



Uema
UNIVERSIDADE ESTADUAL
DO MARANHÃO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO - UEMA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA
REDE BIONORTE

**ASPECTOS TRÓFICOS, ECOLÓGICOS E MOLECULARES COMO
FERRAMENTA DE MONITORAMENTO DA BIODIVERSIDADE EM
UM COMPLEXO PORTUÁRIO NA COSTA AMAZÔNICA
BRASILEIRA**

JORDANA ADORNO FURTADO

São Luís - MA

2025

JORDANA ADORNO FURTADO

**ASPECTOS TRÓFICOS, ECOLÓGICOS E MOLECULARES COMO
FERRAMENTA DE MONITORAMENTO DA BIODIVERSIDADE EM
UM COMPLEXO PORTUÁRIO NA COSTA AMAZÔNICA
BRASILEIRA**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Estadual do Maranhão, como requisito para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientadora: Prof^{fa}. Dr^a. Ligia Tchaicka.

São Luís - MA

2025

Furtado, Jordana Adorno

Aspectos tróficos, ecológicos e moleculares como ferramenta de monitoramento da biodiversidade em um Complexo Portuário na Costa Amazônica Brasileira / Jordana Adorno Furtado. – São Luis, MA, 2025.

174 f

Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia – Rede Bionorte) - Universidade Estadual do Maranhão, 2025.

Orientador: Profa. Dra. Ligia Tchaicka.

1.Biodiversidade. 2.Metabarcoding. 3.Fatores Ambientais. 4. Qualidade da água. 5.Complexo Estuarino. I.Titulo.

CDU: 574.1:556.546

JORDANA ADORNO FURTADO

**ASPECTOS TRÓFICOS, ECOLÓGICOS E MOLECULARES COMO
FERRAMENTA DE MONITORAMENTO DA BIODIVERSIDADE EM
UM COMPLEXO PORTUÁRIO NA COSTA AMAZÔNICA
BRASILEIRA**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Estadual do Maranhão, como requisito para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Aprovada em 22 /12 /2025

Banca examinadora

LIGIA
TCHAICKA:03122063
999

Assinado de forma digital por
LIGIA TCHAICKA:03122063999
Dados: 2026.02.10 11:04:44
-03'00'

Profª. Dra. Ligia Tchaicka (Orientadora)
Universidade Estadual do Maranhão

Documento assinado digitalmente



JORGE LUIZ SILVA NUNES
Data: 23/02/2026 10:41:10-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Jorge Luiz Silva Nunes
Universidade Federal do Maranhão

Documento assinado digitalmente



DEBORA MARTINS SILVA SANTOS
Data: 11/02/2026 15:10:58-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profª. Dra. Débora Martins Silva Santos
Universidade Estadual do Maranhão



Documento assinado digitalmente

NANCYLENI PINTO CHAVES BEZERRA

Data: 13/02/2026 11:01:16-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dra. Nancyleni Pinto Chaves Bezerra
Universidade Estadual do Maranhão



Documento assinado digitalmente

LUIS FERNANDO CARVALHO COSTA

Data: 20/02/2026 10:48:05-0300


Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Luis Fernando Carvalho Costa
Universidade Federal do Maranhão

TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO

Eu, **Jordana Adorno Furtado**, () autorizo (X) não autorizo a publicação da versão final aprovada de minha Tese de Doutorado intitulada “**Aspectos tróficos, ecológicos e moleculares como ferramenta de monitoramento da biodiversidade em um Complexo Portuário na Costa Amazônica Brasileira**” no Portal do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia – Rede BIONORTE (PPG-BIONORTE), bem como no repositório de Teses da CAPES ou junto à biblioteca da Instituição Certificadora.

Local/Data: São Luís, Maranhão, 22 de dezembro de 2025.

Documento assinado digitalmente
 **JORDANA ADORNO FURTADO**
Data: 10/02/2026 09:46:04-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Jordana Adorno Furtado

CPF: 057.653.983-08

Dedico aos meus pais,

Agnailda Adorno e Ivaldo Furtado,

Sou imensamente grata pelo amor incondicional, cuidado e por sempre estarem ao meu lado, mesmo nos momentos mais difíceis. De todos os títulos que tenho ou vier a ter, ser filha de vocês é o que mais me enche de orgulho. Amo vocês para todo o sempre!

AGRADECIMENTOS

Com lágrimas nos olhos e profunda gratidão, escrevo estes agradecimentos. Antes de tudo, agradeço ao meu Deus, que esteve e está comigo em todos os momentos da minha vida. Uma canção de que gosto muito diz: “Se eu não tenho a Ti, não tenho nada, nada eu serei sem Ti, Senhor”. E, de fato, se não fosse pelo Teu imenso amor e misericórdia, eu jamais teria chegado até aqui. Por isso, rendo graças ao Senhor, pois ele é bom e a sua misericórdia dura para sempre (Sl 136:1).

Aos meus amados pais, o que seria de mim sem vocês? Eu sempre digo isso e vocês sorriem. Obrigada por serem minha base, meu alicerce e meus maiores incentivadores. Vocês são o porto seguro onde encontro conforto e segurança. Sou eternamente grata por todo o esforço de vocês para amenizar qualquer cansaço ou sobrecarga que eu viesse a sentir. Agradeço também ao meu irmão, Caio Jordão, por me apoiar sempre e por nunca poupar esforços para me ver feliz. Vocês são o que tenho de mais precioso nessa vida. Amo vocês!

Ao Vinicius Maciel, obrigada por estar sempre pronto para me ajudar, me aconselhar ou simplesmente ouvir meus desabaços. É tão bom partilhar a vida com você, meu amor! Te admiro como pesquisador, como profissional e como companheiro. Como eu sempre digo, você é meu adulto premium Pro Max. Agradeço o cuidado e paciência em todos os momentos. Também sou muito grata à sua família pelo carinho e acolhimento.

A todos os meus familiares, membros da família Adorno e da família Furtado, agradeço pelo incentivo e pelo encorajamento. Em especial à minha avó paterna, Maria José (in memoriam), que nos deixou semanas antes da minha qualificação. Ela amava ver as fotos e vídeos das coletas, e como uma boa degustadora de peixes quase sempre acertava o nome dos exemplares que eu mostrava. Tenho certeza de que a senhora estaria feliz em ver até onde chegamos, vovó.

Aos meus irmãos em Cristo Jesus, membros da Igreja Batista do Calvário, obrigada pelo carinho, pelas orações e pelas palavras de encorajamento ao longo desta caminhada. De modo especial, agradeço ao meu pastor Vladimir Camilo pelo apoio.

Agradeço à tia Ilza pelo cuidado e carinho, assim como aos meus amigos de infância e irmãos do coração: Theyssa, Damiris, Irla, Matheus, Dânia e Yasmin. Juntos, partilhamos sonhos e alegrias. Agradeço especialmente à Theyssa, não só pelas conversas aleatórias que me arrancaram boas gargalhadas em dias que eu não estava tão bem, mas também pelos diálogos profundos e reflexivos sobre a vida. Louvo e agradeço a Deus pela vida de cada um de vocês!

Agradeço às amigas que conquistei durante a graduação na UFMA e que seguem comigo até hoje, as “xubas” Amanda Oliveira, Lisana Cavalcanti e Nágela Gardênia. Sou grata pela amizade, pela parceria e pelos ensinamentos compartilhados. Vocês tornam os meus dias mais leves, meninas.

À minha orientadora, Prof. Lígia Tchaicka, pela confiança, pelo incentivo e por me encorajar a sempre seguir em frente. Quando comecei a trabalhar com a senhora em 2018, eu não fazia ideia de quantas empreitadas ainda teríamos pela frente. Obrigada por confiar a mim um trabalho tão desafiador.

À prof. Patrícia Diniz (que eu chamo carinhosamente de prof. Paty), obrigada por ser tão gentil e atenciosa. Seus conselhos são sempre preciosos!

Agradeço aos professores Débora Santos, Jorge Nunes, Nancyleni Bezerra e Luís Fernando, por gentilmente aceitarem o convite para compor minha banca examinadora. Desde já, agradeço imensamente pela disponibilidade e sugestões.

A todos os integrantes do LABIMOL, aos alunos de iniciação científica Letícia, Dandinaura e Marcello, além de Nívea, Hanna, Thercia, Jéssica e Lucas pelo apoio durante esse período. Agradeço também aos grandes parceiros de campo Gabriel, Amanda, Delzenira e Ingrid, e à Betânia pela oportunidade e parceria ao longo destes anos. Gratidão a toda tripulação das embarcações “Neptuno” e “Colo de Mãe”, que sempre nos auxiliaram durante as coletas.

Sou profundamente grata a todos os professores que contribuíram para a minha formação, cujos ensinamentos foram fundamentais para o meu crescimento acadêmico e profissional. Aos que tive durante a graduação na Universidade Federal do Maranhão (OCEANO/UFMA), aos docentes do mestrado em Ecologia e Conservação da Biodiversidade (PPGECB/UEMA) e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal - Rede Bionorte.

Gostaria de agradecer à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Maranhão (FAPEMA) pelo apoio financeiro e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio acadêmico, assim como ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal - Rede Bionorte, pela formação.

Enfim, a todos aqueles que, de alguma forma, fizeram parte da minha caminhada e contribuíram para tornar a conclusão desta tese possível, meu muito obrigada!

“Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso!
Não se apavore nem desanime, pois o Senhor, o seu
Deus, estará com você por onde você andar!”

Josué 1:9

FURTADO, Jordana Adorno. **Aspectos tróficos, ecológicos e moleculares como ferramenta de monitoramento da biodiversidade em um Complexo Portuário na Costa Amazônica Brasileira**. 2025. 174f. Tese (Doutorado em Biodiversidade Biotecnologia) - Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2025.

RESUMO

Este trabalho tem como objetivo principal estimar a diversidade biológica através de análises morfológicas e eDNA, na água e no sedimento do Complexo Estuarino de São Marcos (CESM), região de grande relevância na Costa Amazônica devido à sua importância ecológica e socioeconômica. Para a execução deste estudo, amostras foram coletadas entre 2018 e 2023 durante o período chuvoso e de estiagem. Os resultados obtidos através dos métodos tradicionais (redes de plâncton, redes de espera, dragas e outros equipamentos de captura, bem como a análise taxonômica e morfológica) revelaram uma diversidade biológica distribuída entre os reinos Eubacteria, Chromista, Plantae e Animalia, registrando aproximadamente 289 táxons. A análise de β -diversidade indicou que a substituição de espécies foi responsável por cerca de 90% da variação total na composição das comunidades. As condições ambientais apresentaram variações significativas, com maior heterogeneidade registrada durante o período seco e nos anos de 2020 e 2023, marcados por eventos atípicos. Através das amostras de eDNA foi possível recuperar sequências para os domínios Archaea, Bacteria e Eukaryota, com registro de 39 filos eucarióticos. O marcador 18S apresentou maior rendimento e capturou ampla diversidade de microeucariotos, enquanto o COI, embora menos específico, contribuiu para a detecção de metazoários. Com base na identificação do fitoplâncton, foram encontradas quatro espécies potencialmente nocivas. Além disso, os índices ecológicos indicaram baixa diversidade e moderada riqueza de espécies. Utilizando o Índice Trófico Multimétrico (TRIX), foi possível observar um ambiente eutrofizado, com a qualidade da água comprometida devido à grande carga de nutrientes ocasionada pelo lançamento de efluentes domésticos e industriais provenientes das atividades antrópicas. Em relação à avaliação *in silico*, primers relacionados ao gene 18S foram projetados para maximizar a identificação de organismos. Os primers desenvolvidos foram eficazes na identificação de fitoplâncton a nível de espécie. Os resultados evidenciam a importância de avaliar o ambiente de forma integrada, sobretudo em um sistema altamente dinâmico, diverso e sujeito a intensa degradação.

Palavras-chave:

Biodiversidade; Metabarcoding; Fatores ambientais; Qualidade da água; Complexo Estuarino.

FURTADO, Jordana Adorno. **Trophic, ecological, and molecular aspects as a tool for monitoring biodiversity in a port complex on the Brazilian Amazon coast.** 2025. 174f. Thesis (PhD in Biodiversity and Biotechnology) - State University of Maranhão, São Luís, MA – Brazil, 2025.

ABSTRACT

This study aims to estimate biological diversity through morphological and eDNA analyzes in the water and sediment of the São Marcos Estuarine Complex (SMEC), a region of great importance on the Amazon coast due to its ecological and socioeconomic significance. Samples were collected between 2018 and 2023 during the rainy and dry seasons. The results obtained using traditional methods (plankton nets, gillnets, dredges and other capture equipment, as well as taxonomic and morphological analysis) revealed a biological diversity distributed among the kingdoms Eubacteria, Chromista, Plantae, and Animalia, registering approximately 289 taxa. β -diversity analysis indicated that species replacement accounted for about 90% of the total variation in community composition. Environmental conditions showed significant variations, with greater heterogeneity recorded during the dry season and in the years 2020 and 2023, marked by atypical events. Through eDNA samples, it was possible to recover sequences for the Archaea, Bacteria, and Eukaryota domains, recording 39 eukaryotic phyla. The 18S marker showed the highest yield and captured a wide diversity of microeukaryotes, while COI, although less specific, contributed to the detection of metazoans. Based on phytoplankton identification, four potentially harmful species were found. Furthermore, ecological indices indicate low diversity and moderate species richness. Using the Multimetric Trophic Index (TRIX), it was possible to observe a eutrophic environment, with compromised water quality due to the high nutrient load caused by the discharge of domestic and industrial effluents from human activities. Regarding *in silico* evaluation, primers related to the 18S gene were designed to maximize organism identification. The developed primers were effective in identifying phytoplankton at the species level. The results highlight the importance of assessing the environment in an integrated way, especially in a highly dynamic, diverse system subject to intense degradation.

Keywords: Biodiversity; Metabarcoding; Environmental factors; Water quality; Estuarine complex.

LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1- Localização da Costa Amazônica e faixa de manguezais.....	21
Figura 2 - Localização dos 5 setores da zona costeira do Estado do Maranhão.....	22
Figura 3 - Aplicações do DNA ambiental metabarcoding em ecossistemas aquáticos e terrestres.....	29

LISTA DE FIGURAS CAPÍTULO 1

Figura 1- Localização da área de estudo no Complexo Estuarino de São Marcos (Costa Amazônica, Brasil)	52
Figura 2 - Média histórica mensal de chuvas (baseado nos últimos 30 anos), precipitação pluviométrica mensal e velocidade dos ventos obtida entre os anos de 2018 e 2023 (www.portal.inmet.gov.br).....	54
Figura 3 - Dispersão de variáveis ambientais por meio de análise de coordenadas principais (PCoA) e boxplot com base na distância ao centroide (heterogeneidade ambiental) considerando a escala temporal Complexo Estuarino São Marcos.....	58
Figura 4- Gráficos de acumulação de espécies (linhas contínuas), extrapolação (linhas tracejadas) e intervalos de confiança de 95% (áreas sombreadas) para os cinco filós mais ricos e os restantes (14 filós) nos seis anos de estudo do Complexo Estuarino São Marcos.....	63
Figura 5 - Análises de cluster usando similaridade de Sørensen e UPGMA, mostrando a riqueza de espécies ao longo dos meses estudados.....	65
Figura 6 - Diversidade β taxonômica (β Sor) particionada em componentes de substituição (β Sim) e aninhamento (β Nes), considerando a escala temporal do Complexo Estuarino de São Marcos (a) e a biodiversidade geral (b). Mapa de calor da diversidade β comparando os grupos representados na análise de agrupamento. As setas representam a substituição ao longo do gradiente temporal.....	66

LISTA DE FIGURAS CAPÍTULO 2

Figura 1- Mapa da área de estudo e dos pontos de amostragem no Complexo Estuarino de São Marcos (CESM).....	89
Figura 2 - Número de sequências obtidas utilizando os marcadores 18S e COI para cada domínio identificado.....	93
Figura 3 - Gráfico de barras empilhadas representando o número de sequências 18S lidas em relação à abundância relativa (%) de A) ordens e B) famílias por amostras de eDNA no período chuvoso.....	96
Figura 4- Gráfico de barras empilhadas representando o número de sequências 18S lidas em relação à abundância relativa (%) de A) ordens e B) famílias por amostras de eDNA no período seco.....	99
Figura 5 - Gráfico de barras representando o número de sequências 18S lidas em relação à abundância relativa (%) de ordens por amostras de eDNA no sedimento.....	100
Figura 6 - Representação do número de sequências de COI lidas em relação à abundância relativa (%) de filós em amostras de eDNA na água e sedimentos.....	101

LISTA DE FIGURAS CAPÍTULO 3

Figura 1- Location of the study area, including the sampling stations in the São Marcos Estuarine Complex, Brazilian Amazon Coast (a). Historical monthly rainfall (last 30 years), monthly rainfall (b) and wind speed (c) for 2018 and 2019. The arrows indicate the months studied. Meteorological data were taken from the National Institute of Meteorology (www.portal.inmet.gov.br)	121
Figura 2 - Temporal variation of environmental variables (a-e) and nutrients (f-i) during dry and rainy seasons in the São Marcos Estuarine Complex, Brazilian Amazon Coast.....	125
Figura 3 - Temporal distribution of phytoplankton abundance (a), chlorophyll a (b) and diversity indices (c-d) during dry and rainy seasons in the São Marcos Estuarine Complex, Brazilian Amazon Coast.....	126
Figura 4- Temporal distribution of potentially harmful and bloom forming diatoms in the São Marcos Estuarine Complex, Brazilian Amazon Coast. The schematic illustrations used were taken from Tomas (1997)	127
Figura 5 - Temporal variation of the Trophic Index (TRIX) (a-c) and Redfield ratio (N:P) (d) during the dry and rainy seasons in the São Marcos Estuarine Complex – Brazil.....	128
Figura 6 - Generalized Additive Models (GAMs) results describing the main variables that influenced the total phytoplankton abundance (a), <i>Thalassionema frauenfeldii</i> (b), and HABs (c-e). Solid lines represent smoothed mean relationships from GAM's and shaded areas are 95% confidence intervals. Other details are provided in Table 3.....	130

LISTA DE FIGURAS CAPÍTULO 4

Figura 1- Localização da área de estudo: (A) Complexo Estuarino de São Marcos - CESM; (B) estado do Maranhão e (C) Brasil.....	152
Figura 2 - Distribuição percentual da comunidade fitoplanctônica no CESM.....	154
Figura 3 - Boxplots de valores de riqueza calculados para os bancos de dados genômicos.....	156
Figura 4- Boxplots de valores de riqueza calculados para os marcadores analisados.....	157

LISTA DE TABELAS CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Resumo dos resultados da análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA) que avalia a variabilidade das condições ambientais ao longo das estações e anos no Complexo Estuarino São Marcos.....	57
Tabela 2 - Resumo descritivo (média e desvio padrão) das variáveis ambientais no Complexo Estuarino São Marcos. Nota: Temporal (Tp.) inclui os anos de coleta; Sazonal (Sz.) os períodos sazonais (chuvoso e seco).....	60
Tabela 3 - Número de ocorrências em cada filo registradas no Complexo Estuarino São Marcos entre 2018 e 2023.....	61

LISTA DE TABELAS CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Tipo de amostra, marcador sequenciado, comprimento das sequências (pares de base - bp) e número de reads em cada amostra obtida no Complexo Estuarino de São Marcos.....	92
Tabela 2 - Principais grupos identificados através dos marcadores 18S e COI por meio de DNA metabarcoding.....	95
Tabela 3 - Espécies de microalgas identificadas nas amostras de eDNA na água e sedimentos.....	101

LISTA DE TABELAS CAPÍTULO 3

Tabela 1 - Classification of trophic status according to Vollenweider et al. (1998)	123
Tabela 2 - Summary of the permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) results assessing the variability of environmental conditions along the temporal scale (seasons and months) in the São Marcos Estuarine Complex, Brazilian Amazon Coast.....	124
Tabela 3 - Summary of generalized additive model (GAMs) between total phytoplankton abundance, <i>Thalassionema frauenfeldii</i> , HABs (<i>T.subtilis</i> , <i>C.centralis</i> and <i>S.costatum</i>) and environmental parameters and trophic index (TRIX) for São Marcos Estuarine Complex.....	129

LISTA DE TABELAS CAPÍTULO 4

Tabela 1 - Descrição dos primers escolhidos.....	158
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CESM	Complexo Estuarino de São Marcos
CMMA	Costa de Manguezais de Macromarés da Amazônia
cm	Centímetro
eDNA	DNA ambiental
EMAP	Empresa Maranhense de Administração Portuária
ENNs	Espécies não nativas
GAMs	Generalized Additive Models
HABs	Harmful algal blooms
HPAs	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
ICMBIO	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
IMO	Organização Marítima Internacional
INMET	Instituto Nacional de Meteorologia
mm	Milímetro
mg. L⁻¹	Miligramas por litro
NCBI	<i>The National Center for Biotechnology Information</i>
NH₄⁺	Íon amônio
NO₂⁻	Nitrito
NO₃⁻	Nitrato
OD	Oxigênio dissolvido
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PERMANOVA	Permutational Multivariate Analysis of Variance
PO₄³⁻	Fosfato
Sal	Salinidade
SEMA	Secretaria Estadual de Meio Ambiente e Recursos Naturais
Sz	Sazonal
Temp	Temperatura
Turb	Turbidez
Tp	Temporal
TRIX	Trophic State Index
UEMA	Universidade Estadual do Maranhão
WoRMS	Registro Mundial de Espécies Marinhas
ZCA	Zona Costeira Amazônica
µm	Micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 OBJETIVO GERAL	20
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
1.3 HIPÓTESES	20
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 ZONA COSTEIRA AMAZÔNICA (ZCA).....	21
2.1.1 Atividades portuárias e impactos ambientais	23
2.2 BIODIVERSIDADE.....	26
2.3 DNA AMBIENTAL (EDNA).....	28
2.3.1 Aplicação do eDNA em amostras de Água.....	31
2.3.2 Aplicação do eDNA em amostras de Sedimentos	33
REFERÊNCIAS	35
3 CAPÍTULO 1	48
4 CAPÍTULO 2	84
5 CAPÍTULO 3	116
6 CAPÍTULO 4	147
7 DISCUSSÃO INTEGRADORA	165
8 CONCLUSÕES.....	167
REFERÊNCIAS	169
ANEXO 1 – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA ECOHYDROLOGY & HYDROBIOLOGY	171
ANEXO 2 – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA OBSERVATORIO DE LA ECONOMIA LATINOAMERICANA	172
ANEXO 3 – AUTORIZAÇÃO AMBIENTAL DE COLETA E CAPTURA DA FAUNA	

1 INTRODUÇÃO

Um dos maiores desafios da atualidade se refere ao declínio da biodiversidade em ecossistemas aquáticos, decorrentes das diversas atividades antrópicas (SANTOS *et al.*, 2020; HU *et al.*, 2025) o que tem despertado preocupação generalizada de países e organizações internacionais para o desenvolvimento sustentável (KECK *et al.*, 2022). Em sistemas aquáticos, as maiores causas da perda de biodiversidade são superexploração, poluição da água, destruição ou degradação de habitats e invasão de espécies exóticas (REY *et al.*, 2020; FAROOQI *et al.*, 2022), que afetam severamente inúmeras funções ecológicas e serviços ecossistêmicos (GARCIA *et al.*, 2018; NIMMA *et al.*, 2025). Essas ações, criam uma necessidade urgente de desenvolver ferramentas de monitoramento que rapidamente identifiquem com precisão a composição da comunidade nos ecossistemas.

O monitoramento e a análise dos ecossistemas aquáticos são essenciais para sua conservação, pois permitem acompanhar mudanças ao longo do tempo e avaliar suas condições atuais. Por se tratar de um processo dinâmico, essas abordagens precisam ser revisadas periodicamente, assegurando que continuem a atender às demandas contemporâneas e contribuam efetivamente para a tomada de decisões, políticas públicas e ações de manejo (KARR, 1991; THORNTON *et al.*, 2022) Essa complexidade natural demanda estratégias de monitoramento mais precisas, capazes de assegurar sua conservação, proteção e recuperação. Entretanto, os métodos atualmente utilizados ainda enfrentam limitações para abranger toda essa diversidade, o que acaba dificultando o manejo eficiente desses ambientes (LIU *et al.*, 2025).

Um condição essencial para a conservação eficiente dos ecossistemas marinhos e dulcícolas em risco é a realização de um levantamento preciso e abrangente da fauna aquática de difícil detecção, a fim de avaliar com exatidão a diversidade biológica (MCCAULEY *et al.*, 2015; REID *et al.*, 2019). A coleta da maior quantidade de informações sobre esses ecossistemas é de extrema importância, porém, muitas vezes, as técnicas e metodologias usuais podem apresentar limitações e com isso necessitam ser complementadas. Muitos estudos têm revelado a presença de espécies crípticas, ou seja, espécies morfológicamente semelhantes, mas geneticamente distintas (APPELTANS *et al.*, 2012). Isso destaca a necessidade de integrar abordagens morfológicas e genéticas para detectar com precisão a composição da comunidade.

O ácido desoxirribonucleico ambiental (eDNA) está revolucionando a avaliação e o monitoramento da biodiversidade em ecossistemas aquáticos ao permitir a detecção de fragmentos de DNA liberados no ambiente (HARRISON *et al.*, 2019; MIYA, 2022). As técnicas de eDNA proporcionam uma maior economia de tempo e esforço durante a coleta em

campo, quando comparadas aos métodos tradicionais de captura física (SAUNDERS *et al.*, 2024), além de ser considerada uma técnica não invasiva (ZHANG *et al.*, 2024).

Com o uso do eDNA, geralmente é preciso um número reduzido de profissionais para obter a amostra, e os equipamentos utilizados demandam menos manipulação, além de oferecerem maior segurança operacional (FUJII *et al.*, 2019; GOLD *et al.*, 2023), além da capacidade de identificar espécies raras (CHEN *et al.*, 2024). No entanto, em comparação com as técnicas tradicionais de identificação, o eDNA enfrenta limitações na quantificação precisa do número absoluto de indivíduos, além do risco de identificar erroneamente espécies que podem não estar presentes no ambiente (SAUNDERS *et al.*, 2024). Outro aspecto que pode limitar o uso do eDNA, se refere a persistência desses fragmentos de DNA na coluna d'água que variam de alguns dias a várias semanas dependendo das condições ambientais (COLLINS *et al.*, 2018 ; HARRISON *et al.*, 2019).

A Zona Costeira Amazônica (ZCA) é um ecossistema extremamente diverso e de alta produtividade biológica, ocupando mais de um terço da costa brasileira (SOUZA FILHO, 2005). Além disso, abriga um dos maiores trechos contínuos de manguezais do mundo (KJERFVE *et al.*, 2002). O Complexo Estuarino de São Marcos (CESM) está situado em São Luís, Maranhão. Esta região possui grande importância ecológica e socioeconômica, abrigando uma importante área industrial e portuária, com um complexo portuário composto pelo porto do Itaqui, Ponta da Madeira (administrado pela Companhia VALE) e ALUMAR, sendo este o maior complexo de cargas da região amazônica e um dos maiores do mundo em termos de movimentação de cargas (OLIVEIRA *et al.*, 2019; QUEIROZ *et al.*, 2022). O potencial portuário da região deve-se às suas condições naturais, que garantem um ancoradouro seguro e a manutenção de grandes profundidades (ANDRADE *et al.*, 2010).

A área em estudo é de grande relevância devido à sua proximidade com diversas unidades de conservação. No entanto, a sua sensibilidade a eventos de invasão biológica é elevada, pois o despejo contínuo de água de lastro em áreas portuárias pode facilitar a introdução de espécies exóticas (QUEIROZ *et al.*, 2022). Estudos regionais com eDNA são fundamentais para testar e aprimorar essas técnicas em diferentes ambientes, possibilitando avaliar sua eficiência na detecção da biodiversidade e compreender como os fatores ambientais influenciam a composição das comunidades e das espécies em distintas escalas (KECK *et al.*, 2023; SEYMOUR *et al.*, 2025). Com isso conhecimento da biodiversidade é de grande valia para tomada de decisões voltadas a conservação de espécies.

Nesse sentido, com o objetivo de estabelecer um protocolo que integre diferentes métodos de coleta, buscamos inicialmente caracterizar a biodiversidade por meio de abordagens

convencionais (uso de redes de plâncton redes de espera, dragas e outros equipamentos de captura, bem como a análise taxonômica e morfológica) e testar a sensibilidade da técnica de eDNA, além de identificar as principais variáveis ambientais que a influenciam. Para uma melhor compreensão do grupo primário, sensível a alterações no meio aquático, trabalhamos mais detalhadamente a ecologia da comunidade fitoplanctônica, bem como identificamos os melhores marcadores a serem utilizados em estudos envolvendo metabarcoding.

A presente tese contribui para o cumprimento das metas 6 e 14 dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da Agenda 2030 da ONU, ao gerar conhecimento aplicado à conservação dos recursos hídricos e à proteção dos ecossistemas aquáticos. Os resultados apresentados reforçam a importância do monitoramento ambiental e da gestão sustentável dos ambientes marinhos e continentais, alinhando-se às diretrizes globais para o uso responsável da água e a preservação da vida na água.

Os resultados apresentados nesta tese de doutorado estão organizados seguindo o modelo de Tese formato Artigo recomendado pelo Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE. Contendo **Introdução e Revisão Bibliográfica**, seguido pelos **Resultados**, apresentados em capítulos que se referem a artigos que foram ou serão publicados, **Discussão Integradora e Conclusões**.

O **primeiro capítulo**, teve como objetivo foi caracterizar a estrutura e a composição da biota aquática no Complexo Estuarino de São Marcos (CESM) por meio de métodos convencionais (análises taxonômicas e morfológicas) a avaliar as interações entre os grupos e a influência de fatores ambientais. Esse manuscrito será submetido à revista *Regional Studies in Marine Science*. No **segundo capítulo**, testamos a sensibilidade da técnica de eDNA na água e sedimentos para identificar diferentes grupos de organismos, visando verificar sua aplicabilidade e eficiência na região. Em breve, esse manuscrito será submetido à revista *Global Ecology and Conservation*. No **terceiro capítulo**, objetivamos avaliar o estado ecológico da comunidade fitoplanctônica, identificando a ocorrência de espécies nocivas e o estado trófico do ambiente. Esse manuscrito foi publicado na revista *Ecohydrology & Hydrobiology* (ANEXO 1). Por fim, no **quarto capítulo**, apresentamos os resultados da seleção de iniciadores aplicados ao metabarcoding para monitorar o fitoplâncton da região em estudo. Esse manuscrito foi publicado no periódico *Observatorio de la Economía Latinoamericana* (ANEXO 2).

1.1 Objetivo Geral

Estimar a diversidade biológica na água e sedimento no Complexo Estuarino de São Marcos (CESM).

1.2 Objetivos Específicos

- Definir a biodiversidade local com base nas metodologias convencionais;
- Testar a sensibilidade da técnica de eDNA para identificar diferentes grupos de organismos na região em estudo;
- Padronizar uma metodologia que inclua coleta e armazenamento de amostras de água e sedimentos, bem como a extração de eDNA oriundo de ambientes de água estuarina e marinha;
- Comparar os resultados obtidos nesse estudo através da análise de eDNA, com dados de composição biológica já existentes na região por meio de metodologias clássicas;
- Avaliar o estado ecológico da comunidade fitoplanctônica;
- Selecionar iniciadores para a aplicação em análises de metabarcoding (eDNA) no monitoramento do fitoplâncton.

1.3 Hipóteses

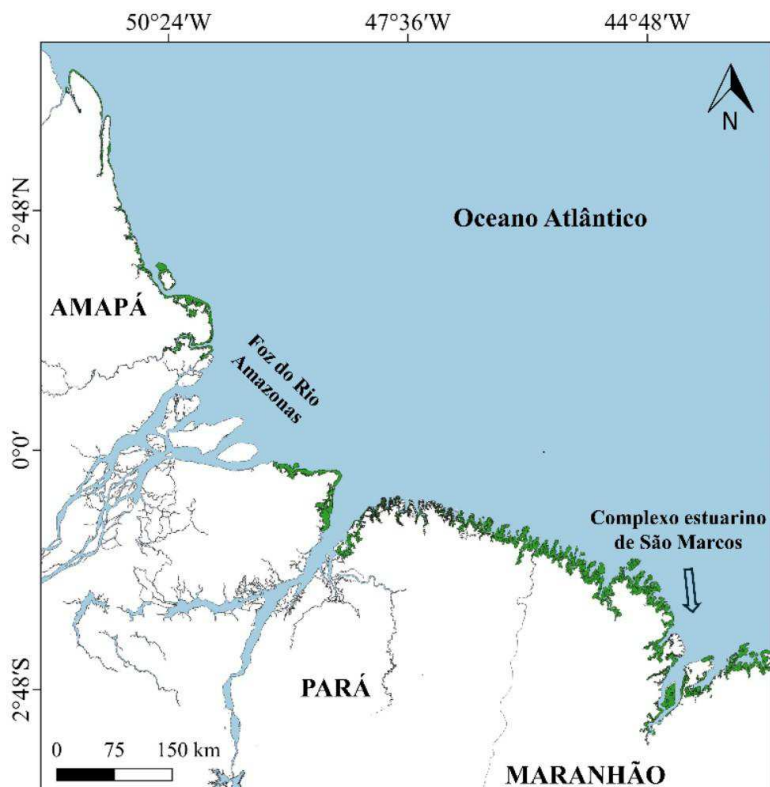
- Mudanças sazonais e temporais ocasionam uma heterogeneidade ambiental que pode levar a alterações nos padrões de distribuição da biodiversidade no Complexo Estuarino de São Marcos.
- A técnica de eDNA é sensível para detectar a diversidade biológica no Complexo Estuarino de São Marcos, sendo validada como uma técnica promissora e recomendada para a região.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ZONA COSTEIRA AMAZÔNICA (ZCA)

O Brasil representa 47% do território da América do Sul e possui uma linha costeira de aproximadamente 8.500 km de extensão, sendo 35% dessa área correspondente ao litoral amazônico. Essa faixa costeira estende-se do rio Oiapoque, no Amapá (5°N, 51°W), até a Baía de São Marcos, no Maranhão (2°S, 44°W) abrangendo uma grande diversidade de ambientes (PEREIRA *et al.*, 2009). A Zona Costeira Amazônica (ZCA) (Figura 1), é um dinâmico e complexo sistema ambiental que conecta o rio ao mar, sendo composto por: a) vastas planícies costeiras argilosas, localizadas no Amapá; b) um conjunto de ilhas interligadas ao baía do Marajó; e c) um litoral recortado por rios e uma extensa faixa de manguezais, formando uma das maiores áreas contínuas desse ecossistema no mundo, abrangendo territórios do Pará e do Maranhão (SOUZA FILHO *et al.*, 2005).

Figura 1 - Localização da Costa Amazônica e faixa de manguezais.



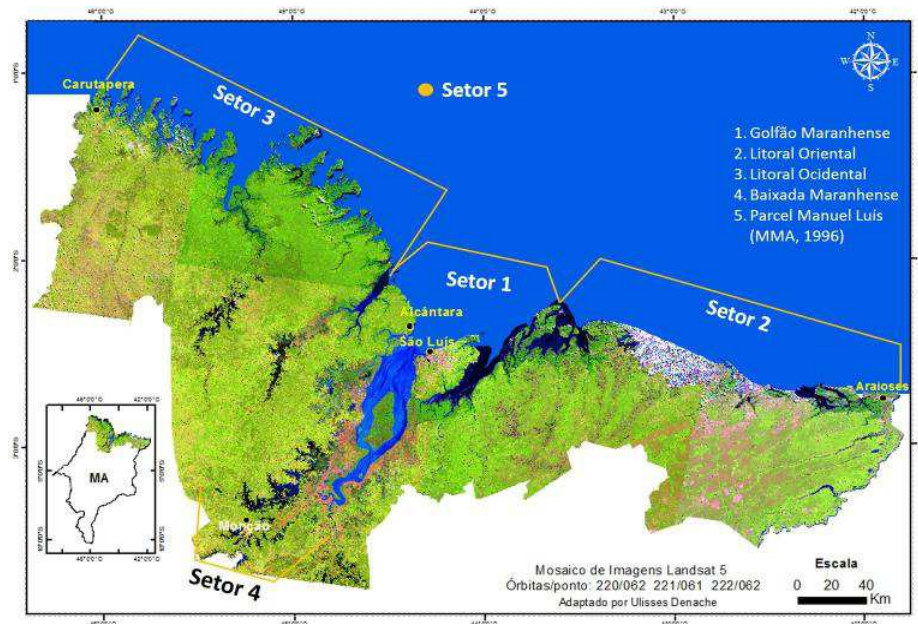
Fonte: Furtado (2025).

A zona costeira amazônica brasileira apresenta características meteorológicas e oceanográficas distintas em relação a outras áreas litorâneas do país. Entre seus principais aspectos, destacam-se a elevada precipitação anual (chegando a 3.300 mm), temperaturas elevadas (acima de 20 °C) com baixa variação ao longo do ano, uma ampla plataforma continental (~330 km), um regime de macromarés expressivo (atingindo até 8 m no Maranhão,

6 m no Pará e 12 m no Amapá) e uma vasta extensão de manguezais, formando uma das maiores áreas contínuas desse ecossistema no planeta. Além disso, a região recebe a descarga de dezenas de estuários e do maior rio do mundo, o Amazonas, responsável por 16% da água doce lançada nos oceanos, bem como um significativo aporte de sedimentos, nutrientes e matéria orgânica (PEREIRA *et al.*, 2009). O Rio Amazonas possui uma área de captação superior a 6×10^6 km², com uma vazão média anual de aproximadamente 6×10^{12} m³ de água e uma carga anual de sedimentos suspensos estimada em $1,2 \times 10^9$ toneladas (MEADE *et al.*, 1985). Esse imenso volume de sedimentos contribui significativamente para a deposição ao longo da costa e da plataforma continental.

O litoral do estado do Maranhão é classificado em 5 compartimentos (Figura 2), sendo eles (1) Golfão Maranhense, (2) litoral oriental, (3) litoral ocidental, (4) Baixada maranhense e (5) Parque estadual Marinho do Parcel de Manuel Luís (EL-ROBRINI *et al.*, 2018). A pesquisa foi realizada no Golfão Maranhense, um complexo estuarino de grande relevância, orientado quase perpendicularmente à linha de costa. Essa região recebe drenagens fluviais significativas, como o sistema Mearim/Pindaré/Grajaú, que deságua na Baía de São Marcos, e o rio Itapecuru, que alimenta a Baía de São José. Esses cursos d'água desempenham um papel essencial na morfodinâmica da área, devido ao expressivo aporte de sedimentos para a zona costeira. O Golfão Maranhense é delimitado a oeste pela Ponta do Guajuru, a leste pela Ilha de Santaninha e, em sua porção central, pela Ilha de Upaon-Açú, atualmente mais conhecida como Ilha do Maranhão (FEITOSA, 2006).

Figura 2 - Localização dos 5 setores da zona costeira do Estado do Maranhão.



Fonte: El-Robrini *et al.* (2018)

O Golfão Maranhense é um extenso complexo estuarino situado perpendicularmente ao litoral. Nele, deságuam duas drenagens independentes: o sistema Mearim/Pindaré/Grajaú, que alimenta a Baía de São Marcos, e o rio Itapecuru, que desemboca na Baía de São José (EL-ROBRINI, 1992). Esses dois grandes complexos estuarinos (São Marcos e São José) são consideradas as mais relevantes da região maranhense. Sua importância se deve tanto aos aspectos fisiográficos, por servirem como receptores dos maiores rios, quanto à intensa hidrodinâmica e à alta concentração de atividades humanas (EL-ROBRINI *et al.*, 2018).

O Complexo Estuarino de São Marcos (CESM) é uma extensa área estuarina com orientação NE-SW, cuja configuração geomorfológica abrange dois tipos distintos de litoral. A nordeste, a costa apresenta um perfil quase retilíneo, caracterizado pela presença de dunas e praias arenosas (norte da Ilha de São Luís). Em contraste, a noroeste, o litoral é recortado por "falsas rias" e amplamente ocupado por manguezais. Esse complexo possui aproximadamente 50 km de largura em sua porção norte, 15 km na região central (entre Alcântara e a Ponta de São Marcos), 25 km na área do delta da Ilha dos Caranguejos e cerca de 4 km na foz do rio Mearim (EL-ROBRINI *et al.*, 2018). Essas características fazem com que a área seja altamente propícia para a navegação e abriga importantes infraestruturas portuárias, incluindo o Terminal de Ponta da Madeira, o Porto do Itaqui e o Terminal Alumar (GONZÁLEZ-GORBEÑA *et al.*, 2015; LIMA *et al.*, 2021).

2.1.1 Atividades portuárias e impactos ambientais

No CESM está localizado uma das áreas portuárias mais importantes do país, com uma das maiores movimentações de carga do mundo (AMARAL e ALFREDIN, 2010). No ano de 2022, o Porto do Itaqui alcançou um marco histórico ao registrar o maior volume de carga movimentada em sua história. Durante o período de janeiro a dezembro, foram exportadas cerca de 33,610 milhões de toneladas de mercadorias, principalmente grãos sólidos, que totalizaram 23 milhões de toneladas movimentadas, representando um aumento notável de 19% em relação ao ano anterior (EMAP, 2023).

Para apoiar as operações realizadas na zona portuária de São Luís, Maranhão, a região sul da cidade abriga um distrito industrial, cujas áreas são conectadas ao sistema portuário por meio de ferrovias e rodovias, onde se concentram diversas instalações industriais (ICMBIO, 2018). Assim, o ecossistema aquático próximo à área portuária pode ter sua qualidade significativamente impactada devido à presença de inúmeras substâncias químicas provenientes dos assentamentos urbanos e do tráfego de embarcações (CARVALHO NETA *et al.*, 2014).

A complexa dinâmica, que envolve a interação entre os aportes de nutrientes continentais e os processos costeiros, sustenta uma produção significativa. Esse fato destaca a importância da pesquisa sobre os processos hidrodinâmicos subjacentes às respostas biológicas correspondentes. Além disso, é crucial gerar informações científicas para respaldar a gestão sustentável das áreas estuarinas, com o objetivo de reduzir a exposição e a vulnerabilidade dessas regiões costeiras (SIRVIENTE *et al.*, 2023).

Embora apresentem grande relevância, esses ecossistemas são frequentemente identificados como alguns dos habitats mais degradados pela intervenção humana no planeta. Além dos processos naturais de interação, atividades humanas, como canalização, retificação de meandros, dragagem, pesca excessiva, descarga de efluentes industriais, lançamento de esgoto e a construção de barragens para controlar a irrigação e reduzir o risco de inundações, estão causando alterações na hidrodinâmica estuarina, na morfologia e na qualidade da água (MULIK *et al.*, 2020; GOMIZ-PASCUAL *et al.*, 2021; SAVURIRAJAN *et al.*, 2022). As consequências dessas atividades estão levando à diminuição da biodiversidade e à perda de habitats. Alterações significativas nos fatores ambientais e físicos estão pressionando os organismos estuarinos a se adaptarem às mudanças nas condições (CASTRO e HUBER, 2003).

O enriquecimento de nutrientes (eutrofização) e a contaminação por metais pesados tem sido cada vez mais frequentes em ecossistemas estuarinos. Os metais são encontrados naturalmente na natureza, sendo originados tanto da crosta terrestre como de fontes atmosféricas (BRIFFA *et al.*, 2020; NDHLOVU *et al.*, 2023). Além disso, eles tendem a persistir no ambiente por longos períodos de tempo (ALI *et al.*, 2019 ; ALI e KHAN, 2019). A presença de metais nos ecossistemas aquáticos pode ter um impacto significativo na estrutura da comunidade e na qualidade desses ambientes (MACLEOD e COUGHANOWR, 2019; NDHLOVU *et al.*, 2023).

No complexo portuário de São Luís, PINHEIRO-SOUSA *et al.* (2021), relataram a presença de oligoelementos tóxicos e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs) em sedimentos, além de alterações histológicas em peixes da espécie de bagre *Sciades herzbergii*. Estudos anteriores também registraram lesões branquiais como biomarcadores de contaminação em bagres *S. herzbergii* (CARVALHO-NETA *et al.*, 2012; SOUSA *et al.*, 2013) e lesões em rins (CASTRO *et al.*, 2018). Demonstrando a vulnerabilidade desta região, que é fortemente influenciada tanto pelas atividades portuárias, quanto por despejo irregular de efluentes domésticos e industriais.

A eutrofização marinha está diretamente ligada à acumulação de nutrientes nos estuários dos rios, e essa acumulação depende em grande parte das atividades humanas, incluindo a

industrialização e a urbanização das áreas adjacentes à bacia hidrográfica (WANG *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2023). No período de 2003 a 2020, observou-se um aumento de 13,2% na extensão do impacto global e um aumento notável de 59,2% na ocorrência de proliferação de algas costeiras. Esses dados apresentam uma correlação positiva significativa com atividades humanas, tais como o uso de fertilizantes agrícolas e a prática da aquicultura, que contribuem para o fenômeno da eutrofização (DAI *et al.*, 2023).

O surgimento de algas nocivas pode ser desencadeado por eventos de eutrofização, levando, em alguns casos, à transformação de um ecossistema previamente dominado por plantas para um cenário caracterizado pelo predomínio do fitoplâncton em ambientes aquáticos fechados (WU *et al.*, 2016). É possível que a qualidade da água sofra degradação e que a biodiversidade diminua significativamente nas zonas costeiras e estuários devido ao rápido crescimento da população costeira, o que por sua vez poderia perturbar o equilíbrio ecológico desses ambientes (LIU *et al.*, 2023).

Estudos que associam o estado trófico da água à detecção de Blooms de Algas Nocivas (HABs) são escassos. As espécies de HBA referem-se a espécies de algas tóxicas e prejudiciais, que podem causar mortalidade de organismos, envenenamento humano e alterações consideráveis nos ecossistemas marinhos (LASSUS *et al.*, 2016; MOZETIČ *et al.*, 2019; HE *et al.*, 2021).

A eutrofização e o crescimento excessivo de algas prejudiciais são dois problemas ambientais enfrentados pelas regiões costeiras globais (HOLT *et al.*, 2016; DAMAR *et al.*, 2020; GOLUBKOV *et al.*, 2021). Nos últimos anos, esta preocupação intensificou-se devido ao aumento das cargas de nutrientes provenientes da atividade humana e das alterações climáticas. A combinação desses fatores agrava ainda mais os impactos negativos das ações humanas (DONEY *et al.*, 2012; TEUTSCHBEIN *et al.*, 2017; GOLUBKOV *et al.*, 2021).

Os índices de qualidade da água constituem ferramentas fundamentais para a definição do estado trófico, pois sintetizam variáveis ambientais em classificações que auxiliam na gestão de corpos d'água. Ao oferecer uma visão integrada das condições ecológicas, esses índices permitem identificar tendências de degradação ou equilíbrio, orientando a formulação de critérios e ações de manejo e conservação dos ecossistemas aquáticos (MÁRQUEZ, 2017). O Índice Trófico Multimétrico (TRIX) integra informações sobre nutrientes, indicadores de resposta biológica, representados pela clorofila a, usada como medida da biomassa fitoplanctônica e ainda aspectos ligados a alterações na qualidade da água, como os níveis de oxigênio dissolvido (RODRIGUES *et al.*, 2020; REYES-VELARDE *et al.*, 2023)

Além disso, a diversidade da comunidade fitoplanctônica tem sido uma importante ferramenta ecológica na avaliação das condições tróficas e da estabilidade dos ambientes aquáticos (FUHRMAN *et al.*, 2015), onde valores elevados de diversidade geralmente indicam um ecossistema saudável, enquanto valores baixos refletem poluição crítica. Desta forma, a aplicação de ferramentas e métodos aquáticos contribui para identificar possíveis fontes de poluição, representando uma ferramenta crucial no apoio ao planejamento e gestão de regiões costeiras e marítimas afetadas por atividades humanas (DODDS e SMITH, 2016; MAHMOUD *et al.*, 2020; MORSY *et al.*, 2022).

A combinação de concentrações elevadas de nutrientes e outros fatores que ameaçam ecossistemas aquáticos torna esses ecossistemas vulneráveis, resultando na necessidade de estabelecer ações e uma gestão eficaz voltadas para a preservação das gerações futuras (ELLIOTT e WHITFIELD, 2011; PEREIRA *et al.*, 2023). Com isso, índices tem sido cada vez mais utilizados para avaliar o estado trófico destas águas, dentre eles o Índice de Status Trófico (TRIX) desenvolvido por VOLLENWEIDER *et al.* (1998) tem sido amplamente empregado devido à sua capacidade de incorporar as principais variáveis relacionadas à causa e ao efeito da eutrofização, abrangendo aspectos como a resposta à pressão, a resposta biológica e as perturbações ambientais (JAYACHANDRAN e BIJOY NANDAN, 2011; CABRITA *et al.*, 2014; PEREIRA *et al.*, 2023).

2.2 BIODIVERSIDADE

A costa amazônica é uma das regiões de maior relevância para o mapeamento e a conservação da diversidade biológica dos ecossistemas costeiros (MARTORANO *et al.*, 1993). A biodiversidade desempenha um papel fundamental na sustentação e na operação dos ecossistemas marinhos. Além disso, ela fornece uma ampla variedade de serviços ecossistêmicos que beneficiam os seres humanos em níveis locais, regionais e globais. Essa riqueza de vida marinha abrange todos os níveis da organização biológica (VERMA *et al.*, 2020; LOTZE *et al.* 2021; LIU *et al.*, 2022). Segundo LOTZE *et al.* (2021), aproximadamente 238.165 espécies marinhas estão oficialmente registradas e descritas no Banco de Dados do Registro Mundial de Espécies Marinhas (WoRMS), disponível em <http://www.marinespecies.org/>. No entanto, este número representa apenas uma pequena fração do total de espécies que habitam tais ambientes. De acordo com estimativas científicas, o número total de espécies marinhas pode ser até 10 vezes maior do que conhecemos atualmente.

A invasão biológica ou bioinvasão, representa um fenômeno vinculado à globalização e é um dos principais fatores que contribui para a perda de biodiversidade em escala global

(SOCOLAR *et al.*, 2016; CROWLEY *et al.*, 2017). A introdução de espécies não nativas em ecossistemas desencadeia uma série de desafios ecológicos, incluindo a alteração da estrutura da comunidade, a extinção de espécies locais e modificações na cadeia alimentar (CABRAL *et al.*, 2020; DONG *et al.*, 2021). As estimativas sugerem que mais de 7.000 espécies podem estar sendo transportadas através das águas de lastro de navios ao redor do mundo, ou como comunidades incrustantes (KARATAYEV *et al.*, 2009), evidenciando que a distância e as correntes não são mais barreiras naturais eficazes.

Os efeitos causados por espécies invasoras podem ter impactos diretos sobre os seres humanos, interferindo nos ambientes habitados por eles, ou efeitos indiretos, afetando negativamente a economia (PIMENTEL *et al.*, 2005). A invasão biológica é considerada uma ameaça tanto presente quanto futura para a biodiversidade, e há décadas projetos de prevenção e gestão de invasões têm recebido atenção em diversas regiões (COLL *et al.*, 2010).

Diante do aumento de problemas relacionados à bioinvasão marinha, as autoridades mundiais viram a necessidade da aplicação de medidas mais rigorosas, com objetivo de minimizar os riscos relacionados a água de lastro descarregada pelos navios. Dentre as medidas, uma das mais importantes foi a “Convenção Internacional para o Controle e Gestão da Água de Lastro e Sedimentos de Navios”. Essa medida foi adotada e aprovada pela Conferência Diplomática Sobre água de Lastro, ocorrida em Londres, na sede da IMO (Organização Marítima Internacional), em 2004 que estabelece 13 diretrizes, dentre elas: 1) diretriz para instalações de recebimento de sedimentos; 2) diretriz sobre amostragem de água de lastro; 3) diretriz para a troca de água de lastro e 4) diretriz sobre análise de risco/isenção de gestão de água de lastro. Essas ações, criam uma necessidade urgente de desenvolver ferramentas de monitoramento que rapidamente identifiquem com precisão a composição da comunidade nos ecossistemas.

A gestão e a preservação dos ecossistemas demandam uma abordagem global que inclua a monitorização periódica da composição e diversidade da biota (JØRGENSEN *et al.*, 2010). A avaliação biológica em ecossistemas aquáticos, possui diversos grupos de organismos que são utilizados para avaliar o estado e as alterações nos ambientes ao longo dos anos, e para determinar os diferentes impactos decorrentes das ações humanas (HERING *et al.*, 2018; KECK *et al.*, 2022).

Portanto, compreender e monitorar a situação geral da biota aquática em grande escala, é um fundamental para a proteção dos recursos biológicos e da saúde dos ecossistemas. No entanto, a classificação taxonômica ainda é predominantemente baseada em características morfológicas, o que é muitas vezes consiste em um processo demorado e sujeito a dúvidas,

sobretudo quando se trata de grupos em que a identificação taxonômica é realizada apenas até níveis mais amplos, como família ou gênero (HAASE *et al.*, 2006; MANDELIK *et al.*, 2010; KECK *et al.* 2022). Dessa forma, o monitoramento da biodiversidade em grande escala, que possibilita a abrangência do maior número de espécies possíveis, exige a implementação de uma estratégia de método padronizado, rápido e eficaz, que complemente as metodologias convencionais.

2.3 DNA AMBIENTAL (eDNA)

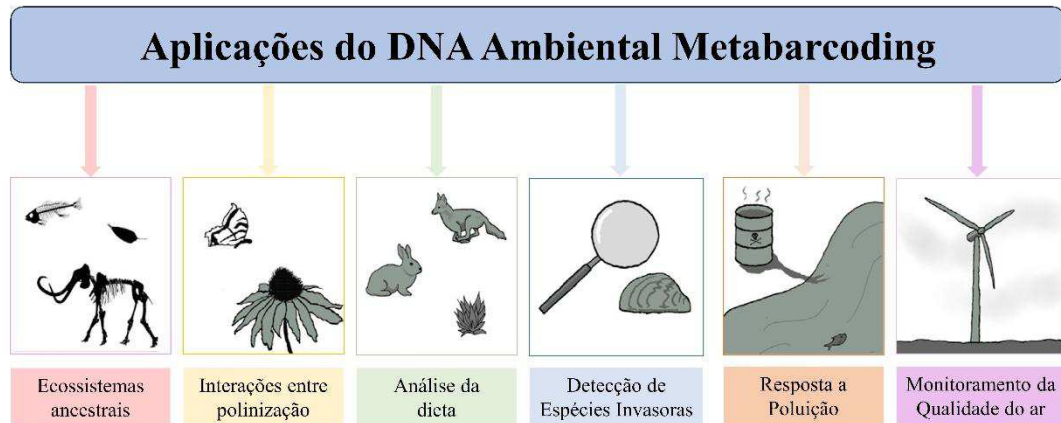
O DNA ambiental (eDNA) pode se acumular no ambiente e tem origem em diversas fontes, como pele, sangue, saliva, espermatozoides, secreções, muco, ovos, fezes, urina, raízes, frutos, pólen e folhas presentes nos ecossistemas (RUPPERT *et al.*, 2019; SAHU *et al.*, 2022). Comparado às abordagens convencionais, o método de análise de eDNA pode ser aplicado em praticamente qualquer habitat, exigindo pouca habilidade ou esforço, além de demonstrar maior precisão na identificação molecular em relação aos métodos tradicionais de detecção visual (BIGGS *et al.*, 2015; PILLIOD *et al.*, 2013). A técnica de DNA metabarcoding refere-se à identificação automatizada de múltiplas espécies a partir de uma única amostra, que pode conter tanto organismos inteiros quanto material genético degradado (ZHANG, 2019).

Os organismos animais e vegetais passam por processos naturais de renovação celular em todos os ambientes, as células antigas que sofrem morte celular são eliminadas através da urina, fezes e descamação epidérmica (HAILE *et al.*, 2009; THOMSEN e WILLERSLEV, 2012; MAHON *et al.*, 2013). Após eliminadas, elas são liberadas para o ambiente (terrestre ou aquático) disponibilizando informações sobre estes organismos. Assim, o DNA ambiental ou eDNA descreve o material genético presente em amostras ambientais, como sedimento, água e ar, incluindo células inteiras, DNA extracelular e organismos potencialmente inteiros (FICETOLA *et al.*, 2008; BARNES e TURNER, 2016).

O estudo inicial voltado para a abordagem do DNA ambiental (eDNA) foi realizado por OGRAM *et al.* (1987), com o objetivo de detectar DNA microbiano em amostras de sedimentos. O termo “eDNA” começou a ser mais amplamente difundido a partir do século XXI, em especial na área de microbiologia (RONDON *et al.*, 2000; HANDELSMAN, 2004). O uso dessa técnica molecular permite a identificação de espécies de vida livre (WILLERSLEV *et al.*, 2003; REES *et al.*, 2014; JANE *et al.*, 2015), terrestres (VALIERE e TABERLET, 2000; ANDERSEN *et al.*, 2012; MAHON *et al.*, 2013) e aquáticas (LODGE *et al.*, 2006; FICETOLA *et al.*, 2008; JERDE *et al.*, 2011; MAHON *et al.*, 2013), com potenciais aplicações em programas de conservação (REES *et al.*, 2014), detecção de espécies criticamente ameaçadas,

espécies invasoras (JERDE *et al.*, 2011; EICHMILLER *et al.*, 2016) e quantificação de organismos aquáticos (THOMSEN e WILLERSLEV, 2012; PILLIOD *et al.*, 2013; TAKAHARA *et al.*, 2013). Essa abordagem é muito útil quando métodos tradicionais de coleta são inadequados (DARLING e MAHON, 2011; JERDE *et al.*, 2011). A Figura 3 ilustra algumas das aplicações do DNA ambiental.

Figura 3- Aplicações do DNA ambiental metabarcoding em ecossistemas aquáticos e terrestres.



Fonte: Adaptado de Ruppert *et al.* (2019).

Nos últimos anos, vários pesquisadores têm empregado amplamente o eDNA para analisar populações em ambientes marinhos (FOOTE *et al.*, 2012), habitats de água doce (YANG *et al.*, 2023) e habitats terrestres (ALLEN *et al.*, 2021; VAN DER HEYDE *et al.*, 2020). O DNA ambiental representa uma ferramenta promissora no aprimoramento da conservação e gestão da biodiversidade (KELLY *et al.*, 2014). Apesar deste potencial está sendo reconhecido cada vez mais, estas ferramentas requerem validação adicional, particularmente em ecossistemas complexos e dinâmicos como os estuários (SUZZI *et al.*, 2023).

O transporte marítimo tem sido apontado como uma fonte direta de introdução de Espécies Não Indígenas (ENIs) nos estuários (SEEBENS *et al.*, 2016). A disseminação dessas espécies tem se acelerado com o aumento do tráfego de navios transoceânicos entre países para o comércio internacional (HULME, 2009). Isso resultou na invasão de muitos organismos em áreas costeiras ao redor do mundo, principalmente em estuários (GROSHOLZ, 2002). Por exemplo, uma pesquisa focada principalmente em ecossistemas costeiros registrou a presença de 1442 espécies únicas (BAILEY *et al.*, 2020). Foi documentado que um total de 986 Espécies Não Indígenas (ENIs) invadiram o Mar Mediterrâneo (ZENETOS *et al.*, 2012). Mesmo nas regiões árticas, foram identificadas 54 introduções e 34 ENIs entre 1960 e 2015 (CHAN *et al.*, 2019). Em escala global, é provável que a Ásia, a África e a América do Sul se tornem áreas

fortemente afetadas por invasões nas próximas décadas. No entanto, até o momento, essas regiões têm recebido menos atenção em comparação com a Europa e a América do Norte (KENNISH, 2002).

Com o avanço da bioinformática, tornou-se possível desenvolver ferramentas que auxiliam as pesquisas atuais, incluindo a concepção de primers para PCR com base no banco de dados do *The National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (MORAIS *et al.*, 2019; MUNIZ *et al.*, 2020). Os primers são sequências específicas de nucleotídeos que se ligam às suas respectivas sequências-alvo de DNA durante a reação em cadeia da polimerase (PCR) (PELT-VERKUIL *et al.*, 2008). A PCR *in silico* tem como objetivo prever quais produtos de PCR serão sintetizados a partir de um ou mais modelos de DNA, utilizando primers oligonucleotídeos já projetados (KALENDAR *et al.*, 2017). Esse método otimiza o processo, reduzindo tempo e custos adicionais (SCHULER, 1997).

