

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

A6MS1 – Material Suplementar 1

Anexo 6 Megafauna - Aves

RT-39 RRDM/FEV 22

RA2021 PMBA/Fest-RRDM

Vitória,

Fevereiro de 2022

SUBPROJETO AVES – METODOLOGIA

1 METODOLOGIA

1.1 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, 2020, e 2021; períodos reprodutivos de *S. leucogaster* em 2013, 2018, 2019, e 2021; 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*.

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.

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 de modelos de Markov e 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). Maior detalhamento da metodologia de análise de dados está em NUNES et al. (no prelo).

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 *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. Na amostragem de agosto de 2021, a equipe não foi autorizada pelo Parque Nacional Marinho dos Abrolhos a amostrar o número mínimo de indivíduos (i.e. 20 indivíduos) dentro do Parque, de modo que o trabalho ficou, praticamente, restrito à ilha Santa Bárbara, área sob jurisdição da Marinha do Brasil, onde haviam poucos indivíduos em atividade reprodutiva. 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. 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.

1.2 ISÓTOPOS ESTÁVEIS

Amostras de sangue de *S. leucogaster*, *P. aethereus*, *P. arminjoniana* e *T. chlororhynchos* do período pós-rompimento foram coletadas entre 2016 e 2021. Amostras e dados do período pré-rompimento (antes de novembro de 2015) foram obtidos através do banco de dados do Laboratório de Aves Aquáticas e Tartarugas Marinhas da FURG. Não foi autorizado o acesso a amostras de tecidos que deveriam ter sido 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.

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. Análises de nicho isotópico foram realizadas através do pacote SIBER. Todas as análises foram realizadas no ambiente R.

1.3 ELEMENTOS-TRAÇO

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, enquanto 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, em fevereiro e agosto de 2011, e em 2019 e 2021, cujas amostras de sangue e penas de contorno representam o período posterior ao rompimento. Amostras de sangue e penas primárias de *P. arminjoniana* foram coletadas na ilha da Trindade, 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). 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. Para o Ano 3, também foram analisados níquel (Ni) e alumínio (Al). Além destes, 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. 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).

1.4 GENÉTICA DE POPULAÇÕES

O monitoramento dos possíveis impactos do rompimento sob o aspecto genético das aves marinhas tem sido realizado entre os anos de 2018 e 2021 com duas espécies: *Sula leucogaster* e *Phaethon aethereus* (ambas populações do arquipélago de Abrolhos). Amostras das duas espécies coletadas no ano de 2011 também foram analisadas com o intuito de verificar alguma mudança em relação à diversidade genética que poderia ter sido ocasionada pelo rompimento da barragem.

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 literatura (TAYLOR et al., 2010; MOLECULAR ECOLOGY RESOURCES PRIMER DEVELOPMENT CONSORTIUM, 2011; JONES et al., 2017). As análises foram conduzidas comparando amostragens por ano de coleta e, também, comparando amostras coletadas antes e depois do rompimento. Os índices descritivos da diversidade genética foram calculados nos programas FSTAT v1.2 (GOUDET, 1995) e Arlequin 3.5 (EXCOFFIER & LISCHER, 2010). Para verificar diferenças na composição

genética nos conjuntos de amostras, uma análise de coordenadas principais (PCoA) foi feita para cada espécie, utilizando o programa GenAlEx 6.5 (PEAKALL & SMOUSE, 2006; PEAKALL & SMOUSE, 2012).

1.5 DEMOGRAFIA E REPRODUÇÃO

1.5.1 Demografia

Para obtenção de dados pretéritos, foram compilados os dados disponíveis na bibliografia 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.

Para obtenção de dados atuais, a estimativa do tamanho populacional foi realizada de forma padronizada por meio de contagens de ninhos durante o pico da estação reprodutiva (BIBBY et al., 1992; MANCINI et al., 2016) pela equipe da RRDM em parceria ou individualmente pela equipe do Parque Nacional/ICMBio. Os ninhos ativos estavam 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 entre 2018 e 2020.

