



**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

TESE

**DIVERSIDADE E DISTRIBUIÇÃO DE FUNGOS E COCCÍDIOS
PARASITAS DE AVES SILVESTRES DE DUAS FITOFISIONOMIAS
DISTINTAS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

JHON LENNON GENOVEZ DE OLIVEIRA

2024



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO
RIO DE JANEIRO INSTITUTO DE
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOLOGIA ANIMAL**

**DIVERSIDADE E DISTRIBUIÇÃO DE FUNGOS E
COCCÍDIOS PARASITAS DE AVES SILVESTRES DE DUAS
FITOFISIONOMIAS DISTINTAS NO ESTADO DO RIO DE
JANEIRO**

JHON LENNON GENOVEZ DE OLIVEIRA

Sob a orientação do

Prof. Dr. Bruno Pereira Berto

e co-orientação da

Prof^ª. Dr^ª. Águida Aparecida de Oliveira

TESE submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutor em
ciências**, no curso de Pós-graduação em
Biologia Animal, UFRRJ.

Seropédica, RJ
Abril, 2024

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L335d

Lennnon Genovez de Oliveira, Jhon, 23/04/1991-
DIVERSIDADE E DISTRIBUIÇÃO DE FUNGOS E COCCÍDIOS
PARASITAS DE AVES SILVESTRES DE DUAS FITOFISIONOMIAS
DISTINTAS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO / Jhon Lennnon
Genovez de Oliveira. - Rio de Janeiro, 2024.
142 f.

Orientador: Bruno Pereira Berto.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro, Pós graduação em biologia animal, 2024.

1. Passeriformes. 2. Microbiota. 3. Coccídios. 4.
Meio Ambiente. I. Pereira Berto, Bruno, 1984-,
orient. II Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Pós graduação em biologia animal III. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL



TERMO Nº 935 / 2024 - PPGBA (12.28.01.00.00.00.42)

Nº do Protocolo: 23083.059114/2024-74

Seropédica-RJ, 30 de outubro de 2024.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

JHON LENNON GENOVEZ OLIVEIRA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor(a) em Ciências, no Curso de pós-graduação em **BIOLOGIA ANIMAL**,
área de concentração em **BIODIVERSIDADE ANIMAL**

TESE APROVADA EM 25/10/2024

(Assinado digitalmente em 31/10/2024 12:00)

BRUNO PEREIRA BERTO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptBA (12.28.01.00.00.00.45)
Matrícula: 1971595

(Assinado digitalmente em 31/10/2024 14:15)

ILDEMAR FERREIRA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptBA (12.28.01.00.00.00.45)
Matrícula: 387289

(Assinado digitalmente em 30/10/2024 15:05)

SERGIO GASPAR DE CAMPOS
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DMIV (12.28.01.00.00.00.54)
Matrícula: 386268

(Assinado digitalmente em 18/11/2024 10:29)

SERGIAN VIANNA CARDOZO
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 082.157.777-83

(Assinado digitalmente em 30/10/2024 14:52)

LAURANNE ALEVS
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 092.244.626-18

(Assinado digitalmente em 30/10/2024 21:06)

MARIANA DE SOUZA OLIVEIRA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 152.850.237-00

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrj.br/public/documentos/index.jsp>
informando seu número: **935**, ano: **2024**, tipo: **TERMO**, data de emissão: **30/10/2024** e o
código de verificação: **05a3e2979d**

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese primeiramente a Deus, pela sabedoria, força e bênçãos que me guiaram ao longo desta jornada. Sem Sua presença constante em minha vida, nada disso seria possível.

Aos meus amados pais, Silvana da Silva Genovez e Luciano Maia de Oliveira, por todo o amor, apoio e ensinamentos que me proporcionaram. Vocês sempre acreditaram em mim e me inspiraram a seguir em frente, mesmo nos momentos mais desafiadores. Esta conquista também é de vocês.

À minha querida esposa, Caroline de Almeida Azevedo, por sua paciência, carinho e compreensão ao longo deste percurso. Sua companhia e incentivo inabaláveis foram fundamentais para que eu conseguisse alcançar este sonho. Sua presença em minha vida é um presente precioso, e sou eternamente grato por ter você ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Um agradecimento especial aos meus orientadores, Prof. Dr. Bruno Pereira Berto e Profa. Dra. Ágida Aparecida de Oliveira, pela confiança, paciência e dedicação. Sou extremamente grato pela orientação, conselhos e por terem compartilhado comigo todo o conhecimento que possibilitou a realização deste trabalho. Suas orientações foram essenciais para o desenvolvimento desta tese.

Ao Prof. Dr. Sergian Vianna Cardozo, que durante minha graduação me indicou o caminho que mudou minha trajetória acadêmica, sugerindo que eu buscasse um estágio no Laboratório de Biologia de Coccídios (Labicoc), onde tive a oportunidade de me apaixonar pela pesquisa.

À Profa. Dra. Viviane Moreira de Lima, que gentilmente cedeu seu laboratório para as análises moleculares, possibilitando o avanço de uma parte crucial deste trabalho. Sua disponibilidade e suporte técnico foram fundamentais.

Ao Prof. Dr. Francisco Gerson Araújo, coordenador do curso, pela orientação e por sempre se dispor a ajudar e incentivar a busca pelo conhecimento.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. "This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

“Observem as aves do céu: não semeiam nem colhem nem armazenam em celeiros; contudo, o pai celestial as alimenta. Não têm vocês muito mais valor do que elas?”

Mateus cap. 6 v. 26

Bíblia sagrada

BIOGRAFIA

JHON LENNON GENOVEZ DE OLIVEIRA filho de Luciano Maia de Oliveira e Silvana da Silva Genovez, nascido do município de Seropédica, Rio de Janeiro. Iniciou sua vida acadêmica em 2012, ao ingressar no curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da UNIGRARIO. Ao terminar a Licenciatura Ingressou no Mestrado em 2018 na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Em 2020 , ingressou no Doutorado na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

GENOVEZ-OLIVEIRA, Jhon Lennon. **Diversidade e distribuição de fungos e coccídios parasitas de aves silvestres de duas fitofisionomias distintas no estado do rio de janeiro.** 2024. 142p. TESE Biologia Animal - Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2024.

RESUMO

O desmatamento na Mata Atlântica do Brasil tem impactado significativamente sua flora, fauna e microbiota. Apesar disso, a diversidade fúngica presente nesses ecossistemas é pouco compreendida. Esta pesquisa investigou a interação entre fungos e aves, considerando que as características morfológicas e fisiológicas específicas das aves podem influenciar sua suscetibilidade à colonização por esses microrganismos. Foram coletadas 238 amostras de 119 aves silvestres (119 penas e 119 fezes) no Parque Nacional do Itatiaia e na Ilha da Marambaia, no sudeste do Brasil. Os fungos filamentosos isolados dessas amostras foram identificados com base em características macroscópicas, microscópicas e molecular. Entre as amostras oriundas de aves, *Aspergillus* spp., *Mucor* spp., *Cladosporium* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e *Syncephalastrum* spp. foram os mais abundantemente identificados. Nas amostras de serrapilheira, *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. Predominaram, evidenciando a presença de espécies de fungos saprófitas nas penas e fezes de aves silvestres, assim como na serrapilheira do ambiente. Além disso, um outro estudo descreve uma nova espécie de *Isospora*, chamada *Isospora pichororei*, encontrada em *Synallaxis ruficapilla* no Parque Nacional de Itatiaia, Brasil. A nova espécie apresenta morfologia distinta de outras espécies do gênero *Isospora* na família Furnariidae. A identificação molecular foi baseada na amplificação do gene mitocondrial *cox1*, que mostrou alta similaridade com *Isospora oliveirai*. Esta é a primeira descrição de *Isospora* para Synallaxinae e a terceira para Furnariidae.

Palavras-chave: Passeriformes; Microbiota; Coccídios; Meio ambiente.

GENOVEZ-OLIVEIRA, Jhon Lennon. **Diversity and distribution of fungi and parasitic coccidia of wild birds from two distinct phytophysiognomies in the state of Rio de Janeiro.** 2024. 142p. THESIS Animal Biology - Institute of Biological and Health Sciences. Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, 2024.

ABSTRACT

Deforestation in the Brazilian Atlantic Forest has significantly impacted its flora, fauna, and microbiota. Despite this, the fungal diversity present in these ecosystems is poorly understood. This research investigated the interaction between fungi and birds, considering that specific morphological and physiological characteristics of birds may influence their susceptibility to colonization by these microorganisms. A total of 238 samples (119 feathers and 119 feces) were collected from 119 wild birds in Itatiaia National Park and Marambaia Island, in southeastern Brazil. The filamentous fungi isolated from these samples were identified based on macroscopic, microscopic, and molecular characteristics. Among birds, *Aspergillus* spp., *Mucor* spp., *Cladosporium* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., and *Syncephalastrum* spp. were the most abundant. In the litter samples, *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. and *Penicillium* spp. predominated, evidencing the presence of saprophytic fungal species in the feathers and feces of wild birds, as well as in the litter of the environment. In addition, another study describes a new species of *Isospora*, called *Isospora pichororei*, found in *Synallaxis ruficapilla* in Itatiaia National Park, Brazil. The new species presents a morphology distinct from other species of the genus *Isospora* in the family Furnariidae. Molecular identification was based on amplification of the mitochondrial gene *cox1*, which showed high similarity to *Isospora oliveirai*. This is the first description of *Isospora* for Synallaxinae and the third for Furnariidae.

Keywords: Passerines; Microbiota; Coccidia; Environment.

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO GERAL

CAPÍTULO I

Tabela 1. Espécies de aves (Pacheco *et al.* 2021), amostras e fungos isolados 22

Tabela 2. Lista de frequência de fungos identificados nos três substratos analisados 26

CAPÍTULO II

Tabela 1. Espécies de aves, amostras e fungos isolados 36

Tabela 2. Lista de frequências de fungos identificados nos substratos analisados..... 40

Tabela 3. Espécies identificadas pela taxonomia tradicional e biologia molecular 42

CAPÍTULO III

Tabela 1. Morfologia comparativa das espécies de *Isospora* registradas em Furnariidae no Novo Mundo..... 51

CAPÍTULO IV

Tabela 1. Espécies de aves, amostras e fungos isolados no Parque Nacional do Itatiaia..... 66

Tabela 2. Espécies de aves, amostras e fungos isolados na Ilha da Marambaia..... 69

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1. Estrutura morfológica de <i>Penicillium</i>	6
Figura 2. Estrutura morfológica de <i>Aspergillus</i>	8
Figura 3. Estrutura morfológica de <i>Mucorales</i>	9

CAPÍTULO I

Figura 1. Microscopia óptica de (A) <i>Aspergillus</i> sp. com lactofenol algodão azul; (B) <i>Fusarium</i> sp. com lactofenol algodão azul; (C) <i>Syncephalastrum</i> sp. com lactofenol algodão azul; (D) <i>Aspergillus</i> sp. com hidróxido de sódio (20%); (E) <i>Rhizopus</i> sp. com lactofenol algodão azul; (F) <i>Mucor</i> sp. com lactofenol algodão azul.....	20
---	----

CAPÍTULO II

Figura 1. Distribuição dos fungos isolados dos substratos coletados, segundo a família das aves.....	39
Figura 2. Microscopia óptica de fungos isolados. Microscopia óptica (2) <i>Mucor</i> sp. com lactofenol algodão azul; (3) <i>Fusarium</i> sp. com lactofenol algodão azul; (4) <i>Syncephalastrum</i> sp. com lactofenol algodão azul. (5) <i>Penicillium</i> sp. com hidróxido de sódio (20%); (6) <i>Aspergillus</i> sp. com lactofenol algodão azul; (7) <i>Rhizopus</i> sp. com lactofenol algodão azul. Isolados das fezes	41

CAPÍTULO III

Figura 1. Desenho de oocisto esporulado de <i>Isospora pichororei</i> de pichororé no sudeste do Brasil. Escala : 10 um	52
Figura 2. Fotomicrografia de oocistos esporulados de <i>Isospora pichororei</i> de pichororé no sudeste do Brasil	52
Figura 3. Relação filogenética de <i>Isospora pichororei</i> de pichororé, baseada em análise Bayesiana do gene <i>cox1</i>	57

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	2
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1. Principais fungos encontrados.....	5
2.1.1 <i>Aspergillus</i> spp. e <i>Penicillium</i> spp	5
2.1.2. Mucorales	8
2.1.3 Demáceos	10
2.1.4.Coccídios.....	10
3. OBJETIVOS E DEMAIS OBSERVAÇÕES	13
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	14
CAPÍTULO I.....	17
1. INTRODUÇÃO.....	18
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
2.1. Local de estudo e coleta de amostras	20
2.2. Isolamento fúngico	20
3. RESULTADOS	21
4. DISCUSSÃO.....	26
5. CONCLUSÃO.....	28
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
CAPÍTULO II	33
1. INTRODUÇÃO	33
2. MATERIAL E MÉTODOS	35
2.1. Local de estudo e coleta de amostras	35
2.2. Isolamento fúngico	35

2.3. Identificação molecular	35
3. RESULTADOS	36
4. DISCUSSÃO.....	39
5. CONCLUSÃO.....	43
6. DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES.....	43
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
CAPÍTULO III.....	47
1. INTRODUÇÃO.....	48
2. METODOLOGIA.....	48
2.1. Declaração de ética.....	48
2.2. Local de estudo e coleta de amostras	49
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
4. CONCLUSÃO.....	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
CAPÍTULO IV	61
1. INTRODUÇÃO	62
2. METODOLOGIA	63
2.1 Declaração de ética	63
2.2 Local de estudo e coleta de amostras	64
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
4. CONCLUSÃO.	74
5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

1 INTRODUÇÃO

O Reino Fungi, diverso e repleto de particularidades, abriga uma grande quantidade de organismos que vão desde seres unicelulares até multicelulares, desempenhando papéis fundamentais nos ecossistemas como saprófitas, oportunistas e patógenos de animais e plantas (Sidrim; Rocha, 2004). Com características essenciais que os diferenciam, os fungos são organismos eucarióticos e heterotróficos por absorção, com habilidade para reprodução tanto sexuada quanto assexuada. Sua capacidade de colonizar uma vasta gama de substratos, incluindo as próprias aves, os torna verdadeiros colonizadores cosmopolitas (Cruz, 2010; Sidrim; Rocha, 2004).

A interação entre fungos e aves, entretanto, é influenciada por caracteres morfológicos e fisiológicos específicos das aves, tornando-as suscetíveis à colonização por esses microrganismos (Dahlhausen, 2006). Quando ocorre a associação entre fungos e aves hospedeiras, a dinâmica subsequente pode variar, indo desde uma relação comensal assintomática até o desencadeamento de infecções, dependendo da capacidade dos fungos de evitarem os mecanismos de defesa do hospedeiro (Casadevall; Pirofski, 2000).

Nos ambientes silvestres, as aves passeriformes desempenham um papel surpreendente como portadoras e dispersoras de fungos. Esta dispersão ocorre de duas maneiras distintas: por meio da liberação de conídios fúngicos no ambiente, que ocorre quando as aves excretam suas fezes, e através de partes de seus corpos, tais como o tarso e as penas, que podem abrigar e transportar fungos para locais distantes (Warner; French, 1970; Kraisitudomsook *et al.*, 2021). Estudos relacionados a ninhos de andorinhas de bando (*Hirundo erythrogaster*, Boddaert, 1783) e andorinhas do celeiro (*Hirundo rustica*) revelaram a presença de conídios no solo pertencentes à família Endogonaceae, a qual compreende quatro gêneros distintos: *Endogone*, *Peridiospora*, *Sclerogone* e *Toungiomyces* (McIlveen; Cole, 1979).

Algumas aves dispersam ativamente esses fungos durante o processo de construção de

seus ninhos, enquanto outras selecionam fungos como componentes estruturais, destacando-se os rizomorfos, cuja aparência semelhante às raízes das plantas lhes permite criar estruturas que aprisionam material orgânico (McIlveen; Cole, 1979).

A vasta diversidade do Reino Fungi abriga uma grande maioria de fungos ambientais que atuam como saprófitas, colonizando habitats tão diversos como o solo, matéria vegetal em decomposição, sementes e grãos. Esses organismos fungais desempenham um papel vital na reciclagem de matéria orgânica e na decomposição de substratos complexos (Conner; Locke, 1982; Jackson; Jackson, 2004; Robledo; Urcelay, 2009).

Um aspecto intrigante dessa diversidade fúngica reside na relação mutualística estabelecida com algumas aves. Especificamente, algumas aves escolhem fazer seus ninhos no interior de troncos de árvores, onde se beneficiam da presença de fungos, especialmente aqueles pertencentes ao filo Basidiomycota, notáveis por cogumelos e orelhas-de-pau (Jackson; Jackson, 2004; Robledo; Urcelay, 2009).

Cryptococcus é um gênero de fungos que exibe uma fascinante dualidade na sua relação com o ambiente. Comumente reconhecido como saprófita, ou seja, um organismo que se alimenta de matéria orgânica em decomposição, *Cryptococcus* também abriga espécies patogênicas capazes de causar doenças em humanos e outros animais (Filiú, *et al.* 2002). Surpreendentemente, esse fungo pode ser encontrado em algumas madeiras de espécies arbóreas, onde prospera em nichos específicos. Essa adaptabilidade e a capacidade de transitar entre papéis ecológicos destacam a complexidade e a importância desse microorganismo no ecossistema, ao mesmo tempo em que alertam para os riscos potenciais que ele pode representar para a saúde pública (Filiú, *et al.* 2002)

Esses fungos desempenham um papel fundamental ao modificar as propriedades químicas e físicas da madeira hospedeira, induzindo seu processo de apodrecimento e tornando-a mais maleável, facilitando assim a escavação das aves para construir seus ninhos. Os fungos também se beneficiam dessa relação, utilizando as aves como agentes de dispersão para seus conídios no ambiente (Conner; Locke, 1982; Jackson; Jackson, 2004; Robledo; Urcelay, 2009). Os fungos que habitam tanto os estágios iniciais quanto os finais da decomposição da serrapilheira, têm sido objeto de estudo crescente. Estes fungos desempenham um papel crucial ao degradar substratos ricos em lignina, um dos componentes mais resistentes da matéria vegetal.

Além dos fungos, estudos sobre coccídios em aves silvestres no Rio de Janeiro são

importantes para entender a diversidade desses parasitas e sua relação com os hospedeiros. Esses parasitas pertencem ao filo Apicomplexa, sendo *Eimeria* e *Isospora* os gêneros mais comuns encontrados em aves (Ortúzar-Ferreira *et al.*, 2020). No estado do Rio de Janeiro, a avifauna silvestre é rica e diversa, proporcionando um ambiente propício para a ocorrência e o estudo desses parasitas diversas espécies de aves, desde passeriformes até aves de rapina, podem ser infectadas por diferentes espécies de coccídios (Ortúzar-Ferreira *et al.*, 2024). As aves silvestres são frequentemente monitoradas por meio de estudos parasitológicos, que ajudam a identificar a prevalência e a intensidade das infecções (Berto e Lopes, 2020).

Os coccídios possuem um ciclo de vida complexo que envolve fases sexuadas e assexuadas, geralmente ocorrendo no trato gastrointestinal dos hospedeiros (Berto e Lopes 2020). A transmissão se dá através da ingestão de oocistos esporulados presentes no ambiente, que contaminam alimentos e água. A alta densidade de aves em determinadas áreas, como áreas de alimentação e nidificação, pode facilitar a disseminação dos coccídios (Ortúzar-Ferreira *et al.*, 2020).

A presença de coccídios em aves silvestres ressalta a importância de práticas de conservação e manejo que minimizem o risco de infecções parasitárias (Ortúzar-Ferreira *et al.*, 2024) Monitoramento regular e estudos contínuos são essenciais para identificar mudanças na prevalência e na diversidade dos coccídios, bem como para entender melhor a dinâmica da interação parasita-hospedeiro em ambientes naturais (Silva-Carvalho *et al.*, 2018).

Os Fungos e coccídios em aves silvestres no estado do Rio de Janeiro representa um desafio significativo para a saúde dessas populações. Ambos os grupos de parasitas, embora distintos em suas naturezas biológicas e modos de infecção, podem causar doenças que variam de leves a graves, afetando a sobrevivência e o bem-estar das aves (De Oliveira *et al.*, 2022). Coccídios, como os pertencentes aos gêneros *Eimeria* e *Isospora*, são protozoários que parasitam o trato gastrointestinal das aves, enquanto fungos, como *Aspergillus*, *Penicillium* além de fungos Mucorales podem causar infecções respiratórias e sistêmicas (Berto e Lopes 2020, De Oliveira *et al.*, 2022). A co-infecção por esses parasitas pode resultar em complicações adicionais, sobrecarregando o sistema imunológico das aves e exacerbando os sintomas clínicos (Cordeiro *et al.*, 2021). Estudos integrados que abordam a epidemiologia de coccídios e fungos são essenciais para desenvolver estratégias eficazes de manejo e conservação, garantindo a saúde das aves silvestres e a preservação da biodiversidade no estado (Cordeiro *et al.*, 2021).

Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivos gerais investigar e isolar fungos e coccídios em aves silvestres no estado do Rio de Janeiro, com o intuito de compreender as

interações parasitárias e comensais que afetam essas populações. Além disso, busca contribuir para o conhecimento ecológico e epidemiológico, auxiliando estudos futuros sobre a preservação da biodiversidade e manutenção dos ecossistemas naturais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Principais fungos estudados

2.1.1. *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp.

A diversidade e a onipresença dos fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* na biosfera terrestre são fenômenos notáveis. Estas formas de vida microscópicas, que pertencem à classe dos fungos filamentosos, estabelecem uma presença inquestionável em praticamente todos os cantos da Terra (Pitt, 1994).

Enquanto o gênero *Penicillium* demonstra predominância em climas mais frios, especialmente em zonas temperadas, *Aspergillus* floresce com maior frequência nos trópicos. (Arne *et al.* 2021). Esses fungos, em sua grande maioria, desempenham papéis essenciais como saprófitas, colonizando substratos diversos, como solo, matéria orgânica em decomposição, sementes e grãos.

A maioria das espécies, caracterizadas como oportunistas, geralmente não representa uma ameaça a organismos saudáveis, que conseguem evitar infecções e doenças graves (Raper; Thon, 1949). No entanto, um punhado de espécies foi identificado como agentes patogênicos relevantes tanto para seres humanos quanto para animais domésticos imunocomprometidos (Pitt, 1994; Arne *et al.* 2021).

Dentre esses notáveis fungos, o gênero *Penicillium* se destaca como um dos grupos mais fascinantes e versáteis, reproduzindo-se por meio da produção de conídios, que se originam a partir de estruturas designadas como conidióforos ou esporóforos. A nomenclatura "*Penicillium*," proposta por Link em 1809, faz alusão à forma de "pincel" dos conidióforos observada em diversas espécies do gênero, derivando do termo latino "*Penicillius*." Thom, em 1910, estabeleceu *P. expansum* como a espécie-tipo do gênero (Raper; Thom, 1949).

A maioria das espécies desse grupo é sapróbia e não exige grandes complexidades nutricionais, o que lhes confere a capacidade de prosperar em uma ampla variedade de ambientes, desde aqueles com quantidades mínimas de sais minerais até os que oferecem fontes

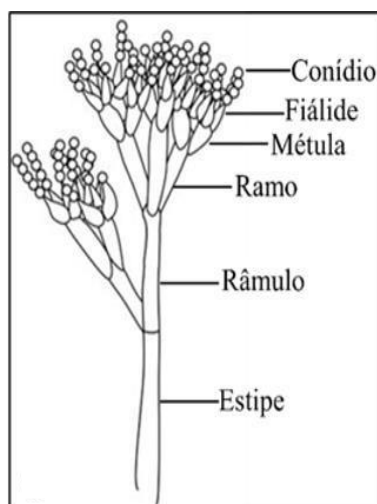
complexas de carbono orgânico.

A notável relevância ecológica do gênero *Penicillium* se manifesta em sua ativa participação na degradação da matéria orgânica (Pitt, 1991; Dantas *et al.*, 2020). Estes fungos do gênero *Penicillium* não se limitam ao solo e ambientes terrestres, sendo também encontrados de forma disseminada em ambientes aquáticos.

Desde a notável descoberta da penicilina, várias espécies de *Penicillium* têm sido objeto de estudos e pesquisas bem-sucedidas em relação à produção de diversos tipos de metabólitos secundários ativos. Estes incluem substâncias antibacterianas (Petit *et al.* 2009) larvicidas (Ragavendran *et al.*, 2017), antifúngicas (Nicoletti *et al.*, 2007), e uma variedade de enzimas de interesse industrial.

Algumas espécies de *Penicillium* também desempenham um papel fundamental no biocontrole (Pallu, 2010) e na produção de alimentos de alta qualidade, como queijos finos e salames. Além disso, essas espécies isoladas de solos frequentemente se revelam como fontes inovadoras de novos produtos farmacêuticos e biotecnológicos (Ahmed, 2018).

Fig. 1. Estrutura morfológica de *Penicillium*.



Na micologia, a análise detalhada do gênero *Aspergillus* revela características distintivas que o tornam objeto de intensa investigação e interesse. Estes fungos são notáveis por apresentarem conidióforos não septados, notavelmente dilatados em seu ápice, assumindo a forma de vesículas onde se desenvolvem as fiálides, células precursoras dos conídios (Pallu, 2010).

A diversidade intrínseca a esse gênero se manifesta em uma gama de adaptações, com algumas espécies demonstrando notável termotolerância e outras revelando-se verdadeiramente xerofílicas, capazes de prosperar em condições de atividade de água substancialmente reduzida em comparação com seus homólogos do gênero *Penicillium* (Arne *et al.*, 2021).

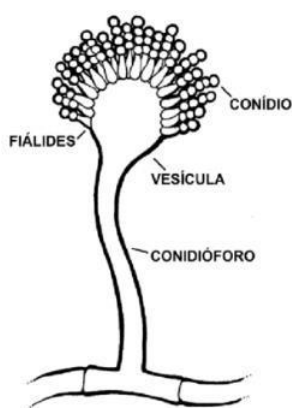
A relevância econômica dos *Aspergillus* é inegável, resultante da capacidade desses fungos de produzir uma miríade de enzimas com aplicações em diversos setores da indústria, desde a manufatura de antibióticos até a produção de cerveja e pães (Ahmed, 2018).