As técnicas tradicionais de avaliação da diversidade e abundância de espécies apresentam limitações, pois dependem da identificação taxonômica, podem causar perturbação ou degradação do habitat e, frequentemente, utilizam métodos que dificultam a detecção de espécies pequenas ou de difícil amostragem. Essas restrições podem comprometer a obtenção de estimativas precisas para comunidades inteiras (RUPPERT *et al.*, 2019). O DNA ambiental (eDNA) surge como uma abordagem complementar a esses métodos, permitindo a detecção de diferentes espécies, a amostragem de uma maior diversidade e o aumento da resolução taxonômica (DEINER *et al.*, 2017). Além disso, o eDNA tem a capacidade de identificar espécies raras, embora não seja adequado para fornecer informações detalhadas sobre a estrutura populacional, como proporção entre os sexos e condições físicas dos indivíduos. Dessa forma, trata-se de uma ferramenta ideal para complementar os estudos tradicionais (GOLDBERG *et al.*, 2016; DEINER *et al.*, 2017).

Uma das principais dificuldades ao lidar com amostras ambientais é a degradação do DNA, um fenômeno particularmente acentuado em regiões tropicais. Isso ocorre porque o material genético já se encontra naturalmente fragmentado e permanece exposto a diversos fatores ambientais, como temperatura, salinidade e movimentação da água (RUPPERT *et al.*, 2019). As condições ambientais desempenham um papel crucial na taxa de degradação desses fragmentos. Por isso, EICHMILLER *et al.* (2016) destacam que fatores como temperatura da água, exposição à luz solar, salinidade e turbidez devem ser considerados na coleta de amostras ambientais, pois podem variar conforme as características topológicas e hidrológicas do corpo d'água.

Segundo GOLDBERG *et al.* (2016), desde 2008 vários grupos de pesquisa em todo o mundo têm intensificado o desenvolvimento de técnicas de DNA ambiental, levando a uma variedade de protocolos para detecção de eDNA de macroorganismos aquáticos em vários táxons e ambientes.

Portanto, esse estudo propõe-se a utilizar a técnica de eDNA integrada aos métodos tradicionais para a identificação e monitoramento desse importante sistema aquático localizado na Costa Amazônica Brasileira. A partir dos dados obtidos será possível elaborar estratégias e protocolos de monitoramento para a área de estudo, podendo expandir os métodos para os demais portos brasileiros. Buscando contribuir para a conservação do ecossistema e uso sustentável dos recursos pesqueiros, atendendo a meta 14 do Objetivo de Desenvolvimento Sustentável das Nações Unidas para 2030.

2.3.1 Aplicação do eDNA em amostras de Água

A descoberta de que é possível detectar espécies por meio de amostras de água utilizando DNA ambiental (eDNA) representa um grande avanço no conhecimento sobre a ecologia e a conservação de organismos aquáticos (GOLDBERG *et al.*, 2015). As técnicas de eDNA ampliam as informações disponíveis sobre a presença de espécies raras ou ameaçadas de extinção, permitindo a detecção precoce de espécies invasoras e a estimativa da biodiversidade (GOLDBERG *et al.*, 2016).

Nos últimos 20 anos, o crescente número de estudos sobre DNA ambiental tem revelado informações essenciais. Por exemplo, BRANNOCK *et al.* (2016) avaliaram a diversidade de microrganismos marinhos ao longo do tempo em diferentes locais da plataforma continental do Alabama. O estudo mostrou que a composição das comunidades microbianas estava relacionada à salinidade, temperatura e concentração de silicato dissolvido, além de apresentar variações sazonais. Essas informações são fundamentais para o estudo dos ecossistemas marinhos e, sem o uso de tecnologias moleculares avançadas, seria extremamente difícil obter um entendimento abrangente dessas dinâmicas.

O potencial do eDNA na identificação da diversidade de peixes marinhos e sua comparação com levantamentos tradicionais foi investigado por THOMSEN *et al.* (2012). Os pesquisadores detectaram com sucesso o DNA de 15 espécies de peixes, incluindo espécies comerciais importantes e espécies raramente registradas. Além disso, observaram que os fragmentos de DNA se degradavam em poucos dias na água do mar, indicando que sinais positivos de eDNA refletem a presença recente das espécies.

Para obter a estrutura da comunidade de peixes em águas costeiras em 47 estações, YAMAMOTO *et al.* (2017) utilizaram eDNA metabarcoding para comparar 14 anos de dados. O estudo detectou 128 espécies, das quais 62,5% já haviam sido registradas por levantamentos tradicionais. Além disso, 20 espécies que deveriam ocorrer na área foram identificadas pela primeira vez, demonstrando a eficiência do método para aprimorar as análises do ecossistema marinho. ANDRUSZKIEWICZ *et al.* (2017) utilizaram DNA ambiental para caracterizar comunidades de vertebrados marinhos em 10 locais, identificando 7 famílias, 3 subfamílias, 10 gêneros e 72 espécies, pertencentes a 33 táxons únicos de vertebrados marinhos, com apenas uma família já conhecida na região. MASSANA *et al.* (2015) analisaram a diversidade taxonômica de comunidades de protistas planctônicos e bentônicos, observando diferenças na composição das amostras de água e sedimentos, com variações entre os locais e ao longo do tempo.

No porto de Bilbao (Espanha), REY *et al.* (2020) avaliaram a composição taxonômica das amostras por meio do DNA ambiental. Os resultados permitiram a detecção de espécies não indígenas previamente registradas, além da identificação de novas espécies, mesmo que em baixa abundância. Já ZHANG *et al.* (2020) utilizaram uma abordagem de metabarcodificação baseada em ToL para monitorar a biodiversidade do Mar Negro e analisar o impacto de processos ecológicos de grande escala na estrutura da comunidade biológica. O estudo revelou mais de 8.900 OTUs, abrangendo bactérias, algas, protozoários, metazoários invertebrados, peixes e grandes mamíferos marinhos.

No estudo realizado por SAUNDERS *et al.* (2024), utilizando tanto redes de arrasto de praia quanto metabarcoding, observaram correlação positiva entre os registros de espécies pelo eDNA e as capturas físicas. Os resultados indicam que a técnica de eDNA complementa os métodos tradicionais de captura na caracterização das comunidades de peixes em estuários. Embora essa técnica não forneça informações sobre parâmetros populacionais, como tamanho, sexo e idade, ela permite uma avaliação mais abrangente da diversidade e da presença-abundância, principalmente em ambientes de difícil acesso.

O estudo realizado por KIM *et al.* (2025) avaliou a eficácia do eDNA metabarcoding na identificação da biodiversidade de vertebrados em zonas úmidas protegidas e de difícil acesso. Foram detectadas 35 espécies nos pântanos de Jangdo e Baenngimill, no Arquipélago de Heuksan, Coreia do Sul, utilizando três primers específicos para aves, mamíferos e peixes. A combinação dos dados do eDNA com o NRS aumentou a riqueza de espécies em 35,3% em Jangdo e 10,2% em Baenngimill, demonstrando a eficiência dessa técnica para a rápida detecção de espécies com intervenção mínima. Além disso, o eDNA identificou cinco espécies

difíceis de serem observadas devido ao seu habitat subaquático ou semelhança morfológica. No entanto, para aves, o eDNA aquático teve menor precisão em comparação ao NRS, indicando a necessidade de aprimoramentos tecnológicos.

2.3.2 Aplicação do eDNA em amostras de Sedimentos

Os sedimentos marinhos e estuarinos abrigam uma grande diversidade de espécies que, além de desempenharem papéis ecológicos essenciais, são sensíveis a perturbações antropogênicas. No entanto, esses ambientes ainda são pouco estudados e, conseqüentemente, não completamente compreendidos. Isso se deve, em grande parte, à complexidade do trabalho taxonômico necessário para descrever as espécies presentes nesses sedimentos, um processo que raramente é realizado (GUARDIOLA *et al.*, 2015).

Metabarcoding de eDNA de sedimentos tem sido usado em tentativas de descrever comunidades eucarióticas, embora tenha sofrido com a falta de conhecimento taxonômico. PAWLOWSKI *et al.* (2011) usaram metabarcoding em sedimentos marinhos para examinar a riqueza eucariótica do fundo do mar e detectaram 942 a 1756 táxons por amostra, dominada por dinoflagelados, cercozoários, ciliados e euglenozoários; até táxons fotossintéticos estavam presentes. Eles determinaram que o fundo do mar é um repositório global de DNA, descrevendo organismos que vivem tanto no sedimento quanto na coluna d'água, tornando-o útil para monitorar mudanças ambientais. Um estudo de GUARDIOLA *et al.* (2015) usando metabarcoding em sedimentos do fundo do mar identificou mais de 1.600 táxons dominados por Metazoa, Alveolata, Stramenopiles e Rhizaria, com diferenças perceptíveis em uma pequena escala, dentro de localidades e entre zonas geográficas (GUARDIOLA *et al.*, 2015).

Em um estudo realizado por GUARDIOLA *et al.* (2016), foi encontrado mais de 5.500 táxons dominados por Metazoa, Alveolata, Rhizaria, Nematoda, Arthropoda e Annelida e descobriu diferenças significativas entre camadas de sedimento, zona (encosta ou cânion), profundidade e estação. Eles determinaram que, apesar do uso de uma região hipervariável, as estimativas de diversidade eram provavelmente conservadoras devido à enorme diversidade de eucariotos e que a falta de bancos de dados extensos limita a complexidade do estudo.

Para identificar eucariotos em ecossistemas impactados, CHARITON *et al.* (2010) aplicaram metabarcoding em sedimentos estuarinos obtendo com sucesso dados de sequenciamento para milhares de eucariotos de 54 filos variando de não-metazoários microscópicos a grandes metazoários, com uma grande proporção de riqueza proveniente da micro e meiofauna que são frequentemente esquecidos em pesquisas tradicionais. CHARITON *et al.* (2015) também publicaram um estudo em que o metabarcoding foi usado para avaliar a

composição eucariótica bentônica de cinco estuários de condições variadas. Eles descobriram que a composição eucariótica refletia a condição ambiental e estava fortemente correlacionada com nutrientes, turbidez e pH, com a maior riqueza biótica ocorrendo no ambiente mais perturbado.

Os autores SINNIGER *et al.* (2016) publicaram um estudo em que usaram eDNA em sedimentos para avaliar bentônicos em alto mar diversidade de metazoários em diferentes profundidades e locais em todo o mundo. Eles descobriram que seus dados eram dominados por táxons meio bentônicos, e embora todos os filos foram identificados, a diversidade permanece amplamente desconhecida devido à falta de estudos que explorem esses organismos, portanto, um banco de dados de referência que carecia de especificidade. LANZEN *et al.* (2017) testaram o uso de metabarcoding DNA genômico obtido de amostras de solo para determinar a diversidade e a estrutura da comunidade de meio e comunidades eucariotas microbentônicas, descobrindo que a profundidade de sequenciamento e as réplicas de extração são importantes para a otimização de estimativas de diversidade.

No estudo realizado por TAGLIABUE *et al.* (2023), foi utilizado metabarcoding baseado no gene COI em amostras de sedimento e água de fundo para caracterizar comunidades bênticas em três locais da costa da Emilia-Romagna (Itália), com diferentes tipos de defesa costeira. Os resultados mostraram diferenças significativas na estrutura das comunidades bênticas dependendo do local, do tipo de amostra e de sua interação. Além disso, a água de fundo revelou uma composição de espécies distinta do sedimento, refletindo maior presença de organismos pelágicos e nectônicos. Esses achados indicam a importância de considerar ambas as matrizes amostrais no monitoramento costeiro.

REFERÊNCIAS

- ALI, H.; KHAN, E. Trophic transfer, bioaccumulation, and biomagnification of nonessential hazardous heavy metals and metalloids in food chains/webs - concepts and implications for wildlife and human health. **Human and Ecological Risk Assessment**, v. 25, p. 1353–1376, 2019. <https://doi.org/10.1080/10807039.2018.1469398>.
- ALI, H.; KHAN, E.; ILAHI, I. Environmental chemistry and ecotoxicology of hazardous heavy metals: environmental persistence, toxicity, and bioaccumulation. **Journal of Chemistry**, p. 1–14, v. 2019, 2019 <https://doi.org/10.1155/2019/6730305>.
- ALLEN, M.C.; NIELSEN, A.L.; PETERSON, D.L.; LOCKWOOD, J.L. Terrestrial eDNA survey outperforms conventional approach for detecting an invasive pest insect within an agricultural ecosystem. **Environmental DNA**, v. 3, n.6, p. 1102 –1112, 2021. <https://doi.org/10.1002/edn3.231>.
- AMARAL, R.; ALFREDIN, P. Modelação Hidrossedimentológica no Canal de Acesso do Complexo Portuário do Maranhão. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v. 15, p. 5–14, 2010. <https://doi.org/10.21168/rbrh.v15n2.p5-14>.
- ANDERSEN, K.; BIRD K.L.; RASMUSSEN, M.; HAILE, J.; BREUNING-MADSEN H.; KJAER, K.H.; *et al.* Meta-barcoding of ‘dirt’ DNA from soil reflects vertebrate biodiversity. **Molecular ecology**, v. 21, p. 1966–1979, 2012. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2011.05261.x.
- ANDRADE, M.P., MAGALHÃES, A., PEREIRA, L.C.C., FLORES-MONTES, M.J., PARDAL, E.C., ANDRADE, T.P., COSTA, R.M. Effects of a La Niña event on hydrological patterns and copepod community structure in a shallow tropical estuary (Taperaçu, Northern Brazil). **Journal of Marine Systems**, v. 164, p.128–143, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmarsys.2016.07.006>.
- ANDRUSZKIEWICZ, E.A.; STARKS, H.A.; CHAVEZ, F.P.; SASSOUBRE, L.M.; BLOCK, B.A.; BOEHM, A.B. Biomonitoring of marine vertebrates in Monterey Bay using eDNA metabarcoding. **PLoS One**, v. 12, p. e0176343, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176343>.
- APPELTANS, W.; AHYONG, S. T.; ANDERSON, G.; ANGEL, M.; ARTOIS, T.; BAILLY, N.; *et al.* The magnitude of global marine species diversity. **Current Biology**, v. 22(23), p. 2189–2202, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.09.036>.
- BAILEY, S. A.; BROWN, L.; CAMPBELL, M. L.; CANNING-CLODE, J.; CARLTON, J. T.; CASTRO, N.; *et al.* Trends in the detection of aquatic non-indigenous species across global marine, estuarine and freshwater ecosystems: A 50-year perspective. **Diversity and Distributions**, v. 26, n. 12, p. 1780–1797, 2020. <https://doi.org/10.1111/ddi.13167>.
- BARNES, M. A.; TURNER, C. R. The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. **Conservation Genetics**, v. 17, p.1–17, 2016. <https://doi.org/10.1007/s10592-015-0775-4>.
- BIGGS, J.; EWALD, N.; VALENTINI, A.; GABORIAUD, C.; DEJEAN, T.; GRIFFITHS, R.A.; *et al.* Using eDNA to develop a national citizen science-based monitoring programme for the great crested newt (*Triturus cristatus*). **Biological Conservation**, v. 183, 19–28, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.029>.

BRIFFA, J.; SINAGRA, E.; BLUNDELL, R. Heavy metal pollution in the environment and their toxicological effects on humans. **Heliyon**, v. 6, p. e04691, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04691>.

CABRITA, M.T.; RAIMUNDO, J.; PEREIRA, P.; VALE, C. Immobilised *Phaeodactylum tricornutum* as biomonitor of trace element availability in the water column during dredging. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 5, p. 3572-2581, 2014.

CARVALHO-NETA, R. N. F.; SOUSA, D. B. P.; ALMEIDA Z. S.; SANTOS D. M. S.; TCHAICKA, L. A histopathological and biometric comparison between catfish (Pisces, Ariidae) from a harbor and a protected area, Brazil. **Aquatic Biosystems**, v. 10, n. 12, p. 1-7, 2014. doi: 10.1186/s12999-014-0012-5.

CARVALHO-NETA, R.N.F.; TORRES, A. R.; ABREU-SILVA, A. L. Biomarkers in catfish *Sciades herzbergii* (teleostei: ariidae) from polluted and non-polluted areas (São Marcos' Bay, Northeastern Brazil). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.166, p.1314-1327, 2012. doi: 10.1007/s12010-011-9519-1.

CASTRO P.; HUBER, M. E. 2003. **Marine Biology**. McGraw Hill, N.Y. 468 pp.

CASTRO, J. S.; FRANÇA, C. L.; FERNANDES, J. F. F.; SILVA, J. S.; CARVALHO-NETA, R. N. F.; TEIXEIRA, E. G. Biomarcadores histológicos em brânquias de *Sciades herzbergii* (Siluriformes, Ariidae) capturados no Complexo Estuarino de São Marcos, Maranhão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 2, p. 410–418, 2018. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9906>.

CHAN, F. T.; STANISLAWCZYK, K.; SNEEKES, A. C.; DVORETSKY, A.; GOLLASCH, S.; MINCHIN, D.; *et al.* Climate change opens new frontiers for marine species in the Arctic: Current trends and future invasion risks. **Global Change Biology**, v. 25, n. 1, p. 25–38, 2018. Portico. <https://doi.org/10.1111/gcb.14469>.

CHARITON, A.A.; COURT, L.N.; HARTLEY, D.M.; COLLOFF, M.J.; HARDY, C.M. Ecological assessment of estuarine sediments by pyrosequencing eukaryotic ribosomal DNA. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 8, p. 233e238, 2010. <https://doi.org/10.1890/090115>.

CHARITON, A.A.; STEPHENSON, S.; MORGAN, M.J.; STEVEN, A.D.L.; COLLOFF, M.J.; COURT, L.N.; HARDY, C.M. Metabarcoding of benthic eukaryote communities predicts the ecological condition of estuaries. **Environmental Pollution**, 203, 165e174, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.03.047>.

CHEN, X.; LI, S.; ZHAO, J.; YAO, M. Passive eDNA sampling facilitates biodiversity monitoring and rare species detection. **Environment International**, v. 187, p. 108706, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2024.108706>.

COLL, M., PIRODDI, C.; STEENBEEK, J.; KASCHNER, K.; BEN RAIS LASRAM, F.; AGUZZI, J.; *et al.* The Biodiversity of the Mediterranean Sea: Estimates, Patterns, and Threats. **PLoS One**, v. 5, n. 8, p. e11842, 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011842>.

COLLINS, R.A.; WANGENSTEEN, O.S.; O’GORMAN, E.J.; MARIANI, S.; SIMS, D.W.; GENNER, M. J. Persistence of environmental DNA in marine systems. **Communications Biology**, v. 1 (1), 185, 2018. doi:10.1038/s42003-018-0192-6. PMID: 30417122.

- CROWLEY, S.L.; HINCHLIFFE, S.; MCDONALD, R.A. Conflict in invasive species management. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 15, p. 133–141, 2017. <https://doi.org/10.1002/fee.1471>.
- DAI, Y.; YANG, S.; ZHAO, D.; HU, C.; XU, W.; ANDERSON, D.M.; *et al.* Coastal phytoplankton blooms expand and intensify in the 21st century. **Nature**, v. 615, p. 280–284, 2023. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-05760-y>.
- DAMAR, A.; COLIJN, F.; HESSE, K.-J.; ADRIANTO, L.; YONVITNER, Y.; FAHRUDIN, A.; *et al.* Phytoplankton Biomass Dynamics in Tropical Coastal Waters of Jakarta Bay, Indonesia in the Period between 2001 and 2019. **Journal of Marine Science and Engineering**, v. 8, 674, 2020. <https://doi.org/10.3390/jmse8090674>.
- DARLING, J.A.; MAHON, A. R. From molecules to management: adopting DNA-based methods for monitoring biological invasions in aquatic environments. **Environmental research**, v. 111, p. 978-988, 2011. DOI: 10.1016/j.envres.2011.02.001.
- DEINER, K.; BIK, H.M.; MACHLER, E.; SEYMOUR, M.; LACOURSIE`RE-ROUSSEL, A.; ALTERMATT, F.; *et al.* Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. **Molecular Ecology**, v. 26, n. 21, p. 5872 –5895, 2017. <https://doi.org/10.1111/mec.14350>.
- DODDS, W.K.; SMITH, V.H. Nitrogen, phosphorus, and eutrophication in streams. **Inland Waters**, v. 6, p. 155–164, 2016. <https://doi.org/10.5268/IW-6.2.909>.
- DONEY, S.C.; RUCKELSHAUS, M.; EMMETT DUFFY, J.; BARRY, J.P.; CHAN, F.; ENGLISH, C.A.; *et al.* Climate Change Impacts on Marine Ecosystems. **Annual Review of Marine Science**, v. 4, p. 11–37, 2012. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-041911-111611>.
- DONG, Y.; ZHANG, H.; WU, H.; XUE, J.; LIU, Y.; JIANG, X. Invasion risk to Yangtze River Estuary posed by resting eggs in ballast sediments from transoceanic ships. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 545, 151627, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2021.151627>.
- 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(1), 56–68, 2016. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12421>.
- ELLIOTT M.; WHITFIELD A. K. Challenging paradigms in estuarine ecology and management. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 94, p. 306-314, 2011.
- EL-ROBRINI, M. *et al.* Maranhão. In: MUEHE, D. (Org.). **Panorama da erosão costeira no Brasil** (Recurso Eletrônico) Ministério do Meio Ambiente/SRHQA/DGAT.1ed. Brasília. 2018, v.1 p. 167-239.
- EL-ROBRINI, M. **Evolution Rapide des fonds d'une zone estuarine: le Secteur d'ItaquiBaie de São Marcos-Maranhão (Brésil)**. Paris: Editions IFREMER, 1992. p. 159-175.
- FAROOQI, A.; JUTLLA, K.; RAGHAVAN, R.; WILSON, A.; UDDIN, M. S.; AKROYD, C.; *et al.* Developing a toolkit for increasing the participation of black, Asian and minority ethnic communities in health and social care research. **BMC Medical Research Methodology**, v. 22, n. 1, 2022. <https://doi.org/10.1186/s12874-021-01489-2>.

FEITOSA, A. C. Relevô do Estado do Maranhão: uma nova proposta de classificação topomorfológica. **In: Simpósio nacional de geomorfologia; regional conference on geomorphology**. 2006. p. 1-11.

FICETOLA, F. G.; MIAUD, C.; POMPANON, F.; TABERLET, P. Species detection using environmental DNA from water samples. **Biology Letters**, v. 4, n. 4, p. 423-425, 2008. DOI: 10.1098/rsbl.2008.0118.

FOOTE, A. D.; THOMSEN, P. F.; SVEEGAARD, S.; WAHLBERG, M.; KIELGAST, J.; KYHN, L. A.; *et al.* Investigating the Potential Use of Environmental DNA (eDNA) for Genetic Monitoring of Marine Mammals. **PLoS One**, v. 7, n.8, p. e41781, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041781>.

FUHRMAN, J.A.; CRAM, J.A.; NEEDHAM, D.M. Marine microbial community dynamics and their ecological interpretation. **Nature Reviews Microbiology**, 13, p. 133–146, 2015. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3417>.

FUJII, K.; DOI, H.; MATSUOKA, S.; NAGANO, M.; SATO, H.; YAMANAKA, H. Environmental DNA metabarcoding for fish community analysis in backwater lakes: a comparison of capture methods. **PLoS One**, 14: e0210357, 2019. doi:10.1371/journal.pone.0210357. PMID: 30703107.

GARCIA, F.C.; BESTION, E.; WARFIELD, R.; YVON-DUROCHER, G. Changes in temperature alter the relationship between biodiversity and ecosystem functioning. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n.43, p. 10989–10999, 2018. doi: 10.1073/pnas.1805518115.

GOLD, Z.; KOCH, M.Q.; SCHOOLER, N.K.; EMERY, K.A.; DUGAN, J.E.; MILLER, R.J.; *et al.* A comparison of biomonitoring methodologies for surf zone fish communities. **PLoS One**, 18: 1–26. doi:10.1371/journal.pone. 0260903.

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. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.040>.

GOLDBERG, C.S.; TURNER, C.R.; DEINER, K.; KLYMUS, K.E.; THOMSEN, P.F.; MURPHY, M.A.; *et al.* Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 7, n. 11, p. 1299 – 1307, 2016. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12595>.

GOLUBKOV, M.; NIKULINA, V.; GOLUBKOV, S. Species-level associations of phytoplankton with environmental variability in the Neva Estuary (Baltic Sea). **Oceanologia**, v. 63, p. 149–162, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.oceano.2020.11.002>.

GOMIZ-PASCUAL, J.J.; BOLADO-PENAGOS, M.; GONZALEZ, C.J.; VAZQUEZ, A.; BUONOCORE, C.; ROMERO-COZAR, J.; *et al.* The fate of Guadalquivir River discharges in the coastal strip of the Gulf of Cádiz. A study based on the linking of watershed catchment and hydrodynamic models. **Science of the Total Environment**, V, 795, p. 148740, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148740>.

GONZÁLEZ-GORBEÑA, E.; ROSMAN, P. C. C.; QASSIM, R. Y. Assessment of the tidal current energy resource in São Marcos Bay, Brazil. **Journal of Ocean Engineering and Marine Energy**, v. 1, p. 421-433, 2015.

GROSHOLZ, E. Ecological and Evolutionary Consequences of Coastal Invasions. **TRENDS in Ecology & Evolution**, v. 17, n. 1, p. 22–27, 2002. [https://doi.org/10.1016/s0169-5347\(01\)02358-8](https://doi.org/10.1016/s0169-5347(01)02358-8).

GUARDIOLA, M.; URIZ, M.J.; TABERLET, P.; COISSAC, E.; WANGENSTEEN, O.S.; TURON, X. Deep-sea, deep sequencing: metabarcoding extracellular DNA from sediments of marine canyons. **PLoS One**, v. 10, e0139633, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139633>.

GUARDIOLA, M.; WANGENSTEEN, O.S.; TABERLET, P.; COISSAC, E.; URIZ, M.J.; TURON, X. Spatio-temporal monitoring of deep-sea communities using metabarcoding of sediment DNA and RNA. **PeerJ**, v. 4, p. e2807, 2016. DOI: 10.7717/peerj.2807.

HAASE, P.; MURRAY-BLIGH, J.; LOHSE, S.; PAULS, S.; SUNDERMANN, A.; GUNN, R.; CLARKE, R. Assessing the impact of errors in sorting and identifying macroinvertebrate samples. **Hydrobiologia**, v. 566, n. 1, p. 505521, 2006. <https://doi.org/10.1007/s10750-006-0075-6>.

HAILE, J.; FROESE, D.G.; MACPHEE, R.D.; ROBERTS, R. G.; ARNOLD, L.J.; REYES, A.V.; *et al.* Ancient DNA reveals late survival of mammoth and horse in interior Alaska. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, p. 22352-22357, 2009. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912510106>.

HANDELSMAN, J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 68, p. 669-685, 2004.

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: 20191409, 2019. doi:10.1098/rspb. 2019.1409.

HE, Y.; QIN, N.; HE, W.; XU, F. The impacts of algae biological pump effect on the occurrence, source apportionment and toxicity of SPM-bound PAHs in lake environment. **Science Total Environmental**, v, 753, 141980, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141980>.

HERING, D.; BORJA, A.; JONES, J. I.; PONT, D.; BOETS, P.; BOUCHEZ, A.: *et al.* Implementation options for DNA-based identification into ecological status assessment under the European Water Framework Directive. **Water Research**, v. 138, p. 192–205, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.03.003>.

HOLT, J.; SCHRUM, C.; CANNABY, H.; DAEWEL, U.; ALLEN, I.; ARTIOLI, Y.; *et al.* Potential impacts of climate change on the primary production of regional seas: A comparative analysis of five European seas. **Progress in Oceanography**, v. 140, p. 91–115, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2015.11.004>.

HU, J.; HAN, G.; ZHANG, Q. Impactos das Mudanças Ambientais e das Atividades Humanas nos Ecossistemas Aquáticos. **Water**, v. 17, 1669, 2025. <https://doi.org/10.3390/w17111669>.

HULME, D. The Millennium Development Goals (MDGs): A Short History of the World's Biggest Promise. **Brooks World Poverty Institute**. BWPI Working Paper 100. 2009.

JANE, S. F.; WILCOX, T. M.; MCKELVEY, K. S.; YOUNG, M. K.; SCHWARTZ, M. K.; LOWE, W. H.; *et al.* Distance, flow and PCR inhibition: e DNA dynamics in two headwater

streams. **Molecular Ecology Resources**, v. 15, n. 1, p. 216–227, 2014. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12285>.

JAYACHANDRAN, P. R.; BIJOY NANDAN, S. Assessment of trophic change and its probable impact on tropical estuarine environment (the Kodungallur-Azhikode estuary, India). **Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change**, v. 17, n. 7, p. 837–847, 2011. <https://doi.org/10.1007/s11027-011-9347-1>.

JERDE, C. L.; MAHON, A. R.; CHADDERTON, W. L.; LODGE, D. M. “Sight-unseen” detection of rare aquatic species using environmental DNA. **Conservation Letters**, v. 4, n. 2, p. 150–157, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1755-263x.2010.00158.x>

JØRGENSEN, S. E.; XU, F.-L.; SALAS, F.; MARQUES, J. C. Application of indicators for the assessment of ecosystem health. In S. E. JØRGENSEN, F.-L. XU, & R. COSTANZA (Eds.), **Handbook of Ecological Indicators for Assessment of Ecosystem Health**, 2nd ed. 2010, pp. 9–75.

KALENDAR, R.; LEE, D.; SCHULMAN, A. H. Java web tools for PCR, *in silico* PCR, and oligonucleotide assembly and analysis. **Genomics**, v. 98, n. 2, p.137–144, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2011.04.009>.

KARATAYEV, A. Y.; BURLAKOVA, L. E.; PADILLA, D. K.; MASTITSKY, S. E.; OLENIN, S. Invaders are not a random selection of species. **Biological Invasions**, v. 11, n. 9, 2009–2019, 2009. <https://doi.org/10.1007/s10530-009-9498-0>.

KARR, J.R. Biological integrity - A long-neglected aspect of water-resource management. **Ecological Applications**, v. 1, v. 66–84, 1991.

KECK, F.; BLACKMAN, R.C.; BOSSART, R.; BRANTSCHEN, J.; COUTON, M.; HÜRLEMANN, S.; *et al.* Meta-analysis shows both congruence and complementarity of DNA and eDNA metabarcoding to traditional methods for biological community assessment. **Molecular Ecology**, v. 31, p. 1820–1835, 2022. <https://doi.org/10.1111/mec.16364>.

KECK, F.; BRANTSCHEN, J.; & ALTERMATT, F. A combination of machine-learning and eDNA reveals the genetic signature of environmental change at the landscape levels. **Molecular Ecology**, v. 32, n. 17, p. 4791–4800, 2023. <https://doi.org/10.1111/mec.17073>

KELLY, R.P.; PORT, J.A.; YAMAHARA, K.M.; MARTONE, R.G.; LOWELL, N.; THOMSEN, P.F.; MACH M.E.; *et al.* Harnessing DNA to improve environmental management. **Science**, v. 344, p. 1455–1456, 2014. <https://doi.org/10.1126/science.1251156>.

KENNISH, M. J. Environmental threats and environmental future of estuaries. **Environmental Conservation**, v. 29, n. 1, p. 78–107, 2002. <https://doi.org/10.1017/s0376892902000061>.

KIM, G.; KANG, Y.; SONG, Y. Multi-primer-based environmental DNA survey for vertebrate biodiversity monitoring in protected island wetlands. **Global Ecology and Conservation**, v.58, p. e03474, 2025. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2025.e03474>.

KJERFVE, B.; PERILLO, G.M.; GARDNER, L.R.; RINE, J.M.; DIAS, G.T.M.; MOCHEL, F.R. 2002. **Morphodynamics of muddy environments along the Atlantic coasts of North and South America**. In: Healy, T.R., Wang, Y., Healy, J.A. (Eds.), *Muddy Coasts of the World: Processes, Deposits and Functions*. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 479–532.

LANZEN, A.; LEKANG, K.; JONASSEN, I.; THOMPSON, E.M.; TROEDSSON, C. DNA extraction replicates improve diversity and compositional dissimilarity in metabarcoding of eukaryotes in marine sediments. **PLoS One**, v. 12, p. e0179443, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179443>.

LASSUS, P.; CHOMERAT, N.; HESS, P.; NEZAN, E. Micro-algues toxiques et nuisibles de l'océan mondial. COI Manuels et Guides, 68, **Toxic and Harmful Microalgae of the World Ocean**. IOC Manuals and Guides, 68, 2016.

LIMA, H.P.; DIAS, F.J.S.; TEIXEIRA, C.E.P.; GODOI, V.A.; TORRES, A.R.; ARAÚJO, R.S. Implications of turbulence in a macrotidal estuary in northeastern Brazil — The São Marcos Estuarine Complex. **Regional Studies in Marine Science**, v. 47, p. 101947, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2021.101947>.

LIU, T.; LIU, H.; TONG, J.; YANG, Y. Habitat suitability of neotenic net-winged beetles (Coleoptera: Lycidae) in China using combined ecological models, with implications for biological conservation. **Diversity and Distributions**, v. 28, n. 12, p. 2806–2823, 2022. <https://doi.org/10.1111/ddi.13545>.

LIU, Z.; YANG, A.; LIU, J.; XING, C.; HUANG, S.; HUO, Y.; *et al.* Turnover of phytoplankton and zooplankton communities driven by human-induced disturbances and climate changes in a small urban coastal wetland. **Ecological Indicators**, v. 157, p. 111271, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2023.111271>.

LIU, X.; HO, L.; BRUNEEL, S.; GOETHALS, P. Applications of unmanned vehicle systems for multi-spatial scale monitoring and management of aquatic ecosystems: A review. **Ecological Informatics**, 102926. 2025. <https://doi.org/10.1016/j.ecoinf.2024.102926>.

LODGE, D. M.; WILLIAMS, S.; MACISAAC, H.J.; HAYES, K.R.; LEUNG, B.; REICHARD, S.; *et al.* Biological invasions: recommendations for US policy and management. **Ecological applications**, v. 16, p. 2035-2054, 2006.

LOTZE, H.K. Marine biodiversity conservation. **Current Biology**, v 31, R1190–R1195, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.06.084>.

MACLEOD, C.; COUGHANOWR, C. Heavy metal pollution in the Derwent estuary: history, science and management. **Regional Studies in Marine Science**, v. 32, p. 100866, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2019.100866>.

MAHMOUD, M.G.; EL-KHIR, E.A.; EBEID, M.H.; MOHAMED, L.A.; FAHMY, M.A.; SHABAN, K.S. An Assessment on the Coastal Seawater Quality of the Gulf of Suez, Egypt **Journal of Environmental Protection**, v. 11, p. 34–47, 2020. <https://doi.org/10.4236/jep.2020.111004>.

MAHON, A. R.; JERDE, C.L.; GALASKA, M.; BERGNER, J.L.; CHADDERTON, W.L.; LODGE, D. M.; *et al.* Validation of eDNA surveillance sensitivity for detection of Asian carps in controlled and field experiments. **PloS One**, v. 8, p. e58316, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058316>.

MANDELIK, Y.; ROLL, U.; FLEISCHER, A. Cost-efficiency of biodiversity indicators for Mediterranean ecosystems and the effects of socio-economic factors. **Journal of Applied Ecology**, v. 47, n. 6, p. 11791188, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2010.01864.x>

MARTORANO, L. G.; FERREIRA, L. C.; CÉSAR, E. G.; M, PEREIRA, I. C. B. Estudos Climáticos do Estado do Pará, Classificação Climática (KOPPEN) e 1993. **Deficiência Hídrica** (THORNTH, WHITE, MATHER). Belém: SUDAM/EMBRAPA, SNLCS.1-53.

MÁRQUEZ, R. E. M. Evaluation of trophic status in the Pom-Atasta and Palizada del Este Fluvial-lagoon systems Campeche, Mexico. **Hidrobiológica**, 27(3), 281–291, 2017. <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbs/hidro/2017v27n3/mucino>.

MASSANA, R.; GOBET, A.; AUDIC, S.; BASS, D.; BITTNER, L.; BOUTTE, C.: *et al.* Marine protist diversity in European coastal waters and sediments as revealed by high-throughput sequencing. **Environmental Microbiology**, v. 17, n. 10, p. 4035–4049, 2015. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12955>.

MCCAULEY, D.J.; PINSKY, M.L.; PALUMBI, S.R.; ESTES, J.A.; JOYCE, F.H.; WARNER, R.R. Marine defaunation: Animal loss in the global ocean. **Science**, v. 347, p. 247–254, 2015.

MEADE, R.H.; DUNNE, T.; RICHEY, J.E.; SANTOS, U. DE M.; SALATI, E. Storage and remobilization of suspended sediment in the lower Amazon River of Brazil. **Science**, v. 228, p. 488–490, 1985.

MIYA, M. Environmental DNA metabarcoding: a novel method for biodiversity monitoring of marine fish communities. **Annual Review of Marine Science**, v. 14, p. 161–185, 2022. [doi:10.1146/annurev-marine-041421-082251](https://doi.org/10.1146/annurev-marine-041421-082251).

MORAIS, R.C.S. **Ensaios de multiplex PCR em tempo real (TaqMan probe) para identificação de Leishmania spp. relacionadas com a etiologia da leishmaniose tegumentar Americana**. 2019. 129f. Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, CPQAM, Recife, 2019.

MORSY, A.; EBEID, M.; SOLIMAN, A.; HALIM, A.A.; ALI, A.E.; FAHMY, M. Evaluation of the water quality and the eutrophication risk in Mediterranean Sea area: A case study of the Port Said Harbour, Egypt. **Environmental Challenges**, v. 7, p. 100484, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.envc.2022.100484>.

MOZETIČ, P.; CANGINI, M.; BASTIANINI, M.; AUBRY, F. B.; BUŽANČIĆ, M.; CABRINI, M.; *et al.* Phytoplankton diversity in Adriatic ports: Lessons from the port baseline survey for the management of harmful algal species. **Marine Pollution Bulletin**, v. 147, p. 117–132, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.12.029>.

MULIK, J.; SUKUMARAN, S.; SRINIVAS, T. Factors structuring spatio-temporal dynamics of macrobenthic communities of three differently modified tropical estuaries. **Marine Pollution Bulletin**, v. 150, p. 110767, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110767>.

MUNIZ, H. V. L.; SILVA NETO, A. F. DA.; SALES, L. A. T.; SOARES, T. R.; ALVES, M. S. Desenvolvimento de primers *in silico* de *Mycobacterium tuberculosis* da região 16s para o diagnóstico da tuberculose. **Interfaces Científicas - Saúde e Ambiente**, v. 8, n. 2, p. 77–86, 2021. <https://doi.org/10.17564/2316-3798.2020v8n2p77-86>.

NDHLOVU, A.; HUMAN, L.R.D.; ADAMS, J.B.; RISHWORTH, G.M.; OLISAH, C.; BORNMAN, T.G. Ecological risk assessment of metal pollutants in two agriculturally impacted estuaries. **Marine Pollution Bulletin**, v. 195, p. 115572, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.115572>.

NIMMA, D.; DEVI, O. R.; LAISHRAM, B.; RAMESH, J. V. M.; BODDUPALLI, S.; AYYASAMY, R.; TIRTH, V.; ARABI, A. Implications of climate change on freshwater ecosystems and their biodiversity, **Desalination and Water Treatment**, v. 321, 2025, p. 100889, 2025. ISSN 1944-3986, <https://doi.org/10.1016/j.dwt.2024.100889>.

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

OLIVEIRA, S.R.S.; SANTOS, B.W.; SOUSA, J.B.M.; NOLETO, K.S.; LIMA, I.M.A.; ANDRADE, T.S.M.; CARVALHO-NETA, R.N.F. Enzymatic and histological biomarkers in *Ucides cordatus* (Crustacea, Decapoda) in an industrial Port on the North Coast of Brazil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 102, n. 6, p. 802–810, 2019. DOI: 10.1007/s00128-019-02594-1.

PAWLOWSKI, J.; CHRISTEN, R.; LECROQ, B.; BACHAR, D.; SHAHBAZKIA, H.R.; AMARAL-ZETTLER, L.; GUILLOU, L. Eukaryotic richness in the abyss: insights from pyrotag sequencing. **PLoS One**, v. 6, p. e18169, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018169>.

PELT-VERKUIL *et al.*, 2008: PELT-VERKUIL, E.; VAN BELKUM, A.; HAYS, J. P. **Principles and technical aspects of PCR amplification**, Springer, 332 pp, 2008.

PEREIRA, L.C.C.; JIMÉNEZ, J.A.; PINEDA, M.G.; COSTA, Á.K.R.; DA SILVA SOUSA, N. DO S.; DE OLIVEIRA, A.R.G.; COSTA, R.M. Assessment of Trophic Status in Amazonian Estuaries: A Reinterpretation of Trix Values in Mangrove Estuaries. **Ocean & Coastal Management**, v. 244, 106805, 2023. <https://doi.org/10.2139/ssrn.4432726>.

PEREIRA, L.; DIAS, J.; CARMO, J.; POLETTE, M. A zona costeira amazônica. **Journal of Integrated Coastal Zone Management**, v. 9, n.2 :3-7, 2009. <https://doi.org/10.5894/rgci172>.

PILLIOD, D.S.; GOLDBERG, C.S.; ARKLE, R.S.; WAITS, L.P.; RICHARDSON, J., Estimating occupancy and abundance of stream amphibians using environmental DNA from filtered water samples. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 70, p. 1123–1130. 2013. <https://doi.org/10.1139/cjfas-2013-0047>.

PIMENTEL, D.; ZUNIGA, R.; MORRISON, D. Update of the environmental and economic costs associated with alien invasive species in the United States. **Ecological Economics**, v. 52, n. 3, p. 273–288, 2005.

PINHEIRO-SOUSA, D.B.; DA COSTA SOARES, S.H.; TORRES, H.S.; DE JESUS, W.B.; DE OLIVEIRA, S.R.S.; BASTOS, W.R.; *et al.* Sediment contaminant levels and multibiomarker approach to assess the health of catfish *Sciades herzbergii* in a harbor from the northern Brazilian Amazon. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 208, p. 111540, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111540>.

QUEIROZ, J.B.M.; OLIVEIRA, A.R.G.D.; COSTA, K.G.D.; BRITO, E.P.; FERNANDES, F.D.D.S.; NUNES, Z.M.P.; KOENING, M.L.; *et al.* Phytoplankton of the shipping sector of São Marcos Bay (Amazon Coast): A potential risk area for the establishment of non-indigenous species. **Regional Studies in Marine Science**, v. 49, p. 102121, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2021.102121>.

REES, H. C.; MADDISON, B. C.; MIDDLEDITCH, D. J.; PATMORE, J. R.; GOUGH K. C. The detection of aquatic animal species using environmental eDNA“a review of eDNA as a

survey tool in ecology. **Journal of Applied Ecology**, v. 51, p. 1450-1459, 2014. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12306>.

REES, H. C.; MADDISON, B. C.; MIDDLEDITCH, D. J.; PATMORE, J. R.; GOUGH K. C. The detection of aquatic animal species using environmental eDNA—a review of eDNA as a survey tool in ecology. **Journal of Applied Ecology**, v. 51, p. 1450-1459, 2014. DOI:10.1111/1365-2664.12306.

REID, A.J.; CARLSON, A.K.; CREED, I.F.; ELIASON, E.J., GELL, P.A., JOHNSON, P.T.J., *et al.*, Emerging threats and persistent conservation challenges for freshwater biodiversity. **Biological Reviews/Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 94(3), p. 849–873, 2019. <https://doi.org/10.1111/brv.12480>.

REY, A.; BASURKO, O.C.; RODRIGUEZ-EZPELETA, N. Considerations for metabarcoding-based port biological baseline surveys aimed at marine nonindigenous species monitoring and risk assessments. **Ecology and Evolution**, v. 10, n. 5, p. 2452–2465, 2020. <https://doi.org/10.1002/ece3.6071>.

REYES-VELARDE, P. M.; ALONSO-RODRÍGUEZ, R.; DOMÍNGUEZ-JIMÉNEZ, V. P.; CALVARIO-MARTÍNEZ, O. The spatial distribution and seasonal variation of the trophic state TRIX of a coastal lagoon system in the Gulf of California. **Journal of Sea Research**, 193, 102385, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2023.102385>.

RODRIGUES, M.; CRAVO, A.; FREIRE, P.; ROSA, A.; SANTOS, D. Temporal assessment of the water quality along an urban estuary (Tagus estuary, Portugal). **Marine Chemistry**, 223, 103824, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2020.103824>.

RONDON, M. R.; AUGUST, P. R.; BETTERMANN, A. D.; BRADY, S. F.; GROSSMAN, T. H.; LILES, M. R., *et al.* Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**. 66, (6), p. 2541-2547, 2000. DOI: 10.1128/AEM.66.6.2541-2547.2000.

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

SAHU, A.; KUMAR, N.; SINGH, C.P.; SINGH, M. Environmental DNA (eDNA): Powerful Technique for Biodiversity Conservation. **Journal for Nature Conservation**, v. 71, p. 126325, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jnc.2022.126325>.

SANTOS, A.M.; CIANCIARUSO, M.V.; BARBOSA, A.M.; BINI, L.M.; DINIZ-FILHO, J.A.F.; FALEIRO, F.V.; *et al.* Current climate, but also long-term climate changes and human impacts, determine the geographic distribution of European mammal diversity. **Global Ecology and Biogeography**, v. 29, 1758–1769, 2020. <https://doi.org/10.1111/geb.13148>.

SAUNDERS, M.; STEEVES, R.; MACINTYRE, L. P.; KNYSH, K. M.; COFFIN, M. R. S.; BOUDREAU, M.; *et al.* Monitoring estuarine fish communities – environmental DNA (eDNA) metabarcoding as a complement to beach seining. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**. 2024. <https://doi.org/10.1139/cjfas-2023-0227>.

SAVURIRAJAN, M.; BARATHKUMAR, S.; KARTHIKEYAN, P.; MARIGOUDAR, S. R.; SHARMA, K. V.; MURTHY, M. V. R. Assessment of ecological quality status using macrobenthic faunal diversity as tools in anthropogenically disturbed Ennore estuary, Tamil

Nadu, India. **Regional Studies in Marine Science**, v. 56, p. 102629, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2022.102629>.

SCHULER, G. D. Sequence mapping by electronic PCR. **Genome research**, v. 7, n. 5, p. 541-550, 1997. <https://doi.org/10.1101/gr.7.5.541>.

SEEBENS, H.; SCHWARTZ, N.; SCHUPP, P. J.; BLASIUS, B. Predicting the spread of marine species introduced by global shipping. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 20, p. 5646–5651, 2016. <https://doi.org/10.1073/pnas.1524427113>.

SEYMOUR, M.; CLAVEY, M.V.; MIYA, M.; CREER, S.; CARVALHO, G.; VON DER HEYDEN, S. Environmental DNA reveals coastal fish biodiversity response across the Atlantic-Indian Ocean environmental transition gradient. **Ecological Indicator**, v. 179, October 2025, 114186, 2025. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2025.114186>.

SILVA, G.; SOUSA, A.; COSTA, J.L.; CHAINHO, P. Non-indigenous species in soft-sediments: are some estuaries more invaded than others? **Ecological Indicators**, v. 110, p. 105640, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.105640>.

SINNIGER, F.; PAWLOWSKI, J.; HARI, S.; GOODAY, A.J.; YAMAMOTO, H.; CHEVALDONNE, P.; *et al.* Worldwide analysis of sedimentary DNA reveals major gaps in taxonomic knowledge of deep-sea benthos. **Frontiers in Marine Science**, v. 3, 2016. <https://doi.org/10.3389/fmars.2016.00092>.

SIRVIENTE, S.; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, J.; GOMIZ-PASCUAL, J.J.; BOLADO-PENAGOS, M.; SIERRA, A.; ORTEGA, T.; *et al.* A numerical simulation study of the hydrodynamic effects caused by morphological changes in the Guadalquivir River Estuary. **Science of The Total Environment**, v. 902, p. 166084, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166084>.

SOCOLAR, J.B.; GILROY, J.J.; KUNIN, W.E.; EDWARDS, D.P., How should beta-diversity inform biodiversity conservation? **Trends in Ecology & Evolution**, v. 31, p. 67–80, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2015.11.005>.

SOUSA, D.B.P.; ALMEIDA, Z.S.; CARVALHO-NETA, R.N.F. Biomarcadores histológicos em duas espécies de bagres estuarinos da Costa Maranhense, Brasil. Histology biomarkers in two estuarine catfish species from the Maranhense Coast, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, p. 369-376, 2013.

SOUZA FILHO, P. W. M.; CUNHA, E. R. S. P. da; SALES M. E. da C.; SOUZA, L. F. M. de O.; COSTA, F. R. (Org.). **Bibliografia da zona costeira Amazônica**. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi/Universidade Federal do Pará/Petrobras, 2005.

SOUZA FILHO, P.W.M., Costa de manguezais de macromaré da Amazônia: cenários morfológicos, mapeamento e quantificação de áreas usando dados de sensores remotos. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 23 (4), p. 427–435, 2005. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-261X2005000400006>.

SUZZI, A. L.; HUGGETT, M. J.; GASTON, T. F.; MACFARLANE, G. R.; ALAM, M. R.; GIBB, J.; STAT, M. eDNA metabarcoding reveals shifts in sediment eukaryote communities in a metal contaminated estuary. **Marine Pollution Bulletin**, v. 191, p. 114896, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.114896>.

TAGLIABUE, A.; MATTERSON, K.; PONTI, M.; TURICCHIA, E.; ABBIATI, M.; COSTANTINI, F. Sediment and bottom water eDNA metabarcoding to support coastal management. **Ocean & Coastal Management**, v. 244, p.106785, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2023.106785>.

TAKAHARA, T.; MINAMOTO, T.; DOI, H. Using environmental DNA to estimate the distribution of an invasive fish species in ponds. **PLoS One**, v. 8, p. e56584, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056584>.

TEUTSCHBEIN, C.; SPONSELLER, R.A.; GRABS, T.; BLACKBURN, M.; BOYER, E.W.; HYTTEBORN, J.K.; BISHOP, K. Future Riverine Inorganic Nitrogen Load to the Baltic Sea From Sweden: An Ensemble Approach to Assessing Climate Change Effects. **Global Biogeochemical Cycles**, v, 31, p. 1674–1701, 2017. <https://doi.org/10.1002/2016GB005598>.

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. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.019>.

THOMSEN, P.F.; KIELGAST, J.; IVERSEN, L.L.; MØLLER, P.R.; RASMUSSEN, M.; WILLERSLEV, E. Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. **PLoS One**, v. 7, e41732, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041732>.

THORNTON, J. A.; HARDING, W. R.; SLAWSKI, T. M.; LIN, H. Monitoring and Evaluation: The Foundation for Lake and Reservoir Management. **Earth**, v. 3(1), p. 115–124, 2022. <https://doi.org/10.3390/earth3010008>.

VALIERE, N.; TABERLET, P. Urine collected in the field as a source of DNA for species and individual identification. **Molecular ecology**, v. 9, p. 2150-2152, 2000.

VAN DER HEYDE, M.; BUNCE, M.; WARDELL–JOHNSON, G.; FERNANDES, K.; WHITE, N.E.; NEVILL, P. Testing multiple substrates for terrestrial biodiversity monitoring using environmental DNA metabarcoding. **Molecular Ecology Resources**, v. 20, n. 3, p. 732–745, 2020. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13148>.

VERMA, M.; SYMES, W. S.; WATSON, J. E. M.; JONES, K. R.; ALLAN, J. R.; VENTER, O.; RHEINDT, F. E.; EDWARDS, D. P.; CARRASCO, L. R. Severe human pressures in the Sundaland biodiversity hotspot. **Conservation Science and Practice**, v. 2, p. 169, 2020.

VOLLENWEIDER, R.A.; GIOVANARDI, F.; MONTANARI, G.; RINALDI, A. Characterization of the trophic conditions of marine coastal waters with special reference to the NW Adriatic Sea: proposal for a trophic scale, turbidity and generalized water quality index. **Environmetrics**, v. 9, p. 329–357, 1998.

WANG, M. Y.; JIN, B. F.; WANG, X.; LI, K. Characteristics of grain size and heavy minerals of sandy beach outside the abandoned Yellow River Estuary and its genetic mechanism. **Marine Sciences**, v. 43, n. 1, p. 50e60, 2019.

WILLERSLEV, E.; HANSEN, A. J.; BINLADEN, J.; BRAND, T. B.; GILBERT, M. T.P.; SHAPIRO, B.; *et al.* Diverse plant and animal genetic records from Holocene and Pleistocene sediments. **Science**, v. 300, p. 791-795, 2003.

WU, H.; DENG, B.; YUAN, R.; HU, J.; GU, J.; SHEN, F.; ZHU, J.; ZHANG, J. Detiding Measurement on Transport of the Changjiang-Derived Buoyant Coastal Current. **Journal of Physical Oceanography**, v. 43, p. 2388–2399, 2013. <https://doi.org/10.1175/JPO-D-12-0158.1>.

YAMAMOTO, S.; MASUDA, R.; SATO, Y.; SADO, T.; ARAKI, H.; KONDOH, M.; *et al.* Environmental DNA metabarcoding reveals local fish communities in a species-rich coastal sea. **Scientific Reports**, v. 7, p. 40368, 2017. DOI: 10.1038/srep40368.

YANG, J.; ZHANG, L.; MU, Y.; ZHANG, X. Small changes make big progress: A more efficient eDNA monitoring method for freshwater fish. **Environmental DNA**, v. 5, n. 2, p. 363–374, 2023. <https://doi.org/10.1002/edn3.387>.

ZENETOS, A.; GOFAS, S.; MORRI, C.; ROSSO, A.; VIOLANTI, D.; GARCIA RASO, J. E.; *et al.* Alien species in the Mediterranean Sea by 2012. A contribution to the application of European Union's Marine Strategy Framework Directive (MSFD). Part 2. Introduction trends and pathways. **Mediterranean Marine Science**, v. 13, n. 2, p. 328, 2012. <https://doi.org/10.12681/mms.327>.

ZHANG, T.; DU, N.; GENG, Z.; WANG, S.; GAO, Y.; YANG, G.; *et al.* Estimation of estuarine habitat degradation and its influence on the reproduction process of the crab *Eriocheir sinensis* in the Yangtze River Estuary. **Ecological Processes**, v. 12, n. 59, 2023. <https://doi.org/10.1186/s13717-023-00473-6>.

ZHANG, X. Environmental DNA shaping a new era of ecotoxicological research. **Environmental Science & Technology**, v. 53, n. 10, 5605–5613, 2019. doi: 10.1021/acs.est.8b06631.

ZHANG, Y.; PAVLOVSKA, M.; STOICA, E.; PREKRASNA, I.; YANG, J.; SLOBODNIK, J.; *et al.* Holistic pelagic biodiversity monitoring of the Black Sea via eDNA metabarcoding approach: From bacteria to marine mammals. **Environment International**, v. 135, p. 105307, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105307>.

ZHANG, Y.; QIU, Y.; ZHONG, W.; YANG, J.; ALTERMATT, F.; ZHANG, X. Evaluating eDNA and eRNA metabarcoding for aquatic biodiversity assessment: From bacteria to vertebrates. **Environmental Science and Ecotechnology**, v. 21, p. 100441, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.es.2024.100441>.

3 CAPÍTULO 1**Influência de fatores ambientais e interações ecológicas entre os múltiplos táxons
no Complexo Estuarino de São Marcos (Costa Amazônica, Brasil)**

Revista Regional Studies in Marine Science (Qualis A4)

Status: Manuscrito não submetido

Influência de fatores ambientais e interações ecológicas entre os múltiplos táxons no Complexo Estuarino de São Marcos (Costa Amazônica, Brasil)

Jordana Adorno Furtado^a; Ligia Tchaicka^{a,b*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal (REDE BIONORTE), Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), 65055-310, São Luís, Maranhão, Brasil

^bPrograma de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade (PPGECB), Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), 65055-310, São Luís, Maranhão, Brasil

*Autor correspondente: Ligia Tchaicka

Endereço de e-mail: ligiatchaicka@professor.uema.br

Resumo

Este estudo avaliou os fatores ambientais capazes de alterar os padrões de distribuição da biodiversidade no Complexo Estuarino de São Marcos (CESM). Foram analisados dados coletados entre 2018 e 2023, abrangendo parâmetros físico-químicos, nutrientes e a composição de múltiplos táxons para compreender como a heterogeneidade sazonal e temporal influencia a estrutura das comunidades biológicas. As condições ambientais apresentaram variações significativas entre anos e estações, com maior heterogeneidade registrada durante o período seco e nos anos de 2020 e 2023, marcados por eventos climáticos extremos. Um total de 289 táxons distribuídos em 19 filos foi registrado, com predominância de Heterokontophyta, Chordata, Arthropoda e Mollusca. A riqueza de espécies foi maior nos anos de 2022 e 2023, sugerindo que a variabilidade ambiental pode favorecer a ocorrência de grupos ecologicamente distintos. A análise de β -diversidade revelou que a substituição de espécies foi responsável por cerca de 90% da variação total na composição das comunidades, evidenciando forte rotatividade e reorganização ecológica ao longo do gradiente ambiental. Os resultados demonstram que a dinâmica ambiental do CESM, modulada por variações climáticas e influências antrópicas, promove mudanças significativas na distribuição da biodiversidade e nas interações ecológicas. Esse padrão reforça a importância de monitoramento contínuo.

Palavras-chave: Diversidade biológica; Variáveis ambientais; Sazonalidade; Estuário amazônico

Abstract

This study evaluated the environmental factors capable of altering biodiversity distribution patterns in the São Marcos Estuarine Complex (SMEC). Data collected between 2018 and 2023 were analyzed, encompassing physicochemical parameters, nutrients, and the composition of multiple taxa to understand how seasonal and temporal heterogeneity influences the structure of biological communities. The predicted environmental conditions showed significant variations between years and seasons, with greater heterogeneity recorded during the dry period and in the years 2020 and 2023, marked by extreme climatic events. A total of 289 taxa distributed across 19 phyla were recorded, with a predominance of Heterokontophyta, Chordata, Arthropoda, and Mollusca. Species richness was highest in the years 2022 and 2023, indicating that environmental variability can favor the occurrence of ecologically distinct groups. A β -diversity analysis revealed that species replacements accounted for approximately 90% of the total variation in community composition, demonstrating strong ecological turnover and reorganization along the environmental gradient. The results show that the environmental dynamics of the SMEC, modulated by climatic variations and anthropogenic influences, promote significant changes in biodiversity distribution and ecological interactions. This pattern reinforces the importance of continuous monitoring.

Keywords: Biological diversity; Environmental variables; Seasonality; Amazon estuary

1. Introdução

Os sistemas estuarinos, caracterizados por uma ampla diversidade de condições bióticas e abióticas, se destacam por oferecer uma variedade de serviços ecossistêmicos essenciais (Lécuyer et al., 2024; Harris et al., 2025). Dentre os quais se incluem o aporte de nutrientes para a zona costeira (Hall et al., 2015; Le Gouvello et al., 2017), habitat para aves migratórias ameaçadas de extinção (Liu et al., 2025), berçários para peixes marinhos e espécies residentes (Miller et al., 2014 ; Chalifour et al., 2019 ; Guerreiro et al., 2021), além de realizar o sequestro de carbono (Waycott et al., 2009; Novak et al., 2020) e a manutenção dos estoques de peixes economicamente importantes (Nixon et al., 1986). Esses sistemas apresentam elevada variação nas condições ambientais resultante da influência das marés, flutuações de temperatura e oscilações na descarga de água doce (Young e Potter, 2002; Oczkowski et al., 2015; Nascimento et al., 2021).

As condições naturais dos estuários estão sendo modificadas pelas atividades antropogênicas, resultando em alterações geoquímicas que afetam de forma significativa a

qualidade da água e comprometem o equilíbrio biogeoquímico desses ecossistemas em escala global (Doney et al., 2009; Robbins e Lisle, 2018). Estuários em todo o mundo, estão sendo afetados pelas mudanças climáticas, enfrentando extremos de salinidade, acidificação e aquecimento das águas (Robbins e Lisle, 2018; Scanes et al., 2020; Long e Mora, 2023). Mudanças nas condições ambientais promovem alterações de longo prazo que afetam a riqueza de espécies, a biomassa, a estrutura genética e as teias alimentares (Gilarranz et al., 2016; Ducrotoy et al., 2019).

As comunidades biológicas constituem redes complexas formadas pelas interações entre as espécies, e não apenas pela simples soma de organismos individuais (Mokross et al., 2014; Vitali et al., 2023). Estudos que focam em grupos isolados e desconsideram os efeitos das interações dentro das redes ecológicas tendem a limitar a compreensão da complexidade das relações ecológicas e da dinâmica das comunidades (Yan et al., 2025). Diante do atual cenário de intensa degradação dos ecossistemas, decorrente da combinação e acumulação de diversos estressores (Halpern et al., 2013), é fundamental identificar e testar variáveis capazes de indicar o potencial de mudanças dinâmicas no estado da comunidade (Juan et al., 2013).

