

Rafael Meurer

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE A MICROBIOTA DE
NINHOS ARTIFICIAIS OCUPADOS POR PAPAGAIO-DE-
CARA-ROXA *Amazona brasiliensis* (LINNAEUS, 1758) (AVES:
PSITTACIDAE) EM VIDA LIVRE**

Trabalho apresentado à disciplina
BIO7016 – Trabalho de Conclusão de
Curso, como requisito para conclusão
do Curso de Graduação em Ciências
Biológicas - Licenciatura.

ORIENTADORA: Me. Patricia Pereira
Serafini (CEMAVE/ICMBio)

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Meurer, Rafael

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE A MICROBIOTA DE NINHOS
ARTIFICIAIS OCUPADOS POR PAPAGAIO-DE-CARA-ROXA *Amazona
brasiliensis* (LINNAEUS, 1758) (AVES: PSITTACIDAE) EM VIDA
LIVRE / Rafael Meurer ; orientadora, Patricia Pereira
Serafini - Florianópolis, SC, 2015.
58 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas.

Inclui referências

1. Ciências Biológicas. 2. Microbiologia. 3.
Psittacidae. 4. Ninhos Artificiais. I. Serafini, Patricia
Pereira. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

Rafael Meurer

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE A MICROBIOTA DE
NINHOS ARTIFICIAIS OCUPADOS POR PAPAGAIO-DE-
CARA-ROXA *Amazona brasiliensis* (LINNAEUS, 1758)
(AVES: PSITTACIDAE) EM VIDA LIVRE**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para o cumprimento da disciplina TCCII (BIO7016) e aprovado em sua forma final pela Banca Examinadora.

Florianópolis, 17 de Julho de 2015.

Prof.^a Dr.^a Maria Risoleta F. Marques
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Me. Patricia Pereira Serafini
Presidente
Centro Nacional de Pesquisa e
Conservação de Aves Silvestres
(CEMAVE)

Dr.^a Cristiane Kiyomi Miyaji
Kolesnikovas
Membro titular
Associação R3 Animal

Me. Elenise Angelotti Bastos
Sipinski
Membro titular
Sociedade de Pesquisa em Vida
Selvagem e Educação
Ambiental (SPVS)

Dr.^a Camile Lugarini
Membro suplente
Centro Nacional de Pesquisa e
Conservação de Aves Silvestres
(CEMAVE)

Este trabalho é dedicado aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

O primeiro agradecimento deste trabalho, com certeza, vai para a minha orientadora, Patricia Pereira Serafini, que me ingressou no fantástico mundo da ornitologia. Obrigado por todo o seu carinho, atenção e suporte, que foram desde arranjar um tempo livre na agenda cheia (isso inclui, férias, final de semana, viagem de trabalho) para fazer aquela correção de última hora até, comprar materiais necessários para a finalização das análises laboratoriais do próprio bolso.

Aos meus pais e irmãos, por todo o amor, carinho, suporte (R\$) e incentivo nas minhas escolhas de vida.

À equipe do Projeto de Conversação do Papagaio-de-cara-roxa, especialmente na pessoa dos Biólogos: Elenise Angelotti Bastos Sipinski, Maria Cecília Abbud e Rafael Meirelles Sezerban; aos auxiliares de campo: Sr. Antônio da Luz dos Santos e Alescar Vicente Casilha. Obrigado por toda presteza, receptividade e preocupação nas expedições de campo. O trabalho de vocês é inspirador! Também agradeço ao Frederico Fontanelli Vaz, pelo auxílio nas coletas das amostras em campo e ensinamentos transmitidos.

À Cristiane Kiyomi Miyaji Kolesnikovas, por toda ajuda na rotina do laboratório e paciência quando iniciei. O meu muito obrigado, também ao Claudinei do lab. por sua compreensão nas vezes em que ficou um tempo a mais para não me deixar sozinho, caso o lab. explodisse.

À Aurora Vargas Paz, pela ajuda na rotina do laboratório.

À Bianca Pinto Vieira, pela ajuda na estatística e outras milhares de dúvidas. Muito obrigado por sua imensa vontade em ajudar e tudo o que você me ensinou sobre ornitologia!

Agradeço também a UFSC, por proporcionar um ensino de qualidade e público, pelas bolsas de monitoria, auxílios para viagem acadêmica e por me formar um biólogo! Todo o corpo docente e técnico do CCB, em especial a professora Eliana Alves dos Santos, por mudar meu pensamento ecológico e me incentivar na carreira acadêmica ornitológica. Meus agradecimentos também vão para os professores Alexandre Paulo Teixeira Moreira e Rafael Dutra de Armas, pela avaliação e sugestões no projeto deste TCC.

À Camile Lugarini, pela ajuda com os estimadores de riqueza e testes estatísticos.

À banca examinadora, Cris, Tise e Camile, por aceitarem o convite e contribuir para a melhoria deste trabalho.

Não posso deixar de agradecer a turma 2010-2 (turma cubozoa, para os íntimos), esses cinco anos juntos foram incríveis. Na primeira saída de campo para o mangue, alguns já desistiram, outros ficaram para trás em disciplinas mais puxadas. Um agradecimento especial para os verdadeiros cubozoários: Antonio Lourenço Pinto, Bruna Freitas da Silva, Dionia Eli Dorneles, Gabriel Delapedra, Lander Rodrigo de Souza e Saulo José dos Reis, por toda a força e boas risadas juntos, pelos clássicos churrascozoas e pela amizade. Vocês são demais!

Aos papagaios-de-cara-roxa, bactérias e fungos, por serem o objeto de estudo do meu TCC.

O último agradecimento, mas não menos importante, vai para a minha namorada, Ana Paula Correia, por todo o seu carinho, amor e ajuda, você é incrível! Assim como a família (Sr. Alceu, Dona Sandra e Pedro), muito obrigado por toda atenção e acolhimento creditados na minha pessoa.

“Nunca ande pelo caminho traçado, pois ele conduz somente até onde
outros já foram.”

Alexander Graham Bell (1847-1922)

RESUMO

O papagaio-de-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*) é um psitacídeo categorizado como quase ameaçado de extinção, segundo a Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção. É endêmico da Mata Atlântica e se distribui ao longo da faixa litorânea do sul de São Paulo ao norte de Santa Catarina. Estimativas dos últimos censos populacionais, realizados pela Sociedade de Pesquisa em Vida Selvagem e Educação Ambiental (SPVS), apontam para uma população em torno de 6.650 indivíduos, sendo que mais de 70 % da população se encontra no Paraná. Entre as ações previstas no Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Papagaios da Mata Atlântica está a caracterização do perfil sanitário das populações de papagaio-de-cara-roxa em vida livre. O objetivo deste estudo foi identificar a microbiota natural dos ninhos artificiais ocupados por *A. brasiliensis* construídos de dois tipos de materiais: madeira (MAD) e de Cloreto de Polivinila (PVC). As amostras foram coletadas na Ilha Rasa, no litoral paranaense, e apenas um ninho foi amostrado no continente, durante o monitoramento reprodutivo realizado pelo projeto de conservação do papagaio-de-cara-roxa (SPVS), no período reprodutivo de 2013/2014. Ensaio microbiológicos, bioquímicos e morfológicos foram realizados seguindo metodologia padronizada para a identificação da microbiota. Foram coletadas amostras de 46 ninhos, sendo apenas um em cavidade natural, destes, 44 foram passíveis de algum tipo de isolamento bacteriano. Apenas seis espécies de fungos filamentosos foram isolados em menos de 50% de amostras colhidas (20 das 46 amostras), sendo, *Aspergillus* spp. a mais abundante isolada (80%). Entre as bactérias isoladas foram identificadas 19 espécies, sendo que, 18 pertencem à família Enterobacteriaceae e um à Bacillaceae. Alguns autores descrevem que a microbiota natural de psitacídeos é composta principalmente por bactérias Gram positivas, já outros, demonstram que existe diferença entre a microbiota de adultos e filhotes. Este trabalho revelou que, os isolados de bactérias dos substratos dos ninhos artificiais são principalmente bactérias Gram negativas. Os isolados bacterianos nos dois tipos de ninhos não diferiram. Em trabalhos futuros, a caracterização microbiológica de ninhos naturais da espécie auxiliará a compreensão destes padrões. Obtendo-se dados da microbiota natural, será possível fazer seu uso como potencial ferramenta para decisões de manejo, para o monitoramento e para a conservação da espécie.

Palavras-chave: Microbiologia. Psittacidae. Ninhos Artificiais.