A avaliação do tamanho populacional atual de *S. hirundinacea* foi extremamente prejudicada pela dificuldade de acesso às ilhas onde a espécie se reproduz no litoral do Espírito Santo. Estas ilhas são protegidas pela Resolução CONSEMA N°011 de 10/08/2005, a qual só permite o desembarque de pesquisadores da Associação Vila-Velhense de Proteção Ambiental – AVIDEPA e do Centro Nacional de Pesquisa para a Conservação das Aves Silvestres – CEMAVE. Mesmo assim, foram realizadas quatro expedições nas colônias. Em junho de 2019, foram visitadas as ilhas Galhetas em Vitória, ilha dos Cabritos em Piúma e ilha Branca em Marataízes. Em julho de 2019, acompanhados pela técnica do CEMAVE/ICMBio e estando autorizados a desembarcar, foi realizada busca ativa e a contagem de ninhos ativos, número de indivíduos adultos, ovos e filhotes da espécie. Em junho de 2021 foram realizadas mais duas expedições nas quais foram visitadas as Ilhas Itatiaia, em Vila Velha e a ilha Galheta de dentro em Vitória. As expedições foram realizadas com autorização e parceria do Instituto do Meio Ambiente e Recursos Hídricos (IEMA) e secretaria Estadual do Meio Ambiente que disponibilizou técnicos para o acompanhamento do trabalho.

1.5.2 Reprodução

Para a avaliação do sucesso reprodutivo, uma amostra das colônias de *P. aethereus* e *S. leucogaster* na ilha Santa Bárbara foi monitorada da postura do ovo ao voo dos filhotes entre dezembro de 2018 e março de 2020. Para *S. hirundinacea* não foi possível acompanhar a reprodução devido à dificuldade de acesso às ilhas onde a espécie se reproduz no litoral do Espírito Santo.

Em Abrolhos, os trabalhos de campo estiveram em consonância com o Programa de Monitoramento de Aves Marinhas do Parque Nacional Marinho dos Abrolhos/ICMBio. Inclusive, em virtude da interrupção das atividades devido à pandemia do COVID-19, dados coletados e cedidos pela equipe do Parque foram também utilizados nas análises.

O sucesso reprodutivo aparente foi calculado usando o método tradicional, dividindo o número de ovos incubados pelo número de ovos postos (sucesso de eclosão) e dividindo o número de filhotes que partiram dos 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 e de recrutamento foram considerados predados. Além disso, ovos com vestígios de predação (cascas quebradas, furos), o que não pode ser ocasionado por condições climáticas extremas, patógenos, pisoteamento pelas cabras presentes na ilha Santa Bárbara ou outros fatores também foram considerados predados. Durante a revisão dos ninhos foram observadas a possibilidade de outros fatores estarem influenciando no insucesso reprodutivo.

Além do sucesso reprodutivo, foi construída a tabela de vida dos filhotes de ambas as espécies (*P. aethereus* – 2019 e 2020; e *S. leucogaster* – 2019) com base nos métodos descritos por BROWER & ZAR (1998) e KREBS (1998), utilizando os dados coletados pela equipe da RRDM (2019) e pela equipe do Parque Nacional. A taxa de mortalidade na idade-específica (qx) foi definida como a proporção de indivíduos do início do intervalo de idade que morreram durante o intervalo de idade. A taxa de sobrevivência na idade-específica (sx) foi calculada com base na proporção de indivíduos vivos no início do intervalo de idade que sobreviveram durante o intervalo de idade.

1.6 SAÚDE

As amostras consistiram em esfregaços sanguíneos, suabes de cloaca, orofaringe e sangue total armazenado em etanol absoluto. 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.

1.6.1 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 metanolabsoluto 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 1000x).

1.6.2 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.

1.6.3 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, Acumidia). 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 desubstratos 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).