No âmbito ecológico, *Aspergillus* ostentam uma distribuição cosmopolita, sendo amplamente disseminados na natureza (Klich, 2002). Este gênero, embora diverso, é frequentemente associado a atividades prejudiciais, incluindo a deterioração de alimentos, uma característica comum entre seus membros saprófitos. Além disso, muitas espécies têm a notória capacidade de produzir micotoxinas, que representam uma ameaça significativa à saúde pública e animal.

Algumas destas espécies também são comumente descritas como patógenos de humanos e animais (Arne *et al.*, 2021). No entanto, o potencial biotecnológico desses fungos não pode ser subestimado, uma vez que várias espécies são utilizadas na produção de uma ampla variedade de metabólitos de interesse, tais como antibióticos, ácidos orgânicos, fármacos, enzimas e como agentes em processos fermentativos (Samson *et al.*, 2014).

Recentes investigações científicas têm ampliado nosso entendimento sobre a riqueza e diversidade dos fungos conidiais, incluindo *Aspergillus* e *Penicillium*, que desempenham papéis cruciais no processo de decomposição da serrapilheira (Pallu, 2010).

Fig. 2. Estrutura morfológica de *Aspergillus* sp.



Fonte: Samson *et al.* (2000).

2.1.2. Mucorales

A ordem Mucorales engloba um grupo intrigante e diversificado de fungos, cuja história evolutiva se entrelaça profundamente com a árvore genealógica dos fungos filamentosos. Esta ordem, pertencente à subclasse Mucoromycotina, ocupa uma posição basal em relação às amplamente conhecidas Basidiomycota e Ascomycota, destacando-se como um dos mais antigos clados fúngicos conhecidos. (Tahiri G. *et al.*, 2023).

A singularidade e a complexidade da ordem Mucorales residem não apenas em sua ancestralidade, mas também na incrível variedade de adaptações e interações que esses organismos desenvolveram ao longo de sua evolução. Este grupo engloba um conjunto diversificado de organismos, atualmente delimitado em 55 gêneros e cerca de 260 espécies (Tahiri *et al.*, 2023).

O que merece destaque é que dentre essas espécies, aproximadamente 25 pertencentes a 11 gêneros têm a capacidade de causar infecções em seres humanos (Zhou *et al.*, 2021). Os gêneros mais notáveis e frequentemente encontrados dentro da ordem Mucorales incluem *Rhizopus*, *Mucor*, *Lichtheimia* e *Rhizomucor* (Zhou *et al.*, 2021). No entanto, existem outras espécies patogênicas, embora menos comuns, que se inserem nos gêneros *Syncephalastrum*, *Cunninghamella*, *Apophysomyces* e *Saksenaea* (Lozano *et al.*, 2023).

Tradicionalmente, o termo "mucormicose" era usado de forma abrangente para descrever infecções fúngicas causadas por qualquer espécie pertencente à ordem Mucorales. Essas infecções são caracterizadas por invasão tecidual rápida, necrose subsequente e disseminação (Zhou *et al.*, 2021).

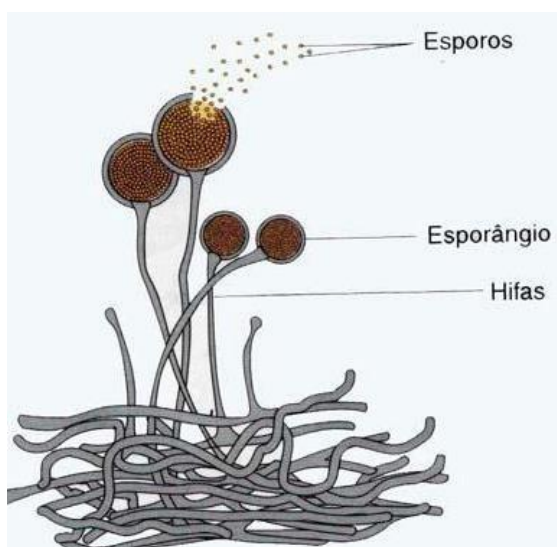
No entanto, estudos recentes têm revelado uma complexidade maior, na qual a natureza da doença pode variar dependendo da espécie fúngica envolvida e da rota de infecção. Por exemplo, a mucormicose pode manifestar-se como uma infecção cutânea, nasal-cerebral ou pulmonar, e essas manifestações estão relacionadas às espécies envolvidas e às vias de infecção específicas (Lozano *et al.*, 2023).

Nesse contexto, é interessante classificar os Mucorales de acordo com as principais vias de transmissão. Alguns, como *Rhizopus* e *Rhizomucor*, são primariamente transmitidos por meio de gotículas aéreas, enquanto outros, como *Mucor* e *Lichtheimia*, são mais frequentemente transmitidos por contato direto (Tahiri *et al.*, 2023). A maioria das espécies são saprófitas e crescem e crescem em substratos orgânicos como fruta, solo e excremento (Lozano *et al.*,

,2023).

Essa diferenciação não apenas enriquece nosso entendimento sobre a diversidade desses patógenos, mas também é fundamental para a compreensão das estratégias de prevenção e tratamento de infecções causadas por esses fungos, que podem representar desafios clínicos significativos. Portanto, a investigação contínua sobre a biologia e a patogenicidade dos Mucorales é crucial para o avanço na gestão clínica e na pesquisa nessa área.

Fig. 3. Estrutura morfológica de Mucorales.



Fonte: Samson *et al.*, (2000).

2.1.3. Demáceos

Os fungos demáceos, também conhecidos como fungos negros, representam um grupo intrigante e diversificado que se estende por todo o globo, mas encontra seu habitat principal em regiões de clima tropical e subtropical. São notáveis por sua adaptação geofílica, o que significa que tendem a habitar o solo e vegetais, desempenhando papéis essenciais na reciclagem de matéria orgânica e na ecologia dos ecossistemas.

Hoffmann (2011) conduziu um estudo abrangente sobre várias variações desses fungos e estabeleceu uma conexão fundamental entre eles e infecções fúngicas em humanos, abrangendo desde infecções cutâneas até sistêmicas, principalmente em indivíduos com

sistemas imunológicos comprometidos.

A diversidade intrínseca desses fungos é notável, com mais de 100 espécies descritas até o momento, muitas das quais têm a capacidade de causar complicações em seres humanos e animais (Da Silva Barbosa *et al.*, 2020). Uma das características morfológicas distintivas que define os fungos demáceos é a presença de melanina em suas células, conferindo uma coloração escura às suas hifas e conídios. Essa pigmentação também está intimamente ligada ao fator de virulência desses fungos (Da Silva Barbosa *et al.*, 2020).

Esta característica não apenas os distingue visualmente, mas também desempenha um papel relevante em suas interações com o ambiente e com organismos hospedeiros. Espinel-Ingroff (1982) fez descobertas notáveis ao identificar fungos demáceos em diversos ambientes, incluindo casas de rações e sementes na América do Norte.

Estudos mais recentes ainda têm ampliado nossa compreensão dos fungos demáceos e suas interações com o ambiente e com outros organismos. Por exemplo, a presença desses fungos em casas de rações para animais, juntamente com algumas espécies de *Aspergillus* foram associada à contaminação de alimentos por aflatoxinas, substâncias potencialmente tóxicas para animais (Nleya *et al.*, 2020).

Isso ressalta a relevância desses fungos não apenas em contextos clínicos, mas também em aplicações práticas, como a segurança alimentar. Além disso, os fungos demáceos demonstram uma notável capacidade de degradação de compostos orgânicos complexos, incluindo celulose, hemicelulose, ácidos aromáticos, polifenóis e proteínas (Mason, 1980). Esta habilidade torna-os participantes ativos nos processos de decomposição da matéria orgânica, desempenhando um papel vital na ciclagem de nutrientes nos ecossistemas.

Em suma, os fungos demáceos, com sua adaptabilidade e impacto tanto na saúde humana quanto no meio ambiente, constituem um campo de pesquisa fascinante e multidisciplinar. A compreensão de sua biologia, ecologia e interações com o ambiente é essencial para desvendar o papel crucial que desempenham nos ecossistemas naturais e na saúde pública.

2.1.4. Coccídios

Os coccídios são um grupo fascinante de protozoários parasitas que habitam o trato gastrointestinal de uma ampla variedade de hospedeiros, incluindo aves silvestres. Esses microrganismos desempenham um papel vital na ecologia das aves, influenciando tanto a saúde

individual dos hospedeiros quanto a dinâmica das populações e dos ecossistemas (Andrade *et al.*, 2023).

Os parasitos de aves mais relevantes da ordem Passeriformes pertencem ao gênero *Isospora*, seguido do gênero *Eimeria*. De acordo com Upton (2000) os coccídios dos gêneros *Isospora* e *Eimeria* apresentam a seguinte classificação:

Domínio: Eukaryota Chatton, 1925

Filo: Apicomplexa Levine, 1970

Classe: Conoidasida Levine, 1988

Subclasse: Coccidiasina Leuckart, 1879

Ordem: Eucoccidiorida Léger e Duboscq, 1910

Sub-ordem: Eimeriorina Léger, 1911

Família: Eimeriidae Minchin, 1903

Gênero: *Eimeria* Schneider, 1875

Gênero: *Isospora* Schneider, 1881

A compreensão da diversidade, biologia e importância ecológica dos coccídios isolados de aves silvestres é fundamental para nossa apreciação da complexa teia da vida nos ambientes naturais (Berto; Lopes, 2020). A avifauna silvestre abriga uma grande diversidade de coccídios, cada um adaptado a um grupo específico de aves hospedeiras. Esses parasitas, que pertencem à classe Coccidia, geralmente têm ciclos de vida complexos, envolvendo múltiplos estágios de desenvolvimento, incluindo esporozoítos, merontes e oocistos (Duszynski; Upton, 2009).

Uma característica principal dos coccídios é o parasitismo intracelular obrigatório, apresentando ciclos biológicos que alternam entre reprodução sexuada (resultando em oocistos) e assexuada (Berto *et al.*, 2014a). De acordo com Levine (1985), além de parasitar diferentes espécies de vertebrados, esses organismos também podem infectar invertebrados. A ordem Eucoccidiorida é subdividida em Adeleorina Léger, 1911 e Eimeriorina. A subordem Eimeriorina inclui todos os coccídios superiores que desenvolvem gametogonia. Tradicionalmente, os gêneros de Eimeriorina foram diferenciados com base na proporção de esporocistos e esporozoítos por oocisto; no entanto, atualmente outras características, incluindo dados moleculares, são utilizadas para a diferenciação genérica (Berto *et al.*, 2014a).

Entre essas características adicionais, a presença do corpo de Stieda, uma estrutura de

existência do esporocisto, é fundamental para a identificação da família Eimeriidae. Neste modelo, os únicos gêneros classificados em Eimeriidae são: *Eimeria*, *Isospora*, *Cyclospora* Schneider, 1881, e *Caryospora* Léger, 1904 em répteis (Jirku *et al.*, 2002), embora outros gêneros ainda sejam tradicionalmente incluídos nessa família. *Eimeria* é o gênero com a maior biodiversidade dentro da ordem Eucoccidiorida, sendo encontrado tanto em invertebrados quanto em vertebrados. As espécies de Eimeriidae são predominantemente intestinais, embora algumas se desenvolvam em outros tecidos, como fígado, baço, pulmões, túbulos renais, vias biliares e útero (McCully *et al.*, 1970; Owen, 1970; Entzeroth *et al.*, 1981; Rosales, 1999).

Aves podem ser infectadas por diversos coccídios, especialmente dos gêneros *Isospora* e *Eimeria*. Desde os primórdios da parasitologia, as espécies de coccídios desses gêneros têm sido descritas com base nos oocistos, que possuem características morfológicas importantes para a identificação. Essas descrições permitiram o reconhecimento de várias espécies como parasitas de passeriformes, e novos coccídios são frequentemente descritos (Duszynski; Wilber, 1997; Berto *et al.*, 2011a).

A transmissão de coccídios do gênero *Isospora* ocorre principalmente por via fecal-oral. A especificidade das infecções tem sido motivo de diversos questionamentos, especialmente devido às frequentes mudanças na sistemática das aves. No entanto, compreende-se que essa especificidade seja geralmente limitada à família do hospedeiro. As espécies do gênero *Isospora* tendem a ser mais específicas aos pássaros em comparação com aquelas do gênero *Eimeria*. Historicamente, descrições de novas espécies no gênero *Isospora* são mais frequentes do que no gênero *Eimeria*, onde as novas descrições são mais esporádicas (Duszynski; Wilber, 1997; Berto *et al.*, 2011a).

A infecção por coccídios pode afetar o estado de saúde das aves, causando desde sintomas leves até doenças graves, dependendo da espécie de coccídio, da carga parasitária e das condições do ambiente (Duszynski; Upton, 2009). Além do impacto direto na saúde das aves, os coccídios também desempenham um papel na regulação das populações de aves silvestres.

As infecções por coccídios podem afetar a sobrevivência e a reprodução das aves hospedeiras, influenciando assim a estrutura populacional (Berto; Lopes, 2020). Além disso, a presença de coccídios pode ter efeitos indiretos na ecologia das aves, alterando a dinâmica das interações entre presas e predadores, bem como a competição intra e interespecífica (Berto; Lopes, 2020).

3. OBJETIVOS E DEMAIS OBSERVAÇÕES

Os objetivos deste estudo foram avaliar a diversidade e distribuição de fungos e coccídios de amostras de aves silvestres e de serrapilheira de dois ambientes com fitofisionomias distintas no Estado do Rio de Janeiro: Ilha da Marambaia e Parque Nacional de Itatiaia. Os objetivos específicos foram: (1) Isolar, cultivar e identificar fungos da serrapilheira próxima aos locais de capturas de aves silvestres; (2) Isolar, cultivar e identificar fungos de amostras de penas e fezes de aves silvestres capturadas; (3) Quantificar o número de oocistos por defecação de ave capturada e identificar uma nova espécie de coccídio; (4) Avaliar a diversidade e distribuição de fungos e coccídios de aves capturadas na Ilha da Marambaia e Parque Nacional de Itatiaia.

Neste sentido, esta TESE apresenta uma revisão da literatura científica nos temas de Taxonomia e Ecologia de fungos e coccídios de aves silvestres, nos capítulos I, II, III e IV, os resultados do presente estudo. O capítulo I e II contêm os dados preliminares de diversidade e distribuição de fungos isolados de aves silvestres e serrapilheira no Parque Nacional do Itatiaia e Ilha da Marambaia, respectivamente. Estes dois primeiros capítulos correspondem respectivamente a dois artigos publicados nos periódicos científicos: Biodiversidade Brasileira (v. 12, p. 1-10, 2022); e Pesquisa Veterinária Brasileira (v. 44, e07383, 2024) (ANEXO). O capítulo III descreve uma nova espécie de coccídio identificado de forma morfológica e molecular, intitulado: “Descrição de uma nova espécie coccidiana, *Isospora pichororei* (Apicomplexa: Eimeriidae) parasita do pichochoaré *Synallaxis ruficapilla* Vieillot, 1819 (Passeriformes: Vireonidae) no Parque Nacional do Itatiaia” publicado no periódico Parasitology International (v. 103, e102936, 2024). O último capítulo (capítulo IV) objetiva-se em associar e discutir os dados dos fungos isolados de aves silvestres com a presença de coccídios nas amostras fecais, nos dois ambientes distintos

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, E.; ELKHATEEB, W.; ABOU TALEB, M.; MOWAFI, S.; ABDELSALAM, I. Wool and silk fabrics dyeing by mannitol-assisted pigment produced from *Penicillium*

purpurogenum. **Pharma Chem**, v. 10, p. 165-176, 2018.

ANDRADE, L. D. A. S.; ORTÚZAR-FERREIRA, C. N.; DE SOUZA OLIVEIRA, M.; CARDOZO, S. V.; DE LIMA, V. M.; BERTO, B. P. *Isospora juruviae* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from chivi vireos *Vireo chivi*. (Vieillot, 1817) (Passeriformes: Vireonidae) in South America. **Parasitology International**, v. 98, p. 102-806, 2024.

BERTO, B. P.; LOPES, C. W. G. Coccidia of wild birds as ecological biomarkers: Some approaches on parasite-host-environment interaction. **Journal of Parasitology**, v. 106, n. 5, p. 707-713, 2020.

CASADEVALL A.; PIROFSKI, LA. Host e pathogen interactions; basic concepts of microbial commensalisms, colonization, infection and disease. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 12, p. 6511–6518, 2000.

CONNER, R. N.; LOCKE, B. A. Fungi and red-cockaded woodpecker cavity trees. **The Wilson Bulletin**, p. 64-70, 1982.

CORDEIRO, L.; LEE, H. B.; NGUYEN, T. T. T.; GURGEL, L. M. S.; DE AZEVEDO, A. L. C. M. *Absidia bonitoensis* (Mucorales, Mucoromycota), a new species isolated from the soil of an upland Atlantic Forest in Northeastern Brazil. **Nova Hedwigia**, v. 112, n. 1-2, p. 241-251, 2021.

DAHLHAUSENR. Implications of mycoses in clinical disorders. In: HarrisonGJ, LightfootTL, editors. **Clinical avian medicine**. Palm Beach, FL, USA: Spix Publishing Inc, p. 691–704, 2006.

DANTAS, N. S., M.; SIQUEIRA DE VASCONCELOS, L. A., COSTA NETO, P. D. Q.; FACCINI DOS SANTOS, F. Mold species and fungi load of washed and unwashed table eggs. **Acta Veterinária Brasília**, v. 14, n. 4, 2020.

DUSZYNSKI, D. W.; UPTON, S. J. CreateSpace: **The biology of the coccidia (Apicomplexa) of snakes**: A scholarly handbook for identification and treatment. CreateSpace: A DBA of on-demand Publishing LLC, Amazon. com Inc. 2009.

ESPINEL-INGROFF, A. T. M. K.; KERKERING, T. M.; SHADOMY, H. J. Isolation of dematiaceous pathogenic fungi from a feed and seed warehouse. **Journal of clinical microbiology**, v. 15, n. 4, p. 714-719, 1982.

FILIÚ, W. F. O.; WANKE, B., AGÜENA, S. M.; VILELA, V. O.; MACEDO, R. C. L.; LAZÉRA, M. Cativeiro de aves como fonte de *Cryptococcus neoformans* na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, p. 591-595, 2002.

DA SILVA BARBOSA, G.; GOMES, G. F.; BIANCALANA, A.; BIANCALANA, F. S. C. Incidência de fungos filamentosos demáceos em espinhos de plantas em um município da Costa Leste da Ilha de Marajó-PA. **Brazilian Journal of Development**, v. 6 n. 12, p. 104149-104162, 2020.

HOFFMANN, C. D. C.; DANUCALOV, I. P.; PURIM, K. S. M.; QUEIROZ-TELLES, F. Infections caused by dematiaceous fungi and their anatomoclinical correlations. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 86, p. 138-141, 2011.

JACKSON, J. A.; JACKSON, B. J. Ecological relationships between fungi and woodpecker cavity sites. **The Condor**, v. 106, n. 1, p. 37-49, 2004.

KLICH, M. A. Identification of common *Aspergillus* species. Amsterdam: **Centralbureau voor Schimmelauteurs**, p. 116, 2002.

- KRAISITUDOMSOOK N.; HEALY R.A.; SMITH, M. E. Molecular systematics and taxonomic overview of the bird's nest fungi (Nidulariaceae). **Fungal Biology**, v. 125, p. 693-703, 2021.
- LOZANO, J.; LOURO, M.; ALMEIDA, C.; VICTÓRIO, A. C.; MELO, P.; RODRIGUES, J. P.; MADEIRA DE CARVALHO, L. Isolation of saprophytic filamentous fungi from avian fecal samples and assessment of its predatory activity on coccidian oocysts. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 8965, 2023.
- MASON, C. F. **Decomposição**. Ed. Universidade de São Paulo. Ed. Pedagógica, 1980.
- MCILVEEN, W. D.; COLE, J. R. H. Influence of zinc on development of the endomycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and its mediation of phosphorus uptake by glycine max 'Amsoy 71'. **Agriculture and Environment**, v. 4, n. 4, p. 245-256, 1979.
- NICOLETTI, R.; LOPEZ-GRESA, M. P.; MANZO, E.; CARELLA, A.; CIAVATTA, M. L. Production and fungitoxic activity of Sch 642305, a secondary metabolite of *Penicillium canescens*. **Mycopathologia**, v. 163, n. 5, p. 295-301, 2007.
- NLEYA, N.; GOMA, L.; ADETUNJI, M. C.; MWANZA, M. Biodiversity of aflatoxigenic *Aspergillus* species in dairy feeds in Bulawayo, Zimbabwe. **Frontiers in microbiology**, v. 11, p. 3438, 2020.
- ORTÚZAR-FERREIRA, C. N.; OLIVEIRA, M. S.; GENOVEZ-OLIVEIRA, J. L.; FRANCO, H. A.; THODE-FILHO, S.; CARDOZO, S. V., BERTO, B. P. (2020). Coccidia of Columbiformes: a taxonomic review of its Eimeriidae species and *Eimeria columbinae* n. sp. from *Columbina talpacoti* (Temminck, 1809) from Brazil. **Parasitology Research**, v. 119, p. 267-281, 2020.
- ORTÚZAR-FERREIRA, C. N.; OLIVEIRA, M. S.; ANDRADE, L. D. A. S.; MELLO, E. R.; LIMA, V. M.; BERTO, B. P. Molecular and statistical approaches to the delimitation of Eimeriidae species: a case of extreme polymorphism in *eimeria* oocysts from the plumbeous pigeon *Patagioenas plumbea* (Vieillot, 1818) (Columbiformes) in South America. **Parasitology Research**, v. 123, p. 42, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00436-023-08045-5>.
- PALLU, A. P. S. **Potencial biotecnológico de fungos de gênero *Penicillium* e interação com cana-de-açúcar**. Piracicaba, Brasil. (Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo USP), p. 129, 2010.
- PETIT, P.; LUCAS, E. M.; ABREU, L. M.; PFENNING, L. H.; TAKAHASHI, J. A. Novel antimicrobial secondary metabolites from a *Penicillium* sp. isolated from Brazilian cerrado soil. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 4, p. 8-9, 2009.
- RAGAVENDRAN, C.; MARIAPPAN, T.; NATARAJAN, D. Larvicidal, histopathological efficacy of *Penicillium daleae* against larvae of *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* plus biotoxicity on *Artemia nauplii* a non-target aquatic organism. **Frontiers in pharmacology**, v. 8, p. 773, 2017.
- RAPER, K. B.; THOM, C. **A manual of the Penicillia**. A manual of the Penicillia, 1949.
- SAMSON R.A.; VAN REENEN-HOEKSTRA E. S.; FRISVAD J. C.; FILTENBORG O. **Introduction to Food and Airborne Fungi**. 6° ed., Utrecht, The Netherlands, Centraalbureau Voor Schimmelcultures. Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences, 2000.
- SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**.

Guanabara Koogan, 2004.

SILVA-CARVALHO, L. M.; PASTURA, D. G.; RODRIGUES, M. B.; GOMES, J. V.; OLIVEIRA, M. S.; SIQUEIRA, P. B.; BERTO, B. P. *Isospora sagittulae* McQuistion & Capparella, 1992 (Apicomplexa: Eimeriidae) from antbirds (Passeriformes: Thamnophilidae) in the Amazon and Atlantic Forest of Brazil: with notes on its distribution and dispersion in the Neotropical region. **Parasitology research**, v. 117, p. 2635-2641, 2018.

SOUZA, C. N. **Diversidade de fungos do solo na Mata Atlântica**, 2010.

TAHIRI, G.; LAX, C.; CÁNOVAS-MÁRQUEZ, J. T.; CARRILLO-MARÍN, P.; SANCHIS, M.; NAVARRO, E.; NICOLÁS, F. E. Mucorales and mucormycosis: Recent insights and future prospects. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 3, p. 335, 2023.

URCELAY, C.; ROBLEDO, G. Positive relationship between wood size and basidiocarp production of polypore fungi in *Alnus acuminata* forest. **Fungal ecology**, v. 2, n. 3, p. 35- 139, 2009.

WARNER, G. M.; FRENCH, D. W. Dissemination of fungi by migratory birds: survival and recovery of fungi from birds. **Canadian Journal of Botany**, v. 48, n. 5, p. 907–910, 1970.

ZHOU, Z.; QIU, Y.; GE, X. The taxonomy, host range and pathogenicity of coronaviruses and other viruses in the Nidovirales order. **Animal Diseases**, v. 1, n. 1, p. 1- 28, 2021.

CAPÍTULO I

FUNGOS ISOLADOS DE AVES SILVESTRES E SERRAPILHEIRA NO PARQUE NACIONAL DO ITATIAIA NO SUDESTE DO BRASIL

RESUMO

No Brasil, a Mata Atlântica tem sofrido com desmatamento, que vem causando impactos na sua flora, fauna e microbiota. Esse bioma é considerado um dos principais destinos turísticos e de observação de aves devido ao grande número de espécies, principalmente passeriformes. Entretanto, a diversidade fúngica presente nesses ambientes é pouco conhecida e estudada. Neste trabalho um total de 148 amostras de 74 aves silvestres (74 de penas e 74 de fezes) e 16 amostras de serrapilheira foram coletadas no Parque Nacional do Itatiaia, no Sudeste Brasileiro. Fungos filamentosos isolados destas amostras foram identificados utilizando características macroscópicas e microscópicas. Entre as aves, *Aspergillus* spp., *Mucor* spp., *Cladosporium* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e *Syncephalastrum* spp., foram identificados em maior abundância. Em serrapilheira, *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. foram identificados. Estes resultados indicam a presença de espécies de fungos saprófitas nas penas e nas fezes de aves silvestres e na serrapilheira do local de captura. Mais estudos devem ser realizados a fim de elucidar modificações no perfil da microbiota com a antropização e sua interferência na saúde das aves e recuperação ambiental.

Palavras-chave: Passeriformes; Microbiota; Meio ambiente.

ABSTRACT

In Brazil, the Atlantic Forest has suffered from deforestation, which has caused impacts on its flora, fauna and microbiota. This biome is considered one of the main tourist and bird watching destinations due to the large number of species, mainly passerines. However, the fungal diversity present in these environments is little known and studied. In this work, a total of 148 samples from 74 wild birds (74 feathers and 74 feces) and 16 litter samples were collected in the Itatiaia National Park, in Southeastern Brazil. Filamentous fungi isolated from these samples were identified using macroscopic and microscopic characteristics. Among birds, *Aspergillus* spp., *Mucor* spp., *Cladosporium* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. and *Syncephalastrum* spp., were identified in greater abundance. In leaf litter, *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. and *Penicillium* spp. were identified. These results indicate the presence of saprophytic fungal species in the feathers and feces of wild birds and in the litter at the capture site. More studies must be carried out in order to elucidate changes in the microbiota profile due to human disturbance and its interference with bird health and environmental recovery.