ABSTRACT

The Red-tailed Amazon Parrot (*Amazona brasiliensis*) is a parrot categorized as near threatened, according to the National List of Species of the Brazilian Endangered Fauna. It is endemic to the Atlantic Forest and is distributed throughout the southern coastline of São Paulo till the north of Santa Catarina. Population estimates conducted by the Sociedade de Pesquisa em Vida Selvagem e Educação Ambiental, indicate a population of about 6.650 individuals, more than 70% of this population is in Paraná. Among the actions foreseen in the National Action Plan for the Conservation of Parrots of the Atlantic Forest is the characterization of the health profile of the red-tailed amazon in the wild. The aim of this study was to identify the natural microbiota of artificial nests occupied by *A. brasiliensis* built of two types of materials: wood (MAD) and Polyvinyl Chloride (PVC). Samples were collected on Rasa Island in the Paraná coast, and only one nest was sampled on the continent during the reproductive monitoring by the conservation of the red-tailed amazon project (SPVS), the reproductive period 2013/2014. Microbiological, biochemical and morphological assays were carried out following standardized methodology for the identification of microorganisms. 46 nests samples were collected, and just a natural cavity, of these, 44 were subject to some kind of bacterial isolation. Only six species of filamentous fungi were isolated in less than 50% of samples (20 out of 46 samples), and *Aspergillus* spp. the most abundant isolated (80%). Among the isolated bacteria were identified 19 species, of which 18 belong to the family Enterobacteriaceae and the Bacillaceae. Some authors describe the natural microbiota of parrots as mainly of Gram positive bacteria, while others, demonstrate that there is difference between the microbiota of adults and nestlings. This work showed that bacteria isolated from substrates of the artificial nests are mainly Gram negative bacteria. The isolates bacterial the two types of nests did not differ. In future work, the microbiological characterization of natural nests of the species would provide better understanding of this patterns. Data from the natural microbiota are a potential tool for management decisions, for monitoring and conservation.

Keywords: Microbiology. Psittacidae. Artificial Nests.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Mapa do Brasil mostrando a cobertura original da Mata Atlântica em bege e os remanescentes florestais em verde.30
- Figura 2: A) Ninho artificial de MAD ocupado por *Amazona brasiliensis* na Ilha Rasa, PR; B) Ninho artificial de PVC ocupado por *Amazona brasiliensis* na Ilha Rasa, PR.32
- Figura 3: Mapa da costa do Paraná mostrando a APA de Guaraqueçaba, com destaque na Ilha Rasa.35
- Figura 4: Auxiliar de campo da SPVS acessando um ninho artificial de MAD na Ilha Rasa, PR, através de técnicas de escalada vertical.....37
- Figura 5: Esquema ilustrando a rotina de análises bacteriológicas no laboratório de análise de água e microbiologia da ESEC Carijós, Florianópolis, SC.....39
- Figura 6: Placa de petri preparada a partir de metodologia para fixação de fungos filamentosos em lâminas, após três dias de incubação à temperatura ambiente, no laboratório de análise de água e microbiologia da ESEC Carijós, Florianópolis, SC.40
- Figura 7: Representatividade de bactérias isoladas em ninhos artificiais de MAD e PVC ocupados por *Amazona brasiliensis* durante o período reprodutivo 2013/2014 na Ilha Rasa, PR.42
- Figura 8: Curva de acumulação de espécies de bactérias isoladas em ninhos artificiais de MAD e PVC ocupados por *Amazona brasiliensis* durante o período reprodutivo 2013/2014 na Ilha Rasa, PR.43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Quantidade de bactérias isoladas em ninhos artificiais de MAD e PVC ocupados por <i>Amazona brasiliensis</i> durante o período reprodutivo 2013/2014 na Ilha Rasa, PR.	41
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α –	alfa
APA –	Área de Proteção Ambiental
BHI –	<i>Brain Heart Infusion</i>
CEMAVE –	Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Aves Silvestres
<i>e.g.</i> –	por exemplo
ESEC –	Estação Ecológica
EPM –	Ágar inclinado verde para realização de provas de desaminação do L-Triptofano, glicose, gás e H ₂ S
EUA –	Estados Unidos da América
H ₂ O ₂ –	Peróxido de Hidrogênio
H ₂ S –	Sulfeto de Hidrogênio
Km ² –	Quilômetro quadrado
ICMBio –	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
IUCN –	União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais
MAD –	Madeira
MIO –	Motilidade, Indol e Ornitina
MMA –	Ministério do Meio Ambiente
pH –	Potencial Hidrogeniônico
PR –	Paraná
PVC –	Cloreto de Polivinila
RPPN –	Reserva Particular do Patrimônio Natural
RS –	Rio do Santo
SC –	Santa Catarina
SISBio –	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SD –	Desvio Padrão
SNUC –	Sistema Nacional de Unidades de Conservação
SPVS –	Sociedade de Pesquisa em Vida Selvagem e Educação Ambiental
TSI –	<i>Triple Sugar Iron</i>
UC –	Unidades de Conservação
°C –	grau Celsius

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	27
2. OBJETIVOS.....	34
2.1. OBJETIVO GERAL.....	34
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1. ÁREA DE ESTUDO.....	35
3.2. COLETA DE DADOS EM CAMPO.....	35
3.3. OBTENÇÃO DE DADOS EM LABORATÓRIO.....	37
3.3.1. Bactérias.....	37
3.3.2. Fungos.....	39
3.4. ANÁLISE DE DADOS.....	40
4. RESULTADOS.....	41
4.1. BACTÉRIAS.....	41
4.2. FUNGOS.....	43
5. DISCUSSÃO.....	45
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	48
REFERÊNCIAS.....	49
APÊNDICE A – Bactérias isoladas em amostras dos respectivos ninhos artificiais de MAD ocupados por <i>Amazona brasiliensis</i> na temporada reprodutiva 2013/2014, na Ilha Rasa, PR.....	56
APÊNDICE B – Bactérias isoladas em amostras dos respectivos ninhos artificiais de PVC ocupados por <i>Amazona brasiliensis</i> na temporada reprodutiva 2013/2014, na Ilha Rasa, PR.....	57
APÊNDICE C – Fungos filamentosos isolados em amostras dos respectivos ninhos artificiais de MAD e PVC ocupados por <i>Amazona brasiliensis</i> na temporada reprodutiva 2013/2014, na Ilha Rasa, PR.....	58
ANEXO A – Resumo publicado durante o X Congresso Neotropical de Ornitologia (NOC) e XXII Congresso Brasileiro de Ornitologia (CBO), Manaus/AM, 2015.....	59

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui a maior diversidade de Psittacidae, inclusive os maiores representantes da família, as araras. A partir de 1500 os mapas brasileiros já evidenciavam tal riqueza, sendo considerado como “Terra dos Papagaios” (SICK, 1997). Os psitacídeos são facilmente identificáveis por apresentarem cabeça grande em relação ao corpo, pescoço reduzido, pés zigodáctilos, tarsometatarso geralmente curto e, principalmente, por apresentarem bico grande, forte, alto e recurvado (SICK, 1997). Quanto ao tamanho, são heterogêneos, podendo variar desde tuins (*Forpus* spp.) e apuins (*Touit* spp.) com aproximadamente 15 cm de comprimento total e 25 gramas de peso, até araras (*Ara* spp. e *Anodorhynchus* spp.), que são os maiores representantes da família, podendo chegar a 98 cm de comprimento total e pesar 1,5 quilogramas (COLLAR; JUNIPER, 1997).

Um dos representantes desta família é o papagaio-de-cara-roxa, *Amazona brasiliensis* (LINNAEUS, 1758), espécie endêmica do Bioma Mata Atlântica, que inicialmente se distribuía em uma faixa contínua de 3.075 km² entre o litoral sul de São Paulo e o litoral norte de Santa Catarina (DIEFENBACH; GOLDHAMMER, 1986; SCHERER-NETO, 1989). A espécie é considerada como vulnerável segundo a Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN) (BIRDLIFE INTERNACIONAL, 2013) e era também na Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção (BRASIL, 2003; MACHADO; DRUMMOND; PAGLIA, 2008). Apenas após a nova avaliação do estado de conservação da fauna brasileira realizada e publicada pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA)/Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) (BRASIL, 2014), a espécie passou a ser classificada como quase ameaçada. A mesma ainda é considerada em perigo, segundo o Livro Vermelho da Fauna Ameaçada do Paraná (MATER NATURA, 2002). Mesmo após os recentes registros de estabilidade e até acréscimo populacional em anos recentes, que subsidiaram a decisão sobre a sua não categorização na lista nacional em uma categoria de ameaçada segundo os critérios da IUCN, os esforços para a conservação em andamento desde 1998 pela Sociedade de Pesquisa em Vida Selvagem e Educação Ambiental (SPVS) devem ser continuados. Principalmente, porque a espécie ainda é dependente de manejo uma vez que o corte seletivo e a pressão sobre seu ambiente natural refletem em um pequeno número de cavidades

naturais passíveis de serem ocupadas para nidificação (SIPINSKI et al., 2014).

