

INSTITUTO FEDERAL CATARINENSE
Pró-reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação
Mestrado Profissional em Produção e Sanidade Animal



Dissertação

**DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE VIABILIDADE E QUANTIFICAÇÃO DE MATERIAL GENÔMICO
AMBIENTAL (eDNA) EM TANQUES DE CULTIVO**

Pedro Henrique Sousa Ferro

Araquari, 2022

Pedro Henrique Sousa Ferro

**DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE VIABILIDADE E QUANTIFICAÇÃO DE MATERIAL
GENÔMICO AMBIENTAL (eDNA) EM TANQUES DE CULTIVO**

Dissertação apresentada ao Mestrado Profissional em Produção e Sanidade Animal do Instituto Federal Catarinense, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Produção e Sanidade Animal).

Orientador: Delano Dias Schleder

Araquari, 2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática do ICMC/USP, cedido ao IFC e
adaptado pela CTI - Araquari e pelas bibliotecas do Campus de Araquari e Concórdia.

Fd Ferro, Pedro Henrique Sousa
 DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE VIABILIDADE E
 QUANTIFICAÇÃO DE MATERIAL GENÔMICO AMBIENTAL (eDNA) EM
 TANQUES DE CULTIVO / Pedro Henrique Sousa Ferro;
 orientador Delano Dias Schleder. -- Araquari, 2022.
 35 p.

 Dissertação (mestrado) - Instituto Federal
 Catarinense, campus Araquari, , Araquari, 2022.

 Inclui referências.

 1. aquicultura. 2. primer. 3. metabarcoding. I.
 Schleder, Delano Dias . II. Instituto Federal
 Catarinense. . III. Título.

Pedro Henrique Sousa Ferro

**DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE VIABILIDADE E QUANTIFICAÇÃO DE MATERIAL
VESTIGIAL (eDNA) EM TANQUES DE CULTIVO**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Curso de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal, Pró-reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação, Instituto Federal Catarinense.

Data da Defesa: 14/12/2022

Banca examinadora:

Prof. Dr. Delano Dias Schleder

Doutor em Aquicultura pela Universidade Federal de Santa Catarina

Instituição de vínculo: Instituto Federal Catarinense

Prof. Dr. Felipe do Nascimento Vieira

Doutor em Aquicultura pela Universidade Federal de Santa Catarina

Instituição de vínculo: Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Moises Angel Poli

Doutor em Aquicultura pela Universidade Federal de Santa Catarina

Instituição de vínculo: VITAPRO - NICOVITA



Emitido em 14/12/2022

DOCUMENTOS COMPROBATÓRIOS - CAMPUS ARAQUARI Nº 18/2022 - PGPSA/ARAQ (11.01.02.22)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 22/03/2023 12:54)

DELANO DIAS SCHLEDER

PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO

CGET/ARAQ (11.01.02.08)

Matrícula: ###133#8

Visualize o documento original em <https://sig.ifc.edu.br/documentos/> informando seu número: **18**, ano: **2022**, tipo: **DOCUMENTOS COMPROBATÓRIOS - CAMPUS ARAQUARI**, data de emissão: **21/03/2023** e o código de verificação: **22840c3ba3**

DEDICO O PRESENTE TRABALHO À TODA MINHA FAMÍLIA

Agradecimentos

Quero agradecer primeiramente à minha família, que desde o início da minha caminhada esteve presente me auxiliando e incentivando a dar o meu melhor para conquistar os meus sonhos e objetivos. Muitas pessoas gostariam de ter uma família que oferecesse apoio, e eu sou extremamente grato por ter uma. Eu não poderia ter escolhido família melhor para estar, o meu amor por vocês é indescritível. Espero sempre poder retribuir todo carinho e amor que vocês têm por mim.

Ao meu orientador Prof. Dr. Delano D. Schleder que foi meu orientador de Iniciação Científica e me mostrou um novo universo que é a Aquicultura. Sou grato por toda dedicação como orientador, por ter me auxiliado e incentivado a ir em busca de conhecimento científico, contribuindo para minha formação profissional. E ainda, por todas as oportunidades a mim oferecidas durante os trabalhos no Laboratório de Aquicultura.

Agradeço a todos os professores e profissionais que de alguma forma contribuíram para a minha formação. E por fim, a todos os amigos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha caminhada me incentivando e apoiando. Somos fortes quando temos em quem nos apoiar.

“Se a educação sozinha não transforma a sociedade, sem ela tampouco a sociedade muda.”

Paulo Freire

Resumo

SOUSA FERRO, Pedro Henrique. **Determinação do tempo de viabilidade e quantificação de material genômico ambiental (eDNA) em tanques de cultivo.** 2022. 35f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Curso de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal, Pró-reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação, Instituto Federal Catarinense, Araquari, 2022.

Um dos desafios do setor da aquicultura é buscar metodologias mais precisas para identificação e quantificação dos animais nos tanques de criação ao longo do ciclo produtivo, pois a maior precisão destas estimativas é vital para realização de uma criação mais produtiva e sustentável. Para que esta técnica possa auxiliar os produtores de organismos aquáticos e seja viável em escala comercial é necessária a avaliação da especificidade dos primers, para que se maximize a eficácia e minimize os riscos de falsos diagnósticos, e a determinação do tempo de viabilidade do material genômico ambiental na água. Foi avaliada a sensibilidade de primers comerciais e o tempo de viabilidade de DNA ambiental de peixes em ambiente lântico (tanques de cultivo) e a quantificação de camarões em tanques de água clara. As amostras de água foram concentradas e o DNA foi extraído pelo kit PureLink™. As bibliotecas foram quantificadas por qPCR e sequenciadas no sequenciador Miseq (Illumina). Os resultados foram confrontados com o banco de dados de genoma mitocondrial. No experimento com tilápia foram identificadas sequências de DNA que correspondiam à espécie *Oreochromis niloticus*. No experimento realizado com camarão em água clara foi possível identificar sequências de eDNA que correspondiam à espécie *Litopenaeus vannamei*. A amplificação por PCR positiva do DNA ambiental presente nas amostras de água confirmou a eficiência dos *primers* e desta metodologia altamente reprodutível, rápida e tecnicamente fácil para uma boa gestão das propriedades. Os resultados obtidos no presente trabalho fornecerão base teórica e metodologia para a aplicação da tecnologia de eDNA na pesquisa e quantificação de animais nos sistemas de produção da aquicultura.