1.6.4 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 cefepime (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), levofloxacin (5 µg), marbofloxacin (5 µg), moxifloxacin (5 µg), norfloxacin (10 µg), ofloxacin (5 µg) e perfloxacin (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 Tripton 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 ClermontTyping (http://clermonttyping.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), que permite prever se uma mutação é neutra ou deletéria.

1.6.5 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.

1.6.6 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°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 (AGCCTTTAAAGCTTCGCTTGTAG) 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 (ACATATTCAGATGCAGACAGAGGT) 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 protocoladamente 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. 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.

1.7 CONTAGENS DE AVES NA FOZ DO RIO DOCE E ADJACÊNCIAS – 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 setembro de 2021, totalizando 24 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 na Tabela 1 do Material Suplementar. O Ano 1 corresponde ao período entre outubro de 2018 e setembro de 2019, o Ano 2 compreende o período entre outubro de 2019 e setembro de 2020 e o Ano 3 de outubro de 2020 a setembro de 2021. As atividades de campo

foram interrompidas de março a dezembro de 2020, devido às restrições impostas pela pandemia de COVID-19 no Brasil.

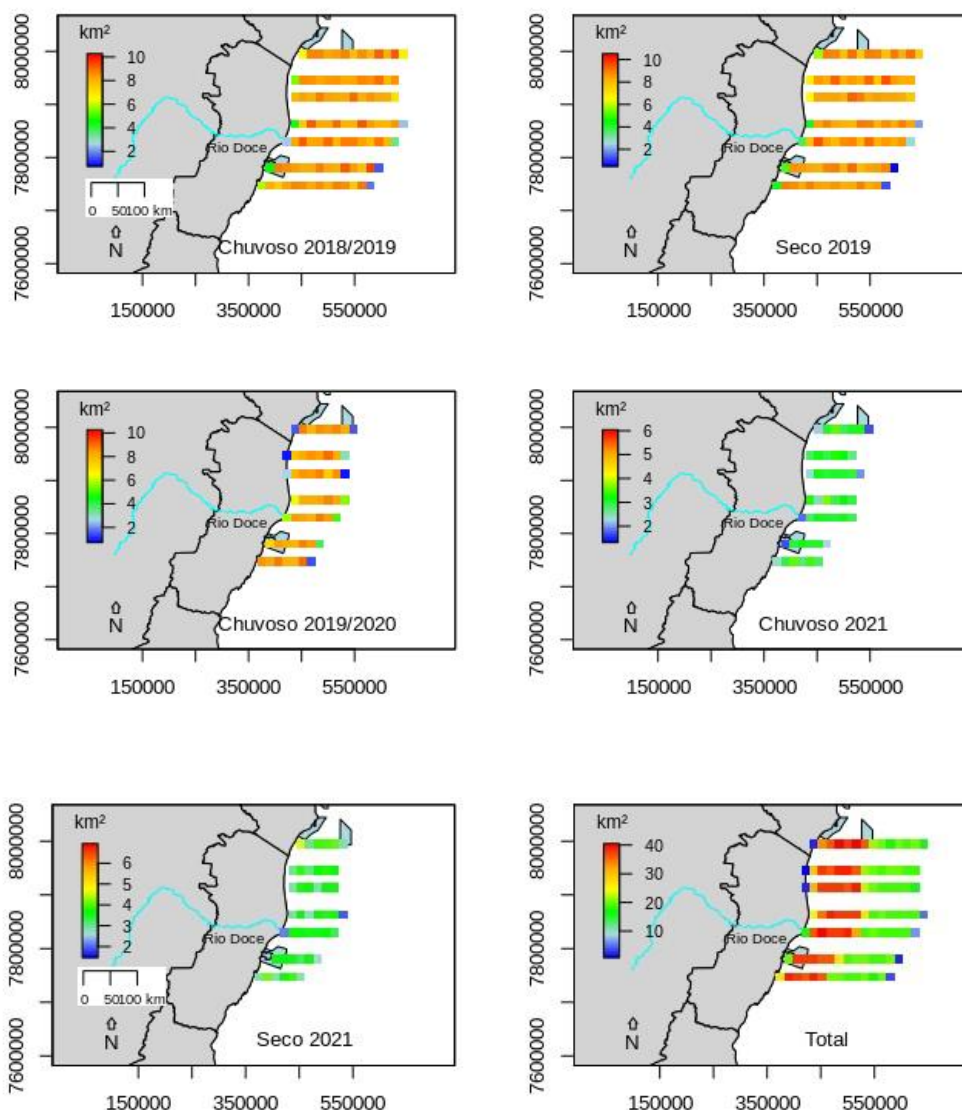
As contagens foram realizadas seguindo dois métodos, de acordo com as características do ambiente amostrado: 1) em praias arenosas contínuas, foi realizado o método de “contagem por itinerário fixo”; e 2) em ambientes estuarinos (foz dos rios) ou praias de enseadas com afloramentos rochosos, foi realizado 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 (30–90x 60 mm) acoplada em um tripé.