A diversidade β é comumente descrita como a variação na composição de espécies entre diferentes áreas, estabelecendo uma conexão direta entre a diversidade local (α) e a diversidade regional (γ) (Whittaker 1960, 1972). Nesse contexto, a β -diversidade desempenha um papel fundamental na identificação de escalas significativas de variação e na compreensão dos processos ecossistêmicos afetados por atividades humanas (Thrush et al., 2010; Bevilacqua et al., 2012). Pesquisas indicam que a decomposição da β -diversidade em seus componentes de substituição de espécies entre locais (renovação) e de perda ou ganho de espécies (aninhamento) contribui para revelar padrões ecológicos espaço-temporais, sendo indispensável para o entendimento de aspectos biogeográficos, ecológicos e de conservação (Baselga, 2010; Legendre, 2014; Cavalcanti-Lima et al., 2023).

Nas últimas décadas, os estuários da região Amazônica vêm sofrendo intensa pressão antrópica e, conseqüentemente, alterações em suas condições ambientais, sobretudo relacionadas aos contaminantes oriundos de atividades portuárias (González-Gorbeña et al., 2015; Oliveira et al., 2019; Cutrim et al., 2025), e as elevadas cargas de nutrientes provenientes do lançamento de esgotos domésticos e agrícolas (Monteiro et al., 2016; Furtado et al., 2024), além das mudanças climáticas (Sá et al., 2025b). Esses fatores têm contribuído para a degradação ambiental e a perda da qualidade da água nesses ecossistemas (Mourão et al., 2020; Cavalcanti et al., 2022; Pereira et al., 2023; Furtado et al., 2025). Estudos que investigam como as alterações ambientais influenciam os organismos têm sido conduzidos para diferentes grupos

biológicos, incluindo o fitoplâncton (Cavalcanti et al., 2018; Cavalcanti et al., 2022; Furtado et al., 2025; Sá et al., 2025a), a macrofauna bentônica (Sousa et al., 2023) e os peixes (Pinheiro Souza et al., 2021; Noletto et al., 2022; Torres et al., 2023). Contudo, ainda existe uma lacuna de conhecimento sobre como diferentes grupos interagem ecologicamente diante de múltiplos estressores em escalas sazonais e temporais. O objetivo deste estudo é investigar como a heterogeneidade ambiental, resultante das variações sazonais e temporais, influencia os padrões de distribuição da biodiversidade e as interações ecológicas entre múltiplos táxons no Complexo Estuarino de São Marcos.

2. Material e métodos

2.1 Área de estudo e amostragem

O Complexo Estuarino de São Marcos (CESM), está situado no estado do Maranhão, que abriga o segundo maior litoral do Brasil, com aproximadamente 640 km de extensão. Apresenta uma macromaré semidiurna, cuja amplitude pode ultrapassar 8 metros em certas áreas durante as marés equinociais de sizígia, além de correntes de maré com velocidades superiores a 1,1 m/s, atingindo um máximo de 2,42 m/s (González-Gorbeña et al., 2015) (Figura 1). O estado do Maranhão possui cerca de 4.350 km² de manguezais, com cerca de 46% da cobertura nacional (Diniz et al., 2019).

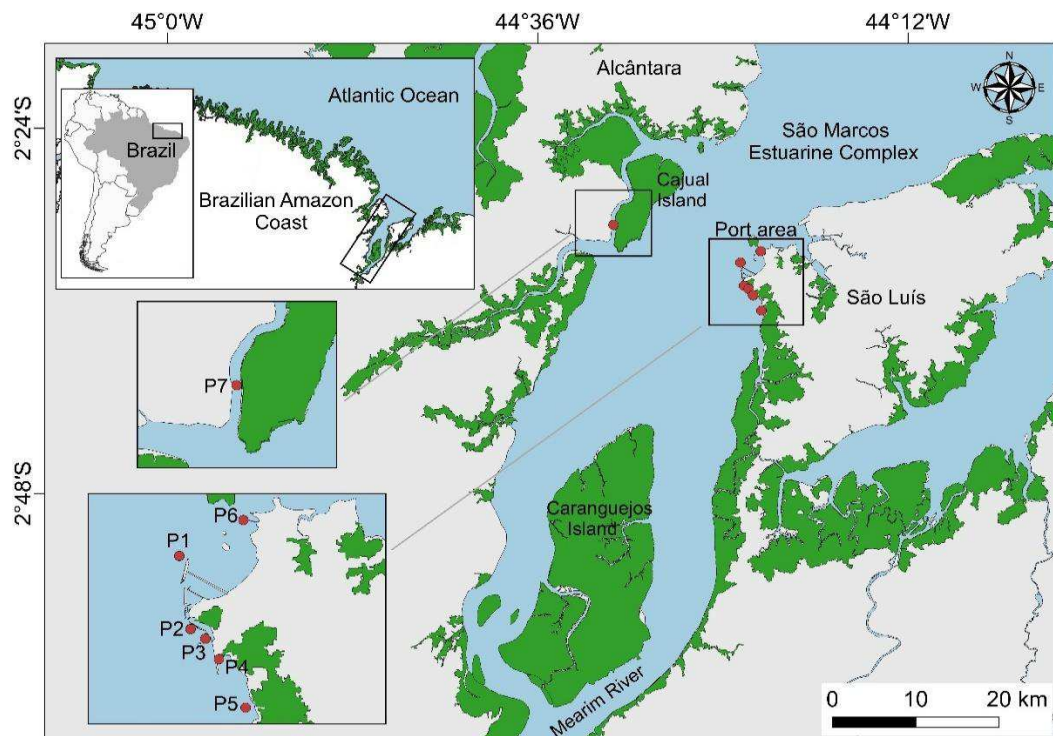


Figura 1 - Localização da área de estudo no Complexo Estuarino de São Marcos (Costa Amazônica, Brasil).

Os fluxos fluviais no CESM são abastecidos predominantemente pela bacia do Mearim, que engloba os rios Pindaré, Grajaú e Mearim. No entanto, o complexo estuarino também recebe influxos de cinco bacias hidrográficas menores, localizadas nas margens leste (rios Cachorros, Bacanga e Anil) e oeste (rios Aurá e Salgado). O volume médio anual de descarga de água doce na baía é de 413 m³/s, com a vazão máxima registrada em abril e a mínima em outubro (ANA,2019; Lima et al., 2021).

O clima da região é tropical, com dois períodos sazonais bem definidos: o período chuvoso (janeiro a junho) e o período seco (agosto a dezembro), controlado pela Zona de Convergência Intertropical, que é o principal sistema responsável pela precipitação na região. regiões Norte e Nordeste do Brasil (Samaritano et al., 2013; Albuquerque et al., 2023).

A precipitação total anual foi de 2.753,00 mm em 2019, 2.725,40 mm em 2020, 2.525,50 mm em 2021, 2.433,90 mm em 2022, 2.330,80 mm em 2018 e 2.243,10 mm em 2023. Os meses de abril e março foram os mais chuvosos, registrando valores superiores ao esperado (> 462 mm e > 321 mm, respectivamente), considerando os dados climáticos históricos dos últimos 30 anos (Figura 2a). A velocidade máxima do vento foi observada nos meses de setembro e outubro, com valores superiores a 2,60 m.s⁻¹ m/s em ambos os períodos (Figura 2b). Os menores valores foram registrados entre os meses de janeiro a junho, sendo este padrão característico da estação chuvosa, enquanto as maiores velocidades de vento ocorreram na estação seca.

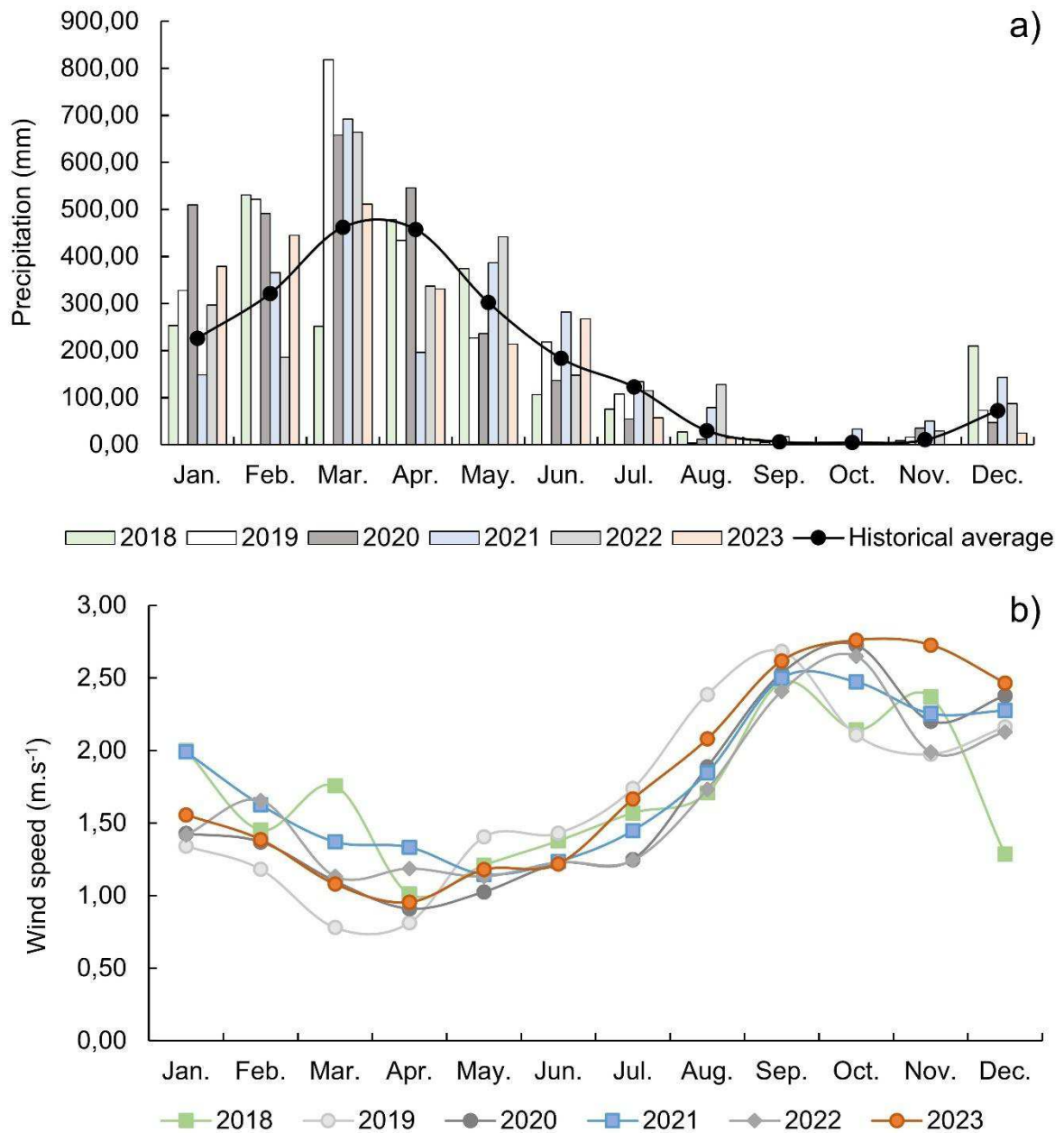


Figura 2 - Média histórica mensal de chuvas (baseado nos últimos 30 anos), precipitação pluviométrica mensal e velocidade dos ventos obtida entre os anos de 2018 e 2023 (www.portal.inmet.gov.br).

As amostras foram coletadas em campanhas trimestrais entre 2018 e 2023 durante o período chuvoso e de estiagem. As condições físico-químicas (temperatura da água, salinidade, pH, oxigênio dissolvido e turbidez) foram mensuradas *in situ*, com auxílio de uma sonda multiparâmetros (Horiba U-52). A transparência da água foi medida com o uso do disco de Secchi. Os dados de precipitação pluviométrica e velocidade dos ventos foram adquiridos através do INMET (Instituto Nacional de Meteorologia, <http://www.inmet.gov.br>).

2.2 *Análise de nutrientes*

Para a obtenção e análise de nutrientes, as amostras de água foram coletadas com auxílio de uma garrafa de Van Dorn (5 L) e acondicionados em gelo para análise em laboratório. As concentrações de nutrientes inorgânicos foram determinadas seguindo as metodologias descritas em Strickland e Parsons (1972) para nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-) e íon amônio (NH_4^+) e pelo método proposto por Grasshoff et al. (1983) para fosfato (PO_4^{3-}).

2.3 *Análise da comunidade aquática*

Para a análise do plâncton, amostras foram coletadas utilizando uma rede cônico-cilíndrica com malha de 45 μm para fitoplâncton e 120 μm para zooplâncton. Cada arrasto foi realizado na sub-superfície da água por um período de 5 minutos. As amostras foram armazenadas em frascos de polietileno de 300 mL devidamente etiquetados e fixadas em formalina a 4%. A identificação de ambos os grupos foi feita até o menor nível taxonômico possível, por meio de microscópio óptico e estereoscópio, além de chaves de identificação. Para o fitoplâncton as espécies foram classificadas com base na plataforma internacional AlgaeBase (Guiry e Guiry, 2023) e para o zooplâncton bibliografia especializada (por exemplo, Boltovskoy 1981, 1999; Dias e Araujo, 2006).

Os organismos incrustantes foram coletados por meio de raspagem da superfície das estruturas fixas na área de estudo (colunas de concreto, raízes de mangue, boias, correntes de âncoras e cascos de navio). Todo o material coletado foi acondicionado em sacos plásticos, fixados com formol a 4% e mantidos em baixa temperatura dentro de caixas isolantes, para conservação. Para obtenção das amostras bentônicas, foram realizados lançamentos com a draga do tipo busca fundo e após coletadas as amostras foram acondicionadas em recipientes plásticos devidamente identificados e fixadas em formaldeído a 4%. Posteriormente o material foi levado para laboratório para realização da triagem com peneira de 0,5 mm e preservadas em álcool etílico a 70%, os espécimes foram identificados com o auxílio de um estereomicroscópio e um microscópio óptico e a atualização dos táxons, foi feito com base no Registro Mundial de Espécies Marinhas - Worms (www.marinespecies.org). As amostras foram lavadas em peneiras com diâmetro de 0,5 mm. Em seguida, o material foi triado, e a identificação foi realizada até o menor nível taxonômico possível.

Para a obtenção da composição ictiofaunística, foi empregado o uso das redes de espera (4, 7 e 14 cm) e espinhel, visando uma maior variação de espécies na amostragem. As redes passaram por revisão a cada uma hora por ciclos completos da maré vazante, para checagem de possíveis exemplares presos nas mesmas. Após a coleta os espécimes foram armazenados em

caixas térmicas contendo gelo e transportados para a triagem no Laboratório de Biodiversidade Molecular (LABimol) da Universidade Estadual do Maranhão.

Para cada espécime coletado foram determinados o comprimento total e o peso, sempre que possível os peixes foram identificados a nível de espécie, com base na literatura especializada e padronizados segundo informações do Fishbase (Froese e Pauly, 2010). A licença ambiental (ANEXO 3) foi obtida junto a Secretaria Estadual de Meio Ambiente e Recursos Naturais – Sema (AAF-018/2021).

2.4 Análise estatística

Inicialmente, uma análise de variância multivariada permutacional (Permanova; Anderson, 2001) foi aplicada para avaliar a variação dos parâmetros ambientais usando dois fatores: i) estações (chuvosa e seca) e ii) anos (2018, 2019, 2020, 2021, 2022 e 2023). Em seguida, foi realizada a normalidade (teste de Kolmogorov-Sminorv) e a homogeneidade (teste de Levene) dos dados. A análise de variância foi utilizada para cada dado abiótico afim de identificar diferenças significativas. Foram utilizados testes One-Way ANOVA (paramétrico) ou Kruskal-Wallis (não paramétrico) para verificar possíveis diferenças, considerando valores significativos $p \leq 0,05$.

Para determinar se a área analisada apresenta alta heterogeneidade ambiental (medida por meio de variáveis hidrológicas e nutrientes), foi realizada uma análise permutacional de dispersão multivariada (PERMDISP; Anderson et al., 2006). Esta análise foi usada para testar a homogeneidade de dispersão desses fatores usando a distância entre centróides e o teste HSD de Tukey em pares ($p < 0,05$). Dessa forma, quanto maior a distância entre as amostras e seus centróides, maior é a heterogeneidade ambiental. Para os testes PERMANOVA e PERMDISP, foram utilizados um total de 999 permutações irrestritas de dados transformados para escala logarítmica ($x + 1$), aplicando a função “betadisper” no pacote ‘Vegan’ R (Oksanen et al., 2020).

Para avaliar o estado atual do conhecimento sobre a biodiversidade em cada um dos anos estudados, geramos curvas de acumulação de espécies a partir de dados de ocorrência para os cinco filos mais ricos em espécies e o restante foi agrupado usando a iNEXT do pacote iNEXT em R (Hsieh et al., 2014).

As semelhanças entre os meses de coleta com base na distribuição de espécies em todos os grupos taxonômicos e em cada grupo separadamente, foi avaliada através das análises de cluster bootstrap com 999 replicatas. Utilizamos o coeficiente de similaridade de Sørensen como medida de dissimilaridade e novamente aplicamos o método UPGMA. Para verificar as mudanças na composição da comunidade entre os grupos formados nas análises de agrupamento, utilizamos a partição da β -diversidade proposta por Baselga (2010). Essa

abordagem permite avaliar a variação total da comunidade no espaço e no tempo (β Sor) e identificar a contribuição de cada componente, correspondendo à substituição de espécies (β Sim) e ao aninhamento (β Nes).

3. Resultados

3.1 Heterogeneidade sazonal-temporal das condições ambientais

A partir da análise PERMANOVA foi observado que as condições ambientais do CESM apresentaram variações altamente significativas entre os períodos sazonais e temporais ($p < 0,5$; Tabela 1). Temporalmente, é possível notar que as flutuações anuais foram ainda mais significativas ($p < 0,001$). No entanto, a interação entre esses dois fatores não revelou significância ($p > 0,5$).

Tabela 1 - Resumo dos resultados da análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA) que avalia a variabilidade das condições ambientais ao longo das estações e anos no Complexo Estuarino São Marcos.

Source	df	SS	MS	F.Model	R ²	p
Estações	1	0,025	0,025	6,378	0,020	0,002***
Anos	5	0,590	0,590	148,618	0,472	0,001**
Estações x Anos	1	0,010	0,010	2,620	0,008	0,057
Residuals	157	0,623	0,003		0,499	
Total	160	124,977			100,000	

Os valores estatisticamente significativos são indicados com asteriscos: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,002$

A heterogeneidade ambiental testada pelo PERMDISP indicou os efeitos da dispersão em escala sazonal ($p < 0,001$) e temporal ($p = 0,019$). Em relação a variação sazonal ($F_{1,159} = 24,55$) foi observado maior heterogeneidade durante o período seco (distância média do centroide = 2,26) quando comparado ao período chuvoso (distância média do centroide = 1,79) (Figura 3a e b).

Temporalmente, as condições ambientais variaram significativamente indicando alta heterogeneidade ($F_{5,155} = 27,75$), a qual foi maior no ano de 2023 (distância média do centróide = 2,37), seguido por 2020 (distância média do centróide = 2,05), 2022 (distância média do centróide = 2,02), 2019 (distância média do centróide = 1,97), 2021 (distância média do centróide = 1,76) e 2018 (distância média do centróide = 1,42) (Figura 3c e d).

A distribuição sazonal e temporal das variáveis ambientais estão descritas na Tabela 2. A temperatura da água apresentou pequena variação, sendo maior durante o período chuvoso ($29,23 \pm 0,46$ °C). A salinidade revelou variações significativas bem marcantes, variando não só sazonalmente, mas temporalmente. Maiores valores foram registrados na estação seca,

principalmente no ano de 2018 ($30,81 \pm 5,22$). O pH foi tipicamente alcalino, e durante o período chuvoso foi observado um ligeiro aumento. Temporalmente os valores variaram entre $7,90 \pm 0,21$ (2019) e $8,58 \pm 0,17$ (2023).

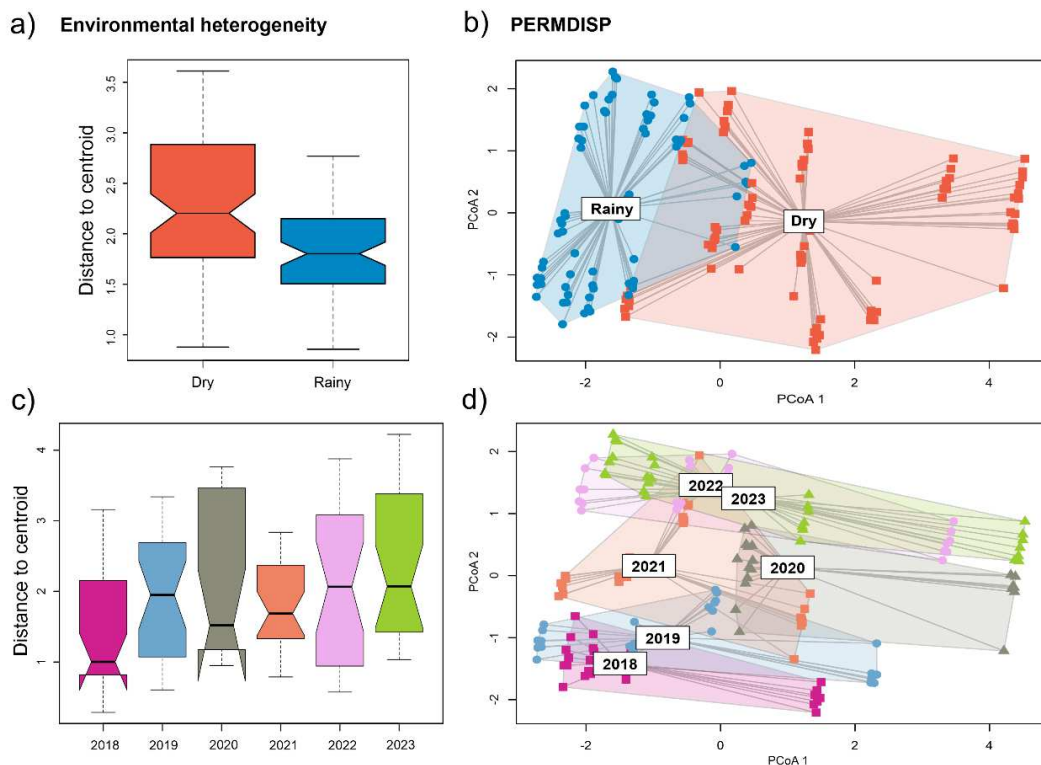


Figura 3 - Dispersão de variáveis ambientais por meio de análise de coordenadas principais (PCoA) e boxplot com base na distância ao centroide (heterogeneidade ambiental) considerando a escala temporal Complexo Estuarino São Marcos.

A distribuição sazonal e temporal das variáveis ambientais estão descritas na Tabela 2. A temperatura da água apresentou pequena variação, sendo maior durante o período chuvoso ($29,23 \pm 0,46$ °C). A salinidade revelou variações significativas bem marcantes, variando não só sazonalmente, mas temporalmente. Maiores valores foram registrados na estação seca, principalmente no ano de 2018 ($30,81 \pm 5,22$). O pH foi tipicamente alcalino, e durante o período chuvoso foi observado um ligeiro aumento. Temporalmente os valores variaram entre $7,90 \pm 0,21$ (2019) e $8,58 \pm 0,17$ (2023).

A turbidez e OD obtiveram diferenças significativas apenas temporalmente. Os valores de turbidez foram maiores no período seco, sobretudo em 2023 ($296,43 \pm 173,18$ NTU). Enquanto os teores de oxigênio dissolvido foram ligeiramente maiores na chuva, variado entre $4,77 \pm 0,34$ mg. L⁻¹ (2023) e $7,32 \pm 0,56$ mg. L⁻¹ (2018), sendo observado uma depleção nos teores ao longo dos anos. A transparência da água foi relativamente baixa ao longo de todo o período, não apresentando variações significativas em nenhum dos cenários avaliados.

Os nutrientes inorgânicos fosfato, nitrato e íon amônio revelaram variações significativas apenas temporalmente (Tabela 2), enquanto o nitrito foi apenas sazonalmente, com valores maiores durante a estação chuvosa ($0,31 \pm 0,27 \text{ mg. L}^{-1}$) principalmente em 2021. Os valores máximos de fosfato ($20,23 \pm 2,87 \text{ mg. L}^{-1}$) ocorreram em 2018 durante a estação chuvosa, enquanto os de nitrato ($3,66 \pm 1,03 \text{ mg. L}^{-1}$) em 2019 e o teores de íon amônio ($1,77 \pm 0,65 \text{ mg. L}^{-1}$) em 2023, ambos durante o período de menor precipitação pluviométrica.

Tabela 2 - Resumo descritivo (média e desvio padrão) das variáveis ambientais no Complexo Estuarino São Marcos. Nota: Temporal (Tp.) inclui os anos de coleta; Sazonal (Sz.) os períodos sazonais (chuvoso e seco).

	2018	2019	2020	2021	2022	2023	Estação		Sz	p	Tp
							Chuvoso	Seca			
Temp (°C)	28,78±0,50	28,89±0,61	29,06±0,47	28,82±0,99	28,96±0,24	29,15±0,41	29,23±0,46	28,67±0,58	p <0,001*	-	
Sal	30,81±5,22	30,24±1,28	28,83±4,24	29,08±3,87	29,35±4,49	30,27±5,04	26,84±4,33	32,01±2,48	p <0,001*	p <0,001*	
Turb (NTU)	101,56±42,11	174,14±79,59	148,97±58,55	116,11±65,40	199,11±131,71	296,43±173,18	166,57±138,49	180,33±104,54	-	p <0,001*	
OD (mg. L⁻¹)	7,32±0,56	6,85±0,37	6,63±0,41	6,25±0,46	5,25±0,79	4,77±0,34	6,17±1,16	6,15±0,94	-	p <0,001*	
pH	8,11±0,38	7,90±0,21	8,13±0,23	8,15±0,19	8,28±0,34	8,58±0,17	8,22±0,28	8,16±0,38	p <0,001*	p <0,004*	
Secchi (cm)	0,28±0,12	0,27±0,09	0,29±0,12	0,20±0,07	0,25±0,07	0,24±0,12	0,26±0,12	0,24±0,08	-	-	
PO₄³⁻ (mg. L⁻¹)	20,23±2,87	17,20±3,38	3,17±1,45	11,16±6,39	1,72±0,53	1,74±0,61	10,14±8,16	8,84±8,32	-	p <0,001*	
NO₂⁻ (mg. L⁻¹)	0,22±0,05	0,24±0,08	0,38±0,34	0,45±0,33	0,20±0,17	0,24±0,16	0,31±0,27	0,27±0,18	p <0,014*	-	
NO₃⁻ (mg. L⁻¹)	3,36±0,97	3,66±1,03	1,22±1,14	0,78±0,55	0,42±0,47	0,62±0,42	1,69±1,66	1,70±1,47	-	p <0,001*	
NH₄⁺ (mg. L⁻¹)	0,80±0,22	0,87±0,20	0,76±0,38	1,22±0,82	1,33±0,56	1,77±0,65	1,05±0,52	1,23±0,71	-	p <0,002*	

Valores estatisticamente significativos são indicados com asteriscos (*); valores não significativos representados por hífen (-)

3.2 Dinâmica dos múltiplos táxons modulada pelas condições ambientais

Um total de 2310 ocorrências de 289 táxons distribuídas entre os reinos Eubacteria, Chromista, Plantae e Animalia foram registradas no CESM. O filo mais representativo foi Heterokontophyta (98 espécies; 51,39%), seguido por Chordata (49 espécies; 13,90%), Mollusca (34 espécies; 7,66%) e Arthropoda (33 espécies; 10,82%). Dinoflagellata (9 espécies; 3,16%), Chlorophyta (2,29%), Cyanobacteria (2,21%), Rhodophyta (1,82%) e Annelida (1,69%), também foram representativos contribuindo com 5 espécies cada, enquanto os demais filós contribuíram com 3 ou menos espécies (Tabela 3). Em relação a dinâmica de espécies temporal, a maior riqueza foi observada em 2022 e 2023 (164 e 166 espécies, respectivamente). A menor riqueza observada em 2018 (127 espécies) e 2019 (128 espécies).

Tabela 3 - Número de ocorrências em cada filo registradas no Complexo Estuarino São Marcos entre 2018 e 2023.

Filo	2018	2019	2020	2021	2022	2023	Total
Heterokontophyta	164	203	141	189	240	250	1187
Chlorophyta	10	10	5	9	10	9	53
Cyanobacteria	8	8	6	8	10	11	51
Dinoflagellata	8	13	8	9	17	18	73
Euglenophyta	2	2	2	0	2	2	10
Ochrophyta	1	0	1	1	1	2	6
Rhodophyta	3	8	5	9	9	8	42
Mollusca	22	27	24	42	30	32	177
Annelida	6	6	4	7	9	7	39
Foraminifera	4	4	3	3	4	4	22
Arthropoda	45	31	42	50	40	42	250
Chaetognatha	3	4	3	3	1	3	17
Nematoda	2	3	3	0	1	0	9
Rotífera	1	1	3	3	4	2	14
Echinodermata	0	0	1	1	0	0	2
Ciliophora	3	0	0	2	2	4	11
Cnidaria	5	4	3	2	0	0	14
Bryozoa	0	0	1	3	4	4	12
Chordata	53	50	52	56	62	48	321
Total	340	374	307	397	446	446	2310

As curvas de acumulação de espécies evidenciaram padrões distintos entre os cinco filós analisados, com variações claras ao longo dos anos de amostragem (Figura 4). Em Heterokontophyta, foi observado o aumento da riqueza estimada, especialmente a partir de 2021, quando as curvas passaram a se aproximar da assíntota, embora ainda apresentem leve tendência ascendente. Para Chordata, todas as curvas mantiveram crescimento suave e contínuo, sem indicação de estabilização, mesmo nos anos mais recentes. Em Mollusca, houve

diferenças marcantes entre os anos analisados, enquanto 2020 e 2021 registraram as maiores riquezas acumuladas, nenhum dos anos apresentou clara aproximação da assíntota, indicando que o esforço amostral ainda não foi suficiente para saturar a diversidade do grupo. Padrão semelhante foi observado em Arthropoda, cujas curvas, embora apresentem declínio na inclinação com o aumento do esforço, não estabilizam completamente.

Para o filo Dinoflagellata, os anos mais recentes (2022-2023) exibiram maior diversidade registrada, mas todas as curvas permaneceram ascendentes. O grupo classificado como “Outros”, inclui o restante dos 14 filios identificados e mostra incremento expressivo a partir de 2020, com os anos 2022 e 2023 exibindo as maiores diversidades. As curvas demonstram aproximação da assíntota, mas nenhuma estabiliza completamente, sugerindo potencial para que mais espécies possam ser adicionadas. De modo geral, apesar do incremento de riqueza ao longo do período avaliado, nenhum dos filios atingiu a assíntota, reforçando que novas espécies podem ser adicionadas com maior esforço amostral.

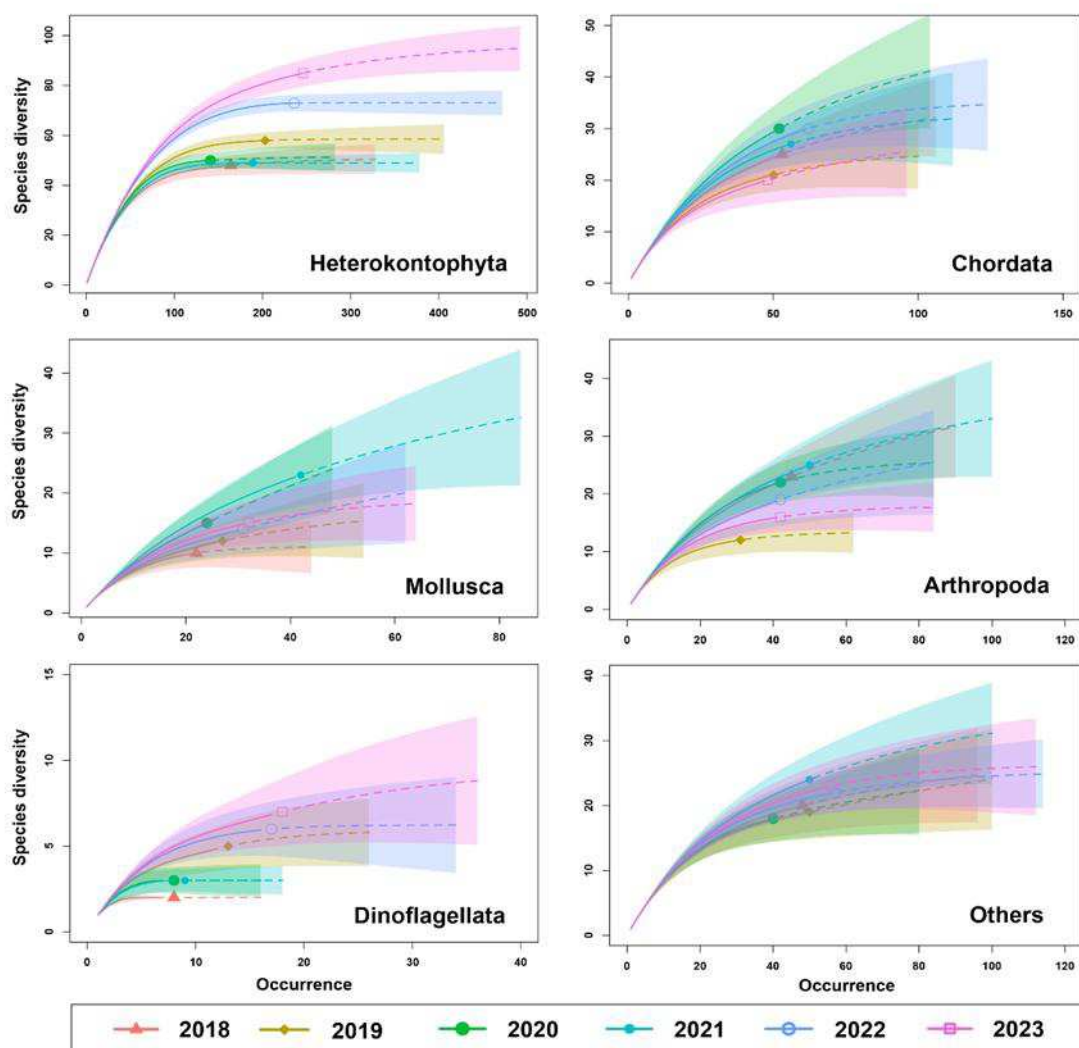


Figura 4 - Gráficos de acumulação de espécies (linhas contínuas), extrapolação (linhas tracejadas) e intervalos de confiança de 95% (áreas sombreadas) para os cinco filios mais ricos e os restantes (14 filios) nos seis anos de estudo do Complexo Estuarino São Marcos.

Sazonalmente, a estação chuvosa apresentou a maior riqueza de espécies nos meses de junho/2023 (127 espécies) e março/2023 (123 espécies) e a menor em fevereiro/2018 (83 espécies) e maio/2018 (85 espécies). Por outro lado, os meses de dezembro/2022 (130 espécies) e setembro/2022 (125 espécies) característicos da estação seca obtiveram maior riqueza de espécies, enquanto setembro/2018 (78 espécies) registrou o menor valor.

Um padrão de distribuição temporal e anual foi identificado a partir da análise de Cluster (Figura 5). Esta análise revelou a formação de 4 grupos principais (A, B, C e D) da metacomunidade com nível de similaridade de 69,23% ($P_i = 12,85$; $P = 0,1$).

O Cluster A incluiu amostras que estiveram sob menor influência da precipitação pluviométrica (julho a dezembro), com similaridade de 81,48%. Neste período as amostras registraram maior salinidade (> 30), águas mais oxigenadas ($> 6 \text{ mg. L}^{-1}$) e altas concentrações de nutrientes, em especial de fosfato em dezembro de 2018 ($20,46 \pm 2,28 \text{ mg. L}^{-1}$) e 2019 ($18,11 \pm 3,57 \text{ mg. L}^{-1}$). O filo Chaetognatha, Foraminifera e Cnidaria apresentaram ampla ocorrência neste período e estiveram presentes em todas as amostras.

Algumas espécies ocorreram somente no período de menor precipitação pluviométrica, dentre elas a macroalga *Bryopsis plumosa* pertencentes ao filo Chlorophyta, o artrópode *Penaeus schmitti*, *Apocyclops panamensis*, os moluscos *Protothaca pectorina*, *Exolaternula spengleri*, *Sheldonella bisulcata*, *Fissurella clenchi*, *Echinolittorina ziczac*, *Littoraria angulifera*, os peixes *Anableps anableps* (Ordem Cyprinodontiformes), *Polydactylus virginicus* (Carangaria/misc), *Nebris micros* (Ordem Eupercaria/misc) e as espécies de tubarão *Carcharhinus sp.*, *Sphyrna tudes* (ordem Carcharhiniformes).

Já o Cluster B agrupou os meses como maior índice pluviométrico (fevereiro a maio), e obteve similaridade de 85,71%. As amostras deste grupo apresentaram salinidade mais baixa (< 30), altas concentrações de nitrato e volume pluviométrico superior ao esperado nos meses de fevereiro e maio de 2018, março de 2019 e março de 2021. O filo Cyanobacteria e Chlorophyta apresentaram número similar de espécies durante este período, além disso, os dinoflagelados apresentaram um ligeiro decréscimo no número de espécies quando comparado aos demais grupos. Neste período algumas espécies ocorreram com exclusividade, dentre elas os artrópodes *Ryloviella sp.*, e *Oithona nana*, os moluscos *Tagelus plebeius*, *Vitta zebra*, *Graptacme perlonga*, *Tectonatica sp.*, e *Cyphoma sp.*, os peixes *Echeneis naucrates* (Ordem Carangiformes), *Anchoviella lepidentostole* (Clupeiformes), *Cetengraulis edentulus lepidentostole* (Clupeiformes), *Elops saurus* (Elopiformes), *Pseudauchenipterus nodosus* (Siluriformes) e *Aetobatus narinari* (Myliobatiformes) e as espécies de fitoplâncton

Coscinodiscus concinnus, *Neobrightwellia alternans*, *Campylosira cymbelliformis* e *Hemiaulus chinensis* e *Euglena viridis*.

O mês de setembro do ano de 2018 formou um único Cluster (C), e registrou menor riqueza de espécies quando comparado aos demais grupos. Enquanto o Cluster D agrupou principalmente os meses de 2021 a 2023 (março, junho, setembro e dezembro), com similaridade de 82,76%. Este grupo compreendeu um total de 77 amostras, que apresentaram valores máximo de turbidez (> 400 NTU), menores valores na transparência da água e concentrações de nitrato relativamente mais baixos ($< 0,60$ mg. L⁻¹). Neste período a riqueza de artrópodes e moluscos foi bem similar, além da baixa ocorrência dos filos Echinodermata, Chaetognatha, Nematoda e Cnidaria.

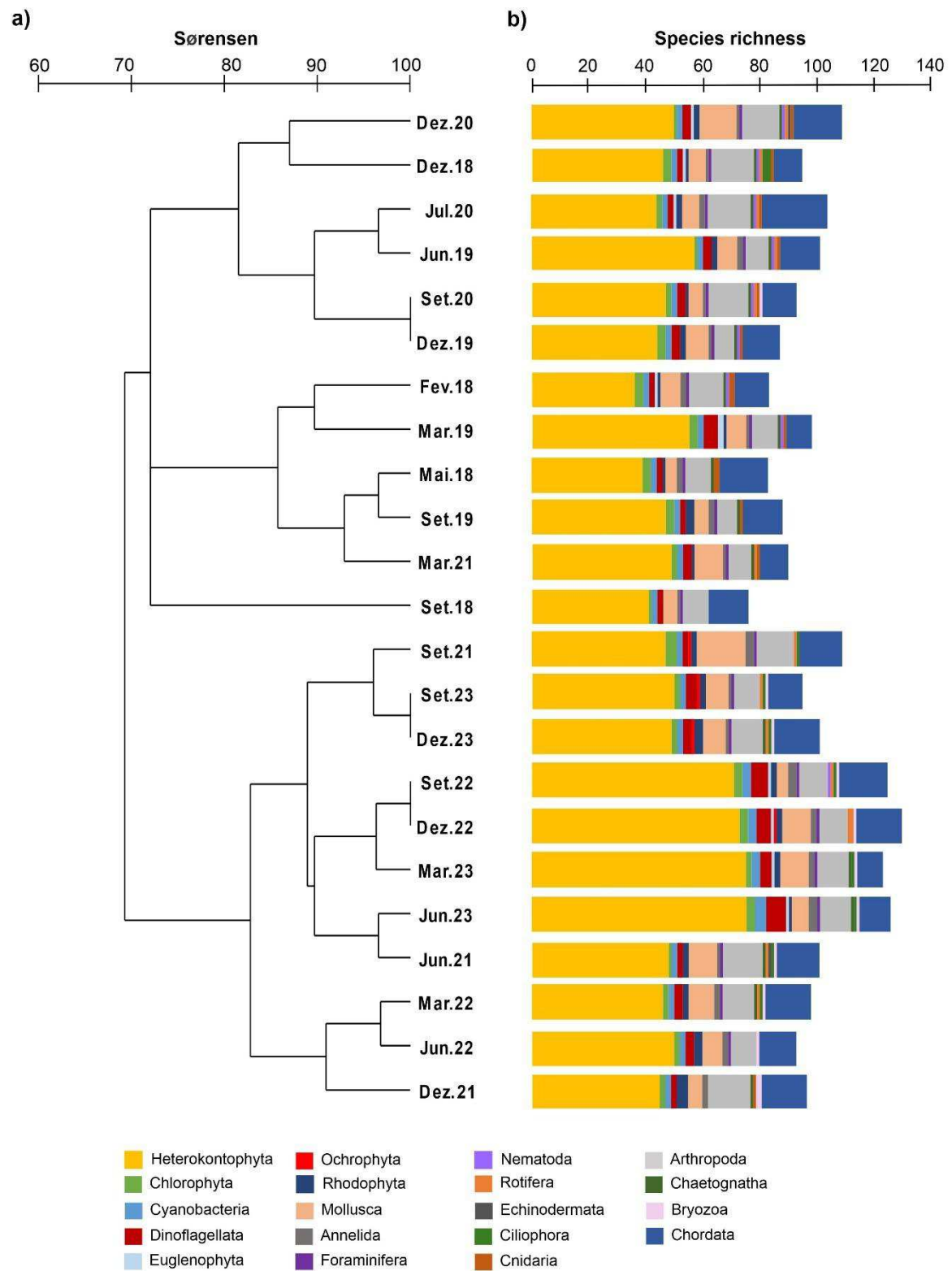


Figura 5 - Análises de cluster usando similaridade de Sørensen e UPGMA, mostrando a riqueza de espécies ao longo dos meses estudados.

3.3 β -diversidade em escala temporal

Calculamos a β -diversidade média entre pares para cada ano representado pela análise de agrupamento (escalas temporal). A variação temporal na β -diversidade (β Sor) entre os anos do CESM são comparadas na Figura 6a. Observamos uma tendência temporal crescente ao longo dos anos, com altos níveis de β -diversidade total ($> 0,55$) entre os anos de 2018 e 2023 (0,46), 2018 e 2022 (0,43) e 2020 e 2023 (0,42) (Figura 6b).

A rotatividade de espécies (β Sim) foi o principal fator responsável pelas variações na composição da comunidade. A substituição de espécies correspondeu a aproximadamente 90% da β -diversidade total, enquanto o aninhamento (β Nes) representou apenas 10%. Esses resultados indicam que as diferenças observadas entre os períodos se devem mais à substituição de espécies do que à sua perda. Os resultados mostram um gradiente temporal, onde os anos de 2018, 2022 e 2023 possuem os maiores valores de β -diversidade.

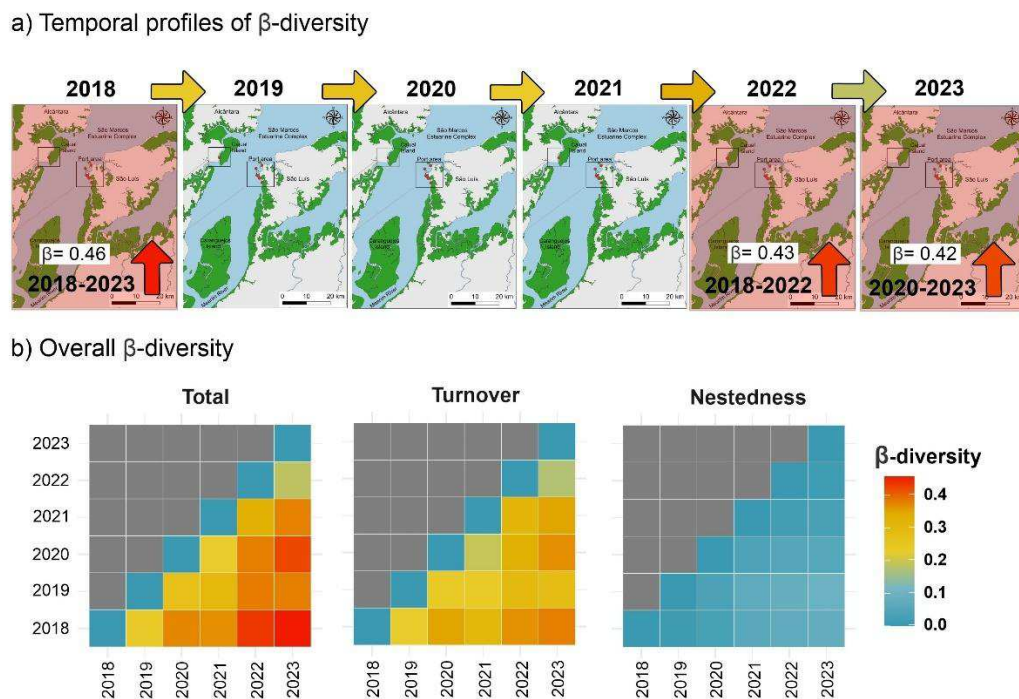


Figura 6 - Diversidade β taxonômica (β Sor) particionada em componentes de substituição (β Sim) e aninhamento (β Nes), considerando a escala temporal do Complexo Estuarino de São Marcos (a) e a biodiversidade geral (b). Mapa de calor da diversidade β comparando os grupos representados na análise de agrupamento. As setas representam a substituição ao longo do gradiente temporal.

Considerando os períodos sazonais, o percentual de táxons compartilhados foi de 71,68%. O maior número de táxons exclusivos (14,69%) foi encontrado durante o período chuvoso. O filo com maior percentual de exclusividade foi Heterokontophyta (5,24%), seguido por Arthropoda e Chordata, ambos com 2,80% cada.

Temporalmente, o maior número de espécies exclusivas foi encontrado no ano de 2023 (23,46%), enquanto o menor em 2019 (6,17%). Entre as espécies compartilhadas entre os anos, 2022 e 2023 (64,88%) apresentaram 133 espécies em comum, obtendo maior percentual em comparação com os anos de 2018 e 2023 (39,02%), que registraram 80 espécies semelhantes. O filos mais ricos entre espécies compartilhadas foram Heterokontophyta (47,33%), Chordata (18,13%), Arthropoda (10,02%) e Mollusca (8,97%). Enquanto isso, os filos Echinodermata (0,07%), Ciliophora (0,26%) e Bryozoa (0,26%) registraram a menor taxa de compartilhamento entre os filos identificados.

4. Discussão

4.1 Heterogeneidade ambiental sazonal e temporal

O Complexo Estuarino de São Marcos (CESM) apresentou um padrão ambiental dinâmico e heterogêneo, influenciado principalmente pelas variações sazonais de precipitação e salinidade. A análise PERMANOVA indicou diferenças significativas entre os períodos sazonais e temporais, enquanto a análise de dispersão (PERMDISP) confirmou alta heterogeneidade, especialmente durante a estação seca. Durante o período de estudo (2018-2023), o regime climático foi considerado atípico. Nos anos de 2019 e 2020, a precipitação superou 2.700 mm, o que pode ser explicado pela ocorrência acentuada do fenômeno La Niña. Por sua vez, no ano de 2023, volumes inferiores foram registrados (cerca de 2.300 mm), evidenciando a influência de eventos extremos de El Niño, especificamente nos meses de setembro e dezembro. Esse aumento no volume de chuvas foi relatado anteriormente em estudos de Sá et al. (2022a) e Cavalcanti et al. (2023).

Nos últimos anos, a intensificação da variabilidade climática, evidenciada por chuvas irregulares e períodos prolongados de estiagem, tem acentuado as oscilações ambientais na região. Fenômenos associados às mudanças climáticas globais, como o aquecimento das águas superficiais, alterações nos regimes de vento e variações na descarga dos rios, contribuem diretamente sobre o balanço hídrico e o gradiente salino dos estuários (Duvall et al., 2022; Leal Filho et al., 2022; Lee et al., 2025). No CESM, observa-se uma redução gradual da precipitação média anual entre 2018 e 2023, que se alinha às tendências de já descritas para a costa amazônica (Pereira et al., 2013; Sá et al., 2025).

Os valores mais elevados de salinidade foram obtidos durante o regime de menor precipitação pluviométrica, refletindo um padrão típico da zona costeira equatorial, que é influenciada pelo balanço hídrico local com contribuições fluviais relevantes na estação chuvosa e intrusão da massa d'água costeira na estação seca (Santos et al., 2020; Cavalcanti et

al., 2022). A região registrou temperaturas elevadas, porém com intervalo esperado para ambientes tropicais. A combinação entre a elevada turbidez, baixos teores de oxigênio dissolvido e variações na salinidade e no pH indicam um sistema aquático sujeito a múltiplos estressores.

A dinâmica observada nesses sistemas apresenta características típicas de ambientes tropicais, nos quais o regime pluviométrico desempenha um papel fundamental na definição das condições ambientais e na estruturação das comunidades biológicas, como relatado em estudos voltados para espécies de fitoplâncton (Conceição et al., 2021; Bharathi et al., 2022; Sá et al., 2023), zooplâncton (Magalhães et al., 2015; Sanvicente-Añorve et al., 2022), macrofauna bentônica (Mariano e Barros, 2014; Gomes e Bernadino, 2020) e peixes (Barletta et al., 2003; Molina et al., 2020).

As concentrações de nutrientes inorgânicos apresentaram variações marcantes, principalmente o fosfato, nitrato e íon amônio, que refletem tanto os processos naturais de aporte de nutrientes quanto a influência antrópica decorrente do lançamento de efluentes domésticos, agrícolas e industriais. Esse padrão corrobora com estudos anteriores realizadas na mesma região, que indicam uma forte associação entre a carga de nutrientes, o aporte continental e a influência das atividades antropogênicas nas margens do estuário (Oliveira et al., 2019; Furtado et al., 2025; Cutrim et al., 2025).

4.2 Padrões de riqueza e composição das comunidades

Os resultados revelaram uma comunidade composta por 289 táxons distribuídas em 19 filos. A maior riqueza de espécies foi observada entre 2022 e 2023, período marcado por maior heterogeneidade ambiental, com destaque durante a estação seca. Essa heterogeneidade parece favorecer a coexistência de espécies com diferentes estratégias ecológicas, resultando em um maior número de táxons observados. Em contrapartida, os anos de 2018 e 2019 foram marcados por elevado volume de chuvas, maiores variações de salinidade e nas concentrações de fosfato, além da menor riqueza de espécies, sugerindo que os extremos climáticos e as oscilações bruscas do regime hídrico reduzem a resiliência das comunidades.

A combinação de fatores estressantes como estiagens prolongadas, ondas intensas de calor e depleção de oxigênio dissolvido, previstas em cenários de mudança climática, tendem a exercer forte pressão sobre a fisiologia e distribuição dos organismos aquáticos, resultando em efeitos adversos (Todgham e Stillman, 2013; Tripathy et al., 2023; Röthig et al., 2023; Shunk et al., 2024). No CESM, esses fatores não parecem ter influenciado de forma significativa a presença e a ausência de espécies. Contudo, não se pode descartar que o maior número de táxons registrados esteja associado à curva de acumulação de espécies, a qual tende a aumentar

gradualmente à medida que novas amostragens são realizadas, refletindo o acréscimo natural de registros decorrente do esforço amostral (Magurran, 2021).

No CESM as diatomáceas (Filo Heterokontophyta) foram as principais contribuintes da comunidade fitoplanctônica, algo comum em outros ecossistemas estuarinos tropicais (Saifullah et al., 2016; Cavalcanti et al., 2020; Oliveira et al., 2022). Essa predominância está relacionada não apenas à diversidade do grupo, mas também à sua alta taxa de reprodução e à ampla tolerância às variações de salinidade, além do rápido crescimento em ambientes turbulentos e ricos em nutrientes (Aquino et al., 2015; Marañón et al., 2012; Mukherjee et al., 2013).

Os filos mais representativos do reino Animalia foram Chordata, Arthropoda e Mollusca, resultados semelhantes foram obtidos por Tosseto et al. (2022) ao avaliar a biodiversidade do litoral Amazônico. O conhecimento sobre a biodiversidade animal é crescente para esses grupos, pois são mundialmente estudados (Costello et al., 2017), contudo, para regiões Norte e Nordeste do Brasil ainda são necessários mais trabalhos, em especial para crustáceos (Boltovskoy et al., 2018) e peixes estuarinos (Silva et al., 2018).

Segundo Silva et al. (2018), o CESM apresenta riqueza de espécies inferior ao encontrado em outros estuários (Campos et al., 2010; Santos et al., 2015; Cattani et al., 2016). Em seu estudo realizado entre 2011 e 2015, um total de 56 espécies foram documentadas. Já Carvalho-Neta e Castro (2008), identificaram na ilha dos Caranguejos, região da Baía de São Marcos a presença de 32 espécies. Nesses estudos, as ordens Perciformes (família Sciaenidae) e Siluriformes (família Ariidae) se destacaram como as mais representativas. Semelhantemente, em nossos resultados às ordens Siluriformes (14 espécies) e Perciformes (12 espécies) registraram a maior diversidade de espécies.

A predominância de espécies nestas duas ordens (Perciformes e Siluriformes), apresenta um padrão esperado para costa norte do Brasil (Chao et al., 2015; Dantas et al., 2016) devido a tolerância de espécies deste grupo a variações de salinidade. As famílias Sciaenidae e Ariidae exploram bem habitats estuarinos e são compostas por espécies generalistas que normalmente habitam fundos moles arenosos-lama (Le Bail et al., 2000). Segundo Cervigón et al. (1992), os sistemas estuarinos, apesar de apresentarem elevada diversidade, podem ser caracterizados pela dominância de determinadas espécies, refletindo a predominância de alguns táxons em sua composição.

A distribuição de organismos bentônicos costuma ser influenciada principalmente pela salinidade (Ysebart et al., 2003). A diversidade de moluscos tende a ser modificada mediante variações na salinidade, devido a biologia desses organismos. Algumas espécies de

moluscos apresentam sensibilidade às variações de salinidade, a espécie *Littoraria angulifera* é considerada estenohalina (Ortiz e Blanco, 2012), enquanto *Stramonita brasiliensis* costuma a ser tolerante às variações de salinidade (Veiga et al., 2016).

Nossos resultados revelaram a ocorrência de 34 espécies de moluscos, sendo que *S. brasiliensis* ocorreu em ambos os períodos sazonais, e algumas espécies ocorreram preferencialmente durante a estiagem. Rodrigues et al. (2016), registrou 21 espécies estudando dois igarapés localizados na região do CESM, sendo que a maior abundância foi obtida na estação chuvosa, exceto pelo mês de setembro (estação seca). Tais resultados sugerem que as populações de moluscos crescem sazonalmente após períodos de chuvas fortes. Conforme observado em nosso estudo, os meses de chuva intensa, como março, revelaram um bom percentual no número de espécies obtidas. Algumas das coletas realizadas em setembro e dezembro também apresentaram resultados positivos. Provavelmente, isso está relacionado ao fato de que dezembro é um mês de transição, marcado pelo início de chuvas esporádicas que antecedem a estação chuvosa. Além disso, algumas coletas realizadas em setembro ocorreram no início do mês, após chuvas atípicas em agosto. Cabe destacar que, comunidades estuarinas apresentam baixa diversidade devido à dominância de algumas espécies geralmente resistentes a situações estressantes e com alta adaptabilidade ecofisiológica a variações na salinidade, com isso tendem a apresentar baixo número de espécies e alto número de indivíduos (Dajoz, 1972; Chung, 2001; Aviz et al., 2012).

Assim como os moluscos, algumas espécies de artrópodes também apresentam limitações quanto a variações de parâmetros ambientais. Larvas de *C. vittatus* não toleram baixas salinidades e por esse motivo as fêmeas ovígeras migram para regiões mais estáveis e com maior teor de salinidade (Sampaio et al., 2009). De fato, *C. vittatus* esteve ausente no zooplâncton, porém foi observado a ocorrência da espécie na análise da bentônica, corroborando com os resultados de Sousa et al. (2015). Segundo Almeida et al. (2010), organismos adultos podem ser encontrados em ambientes com salinidade variando entre 10 e 38, sendo encontrados em estuários, associados ao fundo de lama e areia.

4.3 β -diversidade, efeitos dos fatores ambientais e implicações ecológicas

A β -diversidade obtida no CESM revelou que a substituição de espécies (β Sim) foi o principal componente responsável pela variação total da comunidade. Esse resultado sugere que as alterações na composição são impulsionadas predominantemente por rotatividade de espécies, e não pela perda de diversidade local. Estudos têm demonstrado que em sistemas aquáticos sujeitos a variações ambientais, a estrutura das comunidades costuma se reorganizar (Menegotto et al., 2019; Pawluk et al., 2022). O aumento na substituição de espécies registrada

entre 2022 e 2023 coincidiu com períodos de alta heterogeneidade e anomalias climáticas locais, com a ocorrência de El Niño nesse período. Esse padrão indica que as mudanças climáticas regionais podem estar acelerando os processos de substituição e alterando as interações ecológicas. Conforme Cavalcanti-Lima et al. (2023), o regime climático da costa amazônica exerce influência predominante sobre as interações eco-hidrológicas, incluindo a β -diversidade, mesmo em pequenas escalas geográficas.

Nos anos iniciais, especialmente durante o período de maior precipitação caracterizado por La Niña, houve aumento na ocorrência de cianobactérias e clorofíceas, associado também a valores elevados de turbidez e a alta carga de nutrientes. Diversos estudos apontam que cianobactérias e outros grupos oportunistas tendem a se intensificar em momentos de elevada turbidez e enriquecimento nutricional, sobretudo quando esses eventos estão associados a chuvas intensas e a desequilíbrios ambientais (Reynolds, 2006; Paerl e Otten, 2013; Sommer et al., 2012). Alterações na composição da comunidade fitoplanctônica podem modificar fortemente o fluxo de energia para os níveis tróficos superiores, resultando em consequências diretas para a produtividade de todo o ecossistema (Cloern e Dufford, 2005).

Santos Sá et al. (2025), ao estudarem a comunidade fitoplanctônica do CESM, observaram que, após eventos extremos de El Niño, ocorre o crescimento rápido de espécies menores e mixotróficas, favorecendo táxons oportunistas, alguns deles potencialmente nocivos, enquanto a redução de diatomáceas e dinoflagelados de maior porte compromete a transferência de energia para os níveis tróficos superiores.

O copépode *Oithona nana*, ocorreu em exclusividade durante o período de maior precipitação pluviométrica no CESM. Essa espécie apresenta grande capacidade em tolerar amplas variações de salinidade, inclusive durante períodos de intensa descarga fluvial, como ocorre nos meses chuvosos, quando a salinidade em sistemas estuarinos tende a cair (Magouz et al., 2021; Huanacuni et al., 2021). Além disso, sua ampla flexibilidade alimentar, evidenciada pelo uso de diferentes microalgas como fonte de recurso, favorece o desenvolvimento da espécie em momentos de intensificação do aporte de nutrientes e aumento da biomassa fitoplanctônica, características recorrentes em eventos de precipitação elevada e escoamento superficial (Huanacuni et al., 2021).

A interação entre mudanças climáticas e pressões antrópicas gera um estresse cumulativo que pode acelerar os processos de degradação e comprometer a resiliência dos ecossistemas (Borja et al., 2024; Setter et al., 2022). A compreensão de interações bióticas em uma macroescala em regiões tropicais e temperadas necessitam de mais estudos para serem melhor entendidas (Heino et al., 2020; Saarinen; Candolin, 2020). No entanto, os resultados

aqui obtidos, sugerem que a substituição de espécies observada pode também representar um mecanismo de resiliência adaptativa, onde substituição contínua de táxons pode manter funções ecológicas essenciais mesmo sob perturbações intensas (Yachi e Loreau, 1999; Loreau et al., 2001).