Palavras-chave: aquicultura; *primer*; *metabarcoding*.

Abstract

SOUSA FERRO, Pedro Henrique. **Determination of viability time and quantification of environmental genomic material (eDNA) in pounds.** 2022. 35f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Curso de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal, Pró-reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação, Instituto Federal Catarinense, Araquari, 2022.

One of the challenges of the aquaculture sector is to seek more precise methodologies for identification and quantification of animals in pounds throughout the production cycle, as greater precision in these estimates is vital for achieving a more productive and sustainable creation. In order for this technique to help fish farmers and be viable on a commercial scale, it is necessary to evaluate the specificity of the primers, in order to maximize the effectiveness and minimize the risks of false diagnoses, and the determination of the time of viability of the eDNA in the water. The sensitivity of commercial primers and the viability time of eDNA from fish in a lentic environment and the quantification of shrimp in clear water ponds were evaluated. The water samples were concentrated and the DNA was extracted by the PureLink™ kit. Libraries were quantified by qPCR and sequenced on the Miseq sequencer (Illumina). The results were compared with the mitochondrial genome database. In the experiment with tilapia, DNA sequences were identified that corresponded to the species *Oreochromis niloticus*. In the experiment carried out with shrimp in clear water, it was possible to identify eDNA sequences that corresponded to the species *Litopenaeus vannamei*. The positive PCR amplification of the environmental DNA present in the water samples confirmed the efficiency of the primers and of this highly reproducible, fast and technically easy methodology for a good management of the properties. The results obtained in this work will provide a theoretical basis and methodology for the application of eDNA technology in the research and quantification of animals in aquaculture production systems.

Keywords: aquaculture; primer; metabarcoding.

Lista de Figuras

Figura 1	Análise de eDNA de camarão	14
----------	----------------------------------	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

eDNA	Ácido Desoxirribonucleico Ambiental
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase

SUMÁRIO

1	CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA E ESTADO DA ARTE	1
1.1	Panorama da Aquicultura	1
1.2	Desafios na Produção de Pescado	2
1.3	Material vestigial (eDNA)	3
1.4	Aplicação prática da quantificação de eDNA	4
2	OBJETIVOS	6
2.1	Geral	6
2.2	Específicos	6
3	DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE VIABILIDADE E QUANTIFICAÇÃO DE MATERIAL VESTIGIAL (eDNA) EM TANQUES DE CULTIVO	7
3.1	Introdução	8
3.2	Materiais e Métodos	10
3.2.1	Coleta das amostras de água para análise da sensibilidade e tempo de viabilidade de eDNA	10
3.2.1	Coleta das amostras para análise de quantificação de camarões marinhos em água clara.....	10
3.2.2	Processamento das amostras	11
3.2.3	Amplificação e sequenciamento de eDNA de Peixes	11
3.2.4	Amplificação e sequenciamento de eDNA de Crustáceos	12
3.3	Resultados	13
3.4	Discussão	15
3.5	Conclusão	18
3.6	Referências	19
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	22
5	REFERÊNCIAS	23

1 CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA E ESTADO DA ARTE

1.1 Panorama da Aquicultura

O consumo anual *per capita* de pescado no mundo cresceu vertiginosamente, a uma taxa maior do que a do consumo de proteínas de animais terrestres, e inclusive a própria taxa de crescimento da população mundial. O crescimento do consumo de pescado variou entre as diferentes regiões e países, devido a fatores culturais, econômicos e geográficos, sendo impulsionado expressivamente pelos países menos desenvolvidos e em desenvolvimento, os quais apresentavam baixo consumo *per capita* médio, e pela China (FAO, 2020). Este panorama mundial está associado a mudanças fundamentais na forma que os consumidores escolhem, adquirem e consomem os pescados atualmente, bem como à crescente busca por uma alimentação mais saudável e sustentável.

Ainda em um cenário marcado por incertezas e desafios devido à Pandemia da COVID-19, o Brasil segue aumentando a sua produção de pescado e no ano de 2021 apresentou um crescimento de 4,7% em relação ao ano anterior (PEIXEBR, 2022). A piscicultura tem grande potencial no Brasil, devido ao clima propício, a sua extensão costeira e dimensão territorial, que possui aproximadamente 13% da água doce renovável do planeta, com disponibilidade hídrica de aproximadamente 10 milhões de hectares de lâmina d'água em reservatórios de hidrelétricas, açudes e propriedades particulares (SIDÔNIO et al., 2012). A maioria das pisciculturas da região Sul e Sudeste possuem até 5 hectares, podendo chegar a mais de 50 hectares, o estado do Paraná possui área de criação total de 6.906 hectares e o estado de São Paulo 2.038 (IBGE, 2017).

Além disso, o país se destaca na produção de crustáceos marinhos. No Brasil, a carcinicultura é liderada pela Região Nordeste, concentrando a produção principalmente nos estados do Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte, região mais

vocacionada para o desenvolvimento da atividade devido às suas condições edafoclimáticas tão favoráveis à exploração do *Litopenaeus vannamei* (ABCC, 2022). Segundo dados da Associação Brasileira de Criadores de Camarão (ABCC), nos últimos anos o Brasil vem aumentando sua produção na carcinicultura e no ano de 2021 produziu 120 mil toneladas de camarão (SEAFOOD BRASIL, 2022).

