNA capture. *Environmental DNA*, v. 1, n. 3, p. 227-237, 2019. ISSN 2637-4943.

SEPULVEDA, A. J.; AL-CHOKHACHY, R.; LARAMIE, M. B.; CRAPSTER, K. et al. It's complicated... environmental DNA as a predictor of trout and char abundance in streams. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 78, n. 4, p. 422-432, 2021.

SEPULVEDA, A. J.; NELSON, N. M.; JERDE, C. L.; LUIKART, G. Are environmental DNA methods ready for aquatic invasive species management? *Trends in ecology & evolution*, 35, n. 8, p. 668-678, 2020.

SEYMOUR, M.; DURANCE, I.; COSBY, B. J.; RANSOM-JONES, E. et al. Acidity promotes degradation of multi-species environmental DNA in lotic mesocosms. *Communications biology*, 1, n. 1, p. 4, 2018.

SHASHANK, P. R.; PARKER, B. M.; RANANAWARE, S. R.; PLOTKIN, D. et al. CRISPR-based diagnostics detects invasive insect pests. *Molecular Ecology Resources*, 24, n. 1, p. e13881, 2024.

SHU, L.; LUDWIG, A.; PENG, Z. Standards for methods utilizing environmental DNA for detection of fish species. *Genes*, 11, n. 3, p. 296, 2020.

SIEBER, N.; HARTIKAINEN, H.; VORBURGER, C. Validation of an eDNA-based method for the detection of wildlife pathogens in water. *Diseases of Aquatic Organisms*, 141, p. 171-184, 2020.

SIGSGAARD, E. E.; JENSEN, M. R.; WINKELMANN, I. E.; MØLLER, P. R. et al. Population-level inferences from environmental DNA—Current status and future perspectives. *Evolutionary Applications*, 13, n. 2, p. 245-262, 2020.

SILVA, A. N. B. D.; SOUZA, R. D. C. M. D.; HONORATO, N. R. M.; MARTINS, R. R. et al. Comparison of phenol-chloroform and a commercial deoxyribonucleic acid extraction kit for identification of bloodmeal sources from triatomines (Hemiptera: Reduviidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 53, 2020.

SIVALINGAM, P.; POTÉ, J.; PRABAKAR, K. Extracellular DNA (eDNA): Neglected and Potential Sources of Antibiotic Resistant Genes (ARGs) in the Aquatic Environments. *Pathogens*, 9, n. 11, p. 874, 2020.

SKINNER, M. et al. A mesocosm comparison of laboratory-based and on-site eDNA solutions for detection and quantification of striped bass (*Morone saxatilis*) in marine ecosystems. *Environmental DNA*, v. 2, n. 3, p. 298-308, 2020. ISSN 2637-4943.

SLATKO, B. E.; GARDNER, A. F.; AUSUBEL, F. M. Overview of next-generation sequencing technologies. *Current protocols in molecular biology*, v. 122, n. 1, p. e59, 2018. ISSN 1934-3639.

SMITH, L. Biodiversity monitoring using environmental DNA: Can it detect all fish species in a waterbody and is it cost effective for routine monitoring? 2017.

SMITH, T.; HEGER, A.; SUDBERY, I. UMI-tools: modeling sequencing errors in Unique Molecular Identifiers to improve quantification accuracy. *Genome Res*, 27, n. 3, p. 491-499, Mar 2017.

SOLARZ, W.; NAJBEREK, K.; WILK-WOŹNIAK, E.; BIEDRZYCKA, A. Raccoons foster the spread of freshwater and terrestrial microorganisms—Mammals as a source of microbial eDNA. *Diversity and Distributions*, 26, n. 4, p. 453-459, 2020.

SOUZA, H. V.; MARCHESIN, S. R.; ITOYAMA, M. M. Analysis of the mitochondrial COI gene and its informative potential for evolutionary inferences in the families Coreidae and Pentatomidae (Heteroptera). *Genet Mol Res*, 15, n. 1, Feb 5 2016.