5. Conclusão

O estudo evidenciou que a dinâmica ambiental do CESH influencia diretamente a estrutura e a distribuição da biodiversidade local. As variações de salinidade, turbidez, oxigênio dissolvido e nutrientes inorgânicos destacaram-se como os principais fatores moduladores da composição e diversidade dos táxons ao longo do tempo. Os resultados indicaram elevada heterogeneidade ambiental, associada a variações sazonais e temporais, intensificadas por eventos climáticos e pressões antrópicas. A substituição de espécies foi o principal mecanismo responsável pela variação da β -diversidade, refletindo a reorganização contínua das comunidades frente às mudanças ambientais. Os anos de 2022 e 2023 apresentaram maior heterogeneidade e riqueza de espécies, sugerindo que períodos de maior variabilidade favorecem a coexistência de diferentes grupos taxonômicos. Grupos como diatomáceas, organismos bentônicos e peixes ocorreram ao longo de todo o ano, possivelmente devido à sua tolerância às variações de salinidade e às cargas de nutrientes. Contudo, a ausência de estabilização nas curvas de acumulação indica que o esforço amostral ainda não contemplou toda a diversidade do sistema. Assim, os resultados reforçam que a biodiversidade do CESH é fortemente condicionada pela interação entre fatores hidrológicos, climáticos e antrópicos, destacando a importância do monitoramento contínuo em ambientes estuarinos amazônicos.

Declaração de Conflito de Interesses

Os autores declaram não haver conflitos de interesse financeiros ou pessoais que possam ter influenciado o trabalho relatado neste artigo.

Guia para autores e normas da revista

<https://www.sciencedirect.com/journal/regional-studies-in-marine-science/publish/guide-for-authors>

Agradecimentos

Agradecemos ao Laboratório de Biodiversidade Molecular (LaBimol) pelo suporte, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Maranhão (FAPEMA) e ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia (BIONORTE) pelo apoio financeiro, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio acadêmico.

Referências

- Albuquerque, K. F. d. M., Silva, M. H. L., Azevedo, J. W. d. J., Soares, L. S., Bandeira, A. M., Soares, L. A., & Castro, A. C. L. d., 2022. Assessment of water quality and concentration of heavy metals in fishes in the estuary of the Perizes River, Gulf of Maranhão, Brazil. *Mar. Pollut. Bull.* 186, 114420. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2022.114420>.
- Almeida, A. O., Souza, G. B. G. d., Boehs, G., Bezerra, L. E. A., 2011. Shallow-water anomuran and brachyuran crabs (Crustacea: Decapoda) from southern Bahia, Brazil. *Lat. am. j. aquat.* 38, 3, 329–376. <https://doi.org/10.3856/vol38-issue3-fulltext-2>.
- ANA, 2019. Hidroweb. (Agência Nacional das Aguas). ' online, dataset, <http://www3.ana.gov.br>.
- Anderson, M. J., 2001. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecol.* 26, 1, 32–46. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.2001.01070.pp.x>.
- Anderson, M. J., Ellingsen, K. E., McArdle, B. H., 2006. Multivariate dispersion as a measure of beta diversity. *Ecol. Lett.* 9, 6, 683–693. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.00926.x>.
- Aquino, E. P. d., Borges, G. C. P., Honorato-Da-Silva, M., Passavante, J. Z. O., Silva-Cunha, M. G. G., 2015. Phytoplankton in a tropical estuary, Northeast Brazil: composition and life forms. *Check List*, 11, 3, 1633. <https://doi.org/10.15560/11.3.1633>.
- Aviz, D., Carvalho, I. L. R. d., Filho, J. S. R., 2012. Spatial and temporal changes in macrobenthic communities in the Amazon coastal zone (Guajará Estuary, Brazil) caused by discharge of urban effluents. *Sci. Mar.* 76, 2, 381–390. <https://doi.org/10.3989/scimar.03312.16c>.
- Barletta, M., Barletta-Bergan, A., Saint-Paul, U., Hubold, G., 2003. Seasonal changes in density, biomass, and diversity of estuarine fishes in tidal mangrove creeks of the lower Caeté Estuary (northern Brazilian coast, east Amazon). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 256, 217-228. <https://doi.org/10.3354/meps256217>.
- Baselga, A., 2010. Partitioning the turnover and nestedness components of beta diversity. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 19, 1, 134–143. <https://doi.org/10.1111/j.1466-8238.2009.00490.x>.
- Bevilacqua, S., Plicanti, A., Sandulli, R., Terlizzi, A., 2012. Measuring more of β -diversity: Quantifying patterns of variation in assemblage heterogeneity. An insight from marine benthic assemblages. *Ecol. Indic.* 18, 140–148. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2011.11.006>.
- Bharathi, M. D., Venkataramana, V., Sarma, V. V. S. S., 2022. Phytoplankton community structure is governed by salinity gradient and nutrient composition in the tropical estuarine system. *Cont. Shelf Res.* 234, 104643. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2021.104643>.
- Boltovskoy, D. (Ed.), 1999. South Atlantic Zooplankton. Backhuys Publishers, Leiden pp. ixvi + 1–1706.

- Boltovskoy, D., Valentin, J. L., 2018. Overview of the history of biological oceanography in the southwestern Atlantic, with emphasis on plankton. In *Plankton Ecology of the Southwestern Atlantic* (eds. Hoffmeyer, M. S., Sabatini, M. E., Brandini, F. P., Calliari, D. L., Santinelli, N. H.). 3–34. https://doi.org/10.1007/978-3-319-77869-3_1.
- Boltovskoy, E., 1981. Foraminifera. In: Boltovskoy, D. (Ed.), *Atlas del Zooplancton del Atlántico Sudoccidental y Métodos de Trabajo con el Zooplancton Marino*. Public Esp. Inst. Nac. Inv. Desarrollo Pesq., Mar del Plata, pp. 317–352.
- Borja, Á., Elliott, M., Teixeira, H., Stelzenmüller, V., Katsanevakis, S., Coll, M., et al., 2024. Addressing the cumulative impacts of multiple human pressures in marine systems, for the sustainable use of the seas. *Front. Ocean Sustain.* 1. <https://doi.org/10.3389/focsu.2023.1308125>.
- Campos, C. E. C., Sá-Oliveira, J. C., Araújo, A. S. d., 2010. Composição e estrutura de comunidades de peixes nos parrachos de Muriú, Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. *Arq. Cienc. Mar.* 43, 1, 63–75. <https://doi.org/10.32360/acmar.v43i1.601>.
- Carvalho-Neta, R. N. F., Castro, A. C. L. d., 2008. Diversidade das assembléias de peixes estuarinos da ilha dos caranguejos, maranhão. *Arq. Cienc. Mar.* 41, 1, 48–57. <https://doi.org/10.32360/acmar.v41i1.6075>.
- Cattani, A. P., Jorge, F. G. D., Ribeiro, G. C., Wedekin, L. L., Simões-Lopes, P. C., Rupil, G. M., Spach, H. L., 2016. Fish assemblages in a coastal bay adjacent to a network of marine protected areas in southern Brazil. *Braz. j. oceanogr.* 64, 3, 295–308. <https://doi.org/10.1590/s1679-87592016121306403>.
- Cavalcanti, L. F., Azevedo-Cutrim, A. C. G. d., Oliveira, A. L. L., Furtado, J. A., Araújo, B. d. O., Sá, A. K. D. d. S., Ferreira, F. S., Santos, N. G. R., Dias, F. J. S., Cutrim, M. V. J., 2018. Structure of microphytoplankton community and environmental variables in a macrotidal estuarine complex, São Marcos Bay, Maranhão - Brazil. *Braz. J. Oceanogr.* 66, 3, 283–300. <https://doi.org/10.1590/s1679-87592018021906603>.
- Cavalcanti, L. F., Cutrim, M. V. J., Lourenço, C. B., Sá, A. K. D. S., Oliveira, A. L. L., Azevedo-Cutrim, A. C. G. d., 2020. Patterns of phytoplankton structure in response to environmental gradients in a macrotidal estuary of the Equatorial Margin (Atlantic coast, Brazil). *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 245, 106969. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2020.106969>.
- Cavalcanti, L. F., Cutrim, M. V. J., Maciel, C. C. S., Sá, A. K. D. d. S., Azevedo-Cutrim, A. C. G. d., Santos, T. P., Cruz, Q. S. d., 2022. Application of multiple indices to the evaluation of trophic and ecological status in a tropical macrotidal estuary (Equatorial Margin, Brazil). *Chem. Ecol.* 38, 2, 122–144. <https://doi.org/10.1080/02757540.2021.2023509>.
- Cavalcanti-Lima, L. F., Cutrim, M. V. J., Feitosa, F. A. d. N., Flores-Montes, M., Dias, F. J. S., Sá, A. K. D. d. S., Santos, T. P., Cruz, Q. S., Lourenço, C. B., 2023. Effects of climate, spatial and hydrological processes on shaping phytoplankton community structure and β -diversity in an estuary-ocean continuum (Amazon continental shelf, Brazil). *J. Sea Res.* 193, 102384. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2023.102384>.

- Cervigón, F., Cipriani, R., Fischer, W., Garibaldi, L., Hendrickx, M., Lemus, A. J., Rodríguez, B., 1992. Guía de campo de las especies comerciales marinas y de aguas salobres de la costa septentrional de Sur América. Roma: FAO, 513.
- Chalifour, L., Scott, D. W., MacDuffee, M., Iacarella, J. C., Martin, T., Baum, J. K. 2019. Habitat use by juvenile salmon, other migratory fish, and resident fish species underscores the importance of estuarine habitat mosaics. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 625, 145–162. <https://doi.org/10.3354/meps13064>.
- Chao, N. L., Lucena-Frédou, F., Haimovici, M., Peres, M. B., Polidoro, B., Raseira, M. B., Subirá, R. J., Carpenter, K. E., 2015. A popular and potentially sustainable fishery resource under pressure–extinction risk and conservation of Brazilian Sciaenidae (Teleostei: Perciformes). *Glob. Ecol. Conserv.* 4, 117–126. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2015.06.002>.
- Chung, Kyung S., 2001. Adaptabilidad ecofisiológica de organismos acuáticos tropicales a cambios de salinidad. *Rev. biol. trop* [online]. 2001, vol.49, n.1, pp.9-13. ISSN 0034-7744.
- Cloern, J. E., Dufford, R., 2005. Phytoplankton community ecology: principles applied in San Francisco Bay. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 285, 11–28. <https://doi.org/10.3354/meps285011>.
- Conceição, L. P., Affe, H. M. d. J., Silva, D. M. L. d., Nunes, J. M. d. C., 2021. Spatio-temporal variation of the phytoplankton community in a tropical estuarine gradient, under the influence of river damming. *Reg. Stud. Mar.* 43, 101642. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2021.101642>.
- Costello, M. J., Tsai, P., Wong, P. S., Cheung, A., Basher, Z., Chaudhary, C., 2017. Marine biogeographic realms and species endemism. *Nat. Commun.* 8, 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01121-2>.
- Cutrim, M. V. J., Santos-Sá, A. K. D. D., Cruz, Q. S. d., Azevedo-Cutrim, A. C. G. d., Santos, R. L., Dias, F. J. d. S., Jorge, M. B., Cavalcanti, L. F., 2025. Machine Learning Assessment of Dredging Impacts on the Phytoplankton Community on the Brazilian Equatorial Margin: A Multivariate Analysis. *Environ. Pollut.* 125680. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2025.125680>.
- Dajoz, R. 1972. *Ecologia Geral*. Petrópolis, Editora Vozes, Editora da Universidade de São Paulo, 174p.
- Dantas, N. C. F. d. M., Júnior, C. A. B. d. S., Feitosa, C. V., Carneiro, P. B. d. M., 2016. Seasonal influence of drifting seaweeds on the structure of fish assemblages on the eastern equatorial Brazilian coast. *Braz. J. Oceanogr.* 64, 4, 365–374. <https://doi.org/10.1590/s1679-87592016124006404>.
- Dias, C.O., Araujo, A.V. 2006. Copepoda. In: Bonecker, S.L.C. (ed.). *Atlas de zooplâncton da região central da Zona Econômica Exclusiva brasileira*. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 21-100p.

- Diniz, C. G., Cortinhas, L., Nerino, G., Rodrigues, J., Sadeck, L. W. R., Adami, M., Filho, P. W. M. e. S., 2019. Brazilian Mangrove Status: Three Decades of Satellite Data Analysis. *Remote Sens.* 11, 7, 808. <https://doi.org/10.3390/rs11070808>.
- Doney, S. C., Fabry, V. J., Feely, R. A., Kleypas, J. A., 2008. Ocean Acidification: The Other CO₂ Problem. *Anu. Rev. Mar. Sci.* 1, 1, 169–192. <https://doi.org/10.1146/annurev.marine.010908.163834>.
- Ducrottoy, J.-P., Elliott, M., Cutts, N.D., Franco, A., Little, S., Mazik, K., Wilkinson, M., 2019. Chapter 33 - Temperate Estuaries: their ecology under future environmental changes. In: Wolanski, E., Day, J.W., Elliott, M., Ramachandran, R. (Eds.), *Coasts and Estuaries: The Future*. Elsevier, Amsterdam, ISBN 978-0-12-814003-1, 577-594. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814003-1.00033-2>.
- Duvall, M. S., Jarvis, B. M., Wan, Y., 2022. Impacts of climate change on estuarine stratification and implications for hypoxia within a shallow subtropical system. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 279, 108146. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2022.108146>.
- Furtado, J. A., Cavalcanti, L. F., Santos, V. H. M. d., Serejo, J. H. F., Pereira, L. C. C., Neta, R. N. F. C., Tchaicka, L., 2025. Multimetric trophic status and harmful algal species in a harbor area of the Amazon Macrotidal Mangrove Coast. *Ecohydrol. Hydrobiol.* 25, 618-631. <https://doi.org/10.1016/j.ecohyd.2024.10.002>.
- Gilarranz, L. J., Mora, C., Bascompte, J., 2016. Anthropogenic effects are associated with a lower persistence of marine food webs. *Nat. Commun.* 7, 1, <https://doi.org/10.1038/ncomms10737>.
- Gomes, L. E. d. O., Bernardino, Â. F., 2020. Drought effects on tropical estuarine benthic assemblages in Eastern Brazil. *STOTEN*, 703, 135490. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135490>.
- González-Gorbeña, E., Rosman, P. C. C., Qassim, R. Y., 2015. Assessment of the tidal current energy resource in São Marcos Bay, Brazil. *J. Ocean. Eng. Mar. Energy.* 1, 4, 421-433. <https://doi.org/10.1007/s40722-015-0031-5>.
- Gouvello, D. L., Nel, R., Harris, L. R., Bezuidenhout, K., Woodborne, S., 2017. Identifying potential pathways for turtle-derived nutrients cycling through beach ecosystems. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 583, 49–62. <https://doi.org/10.3354/meps12351>.
- Grasshoff, K., Ehrhardt, M., Kremling, K., 1983. *Methods of Seawater Analysis*, 16. Verlag Chemie, New York, pp. 581–614, 3.
- Guerreiro, M. A., Martinho, F., Baptista, J., Costa, F., Pardal, M. Â., Primo, A. L. 2021. Function of estuaries and coastal areas as nursery grounds for marine fish early life stages. *Mar. Environ. Res.* 170, 105408. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2021.105408>.
- Guiry, M.D., Guiry, G.M., 2023. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication. National University of Ireland, Galway.
- Hall, N. S., Whipple, A. C., Paerl, H. W., 2015. Vertical spatio-temporal patterns of phytoplankton due to migration behaviors in two shallow, microtidal estuaries:

- Influence on phytoplankton function and structure. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 162, 7–21. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2015.03.032>.
- Halpern, B. S., Walbridge, S., Selkoe, K. A., Kappel, C. V., Micheli, F., D'Agrosa, C., Bruno, J. F., Casey, K. S., Ebert, C. M., Fox, H., 2008. A Global Map of Human Impact on Marine Ecosystems. *Science*. 319, 5865, 948–952. <https://doi.org/10.1126/science.1149345>.
- Harris, L. R., Niekerk, L. V., Holness, S., Sink, K., Skowno, A., Dayaram, A., Deventer, H. v., Job, N., Lamberth, S., Adams, J. B., MacKay, C. F., Perschke, M., 2025. Conserving cross-realm coastal biodiversity when real-world planning and implementation processes split the land and sea. *Ocean Coast. Manag.* 263, 107586. <https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2025.107586>.
- Hayes, S. A., Kocik, J. F., 2014. Comparative estuarine and marine migration ecology of Atlantic salmon and steelhead: blue highways and open plains. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 24, 3, 757–780. <https://doi.org/10.1007/s11160-014-9348-8>.
- Heino, J., Alahuhta, J., Bini, L. M., Cai, Y., Heiskanen, A.-S., Hellsten, S., Kortelainen, P., Kotamäki, N., Tolonen, K., Vihervaara, P., 2020. Lakes in the era of global change: moving beyond single-lake thinking in maintaining biodiversity and ecosystem services. *Biological Reviews*, v. 95, n. 6, 2020. <https://doi.org/10.1111/brv.12647>.
- Hsieh, T. C., H., K., Chao, A. 2016. iNEXT: an R package for rarefaction and extrapolation of species diversity (Hill numbers). *Methods in Ecology and Evolution*, 7, 12, 1451–1456. <https://doi.org/10.1111/2041-210x.12613>.
- Huanacuni, J. I., Pepe-Victoriano, R., Lora-Vilchis, M. C., Merino, G. E., Torres-Taipe, F. G., Espinoza-Ramos, L. A., 2021. Influence of Microalgae Diets on the Biological and Growth Parameters of *Oithona nana* (Copepoda: Cyclopoida). *Animals*, 11, 12, 3544. <https://doi.org/10.3390/ani11123544>.
- Juan, S. d., Thrush, S. F., Hewitt, J. E., 2013. Counting on β -Diversity to Safeguard the Resilience of Estuaries. *PLoS ONE*. 8, 6, e65575–e65575. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065575>.
- Le bail, P. Y., Keith, P., Planquette, P., 2000. Atlas des poissons d'eau douce de Guyane. (Tome 2, Fascicule II). Paris, Publications scientifiques du Muséum national d'Histoire naturelle. 307p.
- Leal Filho, W. L., Nagy, G. J., Martinho, F., Saroar, M., Erache, M. G., Primo, A. L., Pardal, M. A., Li, C., 2022. Influences of Climate Change and Variability on Estuarine Ecosystems: An Impact Study in Selected European, South American and Asian Countries. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 19, 1, 585. <https://doi.org/10.3390/ijerph19010585>.
- Lee, J., Biemond, B., Keulen, D. v., Huismans, Y., Westen, R. M. v., Swart, H. E. d., Dijkstra, H. A., Kranenburg, W., 2025. Global increases of salt intrusion in estuaries under future environmental conditions. *Nat. Commun.* 16, 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-025-58783-6>.

- Legendre, P., 2014. Interpreting the replacement and richness difference components of beta diversity. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 23, 11, 1324–1334. <https://doi.org/10.1111/geb.12207>.
- Lima, H. P., Dias, F. J. d. S., Teixeira, C. E. P., Godoi, V. A., Torres, A. R., Araujo, R. S., 2021. Implications of turbulence in a macrotidal estuary in northeastern Brazil — The São Marcos Estuarine Complex. *Reg. Stud. Mar. Sci.* 47, 101947. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2021.101947>.
- Liu, X., Zhao, Y., Fan, L., 2025. Constructing habitat networks to protect endangered migratory birds in the Jiaozhou Bay area. *Glob. Ecol. Conserv.* 57, e03380. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2024.e03380>.
- Long, M. H., Mora, J. W., 2023. Deoxygenation, Acidification and Warming in Waquoit Bay, USA, and a Shift to Pelagic Dominance. *Estuaries Coast.* 46, 4, 941–958. <https://doi.org/10.1007/s12237-022-01166-7>.
- Loreau, M., Naeem, S., Inchausti, P., Bengtsson, J., Grime, J. P., Hector, A., et al., 2001. Biodiversity and Ecosystem Functioning: Current Knowledge and Future Challenges. *Science*, 294, 5543, 804–808. <https://doi.org/10.1126/science.1064088>.
- Magalhães, A., Pereira, L. C. C., Costa, R. M. d., 2015. Relationships between copepod community structure, rainfall regimes, and hydrological variables in a tropical mangrove estuary (Amazon coast, Brazil). *Helgol. Mar. Res.* 69, 1, 123–136. <https://doi.org/10.1007/s10152-014-0421-4>.
- Magouz, F. I., Essa, M. A., Matter, M., Mansour, A. T., Alkafafy, M., Ashour, M., 2021. Population Dynamics, Fecundity and Fatty Acid Composition of *Oithona nana* (Cyclopoida, Copepoda), Fed on Different Diets. *Animals*, 11, 5, 1188. <https://doi.org/10.3390/ani11051188>.
- Magurran, A. E., 2021. Measuring biological diversity. *Curr. Biol.* 31, 19, R1174–R1177. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.07.049>.
- Mariano, D.L.S., Barros, F., 2014. Intertidal benthic macrofaunal assemblages: changes in structure along entire tropical estuarine salinity gradients. *Journal of the Marine Biological J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 95, 1, 5–15. <https://doi.org/10.1017/s002531541400126x>.
- Menegotto, A., Dambros, C., Netto, S. A., 2019. The scale-dependent effect of environmental filters on species turnover and nestedness in an estuarine benthic community. *Ecol.* 100, 7. <https://doi.org/10.1002/ecy.2721>.
- Miller, K. A., Huettmann, F., Norcross, B. M., Lorenz, M. 2014. Multivariate random forest models of estuarine-associated fish and invertebrate communities. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 159–174. <https://doi.org/10.3354/meps10659>.
- Mokross, K., Ryder, T.B., Cortes, ^ M.C., Wolfe, J.D., Stouffer, P.C., 2014. Decay of interspecific avian flock networks along a disturbance gradient in Amazonia. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 281, 20132599. <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.2599>.

- Molina, A., Duque, G., Cogua, P., 2020. Influences of environmental conditions in the fish assemblage structure of a tropical estuary. *Mar. Biodivers.* 50, 5 <https://doi.org/10.1007/s12526-019-01023-0>.
- Monteiro, M. C., Jiménez, J. A., Pereira, L. C. C., 2016. Natural and human controls of water quality of an Amazon estuary (Caeté-PA, Brazil). *Ocean Coast. Manag.* 124, 42–52. <https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2016.01.014>.
- Mourão, F. V., Sousa, A. C. S. R. d., Mendes, R. M. d. L., Castro, K. M., Silva, A. C. d., El-Robrini, M., Salomão, U. d. O., Pereira, J. A. R., Santos, M. d. L. S., 2020. Water quality and eutrophication in the Curuçá estuary in northern Brazil. *Reg. Stud. Mar. Sci.* 39, 101450. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2020.101450>.
- Nascimento, Â., Biguino, B., Borges, C., Cereja, R., Cruz, J. P. C., Sousa, F., Dias, J., Brotas, V., Palma, C., Brito, A. C., 2021. Tidal variability of water quality parameters in a mesotidal estuary (Sado Estuary, Portugal). *Sci. Rep.* 11, 1, <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02603-6>.
- Nixon, S.W., C.A. Oviatt, J. Frithsen, B. Sullivan. 1986. Nutrients and the productivity of estuarine and coastal marine ecosystems. *J. Limnol. Soc. South. Afr.* 12: 43–71.
- Noletto, K. S., Mendes, D. C. S., Carvalho, I. F. d. S., Ribeiro, D. L. d. S., Santos, D. M. S., Ferreira, A. P., Marques, A. L. B., Neta, R. N. F. C., Tchaicka, L., Torres-Júnior, J. R. d. S., 2022. Aquatic pollutants are associated with reproductive alterations and genotoxicity in estuarine fish (*Sciades herzbergii* - Bloch, 1794) from the Amazon Equatorial Coast. *Braz. J. Biol.* 82. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.267996>.
- Novak, A. B., Pelletier, M. C., Colarusso, P., Simpson, J. C., Gutierrez, M. N., Arias-Ortiz, A., Charpentier, M., Masqué, P., Vella, P. 2020. Factors Influencing Carbon Stocks and Accumulation Rates in Eelgrass Meadows Across New England, USA. *Estuaries Coast.* 43, 8, 2076–2091. <https://doi.org/10.1007/s12237-020-00754-9>.
- Oczkowski, A., McKinney, R. A., Ayvazian, S., Hanson, A., Wigand, C., Markham, E., 2015. Preliminary Evidence for the Amplification of Global Warming in Shallow, Intertidal Estuarine Waters. *PLoS ONE.* 10, 10, e0141529–e0141529. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141529>.
- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlenn, D., Minchin, P.R., O'Hara, R. B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Szoecs, E., Wagner, H., 2020. *Vegan: Community Ecology. Package. R package version 2.5-7.* <https://cran.r-project.org>.
- Oliveira, A. R. G. d., Odebrecht, C., Pereira, L. C. C., Costa, R. M. d., 2022. Phytoplankton variation in an Amazon estuary with emphasis on the diatoms of the Order Eupodiscales. *Ecohydrol. Hydrobiol.* 22, 1, 55–74. <https://doi.org/10.1016/j.ecohyd.2021.12.001>.
- Oliveira, S.R.S., batista, W.S., Sousa, J.B.M., Noletto, K.S., Lima, I.M.A., Andrade, T.S.O.M., Carvalho Neta, R.N.F., 2019. Enzymatic and Histological Biomarkers in *Ucides cordatus* (Crustacea, Decapoda) in an Industrial Port on the North Coast of Brazil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 102, 6, 802-810 <https://doi.org/10.1007/s00128-019-02594-1>.

- Ortiz, L.F., Blanco, J.F., 2012. Distribución de los gasterópodos del manglar, *Neritina virginea* (Neritidae) y *Littoraria angulifera* (Littorinidae) en la Ecorregión Darién, Caribe colombiano. *Rev. Biol. Trop.* 60, 219-232.
- Paerl, H. W., Otten, T. G., 2013. Harmful Cyanobacterial Blooms: Causes, Consequences, and Controls. *Microb. Ecol.* 65, 4, 995–1010. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0159-y>.
- Pawluk, M., Fujiwara, M., Martinez-Andrade, F., 2022. Climate change linked to functional homogenization of a subtropical estuarine system. *Ecol. Evol.* 12, 4. <https://doi.org/10.1002/ece3.8783>.
- Pereira, L. C. C., Jiménez, J. A., Pineda, M. G., Costa, Á. K. R. d., Sousa, N. d. S. d. S., Oliveira, A. R. G. d., Costa, R. M. d., 2023. Assessment of trophic status in Amazonian estuaries: A reinterpretation of TRIX values in mangrove estuaries. *Ocean Coast. Manag.* 244, 106805. <https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2023.106805>.
- Pereira, L. C. C., Oliveira, S. M. O. d., Costa, R. M. d., Costa, K. G. d., Vila-Concejo, A., 2013. What happens on an equatorial beach on the Amazon coast when La Niña occurs during the rainy season? *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 135, 116–127. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2013.07.017>.
- Reynolds, C. S., 2006. *The Ecology of Phytoplankton*. Cambridge University Press.
- Robbins, L. L., Lisle, J. T., 2018. Regional Acidification Trends in Florida Shellfish Estuaries: a 20+ Year Look at pH, Oxygen, Temperature, and Salinity. *Estuaries Coast.* 41, 5, 1268–1281. <https://doi.org/10.1007/s12237-017-0353-8>.
- Rodrigues, C. A. L., Ribeiro, R. P., Santos, N. B., Almeida, Z. d. S. d., 2016. Patterns of mollusc distribution in mangroves from the São Marcos Bay, coast of Maranhão State, Brazil. *Acta Amaz.* 46, 4, 391–400. <https://doi.org/10.1590/1809-4392201600493>.
- Röthig, T., Trevathan-Tackett, S. M., Voolstra, C. R., Ross, C., Chaffron, S., Durack, P. J., Warmuth, L. M., Sweet, M., 2023. Human-induced salinity changes impact marine organisms and ecosystems. *Glob. Chang. Biol.* 29, 17, 4731–4749. <https://doi.org/10.1111/gcb.16859>.
- Sá, A. K. D. d. S., Cutrim, M. V. J., Feitosa, F. A. d. N., Flores-Montes, M., Cavalcanti, L. F., Costa, D. d. S., Cruz, Q. S. d., 2022a. Multiple Stressors Influencing the General Eutrophication Status of Transitional Waters of the Brazilian Tropical Coast: An Approach Utilizing the Pressure, State, and Response (PSR) Framework. *SSRN Electron. J.* 189, 102282. <https://doi.org/10.2139/ssrn.4160517>.
- Sá, A. K. D. S., Feitosa, F. A. N., Cutrim, M. V. J., Flores-Montes, M. J., Costa, D. d. S., Cavalcanti, L. F., 2023. Phytoplankton community dynamics in response to seawater intrusion in a tropical macrotidal river-estuary continuum. *Hydrobiol.* 850, 20, 4351–4383. <https://doi.org/10.1007/s10750-022-04851-7>.
- Sá, A.K.D.D.S., Cutrim, M.V.J., Cruz, Q.S.D., Luvizotto-Santos, R., Azevedo-Cutrim, A.C.G., Nunes, Y.B.S., Ferreira, B.O., Sá, A.R.D.C., 2025. Decoding climate-

- induced phytoplankton dynamics in a tropical macrotidal estuary using explainable machine learning, STOTEN, 1005, 180837. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2025.180837>.
- Saarinen, A., Candolin, U., 2020. Mechanisms behind bottom-up effects: eutrophication increases fecundity by shortening the interspawning interval in stickleback. PeerJ, 8, e9521–e9521. <https://doi.org/10.7717/peerj.9521>.
- Saifullah, A. S. M., Kamal, A. H. M., Idris, M. H., Rajae, A. H., Bhuiyan, M. K. A., 2016. Phytoplankton in tropical mangrove estuaries: role and interdependency. Forest sci. technol. 12, 2, 104–113. <https://doi.org/10.1080/21580103.2015.1077479>.
- Samaritano, L., Chagas, F.M., Bernardino, J., Siegle, E., Tessler, M.G., Uemura, S., 2013. Hydrodynamic modeling over a sand wave field at São Marcos Bay, Brazil.
- Sampaio, S. R., Masunari, S., Haseyama, K. L. F., 2009. Distribuição temporal do ermitão *Clibanarius vittatus* (Anomura, Diogenidae) no litoral do Paraná. Iheringia, Sér. Zool. 99, 3, 276–280. <https://doi.org/10.1590/s0073-47212009000300007>.
- Santos, J. A. P., Schmiegelow, J. M. M., Rotundo, M. M., Barrella, W., 2015. Composição e variação temporal da assembleia de peixes do alto sistema estuarino de Santos, São Paulo, Brasil. Bol Inst Pesca. 41, 4, 945-959.
- Santos, V. H. M. d., Dias, F. J. d. S., Torres, A. R., Soares, R. A., Terto, L. C., Castro, A. C. L. d., Santos, R. L., Cutrim, M. V. J., 2020. Hydrodynamics and suspended particulate matter retention in macrotidal estuaries located in Amazonia-semiarid interface (Northeastern-Brazil). Int. J. Sediment Res. 35, 4, 417–429. <https://doi.org/10.1016/j.ijsrc.2020.03.004>.
- Sanvicente-Añorve, L., Sánchez-Campos, M., Alatorre-Mendieta, M., Lemus-Santana, E., Guerra-Castro, E., 2022. Zooplankton functional traits in a tropical estuarine system: Are lower and upper estuaries functionally different? Front. Mar. Sci. 95, 1, 5–15. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.1004193>.
- Scanes, E., Scanes, P., Ross, P. M. 2020. Climate change rapidly warms and acidifies Australian estuaries. Nat. Commun. 11, 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15550-z>.
- Setter, R. O., Franklin, E. C., Mora, C., 2022. Co-occurring anthropogenic stressors reduce the timeframe of environmental viability for the world’s coral reefs. PLoS Biology, 20, 10, e3001821–e3001821. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001821>.
- Shunk, N. P., Mazzini, P. L. F., Walter, R., 2024. Impacts of Marine Heatwaves on Subsurface Temperatures and Dissolved Oxygen in the Chesapeake Bay. J. Geophys. Res. Oceans, 129, 3. <https://doi.org/10.1029/2023jc020338>.
- Silva, M. H. L., Torres, A. R., Castro, A. C. L. d., Azevedo, J. W. d. J., Ferreira, C. F. C., Cardoso, R. L., Nunes, J. L. S., Neta, R. N. F. C., 2018. Fish assemblage structure in a port region of the Amazonic coast. Iheringia, Sér. Zool. 108, 0. <https://doi.org/10.1590/1678-4766e2018018>.
- Sommer, U., Adrian, R., Domis, L. N. d. S., Elser, J. J., Gaedke, U., Ibelings, B. W., et al., 2012. Beyond the Plankton Ecology Group (PEG) Model: Mechanisms Driving

- Plankton Succession. *Annu Rev Ecol Evol Syst.* 43, 1, 429–448. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-110411-160251>.
- Sousa, D. B. P., Soares, S. H. d. C., Torres, H. S., Jesus, W. B. d., Oliveira, S. R. S. d., Bastos, W. R., Ribeiro, C. A. d. O., Neta, R. N. F. C., 2021. Sediment contaminant levels and multibiomarker approach to assess the health of catfish *Sciades herzbergii* in a harbor from the northern Brazilian Amazon. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 208, 111540. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111540>.
- Sousa, D. B., Santos, N. B., Oliveira, V. M. d., Neta, R. N. F. C., & Almeida, Z. d. S. d. (2015). Carcinofauna bêmica estuarina de dois manguezais da costa amazônica maranhense, Brasil. *Iheringia, Sér. Zool.* 105, 3, 339–347. <https://doi.org/10.1590/1678-476620151053339347>.
- Sousa, L. K. S., Cutrim, M. V. J., Júnior, M. N., Oliveira, V. M. d., 2023. Does dredging activity exert an influence on benthic macrofauna in tropical estuaries? Case study on the northern coast of Brazil. *Iheringia, Sér. Zool.* 113. <https://doi.org/10.1590/1678-4766e2023009>.
- Strickland, J.D.H., Parsons, T.R., 1972. A Practical Handbook of Seawater Analysis. Fisheries Research Board of Canada, Ottawa (ON), p. 205. J. C. Stevenson and J. Watson, editors vol. 167 (2).
- Thrush, S. F., Hewitt, J. E., Cummings, V. J., Norkko, A., Chiantore, M., 2010. β -Diversity and Species Accumulation in Antarctic Coastal Benthos: Influence of Habitat, Distance and Productivity on Ecological Connectivity. *PLoS ONE.* 5, 7, e11899–e11899. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011899>.
- Todgham, A. E., Stillman, J. H., 2013. Physiological Responses to Shifts in Multiple Environmental Stressors: Relevance in a Changing World. *Integr. Comp. Biol.* 53, 4, 539–544. <https://doi.org/10.1093/icb/ict086>.
- Torres, H. S., Barros, M. F. d. S., Jesus, W. B. d., Kostek, L. S., Sousa, D. B. P., Neta, R. N. F. C., 2023. Impacted estuaries on the Brazilian Amazon coast near port regions influence histological and enzymatic changes in *Sciades herzbergii* (Ariidae, Bloch, 1794). *Braz. J. Biol.* 83. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.271232>.
- Tosetto, E. G., Bertrand, A., Neumann-Leitão, S., Júnior, M. N., 2022. The Amazon River plume, a barrier to animal dispersal in the Western Tropical Atlantic. *Sci. Rep.* 12, 537. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-04165-z>.
- Tripathy, K. P., Mukherjee, S., Mishra, A. K., Mann, M., Williams, P., 2023. Climate change will accelerate the high-end risk of compound drought and heatwave events. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 120, 28. <https://doi.org/10.1073/pnas.2219825120>.
- Veiga, M. P. T. d., Gutierrez, S. M. M., Castellano, G. C., Freire, C. A., 2016. Tolerance of high and low salinity in the intertidal gastropod *Stramonita brasiliensis* (Muricidae): behaviour and maintenance of tissue water content. *J. Molluscan Stud.* eyv044–eyv044. <https://doi.org/10.1093/mollus/eyv044>.
- Vitali, A., Ruiz, S., Vázquez, D.P., Schleuning, M., Rodríguez, M.A., Sasal, Y., Pilosof, S., 2023. Invasive species modulate the structure and stability of a multilayer

mutualistic network. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 290, 20230132. <https://doi.org/10.1098/rspb.2023.0132>.

- Waycott, M., Duarte, C. M., Carruthers, T. J. B., Orth, R. J., Dennison, W. C., Olyarnik, S., Calladine, A., Fourqurean, J. W., Heck, L., Hughes, A. R., Short, F. T., Williams, S. L. 2009. Accelerating loss of seagrasses across the globe threatens coastal ecosystems. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 30, 12377–12381. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905620106>.
- Whittaker, R.H., 1960. Vegetation of the Siskiyou Mountains, Oregon and California. *Ecol. Monogr.*, 30, 279–338.
- Whittaker, R.H., 1972. Evolution and measurement of species diversity. *Taxon*, 21, 213–251.
- Yachi, S., Loreau, M., 1999. Biodiversity and ecosystem productivity in a fluctuating environment: The insurance hypothesis. *PNAS.* 96, 4, 1463–1468. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.4.1463>.
- Yan, C., Hu, L., Zhang, X., Li, S., Li, F., Dong, Y.-W., 2025. Water-Sediment Regulation drives multi-taxon biodiversity and ecological network dynamics in the Yellow River Estuary. *Reg. Stud. Mar. Sci.* 104336. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2025.104336>.
- Young, G. C., Potter, I. C., 2002. Influence of Exceptionally High Salinities, Marked Variations in Freshwater Discharge and Opening of Estuary Mouth on the Characteristics of the Ichthyofauna of a Normally-Closed Estuary. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 55, 2, 223–246. <https://doi.org/10.1006/ecss.2001.0899>.
- Ysebaert, T., Herman, P. M. J., Meire, P., Craeymeersch, J. A. M., Verbeek, H., Heip, C. H. R., 2003. Large-scale spatial patterns in estuaries: estuarine macrobenthic communities in the Schelde estuary, NW Europe. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 57, 1-2, 335–355. [https://doi.org/10.1016/s0272-7714\(02\)00359-1](https://doi.org/10.1016/s0272-7714(02)00359-1).

4 CAPÍTULO 2

Uso do DNA metabarcoding (eDNA) como ferramenta no monitoramento de um Complexo Portuário na Costa Amazônica Brasileira

Revista Global Ecology and Conservation (Qualis A3)

Status: Manuscrito não submetido

Uso do DNA metabarcoding (eDNA) como ferramenta no monitoramento de um Complexo Portuário na Costa Amazônica Brasileira

Jordana Adorno Furtado^a; Ligia Tchaicka^{a,b*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal (REDE BIONORTE), Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), 65055-310, São Luís, Maranhão, Brasil

^bPrograma de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade (PPGECB), Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), 65055-310, São Luís, Maranhão, Brasil

*Autor correspondente: Ligia Tchaicka

Endereço de e-mail: ligiatchaicka@professor.uma.br

Resumo

O Complexo Estuarino de São Marcos (CESM), representa uma área de alta relevância ecológica e socioeconômica, localizado na Zona Costeira Amazônica (ZCA), embora submetida a intensas pressões antrópicas. Diante desse cenário, técnicas sensíveis como o DNA ambiental (eDNA), tornam-se essenciais para aprimorar o monitoramento da biodiversidade. Neste estudo, avaliamos a eficiência do eDNA em amostras de água e sedimento para caracterizar a diversidade local. O resultados revelaram sequências recuperadas para os domínios Archaea, Bacteria e Eukaryota, com registro de 39 filos eucarióticos. Entre eles, grupos mais abundantes em número de sequências como fitoplâncton como Heterokontophyta, Dinoflagellata e Chlorophyta, fungos (Ascomycota e Basidiomycota) e bactérias (Proteobacteria e Planctomycetes), além como metazoários representados por Arthropoda, Mollusca, Chordata e Annelida. O marcador 18S apresentou maior rendimento e capturou ampla diversidade de microeucariotos, enquanto o COI, embora menos específico, contribuiu para a detecção de metazoários, reforçando que abordagens que dois ou mais marcadores são mais adequadas para caracterizar comunidades complexas. A análise temporal revelou variações sazonais e diferenças entre os anos amostrados, indicando que a dinâmica ambiental estuarina influencia diretamente a composição e a detecção dos grupos biológicos. Mesmo com limitações relacionadas aos ambientes costeiros tropicais os resultados evidenciam que o eDNA é uma ferramenta eficaz e promissora para o monitoramento do CESM. A técnica ampliou o registro de grupos pouco detectáveis por métodos tradicionais, oferecendo alternativas relevantes para avaliações ambientais e estratégias de monitoramento.

Palavras-chave: Biodiversidade; Metabarcoding; Variação sazonal; Complexo estuarino; Monitoramento ambiental

The São Marcos Estuarine Complex (SMEC) represents an area of high ecological and socioeconomic relevance, located in the Amazon Coastal Zone (ACZ), although subjected to intense anthropogenic pressures. Given this scenario, sensitive techniques such as environmental DNA (eDNA) become essential to improve biodiversity monitoring. In this study, we evaluated the efficiency of eDNA in water and sediment samples to characterize local diversity. The recovered results revealed sequences for the Archaea, Bacteria, and Eukaryota domains, with records from 39 eukaryotic phyla. Among them, the most abundant groups in terms of sequence number include phytoplankton such as Heterokontophyta, Dinoflagellata, and Chlorophyta, fungi (Ascomycota and Basidiomycota) and bacteria (Proteobacteria and Planctomycetes), as well as metazoans represented by Arthropoda, Mollusca, Chordata, and Annelida. The 18S marker showed higher yield and captured a wide diversity of microeukaryotes, while COI, although less specific, contributed to the detection of metazoans, reinforcing that approaches using two or more markers are more specific for characterizing complex communities. Temporal analysis revealed seasonal variations and differences between the sampled years, indicating that the estuarine environmental dynamics directly influence the composition and detection of biological groups. Even with limitations related to tropical coastal environments, the results show that eDNA is an effective and promising tool for monitoring the SMEC. The technique expanded the recording of groups that are difficult to detect by traditional methods, offering relevant alternatives for environmental assessments and monitoring strategies.

Keywords: Biodiversity; environmental monitoring; Seasonal variation; Estuarine complex; Environmental monitoring

1. Introdução

As regiões estuarinas constituem zonas de transição essenciais entre ambientes de água doce e marinha, exercendo papel fundamental na conectividade ecológica e no fluxo de energia e nutrientes (Zhang et al., 2021). São ecossistemas altamente produtivos, que fornecem importantes serviços ecológicos, como a ciclagem de nutrientes, o suporte trófico e a oferta de habitats para diversas espécies-chave (Chapman e Wang, 2001; Arevalo et al., 2023).

As atividades humanas, como a industrialização, o uso de recursos naturais e o crescimento urbano, exercem fortes pressões sobre os ecossistemas estuarinos, resultando em

perda de habitat, alterações ambientais e contaminação (Lécuyer et al., 2024). Em escala global, observa-se o aumento dessas pressões sobre a biodiversidade, mesmo em áreas legalmente protegidas, como parques nacionais, que continuam vulneráveis a perturbações (Lockwood et al., 2015; Hoegh-Guldberg et al., 2019). O Brasil, quinto maior país do mundo e o principal entre as nações megadiversas (Mittermeier et al., 2005), concentra entre 15% e 20% de toda a biodiversidade global (CDB, 2022) e possui um dos maiores sistemas de áreas protegidas do planeta (Roque et al., 2018).

A estimativa global sugere a existência de aproximadamente 8,7 milhões de espécies eucarióticas, das quais cerca de 2,2 milhões habitam os oceanos. Apesar dessa expressiva diversidade, grande parte ainda permanece desconhecida (Mora et al., 2011). A proporção de táxons ainda não descritos varia amplamente entre os diferentes grupos, podendo alcançar valores estimados entre 24% e 98%, conforme o grupo taxonômico considerado (Leray e Knowlton, 2016).

A conservação de uma parcela significativa e suficiente da biodiversidade e dos processos ecológicos é uma prioridade global urgente, visando um mundo sustentável (Georgian et al., 2022; Leadley et al., 2022). Assim, para mitigar essas ameaças, é fundamental adotar estratégias de monitoramento que considerem a biodiversidade e a dinâmica ecológica dos ecossistemas. Contudo, um dos principais desafios enfrentados pelos gestores ambientais é identificar e mitigar os impactos das atividades antrópicas nos ambientes costeiros (Suzzy et al., 2023). Adicionalmente, é evidente a necessidade de desenvolver ferramentas eficientes, capazes de atuar como indicadores precisos e confiáveis da qualidade dos ecossistemas, fornecendo subsídios científicos sólidos para a tomada de decisões em gestão ambiental (Clark et al., 2015; Suzzy et al., 2023).

O DNA ambiental (eDNA) surge como uma ferramenta eficiente para o levantamento da biodiversidade em áreas vulneráveis. O eDNA, material genético liberado pelos organismos no ambiente (Hansen et al., 2018; Kim et al., 2025) tem sido bastante empregado como ferramenta para a detecção e identificação de espécies, identificando em uma única amostra ambiental múltiplas linhagens (Taberlet et al. 2012). Essa técnica possibilita a detecção de espécies sem a necessidade de captura física, evitando a perturbação dos habitats e minimizando impactos sobre espécies vulneráveis (Shen et al., 2022; Yao et al., 2022). Há um potencial crescente para que os dados obtidos por meio da detecção de eDNA metabarcoding sejam aplicados de forma mais abrangente, contribuindo para a tomada de decisões em sistemas estuarinos, muitos dos quais demandam novas ferramentas de monitoramento capazes de apoiar o enfrentamento de desafios complexos de gestão (Cloern et al., 2016a). Apesar desse potencial

reconhecido, essas ferramentas requerem validação adicional, particularmente em ecossistemas complexos e dinâmicos como estuários (Suzzy et al., 2023).

A Zona Costeira Amazônica (ZCA) constitui um ambiente de elevada diversidade biológica e alta produtividade, representando mais de um terço de toda a costa brasileira (Souza Filho, 2005). Essa região abriga uma das maiores extensões contínuas de manguezais do planeta (Kjerfve et al., 2002), além de inúmeros estuários, entre eles o do próprio rio Amazonas. Dentre os diversos sistemas associados, destaca-se o Complexo Estuarino de São Marcos (CESM), caracterizado pela intensa atividade humana, que inclui a presença de um dos maiores terminais de transporte marítimo do Brasil (Amaral e Alfredini, 2010). Nos últimos anos, o CESM tem apresentado um quadro de contaminação contínua, decorrente principalmente do lançamento de esgotos domésticos e agrícolas, do uso de agrotóxicos e do descarte de resíduos industriais (Carvalho-Neta et al., 2012; Rodrigues et al., 2016; Oliveira et al., 2019; Jesus et al., 2020; Pinheiro-Sousa et al., 2021; Cutrim et al., 2025; Furtado et al., 2025). Neste estudo, testamos a sensibilidade da técnica de DNA ambiental (eDNA) em amostras de água e sedimento para a identificação da diversidade biológica na região de estudo, bem como padronizamos uma metodologia que contemple as etapas de coleta, armazenamento e extração de eDNA provenientes de ambientes estuarinos altamente dinâmicos.

2. Metodologia

2.1 Área de estudo

O Complexo Estuarino de São Marcos (CESM) está localizado na zona de transição entre o clima amazônico e o semiárido brasileiro, na costa norte do Brasil (Amaral e Alfredini, 2010; Lima et al., 2021) (Figura 1). Possui o canal mais profundo, largo e extenso do país, se destacando como um importante corredor natural de exportação da região geoeconomicamente estratégica da Amazônia Oriental, que abriga um dos principais complexos portuários do Brasil. Esse sistema, composto pelos portos de Itaqui, Ponta da Madeira e ALUMAR, é o segundo maior da América Latina e figura entre os mais importantes centros de movimentação de carga do mundo (Samaritano et al., 2013; ANTAQ – Agência Nacional de Transportes Aquaviários, 2025).

O clima na região é caracterizado como tropical quente e úmido, com uma estação chuvosa prolongada e de forte intensidade. Os índices pluviométricos se mantêm elevados ao longo do ano, com totais anuais que geralmente ultrapassam os 2.000 mm, um padrão típico para o litoral amazônico. A estação chuvosa ocorre entre janeiro e junho, com o período de fevereiro a maio concentrando cerca de 70% da precipitação anual, registrando temperatura do

ar média próxima de 26,8 °C. A estação seca se estende de julho a dezembro e registra os menores volumes de chuva, especialmente entre setembro e novembro, quando as médias mensais ficam em torno de 20 mm e temperaturas do ar acima de 27 °C (Pereira et al., 2016).

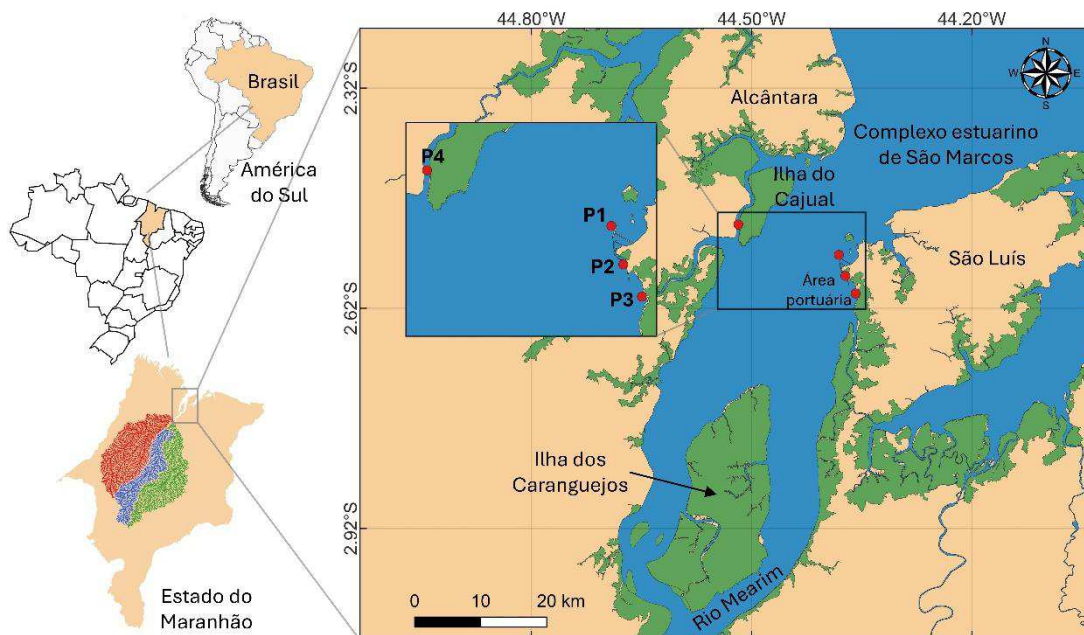


Figura 1 - Mapa da área de estudo e dos pontos de amostragem no Complexo Estuarino de São Marcos (CESM).

2.2 Amostragem em campo

Para a coleta de eDNA, quatro locais de amostragem foram definidos, onde foram realizadas campanhas trimestrais entre 2020 e 2022 durante o período chuvoso e de estiagem. Um total de 14 amostras, sendo 12 de água e 2 de sedimentos, foram enviadas para sequenciamento Illumina de eDNA metabarcoding dos marcadores mitocondriais 18S e citocromo oxidase I (COI).

As amostras de água foram obtidas com o auxílio de uma garrafa de Van Dorn, e para cada estação foram coletados 3 L de água na camada superficial e fundo. Em laboratório, as amostras foram filtradas usando membrana de nitrato de celulose lisa 0,45µm e bomba a vácuo. A padronização da quantidade de água filtrada foi estabelecida a partir da quantidade necessária para promover o entupimento do filtro. A fim de evitar possíveis contaminações, uma amostra controle foi utilizada tanto nas etapas de campo quanto nas análises laboratoriais. Após filtrados os filtros foram armazenados em freezer a uma temperatura de -80 °C até uso posterior.

Além das amostras de água, também foram coletadas em cada uma das quatro estações amostras de sedimento, para tal foi utilizado uma draga do tipo busca fundo. Com uma espátula

esterilizada foram retiradas subamostras de 20 g que foram armazenadas em sacos plásticos estéreis e mantidos no gelo a -80 °C.

2.3 Extração e Sequenciamento de eDNA

O DNA genômico das amostras de água e de sedimento foi extraído utilizando o kit de isolamento DNeasy PowerSoil Pro (QIAGEN), seguindo os procedimentos padrão do fabricante, que inclui etapas de lise mecânica, remoção de inibidores, purificação em coluna de sílica e eluição final do DNA. Os procedimentos foram ajustados para se adequar às características das amostras. A quantidade e a qualidade do DNA foram verificadas em duplicata por meio do espectrofotômetro NanoDrop e do fluorômetro Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific).

Para o processo de amplificação, as amostras de DNA foram previamente avaliadas quanto à concentração e pureza por espectrofotometria (Nanodrop). Em seguida, amostras com baixa qualidade foram submetidas à purificação com esferas magnéticas para remoção de inibidores comuns em matrizes ambientais. A partir das amostras obtidas, dois marcadores genéticos, o rRNA nuclear 18S e a subunidade I da citocromo oxidase mitocondrial (COI), foram amplificados.

Os primers forward fwhF2 (5'-GGDACWGGWTGAACWGTWTAYCCHCC-3') e reverse fwhR2n (5'-GTRATWGCHCCDGCTARWACWGG-3') foram empregados para a amplificação de COI, utilizando o marcador curto proposto por Vamos et al. (2017), que apresentava maior eficiência para DNA ambiental degradado. Para o domínio Eukaryota, a região V9 do gene 18S rRNA foi amplificada com os primers 1391F (5 - GTACACACCGCCCGTC-3) e EukB (5 -TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC-3) (Amaral-Zettler et al., 2009). Todas as reações incluíram controles negativos para verificar possíveis contaminações.

A preparação seguiu o protocolo padrão de duas etapas da plataforma Illumina. Na primeira PCR, foram amplificados os fragmentos alvo com primers contendo sequências pré-adaptadoras. Na segunda PCR, foram adicionados os adaptadores P5 e P7 e índices específicos (barcodes), permitindo a identificação individual das amostras após o sequenciamento. Os produtos amplificados foram purificados com esferas magnéticas, quantificados e normalizados antes de serem reunidos em um pool único.

O pool final foi quantificado por qPCR (KAPA Library Quantification Kit), ajustado para 2 nM e sequenciado na plataforma Illumina iSeq 100 com kit de 300 ciclos (2 × 150 bp).

Uma alíquota de PhiX (30%) foi adicionada como controle interno de qualidade e para aumentar a diversidade da biblioteca.

2.4 Análise Bioinformática

As análises bioinformáticas foram conduzidas em três etapas principais: (1) pré-processamento dos dados brutos, (2) filtragem e (3) identificação taxonômica dos ASVs. A demultiplexação foi realizada automaticamente pela plataforma Illumina iSeq®.

Na primeira etapa, a qualidade das sequências brutas foi avaliada com o software FastQC (Andrews, 2010). Em seguida, os relatórios gerados foram reunidos por meio do MultiQC, o que possibilitou uma visualização comparativa da qualidade entre as amostras (Ewels et al., 2016).

Na segunda etapa, os primers foram removidos em todas as orientações (direta, reversa e complemento reverso) utilizando o Cutadapt 4.0 em ambiente Python 3.9.12, com o pacote *dada2* no R (Martin, 2011; Callahan et al., 2016; R Core Team, 2023). A qualidade das sequências foi inspecionada graficamente, e as extremidades com qualidade inferior a uma pontuação Phred 30 foram cortadas. A filtragem e o aparo das sequências foram realizados com a função *filter And Trim* (*dada2*), permitindo até dois erros esperados nas leituras diretas e quatro nas reversas, número maior devido à menor qualidade destas últimas. Leituras com menos de 50 pb foram descartadas, pois não permitem identificação taxonômica confiável. Artefatos de PCR, conhecidos como sequências quiméricas, foram detectados e removidos com a função *remove Bimera Denovo*. Os demais parâmetros foram mantidos como padrão. As leituras diretas e reversas de *cox1* foram posteriormente unidas com a função *merge Pairs*, admitindo até uma incompatibilidade entre os pares.

Na terceira etapa, as variantes de sequência de amplicon (ASVs) foram inferidas e classificadas taxonomicamente com a função *assign Taxonomy* do DADA2 (Callahan et al., 2016), utilizando o banco de dados SILVA v132 (Quast et al., 2012; Yilmaz et al., 2014), para os dados provenientes de 18S, conforme disponível em Morien e Parfrey (2018) e o banco de dados Barcode of Life Data Systems (BOLD), para COI. Por fim, o conjunto de dados foi filtrado para remover ASVs sem identificação nos níveis de Reino e Filo. Todos os scripts utilizados estão disponíveis em <<https://github.com/jessicovsky>>.

3. Resultados

3.1 Quantidade e Qualidade das sequências

As análises de qualidade realizadas com FastQC e MultiQC indicaram variação considerável na qualidade das leituras entre amostras, anos e marcadores. Foram obtidas 5.398.220 leituras brutas por sequenciamento Illumina MiSeq, referentes a um total de 14 amostras, das quais 5.243.492 são provenientes das amostras de água e 154.728 das amostras de sedimento. Os resultados indicaram que o marcador 18S apresentou um número maior de leituras em comparação ao marcador COI, tanto em água quanto em sedimento. A Tabela 1 resume a distribuição de tamanho das sequências, número de reads por amostra e diferenças entre marcadores e tipos de amostra. As amostras de menor (*) e maior qualidade (**) estão destacadas com asteriscos.

Tabela 1 - Tipo de amostra, marcador sequenciado, comprimento das sequências (pares de base - bp) e número de *reads* em cada amostra obtida no Complexo Estuarino de São Marcos.

Tipo de amostra	Nº da amostra	18S		COI	
		bp	Número de <i>reads</i>	bp	Número de <i>reads</i>
Água	EM157_07	35-151*	1271*	35-151	5701
	EM157_08	35-151	1289	35-151	21453
	EM157_09	35-151	1390	35-151	10084
	EM157_10	35-151	409255	35-151	11565
	EM157_11	40-151	382770	35-151	305289
	EM157_12	41-151	419433	35-151	271005
	EM157_13	35-151	1962	35-151*	1557*
	EM157_14	35-151**	441458**	35-151	253690
	EM157_15	35-151	325277	35-151**	347008**
	EM157_16	35-151	325164	35-151	6742
	EM157_17	35-151	387914	35-151	34281
	EM157_18	35-151	352719	35-151	192878
Sedimento	EM157_19	35-151	350036	35-151	6203
	EM157_20	36-151	382301	35-151	148525

Quanto a espacialidade, o ponto amostral localizado em uma região de menor influência antrópica registrou o maior número de leituras para ambos os marcadores, sendo que durante a estação chuvosa (junho/2021), o marcador 18S contabilizou 441.458 sequências, enquanto no período seco (setembro/2021) o marcador COI registrou 347.008 sequências.

Com base nas informações prévias obtidas, é possível inferir que amostras com mais tempo entre a coleta e o sequenciamento, aqui consideradas amostras “mais antigas” (2020), apresentam baixa qualidade considerando número de sequências por amostra e a qualidade

média de cada base, de acordo com o Phred score. O Phred score mede a probabilidade de que uma determinada base nitrogenada no sequenciamento esteja incorreta. Bases com qualidade acima de 28 são consideradas de boa qualidade, entre 20 e 28 são de qualidade intermediária, e abaixo de 20 são consideradas de baixa qualidade, as quais foram removidas das análises posteriores.

3.2 Atribuição taxonômica

Com base nos resultados obtidos por meio do marcador 18S e do banco de dados SILVA, 13.684 sequências foram detectadas (Figura 2). Destas, aproximadamente 93% (12.689) foram identificadas em algum nível taxonômico, enquanto 7% (995) não obtiveram atribuição definida por serem inconclusivas (NA). As sequências detectadas foram distribuídas entre os domínios Archaea (575), Bacteria (6.435) e Eukaryota (5.680).

Em relação ao marcador COI, utilizamos o banco de dados Barcode of Life Data Systems (BOLD). No total, recuperamos 878 sequências, das quais aproximadamente 70% (611) foram identificadas, no mínimo, até o nível de domínio, enquanto 30% (267) permaneceram sem atribuição taxonômica. Para esse marcador, todas as sequências obtidas corresponderam exclusivamente ao domínio Eukaryota.