Keywords: Passerines; Microbiota; Environment.

1 INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica é uma floresta tropical úmida brasileira, considerada um dos maiores hotspots de biodiversidade, porém, vem sofrendo com o desmatamento, o que vem causando impactos em sua flora e fauna (Rosa et al., 2018). No Rio de Janeiro, o Parque Nacional de Itatiaia foi a primeira área protegida criada no Brasil e possui 28.155 hectares de remanescentes florestais na Serra da Mantiqueira (Rosa et al., 2018).

O Parque é considerado um dos principais destinos turísticos e de observação de aves do Brasil devido à riqueza de espécies locais (Berto; Lopes, 2020). As aves são de extrema importância para a manutenção deste ecossistema, pois desempenham papel importante na polinização de plantas, dispersão de sementes, controle de pragas, entre outros (Berto; Lopes, 2020).

Por outro lado, as aves estão entre os animais que podem funcionar como reservatório e dispersores de diversos agentes causadores de zoonoses, entre esses microrganismos estão os fungos, que podem estar associados às penas, quando se chocam com algum substrato, e encontrados em órgãos internos, entrando pelas vias de alimentação (Simi et al., 2019). As aves silvestres da Mata Atlântica sofrem com o estresse causado pelo desmatamento e pela antropização, tornando-se mais suscetíveis à infecção de diversos tipos de microrganismos (Cordeiro et al., 2021).

A colonização por fungos oportunistas pode ser facilitada por caracteres morfológicos e fisiológicos que favorecem o seu desenvolvimento, incluindo sacos aéreos pouco vascularizados e glândulas uropigiais defeituosas com dificuldade em produzir secreções (Berto; Lopes, 2020). Os fungos, após se associarem ao seu hospedeiro, se não forem eliminados pelas células do sistema imunológico, entram em relação comensal ou parasitária com ele, podendo causar infecção.

Este processo depende do estado geral de saúde do hospedeiro (hospedeiros imunocomprometidos são suscetíveis) e das características inerentes ao microrganismo, como eficientes fatores de virulência (Casadevall; Pirofski, 2000; Feitosa *et al.*, 2020).

A grande maioria dos fungos ambientais são saprófitos, comumente ou ocasionalmente encontrados no solo, vegetação em decomposição, sementes e grãos. Muitos deles são oportunistas, ou seja, em contato com hospedeiros imunocomprometidos podem causar doenças (Pitt, 1994).

Algumas destas espécies foram reconhecidas como importantes patógenos em humanos ou animais domésticos imunocomprometidos (Pitt, 1994; Simi *et al.*, 2019; Arné *et al.*, 2021). Porém, como a diversidade fúngica presente no ambiente tropical, grande parte dela ainda precisa ser descoberta e compreendida; é possível e comum que fungos no ambiente sejam capazes de parasitar animais (Nardoni; Mancianti, 2021; Arné *et al.*, 2021). Isto explica a importância de estabelecer a ocorrência e frequência de fungos no ambiente e em potenciais hospedeiros.

Aves Passeriformes que vivem em ambientes silvestres são portadoras e dispersoras de fungos na natureza (Della Vedova *et al.*, 2019; Nardoni; Mancianti, 2021). Essa dispersão no ambiente pode ocorrer principalmente das seguintes formas: pela liberação de suas fezes no ambiente, e pelo contato com partes de seu corpo, pois esses fungos podem estar associados às penas (Warner; French, 1970; Simi *et al.*, 2019; Kraistudomsook *et al.*, 2021).

Portanto, é importante estabelecer o perfil dos fungos encontrados nas penas e fezes (aves) e na serrapilheira (ambiente) e estabelecer a incidência de fungos filamentosos totais. Neste contexto, este trabalho buscou identificar fungos filamentosos isolados de amostras de aves silvestres e serrapilheira, a fim de compreender a diversidade e frequência de espécies de fungos em habitats de aves no Parque Nacional de Itatiaia, sudeste do Brasil.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Local de estudo e coleta de amostras

Este estudo foi realizado ao longo da Travessia Ruy Braga no Parque Nacional de Itatiaia, uma área protegida com alto grau de vulnerabilidade, localizada na Serra da Mantiqueira, Sudeste do Brasil (22°26'17"S; 44°37'33"W).

As expedições foram realizadas nos meses de maio, junho e julho de 2021. As capturas ocorreram 3 dias por mês, e foram utilizadas 10 redes de neblina, totalizando 180 metros, e permaneceram abertas das 5h às 17h, totalizando 12 horas diurnas e 36 horas por mês. Foram capturadas 74 aves de diferentes espécies (Tabela 1).

As aves foram mantidas em caixas individuais e as fezes foram coletadas imediatamente após a defecação e acondicionadas em tubos de centrífuga esterilizados. As aves foram identificadas segundo Pacheco *et al.* (2021). As penas (plumas e cauda) foram retiradas com pinça estéril e colocadas em envelopes de papel branco previamente esterilizados para eliminar a umidade, evitando assim o crescimento de fungos e/ou bactérias contaminantes. Após a obtenção das amostras as aves foram soltas no mesmo ambiente onde foram capturadas. Adicionalmente, foram coletadas 19 amostras de serrapilheira a cada 500 metros do início da Travessia Ruy Braga em um percurso de 6,5 km na parte baixa do Parque Nacional de Itatiaia.

Todas as amostras foram devidamente etiquetadas, acondicionadas em bolsas térmicas em temperatura ambiente e transportadas para o Laboratório de Micologia e Micotoxicologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

2.2. Isolamento fúngico

Cinco a 10 mg de fezes foi semeada em ágar Sabouraud (Difco) mais cloranfenicol e cada amostra foi incubada diretamente em placa de Petri (90 x 15 cm) a 28 °C por até 07 dias (Simi *et al.*, 2019).

Penas inteiras e cortadas foram semeadas em Ágar Mycosel® (Difco) e cada amostra foi incubada em placa de Petri a 28 °C por até sete dias (Nardoni; Mancianti, 2021).

As amostras de serrapilheira foram colocadas em placas de Petri, nas quais foram depositados fios de crina esterilizados e água destilada (ambos estéreis). As amostras foram

incubadas a 25 °C por até quatro semanas seguindo a metodologia de Vanbreuseghem (1952). Para a identificação dos fungos cultivados nas placas e nas crinas foram observadas as seguintes características: características de crescimento das colônias, como cor e aparência (macromorfologia) e características do micélio, presença, forma, tamanho e septação de macroconídios; abundância e rugosidade dos microconídios; presença ou ausência de clamidoconídios; presença ou ausência de formas de reprodução sexuada; septação de hifas (Samsom *et al.*, 2000; Sidrim *et al.*, 2004, De Hoog *et al.*, 2021).

3. RESULTADOS

Foram coletadas 148 amostras de 74 aves silvestres capturadas, incluindo penas (n= 74) e fezes (n= 74) (Tabela 1), além de 16 amostras de serrapilheira. De cada amostra foi possível isolar uma ou mais colônias filamentosas; portanto, o número de fungos isolados não corresponde ao número total de amostras. De um total de 117 fungos isolados, foram identificados 17 gêneros, conforme Tabela 2. Os gêneros que ocorreram em maior número foram *Aspergillus* e *Mucor* seguidos de *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Syncephalastrum*. Foram identificadas 22 morfoespécies (18%), entre elas *Aspergillus* seção *Nigri*, *Aspergillus* seção *Circumdati*, *Aspergillus* seção *Fumigati* e *Penicillium citrinum*.

Figura 1: Microscopia óptica de (A) *Aspergillus* sp. com lactofenol algodão azul; (B) *Fusarium* sp. com lactofenol algodão azul; (C) *Syncephalastrum* sp. com lactofenol algodão azul; (D) *Aspergillus* sp. com hidróxido de sódio (20%); (E) *Rhizopus* sp. com lactofenol algodão azul; (F) *Mucor* sp. com lactofenol algodão azul.

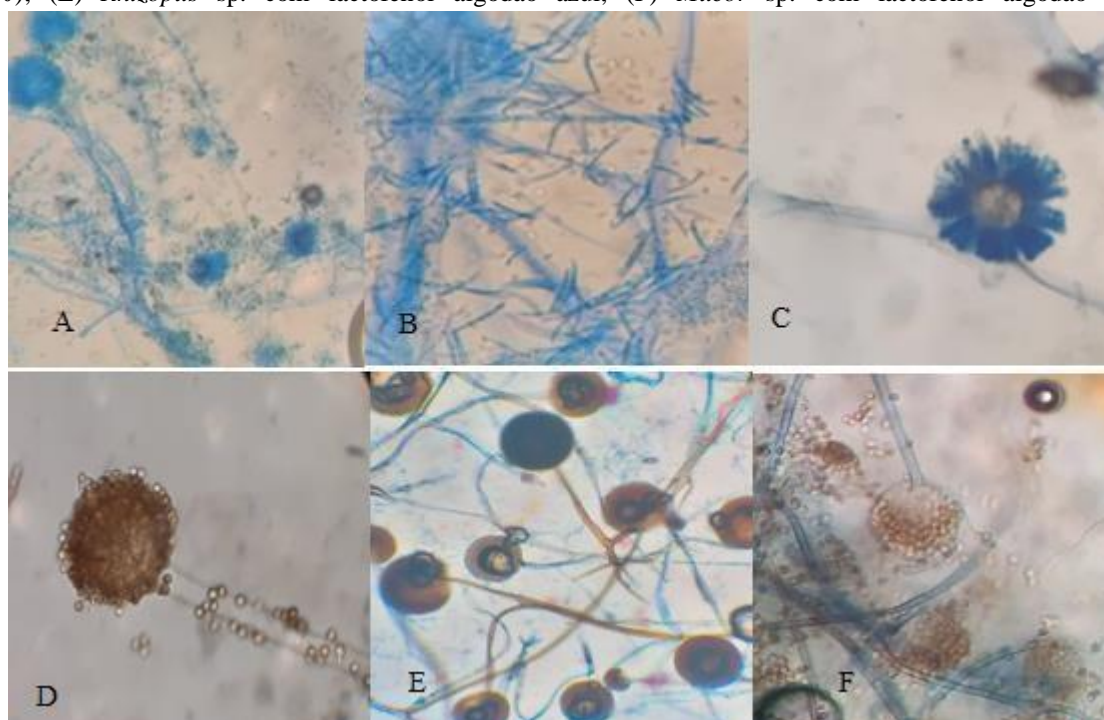


Tabela 1. Espécies de aves (Pacheco *et al.* 2021), amostras e fungos isolados.

Family	Bird species	Feathers	Feces
Thraupidae	<i>Cissopis leverianus</i> (Gmelin, 1788)	<i>Mucor</i> sp.	<i>Geotrichum</i> sp., <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>
	<i>Saltator similis</i> (d'Orbigny & Lafresnaye, 1837)	<i>Mucor</i> sp. <i>Fusarium</i> sp.	<i>Aspergillus</i> section <i>Fumigati</i>
	<i>Saltator fuliginosus</i> (Daudin, 1800)		
	<i>Trichothraupis melanops</i> (Vieillot, 1818)	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>	<i>Eurotium</i> sp.
	<i>Tachyphonus coronatus</i> (Vieillot, 1818)	<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>	
	<i>Tachyphonus coronatus</i>	<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>	
	<i>Tachyphonus coronatus</i>	<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>	
	<i>Tachyphonus coronatus</i>	<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>	
	<i>Saltator fuliginosus</i>	<i>Mucor</i> sp.	<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>
	<i>Trichothraupis melanops</i>	<i>Mucor</i> sp.	<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>
	<i>Tachyphonus coronatus</i>	<i>Mucor</i> sp.	<i>Eurotium</i> sp.
	<i>Haplospiza unicolor</i> (Cabanis, 1851)	<i>Mucor</i> sp. <i>Fusarium</i> sp.	<i>Aspergillus</i> section <i>Fumigati</i>
	<i>Stephanophorus diadematus</i> (Temminck, 1823)		<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>
	<i>Stephanophorus diadematus</i>	<i>Lichtheimia</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.
	<i>Stephanophorus diadematus</i>		<i>Cladosporium</i> sp. <i>Aspergillus</i> section <i>Circumdati</i> , <i>Cladosporium</i> sp.
	<i>Saltator similis</i>		
	<i>Stephanophorus diadematus</i>	<i>Alternaria</i> sp.	
	<i>Stephanophorus diadematus</i>		<i>Cladosporium</i> sp. <i>Cladosporium</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.
	<i>Saltator similis</i>		

	<i>Stephanophorus diadematus</i>	<i>Mucor</i> sp.	
	<i>Thachyphonus coronatus</i>	<i>Chrysonilia</i> sp.	
	<i>Stephanophorus diadematus</i>	<i>Acremonium</i> sp.	<i>Cladosporium</i> sp.
	<i>Tangara sayaca</i> (Linnaeus, 1766)		<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>
	<i>Tangara desmarestis</i> (Vieillot, 1819)	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.
	<i>Tangara desmarestis</i>		<i>Syncephalastrum</i> sp.
	<i>Tangara desmaristis</i>		<i>Curvularia</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.
	<i>Stephanophorus diadematus</i>	<i>Cladosporium</i> sp.	
	<i>Microspingus lateralis</i> (Nordmann, 1835)		<i>Rhizopus</i> sp.
	<i>Saltator similis</i>		<i>Rhizopus</i> sp.
	<i>Trichothraupis melanops</i>		<i>Rhizopus</i> sp.
	<i>Microspingus lateralis</i> (Nordmann, 1835)		<i>Rhizopus</i> sp.
	<i>Tangara desmarestis</i>		<i>Syncephalastrum</i> sp.
	<i>Trichothraupis melanops</i>		
	<i>Microspingus lateralis</i>	<i>Mucor</i> sp.	<i>Cladosporium</i> sp., <i>Mucor</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.
<i>Parulidae</i>	<i>Chiroxiphia caudata</i> (Shaw & Nodder, 1793)		
	<i>Manacus manacus</i> (Linnaeus, 1766)	<i>Mucor</i> sp.	
	<i>Chiroxiphia caudata</i>		<i>Cladosporium</i> sp.
	<i>Neopelma chrysolophum</i> (Pinto, 1944)	<i>Chaetomium</i> sp.	
	<i>Myiothlypis leucoblephara</i> (Vieillot, 1817)		<i>Cladosporium</i> sp.
	<i>Myiothlypis leucoblephara</i>	<i>Mucor</i> sp.	<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> , <i>Cladosporium</i> sp., <i>Mucor</i> sp.

	<i>Basileuterus culicivorus</i> (Deppe, 1830)		<i>Syncephalastrum</i> sp., <i>Mucor</i> sp.
	<i>Basileuterus culicivorus</i>		<i>Mucor</i> sp.
	<i>Basileuterus culicivorus</i>		
	<i>Myiothlypis leucoblephara</i>		
	<i>Myiothlypis leucoblephara</i>	<i>Curvularia</i> sp., <i>Mucor</i> sp.	<i>Syncephalastrum</i> sp.
<i>Onychorhynchidae</i>	<i>Myiobius atricaudus</i> (Lawrence, 1863)		<i>Aspergillus</i> section <i>Fumigati</i>
	<i>Myiobius atricaudus</i>		<i>Neosartorya</i> sp.
<i>Thamnophilidae</i>	<i>Thamnophilus caerulescens</i> (Vieillot, 1816)	<i>Lichtheimia</i> sp.	
	<i>Thamnophilus caerulescens</i>		<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> , <i>Mucor</i> sp.
	<i>Thamnophilus caerulenscens</i>		<i>Penicillium</i> sp.
	<i>Pyriglena leucoptera</i> (Vieillot, 1816)		
	<i>Pyriglena leucoptera</i>	<i>Neosartorya</i> sp.	<i>Aspergillus</i> section <i>Fumigati</i>
	<i>Pyriglena leucoptera</i>	<i>Cladosporium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	
<i>Furnariidae</i>	<i>Anabazenops fuscus</i> (Vieillot, 1816)		<i>Aspergillus</i> section <i>Fumigati</i>
	<i>Anabacerthia amaurotis</i> (Temminck, 1823)	<i>Penicillium</i> sp.	
	<i>Cranioleuca pallida</i> (Wied, 1831)		<i>Fusarium</i> sp., <i>Cladosporium</i> sp.
<i>Passerellidae</i>	<i>Zonotrichia capensis</i> (Statius Muller, 1776)	<i>Mucor</i> sp.	<i>Curvularia</i> sp., <i>Chaetomium</i> sp.
	<i>Zonotrichia capensis</i>	<i>Mucor</i> sp.	
	<i>Zonotrichia capensis</i>	<i>Lichtheimia</i> sp.	
	<i>Phylloscartes difficilis</i> (Ihering & Ihering, 1907)		<i>Mucor</i> sp.
<i>Rhychocyclidae</i>	<i>Phylloscartes difficilis</i>		<i>Fusarium</i> sp.

	<i>Phylloscartes difficilis</i>		<i>Mucor</i> sp.
	<i>Phylloscartes difficilis</i>		<i>Curvularia</i> sp.
<i>Vireonidae</i>	<i>Hylophilus poicilotis</i> (Temminck, 1822)	<i>Penicillium</i> sp.	
	<i>Hylophilus poicilotis</i>		<i>Bipolaris</i> sp.
	<i>Hylophilus poicilotis</i>	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Syncephalastrum</i> sp.
<i>Tyrannidae</i>	<i>Knipolegus cyanirostris</i> (Vieillot, 1818)		<i>Cladosporium</i> sp., <i>Mucor</i> sp.
	<i>Knipolegus cyanirostris</i>	<i>Mucor</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.
<i>Fringillidae</i>	<i>Euphonia pectoralis</i> (Latham, 1801)	<i>Neosartorya</i> sp.	<i>Eurotium</i> sp.
<i>Conopophagidae</i>	<i>Conopophaga melanops</i> (Vieillot, 1818)		<i>Aspergillus</i> section <i>Fumigati</i> , <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>
<i>Dendrocolaptidae</i>	<i>Sittasomus griseicapillus</i> (Vieillot, 1818)	<i>Lichtheimia</i> sp.	
<i>Turdidae</i>	<i>Turdus flavipes</i> (Vieillot, 1818)		<i>Aspergillus</i> section <i>Fumigati</i>
<i>Tityridae</i>	<i>Schiffornis virescens</i> (Lafresnaye, 1838)	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Neosartorya</i> sp.
<i>Platyrinchidae</i>	<i>Platyrinchus mystaceus</i> (Vieillot, 1818)		

Tabela 2. Lista de frequência de fungos identificados nos três substratos analisados.

Fungi	Feathers	Feces	Litter
<i>Acremonium</i> spp.	1		
<i>Alternaria</i> spp.	1		
<i>Aspergillus</i> spp.	6	17	2
<i>Bipolaris</i> spp.		1	
<i>Chaetomium</i> spp.	1	1	
<i>Chrysonilia</i> spp.	1		
<i>Cladosporium</i> spp.	2	11	
<i>Curvularia</i> spp.	1	3	
<i>Eurotium</i> spp.		3	
<i>Fusarium</i> spp.	3	8	5
<i>Geotrichum</i> spp.		1	
<i>Lichtheimia</i> spp.	4		
<i>Mucor</i> spp.	14	8	
<i>Neosartorya</i> spp.	2	2	
<i>Penicillium</i> spp.	5	1	5
<i>Rhizopus</i> spp.		4	
<i>Syncephalastrum</i> spp.		5	
Total	40	65	12

4 DISCUSSÃO

A maioria das espécies identificadas neste trabalho podem ser consideradas fungos ambientais e oportunistas (dependendo do estado geral do hospedeiro), porém a patogenicidade dos fungos não foi avaliada neste estudo. Os mais abundantes nas áreas amostradas foram *Aspergillus* spp. e *Mucor* spp. seguidos por *Cladosporium* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e *Syncephalastrum* spp.

Resultados semelhantes foram encontrados por Bills e Polishook (1994), ao estudar a abundância e diversidade de fungos da serrapilheira úmida da Costa Rica, encontraram *Penicillium* spp., *Trichoderma* spp., *Paecilomyces* spp., *Aspergillus* spp., e fungos *Mucorales*, os fungos os dois últimos em maiores quantidades, como neste estudo. Pesquisa também na Mata Atlântica do sudeste do Brasil realizada por Bezerra *et al.* (2020), no Parque Nacional Restinga de Jurubatiba no Rio de Janeiro, relataram resultados equivalentes, sendo isolados

Aspergillus spp., *Penicillium* spp., *Curvularia* spp., *Pestalotiopsis* spp., *Bipolaris* spp., *Monilia* spp., *Nigrospora* spp., e *Trichoderma* spp.

Ressalta-se que estudos envolvendo a micobiota presente em aves silvestres, principalmente Passeriformes, apesar de sua grande importância, são raros e, no Parque Nacional de Itatiaia, não foi feito até o momento nenhum levantamento da micobiota presente nas penas ou fezes desses animais. Este é o primeiro estudo a relatar fungos saprofíticos em aves silvestres no Parque Nacional do Itatiaia.

A identificação dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em aves migratórias é realizada com frequência, por exemplo, Akter *et al.*, (2020) isolaram *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. nas fezes de aves migratórias em Bangladesh. Simi *et al.*, (2019) identificaram *Aspergillus* spp. em fezes de papagaios e aves de rapina em cativeiro no centro-oeste do Brasil.

Dentre os fungos identificados no presente estudo no Parque Nacional de Itatiaia, destacamos *Aspergillus* spp., que ocorreu abundantemente nas fezes. Este gênero pode ser encontrado no solo, na matéria orgânica e em muitos outros lugares.

A aspergilose, doença causada por *Aspergillus* sp., pode afetar o trato respiratório de aves imunocomprometidas em geral, e causar pneumonia grave, sendo uma das principais causas de morte em aves em cativeiro e, menos frequentemente, em aves de vida livre (Joseph, 2003; Talbot *et al.*, 2018, Della Vedova *et al.*, 2019). Não foram encontradas características físicas desta doença na forma aguda nas aves capturadas.

Outros fungos que foram isolados em abundância, principalmente em amostras fecais, foram fungos da ordem Mucorales, sendo o gênero *Mucor* o mais abundante. Os fungos desta ordem apresentam crescimento rápido e são comumente encontrados no solo e em plantas em decomposição. *Mucor* é um dos principais gêneros da ordem, possuem esporangióforos simples ou ramificados e formam esporângios globulares e não possuem rizóides ou possuem rizóides pouco desenvolvidos (De Souza *et al.*, 2018; De Hoog *et al.*, 2020; Cordeiro *et al.*, 2021).

Os esporangiósporos de *Mucor* sp. variam em tamanho e formato, sendo alguns de formato irregular (Freitas *et al.*, 2021). A prevalência de *Mucorales* e *Cladosporium* spp. e *Fusarium* spp. encontrados crescendo em penas e excrementos de aves silvestres são pouco conhecidos, portanto, há necessidade de continuar mais estudos.

Ao analisar as amostras de serrapilheira coletadas, observamos que a diversidade de fungos filamentosos foi menor, apenas três gêneros foram isolados (*Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*), quando comparados às fezes (dezesseis gêneros) e penas (nove gêneros) das aves

pesquisadas (Tabela 1). A maioria dos microrganismos presentes neste ambiente são de difícil cultivo ou dependem de diferentes técnicas microbiológicas para obter um crescimento satisfatório.

Neste estudo, utilizou-se a técnica de Vanbreuseghem (1952), para isolar principalmente possíveis dermatófitos, fungos que podem causar micoses cutâneas em animais e humanos (Vidal *et al.*, 2017). De acordo com Takahashi *et al.*, (2011) e Vidal *et al.*, (2017) a não positividade dos fungos dermatófitos sugere que a utilização de métodos mais sensíveis para a identificação desses fungos, como aqueles que envolvem biologia molecular, deve ser realizada a fim de possibilitar a análise das espécies queratinofílicas presentes nos ambientes estudados. Portanto, outras investigações necessárias para complementar as técnicas clássicas de identificação de fungos são as técnicas de biologia molecular para a identificação de microrganismos.

Estudos realizados por Labrador *et al.* (2021), quantificando a abundância microbiana nas penas de aves da região sul da Espanha, apontaram os fungos como principais microrganismos. Porém, com a metodologia utilizada pelos autores, não foi possível identificar os gêneros e morfoespécies presentes nas amostras. As mais modernas técnicas de biologia molecular devem complementar as técnicas básicas de cultivo e identificação, a fim de identificar especificamente através do sequenciamento de genes nucleares, como o gene ITS, que é o principal gene utilizado para identificação molecular e filogenia (Lima *et al.*, 2017)

As aves podem estar envolvidas na transmissão de doenças fúngicas das seguintes formas: como vetores biológicos e como vetores mecânicos. Assim, nas aves, os fungos ganham uma dispersão diversificada, pois são transportados mecanicamente pelas penas ou excretados nas fezes (Hubalek, 2004). Os fungos presentes no solo ou na superfície das plantas são facilmente transferidos para as penas das aves.

A inalação dos conídios ou a ingestão de grãos contendo o fungo também são vias de infecção (Johansson *et al.*, 2021). Quando inalados ou ingeridos, esses fungos são excretados e dispersos no ambiente, conforme relatado por Akter *et al.* (2020), que analisando as fezes de aves migratórias em Bangladesh, constataram que essas aves tiveram um papel importante na disseminação de fungos filamentosos, especialmente *Aspergillus* spp. no meio ambiente, o que também poderia ser o caso em nosso estudo.

5. CONCLUSÃO

Uma diversidade de fungos filamentosos de vários gêneros foi isolada de penas e excrementos de pássaros, bem como de lixo. Os gêneros mais relatados foram *Aspergillus*,

Mucor, Cladosporium, Fusarium, Penicillium e Syncephalastrum.

De acordo com os resultados encontrados, pode-se considerar que a Mata Atlântica, mesmo tendo sofrido diversos impactos com o crescimento exponencial e expansão das áreas urbanas, ainda é fonte de riqueza de espécies fúngicas. Além disso, como esta região ainda é pouco investigada quanto à interação fúngica com passeriformes, faz-se necessário que novos estudos micológicos sejam realizados para levantamento das espécies fúngicas da região, e técnicas de biologia molecular sejam aplicadas a fim de encontrar microrganismos como os fungos queratinofílicos.

O estudo em diferentes escalas (entre penas, fezes e serrapilheira), permite sugerir que os microrganismos que vivem nas penas são resultados da chegada de fungos do ambiente externo à ave. Outros processos, como a dispersão microbiana através das fezes, podem desempenhar um papel e devem ser mais estudados.

