

**Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática da  
Área Ambiental I – Porção Capixaba do Rio Doce e Região  
Marinha e Costeira Adjacente**

**RELATÓRIO ANUAL PMBA/Fest-RRDM  
2020**

**ANEXO 6 – MEGAFAUNA**

**Monitoramento de mamíferos, tartarugas e aves marinhas  
associados à foz do rio doce, plataforma continental e áreas  
protegidas adjacentes**

**METODOLOGIA**

**Câmara Técnica**

Adalto Bianchini

Alex Cardoso Bastos

Edmilson Costa Teixeira

Eustáquio Vinícius de Castro

Fabian Sá

Jorge Abdala Dergam dos Santo

## 2. AVES

### 2.1 GENÉTICA POPULACIONAL DE AVES MARINHAS

Para o monitoramento dos possíveis impactos do rompimento da barragem de Mariana (RBM) sob o aspecto genético das aves marinhas, foram utilizadas três espécies: *Sula leucogaster*, *Phaethon aethereus* (ambas as populações do arquipélago de Abrolhos – BA) e *Pterodroma arminjoniana* (Ilha da Trindade – ES). Amostras das três espécies, coletadas anteriormente ao rompimento da barragem (ano de 2011) também foram analisadas com o intuito de verificar eventuais mudanças em relação à diversidade genética.

O DNA genômico foi extraído utilizando o kit DNeasy Blood & Tissue Qiagen® a partir de amostras de sangue preservadas em álcool absoluto. Marcadores do tipo microssatélites (SSR) foram amplificados utilizando *primers* e protocolos específicos descritos para cada espécie na bibliografia (JONES et al., 2017; TAYLOR et al., 2010). Análises descritivas da diversidade genética foram realizadas nos programas FSTAT v1.2 (GOUDET, 1995), Arlequin 3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). Para verificar diferenças na composição genética das amostras coletadas antes e depois do rompimento da barragem, uma análise de coordenadas principais (PCoA) foi feita para cada espécie, utilizando o programa GenAIEx 6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2006, 2012).

### 2.2 SAÚDE

Para a coleta de amostras biológicas, foram realizadas quatro expedições ao Arquipélago de Abrolhos (Tabela 1): novembro de 2018, fevereiro de 2019, abril de 2019 e em fevereiro/março de 2020; além de duas expedições para a Ilha da Trindade (Tabela 2), em junho de 2019 e em outubro de 2019. As amostras consistiram em esfregaços sanguíneos, suabes de cloaca, orofaringe e sangue total armazenado em etanol absoluto.

Tabela 1: Lista das amostras coletadas, por espécie, no Arquipélago de Abrolhos, em diferentes expedições

Data	Espécie	Amostras
Novembro/2018	<i>P. aethereus</i>	22 esfregaços
Fevereiro/2019	<i>P. aethereus</i>	28 esfregaços
Fevereiro/2019	<i>S. leucogaster</i>	28 esfregaços
Fevereiro/2019	<i>S. dactylatra</i>	28 esfregaços
Abril/2019	<i>S. leucogaster</i>	23 suabes (cloaca/orofaringe), sangue em etanol
Fevereiro/2020	<i>P. aethereus</i>	27 amostras de sangue e suabes (cloacais/orofaringe)
Fevereiro/2020	<i>S. leucogaster</i>	21 amostras de sangue e suabes (cloacais/orofaringe)
Fevereiro/2020	<i>P. arminjoniana</i>	10 amostras de sangue e suabes (cloacais/orofaringe)

Tabela 2: Lista das amostras coletadas, por espécie, na Ilha da Trindade, em diferentes expedições

Data	Espécie	Amostras
Junho/2019	<i>P. arminjoniana</i>	31 esfregaços, 12 suabes (cloaca/orofaringe), 21 sangue total
Outubro/2019	<i>P. arminjoniana</i>	10 amostras de sangue e suabes (cloacais/orofaringe)
Outubro/2019	<i>G. alba</i>	13 amostras de sangue e suabes (cloacais/orofaringe)
Outubro/2019	<i>S. dactylatra</i>	06 amostras de sangue e suabes (cloacais/orofaringe)
Outubro/2019	<i>A. stolidus</i>	04 amostras de sangue e suabes (cloacais/orofaringe)
Outubro/2019	<i>O. fuscatus</i>	03 amostras de sangue e suabes (cloacais/orofaringe)

As amostras coletadas foram usadas para os seguintes exames: hemograma, hematoscopia, microbiologia (identificação de patógenos/virulência e sensibilidade a antimicrobianos (antibiograma), pesquisa de bactérias Gram-negativas com genes de resistência a antibióticos, diagnóstico molecular virológico e diagnóstico molecular parasitológico.

Os indivíduos amostrados para análises sanitárias não foram os mesmos para os quais foram obtidas informações sobre o uso do espaço e dos recursos alimentares, inviabilizando a comparação do estado de saúde com variáveis ambientais. Isso ocorreu devido a questões logísticas de campo, em Abrolhos, especialmente por conta da limitação de espaço na casa do ICMBio na ilha Santa Bárbara. Também foi uma decisão visando a segurança dos indivíduos amostrados para evitar o estresse com um aumento no tempo de manipulação e coleta de número maior de amostras de cada espécime. Esse último ponto possui grande relevância para essa decisão, pois os animais rastreados estavam com ninhos ativos, em período de cuidado dos filhotes, e uma eventual deserção do ninho por um dos adultos poderia inviabilizar o sucesso reprodutivo da espécie, que já é baixo em *P. aethereus* (ver capítulo correspondente), espécie ameaçada de extinção. No entanto, cabe ressaltar que todos os parâmetros avaliados nesse projeto representam amostragens para compreender a variabilidade da população de cada espécie, de modo que os resultados devem ser interpretados em nível da população, e não do indivíduo.

### 2.2.1 Esfregaço sanguíneo

A confecção do esfregaço sanguíneo foi feita por meio da disposição de uma gotícula de sangue na lâmina de vidro limpa e seca e rapidamente uma lâmina extensora foi deslizada sobre ela, antes do sangue secar ou coagular.

A lâmina foi mantida em temperatura ambiente até secar, fixada por imersão em metanol absoluto por alguns segundos e, após a secagem, foram todas embrulhadas em papel alumínio e congeladas para assegurar sua conservação até a etapa de coloração. Os esfregaços foram corados por meio de coloração de panótico rápido. A leitura da lâmina foi feita com o auxílio do microscópio binocular da Nikon. Os esfregaços foram examinados sob microscopia ótica (magnificação 1000×).

### 2.2.2 Hemograma e hematoscopia

O esfregaço sanguíneo foi realizado para a obtenção da contagem diferencial de leucócitos, sendo avaliados 100 leucócitos para contagem diferencial de heterófilos, linfócitos, eosinófilos, monócitos e basófilos. O resultado foi expresso em número relativo (%). O número de campos microscópicos examinados foi registrado concomitantemente com a contagem diferencial de leucócitos, de modo a permitir o cálculo da densidade relativa de leucócitos (leucócitos por campo) além da busca minuciosa por hemoparasitas.