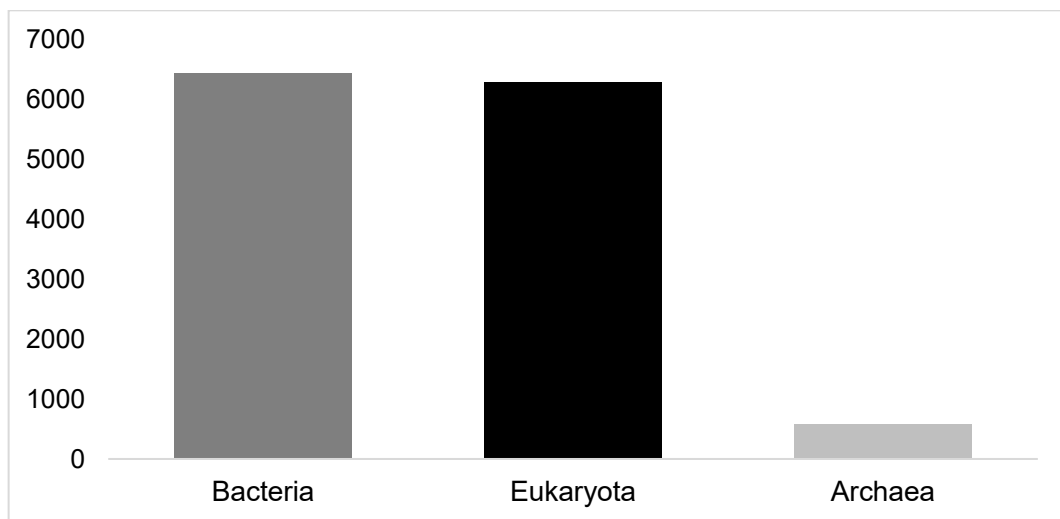


Figura 2 - Número de sequências obtidas utilizando os marcadores 18S e COI para cada domínio identificado.

Dentre as amostras identificadas, aproximadamente 4,52% foram representadas pelo domínio Archaea, que abrangeu cinco filos, sendo o mais abundante Euryarchaeota, com 259 sequências, seguido por Nanoarchaeota (110 sequências) e Thaumarchaeota (101 sequências). No geral, 8 classes, 6 ordens e 5 famílias foram identificadas. Dentre as famílias mais

abundantes, destaca-se Nitrosopumilaceae com 100 sequências obtidas, as demais contribuíram com menos de 3 sequências, ou se restringiram a classe e ordem.

Quanto às bactérias, identificadas em 50,71% das sequências, 22 filos foram registrados, sendo os mais abundantes Proteobacteria (2.854 sequências) e Planctomycetes (1380 sequências), Verrucomicrobia (198 sequências) e Acidobacteria (192 sequências). Nesse domínio, foram identificadas 3 classes, 50 ordens e 80 famílias. Dentre as proteobacterias, uma quantidade considerada de sequências chegou até nível de gênero e espécie, dentre elas os gêneros Candidatus, Desulfatiglans, Desulfurivibrio, Coxiella e Haliangium se destacaram.

Em relação aos eucariotos (44,76% das sequências), aproximadamente 39 filos foram registrados, incluindo espécimes pertencentes aos reinos Chromista, Fungi, Protozoa, Plantae e Animalia (Tabela 2). Os filos mais abundantes foram representados, em sua maioria, por microalgas pertencentes a Heterokontophyta (833 sequências), Dinoflagellata (360), Chlorophyta (121) e Euglenozoa (120).

Em relação as microalgas detectadas, as diatomáceas (classe Diatomea) foram as mais abundantes, com destaque para os gêneros Cyclotella, Coscinodiscus e Gyrosigma, muito comuns em ambientes sob influência marinha e estuarina. Além disso, foi registrada a presença de gêneros potencialmente nocivos, como Skeletonema, e tóxicos, como Pseudo-nitzschia. Os dinoflagelados (classe Dinophyceae) também representaram um número expressivo de sequências, com destaque para os gêneros Paragymnodinium, Protoperidinium e Neoceratium. Além disso, houve o registro de sequências para os gêneros Noctiluca, Alexandrium e Scrippsiella, até então sem registro para região, sendo este último criptogênico.

Os filos Arthropoda, Mollusca, Chordata e Annelida também apresentaram sequências registradas (Tabela 2). No entanto, a identificação se restringiu apenas até a ordem para artrópodes e moluscos, até a classe para vertebrados e até a família para anelídeos. Entre as classes observadas, destacam-se Maxillopoda (ordem Harpacticoida), Bivalvia (ordem Ostreoida), Actinopterygii e Polychaeta (famílias Paraonidae e Orbiniidae). As cinco classes recuperadas para Arthropoda foram Arachnida, Insecta, Malacostraca, Maxillopoda e Nassophorea, com destaque para Maxillopoda, que apresentou o maior número de sequências obtidas. Além disso, foram identificadas sequências dos filos Ciliophora, Cnidaria e Nematoda, além de amebas pertencentes ao filo Cercozoa.

Quanto aos resultados obtidos para o marcador COI, foram recuperadas sequências pertencentes a apenas três filos. Arthropoda apresentou o maior número de sequências, superando os valores observados para o marcador 18S (Tabela 2). Os filos Cnidaria e Mollusca mostraram baixa representatividade, com apenas duas ou uma sequência registrada. Para

Cnidaria e Arthropoda, a identificação alcançou somente o nível de ordem, enquanto em Mollusca foi possível chegar até espécie, sendo esta do gênero *Biomphalaria*.

Tabela 2 - Principais grupos identificados através dos marcadores 18S e COI por meio de DNA metabarcoding.

Primer	Reads	Reino	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero
18S	1380	Bacteria	Planctomycetes	3	6	8	11
	2854		Proteobacteria	3	46	65	69
	833		Heterokontophyta	6	11	15	46
	360	Chromista	Dinoflagellata	2	4	9	33
	121		Chlorophyta	7	10	10	17
	120	Protozoa	Euglenozoa	2	2	4	2
	97	Fungi	Ascomycota	5	9	17	10
	118		Basidiomycota	8	14	12	10
	47		Annelida	2	7	2	-
	84		Arthropoda	5	4	-	-
	37	Animalia	Cnidaria	3	6	-	-
	42		Mollusca	2	6	-	-
	54		Vertebrata	4	1	-	-
	COI	321		Arthropoda	2	1	-
2		Animalia	Cnidaria	2	1	-	-
1			Mollusca	1	1	1	1

3.3 Dinâmica sazonal da biodiversidade

Uma visualização da composição da comunidade do CESH foi obtida a partir da identificação taxonômica nos níveis de ordem e família, representada pelos gráficos de barras empilhadas. A Figura 3a apresenta os resultados obtidos para o marcador 18S nas amostras de água referentes à estação chuvosa, evidenciando que a maior contagem geral de leituras correspondeu a microrganismos, com destaque para os organismos fitoplanctônicos pertencentes às ordens Coscinodiscales, Peridinales e Gymnodiniales. Bacillariophytina (subfilo) apresentou o maior abundância relativa, em razão da grande quantidade de ordens associadas (12 ordens), optamos por utilizar essa classificação.

Em relação a Bacillariophytina, observamos variação entre 20,00% (julho/2020) e 52,38% (março/2021) da riqueza de espécies recuperada em todas as campanhas. A ordem Peridinales variou entre 12,79% (julho/2022) e 20,00% (julho/2020). Dentro dessas ordens, as famílias mais representativas foram Stephanodiscaceae (33%) e Protoperidiniaceae (33%). As ordens Coscinodiscales e Gymnodiniales não foram registradas em 2020 (Figura 3b). Já em 2021, Gymnodiniales apresentou 11,43% das leituras em junho, enquanto Coscinodiscales, ausente nesse mês, alcançou 8,33% em março.

A figura também apresenta a presença de moluscos (Mytiloidea e Ostreoida), artrópodes (Calanoida e Cyclopoida) e cnidários (Actiniaria), além de outros grupos com menor representatividade.

As ordens Ostreoida e Calanoida foram registradas ao longo de todo o estudo. Ostreoida variou entre 1,19% (março/2021) e 20,00% (julho/2020), enquanto Calanoida apresentou 20,00% em julho/2020. Para esses grupos, a classificação taxonômica pôde ser realizada apenas até o nível de ordem. Poliquetas da ordem Eunicida foram exclusivos de 2021, enquanto Spionida foi registrado em 2021 e 2022. A ordem de cnidário Actiniaria também esteve ausente em 2020, porém registradas em 2021 e 2022. Para todos esses táxons, o nível mais baixo de identificação também foi o de ordem.

A ordem Anguilliformes foi exclusiva em março/2021 contribuindo com cerca de 0,60% das sequências obtidas. Não foi possível registrar famílias para esse grupo, contudo, entre as sequências obtidas destaca-se registros para classes como Chondrichthyes e Mammalia. A representatividade das famílias Gymnodiniaceae, Pyrophacaceae, Thoracosphaeraceae, Chaetocerotaceae, Coscinodiscaceae, Rhizosoleniaceae, Euglenaceae e Parabodonidae foi semelhante, com registros apenas em 2021 e 2022 (Figura 3b). Fungos da família Aspergillaceae também ocorreram nesses dois anos, variando entre 9,68% e 13,89%.

De modo geral, o ano de 2020 apresentou a menor diversidade de grupos. Alguns táxons não foram registrados nesse período, enquanto outros se destacaram, como ilustrado na Figura 3.

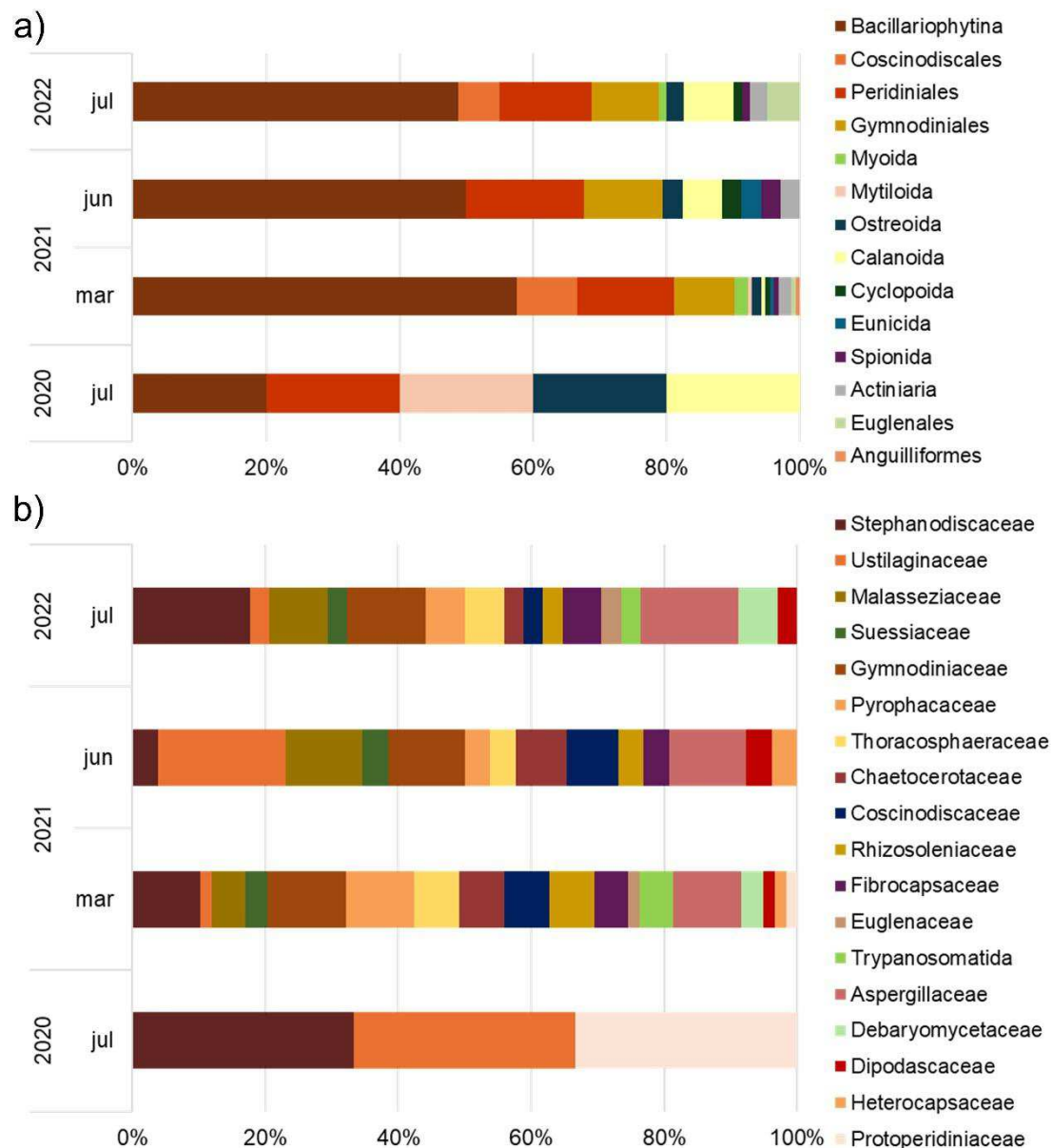


Figura 3 - Gráfico de barras empilhadas representando o número de sequências 18S lidas em relação à abundância relativa (%) de A) ordens e B) famílias por amostras de eDNA no período chuvoso.

Na estação seca, as ordens Coscinodiscales, Peridinales e Gymnodiniales, pertencentes ao subfilo Bacillariophytina, permaneceram como os grupos mais representativos (Figura 4a). Bacillariophytina variou entre 50,00% (setembro/2021) e 67,81% (dezembro/2021), mantendo-se frequente ao longo de todo o período amostrado. Peridinales registrou percentuais entre 8,62% (setembro/2020) e 20,77% (setembro/2021), sendo o segundo grupo mais abundante. Entre as famílias mais representativas destacaram-se Stephanodiscaceae, com 14,29% (setembro/2021), Coscinodiscaceae (11,48%) e Protopteridiniaceae, com 7,14% (setembro/2021) (Figura 4b). Essas famílias ocorreram em todas as amostras da estação seca, comportamento distinto daquele observado na estação chuvosa. A família de dinoflagelados

Gymnodiniaceae alcançou 4,92% das leituras em julho/2020 e ocorreu em todas as amostras, já Protoperidiniaceae não foi registrada em julho/2022, embora tenha alcançado 7,14% em setembro/2021.

Algumas famílias da comunidade fitoplanctônica exibiram maior abundância na estação seca em comparação ao período chuvoso, como Pleurosigmaeae e Thalassiosiraceae, que ocorreram em todas as amostras e atingiram seus maiores percentuais em setembro/2020 (8,20%) e julho/2020 (8,20%), respectivamente.

As ordens Myoidea (0,57% - 1,54%) e Mytiloidea (0,57% - 0,77%) ocorreram em todas as campanhas, com menor representatividade em setembro/2020 e maior em setembro/2021. Nesse mesmo intervalo, Ostreoida exibiu seu menor percentual em setembro/2021 (0,77%) e o maior em dezembro/2022 (1,52%). Calanoida e Cyclopoida apresentaram percentuais inferiores aos observados na estação chuvosa. Calanoida variou de 0,51% (dezembro/2022) a 1,15% (setembro/2020) e não ocorreu em dezembro/2021. Cyclopoida manteve-se presente em todas as amostras, variando de 0,57% (setembro/2020) a 1,37% (dezembro/2021).

As ordens de poliquetas Sabellida e Terebellida foram exclusivas da estação seca, registradas apenas em dezembro/2022, ambas com contribuição de 1,02%. Nesse período, também foi possível identificar a ocorrência da família Orbiniidae. Eunicida variou entre 0,57% (setembro/2020) e 1,02% (dezembro/2022), enquanto Spionida ocorreu em todas as amostras, com percentuais entre 0,57% (setembro/2020) e 1,37% (dezembro/2021). Actiniaria, ordem pertencente ao filo Cnidaria, variou entre 1,02% (dezembro/2022) e 2,31% (setembro/2021), e não ocorreu em dezembro/2021. Para esse grupo, assim como para os demais antozoários registrados, não foi possível avançar para níveis taxonômicos mais específicos.

A ordem Trypanosomatida apresentou maior abundância na estação seca, variando entre 4,92% (setembro/2020) e 24,24% (dezembro/2021). Debaryomycetaceae não ocorreu em dezembro/2022, enquanto Heterocapsaceae e Rhizosoleniaceae estiveram ausentes em dezembro/2021. Aspergillaceae ocorreu ao longo de todo o período, variando entre 3,61% (dezembro/2022) e 11,90% (setembro/2021).

A ordem Anguilliformes, registrada na estação chuvosa apenas em março/2021, ocorreu em todas as amostras do período seco, variando entre 0,51% (dezembro/2022) e 0,77% (setembro/2021). Além disso, o número de sequências recuperadas para a classe Chondrichthyes aumentou, principalmente no ano de 2022.

A comparação entre as estações revela maior recuperação de leituras e, maior riqueza de espécies na estação seca. Nesse período de baixa precipitação pluviométrica, algumas

famílias ausentes na estação chuvosa foram registradas, enquanto grupos inicialmente identificados apenas ao nível de ordem puderam ser definidos até família.

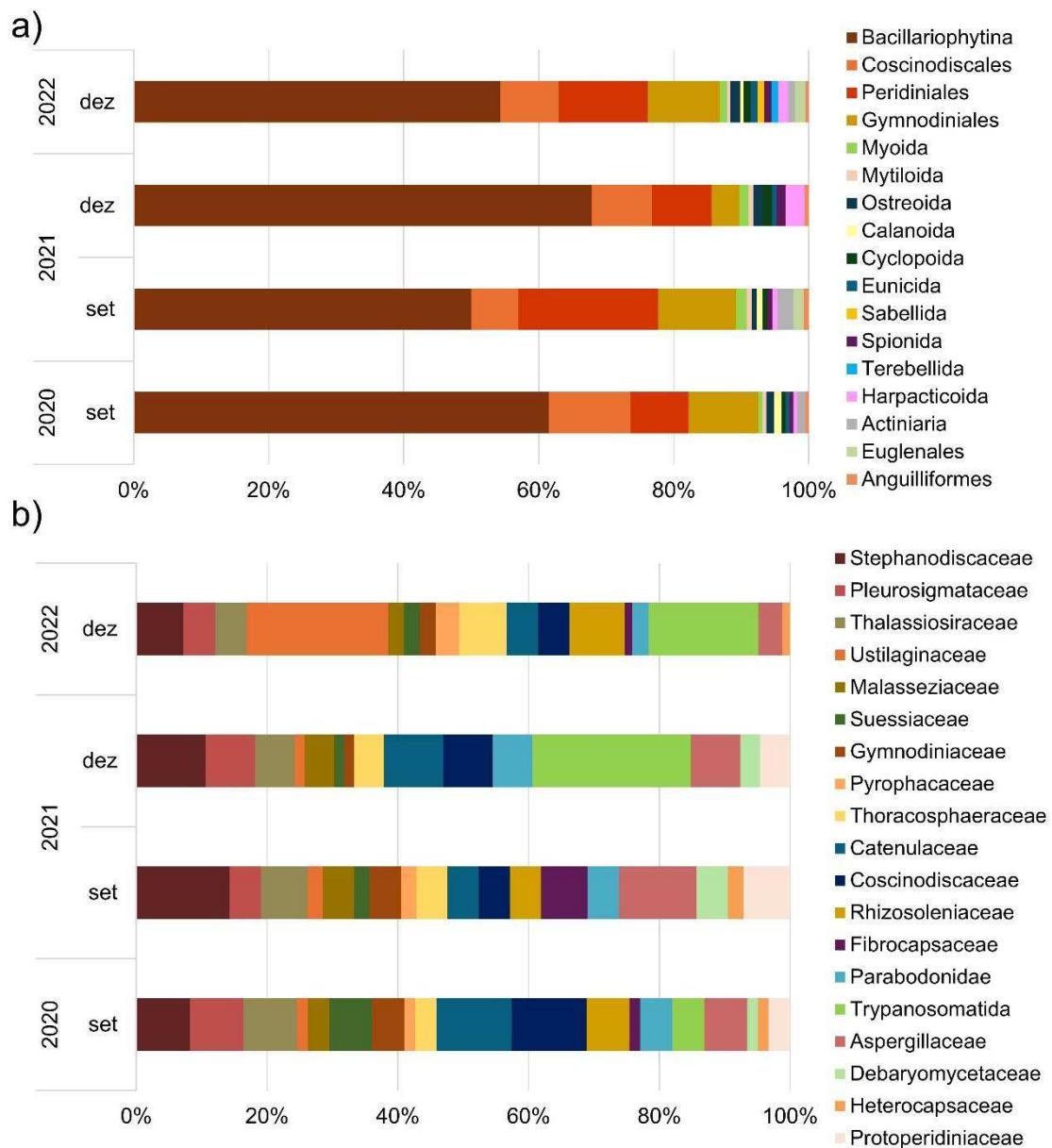


Figura 4 - Gráfico de barras empilhadas representando o número de sequências 18S lidas em relação à abundância relativa (%) de A) ordens e B) famílias por amostras de eDNA no período seco.

A análise do marcador 18S nos sedimentos recuperou sequências pertencentes a apenas 16 filos, totalizando aproximadamente 2.571 sequências (Figura 5). A maior parte das leituras correspondeu ao domínio Bacteria, que representou cerca de 82% do total. Em contraste, as sequências atribuídas a Eukaryota somaram apenas 13%, evidenciando baixa representatividade desse domínio no material sedimentar.

Entre os Eucariotos, várias ordens apareceram em baixa abundância relativa. Thalassiophysales concentrou a maior proporção de sequências (38,89%), seguida por

Thalassiosirales, Ostreoida, Calanoida e Capitellida, cada uma com 8,33%. Ordens como Stephanodiscales e Fragilariales registraram 5,56%, enquanto Cymatosirales, Coscinodiscales, Myoida, Caenogastropoda, Mytiloida e Cyclopoida apresentaram 2,78% cada.

Foram identificadas cerca de 20 famílias, com maior riqueza concentrada entre os organismos fitoplanctônicos. Entre as famílias detectadas destacam-se Bacillariophyceae, Stephanodiscaceae, Thalassiosiraceae, Cymatosiraceae, Coscinodiscaceae, Hemidiscaceae, Protoperidiniaceae, Kryptoperidiniaceae e Procoentraceae. Apesar do reduzido número de sequências depositadas para esses grupos, eles apresentaram maior diversidade taxonômica em comparação aos demais táxons. Os representantes do reino Animalia foram registrados apenas até o nível de ordem.

Esses valores refletem uma composição taxonômica dominada por poucos grupos e indicam que a comunidade eucariótica registrada no sedimento possui baixa diversidade e distribuição desigual entre as ordens identificadas.

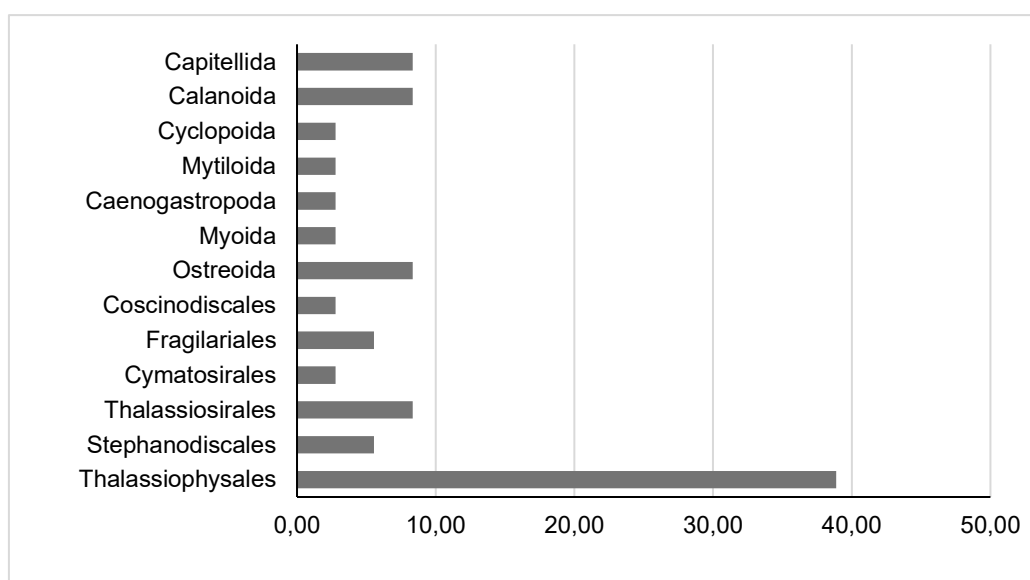


Figura 5 - Gráfico de barras representando o número de sequências 18S lidas em relação à abundância relativa (%) de ordens por amostras de eDNA no sedimento.

Os resultados obtidos para o marcador COI na estação chuvosa mostraram a presença de apenas dois filos (Arthropoda e Cnidaria). Os artrópodes concentraram a maior parte das sequências, variando entre 13 registros em junho/ 2021 e 47 em julho/2020 (Figura 6). As ordens Podocopida, Leptothecata e Actiniaria se destacaram entre os organismos identificados nesse período.

Na estação seca, as amostras recuperaram sequências dos filos Arthropoda e Mollusca, sem qualquer registro de cnidários. Setembro/2020 e dezembro/2022 apresentaram os menores

valores de ocorrência, enquanto dezembro/2021 registrou o maior número de sequências. As ordens detectadas nesse período corresponderam a Podocopida e Basommatophora.

Nas amostras de sedimento, apenas Arthropoda apareceu entre os táxons identificados, totalizando 58 sequências. A ordem Podocopida foi a única registrada.

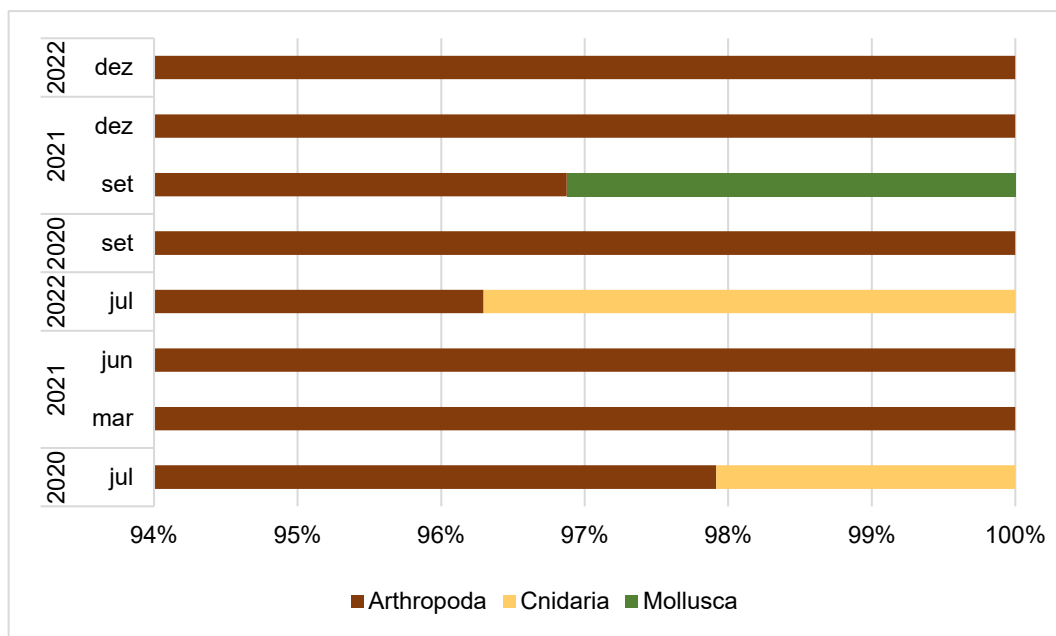


Figura 6 - Representação do número de sequências de COI lidas em relação à abundância relativa (%) de filos em amostras de eDNA na água e sedimentos.

A Tabela 3 reúne parte dos gêneros e espécies de organismos fitoplanctônicos registrados no estudo. Como esse grupo apresentou o maior volume de informações ao longo das análises, optamos por destacar na tabela alguns dos táxons mais representativos pertencentes aos filos Heterokontophyta, Dinoflagellata, Chlorophyta e Euglenozoa. Esses registros ilustram a diversidade taxonômica do fitoplâncton no CESH e reforçam a importância desse grupo na dinâmica ecológica local.

Tabela 3 - Espécies de microalgas identificadas nas amostras de eDNA na água e sedimentos.

Táxons identificados - eDNA		
<i>Achnanthes sp</i>	<i>Psammodictyon panduriformis</i>	<i>Pyrodinium sp</i>
<i>Amphora sp</i>	<i>Stephanocyclus meneghinianus</i>	<i>Aduncodinium sp</i>
<i>Asterionellopsis glacialis</i>	<i>Leptocylindrus danicus</i>	<i>Amphidiniopsis sp</i>
<i>Bacillaria paxillifer</i>	<i>Nitzschia longissima</i>	<i>Archaeperidinium</i>
<i>Cylindrotheca sp</i>	<i>Bacteriastrum hyalinum</i>	<i>Durinskia sp</i>
<i>Gyrosigma sp</i>	<i>Thalassionema nitzschioides</i>	<i>Protoperidinium sp</i>
<i>Haslea sp</i>	<i>Thalassiosira rotula</i>	<i>Roscoffia sp</i>
<i>Pleurosigma sp</i>	<i>Trieres chinensis</i>	<i>Scrippsiella sp</i>
<i>Pseudo-nitzschia sp</i>	<i>Paraphysomonas sp</i>	<i>Stoeckeria sp</i>
<i>Arcocellulus sp</i>	<i>Synura sp</i>	<i>Noctiluca sp</i>

<i>Chaetoceros lorenzianns</i>	<i>Mallomonas sp</i>	<i>Pseudochattonella sp</i>
<i>Cyclotella sp</i>	<i>Oxyphysis sp</i>	<i>Pteridomonas sp</i>
<i>Discostella sp</i>	<i>Sinophysis sp</i>	<i>Pedinella sp</i>
<i>Ditylum brightwellii</i>	<i>Amphidinium sp</i>	<i>Bolidomonas sp</i>
<i>Eucampia sp</i>	<i>Ptychodiscus sp</i>	<i>Fibrocapsa sp</i>
<i>Lithodesmium sp</i>	<i>Gymnoxanthea sp</i>	<i>Haramonas sp</i>
<i>Mediopyxis sp</i>	<i>Gyrodiniellum sp</i>	<i>Heterosigma sp</i>
<i>Minidiscus sp</i>	<i>Nusuttodinium sp</i>	<i>Tetraselmis sp</i>
<i>Minutocellus sp</i>	<i>Paragymnodinium sp</i>	<i>Colemanosphaera sp</i>
<i>Odontella sp</i>	<i>Polykrikos sp</i>	<i>Platydorina sp</i>
<i>Planktoniella sp</i>	<i>Warnowia sp</i>	<i>Desmodesmus sp</i>
<i>Skeletonema costatum</i>	<i>Woloszynskia sp</i>	<i>Mamiella sp</i>
<i>Toxarium sp</i>	<i>Akashiwo sp</i>	<i>Micromonas sp</i>
<i>Triceratium sp</i>	<i>Protodinium sp</i>	<i>Ostreococcus sp</i>
<i>Actinocyclus sp</i>	<i>Pelagodinium sp</i>	<i>Nephroselmis</i>
<i>Actinoptychus sp</i>	<i>Biecheleria sp</i>	<i>Polyblepharides</i>
<i>Coscinodiscus sp</i>	<i>Symbiodinium sp</i>	<i>Prasinoderma sp</i>
<i>Grammonema sp</i>	<i>Alexandrium sp</i>	<i>Pycnococcus sp</i>
<i>Melosira nummuloides</i>	<i>Amphidoma sp</i>	<i>Micractinium sp</i>
<i>Aulacoseira sp</i>	<i>Heterodinium sp</i>	<i>Oocystella sp</i>
<i>Hyalodiscus sp</i>	<i>Lingulodinium sp</i>	<i>Picochlorum sp</i>
<i>Guinardia sp</i>	<i>Neoceratium sp</i>	<i>Euglena viridis</i>
<i>Pseudosolenia sp</i>	<i>Tripos fusus</i>	
<i>Rhizosolenia sp</i>	<i>Prorocentrum micans</i>	

4. Discussão

4.1 Fatores que influenciam na quantidade e qualidade das sequências

O DNA ambiental surge como uma alternativa promissora aos métodos tradicionais de avaliação da biodiversidade baseados em características morfológicas, permitindo a detecção de táxons raros ou críticos e auxiliando no biomonitoramento de múltiplas comunidades (Zhang, 2019; Wang et al., 2023; Pochon et al., 2025). Contudo, estudos realizados em ambientes complexos e altamente dinâmicos ainda são escassos, mesmo se tratando de áreas que sofrem fortes impactos (Suzzi et al., 2023). Este trabalho é o primeiro a empregar a técnica de metabarcoding com dois marcadores para investigar a composição e a diversidade da comunidade eucariótica em um complexo portuário na Costa Amazônica Brasileira.

Os resultados obtidos para o CESM, evidenciaram grande variação na qualidade e no número de leituras entre amostras, marcadores e anos de coleta. Conforme observado, as sequências geradas em 2020 apresentaram os menores valores de sequências (reads) e os piores escores de qualidade, comportamento esperado para amostras submetidas a maior tempo de armazenamento e, mais suscetíveis à degradação do DNA. Já as campanhas de 2021 e 2022 exibiram desempenho superior, sugerindo que a integridade do material genético influencia

diretamente a eficiência das etapas de amplificação e sequenciamento. A degradação do DNA ambiental se inicia logo após sua liberação no meio, e esse processo continua depois da coleta. Fatores como atrito mecânico, atividade de microrganismos produtores de nucleases, reações químicas espontâneas e a exposição à radiação UV aceleram esse desgaste (Thomsen et al., 2012a, b; Allan et al., 2020).

Ambientes altamente dinâmicos, como estuários, aceleram a fragmentação do material genético e reduzem a integridade dos fragmentos recuperados. Estudos destacam que a elevada turbidez dos ambientes estuarinos compromete a eficiência das etapas de captura e detecção de eDNA. A presença intensa de partículas em suspensão e matéria orgânica aumenta a quantidade de inibidores que se ligam ao DNA ou interferem diretamente na PCR, reduzindo a sensibilidade da detecção (Williams et al., 2017; Nagarajan et al., 2022; Holmes et al., 2024). O CESM apresenta turbidez elevada, conforme descrito em trabalhos de Cavalcanti et al. (2018), Queiroz et al. (2022) e Furtado et al. (2025), podendo ultrapassar valores superiores a 300 UNT, principalmente na estação chuvosa, período em que tivemos um menor número de sequências recuperadas.

Durante o processo de coleta, a etapa inicial para a obtenção de amostras de eDNA é fundamental para garantir bons resultados posteriormente. Entre os métodos utilizados para essa captura, a filtração e a precipitação com etanol são os mais comuns (Ficetola et al., 2008; Jerde et al., 2011). Embora ambos sejam eficazes, diversos estudos apontam que a filtração recupera maiores quantidades de eDNA, além de permitir o processamento de volumes maiores de água, o que a torna mais vantajosa em comparação ao método de precipitação, que é limitado pelo volume que pode ser manejado (Turner et al., 2014; Deiner et al., 2015; Eichmiller et al., 2016). Em nosso estudo utilizamos o método de filtração, onde o maior volume de água possível foi passado pelo filtro. Em alguns casos, o entupimento dos poros ocorreu por volta de 750 mL, nesses casos foi realizada a troca do filtro para que a filtração pudesse continuar.

Estudos de Dell'Anno et al. (2015) e Jeunen et al. (2019) mostram que, ao comparar dois kits comerciais, como o DNeasy Blood & Tissue e o DNeasy PowerSoil, o primeiro tende a apresentar maior concentração de DNA. Apesar disso, o DNeasy PowerSoil continua sendo amplamente utilizado, pois possui alta eficiência na remoção de inibidores presentes nas amostras, especialmente em sedimentos, o que resulta em DNA de elevada pureza e adequado para diferentes tipos de análise. Vale ressaltar que a qualidade do DNA extraído pode ser mais importante do que a quantidade, já que a PCR requer apenas uma pequena quantidade de material (Loos e Nijland, 2020)

O uso de pipelines atuais, como o DADA2, ajuda a minimizar erros e outros aspectos gerados durante o sequenciamento, embora aplique filtros bastante restritivos que reduzem o número de variantes mantidas (Callahan et al., 2016). Nesse sentido, os resultados encontrados neste estudo corroboram com a literatura, indicando que a interação entre características do ambiente, escolha do marcador e protocolo laboratorial determina tanto o volume quanto a qualidade das sequências que efetivamente avançam para a interpretação ecológica.

4.2 Aplicação dos marcadores 18S e COI na estimativa da biodiversidade

O marcador 18S apresentou maior amplitude taxonômica e maior número de sequências em comparação ao gene mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI). O 18S apresenta regiões de ligação mais conservadas, o que facilita a amplificação de um conjunto maior de grupos, incluindo microalgas, fungos e metazoários (Clarke et al., 2017; Liu e Zhang, 2021; Zhao et al., 2021). Em nossos resultados, os microrganismos concentraram a maior parte das sequências recuperadas, incluindo registros com identificação detalhada até os níveis de gênero e espécie. Os grupos fitoplânctônicos, como diatomáceas e dinoflagelados, além de fungos e bactérias, apresentaram ampla cobertura e contribuíram de forma expressiva para a caracterização da comunidade.

Abordagens moleculares baseadas no gene nuclear 18S rRNA vêm sendo amplamente utilizadas para descrever a diversidade e a composição de comunidades de eucariotos unicelulares em diferentes níveis taxonômicos, incluindo família, gênero e, em alguns casos, espécie. Estudos recentes demonstram a eficiência desse marcador na resolução de grupos do fitoplâncton, por exemplo (Banerji et al., 2018; Liu et al., 2021; Xu et al., 2023; Chen et al., 2025).

O COI, por sua vez, apresentou uso mais restrito e recuperação de poucos clados, em sua maioria de artrópodes. O COI tem sido frequentemente citado como o marcador mais comum para identificar metazoários. Ele oferece boa resolução para muitas espécies animais, o que explica sua ampla adoção em estudos de diversidade (Hebert et al., 2003; Leray e Knowlton, 2015; Turanov et al., 2024). Apesar disso, suas limitações estão sendo discutidas no contexto do metabarcoding (Deagle et al., 2014). A principal dificuldade se refere ao desenvolvimento de primers realmente universais para esse gene (Geller et al., 2013) já que o COI, por ser codificador, apresenta alta variação a cada e três bases de nucleotídeo reduzindo a presença de regiões de ligação conservadas (Hebert et al., 2003). As consequências incluem perda de táxons durante a amplificação e redução da representatividade da comunidade

amostrada, o que tem motivado críticas à sua adequação como marcador único em metabarcoding (Leray et al., 2013; Deagle et al., 2014).

O gene COI localiza-se na mitocôndria, enquanto o 18S rRNA pertence ao núcleo, essa diferença pode influenciar a quantidade de DNA disponível para detecção (Patin et al., 2025). McCauley et al. (2024) destacam ainda que o DNA nuclear tende a permanecer por mais tempo no ambiente, possivelmente devido à maior resistência estrutural de sua membrana, o que pode favorecer sua recuperação em análises de eDNA.

Uma revisão de literatura realizado por Loos e Nijland (2020), revelou que mais de 50% de estudos realizados utilizam o marcador 18S, enquanto menos de 30% usam COI, justamente porque 18S tem regiões mais conservadas e permite melhor cobertura. Os autores destacam ainda que cerca de 75% dos trabalhos revisados trabalham com apenas um marcador, enquanto 18% utilizados dois e somente 7% aplicaram mais de dois. Portanto, fazer uso de mais de um marcador, rende resultados mais confiáveis do que apenas um. Quando combinamos marcadores evolutivamente independentes, podemos minimizar falsos negativos e obter uma maior cobertura taxonômica (Alberdi et al., 2018; Leite et al., 2021). Assim, em nossos resultados, o 18S se mostrou mais sensível para detectar a diversidade microbiana e microeucariótica, enquanto o COI contribuiu para recuperar grupos específicos de metazoários.

Embora o gene 18S rRNA não ofereça o mesmo nível de resolução específica que o COI, ele se destaca por fornecer informações em níveis taxonômicos mais amplos. Para estudos que não exigem identificação em nível de espécie, o 18S atende bem aos objetivos (Zhao et al., 2021). Como a objetivo deste trabalho foi caracterizar a biodiversidade de forma ampla, o marcador mostrou-se adequado.

4.3 Caracterização da biodiversidade e sazonalidade

A biodiversidade do CESM descrita através da técnica de DNA metabarcoding, permitiu a identificação de aproximadamente 39 filos de eucariotos, 22 filos de bactérias e 5 filos de arqueias. Embora, o número de sequências obtidas tenha sido inferior ao registrado em outros estudos realizados em ambientes aquáticos (Suzzi et al., 2023; Emami-Khoyi et al., 2025). Em nossas análises, tanto as amostras de água quanto as de sedimento mostraram predominância de grupos microbianos e fitoplanctônicos, enquanto os metazoários apareceram em proporções menores. Foi observado maior quantidade de sequências para filos de bactérias, como Proteobacteria e Actinobacteria, e predominância de Dinophyta e Heterokontophyta para o fitoplâncton, padrão semelhante ao descrito por (Zhang et al., 2020). Além disso, foi verificado a presença dos filos Basidiomycota e Ascomycota entre os fungos. Djurhuus et al. (2020),

também registraram uma expressiva quantidade de sequências para microalgas e microrganismos em amostras de água marinha.

Em amostras de sedimentos, Suzzi et al. (2023), registraram sequências para diatomáceas, dinoflagelados e algas. Além de diversas famílias pertencentes aos filos Annelida, Cnidaria, Arthropoda e outros. O DNA associado aos sedimentos tende a permanecer no ambiente por períodos mais longos (Turner et al., 2015) tornando-se, assim, uma fonte útil para detectar espécies mesmo fora de seus períodos de atividade. Cabe destacar que, em nossos resultados a quantidade de sequências recuperadas nos sedimentos, foi consideravelmente inferior as obtidas na água, porém a quantidade das amostras foi menor e isso reflete no valor total obtido.

Em relação aos organismos fitoplanctônicos, mais de 90 gêneros foram identificados, incluindo táxons amplamente reportados para a região, como *Coscinodiscus*, *Actinopterychus*, *Cyclotella*, *Odontella*, *Skeletonema*, *Rhizosolenia* e *Chaetoceros*. Esses gêneros, além de terem sido identificados em nossos resultados por meio das metodologias clássicas de microscopia e taxonomia, também foram registrados em estudos anteriores (Cavalcanti et al., 2018; Queiroz et al., 2022; Furtado et al., 2025). No CESM, esse grupo tem sido amplamente investigado devido à sua grande relevância como sensível indicador das condições ambientais. O fitoplâncton atua como o principal produtor primário dos ambientes aquáticos e exerce forte influência sobre a dinâmica e a disponibilidade de recursos para os demais organismos que a teia trófica (Scholz et al., 2017; Chen et al., 2021).

Sequências de espécies potencialmente nocivas, como *Noctiluca*, *Alexandrium* e *Heterocapsa*, também foram registrados. A espécie *Noctiluca scintillans*, por exemplo, podem liberar fitotoxinas durante eventos de floração, o que leva à mortalidade de peixes e diversos invertebrados marinhos (Kopuz et al., 2014). O gênero *Alexandrium* inclui várias espécies produtoras de toxinas que causam intoxicações por mariscos e impactos pesqueiros (Castrec et al., 2021; Rolton et al., 2022), enquanto *Heterocapsa* pode afetar o desenvolvimento e taxa de sobrevivência de larvas de moluscos (Matsuyama e Oda, 2020; Basti et al., 2021). Além disso, foram obtidas sequências de *Scripsiella*, gênero considerado criptogênico, e até o momento, nunca registrado em estudos realizados na área de estudo.

Nossos resultados mostram que houve recuperação de sequências para filos como Arthropoda, Mollusca, Chordata e Annelida além de outros, embora em alguns casos a identificação não tenha chegado a níveis taxonômicos mais específicos, como gênero ou espécie. A detecção de DNA ambiental em organismos eucariotos como metazoários, costuma ser limitada ao material genético presente em secreções, larvas ou células que já estão em

processo de decomposição. Esse tipo de DNA aparece em concentrações bem menores quando comparado ao eDNA produzido por procariotos e microeucariotos (Turner et al., 2014; Stat et al., 2017).

O uso de diferentes bases de dados de referência pode gerar variações na identificação taxonômica (Zhao et al., 2021). No nosso estudo, optamos pelas bases SILVA e BOLD como referência para as sequências de rRNA 18S e COI, respectivamente. A base SILVA é mais indicada para obtenção de sequências de 18S, oferecendo um nível de detalhamento taxonômico mais refinado do que a base do NCBI (Lindeque et al., 2013). Já o BOLD, foca em códigos de barras COI, reunindo atualmente mais de 4 milhões de sequências associadas a mais de 5 milhões de espécies (Wangenstein et al., 2018).

A técnica de metabarcoding também tem se mostrado capaz de revelar padrões sazonais bem definidos em diferentes grupos biológicos, inclusive daqueles que raramente são detectados por abordagens tradicionais (Banerji et al., 2018). No CESM, observamos que a composição da biodiversidade varia entre as estações e entre os anos, refletindo a dinâmica ambiental típica de ecossistemas estuarinos. Algumas sequências apresentaram distribuição mais concentrada em determinado período e para grupos específicos, indicando que certos táxons respondem de forma mais sensível às mudanças hidrológicas, como variações de salinidade e regimes de chuva.

O presente estudo é o primeiro a utilizar DNA ambiental (eDNA) para identificar diferentes grupos taxonômicos no CESM. Nossos resultados sugerem que o número de sequências obtidas através de rDNA 18S fornece respostas mais eficientes sobre a caracterização da biodiversidade do que marcadores mitocondriais, porém isso deve ser confirmado e investigado aliando adicionando outros marcadores.

5. Conclusões

O uso da técnica de DNA metabarcoding no Complexo Estuarino de São Marcos demonstrou que a técnica é aplicável e sensível para revelar a biodiversidade local, mesmo em um ambiente marcado pela alta turbidez, dinâmica hidrológica intensa e elevada carga de material particulado, fatores que podem comprometer a qualidade e integridade do eDNA analisado. Apesar das limitações associadas à degradação do DNA, ao tempo de armazenamento das amostras e às diferenças entre os marcadores utilizados, os dados obtidos permitiram caracterizar a diversidade de diversos grupos. O marcador 18S recuperou a maior parte das sequências e forneceu uma visão abrangente da comunidade, especialmente voltado para grupos de microrganismos e organismos fitoplanctônicos. Já o COI, embora menos

abrangente, contribuiu para registrar grupos específicos de metazoários e complementar a caracterização da comunidade. Esses resultados mostram que a combinação entre diferentes marcadores aumenta a cobertura taxonômica. A metodologia aplicada às amostras de água e sedimento conseguiu identificar variações sazonais e diferenças entre os anos analisados. Esses resultados reforçam a sensibilidade do eDNA para detectar alterações ambientais e biológicas ao longo do tempo, evidenciando seu potencial como ferramenta de monitoramento em ecossistemas altamente dinâmicos. Mesmo diante dos desafios relacionados ao ambiente marinho e estuarino, o estudo mostra que a técnica é viável, eficiente e promissora para a região, oferecendo uma perspectiva inovadora para o monitoramento da biodiversidade e ampliando o potencial de detecção de organismos que dificilmente seriam registrados por métodos tradicionais.

Declaração Ética

Nossa investigação não envolveu experimentos com animais vivos e todas as amostras eram de água e sedimento.

Declaração de Conflito de Interesses

Os autores declaram não haver conflitos de interesse financeiros ou pessoais que possam ter influenciado o trabalho relatado neste artigo.

Guia para autores e normas da revista

<https://www.sciencedirect.com/journal/global-ecology-and-conservation/publish/guide-for-authors>

Agradecimentos

Agradecemos ao Laboratório de Biodiversidade Molecular (LaBimol) pelo suporte, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Maranhão (FAPEMA) e ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia (BIONORTE) pelo apoio financeiro, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio acadêmico.

Referências

- Alberdi, A., Aizpurua, O., Gilbert, M. T. P., Bohmann, K., 2018. Scrutinizing key steps for reliable metabarcoding of environmental samples. *Methods ecol. evol.* 9, 1, 134–147. <https://doi.org/10.1111/2041-210x.12849>.

- Allan, E. A., Zhang, W. G., Lavery, A. C., Govindarajan, A. F., 2020. Environmental DNA shedding and decay rates from diverse animal forms and thermal regimes. *Environmental DNA*, 3, 2, 492–514. <https://doi.org/10.1002/edn3.141>.
- Amaral, R.F., Alfredini, P., 2010. Modelação hidrossedimentológica no Canal de Acesso do Complexo Portuário do Maranhão. *Revista Brasileira de Recursos Hídricos*, v. 15, p. 5-14.
- Amaral-Zettler, L., McCliment, E. A., Ducklow, H. W., Huse, S. M. 2009. A Method for Studying Protistan Diversity Using Massively Parallel Sequencing of V9 Hypervariable Regions of Small-Subunit Ribosomal RNA Genes. *PLoS ONE*, 4, 7, e6372–e6372. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006372>.
- Andrews, S., 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data.
- ANTAQ - Agência Nacional de Transportes Aquaviários, 2025. Sistema de Estatísticas Aquaviárias (ANTAQ). Acesso em: 24.09.2025. <https://web3.antaq.gov.br/ea/sense/>
- Arevalo, E., Cabral, H. N., Villeneuve, B., Possémé, C., Lepage, M., 2023. Fish larvae dynamics in temperate estuaries: A review on processes, patterns and factors that determine recruitment. *Fish Fish.* 24, 3, 466–487. <https://doi.org/10.1111/faf.12740>.
- Banerji, A., Bagley, M. J., Elk, M., Pilgrim, E. M., Martinson, J., Domingo, J. S., 2018. Spatial and temporal dynamics of a freshwater eukaryotic plankton community revealed via 18S rRNA gene metabarcoding. *Hydrobiol.* 818, 1, 71–86. <https://doi.org/10.1007/s10750-018-3593-0>.
- Basti L., Go J., Okano S., Higuchi K., Nagai S., Nagai K. Sublethal and antioxidant effects of six ichthyotoxic algae on early-life stages of the Japanese pearl oyster. *Harmful Algae*, 103, 102013. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2021.102013>.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M., Han, A., Johnson, A. J. A., Holmes, S., 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods*. 13, 7, 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>.
- Carvalho-Neta, R.N.F., Torres, A.R., Abreu-Silva, A.L., 2012. Biomarkers in catfish *Sciades herzbergii* (Teleostei: Ariidae) from polluted and non-polluted areas (São Marcos' Bay, Northeastern Brazil). *Appl. Biochem. Biotechnol.* 166, 1314–1327. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9519-1>.
- Castrec, J., Fabioux, C., Goïc, N. L., Boulais, M., Soudant, P., Hégaret, H., 2021. The toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* affects oyster gamete health and fertilization potential. *Mar. Environ. Res.* 169, 105401. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2021.105401>.
- Cavalcanti, L. F., Azevedo-Cutrim, A. C. G. d., Oliveira, A. L. L., Furtado, J. A., Araújo, B. d. O., Sá, A. K. D. d. S., Ferreira, F. S., Santos, N. G. R., Dias, F. J. S., Cutrim, M. V. J., 2018. Structure of microphytoplankton community and environmental variables in a macrotidal estuarine complex, São Marcos Bay, Maranhão - Brazil. *Braz. J. Oceanogr.* 66, 3, 283–300. <https://doi.org/10.1590/s1679-87592018021906603>.
- CDB (Convention on Biological Diversity). 2022. Brazil – main details. Biodiversity Facts. Status and trends of biodiversity, including benefits from biodiversity and ecosystem services. Available at: <https://www.cbd.int/countries/?country=br>. Acesso em: 21. out. 2025.

- Chapman, P. M., Wang, F., 2001. Assessing sediment contamination in estuaries. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 1, 3–22. <https://doi.org/10.1002/etc.5620200102>
- Chen, Q., Jiang, X., Han, Q., Sheng, P., Chai, Y., Peng, R., et al., 2021. Growth, calcium content, proximate composition, and fatty acid composition of triangle sail mussel (*Hyriopsis cumingii*) fed five different microalgal diets. *Aquac.* 530, 735719. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735719>.
- Chen, X., Jia, H., Zhang, H. 2025. Does the Zhenbei seamount in the South China Sea harbor distinctive biodiversity? A primary study based on eDNA metabarcoding. *Glob. Ecol. Conserv.* 59, e03590. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2025.e03590>.
- Clark, G. F., Kelaher, B. P., Dafforn, K. A., Coleman, M. A., Knott, N. A., et al., 2015. What does impacted look like? High diversity and abundance of epibiota in modified estuaries. *Environ. Pollut.* 196, 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.09.017>.
- Clarke, L. J., Beard, J. M., Swadling, K. M., Deagle, B. E., 2017. Effect of marker choice and thermal cycling protocol on zooplankton DNA metabarcoding studies. *Ecol. Evol.* 7, 3, 873–883. <https://doi.org/10.1002/ece3.2667>.
- Cloern, J. E., Abreu, P. C., Carstensen, J., Chauvaud, L., Elmgren, R., Grall, J., et al., 2016. Human activities and climate variability drive fast-paced change across the world's estuarine–coastal ecosystems. *Glob Chang Biol.* 22, 2, 513–529. <https://doi.org/10.1111/gcb.13059>.
- Cutrim, M. V. J., Santos-Sá, A. K. D. D., Cruz, Q. S. d., Azevedo-Cutrim, A. C. G. d., Santos, R. L., Dias, F. J. d. S., et al., 2025. Machine Learning Assessment of Dredging Impacts on the Phytoplankton Community on the Brazilian Equatorial Margin: A Multivariate Analysis. *Environ. Pollut.* 125680. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2025.125680>.
- Deagle, B. E., Jarman, S., Coissac, É., Pompanon, F., Taberlet, P., 2014. DNA metabarcoding and the cytochrome *c* oxidase subunit I marker: not a perfect match. *Biol. Lett.* 10, 9, 20140562. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2014.0562>.
- Dell'Anno, A., Carugati, L., Corinaldesi, C., Riccioni, G., Danovaro, R., 2015. Unveiling the Biodiversity of Deep-Sea Nematodes through Metabarcoding: Are We Ready to Bypass the Classical Taxonomy? *PLoS ONE*, 10, 12, e0144928–e0144928. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144928>.
- Deiner, K., Walser, J.-C., Mächler, E., Altermatt, F., 2015. Choice of capture and extraction methods affect detection of freshwater biodiversity from environmental DNA. *Biological Conservation*, 183, 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.018>.
- Eichmiller, J. J., Miller, L. M., Sorensen, P. W., 2016. Optimizing techniques to capture and extract environmental DNA for detection and quantification of fish. *Mol. Ecol. Resour.* 16, 1, 56–68. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12421>.
- Emami-Khoyi, A., Schnelle, C. M., Clark, D. R., Laakmann, S., Teske, P. R., & Rishworth, G. M., 2025. Eukaryote biodiversity in supratidal microbialite pools: a foundational environmental DNA assessment. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 109284. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2025.109284>.
- Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S., Käller, M., 2016. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics.* 32, 3047–3048. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354>.

- Ficetola, F. G.; Miaud, C.; Pompanon, F.; Taberlet, P., 2008. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biol. Lett.* v. 4, n. 4, p. 423-425. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2008.0118>.
- Furtado, J. A., Cavalcanti, L. F., Santos, V. H. M. d., Serejo, J. H. F., Pereira, L. C. C., Neta, R. N. F. C., Tchaicka, L., 2025. Multimetric trophic status and harmful algal species in a harbor area of the Amazon Macrotidal Mangrove Coast. *Ecohydrol. Hydrobiol.* 25, 618-631. <https://doi.org/10.1016/j.ecohyd.2024.10.002>.
- Geller, J., Meyer, C., Parker, M., Hawk, H., 2013. Redesign of PCR primers for mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I for marine invertebrates and application in all-taxa biotic surveys. *Mol. Ecol. Resour.* 13, 5, 851–861. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12138>.
- Georgian, S. E., Hameed, S. O., Morgan, L., Amon, D. J., Sumaila, U. R., Johns, D., Ripple, W. J., 2022. Scientists’ warning of an imperiled ocean. *Biol. Conserv.* 272, 109595. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2022.109595>.
- Hansen, B.K., Bekkevold, D., Clausen, L.W., Nielsen, E.E., 2018. The sceptical optimist: challenges and perspectives for the application of environmental dna in marine fisheries. *Fish Fish* 19, 751–768. <https://doi.org/10.1111/faf.12286>.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., deWaard, J. R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. Biol. Sci.* 270, 1512, 313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>.
- Hoegh-Guldberg, O., Jacob, D., Taylor, M., Bolanos, T.G., Bindi, M., Brown, S., et al., 2019. The human imperative of stabilizing global climate change at 1.5° c. *Science* 365, eaaw6974. <https://doi.org/10.1126/science.aaw6974>.
- Holmes, A. E., Baerwald, M. R., Rodzen, J., Schreier, B. M., Mahardja, B., Finger, A. J., 2024. Evaluating environmental DNA detection of a rare fish in turbid water using field and experimental approaches. *PeerJ*, 11, e16453–e16453. <https://doi.org/10.7717/peerj.16453>.
- Jerde, C. L., Mahon, A. R., Chadderton, W. L., Lodge, D. M., 2011. “Sight-unseen” detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conserv. Lett.* v. 4, n. 2, p. 150–157. <https://doi.org/10.1111/j.1755-263x.2010.00158.x>.
- Jeunen, G.-J., Knapp, M., Spencer, H. G., Taylor, H. R., Lamare, M. D., Stat, M., Bunce, M., Gemmell, N. J., 2019. Species-level biodiversity assessment using marine environmental DNA metabarcoding requires protocol optimization and standardization. *Ecol. Evol.* 9, 3, 1323–1335. <https://doi.org/10.1002/ece3.4843>.
- Jesus, W.B., Soares, S.H., Pinheiro-Sousa, D.B., Andrade, T.S.O.M., Oliveira, S.R.S., Santos, F.S., et al., 2020. Biomarcadores enzimáticos e histológicos em brânquias de *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Brachyura, Ucididae) indicativos de impactos ambientais em uma região portuária do nordeste do Brasil. *Arq. Bras. Med. Veterinária e Zootec.* 72, 1413–1423. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-11666>.
- Kim, G., Kang, Y., Song, Y., 2025. Multi-Primer-Based Environmental DNA Survey for Vertebrate Biodiversity Monitoring in Protected Island Wetlands. *Biol. Conserv.* e03474–e03474. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2025.e03474>.
- Kjerfve, B., Perillo, G.M., Gardner, L.R., Rine, J.M, Dias, G.T.M., Mochel FR., 2002. Morphodynamics of muddy environments along the Atlantic coasts of North and

- South America. In: *Muddy Coasts of the World: Processes, Deposits and Functions*. 1st ed., Amsterdam, Elsevier Science, p. 479–532.
- Kopuz U, Feyzioglu AM, Valente A., 2014. An unusual red-tide event of *Noctiluca scintillans* (Macartney) in the Southeastern Black Sea. *Turk. J. Fish. Aquat. Sc.* 14, 261–8.
- Leadley, P., Gonzalez, A., Obura, D., Krug, C. B., Londoño, M. C., Millette, K. L., et al., 2022. Achieving global biodiversity goals by 2050 requires urgent and integrated actions. *One Earth*, 5, 6, 597–603. <https://doi.org/10.1016/j.oneear.2022.05.009>.
- Lécuyer, R., Brind'Amour, A., Barillé, A.-L., Chouquet, B., Bris, H. L., 2024. Thriving life beneath: Biodiversity and functioning of macrobenthic communities within two human-shaped European estuaries. *J. Sea Res.* 202, 102545. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2024.102545>.
- Leite, B. R., Vieira, P. E., Troncoso, J. S., Costa, F. O., 2021. Comparing species detection success between molecular markers in DNA metabarcoding of coastal macroinvertebrates. *MBMG*, 5. <https://doi.org/10.3897/mbmg.5.70063>.
- Leray, M., Knowlton, N., 2015. DNA barcoding and metabarcoding of standardized samples reveal patterns of marine benthic diversity. *PNAS*, 112, 7, 2076–2081. <https://doi.org/10.1073/pnas.1424997112>.
- Leray, M., Knowlton, N., 2016. Censusing marine eukaryotic diversity in the twenty-first century. *Philos. Trans. R. Soc. B, Biol. Sci.* 371, 1702, 20150331. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0331>.
- Leray, M., Yang, J., Meyer, C., Mills, S. C., Agudelo, N., Ranwez, V., et al., 2013. A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity: application for characterizing coral reef fish gut contents. *Front. Zool.* 10, 1, 34. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-10-34>.
- Lima, H.P., Dias, F.J.S., Teixeira, C.E.P., Godoi, V.A., Torres, A.R., Araújo, R.S., 2021. Implications of turbulence in a macrotidal estuary in northeastern Brazil — The São Marcos Estuarine Complex. *Reg. Stud. Mar. Sci.* 47, 101947. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2021.101947>.
- Lindeque, P. K., Parry, H., Harmer, R. A., Somerfield, P. J., Atkinson, A., 2013. Next Generation Sequencing Reveals the Hidden Diversity of Zooplankton Assemblages. *PLoS ONE*, 8, 11, e81327–e81327. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081327>.
- Liu, J., Zhang, H., 2021. Combining Multiple Markers in Environmental DNA Metabarcoding to Assess Deep-Sea Benthic Biodiversity. *Front. Mar. Sci.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.684955>.
- Liu, Q., Zhao, Q., McMinn, A., Yang, E. J., Jiang, Y., 2021. Planktonic microbial eukaryotes in polar surface waters: recent advances in high-throughput sequencing. *Mar. Life Sci. Tech.* 3, 1, 94–102. <https://doi.org/10.1007/s42995-020-00062-y>.
- Lockwood, M., Worboys, G., K, A., 2015. *Managing Protected Areas*. ANU Press, pp. 207–250. <http://www.jstor.org/stable/j.ctt1657v5d.15>
- Loos, L. M. V. D., Nijland, R., 2020. Biases in bulk: DNA metabarcoding of marine communities and the methodology involved. *Mol. Ecol.* 30, 13, 3270–3288. <https://doi.org/10.1111/mec.15592>.