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 (24 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, 2 e 3. 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.

1.8 CONTAGENS DE AVES NA FOZ DO RIO DOCE E ADJACÊNCIAS – MAR

A metodologia para monitorar a distribuição e a densidade de aves marinhas em alto mar incluiu 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. A cada mês, foram realizados censos de aves marinhas ao longo de duas ou três transecções, de forma que todas foram amostradas a cada estação do ano.

Figura 1: Representação do esforço amostral realizado sobre as transecções entre a primavera de 2018 e o inverno de 2021. O esforço amostral está representado em uma malha com 4 x 4 km² de resolução, na qual a escala de cores indica o somatório de km² percorridos para cada estação (e.g. chuvosa de outubro a março e seco de abril a setembro) para os três diferentes períodos (e.g. 2018/2019, 2019/2020, 2021), e considerando todos os períodos e estações entre outubro de 2019 e julho de 2021.



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 (Tabela 1). 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 km² amostrados. 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 (Tabela 3). Durante o período de transição

(outubro de 2019 a março de 2020), foram realizadas 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 km² amostrados (Tabela 2). 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. A atividade de monitoramento por transecções foi realizada novamente no verão de 2021 (fevereiro/março), quando foram realizadas 133 estações de contagem de aves marinhas nos sete transectos (Tabela 2), totalizando 60 h e 21 min de observação e 595,58 km percorridos. Durante o período de inverno de 2021, de 11 de julho a 23 de julho de 2021, foi realizada novamente a atividade de monitoramento embarcado de transecções, quando foram realizadas 121 estações de contagem de aves nos sete transectos (Tabela 2), totalizando 47 h e 37 min de observação e 695,58 km percorridos.

Tabela 1: Descrição de cada transecção percorrida para contagem de aves no mar nos três anos de amostragem (setembro de 2018 a julho de 2021).

Nome da estação	Localidade	Coordenada UTM (N)	Coordenada UTM (E)
Transecção TS2	Transecção inicia a 10 km da costa e termina a 200 km da costa, próxima da latitude do município de Vila Velha.	Início: 7741725.1 Fim: 7742048.69	Início: 372097.1 Fim: 572626.5
Transecção TS1	Transecção inicia a 10 km da costa e termina a 200 km da costa, próxima da latitude do distrito de Nova Almeida.	Início: 7784258.11 Fim: 7784382.98	Início: 388801.4 Fim: 589427.9
Transecção TFOZ	Transecção inicia a 10 km da costa e termina a 200 km da costa, próxima da latitude da Foz do Rio Doce.	Início: 7826480.3 Fim: 7826208.2	Início: 424306.3 Fim: 624286.8
Transecção TN1	Transecção inicia a 10 km da costa e termina a 200 km da costa, próxima da latitude do distrito de Barra Seca.	Início: 868871.28 Fim: 7868458.9	Início: 437322.2 Fim: 637736.3
Transecção TN2	Transecção inicia a 10 km da costa e termina a 200 km da costa, próxima da latitude do distrito de Barra Nova.	Início: 7910988 Fim: 7910644.37	Início: 431642.6 Fim: 632212.7
Transecção TN3	Transecção inicia a 10 km da costa e termina a 200 km da costa, próxima da latitude do distrito do município de	Início: 953111.18 Fim: 7952758.72	Início: 433352.2 Fim: 633674.1