Amazona brasiliensis, juntamente com outros três representantes do gênero: o papagaio-de-peito-roxo, *Amazona vinacea* (KUHL, 1820); o chauá, *Amazona rhodocorytha* (SALVADORI, 1890) e o papagaio-charão, *Amazona pretrei* (TEMMINCK, 1830), além do papagaio-verdadeiro, *Amazona aestiva* (LINNAEUS, 1758), que é considerada uma espécie de particular interesse para conservação, estão no Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Papagaios da Mata Atlântica - PAN Papagaios, publicado em 2011 e que tem como objetivo garantir a integridade genética e demográfica das populações naturais das espécies-alvo por meio da ampliação do conhecimento científico, da redução da perda de habitat e da retirada de espécimes da natureza para o tráfico, nos próximos cinco anos, ou seja, até 2016 (SCHUNCK et al. 2011). Como se pode observar, o bioma Mata Atlântica possui importância fundamental na conservação do papagaio-de-cara-roxa. Este bioma, originalmente abrangia uma área equivalente a 1.315.460 km² e estendia-se ao longo de 17 Estados Brasileiros (Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Goiás, Mato Grosso do Sul, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo, Bahia, Alagoas, Sergipe, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Ceará e Piauí). Atualmente restam aproximadamente 105.236 km² (8%) de remanescentes florestais com mais de 100 hectares (Figura 1) (SOS MATA ATLÂNTICA, 2010).

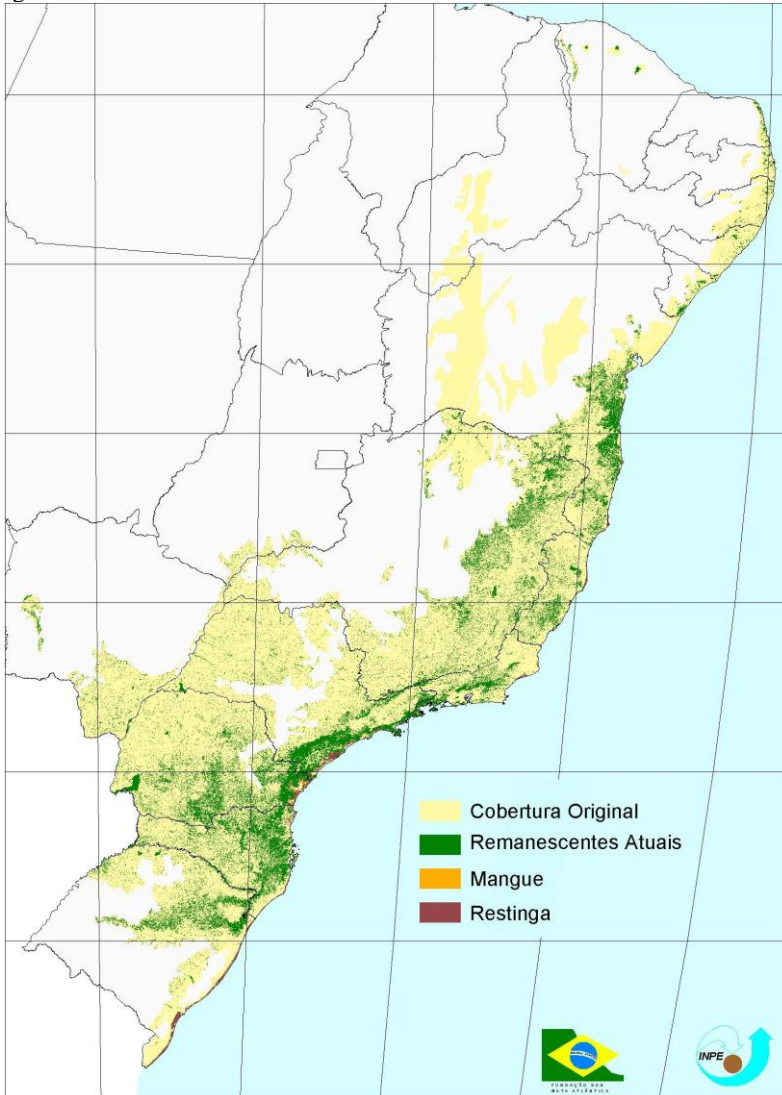
A Mata Atlântica é uma das florestas tropicais mais ricas do mundo em biodiversidade, além de possuir elevadas taxas de endemismo. Alguns levantamentos descrevem para esse bioma aproximadamente 20.000 espécies de árvores e arbustos, 250 espécies de mamíferos, 340 de anfíbios e cerca de 1.020 espécies de aves (MARINI; GARCIA, 2005; TABARELLI et al., 2003). Essa riqueza biológica por área é maior que a da Amazônia (MORELLATO; HADDAD, 2000).

Além das características relacionadas com a biodiversidade, a Mata Atlântica ocupa a segunda colocação no quesito área de extensão de floresta tropical das Américas, perdendo apenas para a floresta Amazônica (RICKLEFS, 2003).

Embora degradada, ainda existem áreas conservadas de Mata Atlântica no Brasil, estabelecidas em Unidades de Conservação (UC) e dentre elas destacamos a área onde o estudo foi realizado: a Área de Proteção Ambiental (APA) de Guaraqueçaba, Paraná (PR). Foi implantada através do Decreto de número 90.883, de 31 de janeiro de 1985, e tem como um dos objetivos proteger uma das últimas áreas

representativas da Floresta Pluvial Atlântica, onde encontram-se espécies raras e ameaçadas de extinção. Está localizada entre os municípios de Guaraqueçaba, Antonina e Paranaguá, no litoral do Estado do Paraná. Tem seu limite ao norte com o Parque Estadual de Jacupiranga (São Paulo), ao sul com o Município de Paranaguá, a oeste com o Parque Estadual do Marumbi e a leste com o Oceano Atlântico, tendo a área total de 282.444,0200 hectares (BRASIL, 1985).

Figura 1: Mapa do Brasil mostrando a cobertura original da Mata Atlântica em bege e os remanescentes florestais em verde.



Fonte: SOS Mata Atlântica (2010).

Fazem parte dessa APA, as seguintes Ilhas, assim como as águas interiores contidas em seu perímetro: Ilha do Lessa, Ilha do Corisco, Ilha do Pastinho, Ilha Baixa Grande, Ilha das Rosas, Ilha Guamiranga de Fora, Ilha Guamiranga de Dentro, Ilha da Ponta Grossa,

Ilha do Gerere, Ilha do Lamin, Ilha Guará, Ilha Biguá, Ilha das Cobras, Ilha das Bananas, Ilha Grande, Ilha dos Porcos, Ilha do Benito, Ilha Rasa, Ilhas das Gamelas, Ilha das Peças e Ilha do Superagui (BRASIL,1985). A temperatura média anual varia entre 20 e 22°C na maior parte da APA e a precipitação é considerada como elevada, havendo diferenças significativas entre as áreas de planície, serras e planalto. Nas planícies as precipitações anuais ficam em torno de 2.500 mm, a 150 metros de altitude temos aproximadamente 2.300 mm de precipitação, reduzindo gradativamente até 900 metros (IPARDES, 1995).

Psittacidae é uma das famílias com maior número de endemismos na Mata Atlântica (GALETTI et al., 2006). Essas aves são especialmente vulneráveis à destruição e distúrbios ambientais, sendo a perda de habitat o principal fator para a redução de muitas populações, além da introdução de espécies predadoras ou competidoras, populações naturalmente reduzidas, perseguição humana para comércio, caça e coleta de ovos (GALETTI; PIZO, 2002). A pressão do tráfico ilegal da fauna silvestre é forte para muitos táxons e estima-se que cerca de 360 filhotes do papagaio-de-cara-roxa foram capturados em apenas um ano em Cananéia, SP (MARTUSCELLI, 1995). É importante salientar que, uma vez que a espécie é classificada como ameaçada, dificilmente ela sai dessa categoria e seu *status* tende a agravar-se com o tempo (GALETTI; PIZO, 2002).

São necessários pelo menos 7.000 indivíduos para garantir a sobrevivência em longo prazo de uma espécie (REED et al., 2003). A população de *A. brasiliensis* em São Paulo no ano de 1995 era de 1.350 indivíduos (MARTUSCELLI, 1995), após 11 anos a população era composta por 1.221 indivíduos (GALETTI et al., 2006).

Os dados dos últimos censos populacionais apontam para um número aproximado de 6.650 indivíduos, distribuídos nos três estados de ocorrência: Paraná, São Paulo e Santa Catarina, sendo que, a maioria (75%) se encontra no litoral do Paraná (SIPINSKI et al., 2014), ressaltando a importância das UC desta região, incluindo a área onde o presente estudo foi realizado, a APA de Guaraqueçaba.

Cabe ainda, destacar que o corte seletivo de espécies vegetais arbóreas associados à supressão do ambiente natural reduziu a disponibilidade de ninhos naturais (ocos) para a reprodução de papagaios-de-cara-roxa no ambiente natural. Diante deste cenário, em 2003 a SPVS começou a instalar ninhos artificiais confeccionados de madeira (MAD) (Figura 2 A) e a partir de 2005, deu-se início a instalação de ninhos artificiais confeccionados também de Cloreto de

Polivinila (PVC) (Figura 2 B), na tentativa de minimizar o impacto na reprodução da espécie. Tanto ninhos de MAD como de PVC foram utilizados desde o ano de início de sua disponibilização e a taxa de ocupação de ninhos artificiais é extremamente alta ao ser comparada com a de outros projetos de conservação de psitacídeos que forneçam ninhos artificiais (ABBUD, 2013; DITTRICH et al., 2013).