- Martin, M. 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet. j.* 17, 1, 10. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>.
- Matsuyama Y., Oda T., 2020. Toxic effects of harmful algal blooms on finfish and shellfish. In: Konur O., Editor. *Handbook of Algal Science, Technology and Medicine (Part IX: Algal Toxicology, Chapter 34th)* Academic Press; London, UK: pp. 543–560.
- McCauley, M., Koda, S.A., Loesgen, S., Duffy, D.J., 2024. Multicellular species environmental DNA (eDNA) research constrained by overfocus on mitochondrial DNA. *STOTEN.* 912, 169550. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.169550>.
- Mittermeier, R., Mittermeier, C.G., Gil, P.R., Da Fonseca, G.A.B., Brooks, T., et al., 2005. Megadiversity: Earth's biologically wealthiest nations. Mexico, CEMEX, 501p.
- Mora, C., Tittensor, D. P., Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Worm, B., 2011. How Many Species Are There on Earth and in the Ocean? *PLoS Biol.* 9, 8, e1001127–e1001127. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001127>.
- Morien, E., Parfrey, L. W., 2018. SILVA v128 and v132 dada2 formatted 18s “train sets.” Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.1447330>.
- Nagarajan, R. P., Bedwell, M., Holmes, A. E., Sanches, T. M., Acuña, S., Baerwald, M. R., et al., 2022. Environmental DNA Methods for Ecological Monitoring and Biodiversity Assessment in Estuaries. *ESCO.* 45, 7, 2254–2273. <https://doi.org/10.1007/s12237-022-01080-y>.
- Oliveira, S.R.S., Batista, W.D.S., Sousa, J.B.M., Noletto, K.S., Arouche Lima, I.M., Andrade, T.S.O.M., et al., 2019. Enzymatic and Histological Biomarkers in *Ucides cordatus* (Crustacea, Decapoda) in an Industrial Port on the North Coast of Brazil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 102, 802–810. <https://doi.org/10.1007/s00128-019-02594-1>.
- Patin, N., Pitz, K. J., Baker, J., Chávez, F. P., Goodwin, K. D., 2025. Markers or metagenomes: sequencing marine eukaryotic DNA for better biodiversity surveys. *MBMG*, 9. <https://doi.org/10.3897/mbmg.9.144935>.
- Pinheiro-Sousa, D.B., Da Costa Soares, S.H., Torres, H.S., De Jesus, W.B., De Oliveira, S.R.S., Bastos, et al., 2021. Sediment contaminant levels and multibiomarker approach to assess the health of catfish *Sciades herzbergii* in a harbor from the northern Brazilian Amazon. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 208, 111540. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111540>.
- Pochon, X., Bowers, H. A., Zaiko, A., Wood, S. A., 2025. Advancing the environmental DNA and RNA toolkit for aquatic ecosystem monitoring and management. *PeerJ*, 13, e19119–e19119. <https://doi.org/10.7717/peerj.19119>.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., et al., 2012. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41, D1, D590–D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>.
- Queiroz, J.B.M., Oliveira, A.R.G.D., Costa, K.G.D., Brito, E.P., Fernandes, F.D.D.S., Nunes, Z.M.P., Koenig, M.L., Pereira, L.C.C., Da Costa, R.M., 2022. Phytoplankton of the shipping sector of São Marcos Bay (Amazon Coast): A potential risk area for the establishment of non-indigenous species. *Reg. Stud. Mar. Sci.* 49, 102121. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2021.102121>.

- Rodrigues, C. A. L., Ribeiro, R. P., Santos, N. B., Almeida, Z. d. S. d., 2016. Patterns of mollusc distribution in mangroves from the São Marcos Bay, coast of Maranhão State, Brazil. *Acta Amaz.* 46, 4, 391–400. <https://doi.org/10.1590/1809-4392201600493>.
- Rolton, A., Rhodes, L., Hutson, K. S., Biessy, L., Bui, T., MacKenzie, L., Symonds, J. E., Smith, K. F., 2022. Effects of Harmful Algal Blooms on Fish and Shellfish Species: A Case Study of New Zealand in a Changing Environment. *Toxins*, 14, 5, 341. <https://doi.org/10.3390/toxins14050341>.
- Samaritano, L., Chagas, F.M., Bernardino, J.C.M., Siegle, E., Tessler, M.G., Uemura, S., 2013. Hydrodynamic modeling over a sand wave field at São Marcos Bay, Brazil. *Proceedings of the 4th International Conference on Marine and River Dune Dynamics (MARID IV)* 4, 241–247.
- Scholz, S. N., Esterhuizen-Londt, M., Pflugmacher, S., 2017. Rise of toxic cyanobacterial blooms in temperate freshwater lakes: causes, correlations and possible countermeasures. *Tox. Environ. Chem.* 99, 4, 543–577. <https://doi.org/10.1080/02772248.2016.1269332>.
- Shen, M., Xiao, N., Zhao, Z., Guo, N., Luo, Z., Sun, G., Li, J., 2022. eDNA metabarcoding as a promising conservation tool to monitor fish diversity in Beijing water systems compared with ground cages. *Sci. Rep.* 12, 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-15488-w>.
- Souza Filho, P.W.M., 2005. Costa de manguezais de macromaré da Amazônia: cenários morfológicos, mapeamento e quantificação de áreas usando dados de sensores remotos. *Rev. Bras. Geof.* 23, 4, 427–435. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-261X2005000400006>.
- Stat, M., Huggett, M. J., Bernasconi, R., DiBattista, J. D., Berry, T. E., Newman, S. J., et al., 2017. Ecosystem biomonitoring with eDNA: metabarcoding across the tree of life in a tropical marine environment. *Sci. Rep.* 7, 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12501-5>.
- Suzzi, A. L., Huggett, M. J., Gaston, T. F., MacFarlane, G. R., Alam, M. R., Gibb, J., Stat, M., 2023. eDNA metabarcoding reveals shifts in sediment eukaryote communities in a metal contaminated estuary. *Mar. Pollut. Bull.* 191, 114896. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.114896>.
- Taberlet, P., Coissac, É., Pompanon, F., Brochmann, C., Willerslev, E., 2012. Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Mol. Ecol.* 21, 8, 2045–2050. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2012.05470.x>
- Thomsen, P. F., Kielgast, J., Iversen, L., Møller, P. R., Rasmussen, M., Willerslev, E., 2012a. Detection of a Diverse Marine Fish Fauna Using Environmental DNA from Seawater Samples. *PLoS ONE*, 7, 8, e41732–e41732. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041732>.
- Thomsen, P. F., Kielgast, J., Iversen, L., Wiuf, C., Rasmussen, M., Gilbert, M. T. P., et al., 2011b. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Mol. Ecol.* 21, 11, 2565–2573. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2011.05418.x>.
- Turanov, S. V., Koltsova, M., Rutenko, O. A., 2024. Experimental evaluation of genetic variability based on DNA metabarcoding from the aquatic environment: Insights from the Leray *COI* fragment. *Ecol. Evol.* 14, 7. <https://doi.org/10.1002/ece3.11631>.

- Turner, C. R., Uy, K. L., Everhart, R. C., 2015. Fish environmental DNA is more concentrated in aquatic sediments than surface water. *Biol. Conserv.* 183, 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.017>.
- Turner, C. R., Barnes, M. A., Xu, C. C. Y., Jones, S., Jerde, C. L., Lodge, D. M., 2014. Particle size distribution and optimal capture of aqueous microbial eDNA. *Methods Ecol. Evol.* 5, 7, 676–684. <https://doi.org/10.1111/2041-210x.12206>.
- Vamos, E., Elbrecht, V., Leese, F. 2017. Short COI markers for freshwater macroinvertebrate metabarcoding. *Metabarcoding and Metagenomics*, 1, e14625. <https://doi.org/10.3897/mbmg.1.14625>.
- Wang, L., Wan, F., Qian, W., 2023. Research and prospects of environmental DNA (eDNA) for detection of invasive aquatic species in East Asia. *Front. Mar. Sci.* 10. <https://doi.org/10.3389/fmars.2023.1284953>.
- Wangensteen, O. S., Palacín, C., Guardiola, M., Turón, X., 2018. DNA metabarcoding of littoral hard-bottom communities: high diversity and database gaps revealed by two molecular markers. *PeerJ*. 6, e4705–e4705. <https://doi.org/10.7717/peerj.4705>.
- Williams, K. E., Huyvaert, K. P., Piaggio, A. J. 2017. Clearing muddied waters: Capture of environmental DNA from turbid waters. *PLoS ONE*, 12, 7, e0179282–e0179282. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179282>.
- Xu, S., Li, G., Cui, H., Huang, Y., Yu, D., Deng, H., et al., 2023. Diversity, community structure, and quantity of eukaryotic phytoplankton revealed using 18S rRNA and plastid 16S rRNA genes and pigment markers: a case study of the Pearl River Estuary. *Mar. Life Sci. Tech.* 5, 3, 415–430. <https://doi.org/10.1007/s42995-023-00186-x>.
- Yao, M., Zhang, S., Lu, Q., Chen, X., Zhang, S.-Y., Kong, Y., Zhao, J., 2022. Fishing for fish environmental DNA: Ecological applications, methodological considerations, surveying designs, and ways forward. *Mol. Ecol.* 31, 20, 5132–5164. <https://doi.org/10.1111/mec.16659>.
- Yilmaz, P., L. W. Parfrey, P. Yarza, J. Gerken, E. Pruesse, C. Quast, T. et al., 2014. The SILVA and “All-species Living Tree Project (LTP)” taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Research* 42: D643–D648. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1209>.
- Zhang, J., Li, F., Lv, Q., Wang, Y., Yu, J., Gao, Y., Ren, Z., Zhang, X., Lv, Z., 2021. Impact of the Water–Sediment Regulation Scheme on the phytoplankton community in the Yellow River estuary. *J. Clean. Prod.* 294, 126291. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.126291>.
- Zhang, X., 2019. Environmental DNA Shaping a New Era of Ecotoxicological Research. *Environ. Sci. Technol.* 53, 10, 5605–5612. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b06631>.
- Zhang, Y., Pavlovska, M., Stoica, E., Prekrasna, I., Yang, J., Slobodník, J., et al., 2020. Holistic pelagic biodiversity monitoring of the Black Sea via eDNA metabarcoding approach: From bacteria to marine mammals. *Environ. Int.* 135, 105307. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105307>.
- Zhao, L., Zhang, X., Xu, M., Mao, Y., Huang, Y., 2021. DNA metabarcoding of zooplankton communities: species diversity and seasonal variation revealed by 18S rRNA and COI. *PeerJ*, 9, e11057–e11057. <https://doi.org/10.7717/peerj.11057>.

**Multimetric trophic status and harmful algal species in a harbor area of the Amazon
Macrotidal Mangrove Coast**

Revista Ecohydrology & Hydrobiology (Qualis A4)

Status: Publicado

Multimetric trophic status and harmful algal species in a macrotidal estuarine complex under the impact of an industrial and harbor area (Brazilian Amazon Coast)

Jordana Adorno Furtado^{a,f}; Lisana Furtado Cavalcanti^{b*}; Vinicius Henrique Maciel dos Santos^{c,d}; Jefferson Horley Feitosa Serejo^d; Luci Cajueiro Carneiro Pereira^e; Raimunda Nonata Fortes Carvalho Neta^{a,f}; Ligia Tchaicka^{a,f}

^a Postgraduate Program in Biodiversity and Biotechnology of the Legal Amazon (REDE BIONORTE), State University of Maranhão (UEMA), 65055-310 São Luís, Maranhão, Brazil

^b Postgraduate Program in Oceanography (PPGO), Federal University of Pernambuco (UFPE), 50670-901 Recife, Pernambuco, Brazil

^c Postgraduate Program in Geology and Geochemistry (PPGG), Institute of Geosciences, Federal University of Pará (UFPA), 66075-110 Belém, Pará, Brazil

^d LHiCEAI Laboratory, Federal University of Maranhão (UFMA), Cidade Universitária Dom Delgado, 65080-805 São Luís, Maranhão, Brazil

^e Institute of Coastal Studies (IECOS), Federal University of Pará (UFPA), 686000-000 Bragança, Pará, Brazil

^f Postgraduate Program in Ecology and Biodiversity Conservation, State University of Maranhão (UEMA), Campus Paulo VI, 65055-970 São Luís, Maranhão, Brazil

*Corresponding Author: Lisana Cavalcanti

E-mail address: (lisana.cavalcanti@gmail.com)

Abstract

Inserted in a region known as the Amazon Macrotidal Mangrove Coast (AMMC), the São Marcos Estuarine Complex (SMEC) has presented a scenario of continuous contamination caused mainly by the discharge of domestic, agricultural, and port sewage. Therefore, this study aims to be the first to determine the trophic state of SMEC, assess the ecological status of the phytoplankton community, and apply additive models to investigate the main environmental parameters that drive phytoplankton. Collections were carried out during the dry season (September and December/2018) and the rainy season (March and June/2019). Seasonal influence on environmental and biological factors was observed, especially those used to classify water quality. Based on the Multimetric Trophic Index (TRIX), SMEC was classified as eutrophic, and the general nutritional status of phytoplankton revealed that the system was predominantly nitrogen-limited. The phytoplankton community was dominated by diatoms, with emphasis on the presence of potentially harmful species such as *Pseudo-nitzschia pungens*, *Coscinodiscus centralis*, *Thalassiosira subtilis* and *Skeletonema costatum*, which can cause ecological and economic losses in the environment. Such species contributed to the low diversity and moderate richness. Hydrological variables such as temperature, salinity, and turbidity, in addition to nutrients, especially nitrate and phosphate, were the main parameters

controlling phytoplankton structure and abundance, revealing an indicator community well adapted to local conditions. Overall, the integrated study of trophic and ecological indices in the SMEC appeared to be sensitive to changes in water quality, being an efficient tool to indicate the current scenario of this environment.

Keywords: Eutrophication; Trophic index; Phytoplankton; Ecology; São Marcos estuarine complex

1 Introduction

Estuaries are highly dynamic environments acting as interface zones between the continents and oceans (Kumar et al., 2020; Sweet et al., 2022). These ecosystems are highly productive and function as biological filters, breeding areas, nurseries, and development of several species. Additionally, tropical estuaries are among the most valuable environments on the planet due to quantity and quality of ecosystem services which they provide (e.g., food production, services of regulation and maintenance) (Cavalcanti et al., 2020; Zapata et al., 2018). As a result, they present socio-economic importance for harbor activities, fishing and recreational activities (Franzen et al., 2023; Rodrigues et al., 2020).

Despite the above, they are subject to natural processes such as changes in climatic conditions, besides the ones caused by human beings such as the disposal of wastewater that can cause variations in physicochemical parameters, changes in nutrient balance, and the structure of biological communities (Rodrigues et al., 2020; Statham, 2012). Pollution caused by high levels of nutrients such as N and P has become one of the most common problems in aquatic environments. Excess nutrients cause the rapid growth of macrophytes and harmful algal species that can lead to environmental problems such as dissolved oxygen depletion, loss of biodiversity, increase in particulate and dissolved organic matter, and release of CO₂ (Berthold et al., 2018; Cereja et al., 2022; Morelli et al., 2018).

Multimeric trophic indices and models serve as valuable tools for assessing the trophic status of an ecosystem and identifying potential deterioration. Their application has been recommended by the Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection (GESAMP) (Moncheva et al., 2001). Thus, these metrics are considered important tools for assessing the degree of human influence in estuarine and coastal environments (Rodrigues et al., 2020; Torres Franco et al., 2019).

In this context, the multimetric trophic index (TRIX) has been systematically applied to determine the trophic status of estuaries worldwide (Andricevic et al., 2021; Anguiano-Cuevas et al., 2015; Cereja et al., 2022; Suteja et al., 2021). While the number of works carried out in

estuarine and coastal waters in Brazil has grown continuously (Alves et al., 2013; Paula Filho et al., 2020; Silva et al., 2022; Tavares et al., 2014), studies focused on the Amazon coast are still scarce (Cavalcanti et al., 2022b; Mourão et al., 2020), especially those that associate the trophic state of the water with the detection of Harmful Algal Blooms (HABs) in the coastal region, the works described generally are concentrated in lacustrine environments (Bonfim et al. 2019; Pineda et al., 2024).

HABs species refer to toxic and harmful algal species, which can cause mortality of organisms, human poisoning, and considerable changes in marine ecosystems (He et al., 2021; Lassus et al., 2016; Mozetič et al., 2019). Eutrophication and harmful algal overgrowth are two environmental issues facing global coastal regions (Damar et al., 2020; Golubkov et al., 2021; Holt et al., 2016). In recent years, this concern has intensified due to increased nutrient loads from human activity and climate change. These factors combined further exacerbate the negative impacts of human actions (Doney et al., 2012; Golubkov et al., 2021; Teutschbein et al., 2017).

Additionally, the diversity of the phytoplankton community has been an important ecological tool in the assessment of trophic conditions and stability of aquatic environments (Fuhrman et al., 2015), where high diversity values generally indicate a healthy ecosystem, while low values reflect critical pollution conditions (Manna et al., 2010). The integration of hydrological and ecological aspects and human intervention as a new scientific approach provide significant information for water management and conservation of aquatic systems (Cavalcanti et al., 2022a; Chícharo et al., 2009; Wolanski and Elliott, 2015).

In this way, the application of aquatic tools and methods contributes to identifying possible sources of pollution, representing a crucial tool in supporting the planning and management of coastal and maritime regions affected by human activities (Dodds and Smith, 2016; Mahmoud et al., 2020; Morsy et al., 2022).

Located on the eastern sector of the Amazon Coast, the São Marcos Estuarine Complex (SMEC) is home to a significant port complex of international renown. With the title of the largest cargo complex in Latin America, SMEC also plays a vital role in capturing fishing resources in the region. In recent years, SMEC presents a scenario of continuous contamination mainly caused by the release of domestic and agricultural sewage, pesticides, and industrial waste, as reported by Carvalho-Neta et al. (2012), Jesus et al. (2020), Neta et al. (2016) and Pinheiro-Sousa et al. (2021). However, no studies have been reported on the application of TRIX and its relationships with the presence of HABs so far. Considering this, we hypothesized that the increase in nutrient loading would shape trophic conditions and phytoplankton

dynamics in the system. To narrow this gap, this study aims to be the first to (i) determine the trophic state of SMEC applying multimetric trophic index, (ii) assess the ecological status of the phytoplankton community, (iii) identify the occurrence of harmful species which can pose toxic effects on human health and cause serious ecological and economic losses, and iv) apply additive models to investigate the main environmental parameters that drive phytoplankton.

2 Material and methods

2.1 Study area and climatology

The São Marcos Estuarine Complex (SMEC) is a large estuarine area located in the north of the State of Maranhão (Fig. 1a), where the Mearim, Grajaú, and Pindaré rivers flow (El-Robrini et al., 2006). The SMEC has an average annual freshwater discharge of $413 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$, with maximum and minimum records occurring in April and October, respectively (ANA, 2019). The study area is in a region known as the Amazon Macrotidal Mangrove Coast (AMMC), located between the Brazilian states of Amapá and Maranhão. The AMMC has an area of $\sim 7300 \text{ km}^2$ of mangrove, equivalent to 73% of the entire mangrove cover in Brazil (Diniz et al., 2019). The SMEC exhibits a semidiurnal and macrotidal pattern, where tidal heights can exceed 6 m in certain locations during spring tides, and tidal currents can reach speeds of up to 3.0 m s^{-1} (Czizewski et al., 2020; González-Gorbeña et al., 2015).

The SMEC has a width of approximately 55 km at its entrance, with variations of 15 km in the central portion and 1.5 km in the innermost portion where the Pindaré and Mearim rivers meet. Characterized by its extensive area and depths reaching up to 90 meters (Amaral and Alfredini, 2010; Cavalcanti et al., 2018), this area proves to be favorable for navigation and hosts significant port infrastructures, including the Ponta da Madeira terminal, Itaqui Harbor, and Alumar terminal (González-Gorbeña et al., 2015; Lima et al., 2021).

The climate in the region is tropical, with two well-defined seasonal periods: the rainy season (January to June) and the dry season (August to December), controlled by the Intertropical Convergence Zone, which is the main system responsible for precipitation in the north and northeast regions of Brazil (Albuquerque et al., 2023; Samaritano et al., 2013; Santos et al., 2023). The total annual rainfall was 2,330.9 mm in 2018, and 2,664.2 mm in 2019. The maximum rainfall was observed in February 2018 (531 mm) and March 2019 (818.2 mm), with an accumulated value much higher than expected ($> 462 \text{ mm}$) considering the historical climate data of the last 30 years (Fig. 1b). The maximum wind speed was observed in September 2018 (2.46 m s^{-1}) and September 2019 (2.68 m s^{-1}), and minimum in April 2018 (1.01 m s^{-1}) and March 2019 (0.78 m s^{-1}). The months with lower wind speeds were characteristic of the rainy season, while the higher wind speeds occurred in the dry season (Fig. 1c).

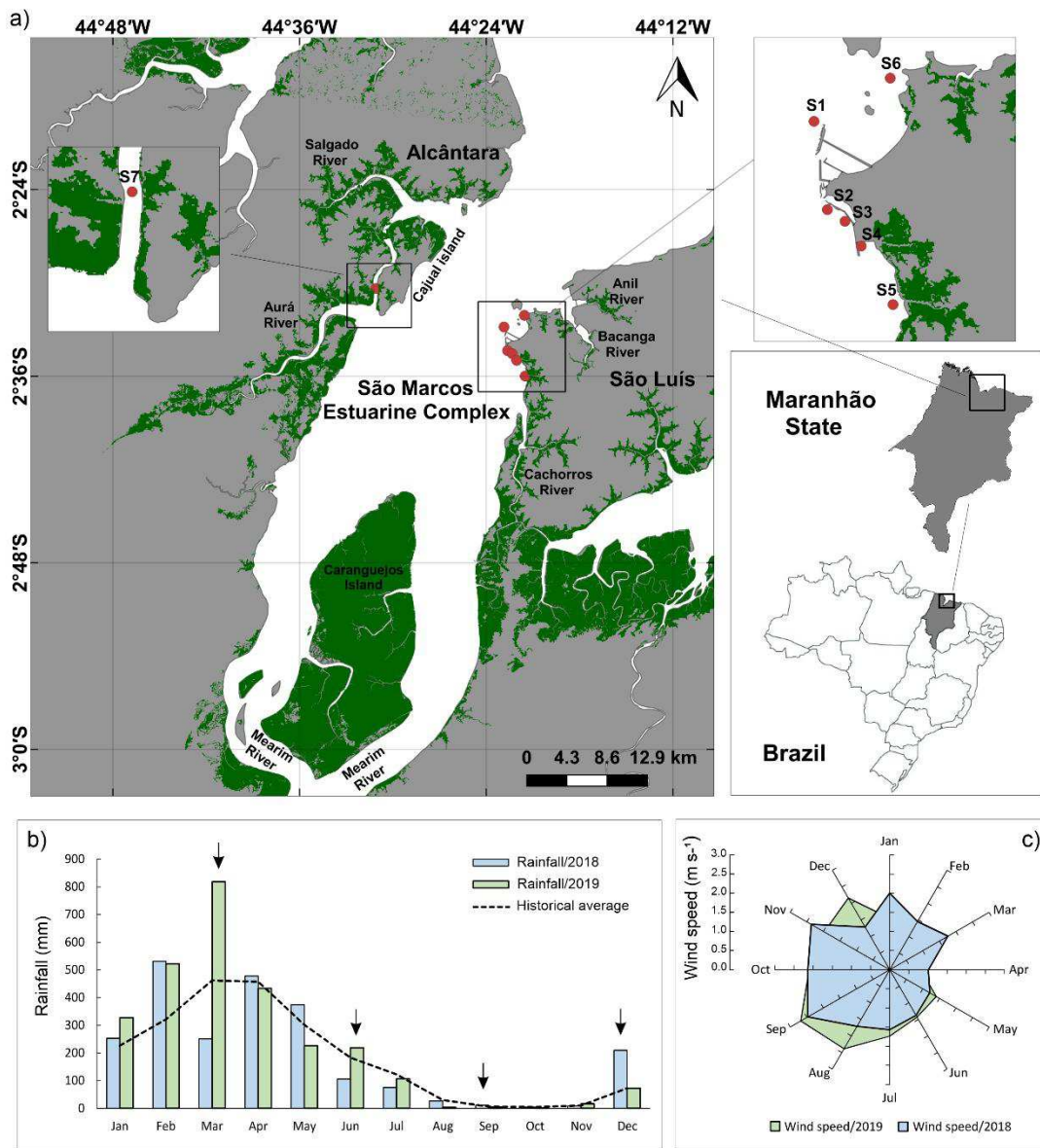


Fig. 1. Location of the study area, including the sampling stations in the São Marcos Estuarine Complex, Brazilian Amazon Coast (a). Historical monthly rainfall (last 30 years), monthly rainfall (b) and wind speed (c) for 2018 and 2019. The arrows indicate the months studied. Meteorological data were taken from the National Institute of Meteorology (www.portal.inmet.gov.br).

2.2 Sampling strategy and environmental variables

To investigate the temporal changes of biological and environmental variables, the sampling campaigns were carried out in the dry (September and December/2018) and rainy (March and June/2019) seasons, during flood tide. These sampling stations are located in areas of intense movement of iron ore cargoes, petroleum products, fertilizers and passenger transport (Ferry-boats) (Fig. 1a). Since the study area is a well-mixed estuarine system (Lima et al.,

2021), the subsurface salinity, temperature, dissolved oxygen, pH and turbidity of the water were measured in situ using a multiparameter probe (Horiba U-51). Water transparency was evaluated based on Secchi depth.

Water samples were collected using a 5-liter Van Dorn bottle and stored in coolers with ice. Nutrient concentrations were determined following the methodologies outlined in Strickland and Parsons (1972) for nitrite (NO_2^-), nitrate (NO_3^-), and ammonium ions (NH_4^+) and by the method proposed by Grasshoff et al. (1983) for phosphate (PO_4^{3-}).

2.3 Phytoplankton density, chlorophyll-a, and ecological indices

To obtain phytoplankton density and chlorophyll-a, water samples were collected 2 L from the subsurface through Van Dorn bottles and stored in polyethylene bottles. The samples for phytoplankton density were fixed with lugol. After homogenization, 10 mL sub-samples were taken and placed in sedimentation chambers following the method of Utermöhl (Utermöhl, 1958) for cell counting in an inverted microscope (ZEISS Axiovert 100) with 400x magnification. Subsequently, to obtain the number of cells (expressed in cells L⁻¹) the equation of Villafañe and Reid (1995) was used. Phytoplankton communities were identified at the lowest taxonomic level and updated using the AlgaeBase international database (Guiry and Guiry, 2023).

Based on the cell count per liter, ecological diversity indexes (Shannon and Wiener, 1949) were calculated according to the classification of Valentin (2000), evenness (Pielou, 1975) and species richness (Margalef, 1958).

Chlorophyll-a concentrations are considered as a reliable proxy for total phytoplankton biomass. For this, water samples (250 mL) were filtered on Whatman GF/C glass fiber filters (1.2 μm porosity and 47 mm diameter) under vacuum. After drying, the filters were kept in a freezer (-18°C) until the pigments were extracted with 90% acetone and identified using the spectrophotometric method (Unesco, 1966). The concentration of chlorophyll-a was calculated according to Strickland and Parsons (1972), and the results expressed in mg m^{-3} .

2.4 Trophic index (TRIX)

The Trophic State Index (TRIX) (Vollenweider et al., 1998) was used to characterize the trophic state of the São Marcos Estuarine Complex:

$$\text{TRIX} = (\log_{10} [\text{Chl a} * (\text{DO}\%) * \text{DIN} * \text{DIP}] + k) / m$$

where: Chla = is the chlorophyll-a concentration (mg m^{-3}); DO% = is the dissolved oxygen saturation; DIN = is the dissolved inorganic nitrogen and DIP the dissolved inorganic

phosphate. The constants $k = 1.5$ and $m = 1.2$ are scalar values. Numerically, the index is scaled from 0 to 8 (Table 1).

Table 1. Classification of trophic status according to Vollenweider et al. (1998).

TRIX	Conditions	Trophic State
< 2	Water very poorly productive and very low trophic status	Excellent (Ultra-Oligotrophic)
2 to 4	Water poorly productive and low trophic status	High (Oligotrophic)
4 to 5	Water moderately productive and medium trophic status	Good (Mesotrophic)
5 to 6	Water moderate to very productive and high trophic status	Moderate (Mesotrophic to Eutrophic)
6 to 8	Water very productive and high trophic status	Poor (Eutrophic)

2.5 Statistical analysis

Primarily, a permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA; Anderson, 2001) was applied to assess the temporal variability of the environmental variables in the SMEC using two factors: i) seasons (rainy and dry) and ii) months (March, June, September and December). After that, the normality (Kolmogorov-Sminorv test) and homogeneity (Levene test) of the data were performed. The analysis of variance was used for each abiotic and biological data to determine whether significant temporal differences existed. A one-way ANOVA (parametric) or Kruskal-Wallis (non-parametric) tests were used to verify possible differences, considering p values of ≤ 0.05 as significant.

To evaluate the effects of multiple stressors (environmental variables) on the phytoplankton community, we modeled the response of phytoplankton abundance and harmful species using Generalized Additive Models (GAMs). This analysis was performed applying the gam function in the R package mgcv (Wood, 2011). This model enables the adjustment of a response variable using multiple predictors in additive structures. The great advantage lies in eliminating the need to previously determine functional relationships, making it suitable for describing ecological interactions (Cavalcanti et al., 2022a; Farias et al., 2022). Prior to analysis, a draftsman plot (scatter plots between pairs of environmental variables) was performed to evaluate the linearity of the data and the inter-correlation between variables. Variables with high degree of correlation (Spearman's correlation coefficient $R_2 > 0.6$) were omitted from the Generalized Additive Models. Multivariate statistical analyses were performed using IBM SPSS Statistics (version 24) and R software (R Core Team, 2019).

3 Results

3.1 Environmental variables and inorganic nutrients

Temporal fluctuations of environmental and inorganic nutrient variables in the São Marcos Estuarine Complex were detected. Based on PERMANOVA analysis, the environmental conditions showed significant differences among seasons and studied months ($p < 0.003$, Table 2).

Table 2. Summary of the permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) results assessing the variability of environmental conditions along the temporal scale (seasons and months) in the São Marcos Estuarine Complex, Brazilian Amazon Coast.

.Source	df	SS	MS	F.Model	R ²	P
Seasonal	1	0.002	0.002	73.772	0.189	0.001***
Months	3	0.003	0.001	28.800	0.221	0.003**
Residuals	23	0.007	0.001		0.589	
Total	27	0.013			1.000	

The mean values and standard deviation with the significance levels are shown in Fig. 2. The mean salinity was 31.43 ± 2.25 ($p < 0.05$), and dissolved oxygen concentrations 6.86 ± 0.50 mg L⁻¹ ($p < 0.05$), with both parameters being higher during the dry season in December and September 2018, respectively. Turbidity 145.01 ± 71.74 NTU ($p < 0.05$), and pH 7.94 ± 0.95 ($p < 0.05$), were significantly higher in the rainy season in June and March 2019. The water temperature with a mean value of 29.13 ± 0.53 °C and the water transparency (0.29 ± 0.10 m) did not show any variation between the studied periods ($p > 0.05$).

Phosphate concentrations ranged from 16.80 ± 1.90 to 22.14 ± 2.15 mg L⁻¹, with a mean of 19.91 ± 2.84 mg L⁻¹. Nitrate concentrations varied from 2.83 ± 0.72 to 4.01 ± 0.91 mg L⁻¹, with a mean of 3.67 ± 0.98 mg L⁻¹. Significant variations were observed for both nutrients ($p < 0.05$), with phosphate higher in the dry season in September 2018, and nitrate higher in the rainy season in June 2019 (Fig. 2).

Nitrite concentrations ranged from 0.21 ± 0.05 to 0.24 ± 0.05 mg L⁻¹, with a mean of 0.22 ± 0.05 mg L⁻¹. Ammonium ion varied from 0.72 ± 0.10 to 1.03 ± 0.28 mg L⁻¹, with a mean of 0.88 ± 0.24 mg L⁻¹. Although these nitrogen compounds did not show significant variation ($p > 0.05$), higher nitrite concentrations were observed in September 2018 and ammonium ion in March 2019.

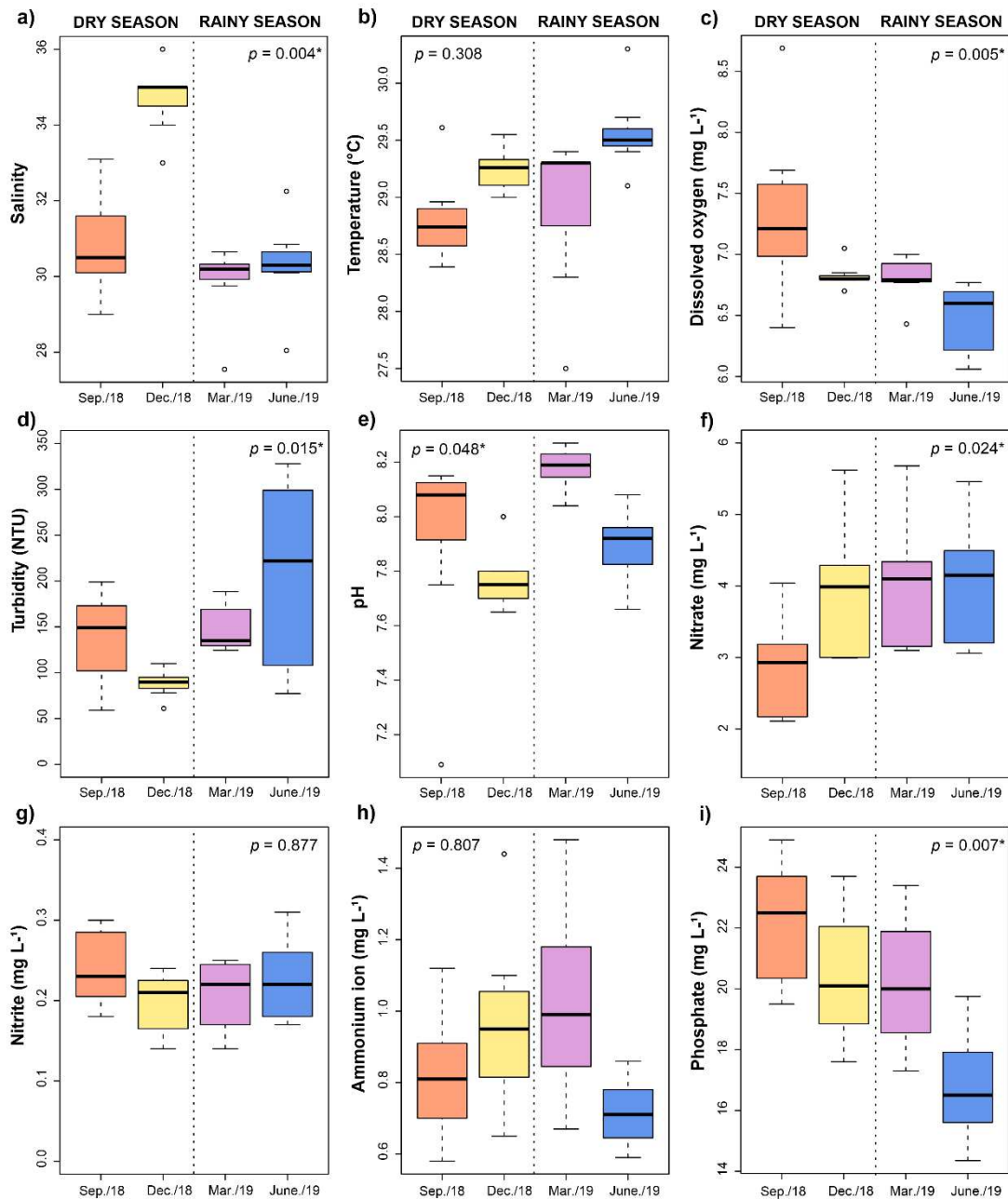


Fig. 2. Temporal variation of environmental variables (a-e) and nutrients (f-i) during dry and rainy seasons in the São Marcos Estuarine Complex, Brazilian Amazon Coast.

3.2 Phytoplankton composition, abundance and chlorophyll-a

A total of 61 phytoplankton taxa were identified in the SMEC, distributed mainly in Bacillariophyta (55 spp.), Cyanobacteria (2 spp.), Miozoa (2 spp.), and Euglenozoa (2 spp.).

Phytoplankton abundance showed a marked variability between the evaluated seasons, with lower values recorded in the dry season ($3.85 \pm 1.03 \times 10^4$ cells L⁻¹) and an increase in the rainy season ($5.38 \pm 1.95 \times 10^4$ cells L⁻¹), particularly in March 2019 (Fig. 3a). Based on the cells counting, *Thalassionema frauenfeldii* (Grunow) Tempère & Peragallo (31.53×10^4 cells L⁻¹) were considered the most dominant species. In addition, four diatoms the such as *Thalassiosira* sp.

(8.42×10^4 cells L⁻¹), *Coscinodiscus* sp. (6.99×10^4 cells L⁻¹), *Thalassionema nitzschioides* (Grunow) Mereschkowsky (6.98×10^4 cells L⁻¹), and *Nitzschia* sp. (6.96×10^4 cells L⁻¹) showed high frequency.

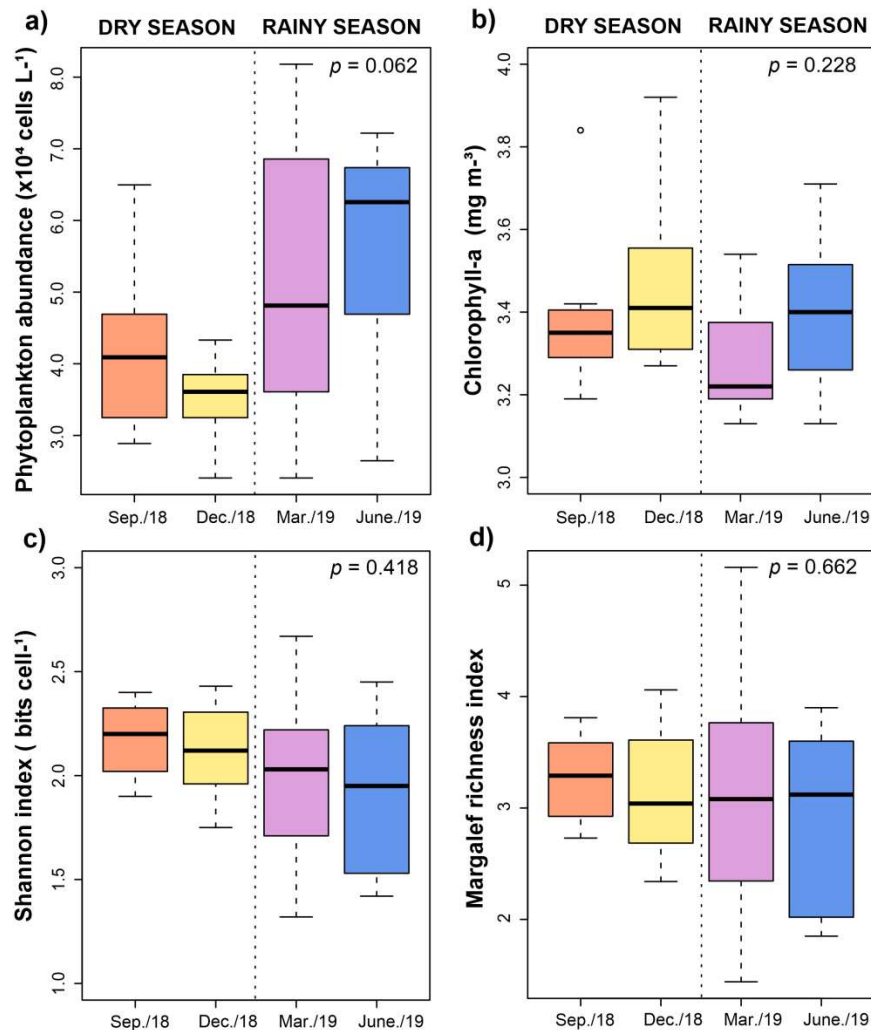


Fig. 3. Temporal distribution of phytoplankton abundance (a), chlorophyll a (b) and diversity indices (c-d) during dry and rainy seasons in the São Marcos Estuarine Complex, Brazilian Amazon Coast.

Additionally, four potentially harmful and bloom forming diatoms were recorded in this study. These species included *Coscinodiscus centralis* Ehrenberg, *Pseudo-nitzschia pungens* (Grunow ex Cleve) Hasle, *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve and *Thalassiosira subtilis* (Ostenfeld) Gran, which were recorded in low concentrations. Considering their temporal distribution (Fig. 4a-d), it was observed that during the dry season, there was an increase in the abundance of *Coscinodiscus centralis* (4.81×10^3 cells L⁻¹) in September 2018, and *Pseudo-nitzschia pungens* (2.41×10^3 cells L⁻¹) in December 2018. In the rainy season, *Skeletonema costatum* (2.41

$\times 10^3$ cells L^{-1}) exhibited higher abundance in June 2019, while *Thalassiosira subtilis* (1.44×10^4 cells L^{-1}) showed an increase in March 2019, with its peak abundance occurring in June 2019.

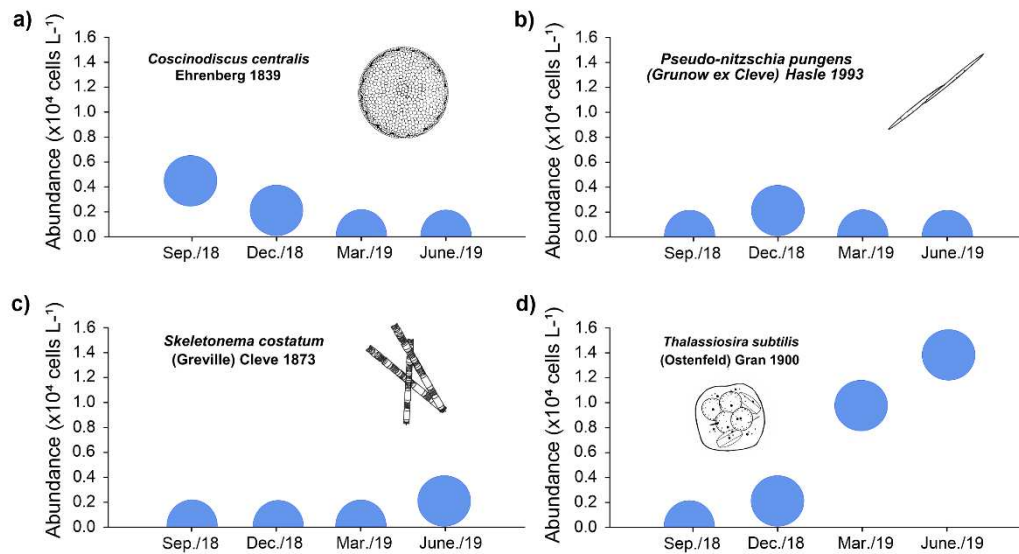


Fig. 4. Temporal distribution of potentially harmful and bloom forming diatoms in the São Marcos Estuarine Complex, Brazilian Amazon Coast. The schematic illustrations used were taken from Tomas (1997).

There was no significant variation in the chlorophyll-*a* ($p = 0.228$) or the phytoplankton density ($p = 0.062$) (Fig. 4). Chlorophyll-*a* concentrations (3.39 ± 0.20 mg m^{-3}) ranged from 3.34 ± 0.18 to 3.44 ± 0.21 mg m^{-3} , with higher records in December 2018.

Species diversity was relatively low, ranging from 1.94 ± 0.43 to 2.07 ± 0.39 bits cel^{-1} , with a mean of 2.01 ± 0.41 bits cel^{-1} . The richness ranged from 3.00 ± 1.07 to 3.21 ± 0.53 , with a mean of 3.10 ± 0.83 . There was no significant variation in the species diversity or richness ($p > 0.05$), while the evenness was significantly different ($p < 0.05$), with a mean value of 0.93 ± 0.05 , ranging from 0.90 ± 0.06 to 0.95 ± 0.04 (Fig. 3).

3.3 Trophic state and Redfield ratio

The TRIX index (6.76 ± 0.11) showed a non-significant variation ($p > 0.05$), between 6.73 ± 0.11 to 6.79 ± 0.10 . The results show that the TRIX values in the SMEC are high throughout the study period, indicating eutrophic conditions. However, it was observed that higher values were found in the dry season compared to the rainy season (Fig. 5).

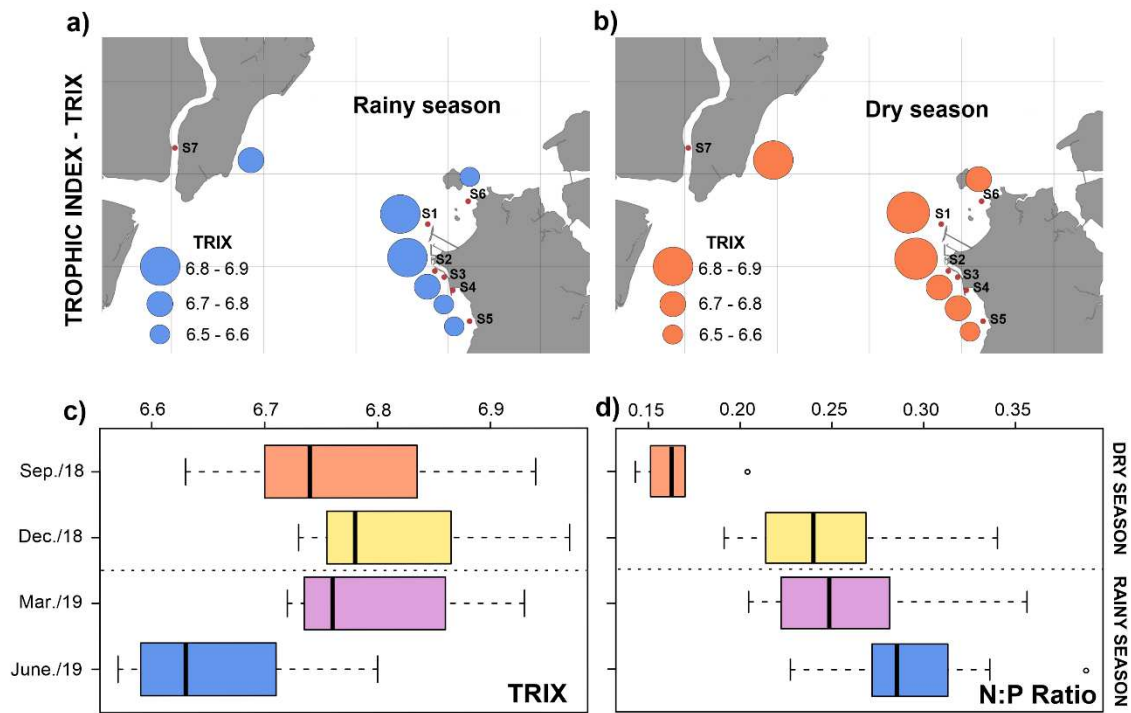


Fig. 5. Temporal variation of the Trophic Index (TRIX) (a-c) and Redfield ratio (N:P) (d) during the dry and rainy seasons in the São Marcos Estuarine Complex – Brazil.

Regarding the Redfield Ratio in SMEC, the N:P ratio (16:1) revealed that 100% of the samples were < 16 (overall mean 0.25 ± 0.06), with significantly lower values ($p < 0.001$) during the dry season, especially in September/2019, indicating that the system was predominantly nitrogen-limited.

3.4 Main determinants of phytoplankton in the São Marcos Estuarine Complex

GAMs models assessing the influence of environmental conditions on phytoplankton community explained at least 46% of the total variance (Table 3). The predictor variables were temperature, salinity, pH, dissolved oxygen, turbidity, nutrients (nitrate and phosphate) and trophic state (Fig. 6).

GAM analysis (96.1%) showed that water temperature, phosphate, and TRIX were significant predictors of phytoplanktonic abundance (Table 3), with optimal conditions observed between $27.5\text{--}28^\circ\text{C}$ for temperature and $16\text{--}20 \text{ mg L}^{-1}$ for phosphate concentration (Fig 6a). GAM results showed the response of the *T. frauenfeldii* to water temperature, salinity, and pH, with a combined explanation of 66.5%. In this context, salinity values lower than 30 and pH lower than 8.0 were revealed to be an ideal threshold for algal growth (Fig 6b).

For HABs, GAMs explained between 46% and 99% of the results (Fig 6c-e). The most significant variables for *T. subtilis* were phosphate, salinity, and turbidity. The greatest abundance of *T. subtilis* occurred when salinity was around 28, turbidity was up to 100 NTU, and phosphate concentrations were between 15 and 20 mg L⁻¹.

C. centralis showed linear relationships with turbidity (> 200 NTU) and TRIX (> 6.8), while nitrate showed a non-linear relationship (Fig. 6d). *S. costatum* abundance was influenced by dissolved oxygen, turbidity, and temperature (Fig. 6e). The model suggests that species abundance was higher due to DO concentrations ranging from 6.5 to 8.5 mg L⁻¹ and turbidity from 200 to 300 NTU, implying a non-linear positive correlation between the analyzed variables.

A Draftsman plot of the nine environmental variables and nutrients and its correlations coefficients are presented in Supplementary Material (Fig. S1), where it was observed a negative relationship between turbidity and DO ($r = -0.39$), salinity ($r = -0.51$), phosphate ($r = -0.23$) and ammonium ion ($r = -0.34$). On the other hand, nitrate showed a positive correlation with turbidity ($r = 0.33$) and temperature ($r = 0.36$).

Table 3. Summary of generalized additive model (GAMs) between total phytoplankton abundance, *Thalassionema frauenfeldii*, HABs (*T.subtilis*, *C.centralis* and *S.costatum*) and environmental parameters and trophic index (TRIX) for São Marcos Estuarine Complex.

Model 1			
Total abundance = s(Temp) + s(PO ₄ ³⁻) + s(TRIX)		R ² = 0.90	Dev. Expl. = 96.1%
Predictors	edf	F	p - value
s(Temp)	6.89	14.54	0.0001
s(PO ₄ ³⁻)	7.45	10.14	0.0006
s(TRIX)	2.63	4.35	0.0300
Model 2			
<i>T. frauenfeldii</i> = s(Temp) + s(Sal) + s(pH)		R ² = 0.51	Dev. Expl. = 66.5%
Predictors	edf	F	p - value
s(Temp)	2.91	7.79	0.0007
s(Sal)	1.00	4.93	0.0371
s(pH)	1.00	5.35	0.0304
Model 3			
<i>T.subtilis</i> = s(PO ₄ ³⁻) + s(Sal) + s(Turb)		R ² = 0.32	Dev. Expl. = 46.7%
Predictors	edf	F	p - value
s(Sal)	1.00	8.31	0.008
s(Turb)	1.00	8.32	0.008
s(PO ₄ ³⁻)	3.85	2.37	0.088
Model 4			
<i>C.centralis</i> = s(NO ₃ ⁻) + s(TRIX) + s(Turb)		R ² = 0.80	Dev. Expl. = 88.9%
Predictors	edf	F	p - value
s(Turb)	1.00	6.54	0.02
s(NO ₃ ⁻)	8.87	11.96	< 0.0001
s(TRIX)	2.30	3.61	0.04
Model 5			
<i>S.costatum</i> = s(DO) + s(Temp) + s(Turb)		R ² = 0.98	Dev. Expl. = 99.3%

Predictors	edf	F	p - value
s(DO)	8.97	8.53	0.003
s(Turb)	8.94	79.21	< 0.0001
s(Temp)	1.00	0.02	0.888

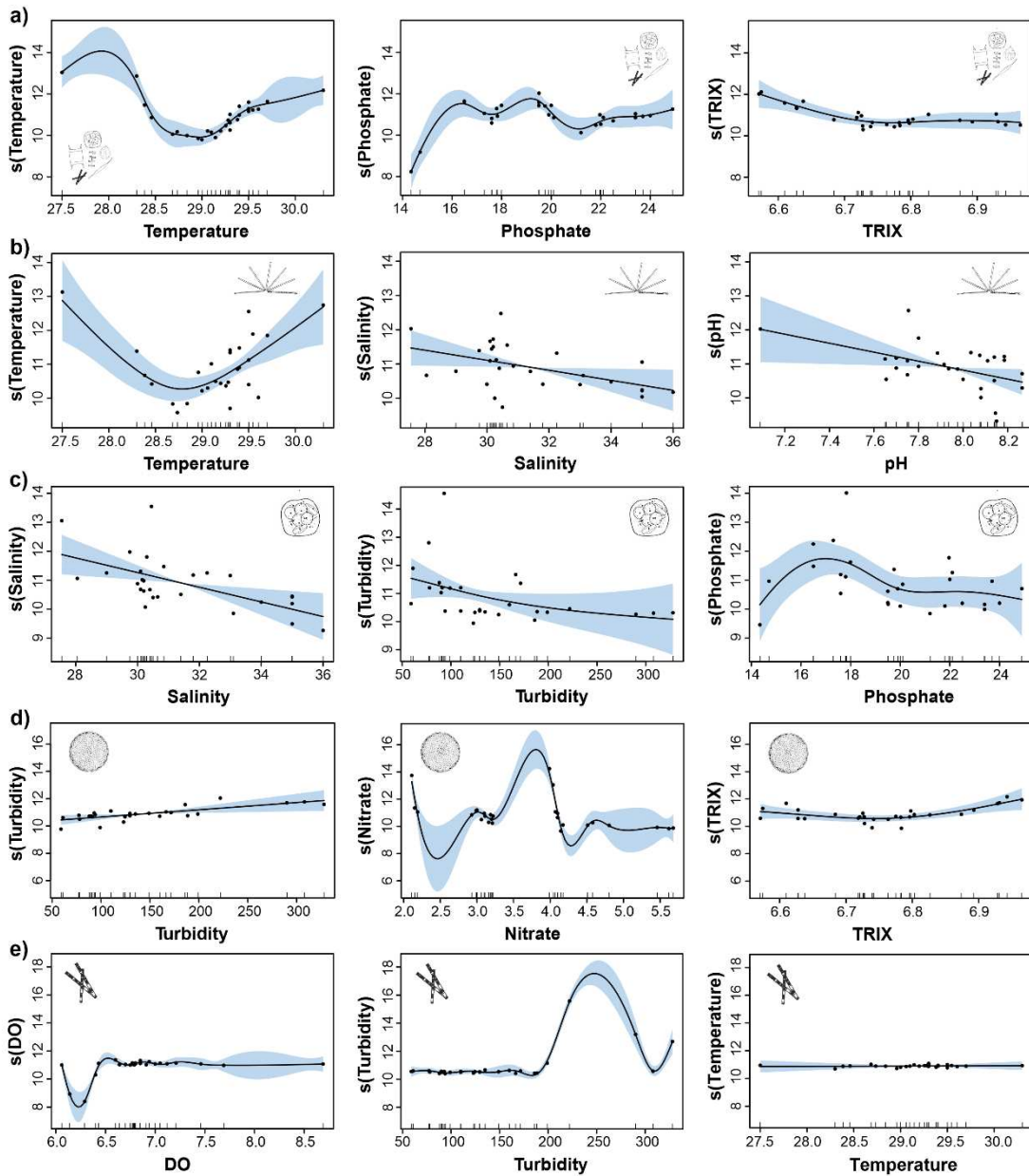


Fig. 6. Generalized Additive Models (GAMs) results describing the main variables that influenced the total phytoplankton abundance (a), *Thalassionema frauenfeldii* (b), and HABs (c-e). Solid lines represent smoothed mean relationships from GAM's and shaded areas are 95% confidence intervals. Other details are provided in Table 3.

4 Discussion

4.1 *Effects of the hydrological conditions on phytoplankton*

The present study revealed that variations in the rainy and dry seasons were decisive in the evaluation of water quality and phytoplankton in the São Marcos Estuarine Complex (SMEC), where the higher rainfall rates led to low salinities and water transparency, while increased nitrate concentrations and turbidity. The variability in these parameters is a result of a marked seasonal cycle associated with local hydrodynamics characterized by the strong mixing processes caused by the tidal movement (tidal range > 6 m) (Cavalcanti et al., 2018; Czizeweski et al., 2020; Lefèvre et al., 2017).

During the present study (2018-2019), the weather conditions reflected an atypical regime reaching annual rainfall > 2.600 mm. These increased rainfall levels can be explained by the cyclical climatic effects of El Niño and La Niña which modify weather patterns and fluvial discharges, as corroborated by findings of Pereira et al. (2023) and Dos Santos Sá et al. (2022).

Water quality in estuarine ecosystems may vary at both spatial and seasonal scales due to the interaction of hydrodynamic circulation with strong salinity gradients, suspended sediments, nutrient concentrations, dissolved oxygen and plankton, in addition to anthropogenic activities that cause significant changes in environments (Liu et al., 2016; Wild-Allen et al., 2013). In our work, most of the hydrological and biological parameters were significantly influenced by variations in the dry and rainy seasons.

This effect was observed through the high salinity values registered particularly during the dry season, indicating a seawater intrusion because of the reduction in precipitation rates and freshwater discharge, and the increase in evaporation. Additionally, fluctuations of the North Brazil Current (NBC) also influence the thermohaline properties of SMEC, which reaches its strongest intensity during July-August (early dry period) and pushes an extensive seawater volume towards the coastal bays (Lefèvre et al., 2017). Similar pattern was also found by Dos Santos et al. (2020) and Cavalcanti et al. (2023) in macrotidal bays along the northern Amazon coast.

Salinity plays a decisive role in phytoplankton community, influencing species abundance in coastal ecosystems (Cavalcanti et al., 2020; Cornwell et al., 2016; Sarker et al., 2023). In the SMEC, low salinities led to an increase in phytoplankton abundance, when conditions were typically polyhaline. Above all, variations in salinity impacts the

phytoplankton distribution, growth and diversity by affecting their photosynthesis and respiration process (Lakshmikandan et al., 2020; Muylaert et al., 2009; Xu et al., 2022).

Other factor that influences the biological processes in the Amazon coast is the light availability, controlled mainly by discharge of local rivers and estuaries. High levels of freshwater discharge and hydrodynamic energy during the months of greater rainfall rates favor the turbid conditions of the Amazon coast (Pamplona et al., 2013; Queiroz et al., 2022). In the SMEC, the high fluvial input of the Pindaré, Mearim and Grajaú rivers contribute to considerable loads of sediments and nutrients, limiting the euphotic zone to a narrow superficial layer (Azevedo et al., 2008). However, the elevated turbidity associated with high nutrient availability (nitrate, ammonium ion) may promote the phytoplankton growth in hydrodynamic ecosystems (Rai and Rajashekhar, 2014). In this context, our results confirmed this biological response where the great nutrient availability and attenuation of the sunlight promoted the ideal conditions to the phytoplankton growth (cell abundance $> 7 \times 10^4$ cells L⁻¹).