### 2.2.3 Microbiologia de virulência e susceptibilidade aos antimicrobianos

As amostras foram semeadas em tubos contendo 3mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion), incubados a 37°C por 24 h, para seu enriquecimento. Após esse período, as amostras foram semeadas em ágar sangue de carneiro (5%) e em MacConkey e, em seguida, incubadas nas mesmas condições anteriores (*Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*). Visando a pesquisa de *Salmonella* spp., os suabes foram inoculados em caldo tetrationato e em ágar xilose-lisina-tergitol 4 (XLT4), e incubados a 37°C por 24h. As placas que apresentaram crescimento bacteriano foram submetidas à caracterização morfológica e bioquímica das colônias.

As amostras de cloaca foram semeadas em diferentes meios seletivos suplementados com antibióticos para o isolamento de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas para possível identificação de isolados produtores de ESBL, MCR-1 e MRSA. A triagem de bactérias Gram-negativas (membros da família Enterobacteriaceae, não-fermentadores e *Vibrio* spp.) foram utilizados os meios seletivos MacConkey (Acumedia) suplementado com ceftriaxona 2 µg/ml e colistina 3 µg/ml e TCBS (Tiosulfato-Citrato-Bile-Sacarose agar, Acumedia). Para triagem de bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus* spp.), as amostras foram semeadas em agar Manitol (Acumedia) suplementado com oxacilina 8 µg/ml. As amostras foram incubadas a 37°C por 18-24 h.

Para a pesquisa de *Enterococcus* spp. com resistência adquirida à vancomicina (VRE) foi usado um meio cromogênico específico e seletivo para a detecção e diferenciação das espécies *E. faecium* e *E. faecalis*.

Para o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos foi realizado o teste de Kirby-Bauer, sinergismo para pesquisa de ESBL e inibição com EDTA (ESPOSITO et al., 2017). Foram testadas 15 drogas: amicacina, gentamicina, cefepime, meropenem, imipenem, ceftazidima, ciprofloxacina, amoxicilina/ácido clavulânico, ertapenem, cefoxitina, cefotaxima, ceftiofur, aztreonam, enrofloxacin, sulfametoxazol/trimetoprima. O inóculo foi preparado a partir de colônias isoladas, presentes na placa de isolamento primário. A amostra da colônia a ser testada foi suspensa em caldo de cultivo, de forma a se obter uma suspensão com turvação adequada. Após essa etapa, uma placa contendo meio Ágar de Mueller Hinton foi uniformemente semeada com uma amostra da suspensão, por meio de um swab estéril. Os discos de papel filtro impregnados com quantidades determinadas de antibióticos específicos foram então dispostos ordenadamente sobre a superfície do meio e as placas

foram incubadas a 37°C por cerca de 24 h. A segunda metodologia utilizada foi o disco combinado de substratos com e sem EDTA, para a comparação das zonas de inibição. Para esse teste foram usados dois discos com 10 µg de colistina no ágar e a um deles foram adicionados 100 mM de EDTA. Para interpretação, os halos de substrato com e sem EDTA foram medidos e comparados após 18-24 horas de incubação a 37°C (ESPOSITO et al., 2017).

Os critérios de realização e interpretação dos testes foram realizados seguindo as diretrizes do manual Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2017).

#### **2.2.4 Pesquisa de bactérias Gram-negativas multirresistentes**

Pesquisa realizada no laboratório de Resistência Bacteriana e Alternativas Terapêuticas, do Departamento de Microbiologia da Universidade de São Paulo, em meio de transporte de Amies.

As amostras biológicas, contidas em swab, foram transferidas para tubos de caldo BHI (Brain Heart Infusion) e incubadas a 36°C por um período de 18-24 horas. Em seguida, foi retirada uma alçada de cada cultura líquida e estriada em placas de ágar MacConkey suplementado com ceftriaxona, ciprofloxacina e colistina (2 µg/mL cada). As diferentes colônias crescidas em ágar MacConkey suplementado com ceftriaxona foram triadas para a produção de ESBL e serino- e metalo-carbapenemases. As colônias crescidas em ágar MacConkey suplementado com ciprofloxacina e colistina foram triadas para resistência aos antibióticos da classe das quinolonas e para a produção de MCR, respectivamente.

Para a triagem de bactérias produtoras de ESBL foi utilizado o método de disco aproximação (JARLIER et al., 1988), em que um disco de amoxicilina com ácido clavulânico (30 µg) foi colocado no centro de placas de antibiograma e discos de ceftazidima (30 µg), cefotaxima (30 µg), ceftriaxona (30 µg) e cefepima (30 µg) foram dispostos a 2,5 cm de distância do mesmo. Nesse método, a produção de ESBL é considerada positiva quando ocorre o aparecimento de uma zona fantasma ou alargamento do halo de inibição da cefalosporina (Jarlier et al., 1988). A triagem de bactérias produtoras de serino- e metalo-carbapenemases foi feita através do método de antibiograma por disco-difusão (Bauer et al., 1966), utilizando discos de ceftazidima (30 µg), cefotaxima (30 µg), ceftriaxona (30 µg), cefepima (30 µg), imipenem (10 µg), ertapenem (10 µg), meropenem (10 µg) e aztreonam (30 µg), onde a resistência a todos esses antibióticos é indicativo de produção de serino-carbapenemases, e a resistência a todos esses antibióticos, com exceção do aztreonam, é indicativo de produção de metalo-carbapenemases (CLSI, 2018).

A avaliação da susceptibilidade às quinolonas, dos isolados que cresceram em ágar MacConkey suplementado com ciprofloxacina, também foi realizada pelo método de antibiograma por disco-difusão (BAUER et al., 1966), utilizando discos de ácido nalidíxico (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), enrofloxacin (5 µg), levofloxacina (5 µg), marbofloxacina (5 µg), moxifloxacina (5 µg), norfloxacina (10 µg), ofloxacina (5 µg) e perfloxacina (5 µg). Já a triagem para a produção de MCR foi realizada através de três metodologias diferentes – NP teste (NORDMANN; JAYOL; POIREL, 2016), um teste rápido que identifica a metabolização de glicose associada ao crescimento bacteriano, na presença de uma determinada concentração de colistina, utilizando o vermelho fenol como indicador de pH;

determinação de concentração inibitória mínima (CIM), por microdiluição em caldo (CLSI, 2018); e teste de disco-combinado, comparando as zonas de inibição de um disco de colistina (10 µg) com um disco de colistina (10 µg) com EDTA (100 nM).