A continuidade das pesquisas é de grande importância para elucidar se o perfil da microbiota é afetado pela antropização e se esse perfil interfere na saúde das aves e do meio ambiente. Este é o primeiro estudo a relatar fungos filamentosos saprófitos em aves silvestres e serrapilheira no Parque Nacional de Itatiaia, no sudeste do Brasil.

REFERÊNCIA

- AKTER, M.; ISLAM, M. S.; ISLAM, M. A.; SOBUR, M. A.; JAHAN, M. S.; RAHMAN, S.; RAHMAN, M. T. Migratory birds as the potential source for the transmission of *Aspergillus* and other fungus to Bangladesh. **Journal of Advanced Veterinary and Animal Research**, v. 7, n. 2, p. 338-338, 2020.
- ARNÉ, P.; RISCO-SASTILLO, V.; JOUVION, G.; LE BARZIC, C.; GUILLOT, J. Aspergillosis in Wild Birds. **Journal of fungi**, v. 7, n. 3, p. 241-241, 2021.
- BERTO, B. P.; LOPES, C. W. G. Coccidia of wild birds as ecological biomarkers: Some approaches on parasite-host-environment interaction. **Journal of Parasitology**, v. 106, n. 5, p. 707-713, 2020.
- BEZERRA, A. G.; MUSSI-DIAS, V.; DOS SANTOS, P. H. D.; CARVALHO, B. M.; DE SOUSA, P. T. P.; DA SILVEIRA, S. Fungos endofíticos associados a bromélias de restingas, do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Rio de Janeiro, Brasil. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, p. 971974298-971974298, 2020.
- BILLS, G. F.; POLISHOOK, J. D. Abundance and diversity of microfungi in leaf litter of a lowland rain forest in Costa Rica. **Mycologia**, v. 86, n. 2, p. 87-198, 1994.
- CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. A. Host e pathogen interactions; basic concepts of microbial commensalisms, colonization, infection and disease. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 12, p. 6511-6518, 2000.
- CORDEIRO, L.; LEE, H. B.; NGUYEN, T. T. T.; GURGEL, L. M. S.; DE AZEVEDO, A. L.

- C. M. *Absidia bonitoensis* (Mucorales, Mucoromycota), a new species isolated from the soil of an upland Atlantic Forest in Northeastern Brazil. **Nova Hedwigia**, v. 112, n. 1-2, p. 241-251, 2021.
- DE HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; AHMED, S.; AL-HATMI, A. M. S.; FIGUEIRAS, M. J.; VITALE, R. G. **Atlas of Clinical Fungi 4th ed.** Hilversum, 2020.
- DE SOUZA, C. A.; VOIGT, K.; GURGEL, L. S.; CORDEIRO, T. R.; OLIVEIRA, R. J.; LIMA, D. X.; SANTIAGO, A. A. A new species of *Mucor* (Mucoromycotina, Mucorales) isolated from an enclave of Upland Atlantic Forest in the semi-arid region of Brazil. *Phytotaxa*, v. 351, n. 1, p. 53-53, 2018.
- DELLA VEDOVA, R.; HEVIA, A.; VIVOT, W.; FERNÁNDEZ, J.; CÓRDOBA, S. B.; REYNALDI, F. J. Aspergillosis in domestic and wild birds from Argentina. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, v. 56, n. 2, p. 152460- 152460, 2019.
- FEITOSA, O. T. J.; DA SILVA, C. E.; DE SOUZA, R. G.; LIMA, C. D. S.; DE CARVALHO GURGEL, A.; DE OLIVEIRA, L. L. G.; MINAFRA, C. S. Microbiota intestinal das aves de produção: revisão bibliográfica. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 5, p. 42952779-42952779, 2020.
- FREITAS, L. W.; LIMA, C. L. F.; SOUZA, C. A. F.; CUNHA, G. C. L.; LEITÃO, J. D. A.; HAHN, R. C. Leveduras e fungos filamentosos em excretas de psittacideos e aves de rapina em cativeiro na região centro-oeste do Brasil: um risco potencial para a saúde humana. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 79, n. 3, p. 414-422, 2019.
- HUBALEK, Z. An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 40, n. 4, p. 639-659, 2004.
- JOHANSSON, N. R.; KAASALAINEN, U.; KIKKINEN, J. Woodpeckers can act as dispersal vectors for fungi, plants, and microorganisms. **Ecology and Evolution**, v. 11, n. 1, p. 7154-7163, 2021.
- JOSEPH, V. Infections and parasitic diseases of captive passerines. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 12, n. 1, p. 21-28, 2003.
- Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 32, n.1, p. 17-32, 1994.
- KRAISITUDOMSOOK, N.; SMITH, M. E. Bird's Nest Fungi: Charismatic Mushrooms in Your Garden. **EDIS**, v. 2021, n. 1, p. 3-3, 2021.
- LABRADOR, M. D. M.; DOÑA, J.; SERRANO, D.; JOVANI, R. Quantitative interspecific approach to the stylosphere: Patterns of bacteria and fungi abundance on passerine bird feathers. **Microbial Ecology**, v. 81, n. 4, p. 1088-1097, 2021.
- LEGRAND, D.; COTE, J.; FRONHOFER, E. A.; HOLT, R. D.; RONCE, O.; SCHTICKZELLE, N.; CLOBERT, J. Eco-evolutionary dynamics in fragmented landscapes. **Ecography**, v. 40, n.1, p. 9-25, 2017.
- LIMA, A. K. S. D.; RODRIGUES, J. R.; SOUZA, IDSD, RODRIGUES, J. C.; SOUZA, T. C. D.; MAIA, C. R.; FERNANDES, O. C. C. Fungos isolados da água de consumo de uma comunidade ribeirinha do médio Rio Solimões, Amazonas, Brasil: potencial patogênico. **Revista Ambiente & Água**. v. 12, p. 1017-1024, 2017.
- NARDONI S; MANCIANTI, F. Survey of Keratinophilic Fungi from Feathers of Birds in Tuscany. **Biology**, v. 10, n. 12, p. 1317, 2021.

- PACHECO, J. F.; SILVEIRA, L. F.; ALEIXO, A.; AGNE, C. E.; BENCKE, G. A.; BRAVO, G. A.; DE Q., PIACENTINI, V. Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee-second edition. **Ornithology Research**, v. 29, n. 2, p. 94-105, 2021.
- PITT, J. I. The current role of *Aspergillus* and *Penicillium* in human and animal health.
- ROSA, C. A.; PINTO, I. A.; JARDIM, N. S. Controle do javali na Serra da Mantiqueira: um estudo de caso no Parque Nacional do Itatiaia e RPPN Alto-Montana. **Biodiversidade Brasileira**, v. 2, n. 2, p. 285-303, 2018.
- SAMSON, R. A.; VAN REENEN-HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C.; FILTENBORG, O. **Introduction to Food and Airborne Fungi**, 6th ed., Utrecht, The Netherlands, Centraalbureau Voor Schimmelcultures. Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences, 2000.
- SIDRIM, J. J. C.; MEIRELES, T. E. F.; OLIVEIRA, L. M. P.; DIÓGENES, M. J. N. Aspectos clínico-laboratoriais das dermatofitoses. *Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p.135-161, 2004.
- SILVA, S. B. G.; OLIVEIRA, R. J. V. A new occurrence of *Mucor inaequisporus* Dade (Mucorales, Mucoromycota) from soil of the Atlantic Forest in the Brazilian Northeast. **Check List**, v. 17, n. 3, p. 753, 2021.
- SIMI, W. B.; LEITE-JR, D. P.; PAULA, C. R.; HOFFMANN-SANTOS, H. D.; TAKAHARA, D. T. Yeasts and filamentous fungi in psittacidae and birds of prey droppings in midwest region of Brazil: a potential hazard to human health. **Brazilian Journal of Biology**, v. 79, p. 414-422, 2018.
- TAKAHASHI, J. P.; PELEGRINI, A.; PEREIRA, C. D. Q. M.; SOUZA, M. C. Levantamento de fungos queratinofílicos em solo de parques e praças públicas no município de São Bernardo do Campo. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 11, n. 1, p. 7-53, 2011.
- TALBOT, J. J.; THOMPSON, P.; VOGELNEST, L.; BARRS, V. R. Identification of pathogenic *Aspergillus* isolates from captive birds in Australia. **Medical Mycology**, v. 56, n. 8, p. 1038- 1041, 2018.
- VANBREUSEGHEM, R. Technique biologique pour l'isolement des dermatophytes du sol. **Annales des Sociétés Belges de Medicine Tropicale de Parasitologie et de Mycologie**, v. 32, n. 2, p. 173-178, 1952.
- VIDAL, V. V.; CANTO, E. S. M.; DE SOUSA, J. S. C.; FROTA, J. K. C.; DOS SANTOS, T. T. Ocorrência de fungos queratinofílicos em solo de áreas recreacionais de Santarém/PA, Brasil. **Revista Cereus**, v. 9, n. 2, p. 03-15, 2017.
- WARNER, G. M.; FRENCH, D. W. Dissemination of fungi by migratory birds: survival and recovery of fungi from birds. **Canadian Journal of Botany**, v. 48, n. 5, p. 907-910, 1970.
- YEPES, M. S.; CARVALHO, J. New rust fungi records (Uredinales) from Brasil, collected at the Itatiaia National Park. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 2, p. 378-385, 2010.

CAPÍTULO II

FUNGOS ISOLADOS DE AVES SILVESTRES NA ILHA DA MARAMBAIA, ESTADO RIO DE JANEIRO, SUDESTE DO BRASIL.

RESUMO

No Brasil, a Mata Atlântica vem sofrendo com o desmatamento, que tem impactado sua flora, fauna e microbiota. No entanto, a diversidade fúngica presente nesses ambientes é pouco conhecida e estudada. Neste trabalho, um total de 90 amostras de 45 aves silvestres (45 penas e 45 fezes) foram coletadas na Ilha da Marambaia, sudeste do Brasil. Fungos filamentosos isolados dessas amostras foram identificados por meio de características macroscópicas e microscópicas. Alguns isolados foram identificados por biologia molecular usando a técnica de PCR. Foram identificados *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cunninghamella*, *Curvularia*, *Eurotium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Neosartorya*, *Pestalotia*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor* e *Syncephalastrum*. Esses resultados indicam a presença de espécies de fungos saprofíticos nas penas e fezes de aves silvestres do local de captura. Novos estudos devem ser realizados a fim de elucidar se o perfil da micobiota se modifica com a antropização e se interfere na saúde das aves e na recuperação ambiental.

Palavras-chave: Passeriformes; Microbiota; Meio ambiente

ABSTRACT

In Brazil, the Atlantic Forest has been suffering from deforestation, which has impacted its flora, fauna and microbiota. However, the fungal diversity present in these environments is little known and studied. In this work, a total of 90 samples from 45 wild birds (45 feathers and 45 feces) were collected on Marambaia Island, southeastern Brazil. Filamentous fungi isolated from these samples were identified through macroscopic and microscopic characteristics. Some isolates were identified by molecular biology using the PCR technique. *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cunninghamella*, *Curvularia*, *Eurotium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Neosartorya*, *Pestalotia*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor* and *Syncephalastrum* were identified. These results indicate the presence of saprophytic fungal species in the feathers and feces of wild birds from the capture site. New studies must be carried out in order to elucidate whether the profile of the mycobiota changes with anthropization and whether it interferes with bird health and environmental recovery.

Keywords: Passerines; Microbiota; Environment

1 INTRODUÇÃO

No Brasil é possível encontrar uma grande variedade de espécies de aves, estando entre os três países com maior diversidade de aves do mundo. Nesse contexto, a Mata Atlântica, bioma

de floresta tropical que abrange o litoral leste, nordeste, sudeste e sul do Brasil, está entre os cinco primeiros na lista de hotspots mundiais, embora sua área remanescente seja inferior a 8% de sua área. extensão original (Schweizer *et al.*, 2022).

A perda e fragmentação de habitats e a biopirataria são as principais ameaças à sua biodiversidade, gerando impactos diretos na fauna, flora e microbiota (Lindström, 1999). Dentro deste bioma, temos a Ilha da Marambaia, considerada reserva biológica e que constitui área de preservação ambiental de acordo com o Decreto nº 9.802, de 12 de março de 1987.

A região é administrada pelo Exército, Força Aérea e Marinha Brasileira, onde atuam realizar experimentos com armamentos e exercícios militares. Além disso, cerca de 430 quilombolas remanescentes estão presentes na área, vivendo da pesca e da agricultura. O acesso à Ilha é restrito, só possível através de embarcações da Marinha e com autorização prévia (De Lima, 2019; Icmbio, 2021).

A polinização, o controle de insetos e a dispersão de sementes são exemplos de como as aves atuam na cadeia do ecossistema (Howard, 2003). Essas aves estão entre os animais que podem atuar como reservatórios e dispersores de diversos agentes microbianos como fungos, por exemplo, que podem se associar às penas, ao esbarrar em algum substrato, e a órgãos internos, entrando pelas vias aéreas e oralmente (Howard, 2003; Reding, 2003; De Oliveira, 2022).

Os fungos são agentes de decomposição da matéria orgânica e podem ser encontrados no pólen, nas sementes e no solo. (Simi *et al.*, 2019; Krasitudomsook *et al.*, 2021). Além disso, muitos destes são oportunistas, ou seja, quando em contacto com hospedeiros imunocomprometidos, podem causar doenças (Pitt, 1994; Simi *et al.*, 2019)

A diversidade de fungos presentes no ambiente tropical é muito elevada e a maioria deles ainda é desconhecida (De Oliveira, 2022). Mais estudos sobre a frequência de fungos ambientais tornam-se importantes, uma vez que a maioria deles apresenta perfil oportunista. (De Oliveira, 2022). Portanto, é de grande importância definir o perfil da micobiota residente nesses locais, bem como estabelecer a incidência de fungos filamentosos.

Quando se trata de fungos filamentosos, as descrições mais comuns são em frangos de corte (Sugiharto, 2019; Hamza; Abaci Gunyar, 2022), em aves domésticas, como pombos (Madsen *et al.*, 2023), e em aves em cativeiro (Talbot *et al.*, 2018). Contudo, em aves de vida livre, esta interação permanece pouco estudada.

Neste cenário, este trabalho teve como objetivo estabelecer a incidência de fungos filamentosos de penas e fezes de aves em localidades da Ilha da Marambaia, no Sudeste do Brasil,

para entender a diversidade e frequência de espécies de fungos neste habitat.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Local de Estudo e Coleta de Amostras

Este estudo foi realizado na Ilha da Marambaia, uma área protegida localizada no Estado do Rio de Janeiro, no Sudeste do Brasil (22°26'17"S; 44°37'33"W). As expedições foram realizadas nos meses de maio, junho e julho de 2021. As capturas ocorreram 3 dias por mês e foram utilizadas 10 redes de neblina, totalizando 180 metros, e permaneceram abertas das 5h às 17h, ou seja, 12 horas por dia. e 36 horas por mês. Foram capturadas 45 aves de diferentes espécies (Tabela 1).

As aves foram mantidas em caixas individuais e as fezes foram coletadas imediatamente após a defecação e acondicionadas em tubos de centrífuga esterilizados. As aves foram identificadas segundo Pacheco *et al.*, (2021). As penas (plumagem e cauda) foram retiradas com pinça estéril e colocadas em envelopes de papel branco previamente esterilizados para eliminar a umidade, evitando assim o crescimento de fungos e/ou bactérias contaminantes. Após a obtenção das amostras, as aves foram soltas no mesmo ambiente onde foram capturadas.

Todas as amostras foram devidamente etiquetadas, acondicionadas em bolsas térmicas em temperatura ambiente e transportadas para o Laboratório de Micologia e Micotoxicologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

2.2 Isolamento fúngico

Cinco a 10 mg de fezes foram semeadas em ágar Sabouraud (Difco) mais cloranfenicol e cada amostra foi incubada diretamente em placa de Petri (90 x 15 cm) a 28 °C por até 07 dias (Simi *et al.*, 2019).

Penas inteiras e cortadas foram semeadas em Ágar Mycosel® (Difco) e cada amostra foi incubada em placa de Petri a 28 °C por até 07 dias (Nardoni; Mancianti, 2021).

Para a identificação dos fungos cultivados nas placas e crinas foram observados: características de crescimento das colônias, como cor e aparência (macromorfologia), e características do micélio, presença, forma, tamanho e septação de macroconídios; abundância e rugosidade dos microconídios; presença ou ausência de clamidoconídio; presença ou ausência de formas de reprodução sexuada; septação de hifas (Samsom *et al.*, 2000; Sidrim *et al.*, 2004; De Hoog *et al.*, 2020).

2.3 Identificação Molecular

O DNA foi extraído de um total de 8 linhagens de espécies diferentes, identificadas de acordo com a taxonomia morfológica, e os resultados dessas identificações serão comparados. Após o isolamento e obtenção das culturas puras, foi realizada a extração total do DNA utilizando o kit comercial DNeasy Blood e Tissue Kit (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante. Em seguida, foi realizada a amplificação pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), na região correspondente ao espaçador interno transcrito. (ITS) ITS1 – 5,8S – ITS2. A reação de PCR continha 12,5 µl de GoTaq® G2 Hot Start Colorless Master Mix (Promega Labs, São Paulo, Brasil) (1 ×), 0,25 µl de cada primer (0,2 µM), 9 µl de água livre de nuclease e 3 µl de DNA (para a reação primária) ou 3 µl de produto de PCR primário (para a reação secundária). Esta mistura de reagentes foi submetida a amplificação com um perfil de temperatura que consistiu em uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos com desnaturação a 94°C por 30 segundos, recozimento a 60°C por 1 minuto, e extensão a 72 °C por 2 minutos. Ao final dos 35 ciclos, foi realizada uma extensão final a 72°C por 10 minutos (Lima, 2017). Os primers utilizados para amplificação foram ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (White *et al.* 1990).

Os amplicons de PCR foram purificados utilizando o Qiagen MinElute PCR Purification (Qiagen, São Paulo, Brasil). Todos os amplicons de PCR foram sequenciados usando os primers PCR forward e reverse da Ludwig Biotechnology, onde um analisador genético ABI-Prism 3500 (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia) foi usado para sequenciamento Sanger.

3 RESULTADOS

Foram coletadas 90 amostras de 45 aves silvestres capturadas, que incluíam penas (n= 45) e fezes (n= 45) (Tabela 1). De cada amostra foi possível isolar uma ou mais colônias filamentosas, enquanto em outras não houve crescimento e, portanto, o número de fungos isolados não corresponde ao número total de amostras. De um total de 68 fungos isolados, foram identificados 15 gêneros, conforme Tabela 2. Os gêneros com maior número de ocorrências foram *Mucor* e *Fusarium*, seguidos de *Syncephalastrum*, *Penicillium* e *Aspergillus*.

Tabela 1. Espécies de aves, amostras e fungos isolados.

Family	Species	Feces	Feathers
<i>Tyrannidae</i>	<i>Myiarchus ferox</i> (Gmelin, 1789)	<i>Fusarium</i> sp.	
	<i>Myiarchus Ferox</i>	<i>Fusarium</i> sp.	
	<i>Myiozetetes similis</i> (Spix, 1825)	<i>Fusarium</i> sp.	

	<i>Myiarchus Ferox</i>	<i>Eurotium</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	
	<i>Myiarchus Ferox</i>	<i>Syncephalastrum</i> sp.	
	<i>Myiarchus Ferox</i>	<i>Syncephalastrum</i> sp. <i>Fusarium</i> sp.	
	<i>Myiarchus Ferox</i>	<i>Syncephalastrum</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.
	<i>Myiarchus ferox</i>	<i>Syncephalastrum</i> sp.	<i>Syncephalastrum</i> sp.
	<i>Myiarchus ferox</i>		
	<i>Myiozetetes similis</i>	<i>Mucor</i> sp.	
	<i>Myiozetetes similis</i>	<i>Mucor</i> sp.	
	<i>Elaenia flavogaster</i> (Thunberg, 1822)	<i>Mucor</i> sp.	
	<i>Myiarchus ferox</i>	<i>Penicillium</i> sp., <i>Pestalotia</i> sp.	
	<i>Tyrannus melancholicus</i> Vieillot, 1819	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Syncephalastrum</i> sp.
	<i>Turdus rufiventris</i> Vieillot, 1818		<i>Cunninghamella</i> sp.
	<i>Turdus rufiventris</i>	<i>Pestalotia</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	
	<i>Turdus rufiventris</i>	<i>Mucor</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp., <i>Geotricum</i> sp.
	<i>Turdus amaurochalinus</i> Cabanis, 1850	<i>Mucor</i> sp.	
<i>Turdidae</i>	<i>Turdus leucomelas</i> Vieillot, 1818	<i>Mucor</i> sp.	
	<i>Turdus rufiventris</i>	<i>Syncephalastrum</i> sp.	
	<i>Turdus leucomelas</i>	<i>Mucor</i> sp., <i>Syncephalastrum</i> sp.	
	<i>Turdus leucomelas</i>	<i>Syncephalastrum</i> sp.	<i>Mucor</i> sp.
<i>Columbidae</i>	<i>Leptotila verreauxi</i> Bonaparte, 1855		<i>Mucor</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Mucor</i> sp., <i>Rizophus</i> sp.
	<i>Leptotila verreauxi</i>	<i>Acremonium</i> sp.	

	<i>Columbina talpacoti</i> (Temminck, 1811)	<i>Rhizopus</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.
	<i>Leptotila verreauxi</i>		
	<i>Leptotila rufaxilla</i> (Richard & Bernard, 1792)	<i>Fusarium</i> sp., <i>Paecilomyces</i> sp.	
	<i>Leptotila verreauxi</i>	<i>Fusarium</i> sp.	
Hirundinidae	<i>Progne chalybea</i> (Gmelin, 1789)	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.
	<i>Progne chalybea</i>	<i>Rhizopus</i> sp.	
	<i>Progne chalybea</i>	<i>Mucor</i> sp.	<i>Aspergillus</i> sp.
	<i>Progne chalybea</i>		<i>Fusarium</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp.
	<i>Progne chalybea</i>		<i>Rhizopus</i> sp.
Vireonidae	<i>Vireo chivi</i> (Vieillot, 1817)	<i>Eurotium</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	
	<i>Vireo chivi</i>	<i>Mucor</i> sp.	
	<i>Vireo chivi</i>	<i>Curvularia</i> sp., <i>Mucor</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp.
	<i>Vireo chivi</i>	<i>Mucor</i> sp.	
	<i>Vireo chivi</i>	<i>Mucor</i> sp.	
Thraupidae	<i>Ramphocelus bresilia</i> (Linnaeus, 1766)	<i>Penicilium</i> sp.	
	<i>Ramphocelus bresilia</i>	<i>Mucor</i> sp.	
	<i>Ramphocelus bresilia</i>	<i>Acremonium</i> sp.	
	<i>Thraupis palmarum</i> (Wied, 1821)	<i>Acremonium</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	<i>Curvularia</i> sp.
	<i>Chloroceryle americana</i> (Gmelin, 1788)	<i>Syncephalastrum</i> sp.	
Icteridae	<i>Molothrus bonariensis</i> (Gmelin, 1789)	<i>Fusarium</i> sp.	
Picidae	<i>Veniliornis maculifrons</i> (Spix, 1824)	<i>Neosartorya</i> sp.	
Total	45	48	20

A grande maioria das espécies de fungos isoladas de penas e fezes de aves neste trabalho são consideradas fungos saprofíticos, sendo ocasionalmente patógenos oportunistas. Com base nas características fenotípicas e chaves taxonômicas correspondentes, podemos verificar que,

entre as amostras isoladas, foram identificados 15 gêneros, são eles, *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cunninghamella*, *Curvularia*, *Eurotium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Neosartorya*, *Pestalotia*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor* e *Syncephalastrum* (Tabela 2).

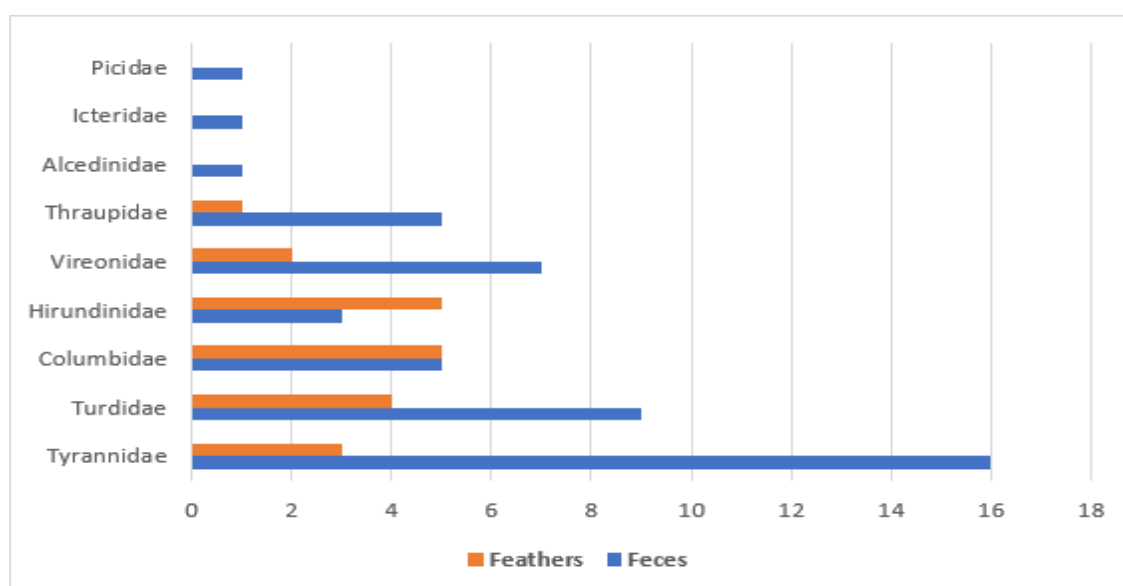
4 DISCUSSÃO

Ressalta-se que estudos envolvendo a micobiota presente em aves silvestres, principalmente Passeriformes, apesar de sua grande importância, são raros e, na Ilha da Marambaia, nenhum levantamento da micobiota presente nas penas ou fezes desses animais foi realizado até o momento. Este é o primeiro estudo a relatar fungos saprofíticos em aves silvestres na Ilha da Marambaia.

A família *Tyrannidae* foi a mais prevalente na captura (Fig. 1). É importante ressaltar que os Tiranídeos constituem um dos grupos de aves mais diversos e numerosos do mundo e, conseqüentemente, também da região neotropical (Chaves *et al.*, 2008). Estas aves espalharam-se por todos os habitats concebíveis (Ridgely; Tudor 1994) e adaptam-se a uma ampla variedade de nichos ecológicos, uma vez que ocupam todos os diferentes estratos verticais dentro das florestas tropicais (Sick, 1997).