Figura 2: A) Ninho artificial de MAD ocupado por *Amazona brasiliensis* na Ilha Rasa, PR; B) Ninho artificial de PVC ocupado por *Amazona brasiliensis* na Ilha Rasa, PR.



Fonte: Adaptado do arquivo da SPVS (2010).

Apesar do sucesso da instalação dos ninhos artificiais, ameaças comuns à maioria das espécies da fauna tais como, fragmentação e degradação ambiental, introdução de espécies exóticas, poluição e mudanças climáticas permanecem atuando e podem facilitar ou permitir ainda a transmissão de doenças infecciosas, as quais podem dizimar espécies (REAL, 1996). Além disso, não é possível afirmar que a introdução dos ninhos artificiais não possa contribuir para o aumento da incidência de infecções microbianas no papagaio-de-cara-roxa.

Já foi detectada a diferença no desenvolvimento das aves considerando padrões morfométricos dos filhotes nos três tipos de ninhos, em um estudo com os dados biométricos obtidos desde 1998 pela SPVS. É possível observar que filhotes em ninhos naturais têm bicos maiores e tarsos menores do que filhotes em ninhos artificiais de PVC, enquanto que filhotes em ninhos artificiais de MAD apresentam valores intermediários (DITTRICH et al., 2013).

São conhecidos poucos efeitos das doenças infecciosas sobre as populações naturais de aves (AGUIRRE et al., 2012), porém diversos autores concordam que existe uma premente necessidade de integrar as teorias e experiências práticas nos campos da ecologia, demografia, taxonomia e genética ao da epidemiologia da vida selvagem, a fim de desenvolver abordagens práticas para a prevenção da extinção de espécies (SOULÉ, 1996; LAFFERTY; GERBER, 2002).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar a microbiota natural dos ninhos artificiais ocupados por *Amazona brasiliensis* construídos de MAD e de PVC.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar a microbiota dos ninhos utilizados pela espécie;
- Estabelecer o padrão natural de ocorrência dos microrganismos;
- Verificar se existe diferença entre a microbiota dos dois tipos de ninhos artificiais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ÁREA DE ESTUDO

A área onde este estudo foi realizado, Ilha Rasa (25° 15' e 25° 30' Sul e 48° 20' e 48° 30' Oeste), está localizada no litoral norte do estado do Paraná, na região de Guaraqueçaba. É protegida por lei, de acordo com o Sistema Nacional de Unidades de Conservação (SNUC) (BRASIL, 2000), como APA (Figura 3). Apenas uma amostra de ninho foi coletada no continente, dentro da Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Serra do Itaquí.

Figura 3: Mapa da costa do Paraná mostrando a APA de Guaraqueçaba, com destaque na Ilha Rasa.



Fonte: Adaptado do arquivo da SPVS (2012).

3.2. COLETA DE DADOS EM CAMPO

Foram realizadas quatro expedições de campo para a Ilha Rasa, no litoral do Paraná, durante o período reprodutivo de 2013 – início em setembro e término em março de 2014. Em todas as expedições, chegou-se à Ilha na segunda-feira partindo na quarta-feira, com retorno à

Florianópolis, Santa Catarina (SC), para o processamento das amostras no laboratório da Estação Ecológica (ESEC) de Carijós/ICMBio.

Cada ninho avistado em campo foi acessado através de técnicas de escalada vertical (Figura 4). Os filhotes foram contidos manualmente e, os ninhegos passaram por avaliação clínico-física pelo médico-veterinário da UFPR e/ou do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Aves Silvestres (CEMAVE), anilhamento com anilhas metálicas padrão CEMAVE de acordo com a Instrução Normativa número 27 do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis de 2002 e coleta de dados biométricos. Enquanto estes procedimentos eram realizados com os filhotes, amostras do substrato dos ninhos foram colhidas com *swabs* estéreis de haste plástica. Os procedimentos de captura, anilhamento e coleta de material microbiológico foram autorizados, conforme a licença do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBio) de número 41035-1.

Imediatamente após a coleta, os *swabs* foram armazenados em meio de transporte Stuart – ácido tioglicólico 0,76 g/l; glicerofosfato de sódio 10,0 g/l; cloreto de cálcio 0,1 g/l; azul de metileno 0,002 g/l; ágar 6,5 g/l com pH ajustado para 7,4. As amostras foram mantidas refrigeradas neste meio de transporte por até 48 horas, até chegar ao laboratório, em Florianópolis, SC.

Figura 4: Auxiliar de campo da SPVS acessando um ninho artificial de MAD na Ilha Rasa, PR, através de técnicas de escalada vertical.



Fonte: Arquivo pessoal do autor (2014).

3.3. OBTENÇÃO DE DADOS EM LABORATÓRIO

3.3.1. Bactérias

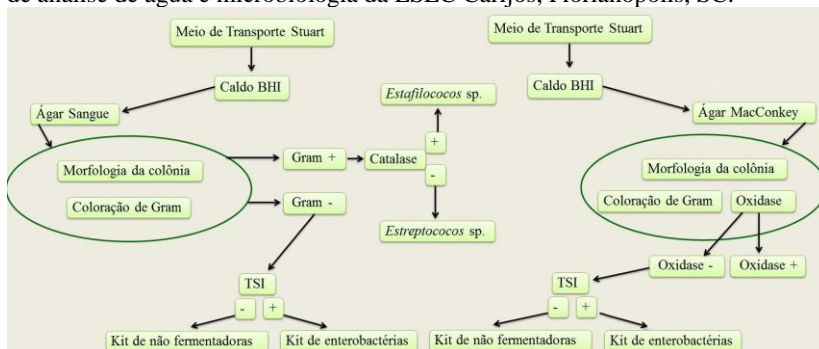
Chegando ao laboratório de análise de água e microbiologia da ESEC Carijós, Florianópolis, SC, cada *swab* foi semeado em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI), um meio composto por nutrientes de cérebro e coração de gado, peptona e dextrose utilizado para cultivo de estreptococos, pneumococos, meningococos, enterobactérias, e fungos. Depois de incubadas durante 24 horas à 37°C em estufa, todas as amostras foram preservadas sob congelamento a - 20°C com 30 % de glicerina mantendo assim as estruturas celulares dos microrganismos viáveis.

Quando descongeladas, foram estriadas em placas de petri com ágar sangue e ágar MacConkey (inibe o crescimento de microrganismos Gram positivos) e acondicionadas em estufa à 37°C por 24 horas. Posteriormente, foram feitas a caracterização morfológica das colônias, a técnica de coloração de Gram e a verificação se a colônia possuía ou

não a enzima catalase através de reação com H_2O_2 (Peróxido de Hidrogênio). Cada colônia pura foi inoculada no ágar *Triple Sugar Iron* (TSI) por picada e estria na superfície inclinada e permaneceu incubada à 37°C por 24 horas. O ágar TSI contém três açúcares (glicose, lactose e sacarose) e permite a detecção da fermentação de carboidratos, a presença de sulfato de ferro, possibilita ainda a detecção da produção de H_2S (Sulfeto de Hidrogênio), indicado pela cor preta na base do tubo, além de permitir também a detecção da produção de gás.

Por último, a colônia identificada como fermentadora foi inoculada em um conjunto de provas bioquímicas para identificação de enterobactérias, que é composto por cinco tubos de diferentes meios: 1) meio de EPM – para identificar a produção de gás a partir de glicose, produção de H_2S e desaminação do L-Triptofano; 2) caldo lisina – para identificar a descarboxilação da L-Lisina; 3) meio de Motilidade, Indol e Ornitina (MIO) – permite observar a motilidade, descarboxilação da ornitina e produção de indol; 4) ágar citrato de Simmons – identifica as bactérias que utilizam o citrato como única fonte de carbono e 5) caldo Rhamnose – utilização da Rhamnose. Após a inoculação das colônias nos *kits* de enterobactérias, eles foram mantidos durante 48 horas à 37°C na estufa, com uma leitura e interpretação em 24 horas e a segunda com mais 24 horas (Figura 5). Cabe ressaltar que, todo o procedimento foi realizado em cabine de fluxo unidirecional, para tentar impedir ao máximo qualquer possível contaminação das amostras. Todo o conjunto de dados obtidos ao longo dos quatro dias de análises foram utilizados para a identificação das bactérias, através da tabela disponibilizada pela empresa fabricante do *kit* de enterobactérias – *Newprov* Produtos para Laboratório Ltda. Além da confirmação da identificação da bactéria através de bibliografia especializada, bem como o uso da metodologia padronizada de identificação (WINN et al., 2012).

Figura 5: Esquema ilustrando a rotina de análises bacteriológicas no laboratório de análise de água e microbiologia da ESEC Carijós, Florianópolis, SC.