Os isolados que apresentaram perfil de resistência de interesse foram submetidos à identificação da espécie bacteriana utilizando o equipamento Vitek®2 (bioMérieux) e foram, subsequentemente, submetidos a sequenciamento de genoma completo. Esses isolados foram armazenados em ágar Triptona de Soja (TSA) a 1%, à temperatura ambiente, e em caldo BHI suplementado com 20% de glicerol, a -20°C.

O DNA genômico foi extraído utilizando o kit PureLink™ Quick Gel Extraction & PCR Purification Combo (Life Technologies, Carlsbad, CA), de acordo com as recomendações do fabricante. A qualidade e a concentração das amostras de DNA foram primeiramente avaliadas por espectrofotometria no aparelho DeNovix DS-11 (DeNovix Inc., Wilmington, USA). Posteriormente, tais parâmetros foram avaliados através do fluorômetro Qubit® 2.0 (Life Technologies, Carlsbad, CA), utilizando o kit Qubit® dsDNA BR Assay (Life Technologies, Carlsbad, CA), conforme recomendações do fabricante.

As bibliotecas genômicas, do tipo paired-end, foram construídas utilizando os kits Nextera XT DNA e Nextera DNA Flex (Illumina Inc., Cambridge, UK), de acordo com os protocolos do fabricante (Nextera® XT DNA Library Prep Reference Guide; Document 15031942 v01; Nextera™ DNA Flex Library Prep Reference Guide; Document 1000000025416 v04). Em seguida, a quantificação das bibliotecas prontas foi avaliada através do fluorômetro Qubit® 2.0 (Life Technologies, Carlsbad, CA), utilizando o kit Qubit® dsDNA HS Assay (Life Technologies, Carlsbad, CA), conforme recomendações do fabricante. Os tamanhos dos fragmentos das bibliotecas foram avaliados pelo sistema Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), utilizando o kit DNA High Sensitivity (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). O sequenciamento dos genomas foi realizado no Laboratório de Investigação e Análise de Genomas (Genome Investigation and Analysis Laboratory - GENIAL), do Centro de Facilidades para a Pesquisa (CEFAP) da USP, utilizando as plataforma Illumina NextSeq (Illumina Inc., San Diego, CA), de 2x150 pb, e Illumina MiSeq (Illumina Inc., San Diego, CA), de 2x250 pb.

Após o sequenciamento, as sequências geradas foram submetidas à montagem de novo, utilizando as versões correntes dos programas de montagem CLC Genomics Workbench (CLC bio, Cambridge, MA, USA) e Unicycler (WICK et al., 2017). Em seguida, as sequências montadas foram submetidas a análise pelas ferramentas do Center for Genomic Epidemiology (<http://www.genomicepidemiology.org/>), para a predição de espécie (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/SpeciesFinder/>), sorotipo (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/SerotypeFinder/>), genes de resistência e mutações de ponto (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>), genes de virulência (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/VirulenceFinder/>), tipagem clonal da bactéria (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>) e identificação de plasmídeos (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>) e tipagem plasmidial (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/pMLST/>). A predição de genes de resistência também foi realizada



utilizando a ferramenta online CARD (The Comprehensive Antibiotic Resistance Database; <https://card.mcmaster.ca/analyze/rqi>). A predição de genes de virulência de outras espécies, que não *E. coli*, foi feita através da ferramenta blastn contra o banco de dados do Virulence Factors of Pathogenic Bacteria (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/>), utilizando um limiar  $\geq 90\%$  de identidade. A análise de filogrupos de isolados de *E. coli* foi realizada utilizando a ferramenta online ClermonTyping ([http://clermontyping.iame-research.center/success/analysis-29062019\\_112344](http://clermontyping.iame-research.center/success/analysis-29062019_112344)). A análise do ambiente genético dos genes de resistência de interesse foi realizada utilizando o programa Geneious v. R9 (Biomatters Ltd, New Zealand) e a ferramenta online BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). As análises de mutações de ponto foram realizadas utilizando o programa Geneious v. R9 (Biomatters Ltd, New Zealand) e a ferramenta online PROVEAN Protein ([http://provean.jcvi.org/seq\\_submit.php](http://provean.jcvi.org/seq_submit.php)), que permite predizer se uma mutação é neutra ou deletéria.

### 2.2.5 Diagnóstico molecular virológico

As amostras foram coletadas com suabe estéril e conservadas em criotubos, mantidos congelados até o momento do processamento. O material foi triado e processado no Departamento de Microbiologia, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

As amostras foram testadas para a detecção de material genético viral (Influenza, Herpesvírus, Adenovírus, Circovírus e Avulavírus) através da técnica de Real Time Polimerase Chain Reaction (qPCR) com primers descritos na literatura. A extração do DNA/RNA viral foi feita por meio do *kit* de purificação da Thermo Fisher MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit.

### 2.2.6 Diagnóstico molecular parasitológico

As amostras foram coletadas em microtubos tipo Eppendorf® de 1,5 ml estéril, com álcool absoluto, mantidos refrigerados até o momento do processamento. O material foi triado e processado no Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP).

O DNA genômico foi extraído de acordo com as instruções do fabricante do kit comercial PureLink® Genomic DNA mini kit (INVITROGEN- Life Technologies, Carlsbad, CA). O DNA extraído foi armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da realização da PCR em tempo real (qPCR). As amostras foram triadas inicialmente para a pesquisa de DNA de *Borrelia* spp., foi utilizado qPCR semiquantitativo (7500 Real Time PCR Systems apparatus – Applied Bio Systems, Foster City, CA, USA) como triagem, com os primers Bor16S3F senso (AGCCTTTAAAGCTTCGCTTGTA) e Bor16S3R anti-senso (GCCTCCCGTAGGAGTCTGG3, e sonda interna Bor16S3P senso (6FAMCCGGCCTGAGAGGGTGAACGG), que amplifica um fragmento de 148pb do gene 16S RNA conforme Parola et al. (2011). As amostras positivas nessa análise seguiram para *nested* PCR utilizando par de primers FlaLL senso (ACATATTTCAGATGCAGACAGAGGT) e FlaRL anti-senso

(GCAATCATAGCCATTGCAGATTGT) externos, que amplificam um fragmento de 665 pb do gene flagelina-B (Flab) e uma segunda reação utilizando um par de primers FlaLS senso (AACAGCTGAAGAGCTTGAATG) e FlaRS anti-senso internos (CTTTGATCACTTATCATTCTAATAGC) que amplificam um fragmento de 354 pb, conforme protocolo previamente adaptado de STROMDAHL et al. (2003). Para cada reação foram utilizados controles positivos (*Borrelia anserina*) e controle negativo (água Milli-Q). As amostras positivas seguirão para caracterização gênica através da PCR e Nested-PCR convencional. Os marcadores e condições da PCR e Nested-PCR estão listados no *Material Suplementar A6MAS1***Erro! Fonte de referência não encontrada.**, Tabela 1. As condições do ciclo para ambas as reações envolveram um tempo inicial de 3 min para desnaturação a 95°C e depois 40 ciclos, com cada ciclo consistindo de 1 min desnaturação a 95°C, anelamento de 1 min a 55°C e uma extensão final de 1 min a 75°C. Todas as reações foram reveladas em gel de agarose 1,5%. A revelação foi feita com Syber Safe® (Eugene, OR, USA) de acordo com as especificações do fabricante e a visualização das bandas em transiluminador ultravioleta.