Nome da estação	Localidade	Coordenada UTM (N)	Coordenada UTM (E)
	Conceição da Barra.		
Transecção TN4	Transecção inicia a 10 km da costa e termina a 200 km da costa, próxima da latitude do município de Mucuri (Bahia).	Início: 995065.61 Fim: 7994559.38	Início: 448871.5 Fim: 649432.6

Tabela 2: Informações gerais sobre o esforço realizado nos censos no mar durante o período de 2021 (fevereiro de 2021 a julho de 2021).

Campanha	Transecção	Data de início	Data de Fim	Tempo total em esforço (h)	Nº de Estações de Contagem	Esforço por km2
Outubro e novembro 2018	TFOZ	30/10/2018	01/11/2018	18h48	83	60,66
	TN1	01/11/2018	02/11/2018	16h24	81	60,59
	TN2	03/11/2018	04/11/2018	15h52	79	60,27
	TN3	04/11/2018	06/11/2018	15h55	84	59,89
Novembro/2018	TN4	06/11/2018	07/11/2018	15h10	85	60,18
Dezembro/2018	TS1	10/12/2018	11/12/2018	16h14	81	60,77
	TS2	06/12/2018	07/12/2018	15h57	77	59,35
Janeiro/2019	TFOZ	14/01/2019	15/01/2019	16h09	84	60,17
	TN1	13/01/2019	14/01/2019	17h42	90	60,22
	TS1	20/02/2019	21/02/2019	15h34	79	60,92
Fevereiro/2019	TS2	21/02/2019	22/02/2019	15h24	81	60,53
	TN2	14/03/2019	15/03/2019	16h40	84	60,48
Março/2019	TN3	15/03/2019	17/03/2019	15h39	78	60,36
	TN4	17/03/2019	18/03/2019	15h34	80	60,23
Abril/2019	TS1	25/04/2019	26/04/2019	19h34	99	60,17
	TS2	27/04/2019	28/04/2019	17h35	91	60,00
Maio/2019	TN3	11/05/2019	12/05/2019	18h58	96	60,18
		13/05/2019	14/05/2019	16h36	86	
	TN4	24/06/2019	24/06/2019	00h47	5	60,13
	TFOZ	16/06/2019	17/06/2019	18h51	96	60,07
Junho/2019	TN1	18/06/2019	19/06/2019	15h47	80	60,19
	TN2	25/06/2019	26/06/2019	15h13	82	60,03

Campanha	Transecção	Data de início	Data de Fim	Tempo total em esforço (h)	Nº de Estações de Contagem	Esforço por km2
Julho/2019	TS1	09/07/2019	10/07/2019	15h12	76	59,96
	TS2	11/07/2019	12/07/2019	15h12	79	60,08
Agosto/2019	TFOZ	08/08/2019	09/08/2019	15h06	78	60,00
	TN1	07/08/2019	07/08/2019	3h43	18	60,51
	TN1	28/08/2019	29/08/2019	13h02	70	60,51
	TN2	29/08/2019	30/08/2019	15h06	79	60,10
	TN3	31/08/2019	01/09/2019	17h12	92	60,51
Setembro/2019	TN4	01/09/2019	02/09/2019	14h49	78	59,48
Fevereiro/2021	TFOZ	22/02/2021	22/02/2021	8h55	19	28,34
	TN1	23/02/2021	23/02/2021	08h50	19	27,97
	TN2	24/02/2021	24/02/2021	08h07	18	27,50
	TN3	27/02/2021	27/02/2021	9h	20	26,70
	TN4	28/02/2021	28/02/2021	8h35	19	28,27
Março/2021	TS1	01/03/2021	01/03/2021	7h59	19	22,34
	TS2	03/03/2021	03/03/2021	8h55	19	26,27
Julho/2021	TS2	22/07/2021	22/07/2021	06h33	17	25,83
	TS1	23/07/2021	23/07/2021	06h29	17	26,60
	TFOZ	18/07/2021	18/07/2021	06h55	18	30,49
	TN1	17/07/2021	17/07/2021	07h07	18	28,06
	TN2	13/07/2021	13/07/2021	06h35	17	26,49
	TN3	12/07/2021	12/07/2021	06h50	17	27,80
	TN4	11/07/2021	11/07/2021	07h07	17	30,46
TOTAL				567h42	2605	2129.63