Ao analisar separadamente os isolados fúngicos desta família, notamos que o gênero mais prevalente foi *Fusarium*, encontrado apenas nas fezes desses animais e nenhum nas penas, o que sugere a presença desse gênero na dieta e no trato gastrointestinal dessas aves. A grande maioria dos Tiranídeos são insetívoros e alguns se alimentam de frutas (Brum *et al.*, 2012). Esses resultados reforçam a necessidade de mais estudos envolvendo a presença de fungos e conjunto com a alimentação consumida por esses animais.

Figura 1. Distribuição dos fungos isolados dos substratos coletados, segundo a família das aves.



O gênero *Fusarium* sp. é comum em grãos e rações comerciais utilizadas para aves em cativeiro, conforme relatado por Koptcke *et al.*, (2021), que avaliaram a contaminação por fungos e suas micotoxinas em rações oferecidas a aves da espécie *Nymphicus hollandicus*, popularmente conhecidas como calopsitas. Ao longo de seis meses, esses alimentos destinados ao consumo dessas aves foram coletados para análise micológica, resultando em alta atividade fúngica do gênero *Fusarium*.

Tabela 2. Lista de frequências de fungos identificados nos substratos analisados.

Fungi	Feces	Feathers
<i>Acremonium</i>	3	
<i>Alternaria</i>	1	
<i>Aspergillus</i>		3
<i>Cunninghamella</i>		1
<i>Curvularia</i>	1	1
<i>Eurotium</i>	2	
<i>Fusarium</i>	12	4
<i>Geotrichum</i>		1
<i>Mucor</i>	13	3
<i>Neosartorya</i>	1	
<i>Penicillium</i>	2	3
<i>Pestalotia</i>	2	
<i>Paecilomyces</i>	1	
<i>Rhizopus</i>	2	2
<i>Syncephalastrum</i>	8	2
Total	48	20

As aves podem transportar pólen, sementes, pequenos parasitas e até fungos nas patas, penas e bico, atuando assim como dispersores em um ambiente ecologicamente equilibrado (Hubalek, 2004). Portanto, é possível assumir a importância do isolamento de fungos das fezes e penas, como foi realizado no presente estudo.

Dentre os 15 gêneros relatados, os mais frequentes nesta pesquisa foram *Mucor*, *Fusarium* e *Syncephalastrum*, seguidos de *Penicillium*, *Aspergillus* e *Rhizopus* (Fig. 2), e ao analisar o número total de fungos presentes nos substratos (fezes e penas), observamos maior número de gêneros isolados nas fezes do que nas penas (Tabela 1). Resultados semelhantes foram encontrados por De Oliveira *et al.*, (2022) que, ao estudarem a diversidade fúngica presente nas aves do Parque Nacional de Itatiaia no Brasil, relataram a presença de *Aspergillus* spp., *Mucor* spp., *Cladosporium* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e *Syncephalastrum* spp. Os mesmos autores demonstraram maior prevalência de fungos nas fezes do que nas penas das aves

capturadas.

Outro gênero amplamente encontrado foi *Mucor*, pertencente à ordem Mucorales. Esses fungos têm colônias lanosas e de crescimento rápido. *Mucor* é o principal gênero da ordem, que possui esporangióforos simples ou ramificados, formam esporângios globulares e não possuem rizóides (De Hoog *et al.*, 2020; De Freitas *et al.*, 2021). Além disso, ao analisarmos a presença desse fungo nos substratos, notamos que ele foi relatado em maior quantidade nas fezes do que nas penas, como também evidenciado por De Oliveira *et al.*, (2022), reforçando a necessidade de mais estudos envolvendo a alimentação desses animais.

Segundo De Oliveira *et al.*, (2022) é difícil observar a dispersão de fungos filamentosos pelas fezes no ambiente silvestre, pois quando as fezes são dispersas, seja no solo ou na serrapilheira, geram contaminação cruzada com fungos que estavam presentes nesses substratos, dificultando saber sua origem. Assim, a metodologia de captura deste trabalho permite uma identificação mais precisa, uma vez que as fezes são coletadas e guardadas em envelopes de papel esterilizados, evitando assim a contaminação cruzada. Esses resultados garantem que esses fungos estiveram presentes nas fezes das aves, e que por elas são dispersos no ambiente. Outros estudos já relataram essa dispersão utilizando diferentes metodologias, como Correia *et al.* (2019).

Os autores analisaram as fezes com sementes intactas, que foram colocadas em solo esterilizado e mantidas por 4 meses em ambiente protegido para evitar contaminação. Como resultado, sete sementes de *Rubus ulmifolius* (Schott, 1818) obtidas de quatro amostras de fezes de *Erithacus rubecula* (Lineu, 1758) e *Sylvia melanocephala* (Gmelin, 1789), foram colonizadas por fungos micorrízicos arbusculares.

Figura 2: Microscopia óptica de fungos isolados. Microscopia óptica (2) *Mucor* sp. com lactofenol algodão azul; (3) *Fusarium* sp. com lactofenol algodão azul; (4) *Syncephalastrum* sp. com lactofenol algodão azul. (5) *Penicillium* sp. com hidróxido de sódio (20%); (6) *Aspergillus* sp. com lactofenol algodão azul; (7) *Rhizopus* sp. com lactofenol algodão azul. Isolados das fezes.

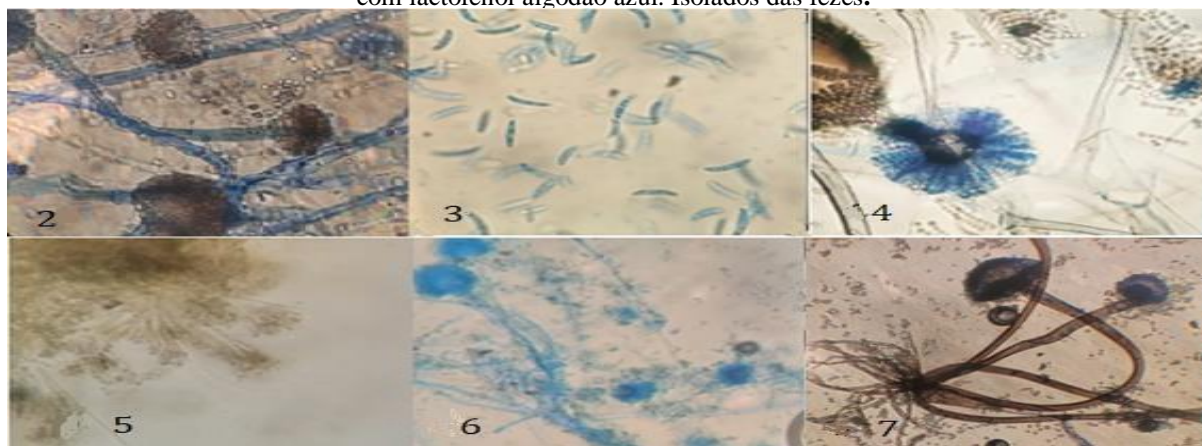


Tabela 3. Espécies identificadas pela taxonomia tradicional e biologia molecular.

Primer	Identificação (blast)	Identidade	Análise morfológica
ITS1	<i>Alternaria</i> sp.	99.81%	<i>Alternaria</i> sp.
ITS4	<i>Alternaria alternata</i>	100%	
ITS1	<i>Fungal endophyte culture</i>	100%	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
ITS4	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	99.61%	
ITS1	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	100%	<i>Syncephalastrum</i> sp.
ITS4	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	99.31%	
ITS1	<i>Fungal</i> sp.	100%	<i>Syncephalastrum</i> sp.
ITS4	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	98.97%	
ITS1	<i>Trichoderma asperellum</i>	99.65%	<i>Mucor</i> sp.
ITS4	Não houve similaridade		
ITS1	<i>Penicillium herquei</i>	98.84%	<i>Penicillium</i> sp.
ITS4	<i>Penicillium herquei</i>	99.82%	
ITS1	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	99.82%	<i>Aspergillus</i> sp.
ITS4	Não houve similaridade		
ITS1	<i>Fusarium</i> sp.	96.96%	<i>Fusarium</i> sp.
ITS4	<i>Fusarium</i> sp.	100%	

Quanto à análise genética, foram obtidas sequências de nucleotídeos das regiões de interesse (ITS) ITS1 – 5.8S – ITS2, e todas essas sequências foram submetidas à identificação em nível de espécie através da comparação com sequências depositadas na base de dados GenBank, o que possibilitou identificar espécies como *Syncephalastrum racemosum* (Cohn ex J. Schröt), *Pestalotiopsis microspora* (G.C. Zhao; N. Li), *Alternaria alternata* (Keissl, 1912), *Penicillium herquei* (Bainier; Sartory 1912), *Trichoderma asperellum* (Samuels Lieckf; Nirenberg 1999) e *Fusarium* sp. (Tabela 3).

Apesar das regiões sequenciadas serem amplamente utilizadas em diversos estudos para caracterização de espécies de fungos, para alguns isolados, essas regiões não foram sensíveis o suficiente para amplificação. E por abranger a diversidade da micobiota da Mata Atlântica, podemos estar lidando com espécies novas que ainda não foram descritas ou com um primer que não possui similaridade suficiente para amplificação.

As técnicas mais modernas de biologia molecular devem complementar (e não substituir) as técnicas básicas de cultivo e identificação para evitar erros de identificação, utilizando chaves taxonômicas morfológicas e sequenciamento de genes nucleares, como o gene ITS, que é o principal gene utilizado para identificação e filogenia (Lima *et al.*, 2017).

Estudos conduzidos por Labrador *et al.*, (2021) mostraram os fungos como principais microrganismos. Porém, com a metodologia utilizada pelos autores, não priorizou a descrição de morfoespécies.

CONCLUSÃO

Uma diversidade de fungos filamentosos de vários gêneros foi isolada de penas e fezes de aves. Os gêneros mais relatados foram *Mucor*, *Fusarium*, *Syncephalastrum*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Rhizopus*. De acordo com os resultados encontrados, pode-se considerar que a Mata Atlântica, mesmo tendo sofrido diversos impactos com o crescimento exponencial e expansão das áreas urbanas, ainda é uma rica fonte de espécies fúngicas.

A criação de novos primers deve ser incentivada, a fim de esclarecer uma maior variedade de espécies de fungos. Além disso, como esta região ainda é pouco investigada quanto à interação de fungos com passeriformes, faz-se necessário que novos estudos micológicos sejam realizados para levantamento das espécies fúngicas da região, e que concomitantemente sejam aplicadas técnicas de biologia molecular (taxonomia polifásica) para auxiliar na identificação desses microrganismos.

REFERÊNCIAS

- BRUM, F. T.; KINDEL, A. HARTZ, S. M.; DUARTE, L. D. S. Spatial and phylogenetic structure drive frugivory in Tyrannidae birds across the range of Brazilian Araucaria forests. **Oikos**, v. 121, n. 6, p. 899-906, 2012.
- CHAVES, A. V.; CLOZATO, C. L.; LACERDA, D. R.; SARI, E. H. R.; SANTOS, F. R. Molecular taxonomy of Brazilian tyrant-flycatchers (Passeriformes: Tyrannidae). **Mol. Ecol. Resour**, v. 8, n. 6, p.1169-1177, 2008.
- CORREIA, M.; HELENO, R.; SILVA, L. P.; COSTA, J. M.; RODRÍGUEZ-ECHEVERRÍA, S. First evidence for the joint dispersal of mycorrhizal fungi and plant diaspores by birds. **New Phytol**, v. 222, n. 2, p.1054-1060, 2019.
- DE HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; AHMED, S.; AL-HATMI, A. M. S.; FIGUEIRAS, M. J.; VITALE, R. G. **Atlas of Clinical Fungi**. 4ª ed. Hilversum, p. 1595, 2020.
- FREITAS, L. W. S.; LIMA, C. L. F.; SOUZA, C. A. F.; CUNHA, G. C. L.; LEITÃO, J. D. A.; SILVA, S. B. G.; CRUZ, M. O.; OLIVEIRA, R. J. V.; SANTIAGO, A. L. C. M. A. A new occurrence of *Mucor inaequisporus* Dade (Mucorales, Mucoromycota) from soil of the Atlantic Forest in the Brazilian Northeast. **Check List**, v. 17, n. 3, p. 753-758, 2021.
- HAMZA, A. A.; GUNYAR, O. A. Nutritional value of commercial broiler feed supplemented with olive mill waste fermented with probiotic *Rhizopus oryzae* strains. **Journal Applicad Microbiology**, v. 133, n. 3, p.1872-1881, 2022.
- HOWARD, D. H. Pathogenic Fungi in Humans and Animals. Marcel Dekker, New York. 808p. Hubalek Z. 2004. An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds. **J. Wild. Dis**, v. 40, n. 4, p. 639-659, 2003.
- ICMBIO 1987. Decreto nº 9.802 de 12 de março de 1987. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. **Available at Accessed on Nov**, v. 1, 2021.
- KÖPTCKE, F. B. N.; PINTO, L. A.; MORAES, T. T.; FARIAS, V. M.; ARONOVICH, M.; KELLER, L. A. M. Determinação da micobiota e micotoxinas em rações comerciais destinadas para calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) no Rio de Janeiro, Brasil. **Braz. J. Anim. Environ Res**, v. 4, n. 3, p. 4385-4394, 2021.
- KRAISITUDOMSOOK, N.; HEALY, R. A.; SMITH, M. E. Molecular systematics and taxonomic overview of the bird's nest fungi (Nidulariaceae). **Fungal. Biol**, v. 125, n. 9, p.93-703, 2021.
- LABRADOR, M. D. M.; DOÑA, J.; SERRANO, D.; JOVANI, R. Quantitative interspecific approach to the stylosphere: Patterns of bacteria and fungi abundance on passerine bird feathers. **Microb. Ecol**, v. 81, n. 4, p. 1088-1097, 2021.
- LIMA, A. K. S.; RODRIGUES, J. R.; SOUZA, I. S.; RODRIGUES, J.C.; SOUZA, T. C.; MAIA, C. R.; FERNANDES, O. C. C. Fungos isolados da água de consumo de uma comunidade ribeirinha do médio Solimões, Amazonas - Brasil: potencial patogênico. **Revta Amb. Água**, v. 12, n. 6, p. 1017-1024, 2017.
- LIMA, D. A.; NOVO, S. P. C.; SANTOS, F. N.; MACIEL, E. M. S. G. Aspectos epidemiológicos, sociais e ambientais relacionados a transmissão e ao controle da leishmaniose visceral canina na Ilha da Marambaia, Mangaratiba - Rio de Janeiro. **Revista Saúde Meio Amb**, v. 10, n. 1, p. 157-174, 2020.
- LINDSTRÖM, J. Early development and fitness in birds and mammals. **Trends Ecol. Evol**, v.

14, n. 9, p. 343-348, 1999

MADSEN, A. M.; Zhang, F.; Zeng, Y.; Frederiksen, M. W. 2023. Airborne methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, other bacteria, fungi, endotoxin, and dust in a pigeon exhibition. **Environ. Res.** 216(Pt 2):114642.

NARDONI, S.; MANCIANTI, F. Survey of keratinophilic fungi from feathers of birds in Tuscany. **Biology**, v. 10, n. 12), p.1317, 2021.

OLIVEIRA, J.; BONCI, M. M.; CONCEIÇÃO, A. B. S.; SILVA, L. G.; BARONE, F. A.; BERTO B. P.; OLIVEIRA, Á. Fungi isolated from wild birds and litter in the Itatiaia National Park in Southeastern Brazil. **Biodiv. Bras**, v. 12, n. 4, p.1-10, 2022.

PACHECO, J. F.; SILVEIRA, L. F.; ALEIXO, A.; AGNE, C. E.; BENCKE, G. A.; BRAVO, G. A.; BRITO, G. R. R.; COHN-HAFT, M.; MAURÍCIO, G. N.; NAKA, L. N.; OLMOS, F.; POSSO, S. R.; LEES, A. C.; FIGUEIREDO, L. F.; CARRANO, E.; GUEDES, R. C.; CESARI, E.; FRANZ, I.; SCHUNCK, F.; PIACENTINI, V. Q. Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee - second edition. **Ornithol. Res**, v. 29, p. 94-105, 2021.

PITT, J. I. The current role of *Aspergillus* and *Penicillium* in human and animal health. **J. Med. Vet. Mycol**, v. 32, n.1, p. 7-32, 1994.

REDING, P. Fungal diseases. In: Samour J. (Ed.), **Avian Medicine**. Edinburgh, UK, p. 275- 291, 2003.

RIDGELY, R. S.; TUDOR, G. **The Birds of South America: the suboscine passerines**. University of Texas Press, Texas, p. 940, 1994.

SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C.; FILTENBORG, O. **Introduction to Food and Airborne Fungi**. 6th ed. Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Utrecht, p. 396, 2000.

SCHWEIZER, D.; PETTER, G.; CÉSAR, R. G.; FERRAZ, S.; MORENO, V. S.; BRANCALIONP. H. S.; BUGMANN, H. Natural forest regrowth under different land use intensities and landscape configurations in the Brazilian Atlantic Forest. **For. Ecol. Manag**, v. 508, p. 120012. 2022.

SICK, H. **Ornitologia Brasileira**. Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos. Ed. Nova Fronteira, Rio de Janeiro, p. 396, 2004.

SIMI, W. B.; LEITE, J. R. D. P.; PAULA, C.R.; HOFFMANN-SANTOS, H. D.; TAKAHARA, D. T.; HAHN, R. C. Yeasts and filamentous fungi in psittacidae and birds of prey droppings in midwest region of Brazil: a potential hazard to human health. **Braz. J. Biol**, v. 79, n. 3, p. 414-422, 2019.

SUGIHARTO, S. A review of filamentous fungi in broiler production. **Agricult. Sci**, v. 64, n.1, p. 1-8, 2019.

TALBOT, J. J.; THOMPSON, P.; VOGELNEST, L.; BARRS, V. R. Identification of pathogenic *Aspergillus* isolates from captive birds in Australia. **Med. Mycol**, v. 56, n. 8, p. 1038-1041, 2018.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics**. Academic, San Diego, p.315-322. 1990.

CAPÍTULO III

Isospora pichororei n. sp. (Chromista: Apicomplexa: Eimeriidae) de *Synallaxis ruficapilla* Vieillot, 1819 (Passeriformes: Furnariidae: Synallaxiinae) na América do Sul.

RESUMO

Pichororé são passeriformes do gênero *Synallaxis* Vieillot 1818, que têm grande interesse para ornitologia, dada a ampla diversidade de 37 espécies que são distribuídas pela região Neotropical. Apesar dessa ampla diversidade e distribuição, *Synallaxis* spp. nunca foram registrados como hospedeiros para coccídios. Neste contexto, o estudo atual descreve uma nova espécie de *Isospora* Schneider 1881, de *Synallaxis ruficapilla* Vieillot, 1819 capturada no Parque Nacional Itatiaia, que é uma unidade de conservação federal no sudeste do Brasil. Os oocistos de *Isospora pichororei* Genovez-Oliveira e Bert o n. sp. são subesferóides a ovais, medindo em média 25 por 21 μm . A micrópila está presente, mas discreta. Resíduo de oocisto ausente, mas um ou dois grânulos polares estão presentes. Os esporocistos são elipsoidais com extremidade posterior ligeiramente pontiaguda, medindo em média 17 por 10 μm . Corpo de Stieda e sub-Stieda estão presentes. O resíduo do esporocisto está agrupado entre os esporozoítos vermiformes, que possuem estrias, corpos refrateis e núcleo. Essa morfologia era diferente das demais *Isospora* spp. registrado na família hospedeira Furnariidae. A identificação molecular foi direcionada pela amplificação e sequenciamento de um locus do gene mitocondrial citocromo coxidase subunidade 1 (cox1). Esta sequência apresentou a maior similaridade de 99,5% com uma sequência depositada para *Isospora oliveirai* em Ortúzar-Ferreira & Berto, 2020, que é uma espécie de coccídio que parasita *Schiffornis virescens* (Lafre snaye, 1838), também no Parque Nacional da Itália. A análise filogenética agrupou algumas espécies em subclados, incluindo *I. pichororei* com *I. oliveirai*; no entanto, foi inconclusiva em uma expectativa de coevolução parasita-hospedeiro. Finalmente, *I. pichororei* é estabelecido como novo para a ciência, sendo a primeira descrição de Synallaxiinae e a terceira descrição de Furnariidae. Além disso, esta é a primeira *Isospora* sp. da família hospedeira Furnariidae a ter uma suplementação molecular por sequenciamento de um locus do gene cox1 do genoma mitocondrial.

ABSTRACT

Spinetails are suboscine passerines of the genus *Synallaxis* Vieillot 1818, which are of great interest to ornithology, given the wide diversity of 37 species that are distributed throughout the Neotropical region. Despite this wide diversity and distribution, *Synallaxis* spp. have never been recorded as hosts for coccidia. In this context, the current study describes a new species of *Isospora* Schneider 1881, from *Synallaxis ruficapilla* Vieillot, 1819 captured in Itatiaia National Park, which is a federal conservation unit in southeastern Brazil. The oocysts of *Isospora pichororei* Genovez-Oliveira and Bert o n. sp. are subspheroidal to oval, measuring on average 25 by 21 μm . The micropyle is present, but discrete. Oocyst residue is absent, but one or two polar granules are present. The sporocysts are ellipsoidal with a slightly pointed posterior end, measuring on average 17 by 10 μm . Stieda and sub-Stieda bodies are present. The sporocyst residue is grouped between the vermiform sporozoites, which have striations, refractile bodies, and a nucleus. This morphology was different from other *Isospora* spp. recorded in the host family Furnariidae. Molecular identification was directed by amplification and sequencing of a locus of the mitochondrial cytochrome coxidase subunit 1 (cox1) gene. This sequence showed the highest similarity of 99.5% with a sequence deposited for *Isospora oliveirai* in Ortúzar-

Ferreira & Berto, 2020, which is a species of coccidium that parasitizes *Schiffornis virescens* (Lafre snaye, 1838), also in the Italian National Park. Phylogenetic analysis grouped some species into subclades, including *I. pichororei* with *I. oliveirai*; however, it was inconclusive in an expectation of host-parasite coevolution. Finally, *I. pichororei* is established as new to science, being the first description of Synallaxinae and the third description of Furnariidae. Furthermore, this is the first *Isospora* sp. of the host family Furnariidae to have a molecular supplementation by sequencing of a locus of the *cox1* gene of the mitochondrial genome.

1 INTRODUÇÃO

A avifauna da América do Sul é notavelmente diversa, com inúmeras espécies das mais diferentes ordens, famílias e gêneros (Birdlife International, 2024; Pacheco *et al.*, 2021). O gênero *Synallaxis Vieillet* (1818) são passeriformes de grande interesse para a ornitologia, dada a ampla diversidade de 37 espécies que são distribuídas pela região Neotropical (Birdlife International, 2024; Sick, 1997). Uma das espécies de pichororé que ocorre no Brasil é o pichororé *Synallaxis ruficapilla Viei llot*, 1819, que se distribui por todo o Sudeste do Brasil, chegando até a Argentina e o Paraguai (Birdlife International, 2024; Pacheco *et al.*, 2021). A pesquisa sobre parasitas de aves silvestres tem sido importante para monitorar a saúde das populações de aves selvagens e avaliar o estado de conservação de certos ecossistemas, além de determinar a diversidade e distribuição de espécies parasitárias na natureza (Berto; Lopes, 2020). No entanto, apesar dos avanços significativos nas últimas décadas, a diversidade de parasitas de aves silvestres é pouco conhecida, especialmente alguns grupos de parasitas, como os coccídios, que raramente são relatados, ou mesmo não são, em alguns táxons (Duszynski, 2021).

Este é o caso da subfamília Synallaxiinae, que apesar de apresentar uma diversidade de 17 gêneros e 59 espécies distribuídas pelo Brasil (Pacheco *et al.*, 2021), não possui nenhuma espécie de coccídio descrita. Esta ausência de descrições deve ser associada à ausência ou à escassez de exames fecais realizados nesta subfamília, e não ao parasitismo negativo (Duszynski, 2021). Neste contexto, o presente estudo fornece uma descrição e identificação molecular de uma nova espécie de *Isospora* Schneider (1881) a partir de espinhos de capa ruiva *S. ruficapilla* capturados no Parque Nacional da Itália, que é uma unidade de conservação federal no sudeste do Brasil.

2 MATERIAIS E MÉTODOS.

2.1 Coleta de Amostras

Foram realizadas doze expedições, entre 2014 e 2022, no Parque Nacional da Itatiaia, uma área protegida com alto grau de vulnerabilidade, localizada na Serra da Mantiqueira, na

divisa dos Estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais e São Paulo (Icmbio, 2024). Onze dessas expedições foram realizadas em três locais diferentes na parte baixa do parque, em altitudes que variam de 600 a 1200 m: (1) Do primeiro ao quinto quilômetro da Travessia Ruy Braga (22°26'17"S, 44°37'33"W) (cinco expedições); (2) Trilha das Borboletas (22°26'57"S, 44°36'25"W) (quatro expedições); e (3) Trilha perto da entrada do Parque (22°27'38"S, 44°35'34"W) (duas expedições). Apenas uma dessas expedições foi realizada no planalto de alta altitude do parque (22°22'07"S 44°44'44"W), a uma altitude de aproximadamente 2000 m. Redes de neblina foram usadas para a captura das aves. Um total de 18 espécimes de *S. ruficapilla* foram capturados, dos quais apenas um foi capturado no planalto de alta altitude do parque. As aves capturadas foram identificadas especificamente (MELLO *et al.*, 2020; Ridgely *et al.*, 2015)), fotografadas e anilhadas com anilhas metálicas numeradas fornecidas pelo Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Aves Silvestres – CEMAVE (Sousa; Serafni, 2020). Posteriormente, as aves foram mantidas em caixas individuais forradas com papel limpo até a defecação, quando foram soltas no mesmo local de captura. Cada gota fresca de fezes de cada ave individual foi colocada individualmente em um tubo de centrífuga com soluções de dicromato de potássio 2,5% (K₂Cr₂O₇) (10).