## 2.3 CONTAMINANTES

A amostragem de sangue, penas de contorno e penas em crescimento de *T. chlororhynchos* foram realizadas em alto mar, nos meses de fevereiro e abril de 2006, compreendendo, portanto, o período antes do rompimento, e sangue e penas de contorno foram coletadas em setembro de 2019, representando o período posterior ao rompimento da barragem. Já as coletas de *S. leucogaster* e de *P. aethereus* ocorreram no arquipélago dos Abrolhos, Bahia, em fevereiro e agosto de 2011, no qual sangue e penas em crescimento representam os anos anteriores ao rompimento, e em fevereiro de 2019, cujas amostras de sangue e penas de contorno representam o período posterior. Por fim, amostras de sangue e penas primárias de *P. arminjoniana* foram coletadas na ilha da Trindade, Espírito Santo, entre dezembro de 2006 e abril de 2007, para o período anterior ao rompimento, e em março e abril de 2019, com coletas de sangue e penas de contorno que representam o período posterior ao rompimento. As amostras foram processadas e encaminhadas ao Laboratório de Zoofisiologia da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), responsável também pelas análises do anexo 1. Fez-se as leituras das concentrações dos elementos traço arsênio (As), cádmio (Cd), cromo (Cr), cobre (Cu), ferro (Fe), mercúrio (Hg), manganês (Mn), chumbo (Pb) e zinco (Zn), em espectrofotômetro de absorção atômica. Além destas, foram realizadas as determinações das concentrações de bifenilas policloradas (PCB), de compostos policlorados, de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) e de éteres difenílicos policlorados (PBDE) no sangue e nas penas das quatro espécies das amostras referentes ao período pós rompimento da barragem. Os resultados de elementos traço foram analisados quanto às concentrações mínimas, médias, medianas e máximas, e comparados estatisticamente considerando-se os grupos antes e depois do rompimento da barragem nas amostras de sangue de *S. leucogaster*, *P. arminjoniana* e *P. aethereus*, e nas amostras de penas das quatro espécies, através de teste Mann-Whitney não pareado. A fim de comparar se o tipo de penas, contorno ou crescimento, influencia na concentração dos elementos traço, realizou-se



um teste Mann-Whitney pareado em amostras de *T. chlororhynchos*. Além disso, correlações entre os diferentes elementos no sangue de *S. leucogaster*, *P. arminjoniana* e *P. aethereus* e nas penas das quatro espécies, foram testadas. Por fim, correlações entre as concentrações de um mesmo elemento nos diferentes tecidos, sangue e penas, foi testada para as quatro espécies no período anterior ao rompimento, e em *S. leucogaster*, *P. arminjoniana* e *P. aethereus* para ambos os períodos, considerando-se o mesmo indivíduo amostrado. As correlações deram-se pelo teste de correlação de Spearman, com correção de Bonferroni para múltiplas comparações (ZAR, 2010). Os resultados acerca das concentrações de compostos orgânicos foram analisados quanto às concentrações mínimas, médias, medianas e máximas. As análises estatísticas foram conduzidas em ambiente R v. 3.6.1 (R Core Team 2020) e os valores foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ . Todos os dados apresentados no relatório anual 1 foram revisados e atualizados, não havendo variações substanciais nos dados numéricos e nenhuma alteração na interpretação ou conclusões.

Assim como para os parâmetros sanitários, os indivíduos amostrados para as análises de concentração de contaminantes não foram os mesmos para os quais foram obtidos dados de uso do espaço e dos recursos alimentares. Novamente, isso ocorreu por limitações de logística em campo e para evitar o estresse da manipulação excessiva da ave. No entanto, entendemos que isso não prejudica a análise dos efeitos do impacto, visto que as amostragens das espécies representam o que ocorre em nível populacional, além de uma amostragem pontual da área de vida não representar o uso do espaço pelo indivíduo, o que pode variar com ventos, distribuição da presa, estágio reprodutivo, entre outros fatores. Adicionalmente, a contaminação e variações nas concentrações de contaminantes nos tecidos integram um conjunto de eventos alimentares, em período mais longo que o rastreamento realizado e, desta forma, não é apropriada uma correlação direta entre rastreamento e concentração de um dado contaminante, em nível individual. No entanto, o presente relatório deixa clara a contaminação dos tecidos analisados para a amostra da população analisada quando comparadas amostras obtidas antes e depois do rompimento da barragem, o que representa uma forte evidência do impacto dos rejeitos sobre as aves.

## 2.4 ECOLOGIA TRÓFICA

Amostras de sangue de *S. leucogaster*, *P. aethereus*, *P. arminjoniana* e *T. chlororhynchos* do período pós-rompimento foram coletadas entre 2016 e 2020. Amostras do período pré-rompimento (antes de novembro de 2015), assim como valores de  $\delta^{15}\text{N}$  e  $\delta^{13}\text{C}$  das presas, foram obtidas através do banco de dados do Laboratório de Aves Aquáticas e Tartarugas Marinhas da FURG. Não foi possível analisar amostras de *T. chlororhynchos* pois as capturas que seria realizadas durante o inverno não foram suspensas devido à pandemia. Adicionalmente, não foi autorizado o acesso a amostras de tecido desta e das demais espécies que deveria ser obtidas através do Programa de Monitoramento de Praia, uma vez que a cedência das amostras, objeto de negociação e autorização entre a Fundação Renova, Petrobras e empresas que realizam o PMP, não foi realizado. Tais amostras serão incluídas na continuidade do programa de monitoramento, tão logo haja acordo entre as partes e seja dado ao PMBA acesso às amostras.

Para a análise de isótopos estáveis (AIE), foram utilizadas amostras de 0,5 ml de sangue, coletadas através de punção da veia tarsal ou braquial, com auxílio de agulha hipodérmica estéril. Todas as amostras de sangue foram secas e armazenadas em frascos plásticos sem adição de reagente fixador. As amostras foram analisadas em Espectrômetro de Massa de Razão Isotópica no Centro Integrado de Análises da FURG.