Tabela 3: Descrição de cada transecção percorrida para contagem de aves no mar.

Nome da estação	Localidade	Coordenada UTM (N)	Coordenada UTM (E)
Transecção TS2	Transecção inicia a 5 km da costa e termina a 100 km da costa, próxima da latitude do município de Vila Velha.	Início: 7741631 Fim: 7742573	Início: 367064 Fim: 463616
Transecção TS1	Transecção inicia a 5 km da costa e termina a 100 km da costa, próxima da latitude do distrito de Nova Almeida.	Início: 7784440 Fim: 7783733	Início: 383661 Fim: 482667
Transecção TFOZ	Transecção inicia a 5 km da costa e termina a 100 km da costa, próxima da latitude da Foz do Rio Doce.	Início: 7826453 Fim: 7826695	Início: 419523 Fim: 518620
Transecção TN1	Transecção inicia a 5 km da costa e termina a 100 km da costa, próxima da latitude do distrito de Barra Seca.	Início: 7868953 Fim: 7869117	Início: 432265 Fim: 532470
Transecção TN2	Transecção inicia a 5 km da costa e termina a 100 km da costa, próxima da latitude do distrito de Barra Nova.	Início: 7910803 Fim: 7911064	Início: 426537 Fim: 526029
Transecção TN3	Transecção inicia a 5 km da costa e termina a 100 km da costa, próxima da latitude do distrito do município de Conceição da Barra.	Início: 7952981 Fim: 7953069	Início: 428386 Fim: 528308
Transecção TN4	Transecção inicia a 5 km da costa e termina a 100 km da costa, próxima da latitude do município de Mucuri (Bahia).	Início: 7994949 Fim: 7995063	Início: 443673 Fim: 543826

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, 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. Foram contabilizadas as aves presentes dentro de um raio de 300 m entre o rumo do barco e a linha perpendicular ao rumo, através de censos realizados em um dos bordos com melhor incidência de luz. Indivíduos observados fora desta área também foram registrados e identificados como fora da área amostrada. As aves marinhas avistadas foram fotografadas com câmera Canon e lente objetiva fixa de 400 mm, para registro e identificação das aves.

Os dados pretéritos foram compilados a partir 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 Universidade Federal do Rio Grande - 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)”. A partir destas buscas, foram selecionados os registros referentes às ordens que representam aves marinhas. 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*. A frequência numérica (FN) e frequência de ocorrência (FO%) foram definidas como a porcentagem de cada espécie de aves em relação ao número total de indivíduos registrados e em relação ao esforço amostral (número de estações ou transectos), contendo determinada espécie, respectivamente (PINKAS et al. 1971). 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).

1.9 ENCALHES DE AVES NAS PRAIAS

Para a avaliação do padrão de encalhes das aves, foi realizado levantamento dos dados disponíveis

no SIMBA. Foram utilizados todos os dados disponíveis no SIMBA no estado do Espírito Santo, compreendidos no período de setembro de 2017 a julho de 2021. 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 destes dados.

Para as análises espaciais foram consideradas duas estações no ano, o período seco (1 de abril a 30 de setembro) e o período chuvoso (1 de outubro a 31 de março), baseado no regime de precipitação local (DOMINGUEZ, 2004). Os mapas foram confeccionados através da utilização de diferentes funções dos pacotes: *dplyr*, *GISTools*, *sp*, *maptools*, *rgdal*, *shapes*. Todos os pacotes foram utilizados em ambiente R v. 3.5 (R Core Team 2020).