Studies that investigate the seasonal influence on hydrological and biological conditions have been widely carried out, since it is one of the determining factors in the dynamics and structure of phytoplankton in aquatic ecosystems. Seasonal changes have been observed primarily in estuarine ecosystems subject to anthropic influence (Kumar et al., 2020; Pereira et al., 2023; Rodrigues et al., 2020; Saifullah et al., 2019), where natural and anthropic factors associated with cycling and increase of nutrients in the environment cause variation in species composition and density.

4.2 Nutrients and trophic state

High nutrient loads often cause disturbances in estuaries. However, the physical characteristics of the estuary determine the response levels regarding productivity, dilution, eutrophication and the possibility of water renewal (De Jonge and Elliott, 2001; Barletta et al., 2019). In our study the concentrations of nutrients (nitrite, nitrate, ammonium ion and phosphate), were quite high throughout the year. The large contribution of nutrients in this area probably occurred due to the continental contribution with organic matter from the mangroves in the system, in addition to the transport of high loads from agricultural, industrial and port activities causing contamination. Similar results were also observed by Oliveira et al. (2019) and Pinheiro-Sousa et al., (2021) in the SMEC.

Several descriptors have been developed to assess the trophic state of an environment, each one based on different aspects of the ecosystem (Brugnoli et al., 2019). According to the TRIX index, the SMEC is characterized as a eutrophic environment, with more critical conditions during the dry season. This scenario was found in other coastal ecosystems highly

urbanized (Dos Santos Sá et al., 2022; Morsy et al., 2022; Pereira et al., 2023; Sathishkumar et al., 2022).

Among the main factors that drive the phytoplankton abundance, the additive models reported water temperature, phosphate, and TRIX as responsible for algal growth in the study area, suggesting that nutritional factors associated with elevated temperature favor the increase of photosynthetic organisms. Several studies have shown that phytoplankton dynamic is shaped by changes in the environment, being susceptible to temperature (Toseland et al., 2013; Yvon-Durocher et al., 2015), influence of sunlight (Finkel et al., 2006; Thrane et al., 2016) and nutrient availability (Lu et al., 2023; Moreno et al., 2018; Nhu et al., 2019). Additionally, the input of nutrients (especially phosphate) and the interactions between fresh and marine waters tend to stimulate the growth of phytoplankton (Cabrerizo et al., 2017). This compound is characterized as the most available and assimilable form of phosphorus in marine waters used by producers and heterotrophic organisms (Wu et al., 2013). In the SMEC, the substantial increase in phosphorus loading was the primary nutritional factor driving algal growth in the study area. Consequently, this nutrient enrichment contributed to elevated TRIX values.

Chlorophyll-a concentrations are considered as a reliable proxy for total phytoplankton biomass. In the SMEC, chlorophyll-a values were within the range recorded on the Amazon coast with values lower than 20 mg m^{-3} (Cavalcanti et al., 2018; Mourão et al., 2020; Queiroz et al., 2022), and other coastal regions in the world (Brugnoli et al., 2019; Cereja et al., 2022). These results reveal that, even if there is a high nutrient input, the intense local hydrodynamics can be a limiting factor for phytoplankton biomass in the euphotic zone.

Another assumption is that increased nutrients do not always lead to a proportional increase in biomass, as a significant portion of the biomass produced by algae may be consumed by the growing herbivorous zooplankton population, which may reduce chlorophyll concentrations due to increased grazing pressure (Hansson et al., 2004; Otero et al., 2020; Rodríguez-Gálvez et al., 2023). In addition, low chlorophyll levels can be attributed to high turbidity, which in estuaries limits the amount of light available for phytoplankton development (Burford et al., 2012; Cole and Cloern, 1987).

4.3 Biological implications of phytoplankton and HABs

The diversity of the phytoplankton community has been an important ecological tool in the assessment of water quality and stability of aquatic environments (Fuhrman et al., 2015; Ramírez-Romero et al., 2020), where high diversity values generally suggest a good ecosystem quality, while low values reflect critical pollution conditions (Manna et al., 2010).

The composition of the phytoplankton community followed the order of Diatoms > Dinoflagellates > Cyanobacteria. As a major taxonomic group of the community in the coastal ecosystem, diatoms are valuable indicators of the aquatic environment since they react rapidly to environmental changes and provide an early warning for pollution (Hilaluddin et al., 2020). Diatoms are known to dominate marine and estuarine waters along the Maranhão coast (Cavalcanti et al., 2020; Cavalcanti-Lima et al., 2023; Costa and Cutrim, 2021; Cruz et al., 2023; Dos Santos Sá et al., 2022). Besides that, this pattern is in accordance with previous studies world-wide in tropical estuarine ecosystems (Biswas et al., 2010; Canini et al., 2013; Saifullah et al., 2019).

Harmful algal blooms (HABs) consist in an uncontrolled increase of certain harmful and/or toxic microalgae, macroalgae, and cyanobacteria, regardless of their concentration (GlobalHAB, 2017; Guo et al., 2023). HABs can pose public health hazards, causing paralytic, amnesic, diarrheal, or neurotoxic intoxication in individuals (He et al., 2021). In our study, four harmful species were identified, including the diatoms *T. subtilis*, *C. centralis*, *S. costatum* and *Pseudo-nitzschia pungens*, corroborating with previously records of Queiroz et al. (2022) and Cavalcanti et al. (2018) in the same region.

Thalassiosira and Coscinodiscus genera were identified as indicators of waters characterized by high levels of pollution and nutrient inputs (Verlecar et al., 2006), and they play a significant role in signaling environmental stress (Ramaiah et al., 1998). Our results indicated that the studied environment faces intense water quality degradation.

According to (Bates et al., 2018), 26 *Pseudo-nitzschia* species produce domoic acid. *Pseudo-nitzschia pungens* is one of them, and its occurrence in high abundance can cause poisoning by domoic acid (DA), which causes Amnesic Shellfish Poisoning (ASP) affecting diverse organism (e. g., birds, marine mammals, and humans). DA can bioaccumulate within food webs, causing sickness and death in higher trophic level organisms (Accoroni et al., 2020; McCabe et al., 2016; Ryan et al., 2017).

The small-celled chain-forming diatom *Skeletonema costatum* showed high abundance in the rainy season, it is probably related to an increase in nitrate and turbidity in this period. According to (Balzano et al., 2011), this species is an excellent paleoenvironmental indicator, and changes in nutrient content and temperature can trigger flowering events in coastal regions (Vossel et al., 2018).

Regarding the ecological conditions of SMEC, it was observed low diversity and moderate richness. However, it is believed that the strong hydrodynamics of SMEC hinder the formation of blooms since the increase in suspended sediments can limit the development of

photosynthetic organisms. In the Indian Tapti and Narmada estuaries, low phytoplankton abundance and lower diversity were associated with high tidal ranges and increased sediment resuspension (Bharathi et al., 2022). The low phytoplankton diversity suggests that species from the study region are adapted to a disturbed environment. From this, species that dominate in areas of low diversity are generally resistant to stressors, causing a decrease in diversity and evenness (Escalas et al., 2019; Xiao et al., 2011). Additionally, stress caused by pollution causes a reduction in the number of species but increases the dominance of others (Manna et al., 2012).

5. Conclusions

This research was the first to study the trophic and ecological conditions in the São Marcos Estuarine Complex (SMEC). Using the multimetric trophic index (TRIX), it was possible to observe an environment in eutrophic conditions, caused both by the natural load of nutrients and by the release of domestic and industrial effluents from activities carried out in the area. Based on the identification of phytoplankton, four potentially harmful species were found (*Pseudo-nitzschia pungens*, *Coscinodiscus centralis*, *Thalassiora subtilis*, and *Skeletonema costatum*); in addition, the ecological indices indicated a low diversity and moderate species richness, suggesting that these species are adapted to the local conditions. The results showed that hydrological conditions (temperature, salinity, and turbidity), nutrients (nitrate and phosphate), and trophic index were the predictor variables responsible for influencing and modulating the SMEC phytoplankton community. Therefore, the combined use of trophic and ecological indices showed as an efficient tool in the assessment of water quality and phytoplankton dynamics, indicating the current scenario of the SMEC which holds significant economic, social and ecological relevance and this fact reinforces the establishment of mitigating measures regarding the anthropic actions carried out in the study area.

Guidelines for authors and journal standards

<https://www.sciencedirect.com/journal/ecohydrology-and-hydrobiology/publish/guide-for-authors>

References

- Accoroni, S., Giulietti, S., Romagnoli, T., Siracusa, M., Bacchiocchi, S., Totti, C., 2020. Morphological Variability of *Pseudo-nitzschia pungens* Clade I (Bacillariophyceae) in the Northwestern Adriatic Sea. *Plants* 9, 1420. <https://doi.org/10.3390/plants9111420>.
- Albuquerque, K.F. de M., Silva, M.H.L., Azevedo, J.W. de J., Soares, L.S., Bandeira, A.M., Soares, L.A., Castro, A.C.L. de, 2023. Assessment of water quality and concentration

- of heavy metals in fishes in the estuary of the Perizes River, Gulf of Maranhão, Brazil. *Mar. Pollut. Bull.* 186, 114420. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2022.114420>.
- Alves, G., Flores, M., Gaspar, F., Gomes, J., Feitosa, F., 2013. Eutrophication and water quality in a tropical Brazilian estuary. *J. Coast. Res.* pp. 7–12. <https://doi.org/10.2112/SI65-002.1>.
- Amaral, R., Alfredini, P., 2010. Modelação Hidrossedimentológica no Canal de Acesso do Complexo Portuário do Maranhão. *Rev. Bras. Recur. Hídricos* 15, 5–14. <https://doi.org/10.21168/rbrh.v15n2.p5-14>.
- ANA, 2019. Hidroweb. (Agência Nacional das Águas). online, dataset, <http://www3.ana.gov.br>.
- Andricevic, R., Kekez, T., Vojkovic, M., 2021. Trophic status assessment of Central Eastern Adriatic Sea using water quality variables and loading capacity concept for estuaries. *Mar. Pollut. Bull.* 173, 113126. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.113126>.
- Anguiano-Cuevas, J.R., Olivos-Ortiz, A., Cervantes, O., Azuz-Adeath, I., Ramírez-Álvarez, N., Rivera-Rodríguez, M.C., 2015. Evaluation of trophic state in the Palo Verde estuary (Colima, México), action to regulating agricultural activities. *Rev. Gest. Costeira Integrada* 15, 507–522. <https://doi.org/10.5894/rgci582>.
- Azevedo, A.C.G. de, Feitosa, F.A.N., Koenig, M.L., 2008. Distribuição espacial e temporal da biomassa fitoplanctônica e variáveis ambientais no Golfão Maranhense, Brasil. *Acta Bot. Bras.* 22, 870–877. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062008000300022>.
- Balzano, S., Sarno, D., Kooistra, W.H.C.F., 2011. Effects of salinity on the growth rate and morphology of ten *Skeletonema strains*. *J. Plankton Res.* 33, 937–945. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbq150>.
- Bharathi, M.D., Venkataramana, V., Sarma, V.V.S.S., 2022. Phytoplankton community structure is governed by salinity gradient and nutrient composition in the tropical estuarine system. *Continental Shelf Research* 234, 104643. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2021.104643>.
- Barletta, M., Lima, A.R.A., Costa, M.F., 2019. Distribution, sources and consequences of nutrients, persistent organic pollutants, metals and microplastics in South American estuaries. *Sci. Total Environ.* 651, 1199–1218. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.276>.
- Bates, S.S., Hubbard, K.A., Lundholm, N., Montresor, M., Leaw, C.P., 2018. Pseudo-nitzschia, Nitzschia, and domoic acid: New research since 2011. *Harmful Algae* 79, 3–43. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2018.06.001>.
- Berthold, M., Karsten, U., von Weber, M., Bachor, A., Schumann, R., 2018. Phytoplankton can bypass nutrient reductions in eutrophic coastal water bodies. *Ambio* 47, 146–158. <https://doi.org/10.1007/s13280-017-0980-0>.
- Biswas, H., Dey, M., Ganguly, D., De, T.K., Ghosh, S., Jana, T.K., 2010. Comparative Analysis of Phytoplankton Composition and Abundance over a Two-Decade Period at the Land–Ocean Boundary of a Tropical Mangrove Ecosystem. *Estuaries Coasts* 33, 384–394. <https://doi.org/10.1007/s12237-009-9193-5>.

- Bomfim, E. de O., Kraus, C.N., Lobo, M.T.M.P.S., Nogueira, I. de S., Peres, L.G.M., Boaventura, G.R., Laques, A.-E., Garnier, J., Seyler, P., Marques, D.M., Bonnet, M.-P., 2019. Trophic state index validation based on the phytoplankton functional group approach in Amazon floodplain lakes. *Inland Waters* 9, 309–319. <https://doi.org/10.1080/20442041.2019.1570785>.
- Brugnoli, E., Muniz, P., Venturini, N., Brena, B., Rodríguez, A., García-Rodríguez, F., 2019. Assessing multimetric trophic state variability during an ENSO event in a large estuary (Río de la Plata, South America). *Reg. Stud. Mar. Sci.* 28, 100565. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2019.100565>.
- Burford, M.A., Webster, I.T., Revill, A.T., Kenyon, R.A., Whittle, M., Curwen, G., 2012. Controls on phytoplankton productivity in a wet–dry tropical estuary. *Estuar. Coast. Shelf Sci., The MIRACLE Project (Mercury Interdisciplinary Research project for Appropriate Clam farming in Lagoon Environment)* 113, 141–151. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2012.07.017>.
- Cabrerizo, M.J., Carrillo, P., Villafañe, V.E., Helbling, E.W., 2017. Differential impacts of global change variables on coastal South Atlantic phytoplankton: Role of seasonal variations. *Mar. Environ. Res.* 125, 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2017.01.005>.
- Canini, N., Metillo, E., Azanza, R., 2013. Monsoon-influenced phytoplankton community structure in a Philippine mangrove estuary. *Trop. Ecol.* 54, 331–343.
- Carvalho-Neta, R.N.F., Torres, A.R., Abreu-Silva, A.L., 2012. Biomarkers in catfish *Sciades herzbergii* (Teleostei: Ariidae) from polluted and non-polluted areas (São Marcos' Bay, Northeastern Brazil). *Appl. Biochem. Biotechnol.* 166, 1314–1327. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9519-1>.
- Cavalcanti, L.F., Azevedo-Cutrim, A.C.G., Oliveira, A.L.L., Furtado, J.A., Araújo, B.D.O., Sá, A.K.D.-S., Ferreira, F.S., Santos, N.G.R., Dias, F.J.S., Cutrim, M.V.J., 2018. Structure of microphytoplankton community and environmental variables in a macrotidal estuarine complex, São Marcos Bay, Maranhão - Brazil. *Braz. J. Oceanogr.* 66, 283–300. <https://doi.org/10.1590/s1679-87592018021906603>.
- Cavalcanti, L.F., Cutrim, M.V.J., Lourenço, C.B., Sá, A.K.D.S., Oliveira, A.L.L., de Azevedo-Cutrim, A.C.G., 2020. Patterns of phytoplankton structure in response to environmental gradients in a macrotidal estuary of the Equatorial Margin (Atlantic coast, Brazil). *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 245, 106969. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2020.106969>.
- Cavalcanti, L.F., Do N Feitosa, F.A., Cutrim, M.V.J., Montes, M.D.J.F., Lourenço, C.B., Furtado, J.A., Dos S Sá, A.K.D., 2022a. Drivers of phytoplankton biomass and diversity in a macrotidal bay of the Amazon Mangrove Coast, a Ramsar site. *Ecohydrol. Hydrobiol.* 22, 435–453. <https://doi.org/10.1016/j.ecohyd.2022.02.002>.
- Cavalcanti, L.F., Cutrim, M.V.J., Maciel, C.C.S., Sá, A.K.D.D.S., Azevedo-Cutrim, A.C.G., Santos, T.P., Cruz, Q.S.D., 2022b. Application of multiple indices to the evaluation of trophic and ecological status in a tropical macrotidal estuary (Equatorial Margin, Brazil). *Chem. Ecol.* 38, 122–144. <https://doi.org/10.1080/02757540.2021.2023509>.
- Cavalcanti-Lima, L.F., Cutrim, M.V.J., Feitosa, F.A.D.N., Flores-Montes, M.D.J., Dias, F.J.S., Sá, A.K.D.D.S., Santos, T.P., Da Cruz, Q.S., Lourenço, C.B., 2023. Effects of climate,

- spatial and hydrological processes on shaping phytoplankton community structure and β -diversity in an estuary-ocean continuum (Amazon continental shelf, Brazil). *J. Sea Res.* 193, 102384. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2023.102384>.
- Cereja, R., Brotas, V., Nunes, S., Rodrigues, M., Cruz, J.P.C., Brito, A.C., 2022. Tidal influence on water quality indicators in a temperate mesotidal estuary (Tagus Estuary, Portugal). *Ecol. Indic.* 136, 108715. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2022.108715>.
- Chícharo, L., Gaona, J., Sousa, P., Arduino, G., 2022. A methodology to evaluate the implementation of ecohydrology solutions at the Ecohydrology demonstration sites: The Guadiana case study. *Ecohydrol. Hydrobiol.* 22, 391–399. <https://doi.org/10.1016/j.ecohyd.2022.06.002>.
- Cole, B.E., Cloern, J.E., 1987. An empirical model for estimating phytoplankton productivity in estuaries. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 396, 299–305.
- Cornwell, J.C., Owens, M.S., Boynton, W.R., Harris, L.A., 2016. Sediment-Water Nitrogen Exchange along the Potomac River Estuarine Salinity Gradient. *J. Coast. Res.* 32, 776–787. <https://doi.org/10.2112/JCOASTRES-D-15-00159.1>.
- Costa, D. dos S., Cutrim, M.V.J., 2021. Spatial and seasonal variation in physicochemical characteristics and phytoplankton in an estuary of a tropical delta system. *Reg. Stud. Mar. Sci.* 44, 101746. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2021.101746>.
- Cruz, Q.S. da, Cutrim, M.V.J., Santos, T.P., Sá, A.K.D. dos S., Cavalcanti-Lima, L.F., 2023. Environmental heterogeneity of a tropical river-to-sea continuum and its relationship with structure and phytoplankton dynamics – Lençóis Maranhenses National Park. *Mar. Environ. Res.* 187, 105950. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2023.105950>.
- Czizeweski, A., Pimenta, F.M., Saavedra, O.R., 2020. Numerical modeling of Maranhão Gulf tidal circulation and power density distribution. *Ocean Dyn.* 70, 667–682. <https://doi.org/10.1007/s10236-020-01354-8>.
- Damar, A., Colijn, F., Hesse, K.-J., Adrianto, L., Yonvitner, Fahrudin, A., Kurniawan, F., Prismayanti, A.D., Rahayu, S.M., Rudianto, B.Y., Ramli, A., 2020. Phytoplankton Biomass Dynamics in Tropical Coastal Waters of Jakarta Bay, Indonesia in the Period between 2001 and 2019. *J. Mar. Sci. Eng.* 8, 674. <https://doi.org/10.3390/jmse8090674>.
- de Jonge, V.N., Elliott, M., 2001. Eutrophication. In: Steele, J., Thorpe, S., Turekian, K. (Eds.), *Encyclopedia of Marine Sciences*. Academic Press, London.
- Diniz, C., Cortinhas, L., Nerino, G., Rodrigues, J., Sadeck, L., Adami, M., Souza-Filho, P., 2019. Brazilian Mangrove Status: Three Decades of Satellite Data Analysis. *Remote Sens.* 11, 808. <https://doi.org/10.3390/rs11070808>.
- Dodds, W.K., Smith, V.H., 2016. Nitrogen, phosphorus, and eutrophication in streams. *Inland Waters* 6, 155–164. <https://doi.org/10.5268/IW-6.2.909>.
- Doney, S.C., Ruckelshaus, M., Emmett Duffy, J., Barry, J.P., Chan, F., English, C.A., Galindo, H.M., Grebmeier, J.M., Hollowed, A.B., Knowlton, N., Polovina, J., Rabalais, N.N., Sydeman, W.J., Talley, L.D., 2012. Climate Change Impacts on Marine Ecosystems. *Annu. Rev. Mar. Sci.* 4, 11–37. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-041911-111611>.

- Dos Santos Sá, A.K.D., Cutrim, M.V.J., Do Nascimento Feitosa, F.A., De Jesus Flores-Montes, M., Cavalcanti, L.F., Dos Santos Costa, D., Da Cruz, Q.S., 2022. Multiple stressors influencing the general eutrophication status of transitional waters of the Brazilian tropical coast: An approach utilizing the pressure, state, and response (PSR) framework. *J. Sea Res.* 189, 102282. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2022.102282>.
- Dos Santos, V.H.M., da Silva Dias, F.J., Torres, A.R., Soares, R.A., Terto, L.C., de Castro, A.C.L., Santos, R.L., Cutrim, M.V.J., 2020. Hydrodynamics and suspended particulate matter retention in macrotidal estuaries located in Amazonia-semiarid interface (Northeastern-Brazil). *Int. J. Sediment Res.* 35, 417–429. <https://doi.org/10.1016/j.ijsrc.2020.03.004>.
- El-Robrini, M., Marques, J.V, Silva, M.M.A., El-Robrini, M.H.S., Feitosa, A.C., Tarouco, J.E.F., Santos, J.H., dos, de S., Viana, J.S., 2006. Maranhão, Erosão e Progradação Do Litoral Brasileiro: Maranhão. MMA Brasília.
- Escalas, A., Catherine, A., Maloufi, S., Cellamare, M., Hamlaoui, S., Yéprémian, C., Louvard, C., Troussellier, M., Bernard, C., 2019. Drivers and ecological consequences of dominance in periurban phytoplankton communities using networks approaches. *Water Res.* 163, 114893. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.114893>.
- Farias, G.B., Molinero, J.-C., Carré, C., Bertrand, A., Bec, B., Melo, P.A.M. de C., 2022. Uncoupled changes in phytoplankton biomass and size structure in the western tropical Atlantic. *J. Mar. Syst.* 227, 103696. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2021.103696>.
- Finkel, Z.V., Quigg, A., Raven, J.A., Reinfelder, J.R., Schofield, O.E., Falkowski, P.G., 2006. Irradiance and the elemental stoichiometry of marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* 51, 2690–2701. <https://doi.org/10.4319/lo.2006.51.6.2690>.
- Franzen, M.O., Silva, P., Siegle, E., Fernandes, E.H.L., 2023. Influence of long jetties on estuarine and coastal hydrodynamics in a microtidal estuary. *Reg. Stud. Mar. Sci.* 59, 102809. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2022.102809>.
- Fuhrman, J.A., Cram, J.A., Needham, D.M., 2015. Marine microbial community dynamics and their ecological interpretation. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 133–146. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3417>.
- GLOBALHAB. 2017. Global Harmful Algal Blooms, Science and Implementation Plan. E. Berdalet et al. (eds.). SCOR and IOC, Delaware and Paris, 64 pp.
- Golubkov, M., Nikulina, V., Golubkov, S., 2021. Species-level associations of phytoplankton with environmental variability in the Neva Estuary (Baltic Sea). *Oceanologia* 63, 149–162. <https://doi.org/10.1016/j.oceano.2020.11.002>.
- González-Gorbeña, E., Rosman, P.C.C., Qassim, R.Y., 2015. Assessment of the tidal current energy resource in São Marcos Bay, Brazil. *J. Ocean Eng. Mar. Energy* 1, 421–433. <https://doi.org/10.1007/s40722-015-0031-5>.
- Grasshoff, K., Ehrhardt, M., Kremling, K., 1983. *Methods of Seawater Analysis*. Verlag Chemie, New York, pp. 581–614 vol. 16 (3).
- Guo, H., Cai, R., Tan, H., 2023. Projected harmful algal bloom frequency in the Yangtze River Estuary and adjacent waters. *Mar. Environ. Res.* 183, 105832. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2022.105832>.

- Guiry, M.D., Guiry, G.M., 2023. AlgaeBase. World-wide electronic publication. National University of Ireland, Galway.
- Hansson, L.-A., Gyllström, M., Ståhl-Delbanco, A., Svensson, M., 2004. Responses to fish predation and nutrients by plankton at different levels of taxonomic resolution. *Freshw. Biol.* 49, 1538–1550. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2004.01291.x>.
- He, Y., Qin, N., He, W., Xu, F., 2021. The impacts of algae biological pump effect on the occurrence, source apportionment and toxicity of SPM-bound PAHs in lake environment. *Sci. Total Environ.* 753, 141980. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141980>.
- Hilaluddin, F., Yusoff, F.M., Natrah, F.M.I., Lim, P.T., 2020. Disturbance of mangrove forests causes alterations in estuarine phytoplankton community structure in Malaysian Matang mangrove forests. *Mar. Environ. Res.* 158, 104935. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2020.104935>.
- Holt, J., Schrum, C., Cannaby, H., Daewel, U., Allen, I., Artioli, Y., Bopp, L., Butenschon, M., Fach, B.A., Harle, J., Pushpadas, D., Salihoglu, B., Wakelin, S., 2016. Potential impacts of climate change on the primary production of regional seas: A comparative analysis of five European seas. *Prog. Oceanogr.* 140, 91–115. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2015.11.004>.
- Jesus, W.B., Soares, S.H., Pinheiro-Sousa, D.B., Andrade, T.S.O.M., Oliveira, S.R.S., Santos, F.S., Santos, D.M.S., Carvalho-Neta, R.N.F., 2020. Biomarcadores enzimáticos e histológicos em brânquias de *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Brachyura, Ucididae) indicativos de impactos ambientais em uma região portuária do nordeste do Brasil. *Arq. Bras. Med. Veterinária E Zootec.* 72, 1413–1423. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-11666>.
- Kumar M, R., Krishnan K, A., Das, R., V, V., 2020. Seasonal phytoplankton succession in Netravathi – Gurupura estuary, Karnataka, India: Study on a three tier hydrographic platform. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 242, 106830. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2020.106830>.
- Lakshmikandan, M., Murugesan, A.G., Wang, S., Abomohra, A.E.-F., Jovita, P.A., Kiruthiga, S., 2020. Sustainable biomass production under CO₂ conditions and effective wet microalgae lipid extraction for biodiesel production. *J. Clean. Prod.* 247, 119398. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119398>.
- Lassus, P., Chomerat, N., Hess, P., Nezan, E., 2016. Micro-algues toxiques et nuisibles de l’océan mondial. COI Manuels et Guides, 68, Toxic and Harmful Microalgae of the World Ocean. IOC Manuals and Guides, 68.
- Lefèvre, N., Da Silva Dias, F.J., De Torres, A.R., Noriega, C., Araujo, M., De Castro, A.C.L., Rocha, C., Jiang, S., Ibánhez, J.S.P., 2017. A source of CO₂ to the atmosphere throughout the year in the Maranhense continental shelf (2°30’S, Brazil). *Cont. Shelf Res.* 141, 38–50. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2017.05.004>.
- Lima, H.P., Dias, F.J.S., Teixeira, C.E.P., Godoi, V.A., Torres, A.R., Araújo, R.S., 2021. Implications of turbulence in a macrotidal estuary in northeastern Brazil — The São Marcos Estuarine Complex. *Reg. Stud. Mar. Sci.* 47, 101947. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2021.101947>.

- Liu, H., Li, Y., Leng, F., Schmidt, W., 2016. Stage Variation of Phytoplankton and Environmental Factors in a Large Drinking Water Reservoir: from Construction to Full Operation. *Water. Air. Soil Pollut.* 227. <https://doi.org/10.1007/s11270-016-3062-1>.
- Lu, X., Yu, W., Chen, B., Ma, Z., Chen, G., Ge, F., An, S., Han, W., 2023. Imbalanced phytoplankton C, N, P and its relationship with seawater nutrients in Xiamen Bay, China. *Mar. Pollut. Bull.* 187, 114566. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2022.114566>.
- Mahmoud, M.G., El-Khir, E.A., Ebeid, M.H., Mohamed, L.A., Fahmy, M.A., Shaban, K.S., 2020. An Assessment on the Coastal Seawater Quality of the Gulf of Suez, Egypt. *J. Environ. Prot.* 11, 34–47. <https://doi.org/10.4236/jep.2020.111004>.
- Manna, S., Chaudhuri, K., Bhattacharyya, S., Bhattacharyya, M., 2010. Dynamics of Sundarban estuarine ecosystem: eutrophication induced threat to mangroves. *Saline Syst.* 6, 8. <https://doi.org/10.1186/1746-1448-6-8>.
- Manna, S., Chaudhuri, K., Sarma, K.S., Naskar, P., Bhattacharyya, S.B. and M., Manna, S., Chaudhuri, K., Sarma, K.S., Naskar, P., Bhattacharyya, S.B. and M., 2012. Interplay of Physical, Chemical and Biological Components in Estuarine Ecosystem with Special Reference to Sundarbans, India, in: *Ecological Water Quality - Water Treatment and Reuse*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/32110>.
- Margalef, R., 1958. Information theory in ecology. *Gen. Sys.* 3, 36–71.
- McCabe, R.M., Hickey, B.M., Kudela, R.M., Lefebvre, K.A., Adams, N.G., Bill, B.D., Gulland, F.M.D., Thomson, R.E., Cochlan, W.P., Trainer, V.L., 2016. An unprecedented coastwide toxic algal bloom linked to anomalous ocean conditions. *Geophys. Res. Lett.* 43, 10366–10376. <https://doi.org/10.1002/2016GL070023>.
- Moncheva, S., Gotsis-Skretas, O., Pagou, K., Krastev, A., 2001. Phytoplankton Blooms in Black Sea and Mediterranean Coastal Ecosystems Subjected to Anthropogenic Eutrophication: Similarities and Differences. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 53, 281–295. <https://doi.org/10.1006/ecss.2001.0767>.
- Morelli, B., Hawkins, T.R., Niblick, B., Henderson, A.D., Golden, H.E., Compton, J.E., Cooter, E.J., Bare, J.C., 2018. Critical review of eutrophication models for life cycle assessment. *Environ. Sci. Technol.* 52, 9562–9578. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b00967>.
- Moreno, A.R., Hagstrom, G.I., Primeau, F.W., Levin, S.A., Martiny, A.C., 2018. Marine phytoplankton stoichiometry mediates nonlinear interactions between nutrient supply, temperature, and atmospheric CO₂. *Biogeosciences* 15, 2761–2779. <https://doi.org/10.5194/bg-15-2761-2018>.
- Morsy, A., Ebeid, M., Soliman, A., Halim, A.A., Ali, A.E., Fahmy, M., 2022. Evaluation of the water quality and the eutrophication risk in Mediterranean Sea area: A case study of the Port Said Harbour, Egypt. *Environ. Chall.* 7, 100484. <https://doi.org/10.1016/j.envc.2022.100484>.
- Mourão, F.V., De Sousa, A.C.S.R., Da Luz Mendes, R.M., Castro, K.M., Da Silva, A.C., El-Robrini, M., De Oliveira Salomão, U., Pereira, J.A.R., De Lourdes Souza Santos, M., 2020. Water quality and eutrophication in the Curuçá estuary in northern Brazil. *Reg. Stud. Mar. Sci.* 39, 101450. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2020.101450>.

- Mozetič, P., Cangini, M., Francé, J., Bastianini, M., Bernardi Aubry, F., Bužančić, M., Cabrini, M., Cerino, F., Čalić, M., D'Adamo, R., Drakulović, D., Finotto, S., Fornasaro, D., Grilli, F., Kraus, R., Kužat, N., Marić Pfannkuchen, D., Ninčević Gladan, Ž., Pompei, M., Rotter, A., Servadei, I., Skejić, S., 2019. Phytoplankton diversity in Adriatic ports: Lessons from the port baseline survey for the management of harmful algal species. *Mar. Pollut. Bull.*, Vulnerability to bioinvasions: current status, risk assessment and management of ballast water through a regional approach – the Adriatic Sea 147, 117–132. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.12.029>.
- Muylaert, K., Sabbe, K., Vyverman, W., 2009. Changes in phytoplankton diversity and community composition along the salinity gradient of the Schelde estuary (Belgium/The Netherlands). *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 82, 335–340. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2009.01.024>.
- Neta, R.N.F.C., Junior, A.R.T., Sousa, D.B.P., de Sousa de Oliveira Mota Andrade, T., Torres, H.S., da Silva Castro, J., da Silva de Almeida, Z., Santos, D.M.S., Tchaicka, L., 2016. In situ assessment of two catfish species (pisces, Ariidae) to evaluate pollution in a harbor 1790, 100007. <https://doi.org/10.1063/1.4968699>.
- Nhu Y, D.T., Hoang, N.T., Lieu, P.K., Harada, H., Brion, N., Hieu, D.V., Hop, N.V., Olde Venterink, H., 2019. Effects of nutrient supply and nutrient ratio on diversity-productivity relationships of phytoplankton in the Cau Hai lagoon, Vietnam. *Ecol. Evol.* 9, 5950–5962. <https://doi.org/10.1002/ece3.5178>.
- Oliveira, S.R.S., Batista, W.D.S., Sousa, J.B.M., Noleto, K.S., Arouche Lima, I.M., Andrade, T.S.O.M., Cardoso, W. da S., Carvalho Neta, R.N.F., 2019. Enzymatic and Histological Biomarkers in *Ucides cordatus* (Crustacea, Decapoda) in an Industrial Port on the North Coast of Brazil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 102, 802–810. <https://doi.org/10.1007/s00128-019-02594-1>.
- Otero, J., Álvarez-Salgado, X.A., Bode, A., 2020. Phytoplankton Diversity Effect on Ecosystem Functioning in a Coastal Upwelling System. *Front. Mar. Sci.* 7.
- Pamplona, F.C., Paes, E.T., Nepomuceno, A., 2013. Nutrient fluctuations in the Quatipuru river: A macrotidal estuarine mangrove system in the Brazilian Amazonian basin. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 133, 273–284. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2013.09.010>.
- Paula Filho, F.J., Marins, R.V., Chicharo, L., Souza, R.B., Santos, G.V., Braz, E.M.A., 2020. Evaluation of water quality and trophic state in the Parnaíba River Delta, northeast Brazil. *Reg. Stud. Mar. Sci.* 34, 101025. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2019.101025>.
- Pereira, L.C.C., Jiménez, J.A., Pineda, M.G., Costa, Á.K.R., da Silva Sousa, N. do S., de Oliveira, A.R.G., Costa, R.M., 2023. Assessment of Trophic Status in Amazonian Estuaries: A Reinterpretation of Trix Values in Mangrove Estuaries. <https://doi.org/10.2139/ssrn.4432726>.
- Pielou, E.C., 1975. *Ecological Diversity*. Wiley InterScience, New York.
- Pineda, A., Campos, B.M., Zanon, F., Felicio, R., Rodrigues, L.C., 2024. Impact of run-of-river damming on increasing phytoplankton biomass and species shift in a large Amazonian River. *Science of The Total Environment* 953, 176154. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.176154>.

- Pinheiro-Sousa, D.B., Da Costa Soares, S.H., Torres, H.S., De Jesus, W.B., De Oliveira, S.R.S., Bastos, W.R., De Oliveira Ribeiro, C.A., Carvalho-Neta, R.N.F., 2021. Sediment contaminant levels and multibiomarker approach to assess the health of catfish *Sciades herzbergii* in a harbor from the northern Brazilian Amazon. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 208, 111540. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111540>.
- Queiroz, J.B.M., Oliveira, A.R.G.D., Costa, K.G.D., Brito, E.P., Fernandes, F.D.D.S., Nunes, Z.M.P., Koenig, M.L., Pereira, L.C.C., Da Costa, R.M., 2022. Phytoplankton of the shipping sector of São Marcos Bay (Amazon Coast): A potential risk area for the establishment of non-indigenous species. *Reg. Stud. Mar. Sci.* 49, 102121. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2021.102121>.
- Rai, S., Rajashekhar, M., 2014. Seasonal assessment of hydrographic variables and phytoplankton community in the Arabian sea waters of Kerala, Southwest coast of India. *Braz. J. Oceanogr.* 62, 279–293. <https://doi.org/10.1590/S1679-87592014069906204>.
- Ramaiah, Neelam, Ramaiah, N., Nair, V.R., 1998. Phytoplankton characteristics in a polluted Bombay Harbour-Thana-Bassein creek estuarine complex. *IJMS Vol2734 Sept. Dec.* 1998.
- Ramírez-Romero, E., Molinero, J.C., Sommer, U., Salhi, N., Kéfi - Daly Yahia, O., Daly Yahia, M.N., 2020. Phytoplankton size changes and diversity loss in the southwestern Mediterranean Sea in relation to long-term hydrographic variability. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 235, 106574. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2019.106574>.
- Rodrigues, M., Cravo, A., Freire, P., Rosa, A., Santos, D., 2020. Temporal assessment of the water quality along an urban estuary (Tagus estuary, Portugal). *Mar. Chem.* 223, 103824. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2020.103824>.
- Rodríguez-Gálvez, S., Macías, D., Prieto, L., Ruiz, J., 2023. Top-down and bottom-up control of phytoplankton in a mid-latitude continental shelf ecosystem. *Prog. Oceanogr.* 217, 103083. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2023.103083>.
- Ryan, J.P., Kudela, R.M., Birch, J.M., Blum, M., Bowers, H.A., Chavez, F.P., Doucette, G.J., Hayashi, K., Marin III, R., Mikulski, C.M., Pennington, J.T., Scholin, C.A., Smith, G.J., Woods, A., Zhang, Y., 2017. Causality of an extreme harmful algal bloom in Monterey Bay, California, during the 2014–2016 northeast Pacific warm anomaly. *Geophys. Res. Lett.* 44, 5571–5579. <https://doi.org/10.1002/2017GL072637>.
- Saifullah, A.S.M., Kamal, A.H.M., Idris, M.H., Rajae, A.H., 2019. Community composition and diversity of phytoplankton in relation to environmental variables and seasonality in a tropical mangrove estuary. *Reg. Stud. Mar. Sci.* 32, 100826. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2019.100826>.
- Samaritano, L., Chagas, F.M., Bernardino, J., Siegle, E., Tessler, M.G., Uemura, S., 2013. Hydrodynamic modeling over a sand wave field at São Marcos Bay, Brazil.
- Santos, V.H.M.D., Dias, F.J.D.S., Dottori, M., Torres, A.R., Santos, R.L., Soares, R.D.A., Ribeiro, J.C.M., Serejo, J.H.F., Lima, H.P., Azevedo, I.H.R., 2023. Investigation of physical properties and suspended particulate matter discharge in a macrotidal estuary at the Amazon-semiarid transition zone. *Reg. Stud. Mar. Sci.* 67, 103194. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2023.103194>

- Sarker, S., Hossain, Md.S., Sonia, M.I., Huda, A.N.M.S., Riya, S.C., Das, N., Liyana, E., Basak, S.C., Kabir, Md.A., 2023. Predicting the impacts of environmental variability on phytoplankton communities of a sub-tropical estuary. *J. Sea Res.* 194, 102404. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2023.102404>.
- Sathishkumar, R.S., Sundaramanickam, A., Mohanty, A.K., Sahu, G., Ramesh, T., Balachandar, K., Nithin, A., Surya, P., Silambarasan, K., 2022. Seasonal assessment of the trophic status in the coastal waters adjoining Tuticorin harbor in relation to water quality and plankton community in the Gulf of Mannar, India. *Oceanologia* 64, 749–768. <https://doi.org/10.1016/j.oceano.2022.07.002>.
- Shannon, C.E., Weaver, W., 1949. *The Mathematical Theory of Communication*. University of Illinois Press, Urbana.
- Silva, B.J. da, Lima, C.A. de, Melo, P.W. de, Malinconico, N., Gaspar, F.L., Araújo, M.E. de, Montes, M. de J.F., 2022. Assessment of the trophic status in a tropical estuarine system. *Ocean Coast. Res.* 70, e22030. <https://doi.org/10.1590/2675-2824070.21051bjds>.
- Satham, P.J., 2012. Nutrients in estuaries--an overview and the potential impacts of climate change. *Sci. Total Environ.* 434, 213–227. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.09.088>
- Strickland, J.D.H., Parsons, T.R., 1972. *A Practical Handbook of Seawater Analysis*. Fisheries Research Board of Canada, Ottawa (ON), p. 205 J. C. Stevenson and J. Watson, editors vol. 167 (2).
- Suteja, Y., Dirgayusa, I.G.N.P., Afdal, Cordova, M.R., Rachman, A., Rintaka, W.E., Takarina, N.D., Putri, W.A.E., Isnaini, Purwiyanto, A.I.S., 2021. Identification of potentially harmful microalgal species and eutrophication status update in Benoa Bay, Bali, Indonesia. *Ocean Coast. Manag.* 210, 105698. <https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2021.105698>.
- Sweet, J.A., Bargu, S., Morrison, W.L., Parsons, M., Pathare, M.G., Roberts, B.J., Soniat, T.M., Stauffer, B.A., 2022. Phytoplankton dynamics in Louisiana estuaries: Building a baseline to understand current and future change. *Mar. Pollut. Bull.* 175, 113344. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2022.113344>.
- Tavares, J.L., Calado, A.L.A., Fontes, R.F.C., 2014. Estudos iniciais para uso do Índice Trix Ppara análise do nível de eutrofização no estuário do rio Potengi – Natal – RN - Brasil. *Rev. AIDIS Ing. Cienc. Ambient. Investig. Desarro. Práctica* 297–308.
- Teutschbein, C., Sponseller, R.A., Grabs, T., Blackburn, M., Boyer, E.W., Hytteborn, J.K., Bishop, K., 2017. Future Riverine Inorganic Nitrogen Load to the Baltic Sea From Sweden: An Ensemble Approach to Assessing Climate Change Effects. *Glob. Biogeochem. Cycles* 31, 1674–1701. <https://doi.org/10.1002/2016GB005598>.
- Thrane, J.-E., Hessen, D.O., Andersen, T., 2016. The impact of irradiance on optimal and cellular nitrogen to phosphorus ratios in phytoplankton. *Ecol. Lett.* 19, 880–888. <https://doi.org/10.1111/ele.12623>.
- Tomas C. R., 1997. *Identifying marine phytoplankton*. Academic press, Harcourt Brace and Company, Toronto. Pp. 858.

- Torres Franco, A., Alatrística-Góngora, G., Guzmán-Rodríguez, N., Calizaya, J., Mota, C., Figueredo, C., 2019. Physicochemical and diatom trophic state indexes: A complementary approach for improving water sustainability in a high Andean urban stream. *Ecohydrol. Hydrobiol.* 19, 577–587. <https://doi.org/10.1016/j.ecohyd.2019.01.007>.
- Toseland, A., Daines, S.J., Clark, J.R., Kirkham, A., Strauss, J., Uhlig, C., Lenton, T.M., Valentin, K., Pearson, G.A., Moulton, V., Mock, T., 2013. The impact of temperature on marine phytoplankton resource allocation and metabolism. *Nat. Clim. Change* 3, 979–984. <https://doi.org/10.1038/nclimate1989>.
- UNESCO. 1966. Determination of photosynthetic pigments in sea waters. Report of SCOR/UNESCO working group 17 with meat from 4 to 6 June 1964. (Monographs on Oceanology Methodology), Paris, UNESCO.
- Utermöhl, H., 1958. Zur Vervollkommnung der quantitativen. Phytoplankton Methodik. *Mitt. Int. Verein. Theor. Angew. Limnology and Oceanography.* 9, 1–38.
- Valentin, J. L. 2000. *Ecologia numérica*. Rio de Janeiro. Interciência, p. 117.
- Verlecar, X.N., Desai, S.R., Sarkar, A., Dalal, S.G., 2006. Biological indicators in relation to coastal pollution along Karnataka coast, India. *Water Res.* 40, 3304–3312. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.06.022>.
- Villafañe, V.E., Reid, F.M.H., 1995. Métodos de microscopia para la cuantificación del fitoplancton. In: Alvear, K., Ferrario, M.E., Oliveira Filho, E.C., Sars, E. (Eds.), *Manual de métodos ficológicos*. Universidad de Concepción, Chile, pp. 169–185.
- Vollenweider, R.A., Giovanardi, F., Montanari, G., Rinaldi, A., 1998. Characterization of the trophic conditions of marine coastal waters with special reference to the NW Adriatic Sea: proposal for a trophic scale, turbidity and generalized water quality index. *Environmetrics* 9, 329–357. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-095X\(199805/06\)9:3<329::AID-ENV308>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-095X(199805/06)9:3<329::AID-ENV308>3.0.CO;2-9).
- Vossel, H., Roeser, P., Litt, T., Reed, J.M., 2018. Lake Kinneret (Israel): New insights into Holocene regional palaeoclimate variability based on high-resolution multi-proxy analysis. *The Holocene* 28, 1395–1410. <https://doi.org/10.1177/0959683618777071>.
- Wild-Allen, K., Skerratt, J., Whitehead, J., Rizwi, F., Parslow, J., 2013. Mechanisms driving estuarine water quality: A 3D biogeochemical model for informed management. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 135, 33–45. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2013.04.009>.
- Wolanski, E., Elliott, M., 2015. *Estuarine Ecohydrology: An Introduction*. Elsevier, Amsterdam, p. 322.
- Wood, S.N., 2011. Fast stable restricted maximum likelihood and marginal likelihood estimation of semiparametric generalized linear models. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Stat. Methodol.* 73, 3–36. <https://doi.org/10.1111/j.1467-9868.2010.00749.x>.
- Wu, H., Deng, B., Yuan, R., Hu, J., Gu, J., Shen, F., Zhu, J., Zhang, J., 2013. Detiding Measurement on Transport of the Changjiang-Derived Buoyant Coastal Current. *J. Phys. Oceanogr.* 43, 2388–2399. <https://doi.org/10.1175/JPO-D-12-0158.1>.

- Xiao, L.-J., Wang, T., Hu, R., Han, B.-P., Wang, S., Qian, X., Padisák, J., 2011. Succession of phytoplankton functional groups regulated by monsoonal hydrology in a large canyon-shaped reservoir. *Water Res.* 45, 5099–5109. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.07.012>.
- Xu, S., Liu, Y., Fan, J., Xiao, Y., Qi, Z., Lakshmikandan, M., 2022. Impact of salinity variation and silicate distribution on phytoplankton community composition in Pearl River estuary, China. *Ecohydrol. Hydrobiol.* 22, 466–475. <https://doi.org/10.1016/j.ecohyd.2022.01.004>.
- Yvon-Durocher, G., Allen, A.P., Cellamare, M., Dossena, M., Gaston, K.J., Leitao, M., Montoya, J.M., Reuman, D.C., Woodward, G., Trimmer, M., 2015. Five Years of Experimental Warming Increases the Biodiversity and Productivity of Phytoplankton. *PLOS Biol.* 13, e1002324. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002324>.
- Zapata, C., Puente, A., García, A., Garcia-Alba, J., Espinoza, J., 2018. Assessment of ecosystem services of an urbanized tropical estuary with a focus on habitats and scenarios. *PLOS ONE* 13, e0203927. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203927>.

6 CAPÍTULO 4**Desenvolvimento de primers *in silico* para eDNA como ferramenta de monitoramento da comunidade fitoplanctônica em um Complexo Estuarino na Costa Amazônica**

Revista Observatorio de la Economía Latinoamericana (Qualis A4)

Status: Publicado

Desenvolvimento de primers *in silico* para eDNA como ferramenta de monitoramento da comunidade fitoplanctônica em um Complexo Estuarino na Costa Amazônica

Development of *in silico* primers for eDNA as a tool for monitoring the phytoplankton community in an Estuarine Complex on the Amazonian Coast

Desarrollo de primers *in silico* para eDNA como herramienta para el monitoreo de la comunidad de fitoplancton en un Complejo Estuarino de la Costa Amazónica

DOI: 10.55905/oelv22n7-215

Receipt of originals: 06/14/2024

Acceptance for publication: 07/05/2024

Jordana Adorno Furtado

Doutoranda em Biodiversidade e Biotecnologia (BIONORTE)
Instituição: Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)
Endereço: São Luís, Maranhão, Brasil
E-mail: jordana1adorno@gmail.com

Dandinaura Ferreira Silva

Graduanda em Ciências Biológicas
Instituição: Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)
Endereço: São Luís, Maranhão, Brasil
E-mail: dandinauraferreira@gmail.com

Nivia Sandiele de Melo Sousa

Mestranda em Ecologia e Conservação da Biodiversidade
Instituição: Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)
Endereço: São Luís, Maranhão, Brasil
E-mail: niviasamelo@gmail.com

Vinicius Henrique Maciel dos Santos

Doutorando em Geologia e Geoquímica
Instituição: Universidade Federal do Pará (UFPA)
Endereço: Belém, Pará, Brasil
E-mail: macielviniciusoc@gmail.com

Leticia Freitas Nascimento

Graduanda em Ciências Biológicas
Instituição: Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)
Endereço: São Luís, Maranhão, Brasil
E-mail: leticiafrenasc16@gmail.com

Marcello Soares Santos Filho

Graduando em Ciências Biológicas
Instituição: Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)
Endereço: São Luís, Maranhão, Brasil
E-mail: marcello.s.santos.f@gmail.com

Hanna Gabriely Pinto Gonçalves

Doutoranda em Biodiversidade e Biotecnologia (BIONORTE)

Instituição: Universidade Federal do Maranhão (UFMA)
Endereço: São Luís, Maranhão e Brasil
E-mail: hanna.gabriely@discente.ufma.br

Ligia Tchaicka

Doutora em Genética e Biologia Molecular
Instituição: Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)
Endereço: São Luís, Maranhão, Brasil
E-mail: ligia.tchaicka@uemanet.uema.br

RESUMO

Este estudo teve como objetivo selecionar iniciadores para aplicação em análises de metabarcoding (eDNA), visando o monitoramento da comunidade fitoplanctônica em um Complexo Estuarino na Costa Amazônica. Inicialmente, foi realizado um levantamento bibliográfico de trabalhos publicados entre 2005 e 2023 nas principais bases de dados (SciELO, Web of Science, ScienceDirect e Google Scholar) sobre as espécies fitoplanctônicas da região. Após isso, foi realizada a busca das sequências de referência para as espécies registradas, com foco nos genes ribossomais 16S, 18S, 23S e no gene mitocondrial Citocromo Oxidase Subunidade I (COI), contidas nos bancos genômicos (GenBank, SILVA e BOLD Systems). Para alinhar as sequências, foi usado o software BioEdit e, para avaliar a qualidade dos primers desenvolvidos, foi utilizada a ferramenta online OligoAnalyzer 3.1. Os resultados mostraram que o filo Bacillariophyta foi o mais representativo em número de espécies e sequências disponíveis. Dos marcadores escolhidos, o gene 18S ribossomal obteve a maior riqueza de sequências depositadas nos bancos de dados, especialmente no GenBank. Cinco conjuntos de primers (DFS-F1, DFS-F2, DFS-F3, DFS-F4 e DFS-F5) foram desenhados *in silico* e validados virtualmente, apresentando entre 19 e 22 pares de bases (pb). As temperaturas de fusão (T_{melting}) variaram entre 55,1°C e 58°C, e a concentração de GC% variou de 40,91% a 57,89%. Portanto, esses resultados colaboram com a literatura sobre protocolos de eDNA, auxiliando na escolha do marcador molecular e dos primers mais adequados para a comunidade fitoplanctônica, aumentando a eficiência e rapidez do trabalho.

Palavras-chave: Desenho de primers, Banco de dados, eDNA, Fitoplâncton

ABSTRACT

This study aimed to select primers for application in metabarcoding (eDNA) analysis to monitor the phytoplankton community in an Estuarine Complex on the Amazon Coast. Initially, a bibliographical survey of works published between 2005 and 2023 in the principal databases (SciELO, Web of Science, ScienceDirect, and Google Scholar) on phytoplanktonic species in the region was carried out. After this, a search for reference sequences for the recorded species was carried out, focusing on the ribosomal genes 16S, 18S, 23S and the mitochondrial gene Cytochrome Oxidase Subunit I (COI), contained in genomic banks (GenBank, SILVA, and BOLD Systems). To align the sequences, we used the BioEdit software, and to assess the quality of the developed primers, we utilized the OligoAnalyzer 3.1 online tool. The results showed that the phylum Bacillariophyta was the most representative regarding the number of species and sequences available. Of the chosen markers, the 18S ribosomal gene had the highest wealth of sequences deposited in the databases, especially in GenBank. Five sets of primers (DFS-F1, DFS-F2, DFS-F3, DFS-F4, and DFS-F5) were designed *in silico* and virtually validated, presenting between 19 and 22 base pairs (bp). The melting temperatures (T_{melting}) varied between 55.1°C and 58°C, and the GC% concentration ranged from 40.91% to 57.89%. Therefore, these results collaborate with the literature on eDNA protocols, helping to choose

the most suitable molecular marker and primers for the phytoplankton community, increasing the efficiency and speed of the work.

Keywords: Primer design, Database, eDNA, Phytoplankton

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue seleccionar primers para su aplicación en análisis de metabarcodificación (eDNA) para monitorear la comunidad fitoplanctónica en un Complejo Estuarino de la Costa Amazónica. Inicialmente, se realizó un relevamiento bibliográfico de trabajos publicados entre 2005 y 2023 en las principales bases de datos (SciELO, Web of Science, ScienceDirect y Google Scholar) sobre especies fitoplanctónicas de la región. A continuación, se realizó una búsqueda de secuencias de referencia para las especies registradas, centrándose en los genes ribosómicos 16S, 18S, 23S y el gen mitocondrial Citocromo Oxidasa Subunidad I (COI), contenidos en bases de datos genómicas (GenBank, SILVA y BOLD Systems). Se utilizó el programa BioEdit para alinear las secuencias y la herramienta en línea OligoAnalyzer 3.1 para evaluar la calidad de los primers desarrollados. Los resultados mostraron que el filo Bacillariophyta era el más representativo en cuanto al número de especies y secuencias disponibles. De los marcadores elegidos, el gen ribosómico 18S era el que contaba con mayor riqueza de secuencias depositadas en bases de datos, especialmente en GenBank. Se diseñaron *in silico* y validaron virtualmente cinco conjuntos de primers (DFS-F1, DFS-F2, DFS-F3, DFS-F4 y DFS-F5), con entre 19 y 22 pares de bases (pb). Las temperaturas de fusión oscilaron entre 55,1°C y 58°C, y la concentración de GC% entre 40,91% y 57,89%. Por lo tanto, estos resultados contribuyen a la literatura sobre protocolos de eDNA, ayudando a elegir el marcador molecular y los primers más adecuados para la comunidad fitoplanctónica, aumentando la eficiencia y la rapidez del trabajo.

Palabras clave: Diseño de primers, Base de datos, eDNA, Fitoplancton

1 INTRODUÇÃO

O fitoplâncton atua como o principal produtor primário em ecossistemas costeiros, pois realiza a ciclagem de nutrientes e contribui diretamente para a estabilização funcional e a preservação do equilíbrio biológico desses ambientes (Sun *et al.*, 2020; Yoon *et al.*, 2024). Além disso, é um excelente indicador de alterações na qualidade da água (Bilbao *et al.*, 2023; Raveh *et al.*, 2019), uma vez que é altamente sensível a perturbações quando comparado a outros organismos aquáticos (Lee *et al.*, 2023; Rocha *et al.*, 2023).

A microscopia óptica tem sido comumente a técnica mais utilizada para investigar a diversidade do fitoplâncton (Agirbas *et al.*, 2015; Lee; Won; Baek, 2020). Porém, essa técnica apresenta algumas limitações devido à falta de características diagnósticas claras, conhecimento taxonômico limitado e tempo prolongado de análise, resultando muitas vezes em informações insuficientes sobre a diversidade (Barsanti *et al.*, 2021; Gaonkar; Campbell, 2024).

O rápido crescimento das tecnologias de sequenciamento de alto rendimento possibilitou a utilização da taxonomia molecular como uma opção viável para os inventários morfotaxonômicos. A base para a utilização dessas metodologias de teste baseadas em DNA se

fundamenta na ideia de que é possível identificar de maneira confiável os táxons com base em um fragmento específico de seu genoma, conhecido como "código de barras de DNA" (Pawlowski *et al.*, 2022; Taberlet *et al.*, 2012;).

O metabarcoding possibilita a identificação simultânea de táxons em amostras ambientais com base em seu DNA, utilizando o sequenciamento de genes marcadores específicos (Keck *et al.*, 2017; Zimmermann *et al.*, 2014). Esse método gera extensas informações sobre biodiversidade, pois é capaz de identificar espécies em diversas fases de vida, além de espécies crípticas e aquelas frequentemente descartadas pelos métodos tradicionais (Comtet *et al.*, 2015).

Com o avanço da bioinformática, tornou-se viável o desenvolvimento de ferramentas que oferecem suporte às pesquisas atuais, incluindo a concepção de primers para PCR com base no *The National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (Morais *et al.*, 2019; Muniz *et al.*, 2020). Os *primers* são sequências específicas de nucleotídeos que podem se ligar às suas sequências alvo de DNA durante a PCR (Pelt-Verkuil; Van Belkum; Hays, 2008). A finalidade da PCR *in silico* é antecipar quais produtos de PCR serão sintetizados a partir de um ou vários modelos de DNA, utilizando primers oligonucleotídicos já concebidos (Kalendar *et al.*, 2017), economizando tempo e custos adicionais (Schuler, 1997).

O Complexo Estuarino de São Marcos (CESM) caracteriza-se como um sistema de grande relevância na Costa Amazônica. Neste ambiente está inserido o Porto do Itaqui, um dos portos públicos mais importantes da América Latina, que tem sofrido fortes impactos decorrentes das atividades antrópicas (Jesus *et al.*, 2020; Oliveira *et al.*, 2019; Ribeiro *et al.*, 2023). No entanto, estudos que estabeleçam iniciadores de PCR com bom desempenho aplicados à comunidade fitoplanctônica são inexistentes.

Nesse sentido, o presente estudo tem como objetivo principal o desenvolvimento *in silico* de primers para aplicação em análises de metabarcoding (eDNA), que auxiliem no monitoramento da comunidade fitoplanctônica em um Complexo Estuarino na Costa Amazônica.

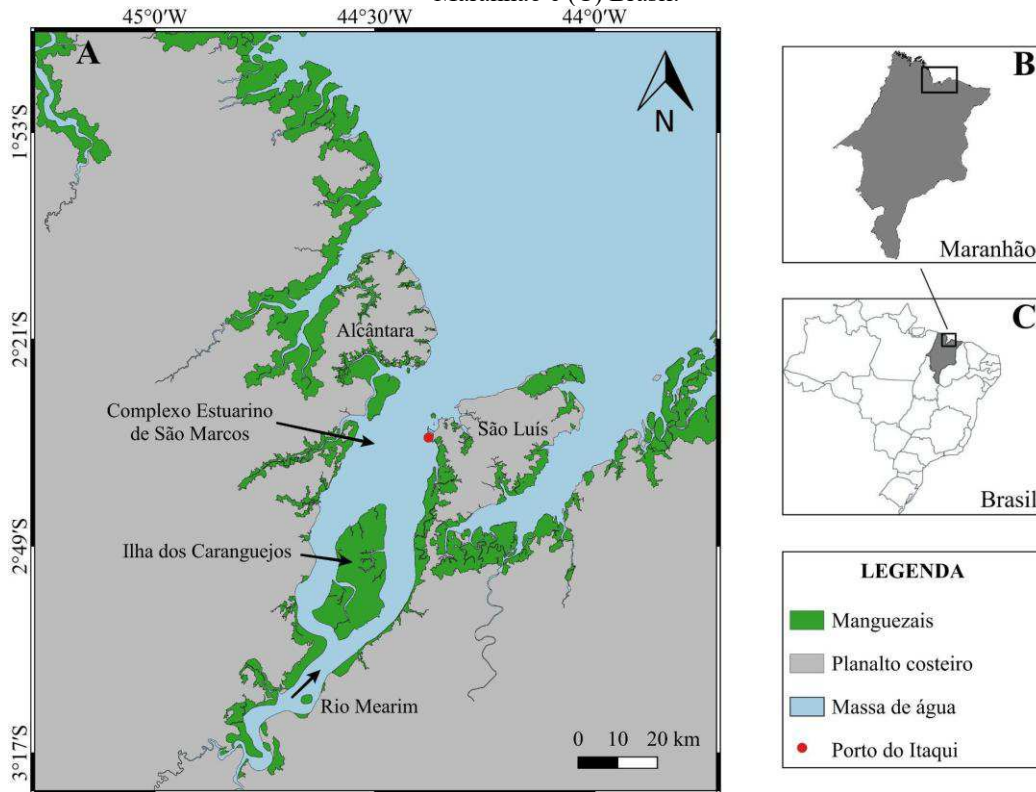
2 METODOLOGIA

2.1 ÁREA DE ESTUDO

O CESM é caracterizado como uma extensa área estuarina localizada no extremo norte do Estado do Maranhão, Brasil (Figura 1). Esse ambiente está localizado em uma região conhecida como Costa dos Manguezais das Macromarés Amazônicas (CMMA), inserida entre

os estados brasileiros do Amapá e Maranhão (Diniz *et al.*, 2019). Possui orientação principal NE-SW, com uma largura de 50 km na porção norte, 15 km na região central (entre Alcântara e a Ponta de São Marcos), 25 km na altura da ilha dos Caranguejos e 4 km na foz do Rio Mearim (El-Robrini *et al.*, 2006).