1.2 Desafios na Produção de Pescado

Um dos desafios na produção de pescado é a presença de fauna acompanhante, que devido a disponibilidade de alimento, pode se desenvolver junto com a espécie-alvo ao longo do ciclo de cultivo, aumentando a biomassa dos viveiros, a disseminação de patógenos, reduzindo a qualidade de água e o ganho de peso da espécie-alvo, uma vez que compete pelo alimento fornecido (MADSEN et al., 2015). Na tilapicultura, algumas espécies de peixes, como por exemplo lambari, traíra e acará, podem entrar nos tanques de cultivo no momento da captação de água do ambiente, competir por alimento e predação os alevinos de tilápia nos primeiros meses de cultivo (SILVA & MASSAGO, 2019).

Nas fazendas de criação de pescado a quantificação dos animais é realizada por amostragem ou por estimativa do consumo de ração que, particularmente nas grandes propriedades, se mostra bastante laboriosa devido à grande extensão territorial e quantidade de tanques de criação presentes, e ainda apresentam baixa precisão. As técnicas de amostragem utilizadas atualmente para quantificação dos animais e estimativa de biomassa são invasivas e não permitem uma gestão precisa da produção. Essas técnicas envolvem um manejo excessivo dos animais, resultando em efeitos negativos sobre eles, como estresse, deterioração do sistema imunológico, diminuição do apetite e da taxa de crescimento, além de predisposição a enfermidades (NASR-ELDAHAN et al., 2021). Como a amostragem e análise de eDNA não é invasiva, melhora a detecção das espécies-alvo sem ocasionar estresse nos animais, mostrando um grande potencial para aplicação na estimativa de animais aquáticos de produção (LI et al., 2020).

O setor da aquicultura tem buscado metodologias mais precisas para quantificação dos animais nos tanques de criação ao longo do ciclo produtivo, pois compreende que a maior precisão destas estimativas é vital para realização de uma criação mais produtiva e sustentável, uma vez que constituem a base para determinar o montante de ração a ser ofertado ao longo do ciclo de produção, evitando assim desperdícios e a contaminação dos corpos d'água adjacentes com efluentes contendo alta carga orgânica (FØRE et al., 2018; HERATH & SATOH, 2022). Adicionalmente, é determinante na tomada de decisões em relação ao manejo, à programação das despescas, às medidas sanitárias frente a enfermidades, e entre outros. Aumentar a precisão na estimativa de biomassa para a alimentação implica em uma maior eficiência produtiva e econômica, visto que em média 70% dos custos de produção na aquicultura é com alimentação.

1.3 Material vestigial (eDNA)

Os métodos moleculares utilizados para determinar a presença de espécies em ecossistemas aquáticos apresentam aplicabilidade tanto para o manejo de produção quanto para estudos ecológicos, com maior rapidez e precisão de detecção do que os métodos tradicionais (MCCLLENAGHAN et al., 2020). As análises de DNA ambiental (eDNA) detectam a presença de uma espécie a partir de vestígios que o organismo deixa no meio ambiente na forma de células excretadas, excrementos ou matéria em decomposição, sem a necessidade de captura (MUHA et al., 2019). Tais análises empregam a reação em cadeia da polimerase padrão (PCR) ou quantitativa (qPCR), as quais são altamente bem-sucedidas na detecção de uma ampla gama de espécies de diferentes grupos taxonômicos em ambientes aquáticos (THOMSEN & WILLERSLEV, 2015; HÄNFLING et al., 2016; MCCLLENAGHAN et al., 2020).

A análise do eDNA possibilita identificar espécies-alvo, ou até mesmo a composição de uma comunidade inteira em larga escala, por meio de DNA *metabarcoding* (MUHA et al., 2019). Nesta técnica, o DNA genômico extraído de

amostras ambientais, como água ou solo, é utilizado para a amplificação de genes-alvo utilizando primers específicos, os quais são sequenciados com tecnologias de sequenciamento de alto desempenho (HÄNFLING et al., 2016). No entanto, para que esta técnica possa auxiliar os produtores de organismos aquáticos e seja viável em escala comercial, alguns pontos ainda precisam ser elucidados. Dentre estes, estão a avaliação da especificidade dos primers, para que se maximize a eficácia e minimize os riscos de falsos diagnósticos, e a determinação do tempo de viabilidade do material genômico vestigial na água (MACDONALD & SARRE, 2017).

No que tange a aquicultura, problemas relacionados à fauna acompanhante e outras espécies invasoras, que podem se desenvolver ao longo do ciclo de cultivo, devem ser identificados e resolvidos o mais breve possível, visto que estes podem comprometer a segurança alimentar do produto final e ocasionar danos econômicos à produção. A determinação do tempo de viabilidade é crucial para que o produtor possa escolher o período correto para fazer a análise e identificar se há ou não presença de outras espécies que estão se desenvolvendo junto à espécie-alvo, e tomar as medidas apropriadas caso necessário (THOMSEN & WILLERSLEV, 2015). Caso seja realizada precocemente pode detectar espécies presentes no corpo d'água de captação da água de cultivo, mas que não entraram nos tanques de cultivo. Por outro lado, se for muito tardio os problemas acarretados por esta fauna acompanhante podem não ser mais reversíveis, ou não seja mais viável realizar nenhuma medida de remediação.

1.4 Aplicação prática da quantificação de eDNA

Para uma gestão eficiente da produção, é necessário obter resultados precisos sobre a quantidade de animais, biomassa e peso médio dos animais presentes nos tanques. A precisão desses dados implica em tomadas de decisão mais assertivas em relação à quantidade de alimentação a ser ofertada, conversão alimentar, mortalidade dos animais e previsão de lucros com a venda do lote (FØRE et al., 2018). Na maioria das vezes a quantidade de animais povoados nos tanques é conhecido, porém a

abundância e biomassa no final do ciclo de produção não é conhecida com exatidão. Isso porque durante o ciclo podem ocorrer mortes por predação de aves aquáticas, espécies invasoras que entram junto à água captada, infecção por diferentes patógenos como parasitas, vírus e bactérias (SIDÔNIO et al., 2012; MADSEN et al., 2015; SILVA & MASSAGO, 2019). Após um evento sanitário para controle das pragas que podem afetar o cultivo, pode se passar duas semanas para ajustar a biomassa aproximada dos tanques, isso significa duas semanas de alimentação ineficiente que se traduz em baixa eficiência produtiva.