Com base nos valores de  $\delta^{15}\text{N}$  e  $\delta^{13}\text{C}$  obtidos, foi realizada análise comparativa dos períodos pré e pós-rompimento e de variação da amplitude de nicho isotópico das espécies. Modelos de mistura Bayesianos foram gerados através do pacote SIAR (PARNELL et al., 2010) e análises de nicho isotópico foram realizadas através do pacote rKIN (ECKRICH et al., 2020). Todas as análises foram realizadas no ambiente R. Fatores de discriminação trófica ( $\Delta\text{N}$  e  $\Delta\text{C}$ ) foram obtidos da bibliografia (BEARHOP et al., 2002; CHEREL; HOBSON; HASSANI, 2005; PAIVA et al., 2010) em estudos experimentais com táxons semelhantes, em cativeiro, e aplicados conforme o tecido analisado e o tipo de presa utilizada na modelagem trófica.

## 2.5 RASTREAMENTO REMOTO

Os dados de rastreamento nos períodos pré e pós rompimento da barragem contemplam quatro espécies: períodos reprodutivos de *P. aethereus* em 2012, 2019 e 2020; períodos reprodutivos de *S. leucogaster* em 2013 e 2019; períodos reprodutivo, de migração e de invernagem de *P. arminjoniana* em 2007, 2014, 2015 e 2016; e período reprodutivo em 2015, e período não reprodutivo em 2019, de *T. chlororhynchos* (Tabela 3).

Para as quatro espécies foram utilizados quatro tipos de rastreadores de acordo com as características individuais do comportamento de forrageamento, tamanho corporal e pergunta a ser respondida. Para as espécies de Abrolhos (*S. leucogaster* e *P. aethereus*) foram acoplados GPS miniaturizados (modelos AxyTrek e i-gotU GPS) às quatro penas centrais da cauda das aves, a fim de inferir os padrões de uso do espaço durante as viagens de alimentação no período reprodutivo. O rastreador é fixado na ave enquanto no ninho, assim o indivíduo sai para o forrageio no mar e, após o retorno do animal à colônia, os equipamentos são removidos para obtenção dos dados, recarregados e reutilizados. Para obtenção de dados de distribuição espacial durante o período não reprodutivo de *S. leucogaster*, *P. aethereus* e *P. arminjoniana*, foram utilizados geolocalizadores (modelo M-series), os quais foram fixados às anilhas metálicas ajustadas ao tarsometatarso das aves. Para a obtenção dos dados, os aparelhos foram/serão removidos após o fim de um ciclo migratório de cada uma das espécies, após cerca de um ano de colocação do aparelho. Por fim, para o estudo de distribuição espacial de *T. chlororhynchos* foram utilizados GPS-PTT (modelo Kiwisat), os quais transmitem remotamente os dados de localização geográfica através do sistema Argos.

As diferentes tecnologias empregadas devem-se aos desafios, limitações e peculiaridades de trabalho com cada espécie, e foram cuidadosamente escolhidas. A Nota Técnica, em seu item 4.2.8.18.1, menciona que houve descumprimento do TR4 por conta da tecnologia de rastreamento remoto utilizada para rastreamento das aves. Entendemos que se trata de um equívoco, pois foram utilizadas três tecnologias distintas para rastreamento das aves: receptores de GNSS; sensores de

luz; e plataformas de transmissão de sinal via constelação do sistema Argos. Os receptores de GNSS, referidos por “GPS”, representam a melhor escolha para aves marinhas em período reprodutivo, pois viabilizam o rastreamento remoto em alta frequência de amostragem, coletam dados com a maior acurácia possível, são fixados nas retrizes centrais das aves, e podem ser facilmente removidos em poucos dias com manipulação rápida (3-5 minutos). Diferente do que foi mencionado na Nota Técnica, o uso de transmissores de sinal via sistema Argos para rastrear aves em período reprodutivo causa mais estresse do que os receptores de GNSS, pois precisam ser fixados com fitas no sistema de “mochila”, permanecem por um período maior nas aves, coletam dados com menores acurácia e frequência de amostragem e possuem maior massa, o que pode causar efeitos indesejáveis na condição corporal e reprodutiva dos organismos. O sistema de fixação pode causar sérios danos em aves que realizam mergulhos do tipo *plunge-diving* e, por isso, não são utilizados em aves das famílias Sulidae e Phaethontidae. Por conta desses aspectos, as plataformas transmissoras de sinal via sistema Argos são utilizadas apenas quando não há possibilidade de recaptura do animal para obtenção dos dados, como foi o caso de *T. chlororhynchos*. Em resumo, o nosso entendimento é de que as tecnologias mais apropriadas estão sendo empregadas para avaliação do uso do espaço pelas aves marinhas no âmbito deste monitoramento, priorizando 1) a saúde e integridade das aves; 2) dados fidedignos, sem o viés da amostragem ou cujo desconforto na ave resulte em mudança de comportamento; 3) maior qualidade dos dados, seja em frequência de dados, volume ou vários dados simultâneos; 4) dados melhor ajustados às perguntas, visando a identificação e quantificação dos impactos do rompimento da barragem de Fundão.

A partir das matrizes de dados espaciais, foram estimados parâmetros básicos das viagens, como distância total percorrida, distância máxima da colônia, área coberta durante as viagens, duração da viagem, distância da foz do Rio Doce e sinuosidade. Além disso, foram estimadas e comparadas às áreas de alimentação antes e após o rompimento, a partir da densidade de Kernel (KDE - Kernel Density Estimator), uma forma não-paramétrica para estimar a função de densidade de probabilidade de uma variável aleatória (WOOD et al., 2000).

Para inferirmos se o uso e escolha do espaço pelas aves são determinados por algum fator oceanográfico ou se, com as mesmas condições ambientais, as aves mudaram sua área de uso devido a um possível impacto local ocorrido depois do rompimento da barragem, os dados de temperatura superficial do mar (TSM), clorofila- $\alpha$  e batimetria foram obtidos de acordo com as posições geográficas nas viagens de cada indivíduo. Tais variáveis são representativas dos fatores que influenciam na distribuição das presas das aves e, por isso, são excelentes *proxies* de condição das áreas de alimentação. A resolução temporal dos dados oceanográficos é a média do período de rastreamento das aves, ou separado pelo período de reprodução, migração e invernagem no caso de *P. arminjoniana*. A concentração de clorofila- $\alpha$  ( $\text{mg}/\text{m}^3$ ), como *proxy* para a produtividade primária, e a TSM, foram obtidas pela plataforma Ocean Color, módulo semanal MODIS Aqua nível 3, com resolução de 4 km, no site da NASA (National Aeronautics and Space Administration, <https://oceancolor.gsfc.nasa.gov>). Os dados de batimetria foram derivados do GEBCO (Gráfico Batimétrico Geral dos Oceanos), disponíveis em <https://www.gebco.net/>.