SPEAR, M. J.; EMBKE, H. S.; KRYSAN, P. J.; VANDER ZANDEN, M. J. Application of eDNA as a tool for assessing fish population abundance. *Environmental DNA*, 3, n. 1, p. 83-91, 2021.

SPENS, J.; EVANS, A. R.; HALFMAERTEN, D.; KNUDSEN, S. W. et al. Comparison of capture and storage methods for aqueous microbial eDNA using an optimized extraction protocol: advantage of enclosed filter. *Methods in Ecology and Evolution*, 8, n. 5, p. 635-645, 2017.

STAT, M.; HUGGETT, M. J.; BERNASCONI, R.; DIBATTISTA, J. D. et al. Ecosystem biomonitoring with eDNA: metabarcoding across the tree of life in a tropical marine environment. *Scientific reports*, 7, n. 1, p. 12240, 2017.

STEWART, K. A. Understanding the effects of biotic and abiotic factors on sources of aquatic environmental DNA. *Biodiversity and Conservation*, v. 28, n. 5, p. 983-1001, 2019. ISSN 0960-3115.

STOECKLE, B. C.; BEGGEL, S.; CERWENKA, A. F.; MOTIVANS, E. et al. A systematic approach to evaluate the influence of environmental conditions on eDNA detection success in aquatic ecosystems. *PLoS One*, 12, n. 12, p. e0189119, 2017.

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.

SUN, S. E.; NI, G.; WANG, W.; SHA, Z. et al. Highly rearranged gene orders and rapid evolutionary rates in the mitochondrial genomes of Apodida (Echinodermata: Holothuroidea). *Frontiers in Marine Science*, 2023.

TABERLET, P.; BONIN, A.; ZINGER, L.; COISSAC, E. *Environmental DNA: For biodiversity research and monitoring*. Oxford University Press, 2018. 0198767226.

TABERLET, P.; WAITS, L. P.; LUIKART, G. Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends in ecology & evolution*, 14, n. 8, p. 323-327, 1999.

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

TAKEUCHI, A.; SADO, T.; GOTOH, R. O.; WATANABE, S. et al. New PCR primers for metabarcoding environmental DNA from freshwater eels, genus *Anguilla*. *Scientific Reports*, 9, n. 1, p. 7977, 2019.

THALINGER, B. et al. The effect of activity, energy use, and species identity on environmental DNA shedding of freshwater fish. *Frontiers in Ecology and Evolution*, v. 9, p. 623718, 2021. ISSN 2296-701X.

THALINGER, B.; DEINER, K.; HARPER, L. R.; REES, H. C. et al. A validation scale to determine the readiness of environmental DNA assays for routine species monitoring. *Environmental DNA*, 3, n. 4, p. 823-836, 2021.

THOMAS, A. C.; HOWARD, J.; NGUYEN, P. L.; SEIMON, T. A. et al. eDNA Sampler: A fully integrated environmental DNA sampling system. *Methods in ecology and evolution*, 9, n. 6, p. 1379-1385, 2018.

THOMSEN, M. S.; WERNBERG, T.; SCHIEL, D. Invasions by non-indigenous species. In: FRID, T. P. C. A. C. L. J. (Ed.). *Marine Ecosystems: Human Impacts on Biodiversity, Functioning and Services*: Cambridge University Pres, 2015. p. 274 - 330.

THOMSEN, P. F. et al. Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. 2012. ISSN 1932-6203.

THOMSEN, P. F.; KIELGAST, J.; IVERSEN, L. L.; WIUF, C. et al. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular ecology*, 21, n. 11, p. 2565-2573, 2012.

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.

TIAN, H. A. Assessing the biotic and abiotic factors influencing the distribution and intensity of cyanobacterial harmful algal blooms in Dog Lake, South Frontenac using UAV imaging and eDNA. 2021. -, Queen's University (Canada).

TILLOTSON, M. D.; KELLY, R. P.; DUDA, J. J.; HOY, M. et al. Concentrations of environmental DNA (eDNA) reflect spawning salmon abundance at fine spatial and temporal scales. *Biological Conservation*, 220, p. 1-11, 2018.