As técnicas de gestão e manejo da produção atuais são altamente invasivas, causam estresse nos animais, têm grande demanda de mão de obra e possuem baixa precisão nos dados obtidos (cerca de 80% de precisão na estimativa da biomassa) (Li et al., 2020). Isso porque a biomassa geralmente é estimada pela coleta de uma parte dos animais presentes nos tanques e por observação visual. O estabelecimento de técnicas precisas pode trazer para os aquicultores uma gestão mais precisa e eficiente da propriedade, previsão dos lucros, diminuição de perdas de lucros pelo uso em excesso de ração e contribuição para uma aquicultura mais sustentável, visto que os excessos de ração podem contaminar os cursos hídricos adjacentes com alta carga de matéria orgânica.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a sensibilidade *dos primers* em identificar e quantificar material vestigial (eDNA) de pescado em ambiente lêntico (tanques de cultivo).

2.2 Específicos

Avaliar a detecção e identificação dos organismos aquáticos de interesse pelos *primers*;

Determinar o tempo de viabilidade do eDNA na água;

Quantificar o eDNA presente na água dos tanques de cultivo;

Comparar a quantificação do eDNA em diferentes densidades de estocagem.

3 DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE VIABILIDADE E QUANTIFICAÇÃO DE MATERIAL VESTIGIAL (EDNA) EM TANQUES DE CULTIVO¹

AQUACULTURE ENGINEERING: <https://www.elsevier.com/journals/aquacultural-engineering/0144-8609/guide-for-authors>

Pedro Henrique Sousa Ferro^{1 2}; Delano Dias Schleder^{1 2}

¹Laboratório de Aquicultura, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Catarinense – IFC, Araquari, SC, 89245-000, Brasil

²Mestrado Profissional em Produção e Sanidade Animal, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Catarinense – IFC, Araquari, SC, 89245-000, Brasil

¹ Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor

3.1 Introdução

As aplicações práticas do eDNA (DNA ambiental) estão em crescimento exponencial, especialmente para a avaliação e monitoramento de ambientes aquáticos, sendo bastante utilizada para levantamento ecológico de espécies presentes em corpos hídricos (Coster et al., 2021; Sanchez et al., 2022; Thomsen and Willerslev, 2015; Valentini et al., 2016). Como a amostragem e análise de eDNA não é invasiva, melhora a detecção das espécies-alvo sem ocasionar estresse nos animais (Li et al., 2020; Thomsen and Willerslev, 2015). Esta técnica tem grande potencial para aplicação na estimativa de animais aquáticos de produção, pois nas fazendas de criação de pescado a quantificação dos animais é realizada por amostragem ou por estimativa do consumo de ração que, particularmente nas grandes propriedades, se mostra bastante laboriosa, lenta e imprecisa devido à grande extensão territorial e quantidade de tanques de criação presentes (Li et al., 2020). O eDNA também apresenta potencial para identificação de espécies invasoras, mesmo quando em baixas densidades, em qualquer fase da vida, mostrando-se promissora para utilizar ao longo de todo o período de cultivo (Coster et al., 2021; King et al., 2022). A detecção precoce de novas invasões e posterior vigilância dessas e de invasões mais antigas é fundamental para a implementação de estratégias de manejo para limitar os impactos nocivos dessas espécies (Thomas et al., 2020).

Os métodos moleculares utilizados para determinar a presença de espécies em ecossistemas aquáticos apresentam aplicabilidade tanto para o manejo de produção quanto para estudos ecológicos, com maior rapidez e precisão de detecção do que os métodos tradicionais (McClenaghan et al., 2020). As análises de eDNA detectam a presença de uma espécie a partir de vestígios que o organismo deixa no meio ambiente na forma de células excretadas, excrementos ou matéria em decomposição, sem a necessidade de captura (Muha et al., 2019). Tais análises empregam a reação em cadeia da polimerase padrão (PCR) ou quantitativa (qPCR), as quais são altamente bem-

sucedidas na detecção de uma ampla gama de espécies de diferentes grupos taxonômicos em ambientes aquáticos (Hänfling et al., 2016; McClenaghan et al., 2020; Thomsen and Willerslev, 2015).

A análise do eDNA possibilita identificar espécies-alvo, ou até mesmo a composição de uma comunidade inteira em larga escala, por meio de DNA *metabarcoding* (Muha et al., 2019). Nesta técnica, o DNA genômico extraído de amostras ambientais, como água ou solo, é utilizado para a amplificação de genes-alvo utilizando primers específicos, os quais são sequenciados com tecnologias de sequenciamento de alto desempenho (Hänfling et al., 2016). Muitos fatores influenciam a detectabilidade do eDNA de amostras de água (Stewart, 2019). O corpo d'água e suas características, bem como as condições ambientais externas, são algumas das razões para os resultados variados da análise de eDNA (Buxton et al., 2017). A combinação de processos abióticos com fatores bióticos pode determinar o tempo e grau de degradação do eDNA presente (Thomsen and Willerslev, 2015).

Atualmente, o setor da aquicultura tem buscado metodologias mais precisas para quantificação dos animais nos tanques de criação ao longo do ciclo produtivo, pois compreende que a maior precisão destas estimativas é vital para realização de uma criação mais produtiva e sustentável, uma vez que constituem a base para determinar o montante de ração a ser ofertado ao longo do ciclo de produção, evitando assim desperdícios e a contaminação dos corpos d'água adjacentes com efluentes contendo alta carga orgânica e aumentando a eficiência produtiva (Herath and Satoh, 2022; Li et al., 2020). Adicionalmente, é determinante na tomada de decisões em relação ao manejo, à programação das despescas, às medidas sanitárias frente a enfermidades, e entre outros. Por esses motivos, o presente estudo buscou avaliar a eficiência da técnica de *metabarcoding* de eDNA em identificar e quantificar material vestigial de pescado nos tanques de cultivo.