Os dados pré rompimento não contemplam as metas do plano de trabalho com o número de indivíduos rastreados, as quais são 20 indivíduos de *S. leucogaster*, *P. aethereus* e *P. arminjoniana* e 10 indivíduos de *T. chlororhynchos*, pois os estudos anteriores não foram delineados para este fim. Os dados pós rompimento de *P. arminjoniana* são derivados do mesmo projeto de rastreamento remoto dos dados pré, de modo que três indivíduos tiveram seus geolocalizadores removidos em 2016, e compuseram os dados pós rompimento. Para *P. aethereus*, o plano de trabalho foi cumprido de maneira bastante satisfatória, faltando apenas um indivíduo a ser rastreado e, portanto, não acarretando prejuízos para o estudo da área de vida no período pós rompimento. Para *S. leucogaster*, não foi possível encontrar mais indivíduos para rastreamento na atividade de campo de 2019, e a atividade prevista para 2020 não foi realizada por conta da pandemia de Covid-19, visto que essa espécie se reproduz em junho/julho. Para o período não reprodutivo de *S. leucogaster* e *P. aethereus*, foram fixados geolocalizadores nas aves em fevereiro de 2020 e, para adquirir os dados, serão necessárias expedições adicionais à colônia para recuperar os aparelhos, pois o mesmo permanece na ave, no mínimo, entre dois ciclos reprodutivos consecutivos. O primeiro e único trabalho de campo de 2020 em Abrolhos ocorreu em fevereiro, quando foram obtidos dados de dois *P. aethereus*, porém, devido à pandemia de Covid-19, expedições adicionais não foram autorizadas. Em fevereiro de 2019, foram fixados geolocalizadores em *P. arminjoniana* e a recuperação deveria ter sido realizada no primeiro semestre de 2020. No entanto, devido à pandemia de Covid-19, todas as viagens até a Ilha da Trindade foram canceladas pela Marinha do Brasil.

Tabela 3: Relação de dados obtidos pré e pós-rompimento da barragem, o número de indivíduos e o ano de rastreamento remoto para cada espécie analisada

Espécie	Pré	Nº de aves	Pós	Nº de aves
<i>S. leucogaster</i>	2013 (inverno)	10	2019	11 (inverno)
<i>P. aethereus</i>	2012 (inverno)	8	2019 2020	19 (verão/outono) 2 (verão)
<i>P. arminjoniana</i>	2007, 2014 e 2015	16	2016	3
<i>T. chlororhynchos</i>	2015 (verão/outono)	7	2019	10 (inverno/primavera)

## 2.6 ESTIMATIVA DE TAMANHO POPULACIONAL, FENOLOGIA REPRODUTIVA, E SUCESSO REPRODUTIVO

Para a obtenção dos dados pretéritos de *S. leucogaster*, *P. aethereus* e *Sterna hirundinacea*, foram compilados os dados disponíveis na bibliografia científica utilizando a base de dados SCOPUS para realização de busca pelo conjunto de palavras “aves marinhas” AND “Abrolhos”, e “seabird” AND “Abrolhos”, incluindo artigos, livros e capítulos de livros. Também foram analisados relatórios técnicos de projetos anteriores e resumos de eventos científicos desde 2001 buscando pela palavra

“Abrolhos”, além de dados coletados pelos pesquisadores em anos anteriores (publicados e não publicados).

Para a obtenção dos dados atuais das espécies de Abrolhos (*i.e.*, *S. leucogaster* e *P. aethereus*), a estimativa do tamanho populacional foi realizada de forma padronizada por meio de contagens de ninhos durante o pico da estação reprodutiva (MANCINI; SERAFINI; BUGONI, 2016). No entanto, este esforço mensal da equipe do projeto, e quinzenal em conjunto com o Parque Nacional Marinho dos Abrolhos, não cobre a contagem total de ninhos em todas as cinco ilhas do Arquipélago. Portanto, o tamanho total da população foi obtido semestralmente em contagens em conjunto com o ICMBio, desde outubro de 2017, como parte do Programa de Monitoramento das Aves Marinhas do Parque Nacional dos Abrolhos (ICMBio, 2018). Os ninhos ativos foram georreferenciados e identificados com placas numeradas. Adultos e filhotes foram individualizados com anilhas metálicas do CEMAVE/ICMBio contendo código alfanumérico. A fenologia reprodutiva das espécies de Abrolhos foi construída com os registros do conteúdo dos ninhos monitorados até o presente momento.

Para a avaliação do sucesso reprodutivo das espécies de Abrolhos, uma amostra das colônias de *P. aethereus* e *S. leucogaster* na ilha Santa Bárbara foi monitorada da postura do ovo ao voo dos filhotes. Em Abrolhos, os trabalhos de campo estiveram em consonância com o Programa de Monitoramento de Aves Marinhas do Parque Nacional Marinho dos Abrolhos. O sucesso reprodutivo aparente foi calculado dividindo o número de ovos incubados pelo número de ovos postos (sucesso de eclosão), e dividindo o número de filhotes que deixaram os ninhos pelo número de filhotes nascidos (sucesso reprodutivo). Os ninhos onde o ovo não foi incubado, ou que ultrapassou o tempo máximo de incubação, foram registrados como ‘abandonados’. Os ninhos onde os ovos ou filhotes desapareceram antes do tempo mínimo de incubação, foram considerados ‘predados’. Além disso, ovos com vestígios de predação (e.g. cascas quebradas, furos e arranhões), o que não pode ser ocasionado por condições climáticas extremas, patógenos, ou pisoteio pelas cabras presentes na ilha Santa Bárbara, também foram considerados ‘predados’. Durante a revisão dos ninhos, foi observada a possibilidade de outros fatores estarem influenciando no insucesso reprodutivo. Nesse contexto, armadilhas fotográficas foram instaladas para identificar as causas adicionais de insucesso reprodutivo, como potenciais predadores dos ninhos, em uma amostra dos ninhos monitorados. Assim, marcas e sinais deixados por predadores foram validados com uso de armadilhas fotográficas.

Para a avaliação do sucesso reprodutivo de *S. hirundinacea*, foram realizadas duas expedições nas colônias localizadas nas ilhas costeiras do Espírito Santo, nos meses de junho e julho de 2019. Em junho, foram visitadas as ilhas Galhetas (20°19'57,34"S, 40°16'14,64"O) em Vitória, ilha dos Cabritos (20°51'18,93"S, 40°43'37,51"O) em Piúma e ilha Branca (21°0'6,56"S, 40°47'9,99"O) em Marataízes, e não foi constatada reprodução da espécie. Na ilha Itatiaia não foi permitido o desembarque com base na Resolução CONSEMA 11/2005. Na expedição de julho de 2019, acompanhados por técnica do CEMAVE/ICMBio e estando autorizados a desembarcar, foi realizada a contagem de ninhos ativos.

## 2.7 ENCALHES DE AVES NAS PRAIAS

Para a avaliação do padrão de encalhes das aves, foi realizado levantamento dos dados disponíveis no Sistema de Informação de Monitoramento da Biota Aquática (SIMBA). Foram utilizados todos os dados disponíveis no SIMBA, que compreende o período de setembro de 2017 a junho de 2020. Não há dados disponíveis anteriores ao rompimento da Barragem de Fundão. Dados posteriores também não estão acessíveis, pois há um embargo de quatro meses para disponibilização pública dos mesmos.