TRIMBOS, K. B.; CIERAAD, E.; SCHRAMA, M.; SAARLOOS, A. I. et al. Stirring up the relationship between quantified environmental DNA concentrations and exoskeleton-shedding invertebrate densities. *Environmental DNA*, 3, n. 3, p. 605-618, 2021.

TROELL, E. A. Does aquaculture add resilience to the global food system? *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111, n. 37, p. 13257-13263, 2014.

TROTH, C. R.; BURIAN, A.; MAUVISSEAU, Q.; BULLING, M. et al. Development and application of eDNA-based tools for the conservation of white-clawed crayfish. *Science of the Total Environment*, 748, p. 141394, 2020.

TROTH, C. R.; SWEET, M. J.; NIGHTINGALE, J.; BURIAN, A. Seasonality, DNA degradation and spatial heterogeneity as drivers of eDNA detection dynamics. *Science of the Total Environment*, 768, p. 144466, 2021.

TSUJI, S. et al. Rapid assessment of invasion front and biological impact of the invasive fish *Coreoperca herzi* using quantitative eDNA metabarcoding. *Biological Invasions*, p. 1-17, 2024. ISSN 1387-3547.

TSUJI, S.; INUI, R.; NAKAO, R.; MIYAZONO, S. et al. Quantitative environmental DNA metabarcoding shows high potential as a novel approach to quantitatively assess fish community. *Scientific Reports*, 12, n. 1, p. 21524, 2022.

TSUJI, S.; TAKAHARA, T.; DOI, H.; SHIBATA, N. et al. The detection of aquatic macroorganisms using environmental DNA analysis—A review of methods for collection, extraction, and detection. *Environmental DNA*, 1, n. 2, p. 99-108, 2019.

TURNER, C. R. et al. Particle size distribution and optimal capture of aqueous microbial eDNA. *Methods in Ecology and Evolution*, v. 5, n. 7, p. 676-684, 2014. ISSN 2041-210X.

UCHIDA, N.; KUBOTA, K.; AITA, S.; KAZAMA, S. Aquatic insect community structure revealed by eDNA metabarcoding derives indices for environmental assessment. *PeerJ*, 8, p. e9176, 2020.

URBAN, P. et al. eDNA based bycatch assessment in pelagic fish catches. *Scientific Reports*, v. 14, n. 1, p. 2976, 2024. ISSN 2045-2322.

URBAN, P. et al. Using eDNA to estimate biomass of bycatch in pelagic fisheries. *Environmental DNA*, 2022. ISSN 2637-4943.

USHIO, M.; FUKUDA, H.; INOUE, T.; MAKOTO, K. et al. Environmental DNA enables detection of terrestrial mammals from forest pond water. *Molecular Ecology Resources*, 17, n. 6, p. e63-e75, 2017.

VAN BOCHOVE, K.; BAKKER, F. T.; BEENTJES, K. K.; HEMERIK, L. et al. Organic matter reduces the amount of detectable environmental DNA in freshwater. *Ecology and Evolution*, 10, n. 8, p. 3647-3654, 2020.

VAN DENDEREN, D. et al. Demersal fish biomass declines with temperature across productive shelf seas. *Global Ecology and Biogeography*, 2023. ISSN 1466-822X.

VEILLEUX, H. D.; MISUTKA, M. D.; GLOVER, C. N. Environmental DNA and environmental RNA: Current and prospective applications for biological monitoring. *Science of the Total Environment*, 782, p. 146891, 2021.

VENTER, J. C. et al. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *science*, v. 304, n. 5667, p. 66-74, 2004. ISSN 0036-8075.

WALDEN, C.; CARBONERO, F.; ZHANG, W. Assessing impacts of DNA extraction methods on next generation sequencing of water and wastewater samples. *Journal of microbiological methods*, 141, p. 10-16, 2017.