3.2 Materiais e Métodos

O trabalho foi desenvolvido e executado no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Catarinense - Campus Araquari, Brasil.

3.2.1 Coleta das amostras de água para análise da sensibilidade e tempo de viabilidade de eDNA

Para a análise da sensibilidade e tempo de viabilidade de eDNA foi utilizada água de três tanques de cultivo de 300 L povoados com tilápias-do-nilo, *Oreochromis niloticus*, com biomassa de $\pm 600\text{g}$ cada tanque, a qual foi transferida para três tanques de polietileno (60L), previamente limpos e tratados com agentes desnaturantes de ácidos nucleicos (solução de peróxido de hidrogênio a 1% e RNAzap). Para análise de eDNA foram coletadas amostras de água de cada tanque, aproximadamente 10 cm abaixo da superfície e em três etapas: coleta no dia da transferência da água (T0), 15 dias após (T15) e 30 dias após a transferência (T30). Para minimizar o risco de contaminação cruzada, foram utilizadas luvas nitrílicas descartáveis, materiais de coleta estéreis e livres de RNase, DNase, e pirogênios, bem como os materiais utilizados na transferência da água para os tanques de 60L foram pré-tratados com agentes desnaturantes de ácidos nucleicos.

3.2.1 Coleta das amostras para análise de quantificação de camarões marinhos em água clara

Para a análise de quantificação de camarões marinhos em água clara foi utilizada água de seis tanques experimentais de 500 L povoadas com camarões da espécie *Litopenaeus vannamei*, três tanques foram povoados com um animal de $\pm 13\text{g}$ cada (N1A, N1B E N1C) com densidade final de 2 camarões m^{-3} . Três tanques foram povoados com 10 animais de $\pm 13\text{g}$ cada (N10A, N10B E N10C) com densidade final de 20 camarões

m⁻³. Para análise de eDNA foram coletadas amostras de 1L de água de cada tanque, aproximadamente 10 cm abaixo da superfície 10 dias após o povoamento dos animais. Para minimizar o risco de contaminação cruzada, foram utilizadas luvas nitrílicas descartáveis e materiais de coleta todos estéreis e livres de RNase, DNase e pirogênios.

3.2.2 Processamento das amostras

As amostras de água foram concentradas e o DNA foi extraído pelo kit PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, CA, USA). O DNA extraído foi encaminhado para o preparo de biblioteca, sendo este realizado em duas etapas de PCR. Amostras de tilápia e camarão, para os controles positivos, foram da mesma forma extraídas com o uso do kit PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, CA, USA).

3.2.3 Amplificação e sequenciamento de eDNA de Peixes

O método Fish Food Defense baseia-se na amplificação por PCR de regiões específicas do DNA mitocondrial de peixes, para subsequente sequenciamento utilizando tecnologia MiSeq (Illumina, Inc. USA). O preparo das bibliotecas foi realizado em dois passos de PCR, o primeiro contendo os *primers* específicos para o gene alvo e o segundo PCR para inclusão dos adaptadores P5 e P7 (Illumina). Os *primers* alvo específico usados na primeira PCR identificam regiões conservadas no DNA mitocondrial de centenas de espécies de peixes e amplificam regiões hipervariáveis, fornecendo um “*código de barras*” que permite identificar os peixes com um refinamento taxonômico a nível de espécie. Os *primers* foram baseados na publicação de Sato et al. (2018). As bibliotecas foram quantificadas por qPCR e logo após normalizadas. As bibliotecas foram sequenciadas no sequenciador Miseq (Illumina) e os resultados confrontados com o banco de dados de genoma mitocondrial de peixes MitoFish, que contém mitogenomas de milhares de espécies de peixes (Sato et al., 2018).

3.2.4 Amplificação e sequenciamento de eDNA de Crustáceos

O ensaio de detecção de DNA de crustáceos foi desenvolvido para a identificação de crustáceos da ordem Decapoda, que compreendem os exemplares comerciais do subfilo Crustacea. Dentre os alvos estão camarões, caranguejos, siris e lagostas. O DNA extraído foi encaminhado para o preparo de biblioteca, sendo este realizado em duas etapas de PCR. A PCR1 foi realizada com *primers* específicos para a ordem Decapoda do subfilo Crustacea, com adaptadores nas extremidades 5'. A PCR2 foi realizada para a adição de índice (sequência nucleotídica única). O *Food Defense* - DNA Crustáceo foi realizado em sequenciamento do tipo *paired-end*, com cobertura de 10.000 *reads*, utilizando o sequenciador MiSeq, da plataforma Illumina. Após o término do sequenciamento, os dados foram transferidos automaticamente para o software Basespace (Illumina, USA) e para o backup na nuvem (Google Cloud). Os dados foram então submetidos a análises de Bioinformática. Inicialmente, foi feita a conversão dos arquivos brutos do sequenciamento em arquivos fastq utilizando *pipelines* de bioinformática, e as sequências foram filtradas em relação à qualidade de bases sequenciadas (Q30). Em seguida, o *pipeline* Neotools foi utilizado para análise e interpretação dos resultados a partir dos dados do sequenciamento.

3.3 Resultados

No experimento de análise de eDNA com peixes foi possível identificar sequências de DNA em dois tanques (réplicas) na coleta T0, e todas correspondiam à espécie *O. niloticus*. No Tanque 1 foi encontrado 2019 e no Tanque 2 114861 sequências. Já no Tanque 3 foi encontrado apenas uma sequência, a qual não mostrou identidade com nenhuma espécie de organismos aquáticos (sem identificação). Na coleta T15 foram identificadas 2243 sequências de DNA em apenas uma amostra e no T30 apenas 3 sequências foram identificadas (uma em cada amostra), não sendo possível identificar a espécie.