## 2.8 CONTAGENS DE AVES NO MAR E NA COSTA

### 2.8.1 Mar

A metodologia para monitorar a distribuição e a densidade de aves marinhas em alto mar incluía sete transecções perpendiculares à costa, paralelas e distantes 42 km uma da outra. Uma transecção alinhada à Foz do Rio Doce, quatro transecções ao norte e duas transecções ao sul da mesma (Figura 1). O censo de aves marinhas foi realizado ao longo das transecções, das quais duas ou três foram percorridas a cada mês, de forma que as sete transecções eram amostradas a cada estação do ano.

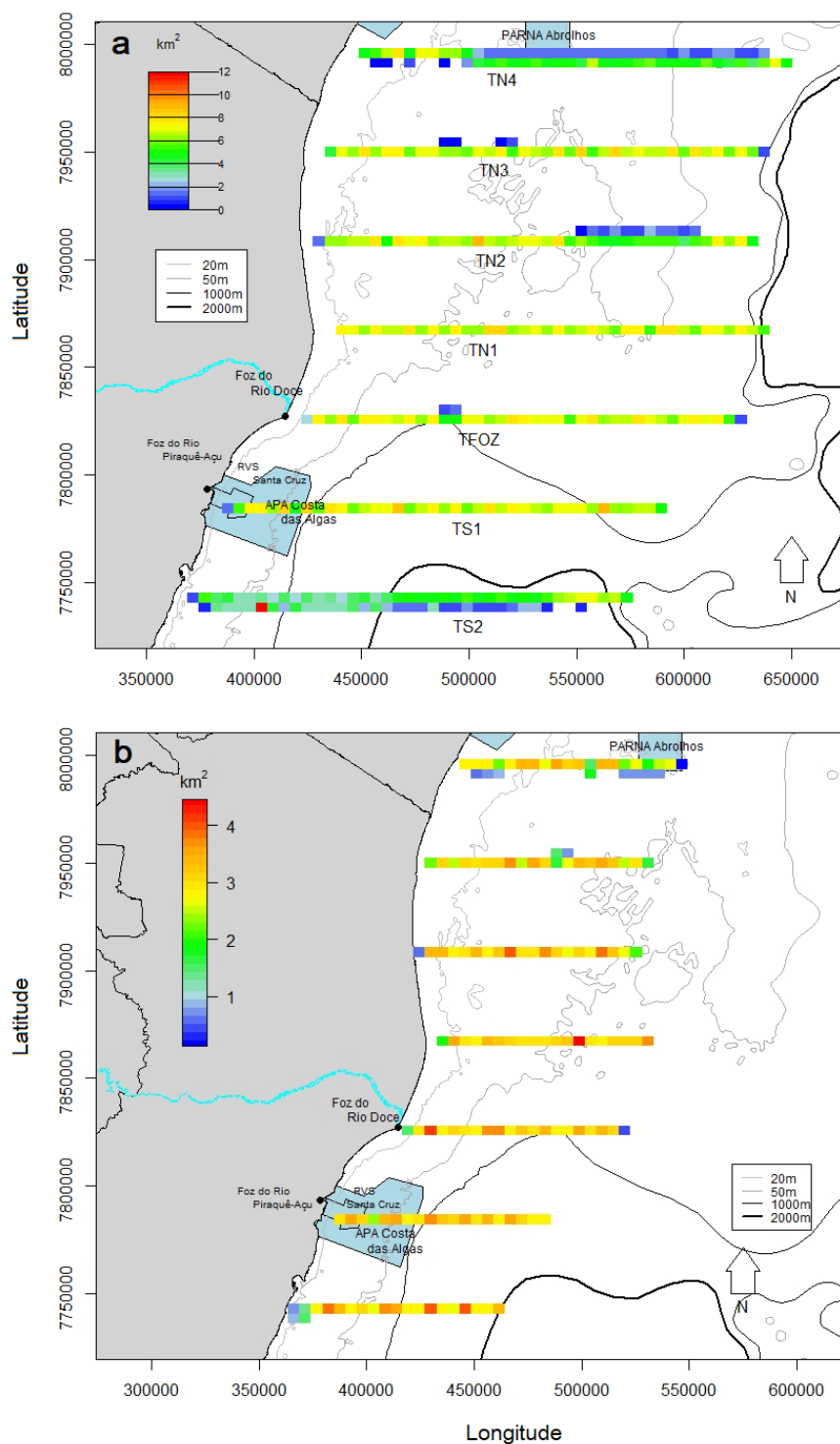
Durante o primeiro ano de monitoramento (outubro de 2018 a setembro de 2019), as transecções estavam posicionadas a 10 km de distância da costa e possuíam 200 km de extensão (Figura 1a; *Material Suplementar A6MAS1, Tabela 2*). Neste período, ao longo de 12 campanhas de campo mensais, foram realizadas 2.351 estações de contagem de aves marinhas, totalizando 459 h e 45 min de observação e 1.686 km<sup>2</sup> amostrados (Figura 1a; *Material Suplementar A6MAS1, Tabela 3*). A partir de outubro de 2019 (ano 2), após ajustes metodológicos, as transecções foram aproximadas em 5 km da costa e passaram a ter 100 km de extensão (Figura 1b, *Material Suplementar A6MAS1, Tabela 4*). Durante o período de transição (outubro de 2019 a março de 2020), houveram duas amostragens em campo (novembro de 2019 e fevereiro de 2020), ao longo das quais foram realizadas 581 estações de contagem de aves marinhas, totalizando 111 h e 09 min de observação e 417,6 km<sup>2</sup> amostrados (Figura 1b, *Material Suplementar A6MAS1, Tabela 5*). Salienta-se que no período de transição tanto a frequência quanto a extensão e localização das transecções no mar foram alteradas, após aprovação pela CTBio. Em função das restrições impostas pela pandemia de Covid-19, as coletas previstas para o outono e inverno de 2020 ficaram inviabilizadas.

As transecções foram percorridas com embarcação em velocidade constante (entre 5 – 10 nós), ao longo do período diurno, a bordo das embarcações Abaeté, Mar de Abrolhos ou Ilha da Trindade (Peroá Offshore). O método adotado, amplamente reconhecido (TASKER et al., 1984; CAMPHUYSEN et al., 2004), consiste na amostragem em estações de contagem, e incluem as seguintes atividades, em ordem de execução: (1) contagem de aves seguidoras na popa da



embarcação; (2) tomada de informações sobre variáveis abióticas (data, hora, latitude e longitude, rumo e velocidade da embarcação, profundidade, tipo de atividade desenvolvida pelo barco, estado do mar em escala Beaufort, e direção do vento); (3) censo contínuo de aves; seguido de (4) censo instantâneo de aves. As aves presentes dentro do raio de 300 m entre o rumo do barco e a linha perpendicular ao rumo, em um dos bordos com melhor incidência de luz, são registradas. Os indivíduos observados fora desta área também são registrados e identificados como fora da área amostrada. As aves marinhas avistadas foram fotografadas com câmera Cannon e lente objetiva fixa de 400 mm, para que dúvidas quanto à identificação das aves pudessem ser sanadas posteriormente.