2 REFERÊNCIAS

BAUER, A. W. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 149-158, 1966.

BIBBY, C.; JONES, M.; MARSDEN, S. **Expedition field techniques: bird surveys**. London: Royal Geographical Society, 1992.

BROWER, J. E.; ZAR, J. H. **Field and laboratory methods for general ecology**. Iowa: HMC Company, p. 194. 1998.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 28th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.

DOMINGUEZ, J. M. L. The coastal zone of Brazil: an overview. **Journal of Coastal Research**, v. 39, p. 16–20, 2006.

ESPOSITO, E. P.; CERVONI, M.; BERNARDO, M.; CRIVARO, V.; CUCCURULLO, S.; IMPERI, F.; ZARRILLI, R. Molecular epidemiology and virulence profiles of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* blood isolates from the hospital agency “Ospedale dei Colli,” Naples, Italy. **Frontiers in microbiology**, 9, 1463, 2017.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 3, p. 564–567, 2010.

GOUDET, J. FSTAT (Version 1.2): a computer program to calculate F-Statistics. **Journal of Heredity**, v. 86, n. 6, p. 485–486, 1995.

JARLIER, V.; NICOLAS, M.H.; FOURNIER, G.; PHILIPPON, A. “Extended broadspectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns”. **Research and Reviews of Infectious Diseases**, v.10, p. 867-878, 1988.

JONES, B. et al. Widespread gene flow between oceans in a pelagic seabird species complex. **Molecular Ecology**, v. 26, n. 20, 5716–5728, 2017.

KREBS, C. J. **Ecological methodology**. Menlo Park: Addison-Welsey Educational, p. 620, 1999.

MANCINI, P. L.; SERAFINI, P. P.; BUGONI, L. Breeding seabird populations in Brazilian oceanic islands: historical review, update and a call for census standardization. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v. 24, n. 2, p. 94–115, 2016.

MOLECULAR ECOLOGY RESOURCES PRIMER DEVELOPMENT CONSORTIUM. Permanent genetic resources added to molecular ecology resources database 1 October 2010–30 November 2010. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, p. 418–421, 2011.

NORDMANN, PATRICE.; JAYOL, AURÉLIE.; POIREL, LAURENT. Rapid detection of polymyxin resistance in Enterobacteriaceae. **Emerging infectious diseases**, v. 22, n. 6, p. 1038, 2016.

PAROLA, P.; RAOULT, D. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: An emerging infection threat. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32 n.6, p. 897-928. 2001.

An emerging infection threat. *Clinical Infectious Diseases*. 32 (6): 897-928.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research: an update. **Bioinformatics**, v. 28, n. 19, p. 2537–2539, 2012.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenAEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, n. 1, p. 288–295, 2006.

PINKAS, L., OLIPHANT M. S., IVERSON, I. L. K. Food habits of albacore, bluefin, tuna, and bonito in Californian waters. **Fisheries Bulletin**, v. 152, p. 1–105, 1971.

R CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Áustria, 2020.

STROMDAHL, E. Y. et al. DNA evidence of *Borrelia lonestari* in *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) removed from humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 5557–5562, 2003.

TAYLOR, S. A. et al. Isolation and characterization of ten microsatellite loci in blue-footed (*Sula nebouxii*) and Peruvian boobies (*Sula variegata*). **Journal of Ornithology**, v. 151, n. 2, p. 525–528, 2010.

WICK, R. R.; JUDD, L. M.; GORRIE, C. L.; HOLT, K. E. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. **PLOS Computational Biology**, v. 13, p. 1–22, 2017.

WOOD, A. G.; NAEF-DAENZER, B.; PRINCE, P. A.; CROXALL, J. P. Quantifying habitat use in satellite-tracked pelagic seabirds: application of kernel estimation to albatross locations. **Journal of Avian Biology**, v. 31, n. 3, p. 278–286, 2000.