Figura 1. Localização da área de estudo: (A) Complexo Estuarino de São Marcos - CESH; (B) estado do Maranhão e (C) Brasil.



Fonte: Elaborado pelos autores (2024).

2.2 LISTA DE ESPÉCIES

Para este estudo, foi realizado um levantamento de trabalhos publicados entre 2005 e 2023 nas bases de dados SciELO (<https://search.scielo.org/>), Web of Science (<https://webofknowledge.com>), ScienceDirect (<https://www.sciencedirect.com/>) e Google Scholar (<https://scholar.google.com.br/>). Os descritores utilizados foram “fitoplâncton”, “Baía de São Marcos” e “Complexo Estuarino de São Marcos”, e suas respectivas traduções para o inglês. Os critérios de inclusão consideraram não só a artigos e notas científicas, mas também monografias, dissertações, teses, livros, capítulos e estudos publicados em anais de eventos. A classificação taxonômica das espécies de fitoplâncton foi atualizada seguindo a base de dados internacional AlgaeBase (Guiry; Guiry, 2023).

2.3 LEVANTAMENTO DE SEQUÊNCIAS

Com base na lista de espécies obtidas, foi realizada a busca das sequências de referência focada nos genes ribossomais 16S, 18S, 23S e no gene mitocondrial Citocromo Oxidase Subunidade I (COI), nos principais bancos de dados genômicos: GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), SILVA (<https://www.arb-silva.de/>) e BOLD Systems (<https://www.boldsystems.org/>).

2.4 DESENHO DE INICIADORES

As sequências obtidas foram convertidas para o formato FASTA no próprio sistema do banco de dados e, em seguida, foram baixadas para um software de alinhamento. Para isso, utilizou-se o software BioEdit Sequence Alignment Editor, versão 7.2.6t (Hall, 1999). Inicialmente, as sequências foram agrupadas de acordo com a ordem a que as espécies pertenciam, cada ordem foi alinhada e editada para melhor padronização das sequências. Posteriormente, esses alinhamentos foram agrupados em um único database no próprio software. Por fim, os gaps das extremidades foram removidos pois a ferramenta “Primer Blast” não permite o desenho dos primers com a presença de gaps.

Para o desenho dos primers, foram estabelecidas espécies-alvo para cada ordem com base na maior disponibilidade de dados, onde os primers foram desenvolvidos com base na região 18S. Os desenhos dos primers foram realizados na ferramenta "Primer Blast" (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) do NCBI com os números de acessos de cada sequências alvo usado como PCR Template. Para isso, alguns parâmetros foram alterados na plataforma, são eles - PCR product size: Min: 70 e Max: 300; o Database: custom (database produzido pelos autores); Max target amplicon size: 400. Em Advanced parameters foram alterados - Primer size: Min:18, Opt: 20 e Max: 24 e em Primer GC content (%): o Min: 40.0 e Max: 60.0. Nos demais parâmetros, foram usados o default da plataforma.

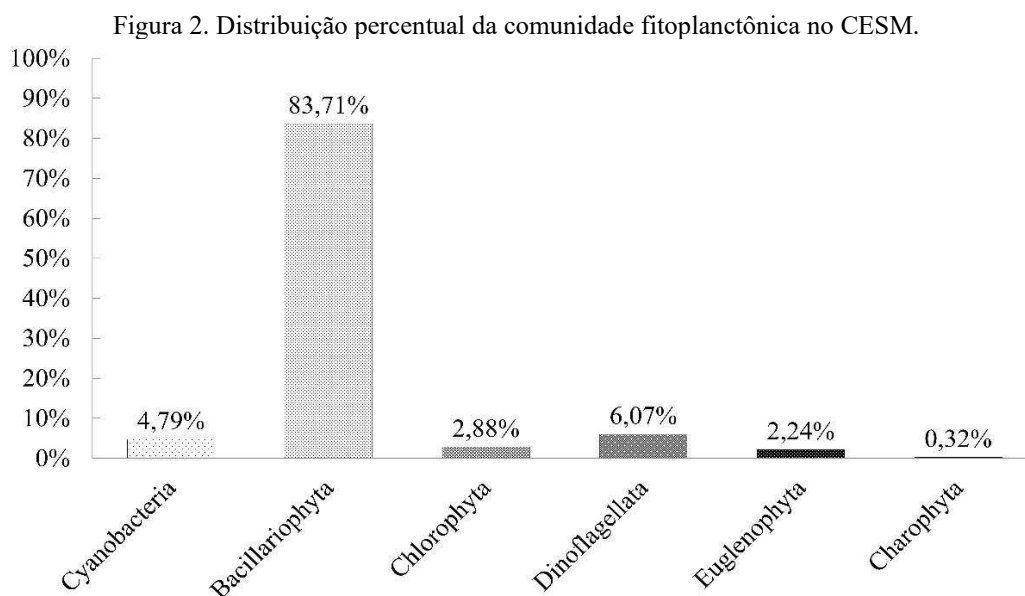
2.5 ANÁLISE DE QUALIDADE E VALIDAÇÃO *IN SILICO*

Para avaliar a qualidade dos primers desenvolvidos antes da PCR *in silico*, foi utilizada a ferramenta online OligoAnalyzer 3.1. Nessa etapa, foram avaliadas a possibilidade de formação de hairpins, self-dímeros e a temperatura de melting (°C). Posteriormente, os primers foram delimitados considerando a quantidade de guanina e citosina em suas extremidades, visando aumentar a estabilidade durante as etapas de anelamento e evitar sua dissociação (Marinho, 2021).

Para a validação dos primers foi realizado uma PCR *in silico* na ferramenta “BLAST” (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) do NCB. Vale salientar que a busca pelos *primers* para análise da cobertura de espécies da PCR *in silico* foi realizada em dois processos distintos. Primeiramente, foi realizada uma PCR específica para as espécies-alvo. Para isso, foi utilizado a Database “Nucleotide collection (nt)” e foram adicionadas na seção “Organism” a espécie-alvo, a ordem à qual ela pertence e as outras espécies da mesma ordem. Posteriormente, foi realizada uma PCR geral, na qual foi feita uma única busca para cada primer, incluindo todas as ordens e todas as espécies com sequências disponíveis.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O levantamento realizado contabilizou 313 táxons referentes à comunidade fitoplanctônica. Esses táxons estiveram distribuídos entre os filos Bacillariophyta (83,71%), Dinoflagellata (6,07%), Cyanobacteria (4,79%), Chlorophyta (2,88%), Euglenophyta (2,24%) e Charophyta (0,32%) (Figura 2). As diatomáceas (Bacillariophyta) foram as mais representativas com 262 táxons, sendo os gêneros *Chaetoceros* (23 táxons), *Nitzschia* (18 táxons) e *Coscinodiscus* (16 táxons) os mais abundantes.



Fonte: Elaborado pelos autores (2024).

O filo Dinoflagellata apresentou 19 espécies, sendo o gênero *Triplos* o mais abundante com 7 espécies. Euglenophyta registrou 7 espécies, com os gêneros mais expressivos sendo *Euglena*, *Phacus* e *Trachelomonas*, cada um com 2 espécies. O filo Cyanobacteria apresentou

15 espécies, das quais o gênero *Oscillatoria* se destacou com 3 espécies. Chlorophyta apresentou 9 espécies, sem nenhum gênero expressivo, e Charophyta apresentou apenas 1 espécie.

As diatomáceas constituíram o grupo dominante em número de táxons, uma vez que são comumente encontradas em ambientes costeiros e contribuem com cerca de 20% da produção primária líquida anual em escala global (Field *et al.*, 1998; Singh *et al.*, 2024). Tais organismos ocorrem não só pela diversidade do grupo, mas por serem eurialinas e fornecerem uma rápida resposta mediante alterações ambientais (Aquino *et al.*, 2015). Esta dominância também foi observada em outros estudos realizados em estuários amazônicos (Carvalho Neto *et al.*, 2023; Cavalcanti *et al.*, 2020; Cavalcanti-Lima *et al.*, 2023; Queiroz *et al.*, 2022). Dentre os gêneros de diatomáceas identificados, os mais abundantes foram *Chaetoceros*, *Nitzschia* e *Coscinodiscus*, resultados similares foram registrados por Cavalcanti *et al.* (2018), Gama *et al.* (2011) e Matos *et al.* (2012) na mesma região.

Conforme Carvalho Neto *et al.* (2023), a dominância desses gêneros demonstra a similaridade na comunidade fitoplanctônica encontrada em estuários amazônicos, ainda que apresentem oscilações no número de espécies. Esse fator é influenciado pelas características particulares de cada ambiente, como a morfologia, aporte marinho e/ou limnético que ele possui.

Quanto às sequências obtidas para as espécies identificadas, o filo Bacillariophyta foi o mais representativo, com 119 táxons registrando a presença de sequências. Para o filo Dinoflagellata, 15 táxons apresentaram sequências disponíveis, seguido por Euglenophyta e Cyanobacteria, cada um com 5 espécies. Chlorophyta obteve sequências disponíveis para 4 táxons, enquanto Charophyta contou com apenas 1 espécie com sequência depositada no GenBank.

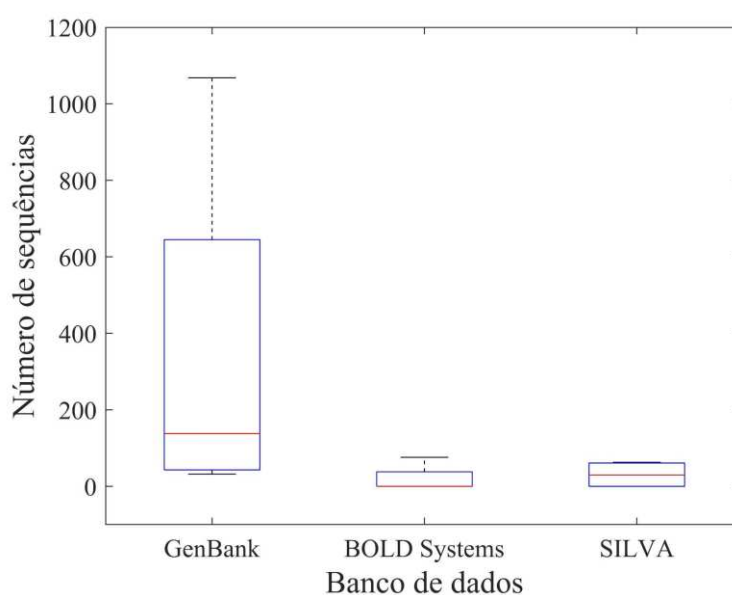
O filo Bacillariophyta apresenta uma das maiores diversidade de espécies dentre os protistas, possuem mais de 200 gêneros e 100.000 espécies (Miettinen, 2018). Essa grande riqueza de espécies e estudos favorece a disponibilidade de sequências nos bancos de dados. Conforme Gaonkar e Campbell (2024), a disponibilidade de bancos de dados de referência completos e validados taxonomicamente é essencial para que os estudos com metabarcoding possam ser eficazes.

Grande parte das sequências de referência disponíveis são para os gêneros mais frequentemente estudados, enquanto as pequenas algas (<5 microns) são pouco caracterizadas e, deste modo, não estão presentes nos bancos de dados de referência (Gaonkar; Campbell, 2024). Atualmente, o desenvolvimento de técnicas de sequenciamento de alto rendimento, integrado aos bancos de dados de sequências de referência aprimorados e bem descritos

taxonomicamente, permitem uma avaliação rápida e econômica da composição fitoplanctônica em nível global (de Vargas *et al.*, 2015).

Através do levantamento de sequências feito nos bancos de dados públicos (GenBank, SILVA e BOLD Systems), foi observado que o GenBank (1376) apresentou a maior riqueza no número de sequências depositadas (Figura 3). Embora o SILVA (122) e o BOLD Systems (76) também contenham sequências, a quantidade obtida é inferior ao GenBank. Além disso, a maior parte das sequências observadas nesses bancos também consta no GenBank. Nesse contexto, as sequências trabalhadas neste estudo foram extraídas majoritariamente dessa biblioteca.

Figura 3. Boxplots de valores de riqueza calculados para os bancos de dados genômicos.



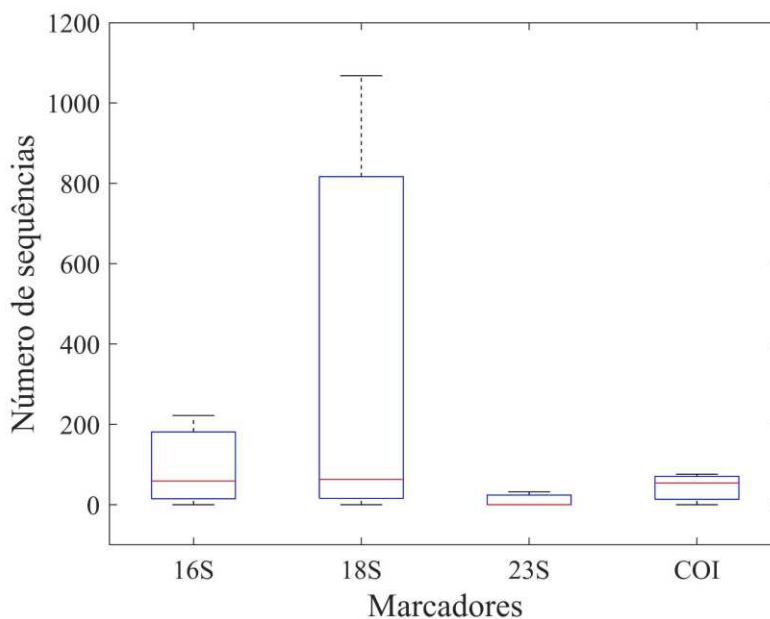
Fonte: Elaborado pelos autores (2024).

Segundo Patel; Scheible; Meiklejohn (2023), o GenBank é o maior banco de dados de sequências públicas do mundo, atualmente possuindo mais de 89 milhões de sequências na coleção Nucleotide. Os recursos disponíveis nessa base de dados a tornam uma ferramenta promissora na preparação do banco de dados a ser utilizado no metabarcoding (Ardura, 2019), uma vez que essa é a base mais completa em número de marcadores e espécies (NCBI, 2016).

Comparando a quantidade de espécies com sequências disponíveis ao total de espécies obtidas através do levantamento, foi observado que menos da metade das espécies tem sequências registradas. Assim, ainda que o protocolo de DNA Barcoding seja eficaz, nota-se que a disponibilidade das sequências de interesse nos bancos de dados é essencial para a identificação de uma espécie. A ausência dessas sequências pode tornar-se, portanto, um fator limitante em estudos que utilizam essa técnica (Cerutti-Pereyra *et al.*, 2012; Kolmann *et al.*, 2017; Martins, 2021).

O gene 18S ribossomal obteve a maior riqueza de sequências depositadas nos bancos de dados, especialmente no GenBank (Figura 4). Tais resultados corroboram os estudos realizados por Countway *et al.* (2005), Gong e Marchetti (2019) e de Vargas *et al.* (2015), que ressaltam que o gene 18S rRNA tem se destacado como o marcador mais comumente utilizado em estudos relacionados à comunidade de protistas eucariontes, tanto em ecossistemas aquáticos quanto terrestres, devido à sua alta especificidade e preservação da sequência.

Figura 4. Boxplots de valores de riqueza calculados para os marcadores analisados.



Fonte: Elaborado pelos autores (2024).

No que diz respeito aos marcadores, o gene 18S é altamente conservador em plantas e animais superiores e sua taxa evolutiva é considerada adequada em diatomáceas (Liu *et al.*, 2020). Segundo Kooistra *et al.* (2010), o gene 18S rDNA é amplamente utilizado como marcador para identificação e delineamento de espécies devido às suas regiões conservadas e hipervariáveis (V1-V9). No entanto, estudos realizados por Clarke *et al.* (2017), Zhang *et al.* (2018) e Wangenstein *et al.* (2018) indicam que o 18S possui uma menor capacidade de recuperação taxonômica quando comparado a outro marcador universal. Assim, Giebner *et al.* (2020) e Tang *et al.* (2012) recomendam seu uso para discriminação de níveis taxonômicos mais elevados. Contudo, de acordo com Leite *et al.* (2021), essas comparações são limitadas devido ao propósito para o qual os marcadores são propostos, à biblioteca de referência de onde são extraídos e aos limiares utilizados.

Vale ressaltar que, durante a PCR específica para cada ordem, apenas a espécie-alvo *Plagiogramma sp.* não revelou similaridade com nenhum outro organismo fitoplanctônico. Na

PCR geral, *Plagiogramma* sp., *Euglena* sp. e *Ankistrodesmus* sp. não apresentaram boa cobertura de espécies dentro da mesma ordem ou de ordens diferentes.

Os melhores primers foram selecionados com base na capacidade de identificar um maior número de ordens distintas na PCR *in silico* (Tabela 1). Desse modo, eles conseguiram identificar entre 40 e 81 espécies de ordens diferentes e amplificaram fragmentos de 100 a 300 pb. Além disso, os primers selecionados possuem um tamanho entre 19 e 22 pb, temperaturas de fusão (*Melting*) entre 55,1°C e 58°C e uma concentração de GC% variando de 40,91% a 57,89%.

Tabela 1- Descrição dos primers escolhidos.

Primers	Sequência (5'→ 3')	Pares de bases	GC	Melt temp (°C)	Self dimer	Hairpin (°C/kcla.mol ⁻¹)
DFS- F1	TGATTACGTCCTGCCCTTTG (F)	21	52.38	57.3	-6.3	17.9/0.47
	TGACACCAATAAAGGCAACAGT (R)	22	40.91	54.9	-3.14	25.7/-0.04
DFS-F2	TTTGTACACACCGCCCGTC (F)	19	57.89	58.0	-7.55	14.8/0.65
	GTCCAGTAAAGGAACCAGACC (R)	22	54.55	57.2	-4.64	29.9/-0.28
DFS- F3	GCCAGTAGTCATACGCTCGTC (F)	21	57.14	57.3	-4.95	23.5/0.1
	TCACCACATCATCCCGAAGG (R)	21	55.00	56.9	-3.61	44.7/-0.89
DFS-F4	ATTGGAGGGCAAGTCTGGTG (F)	20	55.00	57.5	-3.9	32.2/-0.63
	CACACAATTAGTGCACCGAC (R)	21	55.00	56.3	-5.36	46.2/-1.74
DFS-F5	GGGAGTATGGTCGCAAGATT (F)	21	52.38	56.9	-3.61	43.4/-0.74
	GTCCCTCTAAGAAGTTGCC (R)	20	55.00	55.1	-3.17	16/0.59

Fonte: Elaborado pelos autores (2024).

Tais resultados se assemelham aos registrados por Sharma (2021), que em seu estudo indicou que os melhores resultados são obtidos em temperaturas de melting entre 52 e 60 °C. Muniz *et al.* (2020) destacam que a concentração de GC dos primers projetados está dentro das diretrizes recomendadas, entre 40% e 60%, o que é semelhante aos parâmetros utilizados nos estudos de Kalendar; Lee; Schulman (2011), que investigaram ferramentas para o design de primers *in silico*.

Quanto aos valores dos self-dímeros, a variação ocorreu entre -3,9 e -7,55. O hairpin apresentou, para todas as espécies de fitoplâncton-alvo, valores de temperatura de melting abaixo de 50 °C. Ao observar o Delta G, houve uma variação de -1,74 a 0,65. Esses parâmetros são importantes no desenho de primers, pois evitam desperdício durante a execução de uma PCR *in vitro* (Nascimento, 2021).

4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo revelaram que a comunidade fitoplanctônica do CESM é similar à observada em outros estuários amazônicos, especialmente pela dominância de espécies de diatomáceas em relação aos demais grupos. O filo Bacillariophyta obteve o maior número de sequências disponíveis nos bancos de dados públicos, o que auxilia diretamente na realização de estudos ligados ao metabarcoding.

Os primers desenvolvidos neste estudo (DFS-F1, DFS-F2, DFS-F3, DFS-F4 e DFS-F5) foram eficazes na identificação de fitoplâncton a nível de espécie na região. Apesar de algumas restrições apontadas por autores, o marcador 18S mostrou-se eficiente para a comunidade fitoplanctônica estudada. Esses resultados enriquecem a literatura sobre protocolos eDNA, auxiliando na escolha do marcador molecular e dos primers, tornando o trabalho mais eficiente e prático.

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer ao Laboratório de Biodiversidade Molecular (LaBimol) pelo suporte, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Maranhão (FAPEMA) e ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia (BIONORTE) pelo apoio financeiro, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio acadêmico.

GUIA PARA AUTORES E NORMAS DA REVISTA

<https://ojs.observatoriolatinoamericano.com/ojs/index.php/olel/about/submissions>

REFERÊNCIAS

AGIRBAS, E. *et al.* Phytoplankton community composition in the south-eastern Black Sea determined with pigments measured by HPLC-CHEMTAX analyses and microscopy cell counts. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 95, n. 1, p. 35–52, 2015. <https://doi.org/10.1017/S0025315414001040>

ARDURA, A. Species-specific markers for early detection of marine invertebrate invaders through eDNA methods: gaps and priorities in GenBank as database example. **Journal for Nature Conservation**, v. 47, p. 51-57, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jnc.2018.11.005>

- AQUINO, E. P. *et al.* Phytoplankton in a tropical estuary, Northeast Brazil: composition and life forms. **Check List**, v. 11, p. 1633, 2015. <https://doi.org/10.15560/11.3.1633>
- BARSANTI, L.; BIRINDELLI, L.; GUALTIERI, P. Water monitoring by means of digital microscopy identification and classification of microalgae. **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 23, p. 1443–1457, 2021. <https://doi.org/10.1039/D1EM00258A>
- BILBAO, J. *et al.* Phytoplankton community composition in relation to environmental variability in the Urdaibai estuary (SE Bay of Biscay): Microscopy and eDNA metabarcoding. **Marine Environmental Research**, v. 191, p. 106175, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2023.106175>
- CARVALHO NETO, F. C. M. *et al.* Fitoplâncton do estuário do Emboraí Velho (Nova Olinda - PA). **Observatorio de la Economía Latinoamericana**, v. 21, n. 6, p. 5492-5519, 2023. <https://doi.org/10.55905/oelv21n6-122>
- CAVALCANTI, L.F. *et al.* Structure of microphytoplankton community and environmental variables in a macrotidal estuarine complex, São Marcos Bay, Maranhão – Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 66, p. 283–300, 2018. <https://doi.org/10.1590/s1679-87592018021906603>
- CAVALCANTI, L.F. *et al.* Patterns of phytoplankton structure in response to environmental gradients in a macrotidal estuary of the Equatorial Margin (Atlantic coast, Brazil). **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 245, p.106969, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2020.106969>
- CAVALCANTI-LIMA, L.F. *et al.* Effects of climate, spatial and hydrological processes on shaping phytoplankton community structure and β -diversity in an estuary-ocean continuum (Amazon continental shelf, Brazil). **Journal of Sea Research**, v. 193, p. 102384, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2023.102384>
- CERUTTI-PEREYRA F. *et al.* Identification of Rays through DNA Barcoding: An Application for Ecologists. **PLOS ONE**, v. 7 (6), p. e36479–e36479, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036479>
- CLARKE, L. J. *et al.* Effect of marker choice and thermal cycling protocol on zooplankton DNA metabarcoding studies. **Ecology and Evolution**, v. 7, p. 873 – 883, 2017. <https://doi.org/10.1002/ece3.2667>
- COMTET, T. *et al.* DNA (meta)barcoding of biological invasions: a powerful tool to elucidate invasion processes and help managing aliens. **Biological Invasions**, v. 17, p. 905-922. 2015. <https://doi.org/10.1007/s10530-015-0854-y>
- COUNTWAY, P. D. *et al.* Protistan diversity estimates based on 18S rDNA from seawater incubations in the Western North Atlantic. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 52 (2), p. 95-106, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2005.05202006.x>
- DE VARGAS, C. *et al.* Eukaryotic plankton diversity in the sunlit global ocean. **Science**, v. 348 p. 1261605, 2015. <https://doi.org/10.1126/science.1261605>
- DINIZ, C. *et al.* Brazilian Mangrove Status: Three Decades of Satellite Data Analysis. **Remote Sensing**, v.11, n. 7, p. 808, 2019. <https://doi.org/10.3390/rs11070808>

EL-ROBRINI, M. *et al.* In: MUEHE, D. **Erosão e progradação no litoral brasileiro**. Brasília: MMA, p. 41-86, 2006.

FIELD, C.B. *et al.* Primary production of the biosphere: Integrating terrestrial and oceanic components. **Science**, v. 281, p. 237–240, 1998.

GAMA, L. R. *et al.* Microfitoplâncton das baías do Golfão Maranhense e Litoral Oriental do Estado do Maranhão. **Boletim do Laboratório de Hidrobiologia**, v. 24, n. 1, p. 13–26, 2011.

GAONKAR, C. C.; CAMPBELL, L. A full-length 18S ribosomal DNA metabarcoding approach for determining protist community diversity using Nanopore sequencing. **Ecology and Evolution**, v. 14, 2024. <https://doi.org/10.1002/ece3.11232>

GIEBNER, H. *et al.* Comparing diversity levels in environmental samples: DNA sequence capture and metabarcoding approaches using 18S and COI genes. **Molecular Ecology Resources**, v. 20, p. 333–345, 2020. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13201>

GONG, W.; MARCHETTI, A. Estimation of 18S gene copy number in marine eukaryotic plankton using a next-generation sequencing approach. **Frontiers in Marine Science**, v. 6, p. 219, 2019. <https://doi.org/10.17615/th53-ak73>

GUIRY, M.D.; GUIRY, G.M., 2023. **AlgaeBase**. World-wide electronic publication. National University of Ireland, Galway.

HALL, T.A. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

JESUS, W.B. *et al.* Biomarcadores enzimáticos e histológicos em brânquias de *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Brachyura, Ucidae) indicativos de impactos ambientais em uma região portuária do nordeste do Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, n. 4, p. 1413–1423, 2020. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-11666>

KALENDAR, R.; LEE, D.; SCHULMAN, A. H. Java web tools for PCR, *in silico* PCR, and oligonucleotide assembly and analysis. **Genomics**, v. 98, n. 2, p.137–144, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2011.04.009>

KALENDAR, R. *et al.* FastPCR: An *in silico* tool for fast primer and probe design and advanced sequence analysis. **Genomics**, v. 109 (3-4), p. 312–319, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2017.05.005>

KECK, F. *et al.* Freshwater biomonitoring in the information age. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 15, p. 266–274, 2017. <https://doi.org/10.1002/fee.1490>

KOLMANN, M. A. *et al.* DNA barcoding reveals the diversity of sharks in Guyana coastal markets. **Neotropical Ichthyology**, v. 15, (4), p. e170097, 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/1982-0224-20170097>

KOOISTRA, W. H. *et al.* Comparative molecular and morphological phylogenetic analyses of taxa in the Chaetocerotaceae (Bacillariophyta). **Phycologia**, v. 49, n. 5, p. 471–500, 2010. <https://doi.org/10.2216/09-59.1>

LEE, J. *et al.* Methodological advances and future directions of microalgal bioassays for evaluation of potential toxicity in environmental samples: A review. **Environment International**, v. 173, p. 107869, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2023.107869>

LEE, M.; WON, N.I.; BAEK, S.H. Comparison of HPLC Pigment Analysis and Microscopy in Phytoplankton Assessment in the Seomjin River Estuary, Korea. **Sustainability**, v. 12, n. 4, p. 1675, 2020. <https://doi.org/10.3390/su12041675>

LEITE, B.R. *et al.* Comparing species detection success between molecular markers in DNA metabarcoding of coastal macroinvertebrates. **Metabarcoding and Metagenomics**, v. 5, p. e70063, 2021. <https://doi.org/10.3897/mbmg.5.70063>

LIU, M. *et al.* Diatom DNA barcodes for forensic discrimination of drowning incidents. **FEMS Microbiology Letters**, v. 367, n. 17, 2020. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa145>

MARINHO, E. I. N. **Desenho de primers *in silico* para o gene 16S rRNA**. 2021. 41f. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Ciências Biológicas) - Instituto Federal do Piauí, Campus Pedro II, 2021.

MARTINS, T. O. M. **DNA Barcode e a identificação de espécies de Raias exploradas pela pesca**. 2021. 25 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Bacharelado Interdisciplinar em Ciência e Tecnologia do Mar) - Instituto do Mar, Universidade Federal de São Paulo, Santos, 2021.

MATOS, J. B. *et al.* Caracterização quali-quantitativa do fitoplâncton da zona de arrebentação de uma praia amazônica. **Acta Botanica Brasileira**, v. 26, n. 4, p. 979–990, 2012. <https://doi.org/10.1590/s0102-33062012000400028>

MIETTINEN, A. Diatoms in Arctic regions: Potential tools to decipher environmental changes. **Polar Science**, v. 18, p. 220–226, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.polar.2018.04.001>

MORAIS, R.C.S. **Ensaio de multiplex PCR em tempo real (TaqMan probe) para identificação de Leishmania spp. relacionadas com a etiologia da leishmaniose tegumentar Americana**. 2019. 129f. Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, CPQAM, Recife, 2019.

MUNIZ, H. V. L. *et al.* Desenvolvimento de primers *in silico* de *Mycobacterium tuberculosis* da região 16s para o diagnóstico da tuberculose. **Interfaces Científicas - Saúde e Ambiente**, v. 8, n. 2, p. 77–86, 2021. <https://doi.org/10.17564/2316-3798.2020v8n2p77-86>

NASCIMENTO, J. Í. S. **Identificação e validação *in silico* de potenciais marcadores moleculares para o gênero Leishmania**. 2021. 59f. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Ciências Biológicas) Instituto Federal do Piauí, Campus Pedro II, 2021.

NCBI, 2016. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

OLIVEIRA, S. R. S. D. *et al.* Enzymatic and Histological Biomarkers in *Ucides cordatus* (Crustacea, Decapoda) in an Industrial Port on the North Coast of Brazil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 102, p. 802–810, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00128-019-02594-1>

PATEL, K. K.; SCHEIBLE, M. K. R.; MEIKLEJOHN, K. A. Interlaboratory study to assess the practical utility of OSAC proposed standard 2021-S-0006: Standard for the use of GenBank for taxonomic assignment of wildlife. **Forensic Science International: Animals and Environments**, v. 4, p. 100067, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.fsiae.2023.100067>

PAWLOWSKI, J. *et al.* Environmental DNA metabarcoding for benthic monitoring: A review of sediment sampling and DNA extraction methods. **Science of The Total Environment**, v. 818, p. 151783, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151783>

PELT-VERKUIL, E.; VAN BELKUM, A.; HAYS, J. P. **Principles and technical aspects of PCR amplification**, Springer, 332 pp, 2008.

QUEIROZ, J.B.M. *et al.* Phytoplankton of the shipping sector of São Marcos Bay (Amazon Coast): A potential risk area for the establishment of non-indigenous species. **Regional Studies in Marine Science**, v. 49, p. 102121, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2021.102121>

RAVEH, O. *et al.* Phytoplankton response to N-rich well amelioration brines: a mesocosm study from the southeastern Mediterranean Sea. **Marine Pollution Bulletin**, v. 146, p. 355–365, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.06.067>

RIBEIRO, E. B. *et al.* Gill and hepatic histological alterations in *Sciades herzbergii* resulting from trace element contamination in the Port of São Luiz, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 83, p. e274069, 2023. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.274069>

ROCHA, B.S. *et al.* Assessing resilience and sensitivity patterns for fish and phytoplankton in French lakes. **Global Ecology and Conservation**, v. 43, p. e02458, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2023.e02458>

SCHULER, G. D. Sequence mapping by electronic PCR. **Genome research**, v. 7, n. 5, p. 541-550, 1997. <https://doi.org/10.1101/gr.7.5.541>

SHARMA, M. Basic Concepts of Primer Designing: A Mini Review. **International Journal of Latest Trends in Engineering and Technology**, v. 17, n. 4, p. 010-012, 2021. <http://dx.doi.org/10.21172/1.174.03>

SINGH, P. *et al.* Marine sedimentary ancient DNA from Antarctic diatoms. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v. 640, p. 112090, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2024.112090>

SUN, Y. *et al.* Disentangling effects of river inflow and marine diffusion in shaping the planktonic communities in a heavily polluted estuary. **Environmental Pollution**, v. 267, p. 115414, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115414>

TABERLET, P. *et al.* Soil sampling and isolation of extracellular DNA from large amount of starting material suitable for metabarcoding studies. **Molecular Ecology**, v. 21, p. 1816–1820, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2011.05317.x>

TANG, C. Q. *et al.* The widely used small subunit 18S rDNA molecule greatly underestimates true diversity in biodiversity surveys of the meiofauna. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 40, p. 16208 - 16212, 2012. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209160109>

WANGENSTEEN, O. S. *et al.* DNA metabarcoding of littoral hard-bottom communities: high diversity and database gaps revealed by two molecular markers. **PeerJ**, v. 6, p. e4705, 2018. <https://doi.org/10.7717/peerj.4705>

YOON, S. J. *et al.* Phytoplankton assemblage responses to massive freshwater inputs and anthropogenic toxic substances contamination in the Geum River Estuary, South Korea. **Marine Pollution Bulletin**, v. 199, p. 116020, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.116020>

ZHANG, G.K. *et al.* Metabarcoding using multiplexed markers increases species detection in complex zooplankton communities. **Evolutionary Applications**, v. 11, p. 1901–1914, 2018. <https://doi.org/10.1111/eva.12694>

ZIMMERMANN, J. *et al.* Metabarcoding vs. morphological identification to assess diatom diversity in environmental studies. **Molecular Ecology Resources**, v. 15, p. 526–542, 2014. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12336>

7 DISCUSSÃO INTEGRADORA

Os resultados obtidos nesta tese revelam a biodiversidade do Complexo Estuarino de São Marcos (CESM) obtida através de métodos tradicionais de coleta (redes de plâncton, redes de espera, dragas e outros equipamentos de captura), identificação (análise taxonômica e morfológica) e técnicas moleculares, como o uso do DNA ambiental. A integração entre os métodos utilizados mostrou que mudanças sazonais, alterações dos fatores ambientais e pressões antrópicas influenciam de forma contínua a composição da biodiversidade aquática, esses resultados reforçam os estudos de CLOERN *et al.* (2016) e ZHANG *et al.* (2023), que destacam que o uso de novas ferramentas como DNA metabarcoding podem ampliar e ser uma alternativa complementar em atividade de monitoramento.

Diante disso, o primeiro artigo mostrou que a biodiversidade do CESM responde de maneira intensa às variações ambientais. A elevada heterogeneidade observada, em especial nos anos de 2022 e 2023, refletiu através da β -diversidade uma reorganização das comunidades, marcada por substituição de táxons e pela interação de grupos com diferentes tolerâncias ecológicas. Fatores estressantes associados às mudanças climáticas, exercem forte pressão sobre os organismos aquáticos, influenciando sua fisiologia e distribuição (RÖTHIG *et al.*, 2023; SHUNK *et al.*, 2024). O clima da costa amazônica exerce papel central nas interações eco-hidrológicas, influenciando a β -diversidade (CAVALCANTI-LIMA *et al.*, 2023).

O segundo artigo teve como objetivo ampliar o conhecimento sobre a biodiversidade local e oferecer uma abordagem complementar para o monitoramento de ecossistemas aquáticos, demonstrando a eficiência do eDNA na identificação de microrganismos e metazoários, com o registro de 39 filos eucarióticos. Mesmo em um ambiente altamente dinâmico e turvo como o CESM, os resultados foram satisfatórios. A combinação dos marcadores 18S e COI ampliou a cobertura taxonômica, permitindo a detecção de grupos não observados pela metodologia clássica, com o 18S destacando-se na identificação de fitoplâncton e microrganismos, e o COI na caracterização de metazoários. O gene 18S rRNA tem se mostrado eficiente na detecção de microrganismos e grupos fitoplanctônicos, com bom desempenho já comprovado em outros estudos (LIU *et al.*, 2021; XU *et al.*, 2023; CHEN *et al.*, 2025). Assim, o DNA metabarcoding se mostra uma ferramenta promissora para complementar técnicas tradicionais no monitoramento de ambientes costeiros, com potencial de aplicação em ecossistemas com características semelhantes.

Conforme observado, a comunidade fitoplanctônica foi o grupo com maior número de sequências disponíveis e com o maior nível de informações taxonômicas obtidas por meio da técnica de eDNA. Por isso, buscou-se detalhar mais profundamente os processos ecológicos

desse grupo, indicando os fatores que modulam sua ocorrência, bem como compreender o estado trófico do ambiente. No artigo 3, os resultados revelaram que o CESH foi classificado como eutrófico, e a presença de diatomáceas potencialmente nocivas, reforça que alterações nos padrões e qualidade da água relacionadas a intensa atividade antrópica modulam a distribuição e a abundância de organismos que compõem a base da cadeia alimentar aquática, podendo comprometer toda a cadeia trófica (FURTADO *et al.*, 2025). A comunidade fitoplanctônica responde de maneira sensível à temperatura, salinidade, turbidez e aos nutrientes, sobretudo nitrato e fosfato, o que explica por que alguns táxons mantêm presença constante mesmo frente a mudanças sazonais. A ocorrência de espécies nocivas também destaca a vulnerabilidade de ecossistemas portuários e a necessidade de ferramentas de monitoramento.

O quarto artigo fornece informações sobre desenvolvimento de primers específicos para comunidade fitoplanctônica, em especial aqueles voltados para o marcador 18S. A seleção e validação *in silico* de conjuntos de primers otimizados amplia a eficácia das análises moleculares e cria bases sólidas para futuros protocolos de monitoramento (SCHULER, 1997; KALENDAR *et al.*, 2017). Esses avanços permitem que o eDNA se torne cada vez mais preciso em ambientes tropicais estuarinos, onde a turbidez e a variabilidade hidrológica geralmente prejudicam as análises (FURTADO *et al.*, 2024).

Com os achados obtidos neste estudo, reforçamos a necessidade do monitoramento contínuo da região e recomendamos fortemente o uso da técnica de eDNA para estudos voltados a detecção da presença de espécies invasoras, vulneráveis e de importância ecológica e econômica. Dessa forma, os resultados aqui apresentados destacam a importância de avaliar o ambiente de uma forma integrada principalmente um sistema altamente dinâmico, diverso e sob intenso processo de degradação, onde aliar o uso de métodos tradicionais e moleculares se torna uma ferramenta útil no entendimento da estrutura da biodiversidade local, no monitoramento e na gestão ambiental.

8 CONCLUSÕES

Neste estudo, avaliamos os resultados da biodiversidade obtidos através das metodologias convencionais no CESM, sendo possível registrar a presença de 289 táxons distribuídas entre os reinos Eubacteria, Chromista, Plantae e Animalia, identificados nas estações chuvosa e de estiagem entre os anos de 2018 e 2023. Os dados ambientais revelaram alta heterogeneidade entre os períodos sazonais e entre os anos de estudo, principalmente no período seco. Os filos que compreendem organismos fitoplanctônicos, peixes, artrópodes e moluscos foram os mais ricos em número de espécies. Observou-se que fatores nutricionais podem influenciar a ocorrência de certos grupos fitoplanctônicos, que, por sua vez, estão associados aos demais níveis da teia alimentar. Para alguns grupos, como diatomáceas, organismos bentônicos e peixes, a ampla ocorrência ao longo de todo o ano se deve ao fato de tolerarem bem variações na salinidade e nas cargas de nutrientes. Moluscos e artrópodes também registraram um número significativo de espécies e ocorrências, sendo que algumas espécies foram observadas exclusivamente na estação chuvosa ou seca, evidenciando mudanças na comunidade influenciadas por variações nos fatores ambientais.

O resultados revelaram sequências recuperadas para os domínios Archaea, Bacteria e Eukaryota, com registro de 39 filos eucarióticos. Entre eles, grupos mais abundantes em número de sequências como fitoplâncton como Ochrophyta, Dinoflagellata e Chlorophyta, fungos (Ascomycota e Basidiomycota) e bactérias (Proteobacteria e Planctomycetes), além como metazoários representados por Arthropoda, Mollusca, Chordata e Annelida. O marcador 18S apresentou maior rendimento e capturou ampla diversidade de microeucariotos, enquanto o COI, embora menos específico, contribuiu para a detecção de metazoários, reforçando que abordagens que dois ou mais marcadores são mais adequadas para caracterizar comunidades complexas.

Foi possível observar um ambiente em condições eutróficas, causadas tanto pela carga natural de nutrientes quanto pelo lançamento de efluentes domésticos e industriais provenientes das atividades desenvolvidas na área. Com base na identificação do fitoplâncton, foram encontradas quatro espécies potencialmente nocivas (*Pseudo-nitzschia pungens*, *Coscinodiscus centralis*, *Thalassiora subtilis* e *Skeletonema costatum*), além disso, os índices ecológicos indicaram baixa diversidade e moderada riqueza de espécies, sugerindo que estas espécies estão adaptadas às condições locais. Os resultados mostraram que as condições hidrológicas (temperatura, salinidade e turbidez), nutrientes (nitrato e fosfato) e índice trófico foram as variáveis preditoras responsáveis por influenciar e modular a comunidade fitoplanctônica. Portanto, o uso combinado de índices tróficos e ecológicos mostrou-se como uma ferramenta

eficiente na avaliação da qualidade da água e da dinâmica do fitoplâncton, indicando o cenário atual do CESH que possui significativa relevância econômica, social e ecológica e este fato reforça o estabelecimento de medidas mitigadoras referente às ações antrópicas realizadas na área de estudo.

Por fim, os resultados obtidos na avaliação *in silico* revelaram a dominância de espécies de diatomáceas em relação aos demais grupos. O filo Bacillariophyta obteve o maior número de sequências disponíveis nos bancos de dados públicos, o que auxilia diretamente na realização de estudos ligados ao metabarcoding. Os primers desenvolvidos neste estudo (DFS-F1, DFS-F2, DFS-F3, DFS-F4 e DFS-F5) foram eficazes na identificação de fitoplâncton a nível de espécie na região. Apesar de algumas restrições apontadas por autores, o marcador 18S mostrou-se eficiente para a comunidade fitoplanctônica estudada. Esses resultados enriquecem a literatura sobre protocolos eDNA, auxiliando na escolha do marcador molecular e dos primers, tornando o trabalho mais eficiente e prático.

Esses resultados, demonstram a importância do estudo de diferentes grupos e como os fatores ambientais influenciam na distribuição desses organismos. O uso do eDNA é sensível para a região em estudo e revelam o potencial da técnica que, utilizada em associação com os demais métodos tradicionais de inventário, poderá contribuir para o melhor entendimento da comunidade e reforçar a elaboração de estratégias de monitoramento e conservação de espécies.

REFERÊNCIAS

- CAVALCANTI-LIMA, L. F.; CUTRIM, M. V. J.; FEITOSA, F. A. D. N.; FLORES-MONTES, M.; DIAS, F. J. S.; SÁ, A. K. D. D. S.; SANTOS, T. P.; CRUZ, Q. S.; LOURENÇO, C. B. Effects of climate, spatial and hydrological processes on shaping phytoplankton community structure and β -diversity in an estuary-ocean continuum (Amazon continental shelf, Brazil). **Journal of Sea Research**, v. 193, p. 102384, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2023.102384>.
- CHEN, X.; JIA, H.; ZHANG, H. Does the Zhenbei seamount in the South China Sea harbor distinctive biodiversity? A primary study based on eDNA metabarcoding. **Global Ecology and Conservation**, v. 59, p. e03590, 2025. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2025.e03590>.
- CLOERN, J. E.; ABREU, P. C.; CARSTENSEN, J.; CHAUVAUD, L.; ELMGREN, R.; GRALL, J.; GREENING, H.; JOHANSSON, J. O. R.; KAHRU, M.; SHERWOOD, E. T.; XU, J.; & YIN, K. Human activities and climate variability drive fast-paced change across the world's estuarine-coastal ecosystems. **Global Change Biology**, v. 22, 2, p. 513–529, 2016. <https://doi.org/10.1111/gcb.13059>.
- FURTADO, J. A.; CAVALCANTI, L. F.; SANTOS, V. H. M. D.; SEREJO, J. H. F.; PEREIRA, L. C.; NETA, R. F. C.; TCHAICKA, L. Multimetric trophic status and harmful algal species in a harbor area of the Amazon Macrotidal Mangrove Coast. **Ecohydrology & Hydrobiology**, v. 25, P. 618-631, 2025. <https://doi.org/10.1016/j.ecohyd.2024.10.002>.
- FURTADO, J. A.; SILVA, S. F.; SOUSA, N. S. D. M.; SANTOS, V. H. M. D.; NASCIMENTO, L. F.; FILHO, M. S. S., GONÇALVES, H. G. P., & TCHAICKA, L. Desenvolvimento de primers *in silico* para eDNA como ferramenta de monitoramento da comunidade fitoplanctônica em um Complexo Estuarino na Costa Amazônica. **Observatório de La Economía Latinoamericana**, v. 22(7), p. e5905–e5905, 2024. <https://doi.org/10.55905/oelv22n7-215>.
- KALENDAR, R.; KHASSENOV, B.; RAMANKULOV, Y.; SAMUILOVA, O. & IVANOV, K. I. FastPCR: An *in silico* tool for fast primer and probe design and advanced sequence analysis. **Genomics**, v. 109 (3-4), p. 312–319, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2017.05.005>.
- LIU, Q.; ZHAO, Q.; MCMINN, A.; YANG, E. J.; JIANG, Y. Planktonic microbial eukaryotes in polar surface waters: recent advances in high-throughput sequencing. **Marine Life Science & Technology**, v. 3, 1, p. 94–102, 2021. <https://doi.org/10.1007/s42995-020-00062-y>.
- RÖTHIG, T.; TREVATHAN-TACKETT, S. M.; VOOLSTRA, C. R.; ROSS, C.; CHAFFRON, S.; DURACK, P. J.; WARMUTH, L. M.; SWEET, M. Human-induced salinity changes impact marine organisms and ecosystems. **Global Change Biology**, v. 29, 17, p. 4731–4749, 2023. <https://doi.org/10.1111/gcb.16859>.
- SCHULER, G. D. Sequence mapping by electronic PCR. **Genome research**, v. 7, n. 5, p. 541-550, 1997. <https://doi.org/10.1101/gr.7.5.541>.
- SHUNK, N. P.; MAZZINI, P. L. F.; WALTER, R. Impacts of Marine Heatwaves on Subsurface Temperatures and Dissolved Oxygen in Chesapeake Bay. **Journal of Geophysical Research: Oceans**, 129, 3, 2024. <https://doi.org/10.1029/2023jc020338>.
- XU, S.; LI, G.; CUI, H.; HUANG, Y.; YU, D.; DENG, H.; TONG, Z.; WANG, Y.; DUPUY, C.; HUANG, B.; XU, J. & GONG, J. Diversity, community structure, and quantity of

eukaryotic phytoplankton revealed using 18S rRNA and plastid 16S rRNA genes and pigment markers: a case study of the Pearl River Estuary. **Marine Life Science & Technology**, v. 5(3), p. 415–430, 2023. <https://doi.org/10.1007/s42995-023-00186-x>.

ZHANG, M.; ZOU, Y.; XIAO, S.; & HOU, J. Environmental DNA metabarcoding serves as a promising method for aquatic species monitoring and management: A review focused on its workflow, applications, challenges and prospects. **Marine Pollution Bulletin**, v. 194, p. 115430, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.115430>.

ANEXO 1 – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA ECOHYDROLOGY & HYDROBIOLOGY

Ecohydrology & Hydrobiology 25 (2025) 618–631



Contents lists available at ScienceDirect

Ecohydrology & Hydrobiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ecohyd



Multimetric trophic status and harmful algal species in a harbor area of the Amazon Macrotidal Mangrove Coast

Jordana Adorno Furtado^a, Lisana Furtado Cavalcanti-Lima^{b,*},
Vinicius Henrique Maciel dos Santos^{c,d}, Jefferson Horley Feitosa Serejo^d,
Luci Cajueiro Carneiro Pereira^e, Raimunda Nonata Fortes Carvalho-Neta^{a,f}, Ligia Tchaicka^{a,f}

^a Postgraduate Program in Biodiversity and Biotechnology of the Legal Amazon (REDE BIONORTE), State University of Maranhão (UEMA), 65055-310 São Luís, Maranhão, Brazil

^b Federal Institute of Education (IFMA), Campus Barreirinhas, MA-225 Road, 65590-000 Barreirinhas, Maranhão, Brazil

^c Postgraduate Program in Geology and Geochemistry (PPGG), Institute of Geosciences, Federal University of Pará (UFPA), 66075-110 Belém, Pará, Brazil

^d LHCCEAI Laboratory, Federal University of Maranhão (UFMA), Cidade Universitária Dom Delgado, 65080-805 São Luís, Maranhão, Brazil

^e Institute of Coastal Studies (IECOS), Federal University of Pará (UFPA), 686000-000 Bragança, Pará, Brazil

^f Postgraduate Program in Ecology and Biodiversity Conservation, State University of Maranhão (UEMA), Campus Paulo VI, 65055-970 São Luís, Maranhão, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Eutrophication
Trophic index
Phytoplankton
Ecology
São Marcos estuarine complex

ABSTRACT

Inserted in a region known as the Amazon Macrotidal Mangrove Coast (AMMC), the São Marcos Estuarine Complex (SMEC) has presented a scenario of continuous contamination caused mainly by the discharge of domestic, agricultural, and port sewage. Therefore, this study aims to be the first to determine the trophic state of SMEC, assess the ecological status of the phytoplankton community, and apply additive models to investigate the main environmental parameters that drive phytoplankton. Collections were carried out during the dry season (September and December/2018) and the rainy season (March and June/2019). Seasonal influence on environmental and biological factors was observed, especially those used to classify water quality. Based on the Multimetric Trophic Index (TRIX), SMEC was classified as eutrophic, and the general nutritional status of phytoplankton revealed that the system was predominantly nitrogen-limited. The phytoplankton community was dominated by diatoms, with emphasis on the presence of potentially harmful species such as *Pseudo-nitzschia pungens*, *Coscinodiscus centralis*, *Thalassiosira subtilis* and *Skeletonema costatum*, which can cause ecological and economic losses in the environment. Such species contributed to the low diversity and moderate richness. Hydrological variables such as temperature, salinity, and turbidity, in addition to nutrients, especially nitrate and phosphate, were the main parameters controlling phytoplankton structure and abundance, revealing an indicator community well adapted to local conditions. Overall, the integrated study of trophic and ecological indices in the SMEC appeared to be sensitive to changes in water quality, being an efficient tool to indicate the current scenario of this environment.

1. Introduction

Estuaries are highly dynamic environments acting as interface zones between the continents and oceans (Kumar et al., 2020; Sweet et al., 2022). These ecosystems are highly productive and function as biological filters, breeding areas, nurseries, and development of several species. Additionally, tropical estuaries are among the most valuable environments on the planet due to quantity and quality of ecosystem services which they provide (e.g., food production, services of regulation

and maintenance) (Cavalcanti et al., 2020; Zapata et al., 2018). As a result, they present socio-economic importance for harbor activities, fishing and recreational activities (Franzen et al., 2023; Rodrigues et al., 2020).

Despite the above, they are subject to natural processes such as changes in climatic conditions, besides the ones caused by human beings such as the disposal of wastewater that can cause variations in physicochemical parameters, changes in nutrient balance, and the structure of biological communities (Rodrigues et al., 2020; Statham, 2012).

* corresponding author at: Federal Institute of Education (IFMA) - Campus Barreirinhas, MA-225 Road, 65590-000 Barreirinhas, Maranhão, Brazil.
E-mail address: lisana.cavalcanti@ufpe.br (L.F. Cavalcanti-Lima).

<https://doi.org/10.1016/j.ecohyd.2024.10.002>

Received 6 November 2023; Received in revised form 13 October 2024; Accepted 20 October 2024

Available online 28 October 2024

1642-3593/© 2024 European Regional Centre for Ecohydrology of the Polish Academy of Sciences. Published by Elsevier B.V. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

ANEXO 2 – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA OBSERVATORIO DE LA
ECONOMIA LATINOAMERICANA



Desenvolvimento de primers *in silico* para eDNA como ferramenta de monitoramento da comunidade fitoplanctônica em um Complexo Estuarino na Costa Amazônica

Development of *in silico* primers for eDNA as a tool for monitoring the phytoplankton community in an Estuarine Complex on the Amazonian Coast

Desarrollo de primers *in silico* para eDNA como herramienta para el monitoreo de la comunidad de fitoplancton en un Complejo Estuarino de la Costa Amazónica

DOI: 10.55905/oelv22n7-215

Receipt of originals: 06/14/2024

Acceptance for publication: 07/05/2024

Jordana Adorno Furtado

Doutoranda pela Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal (BIONORTE)

Instituição: Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)
Endereço: São Luís, Maranhão, Brasil
E-mail: jordana1adorno@gmail.com

Dandinaura Ferreira Silva

Graduanda em Ciências Biológicas

Instituição: Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)
Endereço: São Luís, Maranhão, Brasil
E-mail: dandinauraferreira@gmail.com

Nivia Sandiele de Melo Sousa

Mestranda em Ecologia e Conservação da Biodiversidade

Instituição: Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)
Endereço: São Luís, Maranhão, Brasil
E-mail: niviasamelo@gmail.com

Vinicius Henrique Maciel dos Santos

Doutorando em Geologia e Geoquímica

Instituição: Universidade Federal do Pará (UFPA)
Endereço: Belém, Pará, Brasil
E-mail: macielviniciusoc@gmail.com

Leticia Freitas Nascimento

Graduanda em Ciências Biológicas
Instituição: Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)
Endereço: São Luís, Maranhão, Brasil
E-mail: leticiafrenasc16@gmail.com

Marcello Soares Santos Filho

Graduando em Ciências Biológicas
Instituição: Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)
Endereço: São Luís, Maranhão, Brasil
E-mail: marcello.s.santos.f@gmail.com

Hanna Gabriely Pinto Gonçalves

Doutoranda pela Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal
(BIONORTE)
Instituição: Universidade Federal do Maranhão (UFMA)
Endereço: São Luís, Maranhão e Brasil
E-mail: hanna.gabriely@discente.ufma.br

Ligia Tchaicka

Doutora em Genética e Biologia Molecular
Instituição: Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)
Endereço: São Luís, Maranhão, Brasil
E-mail: ligia.tchaicka@uemanet.uema.br

RESUMO

Este estudo teve como objetivo selecionar iniciadores para aplicação em análises de metabarcoding (eDNA), visando o monitoramento da comunidade fitoplanctônica em um Complexo Estuarino na Costa Amazônica. Inicialmente, foi realizado um levantamento bibliográfico de trabalhos publicados entre 2005 e 2023 nas principais bases de dados (SciELO, Web of Science, ScienceDirect e Google Scholar) sobre as espécies fitoplanctônicas da região. Após isso, foi realizada a busca das sequências de referência para as espécies registradas, com foco nos genes ribossomais 16S, 18S, 23S e no gene mitocondrial Citocromo Oxidase Subunidade I (COI), contidas nos bancos genômicos (GenBank, SILVA e BOLD Systems). Para alinhar as sequências, foi usado o software BioEdit e, para avaliar a qualidade dos primers desenvolvidos, foi utilizada a ferramenta online OligoAnalyzer 3.1. Os resultados mostraram que o filo Bacillariophyta foi o mais representativo em número de espécies e sequências disponíveis. Dos marcadores escolhidos, o gene 18S ribossomal obteve a maior riqueza de sequências depositadas nos bancos de dados, especialmente no GenBank. Cinco conjuntos de primers (DFS-F1, DFS-F2, DFS-F3, DFS-F4 e DFS-F5) foram desenhados *in silico* e validados virtualmente, apresentando entre 19 e 22 pares de bases (pb). As temperaturas de fusão (Tmelting) variaram entre 55,1°C e 58°C, e a concentração de GC% variou de 40,91% a 57,89%. Portanto, esses resultados colaboram com a literatura sobre protocolos de eDNA.

ANEXO 3 – AUTORIZAÇÃO AMBIENTAL DE COLETA E CAPTURA DA FAUNA

GOVERNO DO ESTADO DO MARANHÃO
SECRETARIA DE ESTADO DO MEIO AMBIENTE E RECURSOS NATURAIS
SECRETARIA ADJUNTA DE RECURSOS AMBIENTAIS
SUPERINTENDÊNCIA DE BIODIVERSIDADE E ÁREAS PROTEGIDAS

Nº da Autorização		Nº do Processo		Período de Validade	
AAF-018/2021		2107230019		24 meses	
ATIVIDADE DE MANEJO					
MONITORAMENTO					
Localização					
Município de São Luís – MA.					
Descrição					
Renovação da ACCT nº 028/2021, referente à execução de serviços de Monitoramento Ambiental permanente, na área de influência do Porto do Itaqui, em cumprimento às condicionantes da Licença de operação nº 001/2015 (e-Processos nº 83463/2015), - programa de Monitoramento de recursos Hídricos e Sedimentos, Programa de Monitoramento da Biota Aquática, programa de Monitoramento de Espécies Exóticas Invasoras e Programa de Monitoramento Ambiental para Modelagem Matemática, de responsabilidade da EMAP.					
Favorecido					
Empreendedor: EMPRESA MARANHENSE DE ADMINISTRAÇÃO PORTUÁRIA					
CNPJ: 03.650.080/0001-48			CTF: 6597090		
Endereço: Av. dos Portugueses, s/n, Porto de Itaqui, São Luís – MA				CEP: 65.085-370	
Representante Legal: Luane Lemos Felício Agostinho		CPF: 640.874.683-72		CTF:	
Contato: (98) 3216-8015		e-mail: luane.lemos@emap.ma.gov.br			
Executor (Consultoria)					
Nome: MONA CONSULTORIA AMBIENTAL LTDA					
CNPJ: 07.322.866/0001-68			CTF: 6254376		
Endereço: SGAN 915 Módulo G Bloco B Sala 108 Asa Norte - Brasília/DF				CEP: 70.790-157	
Representante Legal: Alex Valori		CTF: 6083182		CPF: 213.008.158-41	
Contato: (61) 3328-5331		e-mail: valori@mona.eco.br			
Responsável Técnico: Kiev Martins					
CPF: 010.151.994-02			CTF: 4930464		
Registro Profissional: CRBio 107004/05-D			ART: 5-3077/17		
Transportador e Meios de Transporte:					
Pesquisadores constantes nesta autorização, por meio terrestre ou aéreo, em veículos próprios ou alugados da Executora.					
Destinação do Material Biológico Coletado:					
Amostras biológicas: Coleção de Tecidos e DNA da Fauna Silvestre Maranhense do Departamento de Biologia, da Universidade Estadual do Maranhão - CoFauMA – UEMA					
Táxons a ser Capturados e Petrechos Utilizados:					
Biota aquática: equipamentos diversos permitidos à coleta e captura da fauna no local de estudo.					
ESTA AUTORIZAÇÃO NÃO PERMITE:					
1. Coleta/Captura /Transporte de espécies em área de particular sem o consentimento do proprietário;					
2. Coleta/Captura /Transporte de espécies em área de Unidades de Conservação Federais ou Municipais, salvo quando acompanhada da respectiva anuência emitida pelo órgão administrador competente;					
3. Coleta/Captura /Transporte de espécimes da fauna silvestre, por técnico não listado nesta autorização;					
4. Exportação de espécimes da fauna silvestre.					
Data e Local da Emissão		São Luís, 6 de agosto de 2021.			
AUTORIZAÇÃO VÁLIDA SOMENTE COM ASSINATURA ELETRÔNICA					
AS CONDICIONANTES DESTA AUTORIZAÇÃO ESTÃO LISTADAS NO VERSO					

Autorização em conformidade com a Portaria SEMA nº 035 de 8 de junho de 2021.
Documento com assinatura eletrônica, de acordo com a Portaria SEMA nº 194/2019.