- WANG, S. et al. Methodology of fish eDNA and its applications in ecology and environment. *Science of the Total Environment*, v. 755, p. 142622, 2021. ISSN 0048-9697.
- WANG, Z.; LIU, X.; LIANG, D.; WANG, Q. et al. VertU: universal multilocus primer sets for eDNA metabarcoding of vertebrate diversity, evaluated by both artificial and natural cases. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 11, 2023-June-19 2023. Original Research.
- WATTS, A. W.; MIKSIS-OLDS, J., 2018, The ocean as a living sensor: environmental DNA and acoustics for detecting marine life.
- WEBB, P. W.; WEIHS, D. Functional locomotor morphology of early life history stages of fishes. *Transactions of the American Fisheries Society*, v. 115, n. 1, p. 115-127, 1986. ISSN 0002-8487.
- WELDON, L.; O'LEARY, C.; STEER, M.; NEWTON, L. et al. A comparison of European eel *Anguilla anguilla* eDNA concentrations to fyke net catches in five Irish lakes. *Environmental DNA*, 2, p. 587-600, 2020.
- WILCOX, T. M. et al. Fine-scale environmental DNA sampling reveals climate-mediated interactions between native and invasive trout species. *Ecosphere*, v. 9, n. 11, p. e02500, 2018. ISSN 2150-8925.
- WILCOX, T.; CARIM, K.; FRANKLIN, T. W.; MCKELVEY, K. S. et al. The importance of sound methodology in environmental DNA sampling. 2018.
- WILDER, M. L.; FARRELL, J. M.; GREEN, H. C. Estimating eDNA shedding and decay rates for muskellunge in early stages of development. *Environmental DNA*, v. 5, n. 2, p. 251-263, 2023. ISSN 2637-4943.
- WITTEW, C.; NOWAK, C.; STRAND, D. A.; VRÅLSTAD, T. et al. Comparison of two water sampling approaches for eDNA-based crayfish plague detection. *Limnologia*, 70, p. 1-9, 2018.
- WIYONO, E. S.; ZAINUDDIN, M.; SYAMSUDDIN, M. L. Measuring indices of fish community structure in Fisheries Management Area 713 (FMA 713), Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, v. 25, n. 5, 2024. ISSN 2085-4722.
- WOOTTON, R. J. *Ecology of teleost fishes*. Springer Science & Business Media, 2012. ISBN 9400908296.
- XIONG, W.; MACISAAC, H. J.; ZHAN, A. An overlooked source of false positives in eDNA-based biodiversity assessment and management. *Journal of Environmental Management*, v. 358, p. 120949, 2024. ISSN 0301-4797.
- YAMAMOTO, S.; MASUDA, R.; SATO, Y.; SADO, T. et al. Environmental DNA metabarcoding reveals local fish communities in a species-rich coastal sea. *Scientific reports*, 7, n. 1, p. 40368, 2017.
- YANG, H.; YU, J.; JIN, L.; ZHAO, Y. et al. A deep learning based method for automatic analysis of high-throughput droplet digital PCR images. *Analyst*, 148, n. 2, p. 239-247, 2023.

YANG, J. et al. Unsupervised biological integrity assessment by eDNA biomonitoring of multi-trophic aquatic taxa. *Environment International*, v. 175, p. 107950, 2023. ISSN 0160-4120.

YANG, L.; DING, F.; LIN, Q.; XIE, J. et al. A tool to automatically design multiplex PCR primer pairs for specific targets using diverse templates. *Scientific Reports*, 13, n. 1, p. 16451, 2023/09/30 2023.

YATES, M. et al. Towards a framework to unify the relationship between numerical abundance, biomass, and quantitative eDNA. *bioRxiv*, p. 2022.12.06.519311, 2022.

YATES, M. C.; CRISTESCU, M. E.; DERRY, A. M. Integrating physiology and environmental dynamics to operationalize environmental DNA (eDNA) as a means to monitor freshwater macro-organism abundance. *Molecular Ecology*, 30, n. 24, p. 6531-6550, 2021.

YATES, M. C.; DERRY, A. M.; CRISTESCU, M. E. Environmental RNA: A Revolution in Ecological Resolution? *Trends in Ecology and Evolution*. 36: 601-609 p. 2021.