2.2 Análise Morfológica

As amostras foram examinadas no Laboratório de Biologia de Coccídios (LA BICOC) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Todas as amostras foram incubadas em temperatura ambiente (25 °C) por 7 dias. Os oocistos foram isolados por flotação em solução saturada de açúcar de Sheather (gravidade específica: 1,20) (Duszynski; Wilber, 1997). A prevalência foi calculada como o número de hospedeiros positivos para coccídios dividido pelo número de hospedeiros examinados (Bush *et al.*, 1997). A densidade se refere ao número de gotículas fecais específicas do oocisto (OPD) (Dolnik, 2006; Bush *et al.*, 1997). Observações e medições morfológicas foram feitas seguindo as diretrizes de Duszynski e Wilber, (1997) e, Berto e McIntosh e Lopes (2014), usando um microscópio binocular Olympus BX (Olympus Optical, Tóquio, Japão) equipado com uma câmera digital Eureka 5.0 (BEL Photo nics, Monza, Itália). Desenhos de linha, fotomicrografias e outras figuras foram editados usando dois aplicativos de software (Corel DRAW e Corel PHOTO-PAINT) do CorelDRAW® (Corel Draw Graphics Suite, versão 2020, Corel Corporation, Canadá). Todas as medidas estão em micrômetros e são fornecidas como o intervalo seguido pela média entre parênteses.

2.3 Análise Molecular

Trinta e dois oocistos do mesmo morfotipo sob microscopia de luz, que foram recuperados

de uma única gota fecal, foram isolados, ressuspensos em solução salina tamponada com fosfato (PBS) a 0,9% (v/v) e lavados por centrifugação até que o sobrenadante se tornasse límpido (Dolnik; Palinauskas; Bensch, 2009). O DNA foi extraído do oocisto usando o Quick Dna Kit (Zymo Research) de acordo com as instruções do fabricante. Quatro ciclos de congelamento e descongelamento foram aplicados antes da extração de DNA para atingir a lise completa dos oocistos. A amplificação de PC para um locus (COIBF1) do gene da subunidade 1 da citocromo oxidase mitocondrial (cox1) foi direcionada (Dolnik; Palinauskas; Bensch, 2009; Ortúzar-Ferreira *et al.*, 2024)). Para amplificação, uma reação de PC R de 25 µ l foi preparada usando 3 µ l de DNA genômico (< 1 µ g), 12,5 µ l de GoTaq® G2 Hot Start Color-less Master Mix (Promega Labs) (1×), 0,25 µ l de cada Primer (0,2 µ M) e 9 µ L de Nuclease Free Water. A amplificação de PCR foi conduzida usando a condição de ciclagem originalmente indicada por Ortúzar-Ferreira *et al.*, (2024). Os DNAs foram purificados usando o Kit de purificação de DNA Reli-aPre p™.

2.4 Análises de Sequência De DNA

O produto da PCR foi sequenciado usando os primers de PCR forward e reverse da Ludwig Biotechnology, onde um Analisador Genético ABI-Prism 3500 (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia) foi usado para sequenciamento de Sanger. O resultado da reação de sequenciamento foi analisado e editado no programa Chromas 2. 6. A sequência foi comparada com outros coccídios disponíveis no banco de dados GenBank usando a Ferramenta de Busca de Alinhamento Local Básico (BLAST). O alinhamento foi criado no MEGA v10.2.6 usando Clustal W (<http://www.clustalw.genome.jp>). A relação filogenética foi reconstruída usando Inferência Bayesiana no MrBayes v3.2.7 (Ronquist *et al.*, 2012) e usando o método de Máxima Verossimilhança no MEGA (Kumar *et al.*, 2018). O modelo evolutivo mais adequado para a análise filogenética foi selecionado pela Seleção de Modelos no MEGA. A análise de inferência bayesiana foi conduzida sob o modelo evolutivo GT R + G para 1.000.000 de gerações, e a árvore foi resumida após a remoção de 25% do burn-in. A análise de máxima verossimilhança foi conduzida sob o modelo evolutivo TN93 + G, e os valores bootstrap foram calculados por 1.000 replicados. A árvore filogenética resultante foi visualizada no MrBayes e MEGA e exportada no FigTree v1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/>).

Resultados 3. 1. Prevalência e descrição Nove de 18 (50%) *S. ruficapilla* capturados no Parque Nacional da Itália foram positivos para coccidiocistos. O único espécime capturado no planalto de alta altitude do parque foi positivo. Os coccidiocistos observados foram classificados no gênero *Isospora*; no entanto, eles não compartilhavam caracteres taxonômicos equivalentes com nenhuma espécie de *Isospora* previamente registrada em passeriformes do mesmo gênero,

família ou espécie do hospedeiro (Tabela 1). Este material é descrito abaixo. *Isospora pichororei* Genovez -Oliveira & Berto n. sp. (Fig. 1, 2).

Reino: Chromista Cavalier-Smith, 1981.

Filo: Miozoa Cavalier -Smith, 1987.

Infra-filo: Apicomplexa Levine, 1970.

Classe: Coccidiomorpha Doflein, 1901.

Subclasse: Coccidia Leuckart, 1879.

Família: Eimeriidae Minchin, 1903.

Gênero: *Isospora* Schneider, 1881.

Espécie de coccídio	Espécie Hospedeira (Família: Subfamília)	Referências	Oocistos					Esporocistos								
			Shape	Comprim. (µm)	Largura (µm)	L/W ratio	Pared. (µm)	Micropila		Comprim. (µm)	Largura (µm)	L/W ratio	Corpo de Stieda	Corpo de Substida	Resíduo	
								Granuloso Polar	Forma							
<i>Isospora hyloctistum</i>	<i>Automolus subulatus</i> (Spix, 1824)	McQuiston & Capparella [18]	ovoidal	15–21 (17.5)	14–19 (16.0)	1.0–1.3 (1.09)	Suave	ausente	presente, 1, largo, irregular, 2.0–3.5	ovoidal	11–15 (12.4)	6–11 (8.0)	1.4–2.2 (1.55)	pequeno, tipo-mamilo	retangular	granulosos uniformes aglomerados subesféricos
<i>Isospora automoli</i>	<i>Automolus ochrolaemus</i> (Tschudi, 1844); <i>infuscatus</i> (Sclater, 1856)	McQuiston et al. [19]	subesférico	18–28 (23.4)	17–24 (21.3)	1.0–1.2 (1.10)	suave	ausente	presente, 1	ovoidal	14–17 (15.4)	8–11 (9.9)	1.4–1.9 (1.60)	pequeno, tipo-mamilo	pequeno, acêntrico	aglomerado subesférico de grânulos grosseiros

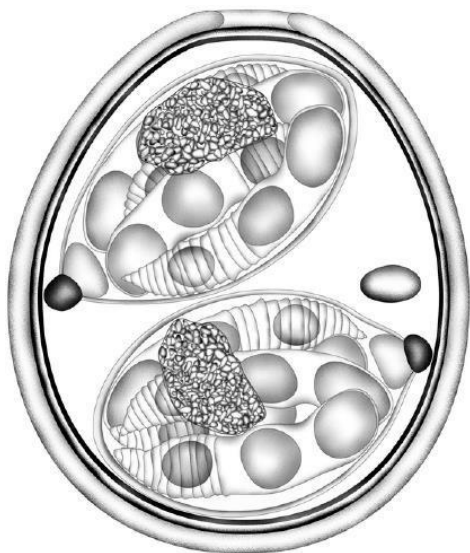
e:
Philydorin
ae)

<i>Isospora</i> <i>pichororei</i> Genovez- Oliveira & Berto n. sp.	<i>Synallaxis</i> <i>ruficapilla</i> Vieillot, (Furnariida e: <i>Synallaxis</i> <i>nae</i>)	Estudo atual	ovoide a elipsoidal alongado	21– 32 (25.5)	18– 24 (21. 1)	1.1– 1.7 (1.2 1)	suav e, 1.5– 1.9 (1.7)	presente, discreto ou quase imperceptí vel, 3.8– 4.3 (4.1)	present e, 1 ou raramen te 2, 3.0–3.3 × 2.4– 2.6 (3.1 × 2.5)	elipsoidal com extremid ade posterior ligeirame nte pontiaqu da	15– 19 (16.6)	9– 12 (10. 2)	1.5– 1.8 (1.6 3)	Proemi nente, em forma de botão ou bolha, 1. 0–1.6 × 1.5–2.0 (1.2 × 1.8)	rectangu lar para trapezoi dal, 1.1– 1.7 × 2.1–2.8 (1.4 × 2.5)	numeros os grânulos em um aglomer ado grande e irregular, 5.7–7.0 × 4.3– 6.0 (6.2 × 5.1)
---	--	-----------------	------------------------------------	-------------------------	-------------------------	---------------------------	------------------------------------	---	--	---	-------------------------	------------------------	---------------------------	---	---	---

Tabela 1 - Morfologia comparativa das espécies de *Isospora* registradas em Furnariidae no Novo Mundo.

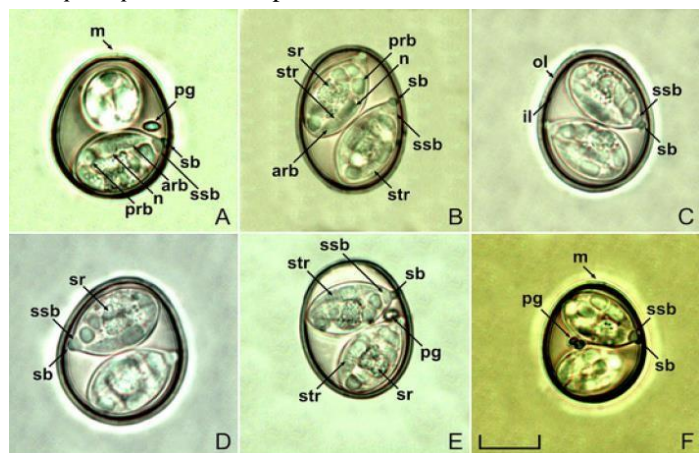
Fonte: Genovez-Oliveira *et al.*, 2024

Figura 1 - Desenho do oocisto esporulado de *Isospora pichororei* de pichororé no sudeste do Brasil. Escala: 10 µm.



Fonte: Genovez-Oliveira *et al.*, 2024

Figura 2 - Fotomicrografias de oocistos esporulados de *Isospora pichororei* de pichororé no sudeste do Brasil.¹



Fonte: Genovez-Oliveira *et al.*, 2024

¹ Observe os corpos refratários anterior (arb) e posterior (prb), micropilo (m), núcleo (n), camada externa (ol) e interna (il) da parede do oocisto, grânulo polar (pg), residuum esporocístico (sr), corpo de Stieda (sb), corpos sub-stieda (ssb) e estriações (str). Todas as fotomicrografias estão na mesma escala. Barra de escala: 10 µm.

Oocisto (n = 114) ovóide para alongar elipsoidal, 21 –32 × 18 –24 (25,5 × 21,1); L/W ratio 1,1–1,7 (1,21). Parede bicamada, 1,5–1,9 (1,7) de espessura, camada externa lisa, c.2/3 da espessura total. Micrópila presente, mas discreta ou quase imperceptível em alguns oocistos, 3,8–4,3 (4,1) de largura. Resíduo de oocisto ausente, mas um (frequentemente dois) grânulo polar está presente, 3,0–3,3 × 2,4–2,6 (3,1 × 2,5). Esporocisto (n = 114) elipsoidal com extremidade posterior ligeiramente pontiaguda, 15–19 × 9–12 (16,6 × 10,2); relação C/L 1,5–1,8 (1,63). Corpo de Stieda presente, proeminente, em forma de botão a em forma de bolha, 1,0–1,6 de altura × 1,5–2,0 de largura (1,2 × 1,8). Corpo de Sub-Stieda presente, retangular a trapezoidal, 1,1–1,7 de altura × 2,1–2,8 de largura (1,4 × 2,5). Corpo de Para-Stieda ausente. Resíduo de esporocisto presente, consistindo de numerosos grânulos em um aglomerado grande e irregular, 5,7–7,0 × 4,3–6,0 (6,2 × 5,1). Esporozóitos vermiformes, com estrias em toda a metade anterior, corpos refratários anterior e posterior e um núcleo central.

2.5 Diagnóstico

Isospora pichororei é a terceira espécie de coccídio registrada para Furnariidae, mas o primeiro registro na subfamília Synallaxiinae. Esta espécie é diferente na maioria dos caracteres taxonômicos de *Isospora hyloctistum* McQuistion & Capparella, 1994 e *Isospora automoli* McQuistion, Barber & Capparella, 1999, que são registrados na mesma família hospedeira, mas de uma subfamília diferente, Philodora (Tabela 1) (Pacheco *et al.*, 2021; McQuistion; Capparella, 1994; McQuistion; Barber; Capparella, 1999). Características típicas de *I. pichororei* são o microptilo discreto, corpo de Stieda proeminente e estrias nos esporozoítos. Além disso, *I. pichororei* pode ser facilmente diferenciado de *I. hyloctistuman* e *I. automoli* pelos oocistos maiores, formato elipsoidal alongado (conforme visto pela razão L/W de até 1,7), até dois grânulos polares, esporocistos com extremidade pontiaguda e resíduo de esporocisto grande e irregular.

3. Resumo Taxonômico

Synallaxis ruficapilla Vieillot, 1819 (Aves: Passeriformes : Tyranni: Furnariida: Furnarioidea: Furnariidae : Synallaxiinae), Víreo-chivi.

Localidade - tipo: : Parque Nacional do Itatiaia (22°26' S , 44 °3 6 ' W), Sudeste do Brasil.

Material - tipo: Foto, desenho, e oocistos em solução de K₂Cr₂O₇ a 2,5% (Williams *et al.*, 2010) estão depositados e disponíveis (<http://r1.ufrj.br/labioc/colecao.html>) na Coleção Parasitologia do Laboratório de Biologia de Coccídios, da UFRRJ, sob o número de repositório P - 138/2024 . Fotografias do espécime hospedeiro-tipo (simbiotipo) é depositado na mesma coleção. Sequência representativa de DNA: a amplificação de DNA do locus COIBF1 (Ortúzar-Ferreira *et al.*, 2024) mostrou uma banda clara em torno de ~250 pb. A sequência representativa foi depositada no banco de dados GenBank sob a permissão de acesso. número: PP944376 . Registro no ZooBank: Para cumprir com os regulamentos estabelecidos no Artigo 8. 5 da versão alterada de 2012 do Código Internacional de Zoologia Nomenclatura lógica (ICZN, 2012) detalhes das novas espécies foram enviados ao ZooBank. O Identificador de Ciências Biológicas (LSID) do artigo é urn:lsid :zoobank.org:pub :A2EE5479 -9147 -48A7 -A84F - 8E325B4E6FFD. O LSID para o novo nome *Isospora pichororei* Genovez-Oliveira & Berto n. sp. é urn:lsid :zoobank.org:act :B72E021E - 9149 -4C8E -BF7E -33CF41A33C46 . Local de infecção : Desconhecido, os oocistos foram recuperados das fezes. Densidade : Média de 65,8 (variando de 7 a 4576) OPD. O espécime positivo no planalto de alta altitude lançou 250 OPD. Etimologia: O nome específico é derivado do nome local comum para o hospedeiro, que é 'pichororé'.

3.1 Análise Molecular

A análise molecular no locus COIBF1 dos oocistos morfologicamente identificados como *I. pichororei* recuperados de *S. ruficapilla* resultou em uma sequência que diferia de outras espécies de *Isospora* depositadas no banco de dados do GenBank. A sequência de *I. pichororei* apresentou a maior similaridade de 99,5% com uma sequência depositada para *Isospora oliveirai* Ortúzar-Ferreira & Berto, 2020, que é uma espécie que parasita o schiffornis esverdeado *Schiffornis virescens* (Lafresnaye, 1838), um passeriforme suboscínico da família Tityridae. *Isospora oliveirai* também tem como localidade-tipo o Parque Nacional de Itatia (Ortúzar-Ferreira *et al.*, 2020). Mais distantemente, com cerca de 98% de similaridade, estão dois parasitas coccídeos de passeriformes oscinos: (1) *Isospora trincaferri* Berto, Balthazar, Flausino & Lopes, 2008, de saltadores de asas verdes *Saltator similis* d'Orbigny & Lafresnaye, 1837, que foi relatado recentemente no Parque Nacional da Itália (Maronezi *et al.*, 2024); e (2) *Isospora canariense* Box, 1975, dos canários das ilhas *Serinus canariense* (Linnaeus, 1758), que tem distribuição mundial (Berto *et al.*, 2023).

3.2 Análises filogenéticas

As análises filogenéticas baseadas no locus COIBF1 incluíram sequências de coccídeos disponíveis no Genbank (Figura 3). *Eimeria tenella* (Rai Iliet; Lucet, 1891) foi usado como o grupo externo. *Isospora pichororei* estava em um grupo monofilético com *I. oliveirai* com altas probabilidades posteriores e suportes bootstrap, correspondendo a uma similaridade de 99,5% entre estes e *Isospora* spp. Considerando o clado anterior, há também *Isospora* spp. de passeriformes oscinos e suboscinos de diferentes famílias, como também observado nos clados monofiléticos.

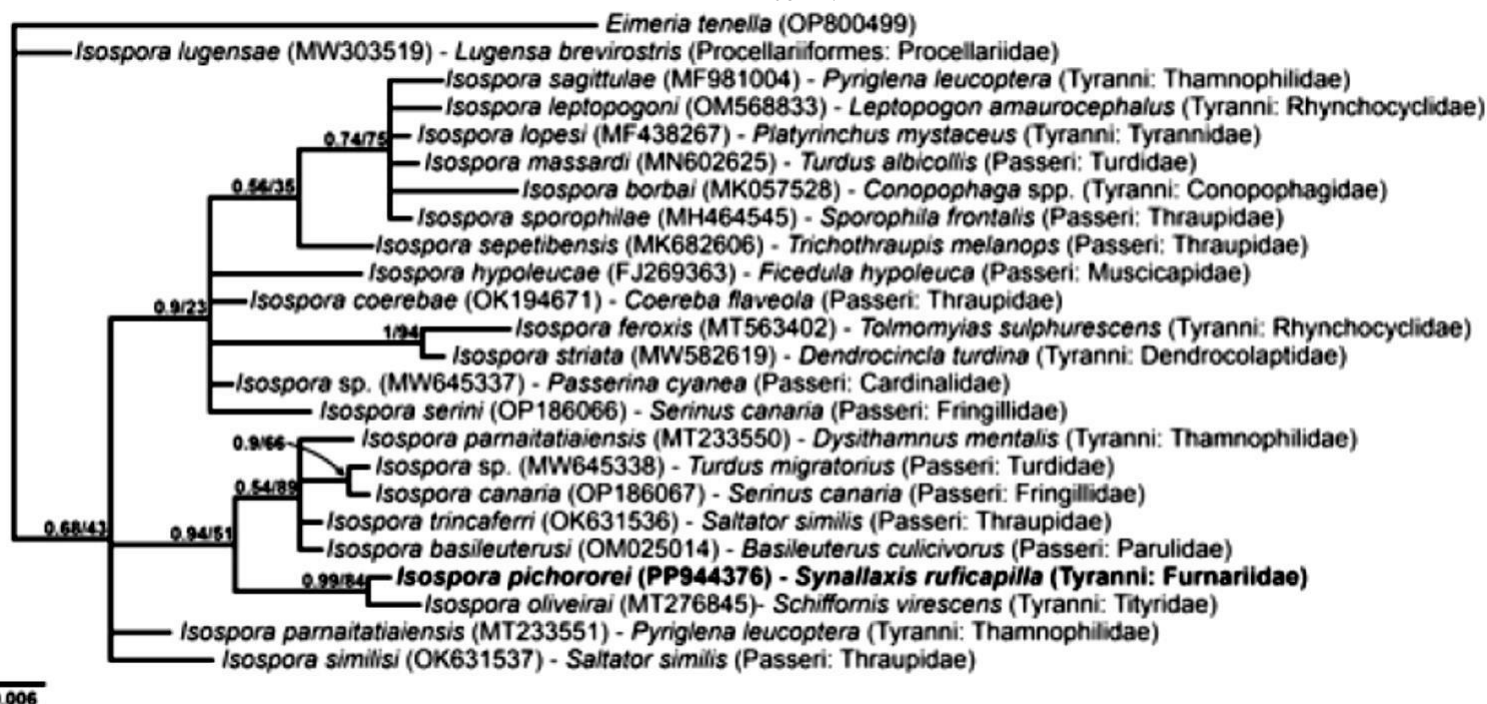
4 DISCUSSÃO

Na revisão taxonômica de coccídeos de pássaros passeriformes do Novo Mundo por Berto *et al.* (2011) três espécies de *Isospora* são registradas para a família hospedeira Furnariidae. Isso se deve ao fato de que os vira-folha *Sclerurus* spp. foram classificados em Furnariidae naquela época; no entanto, esses passeriformes são atualmente o gênero *Scleruridae* (Pacheco *et al.*, 2021). Em contraste, a *BirdLife International* (2024) ainda classifica os vira-folhas *Sclerurus* spp. como pássaros furnarídeos. Em qualquer caso, a única espécie descrita deste gênero de passeriformes é *Isospora scleruri* McQuistion e Capparella, 1994, que foi recuperada do vira-folhas de cauda preta *Sclerurus caudacutus* (Vieillot, 1816) e do vira-folhas de garganta amarelada *Sclerurus mexicanus* Sclater, 1857 no Equador. Esta espécie é semelhante em tamanho e forma a *I. pichororei*, mas pode ser diferenciada principalmente pela ausência de micropile e pela forma ondulada do corpo do sub-Stieda (McQuistion; Capparella, 1994). Além disso, nenhuma outra espécie de *Isospora* sp. foi descrito a partir de antigos furnarídeos. Todas as espécies de *Isospora* de aves furnarídeos e esclerurídeos foram descritas pelo grupo de pesquisa do Dr. Thomas McQuistion na década de 1990 nas províncias de Sucumbios e Esmeraldas no Equador (McQuistion; Capparella, 1994; McQuistion; Barber; Capparella, 1999; Berto *et al.*, 2011). Apesar da distância dessas localidades-tipo da localidade-tipo de *I. pichororei* no sudeste do Brasil, vale destacar que todos esses hospedeiros *Auto-molus* spp. e *Sclerurus* spp. apresentam apenas distribuição cis-andina, ou distribuição cis-andina e trans-andina, além de serem distribuídas na Amazônia brasileira. Esta observação destaca a possibilidade de dispersão e transmissão destas espécies de *Isospora*, originalmente registradas no Equador, para aves suscetíveis no Brasil (Berto; Lopes, 2020). Neste contexto, embora *S. ruficapilla* não seja simpátrica com estas espécies hospedeiras devido à sua distribuição ser quase restrita ao sudeste do Brasil, outras aves forrageiras suscetíveis que têm ampla distribuição podem dispersar estas espécies de *Isospora* pela região Neotropical, incluindo o sudeste do Brasil (Berto; Lopes, 2020). Esta dinâmica dispersa foi observada para *Isospora sagittae* McQuistion & Capparella, 1992, em

formigueiros, que foi originalmente descrito no Equador (McQuistion; Capparella, 1992), posteriormente relatado na Amazônia brasileira (Berto *et al.*, 2014) e, finalmente, na Mata Atlântica do sudeste do Brasil (Silva-Carvalho *et al.*, 2018). Por outro lado, os limpa-folhas *Automolus* spp. são aves comuns classificadas na subfamília Philydorinae, ao contrário de *S. ruficapilla*, que é classificada na subfamília Synallaxiinae; enquanto os vira-folhas *Sclerurus* spp. são atualmente classificados em Sclerurida, conforme mencionado anteriormente (Pacheco *et al.*, 2021). Portanto, ao considerar a especificidade no nível da subfamília hospedeira, *Isospora* spp. registrada de *Automolus* spp. não seria infecciosa para *S. ruficapilla*; e para considerar que *I. scleruri* pode infectar *S. ruficapilla*, a especificidade além da família hospedeira deve ser considerada. Nesse sentido, no trabalho atual decidiu-se considerar apenas *Isospora* spp. registrados de *Automolus* spp. para comparação taxonômica na Tabela 1, de acordo com o conceito de especificidade no nível da família hospedeira para coccídios eimeriídeos amplamente divulgado na literatura científica (Duszynski e Wilber, 1997; Berto *et al.*, 2011). Com o objetivo de avaliar a suscetibilidade de *S. ruficapilla* a *Isospora* spp. registrados de *Automolus* spp. e *Sclerurus* spp., além da comparação morfológica básica de seus oocistos, deve-se realizar uma análise molecular e/ou de infecção experimental direta por sequenciamento de certos *locus* gênicos (Duszynski; Wilber, 1997; Berto; McIntosh; Lopes, 2014). No trabalho atual, foi alvejado o locus COIBF1, que foi pioneiro em estudos moleculares de *Isospora* spp. de passeriformes, e é o locus que possui o maior número de depósitos de *Isospora* spp. no *GenBank*. Este locus foi originalmente alvejado por Dolnik *et al.*, (2009) porque pertence ao gene *cox1*, que é o mais adequado para delimitação e diferenciação de espécies (Ortúzar-Ferreira *et al.*, 2024; Ogedengbe; Hanner; Barta, 2011), e porque é o mais bem-sucedido para amplificação de DNA de um único ou poucos oocistos (Dolnik; Palinauskas; Bensch, 2009).

A análise filogenética construída para o locus COIBF1 foi inconclusiva para *Isospora* spp. de passeriformes, apesar do grande número depositado no *GenBank*, como já destacado em trabalhos anteriores (Ortúzar-Ferreira *et al.*, 2024; Ortúzar-Ferreira *et al.*, 2020; Ogedengbe *et al.*, 2018). No cladograma (Fig. 3) são observados três subclados coerentes com dois *Isospora* spp., incluindo o subclado com *I. pichororei* e *I. oliveirai*; entretanto, os clados maiores agrupam *Isospora* spp. de passeriformes oscinos e suboscinos de diferentes famílias hospedeiras. Esta observação inconclusiva é baseada na expectativa de coevolução, onde os parasitas evoluem junto com seus hospedeiros e, portanto, devem formar grupos monofiléticos de acordo com seus hospedeiros.

Figura 3 - Relação filogenética de *Isospora pichororei* de pichororé, baseada em análise Bayesiana do gene *cox1*².



Fonte: Genovez-Oliveira *et al.*, 2024

¹ Os comprimentos dos ramos correspondem às estimativas médias posteriores das distâncias evolutivas (barra de escala: 0,006). Os rótulos dos ramos nos nós mostram as probabilidades posteriores (à esquerda) da análise Bayesiana e os valores de bootstrap (à direita) da análise de Máxima Verossimilhança. Apenas probabilidades posteriores maiores que 0,5 estão exibidas. Os filogramas foram agrupados usando *Eimeria tenella* (Railliet & Lucet, 1891 *apud* Genovez-Oliveira *et al.*, 2024) como grupo externo.