No experimento realizado com camarão em água clara foi possível identificar sequências de eDNA de camarão nas amostras coletadas, e todas correspondiam à espécie *Litopenaeus vannamei*. Conforme pode ser observado na Fig. 1, no Tanque N10A foi encontrado 30765 sequências e no Tanque N10C foi encontrado 20570 sequências. Devido à um erro no processamento não foi possível analisar a amostra do Tanque N10B. Já no Tanque N1A foi encontrado 6586 sequências, no Tanque N1B 3642 sequências e no Tanque N1C 2915 sequências. Com isso, pode-se observar que ao passo que se aumentou a densidade em 10 vezes, o número de sequências encontradas nas análises de eDNA aumentou em termos médios 6 vezes. Desta forma, pode indicar uma correlação entre a densidade de animais presentes no tanque e a quantidade de sequências encontradas.

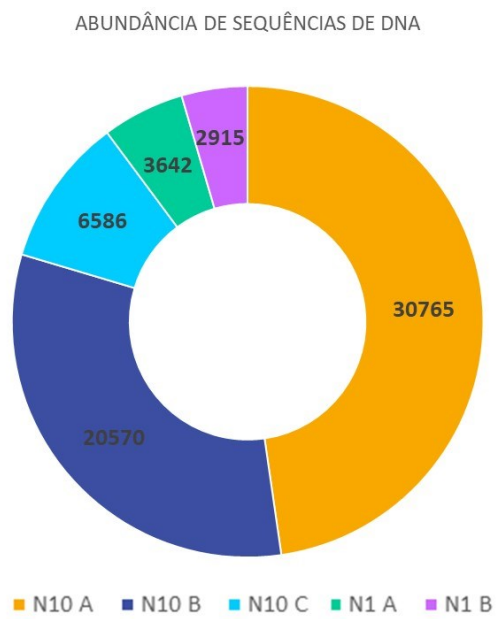


Fig. 1 - Análise de eDNA de camarão

3.4 Discussão

Os *primers* utilizados no ensaio de análise de eDNA de peixes mostraram sensibilidade em relação à espécie alvo quando testadas amostras de água em diferentes períodos de estocagem. A detecção do eDNA em meio aquático depende de sua liberação e degradação, bem como a densidade dos indivíduos influencia a dinâmica da detectabilidade em amostras de água (Stewart, 2019). Uma vez liberado dos organismos, o DNA extracelular no meio ambiente pode persistir, adsorvido em partículas orgânicas ou inorgânicas, mas também pode ser transformado por microrganismos competentes do solo ou pode ser degradado (Parsons et al., 2018). Vários fatores atuam na degradação do DNA, como nucleases endógenas, água, radiação ultravioleta e a ação de bactérias e fungos no meio ambiente contribuem para a decomposição do DNA (Buxton et al., 2017; Harper et al., 2019; Stewart, 2019).

A compreensão do período de degradação do eDNA pode auxiliar a diferenciar se as espécies detectadas nas amostras estão presentes nos tanques de cultivo ou se estavam presentes somente no corpo hídrico de captação. A degradação pode ocorrer diretamente pela desnaturação do DNA ou indiretamente de acordo com fatores ambientais pelo aumento da atividade enzimática e do metabolismo microbiano, podendo persistir de horas há dias em amostras de água (Stewart, 2019). Essa variação pode ser influenciada também pela espécie analisada, tamanho e estágio reprodutivo dos animais (Karlsson et al., 2022; Laporte et al., 2022). A diminuição da detecção do eDNA após a primeira coleta observada no presente trabalho vai de acordo com o encontrado em outros trabalhos em que o eDNA pode iniciar sua degradação no ambiente a partir de 24 horas após ser excretado no ambiente (Karlsson et al., 2022; Moyer et al., 2014; Muha et al., 2019). Estudos futuros são necessários para definir de forma precisa o período da degradação do eDNA nos tanques de cultivo, que no presente estudo ocorreu principalmente ente 15 e 30 dias.

A identificação do eDNA de tilápia no primeiro experimento mostra o potencial desta tecnologia no monitoramento de espécies invasoras que podem adentrar nos

tanques de cultivo no momento da captação de água. Auxiliando os produtores a terem um maior controle na gestão da produção e também na tomada de decisões quanto a intervir se houver presença de espécies invasoras nos tanques de cultivo.

Cada espécie tem características biológicas que podem influenciar a quantidade de eDNA liberado na água e, portanto, de acordo com a espécie as taxas de detecção podem diferir. O exoesqueleto rígido do camarão pode limitar a liberação de eDNA em comparação com peixes, que estão em contato direto com o corpo d'água (Andruszkiewicz Allan et al., 2021). Embora haja uma diferença na quantidade de sequências (diferença de 6 vezes entre os tratamentos) encontradas em cada tanque, pode-se estabelecer uma relação da quantidade de animais (diferença de 10 vezes entre os tratamentos) e a abundância de eDNA, visto que nos tanques com maior densidade de estocagem o número de sequências encontradas foi maior em relação aos de menor densidade.

A aquicultura abrange a produção de uma ampla gama de espécies em ambiente de água doce e marinha, como peixes, moluscos, crustáceos, anfíbios, répteis e plantas aquáticas. Deste modo, para uma aplicabilidade de um produto comercial são necessárias abordagens técnicas em que seja possível analisar vários táxons que habitam variados ambientes de cultivo. O *metabarcoding* de eDNA oferece um método potencial para identificar espécies de peixes e crustáceos precocemente e implementar planos de manejo, mesmo no estágio larval (Karlsson et al., 2022; Laporte et al., 2022; Valentini et al., 2016). É extremamente sensível, capaz de detectar DNA em concentrações de 0,02% da biomassa total analisada, além de detectar uma variedade de táxons simultaneamente, podendo ser aplicado tanto em ambientes de água doce quanto marinhos (Hatzenbuehler et al., 2017; Thomsen and Willerslev, 2015).