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3.2. Fungos

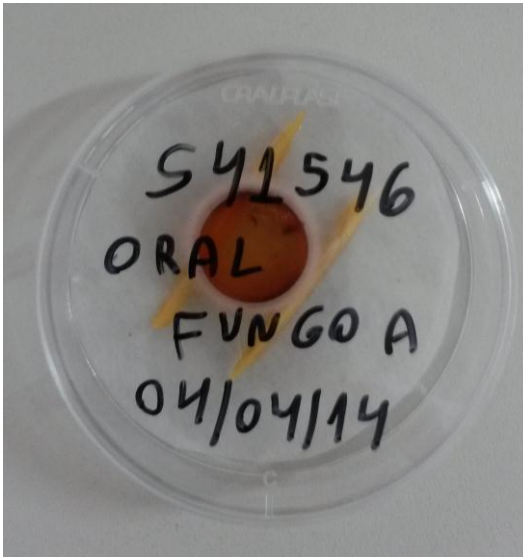
Chegando ao laboratório de análise de água e microbiologia da ESEC de Carijós, Florianópolis, SC, após semear cada *swab* em BHI e congelar, algumas amostras foram semeadas em ágar *Sabouraud* inclinado em tubos.

As amostras permaneceram em temperatura ambiente por até 30 dias e na medida em que se notou crescimento fúngico, estes foram fixados em lâminas permanentes através da seguinte técnica: um pedaço redondo de papel filtro foi adicionado ao fundo de uma placa de petri estéril, sobre o papel filtro foi posicionado um par de bastões de madeira estéreis (feitos com palitos de dente), servindo de suporte para uma lamínula. Em seguida um bloco de ágar *Sabouraud* foi posto sobre uma lamínula, ambos estéreis e o bloco de ágar *Sabouraud* inoculado com a amostra de fungo por picada em três ou quatro locais. A lamínula com o bloco de ágar inoculado foi posta sobre o suporte de bastão de madeira e foi adicionada água destilada estéril ao fundo da placa de petri para simular uma câmara úmida, posteriormente, uma segunda lamínula foi utilizada em cima do bloco de ágar, a placa fechada e incubada em temperatura ambiente por até cinco dias (Figura 6), dependendo do crescimento dos fungos.

De acordo com o crescimento nas amostras, a lamínula mais superior pôde ser retirada gentilmente com o auxílio de pinças estéreis, e colocada sobre uma lâmina com uma gota do corante de azul de metileno. Assim como nos procedimentos com as bactérias, todo o procedimento com os fungos foi realizado em cabine de fluxo

unidirecional, para tentar impedir ao máximo qualquer possível contaminação das amostras. A montagem foi vedada com esmalte de unhas de coloração clara, tornando-a permanente para posterior identificação de acordo com a morfologia, comparando com a literatura (WINN et al., 2012).

Figura 6: Placa de petri preparada a partir de metodologia para fixação de fungos filamentosos em lâminas, após três dias de incubação à temperatura ambiente, no laboratório de análise de água e microbiologia da ESEC Carijós, Florianópolis, SC.



Fonte: Arquivo pessoal do autor (2014).

3.4. ANÁLISE DE DADOS

Para as análises estatísticas foi utilizado o programa estatístico Bioestat 5.3 (AYRES et al., 2007). A similaridade entre ninhos de MAD e PVC, foi estipulada através do índice qualitativo de Jaccard. Para verificar se a amostragem foi suficiente, utilizou-se uma curva de acumulação de espécies, complementada pelo estimador de riqueza *Bootstrap*. A normalidade de distribuição das bactérias nos ninhos amostrados foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk (ZAR, 1999). Para comparar se existe diferença entre a composição de bactérias entre os ninhos artificiais de MAD e PVC, foi utilizado o teste de Mann-Whitney e o teste G. Para ambos os testes foi considerado um $\alpha < 5\%$.

4. RESULTADOS

4.1. BACTÉRIAS

Amostras de 46 ninhos foram obtidas ao longo das expedições de campo, sendo que, 44 foram passíveis de algum tipo de isolamento bacteriano. Análises microbiológicas de 44 ninhos resultaram no isolamento de 90 colônias bacterianas e destas, foram passíveis de identificação 17 espécies. Para duas colônias adicionais foi possível a identificação apenas, em nível de gênero. O total de gêneros isolados foi de 11, sendo que, dez pertencem à família Enterobacteriaceae e um à Bacilaceae (Tabela 1).

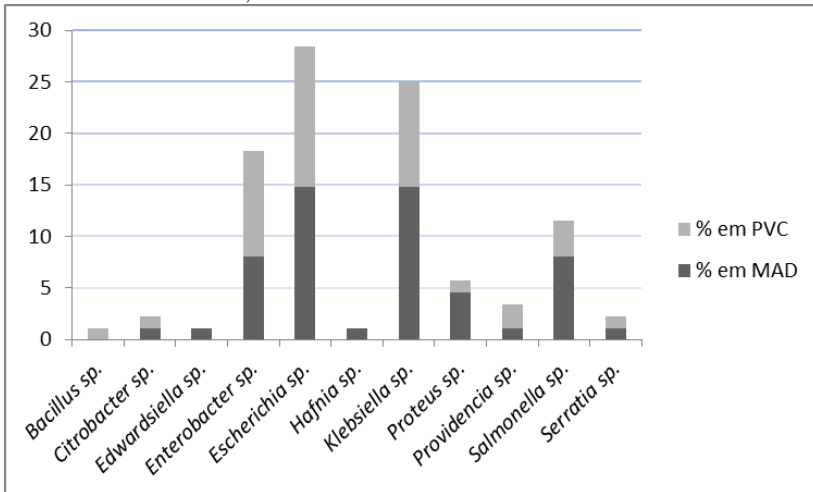
Tabela 1: Quantidade de bactérias isoladas em ninhos artificiais de MAD e PVC ocupados por *Amazona brasiliensis* durante o período reprodutivo 2013/2014 na Ilha Rasa, PR.

Espécies bacterianas isoladas	Quantidade em ninhos de MAD	Quantidade em ninhos de PVC	Total (%)
<i>Bacillus</i> sp.	-	01	01 (1,1%)
<i>Citrobacter freundii</i>	-	01	01 (1,1%)
<i>Citrobacter koseri</i>	01	-	01 (1,1%)
<i>Edwardsiella tarda</i>	01	-	01 (1,1%)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	02	03	05 (5,8%)
<i>Enterobacter cloacae</i>	02	01	03 (3,4%)
<i>Enterobacter gergoviae</i>	02	05	07 (8,0%)
<i>Enterocater sakazakii</i>	01	-	01 (1,1%)
<i>Escherichia coli</i>	13	12	25 (28,4%)
<i>Hafnia alvei</i>	01	-	01 (1,1%)
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	-	01	01 (1,1%)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	02	-	02 (2,3%)
<i>Klebsiella ozaenae</i>	-	01	01 (1,1%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	11	07	18 (20,4%)
<i>Proteus mirabilis</i>	03	01	04 (4,6%)
<i>Proteus vulgaris</i>	01	-	01 (1,1%)
<i>Providencia alcalifaciens</i>	01	02	03 (3,4%)
<i>Salmonella</i> spp.	07	03	10 (11,5%)
<i>Serratia liquefaciens</i>	01	01	02 (2,3%)
Total	49 (n=22)	39 (n=22)	88 (n=44)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Dentre as colônias bacterianas isoladas, destacam-se quatro espécies: *Escherichia coli* (28,4%), *Klebsiella pneumoniae* (20,4%), *Salmonella* spp. (11,5%) e *Enterobacter gergoviae* (7,9%) que juntas somam mais de 2/3 (68,1%) da abundância bacteriana isolada. Na figura 7, é possível observar a elevada quantidade citada.

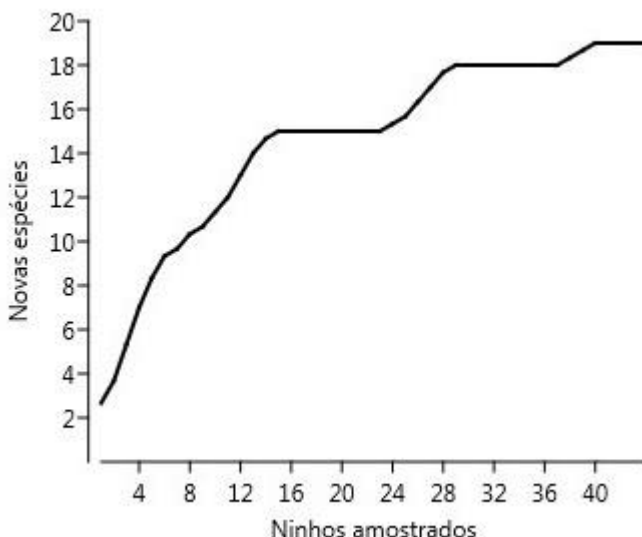
Figura 7: Representatividade de bactérias isoladas em ninhos artificiais de MAD e PVC ocupados por *Amazona brasiliensis* durante o período reprodutivo 2013/2014 na Ilha Rasa, PR.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A curva de acumulação de espécies (Figura 8) mostra uma tendência a estabilização, apontando que a quantidade de ninhos amostrados (44) foi suficiente para estimar a maioria das espécies de bactérias que ocorrem dentro dos ninhos artificiais de *Amazona brasiliensis*. O estimador de riqueza *Bootstrap*, estimou uma riqueza de 22,49 (SD \pm 0,48) bactérias encontradas nos ninhos com um intervalo de confiança de 95%. Tal diferença entre a riqueza observada e estimada, pode se dar por dois motivos: o primeiro e menos provável seria um baixo número amostral; o segundo e, talvez, o mais coerente, é a dificuldade de obter o crescimento de determinadas bactérias em meio de cultura.