Por outro lado, podem ser observadas outras características morfológicas, biológicas e/ou ecológicas que sustentam estes resultados filogenéticos. Por exemplo, *I. pichororei* e *I. oliveirai*, que foram os mais semelhantes e se mantiveram monofilicamente na análise filogenética, apesar de parasitarem famílias distintas de passeriformes sub-boscínicos, apresentam algumas características semelhantes em seus roocistos, tais como: tamanho do oocisto, forma dos corpos de Stieda e sub-Stieda, e tamanho e forma do esporocisto; apesar de serem absolutamente distintos na parede do oocisto, grânulo polar e resíduo doocisto (Ortúzar-Ferreira *et al.*, 2020). Há também a observação de que muitas das espécies de coccídios nos clados e subclados foram registradas no Parque Nacional da Itália, o que apoiaria a perspectiva de grupos monofiléticos formados a partir de regiões geográficas; no entanto, algumas espécies nesses clados são registradas em localidades distantes, incluindo outras regiões geográficas. Em qualquer caso, não há atualmente nenhuma evidência ou abordagem que apoie

parcimoniosamente os resultados filogenéticos observados a partir de sequências no locus COIBF1 de *Isospora* spp. de passeriformes, principalmente de uma perspectiva coevolutiva.

5 CONCLUSÃO

Finalmente, após a análise dos dados morfológicos e moleculares das espécies identificadas no estudo atual em comparação com espécies relacionadas registradas na literatura científica, *I. pichororei* é estabelecido como novo para a ciência, sendo a primeira descrição de Synallaxinae e a terceira descrição de Furnariidae. Além disso, esta é a primeira *Isospora* sp. da família hospedeira Furnariidae para ter uma suplementação molecular por sequenciamento de um locus do gene *cox1* do genoma mitocondrial.

Declaração de ética

As licenças de coleta de campo foram emitidas pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio, por meio do e Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO sob as licenças 45200, 54951 e 70132; e o Comitê de Ética Animal (Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA) da UFRRJ sob protocolo número 036/2014(IV), 008/2015 (IB), 6606250616(IV) e Universidade do Grande Rio (Universidade do Grande Rio – UNIGRANRIO) sob protocolo número 021/2019. As licenças de banding e anéis de metal foram emitidas pela CEMAVE /ICMBio (Senior Ringer: BPB, registro 5967850). Todas as diretrizes institucionais, nacionais e internacionais aplicáveis para o cuidado e uso de animais foram seguidas.

Financiamento

Este estudo foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Ensino Superior. Pessoal de Educação (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas - Sol de Nível Superior – CAPES) e Carlos Chagas Filho Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ). JLG - O e CN O - F possuem bolsas de estudos do CAPES (Número da Concessão/Prêmio: 001). MS O possui bolsa de pós-doutorado da FAPERJ (Número da Bolsa/Prêmio: E -26/204.228/2021). VM L possui bolsa da FAPERJ (Número da Bolsa/Prêmio: E -27/211.566/2021). BPB é bolsista do CNPq (Número da bolsa/Prêmio: 302345/2022 – 1) e da FAPERJ (Número da bolsa/Prêmio: E -26/200.565/2023).

REFERÊNCIAS

- BERTO, B. P.; LOPES, C. W. G. Coccidia of wild birds as ecological biomarkers: some approaches on parasite-host-environment interaction. **Journal of Parasitology**, v. 106, p. 707–713, 2020.
- BERTO, B. P.; MCINTOSH, D.; LOPES, C. W. G. Studies on coccidian oocysts (Apicomplexa: Eucoccidiorida). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, p. 1–15, 2014.
- BIRDLIFE International. **The IUCN Red List of Threatened Species**. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org>. Acesso em: 19 jun. 2024.
- BUSH, A. O.; LAFFERTY, K. D.; LOTZ, J. M.; SHOSTAK, A. W. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. **Journal of Parasitology**, v. 83, p. 575–583, 1997.
- DOLNIK, O. V. The relative stability of chronic. *Isospora sylvianthina* (Protozoa: Apicomplexa) infection in blackcaps (*Sylvia atricapilla*): evaluation of a simplified method of estimating isosporan infection intensity in passerine birds. **Parasitology Research**, v. 100, p. 155–160, 2006.
- DOLNIK, O. V.; PALINAUSKAS, V.; BENSCH, S. Individual oocysts of *Isospora* (Apicomplexa: Coccidia) parasites from avian feces: from photo to sequence. **Journal of Parasitology**, v. 95, p. 169–174, 2009.
- DUSZYNSKI, D. W. Biodiversity of the Coccidia (Apicomplexa: Conoidasida) in vertebrates: what we know, what we do not know, and what needs to be done. **Folia Parasitologica**, v. 68, n. 001, 2021.
- DUSZYNSKI, D. W.; WILBER, P. G. A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeriidae. **Journal of Parasitology**, v. 83, p. 333–336, 1997.
- ICMBIO. **Parque Nacional do Itatiaia**. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/parnaitatiaia>. Acesso em: 19 jun. 2024.
- ICZN. International Commission on Zoological Nomenclature, Amendment of articles 8, 9, 10, 21 and 78 of the international code of zoological nomenclature to expand and refine methods of publication. **Bulletin of Zoological Nomenclature**, v. 69, p. 161–169, 2012.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, p. 1547–1549, 2018.
- MCQUISTION, T. E.; BARBER, C. Y.; CAPPARELLA, A. P. *Isospora automoli*, a new coccidian parasite (Apicomplexa: Eimeriidae) from the buff-throated foliage-gleaner *Automolus ochrolaemus* and the olive-backed foliage-gleaner *A. infuscatus* from South America. **Systematic Parasitology**, v. 44, p. 73–75, 1999. DOI:
- MCQUISTION, T. E.; CAPPARELLA, A. P. Two new species of *Isospora* (Apicomplexa: Eimeriidae) from ovenbirds (Passeriformes: Furnariidae) of South America. **Transactions of the American Microscopical Society**, v. 113, p. 90–95, 1994. DOI:
- MELLO, D. J. M.; MELLO, G. J. M.; MALLET-RODRIGUES, F.; LIMA, L. M. **Aves do Sudeste do Brasil: Guia de Identificação**. Rio de Janeiro: Editora Irmãos Mello, 2020.
- ORTÚZAR-FERREIRA, C. N.; GENOVEZ-OLIVEIRA, J. L.; OLIVEIRA, M. S.; MELLO, E. R.; THODE-FILHO, S.; OLIVEIRA, Á. A.; LIMA, V. M.; FERREIRA, I.; BERTO, B. P. Description of *Isospora xenopsi* sp. n. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the bird genus *Xenops*

(*X. minutus*, *X. rutilans* and *X. tenuirostris*) in South America, with new geographic records of *Isospora ameivae* and *Eimeria* sp. from reptiles in Brazil. **Parasitology Research**, v. 123, n. 42, 2024.

ORTÚZAR-FERREIRA, C. N.; OLIVEIRA, M. S.; GENOVEZ-OLIVEIRA, J. L.; FRANCO, H. A.; THODE-FILHO, S.; CARDOZO, S. V.; BERTO, B. P. (2020). Coccidia of Columbiformes: a taxonomic review of its Eimeriidae species and *Eimeria columbinae* n. sp. from *Columbina talpacoti* (Temminck, 1809) from Brazil. **Parasitology Research**, v. 119, p. 267-281, 2020.

ORTÚZAR-FERREIRA, C. N.; OLIVEIRA, M. S.; ANDRADE, L. D. A. S.; MELLO, E. R.; LIMA, V. M.; BERTO, B. P. Molecular and statistical approaches to the delimitation of Eimeriidae species: a case of extreme polymorphism in eimerian oocysts from the plumbeous pigeon *Patagioenas plumbea* (Vieillot, 1818) (Columbiformes) in South America. **Parasitology Research**, v. 123, p. 42, 2024.

PACHECO, J. F.; SILVEIRA, L. F.; ALEIXO, A.; AGNE, C. E.; BENCKE, G. A.; BRAVO, G. A.; FIGUEIREDO, G. R. R.; CARRANO, E.; GUEDES, R. C.; CESARI, E.; FRANZ, I.; SCHUNCK, F.; PIACENTINI, V. Q. Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian ornithological records committee – second edition. **Ornithological Research**, v. 29, p. 94–105, 2021.

RIDGELY, R. S.; GWYNNE, J. A.; TUDOR, G.; ARGEL, M. **Aves do Brasil: Mata Atlântica do Sudeste**. São Paulo: Horizonte Geográfico, 2015.

RONQUIST, F.; TESLENKO, M.; VAN DER MARK, P.; AYRES, D. L.; DARLING, A.; HÖHNA, S.; LARGET, B.; LIU, L.; SUCHARD, M. A.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology**, v. 61, p. 539–542, 2012.

SICK, H. **Ornitologia Brasileira**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997.

SILVA-CARVALHO, L. M.; PASTURA, D. G.; RODRIGUES, M. B.; GOMES, J. V.; OLIVEIRA, M. S.; SIQUEIRA, P. B.; BERTO, B. P. *Isospora sagittulae* McQuistion & Capparella, 1992 (Apicomplexa: Eimeriidae) from antbirds (Passeriformes: Thamnophilidae) in the Amazon and Atlantic Forest of Brazil: with notes on its distribution and dispersion in the Neotropical region. **Parasitology research**, v. 117, p. 2635-2641, 2018.

SOUSA, A. E. B. A.; SERAFINI, P. P. **Manual de Anilhamento de Aves Silvestres**. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Aves Silvestres, 2020.

WILLIAMS, R. B.; THEBO, P.; MARSHALL, R. N.; MARSHALL, J. A. Coccidian oocysts as type specimens: long-term storage in aqueous potassium dichromate solution preserves DNA. **Systematic Parasitology**, v. 76, p. 69–76, 2010.

CAPÍTULO IV

DIVERSIDADE DE FUNGOS E COCCÍDIOS ISOLADOS DE AVES SILVESTRES DE DUAS FITOFISIONOMIAS DISTINTAS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

RESUMO

O Brasil se destaca globalmente pela sua riqueza avícola, com uma das maiores variedades de espécies de aves do mundo. Este estudo investigou a diversidade micológica e a presença de parasitas gastrointestinais em aves silvestres capturadas no Parque Nacional de Itatiaia e na Ilha de Marambaia, no Estado do Rio de Janeiro. Foram coletadas amostras de 136 aves no Parque Nacional de Itatiaia e 90 aves na Ilha de Marambaia. Os fungos filamentosos mais abundantemente identificados foram *Aspergillus* spp., *Mucor* spp., *Cladosporium* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e *Syncephalastrum* spp. Quanto aos parasitas gastrointestinais, aves da família Thraupidae apresentaram contagens de oocistos que variaram de negativo a 836 OoPD (oocistos por grama de fezes). Algumas famílias, como Tityridae, Fringillidae, Plathyrinchidae, Rhychocyclidae, Onychorhynchidae e Thamnophilidae, exibiram resultados negativos para a presença de oocistos, indicando ausência desses parasitas nas aves capturadas em Itatiaia. Por outro lado, famílias como Tyrannidae e Turdidae apresentaram uma maior presença de oocistos, especialmente na Ilha de Marambaia. Este estudo contribui para o entendimento da diversidade microbiana e parasitária em aves silvestres no sudeste do Brasil, além de destacar variações entre diferentes áreas geográficas e famílias de aves.

Palavras-chave: Passeriformes, micobiota, oocistos.

ABSTRACT

Brazil stands out globally for its bird wealth, with one of the largest varieties of bird species in the world. This study investigated the mycological diversity and the presence of gastrointestinal parasites in wild birds captured in the Itatiaia National Park and Marambaia Island, in the State of Rio de Janeiro. Samples were collected from 136 birds in Itatiaia National Park and 90 birds on Marambaia Island. The most abundantly identified filamentous fungi were *Aspergillus* spp., *Mucor* spp., *Cladosporium* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. and *Syncephalastrum* spp. As for gastrointestinal parasites, birds from the Thraupidae family presented oocyst counts that ranged from negative to 836 OoPD (oocysts per gram of feces). Some families, such as Tityridae, Fringillidae, Plathyrinchidae, Rhychocyclidae, Onychorhynchidae and Thamnophilidae, showed negative results for the presence of oocysts, indicating the absence of these parasites in birds captured in Itatiaia. On the other hand, families such as Tyrannidae and Turdidae showed a greater presence of oocysts, especially on Marambaia Island. This study contributes to the understanding of microbial and parasitic diversity in wild birds in southeastern Brazil, in addition to highlighting variations between different geographic areas and bird families.

Keywords: Passerines, mycobiota, oocysts.

1 INTRODUÇÃO

A diversidade avícola do Brasil é notável, colocando-o consistentemente entre os três países com uma maior variedade de espécies de aves em todo o mundo (Schweizer *et al.*, 2022). Esta riqueza ornitológica é especialmente destacada na Mata Atlântica, um bioma de floresta tropical que abrange vastas áreas ao longo das costas leste, nordeste, sudeste e sul do país. A Mata Atlântica é contemporânea como um dos cinco principais hotspots de biodiversidade do mundo, mas, lamentavelmente, menos de 8% de sua área original permanece intocada (Schweizer *et al.*, 2022).

As aves silvestres, que constituem essa riqueza biológica, são regularmente expostas a uma ampla gama de microrganismos, incluindo fungos, bactérias e parasitas gastrointestinais que podem ser generalistas ou específicas para cada hospedeiro. Esses parasitas apresentaram diversos ciclos de vida e níveis variados de patogenicidade, conforme demonstrado por Ortúzar-Ferreira *et al.*, (2020) e Oliveira *et al.*, (2022). A pesquisa das interações entre esses parasitas e seus hospedeiros é crucial para compreender uma série de processos ecológicos, evolutivos e comportamentais. Por exemplo, a presença de parasitas pode tornar os indivíduos mais suscetíveis a predadores e menos capazes de estabelecer territórios, como evidenciado por Cabral *et al.*, (2022).

Os impactos dos parasitas na sobrevivência e reprodução dos hospedeiros têm implicações não apenas na dinâmica populacional das aves, mas também na abundância relativa, estrutura da comunidade, dispersão e diversidade genética, como discutido por Ortúzar-Ferreira *et al.*, (2019). Portanto, a investigação da prevalência e densidade de coccídios, por exemplo, é de vital importância, especialmente em ambientes afetados pelas atividades humanas, como desmatamento para expansão agrícola e urbanização. Nessas áreas, as aves frequentemente enfrentam estresse devido às mudanças em seus habitats, tornando-as mais suscetíveis a infecções e colonizações por coccídios. Assim, os coccídios desempenham um papel crucial como biomarcadores de impactos ambientais, conforme evidenciado por Berto e Lopes (2020).

Além disso, é importante ressaltar que as aves desempenham um papel significativo como portadoras e dispersoras de diversos tipos de fungos. Esses fungos podem aderir às penas das aves, entrar em contato com substratos ou mesmo invadir órgãos internos, seguindo as vias aéreas e orais, antes de serem excretados nas fezes das aves. A maioria desses fungos ambientais são saprófitos, comumente encontrada em solos, serrapilheira, sementes e grãos, conforme observado por Howard (2003), Reding (2003) e Oliveira (2022).

Essas interações complexas entre aves e seus microrganismos, sejam parasitas ou

fungos, têm um impacto profundo não apenas na saúde e no comportamento das aves, mas também na ecologia e na biodiversidade dos ecossistemas que habitam. Assim o presente trabalho, teve como objetivo estabelecer uma comparação entre a densidade de coccídios e de fungos encontrados em aves silvestres do Parque Nacional do Itatiaia e na Ilha da Marambaia, no sudeste do Brasil.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Declaração de ética

Este estudo foi aprovado pelo 'Sistema de Autorização e Informação sobre Biodiversidade' do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (SISBIO/ICMBIO, licença 70132) e pelo Comitê de Ética Animal da Universidade do Grande

Rio, Campus Duque de Caxias (CEUA/ UNIGRANRIO, protocolo 021/2019). As licenças de anilhamento e anéis metálicos foram emitidas pelo Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Aves Silvestres (CEMAVE, Anilhador Sênior: BPB, registro 5967850).

2.2 Local de estudo e coleta de amostras.

Este estudo foi realizado ao longo da Travessia Ruy Braga no Parque Nacional de Itatiaia, uma área protegida com alto grau de vulnerabilidade, localizada na Serra da Mantiqueira, Sudeste do Brasil (22°26'17 "S; 44°37'33" W). As expedições foram realizadas nos meses de maio, junho e julho de 2021. As capturas ocorreram ao longo de 3 dias por mês, e foram utilizadas 10 redes de neblina, totalizando 180 metros, e permaneceram abertas das 5h às 17h, totalizando 12 horas diárias e 36 horas por mês. Foram capturadas 68 aves de diferentes espécies (Tabela 1).

Posteriormente, outro estudo foi realizado na Ilha de Marambaia, área protegida localizada no Estado do Rio de Janeiro, no Sudeste do Brasil (22°26'17"S; 44°37'33"W). As expedições foram realizadas nos meses de maio, junho e julho de 2021. As capturas ocorreram 3 dias por mês e foram utilizadas 10 redes de neblina, totalizando 180 metros, e permaneceram abertas das 5h às 17h, ou seja, 12 horas por dia e 36 horas por mês. Foram capturadas 45 aves de diferentes espécies (Tabela 2). As aves foram identificadas segundo Pacheco *et al.*, (2021).

Observação de coccídios: As amostras para observação da prevalência de coccídios das aves foram coletadas a partir do acondicionamento das aves em caixas individuais, onde obteve-se defecações isoladas que foram em seguida transferidas para tubos contendo solução de dicromato de potássio (2,5%). Posteriormente os tubos foram transportados para o Laboratório

de Biologia de Coccídeos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Janeiro (UFRRJ). As amostras foram incubadas em temperatura ambiente (25°C) por 10 dias ou até ~70% dos oocistos esporulados. Os oocistos foram isolados por flotação em solução saturada de açúcar de Sheather (gravidade específica: 1,20) e examinados microscopicamente usando a técnica descrita por Duszynski e Wilber (1997) e Berto *et al.*, (2014). Para todas as amostras foi avaliada a presença ou ausência de oocistos, além de sua densidade nas amostras positivas, por meio de quantificação por OoPD (Dolnik *et al.*, 2006).

Observação de fungos: Além do acondicionamento de defecções isoladas em solução de dicromato de potássio visando o desenvolvimento coccidiano, algumas defecções foram

acondicionadas diretamente em tubos de centrífuga esterilizados para recuperação de fungos. As penas (plumas e cauda) foram retiradas com pinça estéril e colocadas em envelopes de papel branco previamente esterilizados para eliminar a umidade, evitando assim o crescimento de fungos e/ou bactérias contaminantes. Todas as amostras foram devidamente etiquetadas, acondicionadas em bolsas térmicas e transportadas para o Laboratório de Micologia e Micotoxicologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Foram semeadas 5 a 10 mg de fezes em ágar Sabouraud (Difco) mais cloranfenicol e cada amostra foi incubada diretamente em placa de Petri (90x15 cm) a 28 °C por até 07 dias. (Simi *et al.*, 2019). Penas inteiras e cortadas foram semeadas em Ágar Mycosel® (Difco) e cada amostra foi incubada em placa de Petri a 28 °C por até 07 dias.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram coletadas 136 amostras de 68 aves silvestres capturadas no Parque Nacional do Itatiaia, que incluíram penas (n= 68) e fezes (n= 68) (Tabela 1). De cada amostra foi possível isolar uma ou mais colônias filamentosas, enquanto em outras não houve crescimento e, portanto, o número de fungos isolados não corresponde ao número total de amostras. De um total de 98 (63 nas fezes e 35 nas penas) fungos isolados, foram identificados 16 gêneros, conforme Tabela 1.

Da Ilha da Marambaia, foram coletadas 90 amostras de 45 aves silvestres capturadas, as quais incluíram penas (n= 45) e fezes (n= 45) (Tabela 2). De cada amostra foi possível isolar uma ou mais colônias filamentosas, enquanto em outras não houve crescimento e, portanto, o número de fungos isolados não corresponde ao número total de amostras. De um total de 68 fungos isolados (48 nas fezes e 20 nas penas), foram identificados 15 gêneros, conforme tabela 1.

Tabela 1. Espécies de aves, fungos por amostras, e oocistos por defecação (OoPD) no Parque Nacional do Itatiaia.

Família	Espécie	Fezes	Penas	Oopd
Thraupidae	<i>Cissopis leverianus</i> (Gmeli, 1788)	<i>Geotrichum</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp.	<i>Mucor</i> sp.	214
	<i>Saltator similis</i> (d'Orbigny & Lafresnaye, 1837)	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Mucor</i> sp. <i>Fusarium</i> sp.	95
	<i>Saltator fuliginosus</i> (Daudin, 1800)			negativo
	<i>Trichothraupis melanops</i> (Vieillot, 1818)	<i>Eurotium</i> sp.	<i>Aspergillus niger</i>	4
	<i>Tachyphonus coronatus</i> (Vieillot, 1818)		<i>Aspergillus niger</i>	50
	<i>Saltator fuliginosus</i>	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Mucor</i> sp.	1
	<i>Trichothraupis melanops</i>	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Mucor</i> sp.	15
	<i>Haplospiza unicolor</i> (Cabanis, 1851)	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Mucor</i> sp. <i>Fusarium</i> sp.	negativo
	<i>Tachyphonus coronatus</i>	<i>Eurotium</i> sp.	<i>Mucor</i> sp.	negativo
	<i>Microspingus lateralis</i> (Nordmann, 1835)	<i>Cladosporium</i> sp., <i>Mucor</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	<i>Mucor</i> sp.	26
	<i>Stephanophorus diadematus</i> (Temminck, 1823)	<i>Aspergillus</i> sp.		17
	<i>Tangara sayaca</i> (Linnaeus, 1766)	<i>Aspergillus</i> sp.		negativo
	<i>Stephanophorus diadematus</i>	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Lichtheimia</i> sp.	1
	<i>Saltator similis</i>	<i>Aspergillus</i> sp, <i>Aspergillus</i> sp <i>Cladosporium</i> sp.		162
	<i>Stephanophorus diadematus</i>	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Acremonium</i> sp.	45
	<i>Stephanophorus diadematus</i>	<i>Cladosporium</i> sp.		negativo
	<i>Stephanophorus diadematus</i>		<i>Mucor</i> sp.	110
	<i>Stephanophorus diadematus</i>		<i>Alternaria</i> sp	836
	<i>Stephanophorus diadematus</i>	<i>Cladosporium</i> sp.		57
	<i>Saltator similis</i>	<i>Cladosporium</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.		29
	<i>Thachyphonus coronatus</i>		<i>Chaysonilia</i> sp.	negativo
	<i>Tangara</i>	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.	negativo

	<i>desmarestis</i> (Vieillot 1819)			
	<i>Tangara desmarestis</i>	<i>Syncephalastrum</i> sp.		negativo
	<i>Tangara desmarestis</i>	<i>Syncephalastrum</i> sp.		negativo
	<i>Tangara desmaristis</i>	<i>Curvularia</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.		negativo
	<i>Stephanophorus diadematus</i>		<i>Cladosporium</i> sp.	68
	<i>Microspingus lateralis</i>	<i>Rhizopus</i> sp.		45
	<i>Saltator similis</i>	<i>Rhizopus</i> sp.		6
	<i>Trichothraupis melanops</i>	<i>Rhizopus</i> sp.		526
	<i>Microspingus lateralis</i>	<i>Rhizopus</i> sp.		2
Tyrannidae	<i>Neopelma chrysolophum</i> (Pinto, 1944)		<i>Chaetomium</i> sp.	negativo
	<i>Knipolegus cyanirostris</i> (Vieillot, 1818)	<i>Cladosporium</i> sp., <i>Mucor</i> sp.		negativo
	<i>Basileuterus culicivorus</i> (Deppe, 1830)	<i>Mucor</i> sp.		2
	<i>Myiothlypis leucoblephara</i> (Vieillot, 1817)	<i>Syncephalastrum</i> sp.	<i>Curvularia</i> sp., <i>Mucor</i> sp.	negativo
Parulidae	<i>Basileuterus culicivorus</i>	<i>Syncephalastrum</i> sp., <i>Mucor</i> sp.		negativo
	<i>Basileuterus culicivorus</i>			negativo
	<i>Myiothlypis leucoblephara</i>	<i>Cladosporium</i> sp.		19
	<i>Myiothlypis leucoblephara</i>			80
	<i>Myiothlypis leucoblephara</i>	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Cladosporium</i> sp., <i>Mucor</i> sp.	<i>Mucor</i> sp.	3
	<i>Chiroxiphia caudata</i> (Shaw & Nodder, 1793)			negativo
Pipridae	<i>Manacus manacus</i> (Linnaeus, 1766)		<i>Mucor</i> sp.	negativo
	<i>Chiroxiphia caudata</i>	<i>Cladosporium</i> sp.		negativo
	<i>Pyriglena leucoptera</i> (Vieillot, 1816)	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Neosartory</i> sp.	3
Thamnophilidae	<i>Thamnophilus caerulescens</i> (Vieillot, 1816)		<i>Lichtheimia</i> sp.	negativo
	<i>Thamnophilus caerulescens</i>	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Mucor</i> sp.		negativo
	<i>Thamnophilus caerulescens</i>	<i>Penicillium</i> sp.		3

	<i>Pyriglena leucoptera</i>		<i>Cladosporium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	negativo
	<i>Pyriglena leucoptera</i>			negativo
Passerellidae	<i>Zonotrichia capensis</i> (Statius Muller, 1776)	<i>Curvularia</i> sp. <i>Chaetomium</i> sp.	<i>Mucor</i> sp.	1
	<i>Zonotrichia capensis</i>		<i>Lichtheimia</i>	1
	<i>Zonotrichia capensis</i>		<i>Mucor</i> sp.	17
Onychorhynchidae	<i>Myiobius atricaudus</i> (Lawrence, 1863)	<i>Aspergillus</i> sp.		negativo
	<i>Myiobius atricaudus</i>	<i>Neosartory</i> sp.		negativo
Vireonidae	<i>Hylophilus poicilotis</i> (Temminck, 1822)		<i>Penicillium</i> sp.	negativo
	<i>Hylophilus poicilotis</i>	<i>Bipolaris</i> sp.		negativo
Furnariidae	<i>Anabacerthia amaurotis</i> (Temminck, 1823)		<i>Penicillium</i> sp.	negativo
	<i>Cranioleuca pallida</i> (Wied, 1831)	<i>Fusarium</i> sp. <i>Cladosporium</i> sp.		32
	<i>Anabazenops fuscus</i> (Vieillot, 1816)	<i>Aspergillus</i> sp.		negativo
	<i>Phylloscartes difficilis</i> (Ihering & Ihering, 1907)	<i>Mucor</i> sp.		negativo
Rhychocyclidae	<i>Phylloscartes difficilis</i>	<i>Curvularia</i> sp.		negativo
	<i>Phylloscartes difficilis</i>	<i>Mucor</i> sp.		negativo
	<i>Phylloscartes difficilis</i>	<i>Fusarium</i> sp.		negativo
	<i>Turdus flavipes</i> (Vieillot, 1818)	<i>Aspergillus</i> sp.		18
Plathyrrinchidae	<i>Platyrrinchus mystaceus</i> (Vieillot, 1818)			negativo
	<i>Platyrrinchus mystaceus</i>			negativo
Conopophagidae	<i>Conopophaga melanops</i> (Vieillot, 1818)	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp.		2
Dendrocolaptidae	<i>Sittasomus griseicapillus</i> (Vieillot, 1818)		<i>Lichtheimia</i> sp.	680
Tityridae	<i>Schiffornis virescens</i>	<i>Neosartory</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.	negativo

	(Lafresnaye, 1838)			
Fringillidae	<i>Euphonia pectoralis</i> (Latham, 1801)	<i>Eurotium</i> sp.	<i>Neosartory</i> sp.	negativo
	68	63	35	

Tabela 2. Espécies de aves, fungos por amostras, e oocistos por defecação (OoPD) na Ilha da Marambaia.