YATES, M. C.; GLASER, D.; POST, J. R.; CRISTESCU, M. E. et al. The relationship between eDNA particle concentration and organism abundance in nature is strengthened by allometric scaling. *Molecular Ecology*, 30, n. 13, p. 3068-3082, 2021.

YATES, M. C.; WILCOX, T. M.; STOECKLE, M.; HEATH, D. D. Interspecific allometric scaling in eDNA production among northwestern Atlantic bony fishes reflects physiological allometric scaling. *Environmental DNA*, 2022.

YOCCOZ, N. G. The future of environmental DNA in ecology. *Molecular ecology*, 21, n. 8, p. 2031-2038, 2012.

YONAGO, T.; KAWAKAMI, T.; KASAI, A. Linkage between spatiotemporal distribution of environmental DNA and phenological activity in an amphidromous fish, ayu *Plecoglossus altivelis altivelis*, in a river located in its northernmost distributional area. *Journal of Fish Biology*, 104, n. 5, p. 1468-1482, 2024.

YOSHITAKE, K.; FUJIWARA, A.; MATSUURA, A.; SEKINO, M. et al. Estimation of tuna population by the improved analytical pipeline of unique molecular identifier-assisted HaCeD-Seq (haplotype count from eDNA). *Scientific Reports*, 11, n. 1, p. 7031, 2021.

YOSHITAKE, K.; YOSHINAGA, T.; TANAKA, C.; MIZUSAWA, N. et al. HaCeD-Seq: a Novel Method for Reliable and Easy Estimation About the Fish Population Using Haplotype Count from eDNA. *Marine Biotechnology*, 21, p. 813-820, 2019.

ZHANG, J.; DING, R.; WANG, Y.; WEN, J. Experimental study on the response relationship between environmental DNA concentration and biomass of *Schizothorax prenanti* in still water. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 10, p. 972680, 2022.

ZHANG, L.; YANG, J.; ZHANG, Y.; SHI, J. et al. eDNA biomonitoring revealed the ecological effects of water diversion projects between Yangtze River and Tai Lake. *Water Research*, 210, p. 117994, 2022.

ZHANG, L.; ZHOU, W.; JIAO, M.; XIE, T. et al. Use of passive sampling in environmental DNA metabarcoding technology: Monitoring of fish diversity in the Jiangmen coastal waters. *Science of The Total Environment*, 908, p. 168298, 2024.

ZHANG, P. et al. Species range shifts in response to climate change and human pressure for the world's largest amphibian. *Science of the Total Environment*, v. 735, p. 139543, 2020. ISSN 0048-9697.

ZHANG, S.; LU, Q.; WANG, Y.; WANG, X. et al. Assessment of fish communities using environmental DNA: Effect of spatial sampling design in lentic systems of different sizes. *Molecular Ecology Resources*, 20, n. 1, p. 242-255, 2020.

ZHANG, S.; ZHAO, J.; YAO, M. A comprehensive and comparative evaluation of primers for metabarcoding eDNA from fish. *Methods in Ecology and Evolution*, 11, n. 12, p. 1609-1625, 2020.

ZHANG, Y.; PAVLOVSKA, M.; STOICA, E.; PREKRASNA, I. et al. Holistic pelagic biodiversity monitoring of the Black Sea via eDNA metabarcoding approach: From bacteria to marine mammals. *Environment International*, 135, p. 105307, 2020.

ZHAO, B.; VAN BODEGOM, P. M.; TRIMBOS, K. B. Bacterial abundance and pH associate with eDNA degradation in water from various aquatic ecosystems in a laboratory setting. *Frontiers in Environmental Science*, 11, p. 1025105, 2023.

ZHAO, F.; FILKER, S.; WANG, C.; XU, K. Bathymetric gradient shapes the community composition rather than the species richness of deep-sea benthic ciliates. *Science of the Total Environment*, 755, p. 142623, 2021.

ZULKEFLI, N. S.; KIM, K.-H.; HWANG, S.-J. Effects of microbial activity and environmental parameters on the degradation of extracellular environmental DNA from a eutrophic lake. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16, n. 18, p. 3339, 2019.