Figura 8: Curva de acumulação de espécies de bactérias isoladas em ninhos artificiais de MAD e PVC ocupados por *Amazona brasiliensis* durante o período reprodutivo 2013/2014 na Ilha Rasa, PR.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O coeficiente de Jaccard indicou que a composição das bactérias em ninhos de MAD e PVC são similares em 47% ($J = 0,47$).

O teste de normalidade de Shapiro-Wilk revelou que as amostras não estão distribuídas normalmente ($p=0,0072$). Posteriormente, o teste de Mann-Whitney mostrou o valor de $p > 0,05$ ($p=0,1388$), sugerindo que não existe diferença estatística entre o número de bactérias isoladas em ninhos de MAD e PVC. Essa afirmativa foi reforçada pelo teste G que compara se amostras são homogêneas ou heterogêneas, os seguintes resultados do teste $G(\text{adj}) = 6,343$; $df = 8$; $p = 0,608$ corroboram para uma homogeneidade entre ninhos artificiais de MAD e PVC.

4.2. FUNGOS

A diversidade de fungos isolada foi baixa, apenas seis espécies. O número de amostras que houve crescimento também foi baixo (43,5%). Este crescimento abaixo do esperado ocorreu devido à metodologia de armazenamento das amostras utilizada. Foram coletadas

amostras de 46 substratos de ninhos e destas, 26 tiveram que ser congeladas após enriquecimento em BHI. Os dados obtidos nas amostras em que houve crescimento fúngico foram publicados na forma de pôster em evento científico internacional (Apêndice 3). Os dados dos fungos foram excluídos das análises estatísticas deste trabalho, devido à baixa prevalência observada e as tendências advindas do congelamento.

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, 94,7% das espécies bacterianas isoladas em substratos de ninhos artificiais ocupados por *Amazona brasiliensis* foram Gram negativas e 5,3% Gram positivas. Não foram encontrados trabalhos com a microbiologia de ninhos de qualquer outro psitacídeo de vida livre na literatura mundial. Diante deste cenário, partiu-se do princípio de que a composição da microbiota de ninhos é semelhante a encontrada em ninhegos (SERAFINI et al., no prelo; VAZ, 2015), já que, os filhotes permanecem por cerca de 60 dias dentro dos ninhos após a eclosão. O ninho se torna um microhabitat para os filhotes e, conseqüentemente, para os microrganismos ali se desenvolverem.

A microbiota entérica de Psittaciformes é composta, sobretudo por bactérias Gram positivas, sendo os principais gêneros: *Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp., *Streptomyces* spp., *Gaffkya* spp., *Aerococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Staphylococcus* spp., e *Streptococcus* spp. não hemolíticos (BANGERT et al., 1988; FLAMMER; DREWES, 1988; MARIETTO-GONÇALVES et al., 2010; ALLEGRETTI et al., 2014). Diversos autores consideram a presença de bactérias Gram negativas uma desarmonia no equilíbrio sanitário, bem como a presença de *Escherichia coli*, e a sua presença estaria associada ao seu potencial patogênico (TRABULSI, 1996; HOEFER, 1997; MATTES et al., 2005; KNÖBL; MENÃO, 2010).

Os resultados obtidos em nosso trabalho divergiram amplamente do relatado na literatura até o momento. Contudo, Saidenberg (2008) ressalta que a microbiota de adultos e filhotes de psitacídeos difere em vida livre, isso se dá perante o acúmulo de fezes e matéria orgânica ao longo dos quase dois meses que os filhotes permanecem dentro do ninho, além do ninho já poder ter sido utilizado por outra espécie com a microbiota diversa a de psitacídeos (e.g.: anatídeos, rapinantes e ranfastídeos). Já van Dongen et al. (2013) concluem que a microbiota de filhotes e adultos é naturalmente diferente, em um trabalho realizado com *Rissa tridactyla* (Gaivota-tridáctila), no golfo do Alasca (EUA), a partir de amostras cloacais de filhotes e adultos da espécie.

As bactérias, Gram negativas possuem uma maior importância, para a manutenção da saúde das populações, e geralmente surgem como agente primário nas infecções. As mais comuns isoladas em aves com infecções no trato respiratório são: *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* sp., *Pasteurella* spp., *Yersinia* sp. e *Salmonella* spp. (AGUILAR, 2006; CUBAS; SILVA; CATÃO-DIAS, 2006). Somente,

Pseudomonas sp., *Pasteurella* spp. e *Yersinia* sp. não foram isoladas nas amostras dos ninhos artificiais, as demais foram consideravelmente encontradas, totalizando 64,8% dos isolados de bactérias.

A única espécie Gram positiva isolada, *Bacillus* sp., também costuma ser patógeno oportunista, causando doença em hospedeiro já debilitado, com exceção de *B. anthracis* e o *B. cereus* que são indiscutivelmente patogênicas, inclusive, como arma biológica (antraz) e causa de intoxicação alimentar em humanos, respectivamente (GOMES, 2013).

As enterobactérias, praticamente a totalidade de espécies isoladas (94,7%), são bastonetes amplamente distribuídos na natureza, podendo ser encontrados no solo, na água, em vegetais e, como a nomenclatura da família sugere, no trato intestinal dos animais. São os responsáveis pela maioria das doenças infecciosas, sobretudo em animais imunocomprometidos (WINN et al., 2012). *Escherichia coli* é uma das principais integrantes da microbiota intestinal de animais. Acredita-se que a maioria dos sorotipos de *E. coli* não tenha fator de patogenicidade, entretanto algumas cepas adquiriram, durante o processo evolutivo, diferentes mutações gênicas que lhes conferiram a capacidade de ocasionar doença, fato que determina a grande versatilidade patogênica da espécie (CHERNAKI-LEFFER et al., 2002).

Salmonella spp. representam uma considerável parte do total de bactérias isoladas nos ninhos (11,5%) e merecem atenção, já que são as responsáveis pela salmonelose, uma das zoonoses mais problemáticas para a saúde pública mundial, principalmente, pela dificuldade no controle (HOFER; FILHO; REIS, 1997).

Infelizmente, estudos envolvendo a microbiota natural de aves silvestres são pouco comuns e, quando ocorrem se limitam a um baixo número amostral. Nos relatos de estudos com maior número amostral, estes descrevem os microrganismos isolados após epizootia ou grande distúrbio (e.g. alta taxa de mortalidade), não fornecendo dados da microbiota de indivíduos sadios no ambiente natural, úteis para comparação ou referência (BENSKIN et al. 2009).

Este trabalho objetivou identificar a microbiota de ninhos artificiais utilizados por *Amazona brasiliensis* com a identificação da prevalência das espécies e gêneros que naturalmente são encontradas nos mesmos. Como próximo passo deste trabalho, seria de extrema importância realizar a sorotipificação ou genotipagem desses microrganismos, já que o potencial de patogenicidade das enterobactérias está estreitamente relacionado ao tipo de cepa. Todas as cepas isoladas neste trabalho estão armazenadas na Base Avançada do

CEMAVE em Santa Catarina, sendo possível sua disponibilização para futuros estudos e diagnósticos com técnicas adicionais.

Quanto aos fungos, justamente, as amostras congeladas foram as que não apresentaram crescimento após incubação no meio de cultura em laboratório. WINN et al. (2012) relatam que as amostras que não serão processadas imediatamente, devem permanecer em temperatura ambiente, pois muitas espécies fúngicas não resistem a refrigeração, muito menos ao congelamento. Apenas nas 20 amostras que foram processadas imediatamente após a coleta (mesmo submetidas a uma pequena refrigeração) houve algum tipo de crescimento nos meios de cultura. Sendo mais de 70% *Aspergillus* spp. corroborando com a afirmativa de que este gênero é o mais resistente para culturas em laboratório (WINN et al., 2012).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A microbiota do substrato de ninhos artificiais ocupados por *Amazona brasiliensis* é composta, principalmente, por bactérias Gram negativas. Apesar desta composição parecer epidemiologicamente um tanto negativa ao comparar-se com dados da microbiota de adultos Psittaciformes publicados até o momento, os ninhegos de papagaios parecem estar adaptados a tais microrganismos uma vez que apresentavam-se hígidos e, a maioria teve sucesso reprodutivo (voaram dos ninhos).

A necessidade de compreender as diferenças entre ninhos artificiais disponíveis e utilizados para o manejo do papagaio-de-cara-roxa é fundamental, considerando principalmente que o fornecimento destes ninhos é atualmente indispensável, devido ao corte seletivo e supressão de hábitat que culmina com a baixa disponibilidade de cavidades naturais passíveis de serem ocupadas como ninhos. A determinação de características individuais do tipo de ninho mais apto para o desenvolvimento dos filhotes é ferramenta útil para incrementar o manejo e propiciar o sucesso reprodutivo de espécie tão sensível que apenas atualmente tem apresentado tendência populacional de estabilidade. Os dados obtidos neste estudo sobre a composição bacteriana entre tipos de ninho não diferenciou ou sugeriu a preferência de uso por qualquer um destes. Ou seja, indica-se que o manejo pode ser continuado utilizando-se ambos, se forem considerados apenas os resultados encontrados neste trabalho.