Figura 1: Representação do esforço amostral realizado sobre as transecções entre a) outubro de 2018 e setembro de 2019 e b) entre outubro de 2019 e março de 2020. O esforço amostral está representado em uma malha com 4 x 4 km<sup>2</sup> de resolução, na qual a escala de cores indica o somatório de km<sup>2</sup> percorridos durante os meses de primavera (outubro, novembro e dezembro), verão (janeiro, fevereiro e março), outono (abril, maio e junho) e inverno (julho, agosto e setembro). As seguintes Unidades de Conservação estão representadas: Refúgio da Vida Silvestre de Santa Cruz (RVS Santa Cruz), Área de Proteção Ambiental Costa das Algas (APA Costa das Algas) e Parque Nacional Marinho dos Abrolhos (PARNA Abrolhos)



Os dados pretéritos são uma compilação de dados de contagens prévias ao rompimento da barragem, utilizando a mesma metodologia, em regiões adjacentes à área descrita acima e/ou com condições ambientais similares, e compõem o banco de dados do Laboratório de Aves Aquáticas e Tartarugas Marinhas da FURG. Outras fontes de dados foram consultadas a fim de complementar o banco de dados pretéritos na área de estudo e áreas próximas (por exemplo, Rio de Janeiro e Bahia). Foram realizadas buscas no banco de dados do Sistema Global de Informação sobre Biodiversidade – GBIF, com as seguintes especificações: Ano: “antes do final de 2015”; Polígono: “N 7677142.06 - 8119157.46; E. 182324.98 - 819451.553185; Z. 24 K”; Dataset: “eBird Observation Dataset + Coleção de Aves Museu de Biologia Mello Leitão (MBML)”. Os registros desta pesquisa referentes às ordens que representam aves marinhas foram selecionados. Além disso, listas de espécies da fauna ameaçada do Espírito Santo, relatórios de projetos, e artigos científicos foram revisados a fim de complementar o banco de dados pretérito.

Os cálculos de esforço, frequência de ocorrência, abundância e densidade de aves marinhas foram realizadas através de manipulação de planilhas utilizando o pacote *dplyr*. Os mapas foram confeccionados através da utilização de diferentes funções dos pacotes: *dplyr*, *GISTools*, *sp*, *maptools*, *rgdal*, *shapes*. Os mapas de esforço amostral e densidade de aves foram construídos a partir da utilização da função *rasterize* disponível no pacote *raster*. A análise de Shannon foi realizada através da função *diversity* disponível no pacote *vegan*. Todos os pacotes foram utilizados em ambiente R v. 3.5 (R Core Team 2020).

### 2.8.2 Costa

O monitoramento da assembleia de aves aquáticas nas praias e estuários foi realizado por meio de contagens mensais durante o período de outubro de 2018 a fevereiro de 2020, totalizando 17 campanhas mensais. A área de amostragem abrangeu 130 km de costa, onde destacam-se quatro setores: Pontal do Ipiranga, Povoação, Regência e Piraquê-açu. O detalhamento da localização das áreas de amostragem encontra-se no *Material Suplementar A6MAS1, Tabela 6*. O Ano 1 corresponde ao período entre outubro de 2018 e setembro de 2019 e o Ano 2 compreende o período entre outubro de 2019 e fevereiro de 2020. As atividades de campo foram interrompidas desde março de 2020 até o momento presente, devido às restrições impostas pela pandemia de Covid-19 no Brasil.

As contagens foram realizadas seguindo dois métodos, de acordo com as características do ambiente amostrado: 1) em praias arenosas contínuas, foi realizado o método de “contagem por itinerário fixo”; e 2) em ambientes estuarinos (foz dos rios) ou praias de enseadas com afloramentos rochosos, foi realizado o método de “contagem em descanso”. Para a contagem por itinerário fixo, foi utilizado um quadriciclo motorizado para percorrer as distâncias, estando o pesquisador na carona, de onde realizou os registros com o uso de binóculos (10 x 50 mm), gravador, aparelho GPS e equipamento fotográfico. Para a contagem em descanso, o pesquisador acessou as áreas de amostragem a partir do ponto fixo e utilizou os mesmos equipamentos descritos anteriormente, além de uma luneta (30–90 x 60 mm) acoplada em um tripé.

O método de contagem por itinerário fixo foi empregado em três setores de praia, desde o norte: 1) transecção de Pontal do Ipiranga, desde Barra Seca à praia do Degredo; 2) transecção de Povoação, desde o Degredo até o pontal norte da foz do Rio Doce; e 3) transecção de Regência, desde o pontal sul da foz do Rio Doce, pela praia de Comboios, até a foz do Rio Riacho. Esses três setores de costa apresentam, predominantemente, praias arenosas contínuas, de granulometria grosseira e amplo mesolitoral, margeado por restingas em sua maioria bem preservadas. Também nesses setores foi empregado o método de contagem em descanso nas áreas estuarinas, ambientes favoráveis à concentração de aves em repouso e forrageio: Barra Seca, pontal norte do Rio Doce, pontal sul do Rio Doce e barra do Rio Riacho.

Mais ao sul, localizado na região da Área de Proteção Ambiental da Costa das Algas, situa-se a área de amostragem de Piraquê-açu. Este setor apresenta, predominantemente, enseadas margeadas por formações rochosas. A área de amostragem compreende 15 km de praias ao norte e 15 km de praias ao sul da foz do Rio Piraquê-açu. Ao longo dessa área, foram selecionados 23 pontos fixos de amostragem nos quais foi empregado o método de censo por contagem em descanso.

Foi calculada a frequência de ocorrência relativa das espécies, expressa em porcentagem do número de censos com registros da espécie, considerando-se o número de amostragens para o período amostral (17 campanhas) e os quatro setores de costa (Pontal do Ipiranga, Povoação, Regência e Piraquê-açu). O índice de diversidade de Shannon-Weiner foi calculado para os quatro setores de costa a cada mês de amostragem dos Anos 1 e 2 (período de transição). Para o cálculo do índice, foi utilizado, para cada setor e mês, o número total de espécies registradas e a abundância relativa de cada espécie na comunidade. Para detectar eventuais diferenças interanuais na abundância de aves aquáticas na área de estudo, a abundância de aves em cada setor amostral durante a primavera e verão (outubro a fevereiro) foi comparada entre os anos 1 e 2 através do teste não paramétrico de Mann-Whitney.