Nossos resultados mostram um grande potencial para a identificação e quantificação de espécies aquáticas. Estudos futuros são necessários para determinar a relação da densidade com a quantidade de sequências encontradas nas amostras, definir os protocolos de bioinformática e a interpretação dos dados a serem utilizados.

Além de realizar a experimentação em diferentes condições de cultivo e variáveis ambientais, com uma maior quantidade de repetições, com e sem renovação de água, com e sem alta carga orgânica, diferentes temperaturas, cultivo com mais de uma espécie e tempo de cultivo.

3.5 Conclusão

A amplificação por PCR positiva do eDNA presente nas amostras de água confirmou a eficiência dos primers e desta metodologia em detectar eDNA de peixe e camarão em tanques de cultivo. Foi possível identificar a taxonomia dos animais à nível de espécie. Apesar de ter sido observado uma relação entre as sequências de eDNA e a quantidade de camarões presentes nos tanques novos estudos em variadas densidades de estocagem e condições de cultivo são necessários para definir a correlação da quantidade de animais e o número de sequências identificadas pelas análises de eDNA.

3.6 Referências

- Andruszkiewicz Allan, E., Zhang, W.G., C. Lavery, A., F. Govindarajan, A., 2021. Environmental DNA shedding and decay rates from diverse animal forms and thermal regimes. *Environmental DNA* 3, 492–514. <https://doi.org/10.1002/edn3.141>
- Buxton, A.S., Groombridge, J.J., Zakaria, N.B., Griffiths, R.A., 2017. Seasonal variation in environmental DNA in relation to population size and environmental factors. *Sci Rep* 7, 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep46294>
- Coster, S.S., Dillon, M.N., Moore, W., Merovich, G.T., 2021. The update and optimization of an eDNA assay to detect the invasive rusty crayfish (*Faxonius rusticus*). *PLoS One* 16, 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259084>
- Hänfling, B., Handley, L.L., Read, D.S., Hahn, C., Li, J., Nichols, P., Blackman, R.C., Oliver, A., Winfield, I.J., 2016. Environmental DNA metabarcoding of lake fish communities reflects long-term data from established survey methods. *Mol Ecol* 25, 3101–3119. <https://doi.org/10.1111/mec.13660>
- Harper, L.R., Buxton, A.S., Rees, H.C., Bruce, K., Brys, R., Halfmaerten, D., Read, D.S., Watson, H. V., Sayer, C.D., Jones, E.P., Priestley, V., Mächler, E., Múrria, C., Garcés-Pastor, S., Medupin, C., Burgess, K., Benson, G., Boonham, N., Griffiths, R.A., Lawson Handley, L., Hänfling, B., 2019. Prospects and challenges of environmental DNA (eDNA) monitoring in freshwater ponds. *Hydrobiologia* 826, 25–41. <https://doi.org/10.1007/s10750-018-3750-5>
- Hatzenbuehler, C., Kelly, J.R., Martinson, J., Okum, S., Pilgrim, E., 2017. Sensitivity and accuracy of high-throughput metabarcoding methods for early detection of invasive fish species. *Sci Rep* 7, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep46393>
- Herath, S.S., Satoh, S., 2022. 15 - Environmental impacts of nitrogen and phosphorus from aquaculture, in: Davis, D.A.B.T.-F. and F.P. in A. (Second E. (Ed.), *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*. Woodhead Publishing, Oxford, pp. 427–444. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821598-2.00010-2>
- Karlsson, E., Ogonowski, M., Sundblad, G., Sundin, J., Svensson, O., Nousiainen, I., Vasemägi, A., 2022. Strong positive relationships between eDNA concentrations and biomass in juvenile and adult pike (*Esox lucius*) under controlled conditions: Implications for monitoring. *Environmental DNA* 1–13. <https://doi.org/10.1002/edn3.298>
- King, A.C., Krieg, R., Weston, A., Zenker, A.K., 2022. Using eDNA to simultaneously detect the distribution of native and invasive crayfish within an entire country. *J Environ Manage* 302, 113929. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113929>

Laporte, M., Berger, C.S., García-Machado, E., Côté, G., Morissette, O., Bernatchez, L., 2022. Cage transplant experiment shows weak transport effect on relative abundance of fish community composition as revealed by eDNA metabarcoding. *Ecol Indic* 137, 0–7. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2022.108785>

Li, D., Hao, Y., Duan, Y., 2020. Nonintrusive methods for biomass estimation in aquaculture with emphasis on fish: a review. *Rev Aquac* 12, 1390–1411. <https://doi.org/10.1111/raq.12388>

McClenaghan, B., Compson, Z.G., Hajibabaei, M., 2020. Validating metabarcoding-based biodiversity assessments with multi-species occupancy models: A case study using coastal marine eDNA. *PLoS One* 15, 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224119>

Moyer, G.R., Díaz-Ferguson, E., Hill, J.E., Shea, C., 2014. Assessing environmental DNA detection in controlled lentic systems. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103767>

Muha, T.P., Robinson, C.V., de Leaniz, C.G., Consuegra, S., 2019. An optimised eDNA protocol for detecting fish in lentic and lotic freshwaters using a small water volume. *PLoS One* 14, 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219218>

Parsons, K.M., Everett, M., Dahlheim, M., Park, L., 2018. Water, water everywhere: Environmental DNA can unlock population structure in elusive marine species. *R Soc Open Sci* 5. <https://doi.org/10.1098/rsos.180537>

Sanchez, L., Boulanger, E., Arnal, V., Boissery, P., Dalongeville, A., Dejean, T., Deter, J., Guellati, N., Holon, F., Juhel, J.-B., Lenfant, P., Leprieur, F., Valentini, A., Manel, S., Mouillot, D., 2022. Ecological indicators based on quantitative eDNA metabarcoding: the case of marine reserves. *Ecol Indic* 140, 108966. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2022.108966>