De qualquer maneira, seria muito importante, em trabalhos futuros, a caracterização microbiológica de ninhos naturais da espécie, com o intuito de melhor compreender os padrões naturais microbiológicos. Contudo, atualmente a disponibilidade de ninhos naturais é um sério problema observado, inclusive culminando em baixo número passível para obtenção das amostras e alta taxa de ocupação de ninhos artificiais pelos papagaios-de-cara-roxa. Complementando ainda mais o trabalho, uma caracterização microbiológica nos três tipos de ninhos utilizados (natural, MAD e PVC) ao longo de um ano contínuo de estudo (período reprodutivo e não-reprodutivo incluídos), visando compreender como funciona a dinâmica de colonização microbiológica em diferentes estágios de uso pelos papagaios, seria extremamente elucidativo.

Tais informações são importantes para subsidiar eventual continuidade no manejo *in situ* ou *ex situ* de *Amazona brasiliensis* ou de outro *Amazona* spp. constante no PAN Papagaios.

REFERÊNCIAS

ABBUD, M. C. **Reprodução e Conservação do Papagaio-de-cara-roxa *Amazona brasiliensis* (Linnaeus, 1758) (Aves: Psittacidae) no Litoral Norte do Estado do Paraná.** 2013. 75 f. Dissertação de Mestrado em Ecologia e Conservação. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Paraná.

AGUILAR, R. F.; HERNÁNDEZ, S. M.; HERNÁNDEZ, S. J. Medicina e patologia de aves de companhia. In:_____. **Atlas de medicina, terapêutica e patologia de animais exóticos.** São Caetano do Sul, SP: Interbook, 2006. Cap. 08, p. 213-264.

AGUIRRE, A.; OSTFELD, R.; DASZAK, P. New Directions in Conservation Medicine: Applied Cases of Ecological Health. New York, USA: **Oxford University**, 2012, 639 p.

ALLEGRETTI, L., et al. Isolation and molecular identification of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* spp. from faeces of the blue-fronted Amazon parrot in Brazil. **Beneficial Microbes**, v. 5, n. 4, p. 497-503, 2014.

AYRES, M., et al. **BioEstat 5.3: Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas.** 5 ed. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, Brasília CNPq, 2007, 364 p.

BANGERT, R. L., et al. A survey of aerobic bacteria and fungi in the feces of healthy psittacine birds. **Avian Diseases**, v. 32, n. 1, p. 46-52, 1988.

BENSKIN, C. M. H., et al. Bacterial pathogens in wild birds: a review of the frequency and effects of infection. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 84, n. 3, p. 349–373, 2009.

BIRDLIFE INTERNATIONAL 2013. *Amazona brasiliensis*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015.2. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em: 23/07/2015.

BRASIL. **Decreto nº 90.883**, de 31 de janeiro de 1985. Implantação da Área de Proteção Ambiental de Guaraqueçaba, no estado do Paraná. Disponível em: <<http://www2.camara.leg.br/legin/fed/decret/1980-1987/decreto-90883-31-janeiro-1985-441417-publicacaooriginal-1-pe.html>>. Acesso em: 17/11/2013.

BRASIL. **Instrução Normativa nº 3**, de 27 de maio de 2003: Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção. Disponível em: <http://www.mp.go.gov.br/nat_sucroalcooleiro/Documentos/legislacao/Geral/fauna/fauna3.pdf>. Acesso em: 17/11/2013.

BRASIL. **Lei nº 9.985, de 18 de julho de 2000**. Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza – SNUC. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LeIs/L9985.htm>. Acesso em: 24/06/2015.

BRASIL. **Portaria nº 444**, de 17 de dezembro de 2014: Lista Nacional Oficial das Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/biodiversidade/fauna-brasileira/avaliacao-do-risco/PORTARIA_N%C2%BA_444_DE_17_DE_DEZEMBRO_DE_2014.pdf>. Acesso em: 23/06/2015.

CHERNAKI-LEFFER, A. M., et al. Isolamento de enterobactérias em *Alphitobius diaperinus* e na cama de aviários no oeste do estado do Paraná, **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 4, n. 3, p. 243-247, 2002.

COLLAR, N. J.; JUNIPER, A. T. Dimensions and Causes of the Parrot Conservation Crisis. In: BEISSINGER, S. R.; SNYDER, N. F. R. **New world parrots in crisis: solutions from conservation biology**. Washington, D.C.:Smithsonian Institution Press, 1997.

CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens - medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2006.

DIEFENBACH, K. H.; GOLDHAMMER, S. P. Biologie und ökologie der rotschwanzamazone *Amazona brasiliensis*. **Trochilus**, v. 7, p. 72-78, 1986.

DITTRICH, J., et al. Fontes de variação da morfometria de filhotes do Papagaio -de-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*). **XX Congresso Brasileiro de Ornitologia**, p. 4-7. Universidade de Passo Fundo. Passo Fundo, RS. 2013.

FLAMMER, K.; DREWES, L. A. Species-related differences in the incidence of gram-negative bacteria isolated from the cloaca of clinically normal psittacine birds. **Avian Diseases**, v. 32, n. 32, p. 79-83, 1988.

GALETTI, M.; PIZO, M. A. **Ecologia e Conservação de Psitacídeos**. Belo Horizonte: Melopsittacus Publicações Científicas. 2002.

GALETTI, M. et al. Distribuição e tamanho populacional do papagaio-de-cara-roxa *Amazona brasiliensis* no estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v. 14, p. 239-247, 2006.

GOMES, M. J. P. **Tópicos em Bacteriologia Veterinária**. 2013, FAVET-UFRGS. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/labacvet/files/G%C3%AAnero%20Bacillus%204-2013-1%20vers%C3%A3o%202013.pdf>> Acesso em: 03/07/2015.

HOEFER, H. L. Diseases of the gastrointestinal tract. In: ALTMAN, R.B., et al. **Avian Medicine and surgery**. Philadelphia: Saunders. p.419-453, 1997.

HOFER, E.; FILHO, S. J. S.; REIS, E. M. F. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 17, n. 2, p. 55-62, 1997.

KNÖBL, T.; MENÃO, M. Escherichia coli enteropatogênica (EPEC) isoladas de psitacídeos. **FIEP Bulletin**, v. 80, p. 839-841, 2010.

IPARDES (Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social). **Diagnóstico Ambiental da APA de Guaraqueçaba**. Curitiba: IPARDES, p. 7-12, 1995.

LAFFERTY, K. D.; GERBER, L. R. Good Medicine for Conservation Biology: the intersection of epidemiology and conservation theory. **Conservation Biology**, v. 16, p. 593-604, 2002.

MACHADO, A. B. M.; DRUMMOND, G. M.; PAGLIA, A. P. (Eds.). **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. 1ª Ed., Vol. 2, Ministério do Meio Ambiente e Fundação Biodiversistas, Brasília, DF, Brasil, 1420p., 2008.

MARIETTO-GONÇALVES, G. A., et al. Detecção de *Escherichia coli* e *Salmonella* sp. em microbiota intestinal de Psittaciformes em fase de reabilitação para soltura. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, v.47, p.185-189, 2010.

MARINI, M. A.; GARCIA, F. I. Bird conservation in Brazil. **Conservation Biology**, v.19, p. 665-671, 2005.

MARTUSCELLI, P. Ecology and conservation of the red tailed Amazon *Amazona brasiliensis* in south-eastern Brazil. **Bird Conservation International**. v. 5, p. 225-240, 1995.

MATER NATURA. 2002. **Livro Vermelho da Fauna Ameaçada do Estado do Paraná**. Disponível em: <www.maternatura.org.br/livro/index.asp?idgrupo=9&index=ger>. Acesso em: 19/03/2013.

MATTES, B. R., et al. Influência da biossegurança na colonização intestinal por *Escherichia coli* em psitacídeos. **Arquivo Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 2, p.13-16, 2005.

MORELLATO, L. P. C.; HADDAD, C. F. B. Introduction: The Brazilian Atlantic Forest. **Biotropica**, v. 32, p. 786-792, 2000.

REAL, L. A. Sustainability and the ecology of infectious disease. **Bioscience**, v. 46, p. 88-97, 1996.

REED, D. H., J. J.; et al. Estimates of minimum viable population sizes for vertebrates and factors influencing those estimates. **Biology Conservation**. v. 113, p. 23-34, 2003.

RICKLEFS, R. E. **Economia da natureza**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

SAIDENBERG, A. B. S. **Detecção de fatores de virulência de *Escherichia coli* isoladas de psitacídeos com diferentes manifestações clínicas**. São Paulo, 2008. 91 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade de São Paulo.

SCHERER-NETO, P. **Contribuição à biologia do papagaio-de-cara-roxa, *Amazona brasiliensis* (LINNAEUS, 1758) (Psittacidae, aves)**. Curitiba, 1989. 170 f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Universidade Federal do Paraná.

SCHUNCK, F. *et al.* **Plano de Ação para a Conservação dos Papagaios da Mata Atlântica**. 1ª ed. Brasília: ICMBio, v. 1, 128 f., 2011.

SERAFINI, P.P. *et al.* **O uso da microbiologia como ferramenta para a conservação de aves ameaçadas: dados preliminares para o papagaio-de-cara-roxa, *Amazona brasiliensis* (Aves: Psittacidae) no Paraná**. Submetida a Arquivos de Veterinária e Zoologia da UNIPAR em 2014. No prelo.

SICK, H. **Ornitologia Brasileira**. São Paulo: Nova Fronteira, 1997.

SIPINSKI, E. A. B, *et al.* Tendência populacional do papagaio-de-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*) no litoral do estado do Paraná. **Ornithologia**, v. 6, n.2, p. 136-143, 2014.

SOS MATA ATLÂNTICA. **A Mata Atlântica**. 2010. Disponível em: <<http://www.sosma.org.br/nossa-causa/a-mata-atlantica>>. Acesso em: 19/11/2013.

SOULÉ, M. E. **Conservation biology: the science of scarcity and diversity**. Sunderland: Sinauer Associates, 1996.

TABARELLI, M., et al. The Atlantic Forest of Brazil: endangered species and conservation planning. In: Galindo-Leal, C. et al., (Ed.). **The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, trends, and outlook**. Washington D.C.: Center for Applied Biodiversity Science and Island Press. p. 86-94, 2003.

TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. São Paulo: Ateneu, p. 386, 1996.

VAN DONGEN et al.: Age-related differences in the cloacal microbiota of a wild bird species. **BMC Ecology**, p. 13-11, 2013.

VAZ, F. F. **Perfil sanitário de filhotes de *Amazona brasiliensis* de vida livre no Paraná: parâmetros hematológicos, bioquímicos e pesquisa de agentes infecciosos**. 2015. 90 f. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Paraná.

WINN JR, W. et al. **Koneman diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2012, 1565 p.

ZAR, J. H. 1999. **Biostatistical analysis**. 4ª ed. New Jersey: Prentice-Hall Inc. 663 p.

APÊNDICE A – Bactérias isoladas em amostras dos respectivos ninhos artificiais de MAD ocupados por *Amazona brasiliensis* na temporada reprodutiva 2013/2014, na Ilha Rasa, PR.

Ninho	Espécies bacterianas isoladas		
03	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Escherichia coli</i>	
05	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Enterobacter gergoviae</i>	<i>Escherichia coli</i>
07	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Escherichia coli</i>	
08	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>	
14	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Hafnia alvei</i>
21	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>
25	<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
26	<i>Klebsiella oxytoca</i>		
27	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Providencia alcalifaciens</i>	<i>Escherichia coli</i>
29	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
36	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Citrobacter koseri</i>
40	<i>Enterocater sakazakii</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
42	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	
43	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Escherichia coli</i>
45	<i>Escherichia coli</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	
48	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
49	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	
50	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Salmonella</i> spp.	
51	<i>Escherichia coli</i>		
52	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Escherichia coli</i>
57	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Enterobacter gergoviae</i>	<i>Salmonella</i> spp.
RS	<i>Escherichia coli</i>		

Fonte: Elaborado pelo autor.

**APÊNDICE B – Bactérias isoladas em amostras dos respectivos
ninhos artificiais de PVC ocupados por *Amazona brasiliensis* na
temporada reprodutiva 2013/2014, na Ilha Rasa, PR.**

APÊNDICE C – Descrição

Ninho	Espécies bacterianas isoladas		
01	<i>Escherichia coli</i>		
02	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
10	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	
20	<i>Escherichia coli</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>	
59	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Enterobacter gergoviae</i>	
60	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Enterobacter gergoviae</i>	
61	<i>Escherichia coli</i>		
62	<i>Enterobacter aerogenes</i>		
64	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	
65	<i>Escherichia coli</i>		
66	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
67	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Providencia alcalifaciens</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
70	<i>Escherichia coli</i>		
71	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Enterobacter gergoviae</i>
72	<i>Enterobacter gergoviae</i>	<i>Escherichia coli</i> / <i>Salmonella</i> spp.	<i>Proteus mirabilis</i>
76	<i>Escherichia coli</i>		
80	<i>Klebsiella ozaenae</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	
81	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	
83	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Providencia alcalifaciens</i>	
84	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	
85	<i>Enterobacter gergoviae</i>	<i>Escherichia coli</i>	
86	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	

Fonte: Elaborado pelo autor.

APÊNDICE C – Fungos filamentosos isolados em amostras dos respectivos ninhos artificiais de MAD e PVC ocupados por *Amazona brasiliensis* na temporada reprodutiva 2013/2014, na Ilha Rasa, PR.

Dados publicados na forma de pôster durante o X Congresso Neotropical de Ornitologia (NOC) e XXII Congresso Brasileiro de Ornitologia (CBO), Manaus/AM, 2015.

Ninho	Tipo de ninho	Espécies fúngicas isoladas
05	MAD	<i>Aspergillus</i> spp.
21	MAD	<i>Aspergillus</i> spp.
25	MAD	<i>Aspergillus</i> spp.
27	MAD	<i>Aspergillus</i> spp. <i>Trichophyton</i> sp.
29	MAD	<i>Aspergillus</i> spp.
38	MAD	<i>Trichophyton</i> sp.
43	MAD	<i>Microsporium gypseum</i>
45	MAD	<i>Trichophyton</i> sp.
51	MAD	<i>Aspergillus</i> spp.
57	MAD	<i>Aspergillus</i> spp. <i>Syncephalastrum</i> sp.
10	PVC	<i>Aspergillus</i> spp.
62	PVC	<i>Aspergillus</i> spp.
64	PVC	<i>Aspergillus</i> spp.
65	PVC	<i>Fusarium</i> sp.
67	PVC	<i>Aspergillus</i> spp.
70	PVC	<i>Aspergillus</i> spp.
72	PVC	<i>Aspergillus</i> spp. <i>Mucor</i> sp.
80	PVC	<i>Aspergillus</i> spp.
83	PVC	<i>Aspergillus</i> spp.
84	PVC	<i>Aspergillus</i> spp.
85	PVC	<i>Aspergillus</i> spp.

Fonte: Elaborado pelo autor.

ANEXO A – Resumo publicado durante o X Congresso Neotropical de Ornitologia (NOC) e XXII Congresso Brasileiro de Ornitologia (CBO), Manaus/AM, 2015.

FUNGAL CHARACTERIZATION IN OCCUPIED NESTS BY FREE-LIVING *AMAZONA BRASILIENSIS*

Rafael Meurer¹, Cristiane Kiyomi Miyaji Kolesnikovas², Elenise Angelotti Bastos Sipinski³, Frederico Fontanelli Vaz⁴ e Patricia Pereira Serafini⁵

¹ Graduando em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC

² Médica Veterinária, Associação R3 Animal, Florianópolis-SC

³ Coordenadora do Projeto de Conservação do Papagaio-de-cara-roxa, Sociedade de Pesquisa em Vida Selvagem e Educação Ambiental – SPVS, Curitiba-PR

⁴ Mestrando em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR

⁵ Analista Ambiental, Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Aves Silvestre, ICMBio, Florianópolis-SC

Email: rfa.meurer_@hotmail.com

Amazona brasiliensis is a Psittacidae rated in the Brazilian list as near threatened with extinction, but highly dependent on management. It is endemic to the Atlantic Forest and has a restricted range on the south coast of Brazil. Currently, the total population is estimated at 6.650 individuals, 5.000 only for the state of Paraná. Among the actions outlined in the National Action Plan for the Conservation of Parrots of the Atlantic Forest, published in 2011, is the characterization of the health profile of populations of *A. brasiliensis*, *A. pretrei*, *A. rhodocorytha* and *A. vinaceae* in the wild. The objective of this study was to identify fungi present in the substrate of the artificial (wood or PVC) nests occupied by *A. brasiliensis* sampled and determine the natural patterns of fungi occurring during the reproductive period. The collections of the samples took place between December 2014 and January 2015, at Rasa Island (PR), using sterile plastic swabs and transport media. The nests surveyed (n=21) contained nestlings with age between 30 and 55 days. The microbiological and morphological analysis was performed following standard methodology (WINN et al. 2012). 24 colonies were isolated from filamentous fungi, being 70.9% (n = 17) *Aspergillus* spp., 12.6% (n = 3) *Trycophyton* sp., 4.1% (n = 1) *Microsporum gypseum*, 4.1 % (n = 1) *Fusarium* sp., 4.1% (n = 1) *Mucor* sp., 4.1% (n = 1) *Syncephalastrum* sp. The results constitute unprecedented characterization of fungal microbiota of the nests of this species and are important for monitoring the health of the population and an essential tool to management and conservation efforts.