Sato, Y., Miya, M., Fukunaga, T., Sado, T., Iwasaki, W., 2018. MitoFish and mifish pipeline: A mitochondrial genome database of fish with an analysis pipeline for environmental DNA metabarcoding. *Mol Biol Evol* 35, 1553–1555. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy074>

Stewart, K.A., 2019. Understanding the effects of biotic and abiotic factors on sources of aquatic environmental DNA. *Biodivers Conserv* 28, 983–1001. <https://doi.org/10.1007/s10531-019-01709-8>

Thomas, A.C., Tank, S., Nguyen, P.L., Ponce, J., Sinnesael, M., Goldberg, C.S., 2020. A system for rapid eDNA detection of aquatic invasive species. *Environmental DNA* 2, 261–270. <https://doi.org/10.1002/edn3.25>

Thomsen, P.F., Willerslev, E., 2015. Environmental DNA - An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biol Conserv* 183, 4–18. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.019>

Valentini, A., Taberlet, P., Miaud, C., Civade, R., Herder, J., Thomsen, P.F., Bellemain, E., Besnard, A., Coissac, E., Boyer, F., Gaboriaud, C., Jean, P., Poulet, N., Roset, N., Copp, G.H., Geniez, P., Pont, D., Argillier, C., Baudoin, J.M., Peroux, T., Crivelli, A.J., Olivier, A., Acqueberge, M., Le Brun, M., Møller, P.R., Willerslev, E., Dejean, T., 2016. Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Mol Ecol* 25, 929–942. <https://doi.org/10.1111/mec.13428>

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho serve como base para o desenvolvimento de uma metodologia que tem grande potencial para a solução de gargalos importantes do setor aquícola. Essa tecnologia tem potencial para detectar e quantificar espécies presentes no sistema de cultivo com múltiplas possibilidades, que vão desde a detecção de espécies invasoras nos tanques de cultivo à quantificação das espécies-alvo para planejamento de alimentação e despesca. Foi possível observar que a densidade nos tanques de cultivo pode impactar na quantidade de sequências de material genômico presente nas amostras. Novos estudos estão previstos para solucionar os desafios encontrados e padronização da técnica de identificação e quantificação de eDNA.

5 REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA PISCICULTURA, PeixeBr. **Anuário 2022 Peixe BR da Piscicultura**. Disponível em: <<https://www.peixebr.com.br/anuario2022/>>. Acessado em: 25 jun 2022.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE CAMARÃO, ABCC. **CENSO DA CARCINICULTURA DO CEARÁ, PIAUÍ E RIO GRANDE DO NORTE**. Disponível em: <<https://abccam.com.br/wp-content/uploads/2022/12/CENSO-CE-PI-RN-VERSAO-DIGITAL0612-1.pdf>>. Acessado em: 09 jan 2023.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. **Sustainability in Action**. 2020.

FØRE, M.; FRANK, K.; NORTON, T.; SVENDSEN, E.; ALFREDSEN, J. A.; DEMPSTER, T.; BERCKMANS, D. Precision fish farming: A new framework to improve production in aquaculture. **Biosystems Engineering**, 173, 176–193, 2018.

HÄNFLING, B.; HANDLEY, L.L.; READ, D.S.; HAHN, C.; LI, J.; NICHOLS, P.; BLACKMAN, R.C.; OLIVER, A.; WINFIELD, I.J. Environmental DNA metabarcoding of lake fish communities reflects long-term data from established survey methods. **Molecular ecology**, 25, 13, 3101-3119, 2016.

HERATH, S. S.; SATOH, S. 15 - Environmental impacts of nitrogen and phosphorus from aquaculture. *In*: DAVIS, D. A. B. T.-F. AND F. P. IN A. (SECOND E. (Org.). **Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition**. Oxford: Woodhead Publishing, p. 427–444, 2022.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Agropecuário 2017. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/21814-2017-censo-agropecuaria.html?=&t=resultados_2017>. Acessado em: 25 jun 2022.

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

MACDONALD, A. J.; SARRE, S. D. A framework for developing and validating taxon-specific primers for specimen identification from environmental DNA. **Molecular Ecology Resources**, 17, 4, 708–720, 2017.

MADSEN, H.; DUNG, B. T.; VIET, N. K.; DALSGAARD, A.; VAN, P. T. The role of rice fields, fish ponds and water canals for transmission of fish-borne zoonotic trematodes in aquaculture ponds in Nam Dinh Province, Vietnam. **Parasites & vectors**, 8, 625, 2015.

McCLENAGHAN, B.; COMPSON, Z. G.; HAJIBABAEI, M. Validating metabarcoding-based biodiversity assessments with multi-species occupancy models: A case study using coastal marine eDNA. **PloS one**, 15, 3, e0224119, 2020.

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

NASR-ELDAHAN, S.; NABIL-ADAM, A.; SHREADAH, M. A.; MAHER, A. M.; EL-SAYED ALI, T. A review article on nanotechnology in aquaculture sustainability as a novel tool in fish disease control. **Aquaculture International**, 29, 4, 1459–1480, 2021.

SEAFOOD BRASIL. **8º Anuário Seafood Brasil de Produtos, Serviços e Conteúdo**. Disponível em: <<https://www.seafoodbrasil.com.br/revista/seafood-brasil-45-8th-yearbook-8-anuario>>. Acessado em: 09 jan 2023.

SIDÔNIO, L.; CAVALCANTI, I.; CAPANEMA, L. X. D. L.; MORCH, R. B., MAGALHÃES, G.; LIMA, J. F.; MUNGIOLI, R. P. Panorama da aquicultura no Brasil: desafios e oportunidades. **BNDES Setorial**, 421-463, 2012.

SILVA, Bruno Corrêa da; MASSAGO, Haluko. Monocultivo de tilápia em viveiros escavados em Santa Catarina. **Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI)**, p. 82, 2019.

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