Family	Species	Feces	Feathers	Oopd
Tyrannidae	<i>Myiarchus ferox</i> (Gmelin, 1789)	<i>Fusarium</i> sp.		negativo
	<i>Myiarchus Ferox</i>	<i>Fusarium</i> sp.		negativo
	<i>Myiozetetes similis</i> (Spix, 1825)	<i>Fusarium</i> sp.		negativo
	<i>Myiarchus Ferox</i>	<i>Eurotium</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.		negativo
	<i>Myiarchus Ferox</i>	<i>Syncephalastrum</i> sp.		negativo
	<i>Myiarchus Ferox</i>	<i>Syncephalastrum</i> sp. <i>Fusarium</i> sp.		negativo
	<i>Myiarchus Ferox</i>	<i>Syncephalastrum</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.	negativo
	<i>Myiarchus ferox</i>	<i>Syncephalastrum</i> sp.	<i>Syncephalastrum</i> sp.	negativo
	<i>Myiarchus ferox</i>			negativo
	<i>Myiozetetes similis</i>	<i>Mucor</i> sp.		negativo
	<i>Myiozetetes similis</i>	<i>Mucor</i> sp.		1
	<i>Elaenia flavogaster</i> (Thunberg, 1822)	<i>Mucor</i> sp.		negativo
	<i>Myiarchus ferox</i>	<i>Penicillium</i> sp., <i>Pestalotia</i> sp.		negativo
	<i>Tyrannus melancholicus</i> Vieillot, 1819	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Syncephalastrum</i> sp.	negativo
	<i>Turdus rufiventris</i> Vieillot, 1818		<i>Cunninghamella</i> sp.	16
Turdidae	<i>Turdus rufiventris</i>	<i>Pestalotia</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.		negativo
	<i>Turdus rufiventris</i>	<i>Mucor</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp., <i>Geotricum</i> sp.	negativo
	<i>Turdus amaurochalinus</i> Cabanis, 1850	<i>Mucor</i> sp.		negativo
	<i>Turdus leucomelas</i> Vieillot, 1818	<i>Mucor</i> sp.		negativo
	<i>Turdus rufiventris</i>	<i>Syncephalastrum</i> sp.		negativo
	<i>Turdus leucomelas</i>	<i>Mucor</i> sp., <i>Syncephalastrum</i> sp.		negativo

	<i>Turdus leucomelas</i>	<i>Syncephalastrum</i> sp.	<i>Mucor</i> sp.	negativo
	<i>Leptotila verreauxi</i> Bonaparte, 1855		<i>Mucor</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Mucor</i> sp., <i>Rizophus</i> sp.	negativo
Columbidae	<i>Leptotila verreauxi</i>	<i>Acremonium</i> sp.		negativo
	<i>Columbina</i> <i>talpacoti</i> (Temminck, 1811)	<i>Rhizopus</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.	negativo
	<i>Leptotila verreauxi</i>			negativo
	<i>Leptotila rufaxilla</i> (Richard & Bernard, 1792)	<i>Fusarium</i> sp., <i>Paecilomyces</i> sp.		negativo
	<i>Leptotila verreauxi</i>	<i>Fusarium</i> sp.		negativo
	<i>Progne chalybea</i> (Gmelin, 1789)	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.	negativo
Hirundinidae	<i>Progne chalybea</i>	<i>Rhizopus</i> sp.		negativo
	<i>Progne chalybea</i>	<i>Mucor</i> sp.	<i>Aspergillus</i> sp.	negativo
	<i>Progne chalybea</i>		<i>Fusarium</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp.	negativo
	<i>Progne chalybea</i>		<i>Rhizopus</i> sp.	negativo
	<i>Progne chalybea</i>			negativo
Vireonidae	<i>Vireo chivi</i> (Vieillot, 1817)	<i>Eurotium</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.		17
	<i>Vireo chivi</i>	<i>Mucor</i> sp.		1
	<i>Vireo chivi</i>	<i>Curvularia</i> sp., <i>Mucor</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp.	85
	<i>Vireo chivi</i>	<i>Mucor</i> sp.		164
	<i>Vireo chivi</i>	<i>Mucor</i> sp.		76
	<i>Ramphocelus</i> <i>bresilia</i> (Linnaeus, 1766)	<i>Penicilium</i> sp.		negativo
Thraupidae	<i>Ramphocelus</i> <i>bresilia</i>	<i>Mucor</i> sp.		64
	<i>Ramphocelus</i> <i>bresilia</i>	<i>Acremonium</i> sp.		negativo
	<i>Thraupis</i> <i>palmarum</i> (Wied, 1821)	<i>Acremonium</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	<i>Curvularia</i> sp.	negativo
	<i>Chloroceryle</i> <i>americana</i> (Gmelin, 1788)	<i>Syncephalastrum</i> sp.		negativo
Icteridae	<i>Molothrus</i> <i>bonariensis</i> (Gmelin, 1789)	<i>Fusarium</i> sp.		30
Picidae	<i>Veniliornis</i> <i>maculifrons</i> (Spix, 1824)	<i>Neosartorya</i> sp.		negativo
Total	45	48	20	

As Tabela 1 e 2 contém uma correlação entre Família de aves capturadas, presença de diferentes fungos nas amostras e contagem de oocistos por defecação (OoPD). Uma análise

cruzada dos dados mencionados acima pode fornecer informações importantes para a saúde das aves, bem como para a ecologia e a qualidade do ambiente em que vivem. Isso poderia ser utilizado para a compreensão de padrões ecológicos, comportamentais e de saúde dessas espécies, além de apoiar medidas de conservação e manejo adequado de seus habitats.

O levantamento de fungos isolados das aves capturadas no Parque Nacional do Itatiaia (Tabela 1) revela que, algumas famílias, como Thraupidae, revelaram uma amostragem mais substancial em comparação com outras, onde a captura foi mais limitada, como Conopophagidae, Dendrocolaptidae, Tityridae e Fringillidae. Isso poderia ser devido à abundância, distribuição geográfica ou comportamento dessas aves (Schimitt; Edwards 2022). Observa-se uma similaridade entre o número de aves capturadas e a presença de fungos em suas fezes e penas. Em geral, famílias com um maior número de aves capturadas tendem a ter uma presença mais significativa de fungos tanto nas fezes quanto nas penas (Ortúzar- Ferreira *et al.*, 2019; Oliveira *et al.*, 2022). No entanto, essa relação não é diretamente proporcional em todos os casos. Por exemplo, Thraupidae tem o maior número de aves capturadas, mas não necessariamente a maior presença de fungos nas penas em comparação com outras famílias.

É interessante notar que, em várias famílias, a presença de fungos nas fezes é maior do que nas penas. Isso sugere que a dinâmica de contaminação por fungos pode ser mais prevalente no trato digestivo das aves do que em suas penas (Oliveira *et al.*, 2022). A diferença nos números pode estar relacionada a diversos fatores, como hábitos alimentares, interações e exposição a diferentes ambientes (Elliott *et al.*, 2029).

Cada família de aves parece ter sua própria dinâmica em relação à presença de fungos. Alguns têm um número significativo de fungos tanto nas fezes quanto nas penas, enquanto outros mostram uma presença mínima ou nula. Isso pode ser atribuído a uma série de fatores, como a fisiologia das aves, os hábitos de alimentação, as interações ecológicas e a exposição a diferentes ambientes (Berto; Lopes 2020).

A comparação dos resultados entre o OoPD entre diferentes famílias de aves capturadas na Tabela 1, revelam uma variação significativa na presença e na quantidade de oocistos entre as famílias. Algumas famílias e espécies apresentam contagens variadas de oocistos, por exemplo, a Família Dendrocolaptidae, representada pela espécie *Sittasomus griseicapillus*, mostrou uma contagem significativa de 680 oocistos por defecação, evidenciando uma alta presença destes parasitas nessa ave em específico. Além disso, há variações notáveis dentro das espécies. Por exemplo, *Stephanophorus diadematus*, uma espécie de *Thraupidae*, mostrou uma ampla gama de contagens de oocistos, variando de negativo a 836 OoPD. Isso sugere variações

marcantes na presença desses parasitas até mesmo entre indivíduos da mesma espécie. Em contrapartida, famílias como Tityridae, Fringillidae, Plathyrrinchidae, Rhychocyclidae, Onychorhynchidae, Thamnophilidae, e algumas espécies de outras famílias, mostraram resultados negativos, indicando ausência de oocistos nessas aves.

O levantamento de fungos isolados das aves capturadas Tabela 2, revela que, famílias como Tyrannidae e Turdidae têm uma amostra relativamente maior em comparação com outras, como Alcedinidae, Icteridae e Picidae. Isso pode ser indicativo de diferenças na abundância ou distribuição geográfica dessas aves.

A presença de fungos nas fezes e penas varia entre as diferentes famílias. Tyrannidae, por exemplo, mostra um resultado aparentemente positivo entre o número de aves capturadas, fungos nas fezes e fungos nas penas

Segundo Grond *et al.*, (2018), as discrepâncias nos resultados podem ser atribuídas a uma série de fatores, incluindo a biologia das aves, seus hábitos alimentares, interações sociais, e a exposição a diferentes ambientes. Os autores sugerem que a presença de fungos nas fezes e penas pode depender não apenas da captura da ave, mas também de fatores intrínsecos à biologia da espécie.

A presença de fungos em aves é uma variável importante do ponto de vista ecológico (De Oliveira *et al.*, 2022). Segundo Harman *et al.*, 2021, os fungos podem desempenhar papéis diversos, desde simbioses benéficos até patógenos prejudiciais. Entender como diferentes famílias de aves interagem com esses fungos pode fornecer insights sobre a dinâmica ecológica local e a saúde das populações de aves (Gupta; Dharmarajan, 2020).

A comparação dos resultados entre o número de oocistos por defecação entre diferentes famílias de aves capturadas na Tabela 2, revela padrões interessantes, por exemplo, a família Vireonidae mostra uma variação considerável na presença de oocistos, enquanto as famílias Tyrannidae, Turdidae e Columbidae apresentam principalmente resultados negativos. Essa variação pode estar relacionada a fatores genéticos, comportamentais ou ambientais específicos de cada família.

A espécie *Vireo chivi* se destaca por apresentar uma alta prevalência de oocistos, com números significativos em algumas amostras. Essa observação pode sugerir uma possível suscetibilidade ou interação mais intensa com o agente causador dos oocistos em comparação com outras espécies.

A variação nos números de oocistos pode ser influenciada por vários fatores, incluindo

a biologia, o comportamento, a dieta e até mesmo a localização geográfica das espécies de aves (Berto; Lopes, 2020). Por exemplo, diferenças na dieta e nos hábitos alimentares podem afetar a presença de oocistos, já que a infecção por parasitas, como coccídios, está frequentemente associada à ingestão de alimentos contaminados (Berto; Lopes, 2020).

Além disso, o número de oocistos pode estar relacionado à saúde das aves e à sua capacidade de resistir e combater infecções parasitárias (McGraw *et al.*, 2022). Algumas espécies podem ter sistemas imunológicos mais eficientes, resultando em uma menor carga de parasitas (McGraw *et al.*, 2022; Ruhs *et al.*, 2020).

A comparação entre o Parque Nacional do Itatiaia e a Ilha da Marambaia revela insights intrigantes sobre a presença e diversidade de fungos em aves silvestres nesses ecossistemas distintos. No decorrer do estudo, foi notado que o Parque Nacional do Itatiaia se destacou por sua amplitude de amostragem, totalizando 136 amostras, em comparação com as 90 amostras coletadas na Ilha da Marambaia.

Curiosamente, a distribuição de tipos de amostras, incluindo penas e fezes, mostrou-se equitativa em ambos os locais, indicando uma abordagem balanceada na coleta de dados. Contudo, ao analisar as amostras, ambas as localidades apresentaram um padrão interessante: algumas amostras revelaram colônias filamentosas, enquanto outras não evidenciaram crescimento de fungos, sugerindo uma variabilidade na colonização fúngica entre as aves e os ambientes.

Quanto aos resultados quantitativos, a Ilha da Marambaia apresentou um número total menor de fungos isolados, registrando 68 fungos, em comparação com os 98 fungos isolados no Parque Nacional do Itatiaia. Além disso, a análise da diversidade de gêneros de fungos, na Ilha da Marambaia foram identificados 15 gêneros, enquanto o Parque Nacional do Itatiaia revelou 16. Esses resultados destacam a importância de estudos comparativos em diferentes ecossistemas, fornecendo uma compreensão mais abrangente da dinâmica microbiológica em aves silvestres. Ainda há muito a ser explorado sobre a interação entre aves, fungos e seus ambientes, e essas descobertas contribuem significativamente para a compreensão mais profunda da ecologia dessas regiões específicas.

É crucial considerar que a presença de oocistos não deve ser interpretada isoladamente como um indicador definitivo da saúde ou condição geral das aves. É necessária uma compreensão mais abrangente, levando em conta fatores ambientais, comportamentais e de saúde geral das populações de aves para uma avaliação mais completa, bem como uma maior

amostragem de aves. Esses dados são importantes para estudos de parasitologia e ecologia das aves, fornecendo informações valiosas sobre a prevalência de infecções por coccídios em diferentes famílias de aves. A comparação entre as famílias destaca a diversidade nas respostas das aves à infecção por esses parasitas e pode ser útil para pesquisas futuras sobre a saúde e o manejo de populações de aves em ambientes naturais.

É crucial reconhecer as limitações desses dados, que oferecem uma visão superficial. Estudos mais aprofundados com um número mais de amostragem são necessários para investigar as razões por trás das variações observadas, incluindo análises genéticas dos fungos, estudos comportamentais das aves e consideração de fatores ambientais específicos.

O isolamento de diferentes tipos de fungos está relacionado a diferença da natureza do substrato (fezes e penas) das aves capturadas, o que pode ser indicativo da distribuição desses fungos no ambiente (De Oliveira *et al.*, 2022). A presença de gêneros fúngicos como *Aspergillus*, *Mucor*, *Fusarium*, entre outros, pode ter implicações significativas na saúde das aves (Titilayo *et al.*, 2023). Esses fungos podem causar doenças respiratórias, comprometendo o sistema imunológico e, em casos mais graves, levando à morte. As quantidades variadas de oocistos por defecação indicam a carga parasitária, o que também pode ser crucial para avaliar a saúde das aves e o potencial risco de disseminação de parasitas no ambiente (Titilayo *et al.*, 2023). Vale destacar que, não foram feitos estudos clínicos para verificar a saúde das aves capturadas.

Esses dados sugerem que a presença de fungos e coccídios em aves silvestres podem variar significativamente entre diferentes famílias e que a relação entre a captura das aves e a presença desses microrganismos depende de vários fatores. Estudos adicionais com uma maior amostragem seriam necessários para investigar mais a fundo as razões por trás dessas discrepâncias e para entender melhor a relação entre as aves, sua fisiologia e a presença de patógenos.

CONCLUSÃO

Em conclusão, os dados destacam a complexidade das interações entre aves, fungos e coccídios, ressaltando a necessidade de uma abordagem multidisciplinar para entender completamente essas relações ecológicas bem como uma maior amostragem de aves para estudo, sendo necessários mais coletas de dados nessas localidades. Levando em consideração que no PNI o número de aves capturadas foi maior que na Marambaia, o número de positivos tendem a ser maiores, sendo assim, outras pesquisas adicionais podem fornecer dados mais

precisos sobre o papel desses microrganismos na ecologia das aves e promover a conservação dessas populações.

REFERÊNCIAS

- BERTO, B. P.; LOPES, C. W. G. Coccidia of wild birds as ecological biomarkers: Some approaches on parasite-host-environment interaction. **The Journal of Parasitology**, v. 106, n.5, p. 707-713, 2020.
- CABRAL, R. B. G.; ORTÚZAR-FERREIRA, C. N.; OLIVEIRA, M. D. S.; DE MELLO, E. R.; DE OLIVEIRA, Á. A.; DE LIMA, V. M.; BERTO, B. P. Worldwide Dispersion of Coccidia from Migratory Birds: First Report of *Eimeria bazi* Chauhan et Bhatia, 1970 (Eimeriidae) Outside Asia from Buff-Necked Ibises *Theristicus caudatus* (Boddaert, 1783) (Threskiornithidae) in South America. **Acta Parasitologica**, v.67, n.3, p. 1343-1353, 2022.
- DE OLIVEIRA, J.; BONCI, M. M.; DOS SANTOS CONCEIÇÃO, A. B.; SILVA, L. G.; DE ASSIS BARONE F.; BERTO, B. P.; OLIVEIRA, Á. Fungi Isolated from Wild Birds and Litter in the Itatiaia National Park in Southeastern Brazil. **Biodiversidade Brasileira**, v. 12, n. 4, 2022.
- DOLNÍK, V. Capillary electrophoresis of proteins 2003–2005. **Electrophoresis**, v. 27, n. 1, p. 126-141, 2006.
- ELLIOTT, T. F.; JUSINO, M. A.; TRAPPE, J. M.; LEPP, H.; BALLARD, G. A.; BRUHL, J. J.; VERNES, K. A global review of the ecological significance of symbiotic associations between birds and fungi. **Fungal Diversity**, v. 98, n. 1, p. 161-194, 2019.
- GENOVEZ-OLIVEIRA, J. L.; ORTÚZAR-FERREIRA, C. N.; OLIVEIRA, M. S.; OLIVEIRA, A. A.; LIMA, V. M.; BERTO, B. P.. *Isospora pichororei* n. sp. (Chromista: Apicomplexa: Eimeriidae) from rufous-capped spinetails *Synallaxis ruficapilla* Vieillot, 1819 (Passeriformes: Furnariidae: Synallaxiinae) in South America. **Parasitology International**, v. 103, 2024.
- GROND, K.; SANDERCOCK, B. K.; JUMPPONEN, A.; ZEGLIN, L. H. The avian gut microbiota: community, physiology and function in wild birds. **Journal of Avian Biology**, v. 49, n. 11, p. 01-788, 2018.
- GUPTA, P.; ROBIN, V. V.; DHARMARAJAN, G. Towards a more healthy conservation paradigm: integrating disease and molecular ecology to aid biological conservation. **Journal of Genetics**, v. 99, n. 1, p. 65, 2020.
- HARMAN, G.; KHADKA, R.; DONI, F.; UPHOFF, N. Benefits to plant health and productivity from enhancing plant microbial symbionts. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, n. 6, p. 10-065, 2021.
- HOWARD, D.H. **Pathogenic fungi in humans and animals**. CRC Press. 2003.
- KRAISITUDOMSOOK, N.; HEALY, R. A.; SMITH, M. E. Molecular systematics and taxonomic overview of the bird's nest fungi (Nidulariaceae). **Fungal Biology**, v. 12, n. 5, p. 693-703, 2021.
- MCGRAW, K. J.; AGUIAR DE SOUZA PENHA, V.; DRAKE, D. J.; KRABERGER, S.; VARSANI, A. *Poxvirus* infection in house finches (*Haemorrhous mexicanus*): Genome sequence analysis and patterns of infection in wild birds. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 69, n. 5, p. 2318-2328, 2022.

- OLIVEIRA, M. S.; OLIVEIRA, J. L. G.; RODRIGUES, M. B.; SILVA-CARVALHO, L. M.; ANDRADE, L. S. A. S.; CARDOZO, S. V.; BERTO, B. P. *Isospora brasilatoae* spp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from thrushes *Turdus* spp. (Passeriformes: Turdidae) from Brazil. **Zootaxa**, v. 4555, n. 3, p. 433-440, 2019.
- PACHECO, J. F.; SILVEIRA, L. F.; ALEIXO, A.; AGNE, C. E.; BENCKE, G. A.; BRAVO, G. A. Q.; PIACENTINI, V. Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee - second edition. **Ornithology Research**, v. 29, p. 94-105, 2021.
- REDING, P. Fungal diseases. In: Samour J, editor. **Avian medicine**. Edinburgh, UK: Elsevier Science, p. 275–291, 2003.
- RUHS, E. C.; MARTIN, L. B.; DOWNS, C. J. The impacts of body mass on immune cell concentrations in birds. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 287, n. 1934, p. 202-655, 2020.
- SCHMITT, C. J.; EDWARDS, S. V. Passerine birds. **Current Biology**, v. 32, n. 20, p. 1149-1154, 2022.
- SCHWEIZER, D.; PETTER, G.; CESAR, R. G.; FERRAZ, S.; DE SOUZA MORENO, V.; BRANCALION, P. H.; BUGMANN, H. Natural forest regrowth under different land use intensities and landscape configurations in the Brazilian Atlantic Forest. **Forest Ecology and Management**, v. 508, 120012, 2022.
- SIMI, W. B.; LEITE-JR, D. P.; PAULA, C. R.; HOFFMANN-SANTOS, H. D.; TAKAHARA, D. T.; HAHN, R. C. Leveduras e fungos filamentosos em excretas de psittacideos e aves de rapina em cativeiro na região centro-oeste do Brasil: um risco potencial para a saúde humana. **Revista Brasileira de Biodiversidade**, v. 79, p. 414-422, 2019.
- TITILAYO, Y. R.; SESAN, L. W.; OYETAYO, O. E.; TAWAKALITU, A.; IDAYAT, D.; OMOLABAKE, A. A.; OLORUNDARE, T. M. Fungi Associated with the Crop of a Local Fowl: A Public Health Problem. **Asian Journal of Biology**, v. 19, n.1, p. 31-36, 2023.
- TITILAYO, Y. R.; SESAN, L. W.; OYETAYO, O. E.; TAWAKALITU, A.; IDAYAT, D.; OMOLABAKE, A.A.; OLORUNDARE, T. M. Fungi Associated with the Crop of a Local Fowl: A Public Health Problem. **Asian Journal of Biology**, v. 19, n. 1, p. 31-36 2023.

Objetivos concluídos

Os objetivos deste estudo foram alcançados com a avaliação da diversidade e distribuição de fungos e coccídios em amostras de aves silvestres e de serrapilheira em dois ambientes com fitofisionomias distintas no Estado do Rio de Janeiro: Ilha da Marambaia e Parque Nacional de Itatiaia. Especificamente, foi realizado o isolamento, cultivo e identificação de fungos da serrapilheira próxima aos locais de captura das aves silvestres; também foram isolados, cultivados e identificados fungos provenientes de amostras de penas e fezes das aves capturadas. Além disso, foram quantificados e identificados os oocistos presentes nas defecações das aves capturadas. Os dados morfológicos e moleculares das espécies

identificadas foram comparados com as espécies relacionadas descritas na literatura científica. Como resultado, a *Isoospora pichororei* foi estabelecida como uma nova espécie para a ciência, sendo a primeira descrição de um coccídio em aves da subfamília Synallaxinae e a terceira em Furnariidae. Este estudo também representa o primeiro registro de uma *Isoospora* sp. em hospedeiros da família Furnariidae a ser suplementado com dados moleculares por meio do sequenciamento de um *locus* do gene *cox1* do genoma mitocondrial. Por fim, a diversidade e distribuição dos fungos e coccídios das aves capturadas tanto na Ilha da Marambaia quanto no Parque Nacional de Itatiaia foram avaliadas, proporcionando uma base inicial para estudos futuros.

ANEXOS



UFRRJ
Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro

**Comissão de Ética no
Uso de Animais**
Instituto de Veterinária



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "TAXONOMIA E ECOLOGIA DE COCCÍDIOS DE AVES SILVESTRES DO SUDESTE BRASILEIRO", protocolada sob o CEUA nº 6606250616, sob a responsabilidade de **Bruno Pereira Berto** e equipe; *Irlane Faria de Pinho; Lidiane Maria da Silva; Mariana Borges Rodrigues; Hermes Ribeiro Luz* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) na reunião de 17/10/2016.

We certify that the proposal "TAXONOMY AND ECOLOGY OF COCCIDIA FROM WILD BIRDS FROM SOUTHEASTERN BRAZIL", utilizing 500 Birds (males and females), protocol number CEUA 6606250616, under the responsibility of **Bruno Pereira Berto and team; Irlane Faria de Pinho; Lidiane Maria da Silva; Mariana Borges Rodrigues; Hermes Ribeiro Luz** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Veterinary Institute of Rural Federal University of Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) in the meeting of 10/17/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **09/2016** a **08/2019**

Área: **Biologia Animal**

Origem: **Não aplicável biotério**

Espécie: **Aves**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **1 a 240 meses**

N: **500**

Linhagem: **não se aplica**

Peso: **10 a 10000 g**

Resumo: A Mata Atlântica é um dos biomas mais importantes para ser preservado na biodiversidade do planeta, sendo as regiões das baixadas do litoral do Sudeste brasileiro, onde está inserido o Estado do Rio de Janeiro, as mais prioritárias para conservação. A perda e fragmentação de habitats e a biopirataria são as principais ameaças, as quais, além dos impactos diretos a fauna, flora e microbiota, indiretamente favorecem a transmissão de parasitas e a susceptibilidade das aves. Neste contexto, surge a importância do conhecimento dos parasitas de aves silvestres, principalmente de alguns grupos pouco estudados, como os protozoários coccídios (Apicomplexa: Eucoccidiorida), os quais são de extrema importância, tanto em termos de biodiversidade, quanto em sua dinâmica e especificidade. Neste sentido, este projeto visa identificar e quantificar as espécies de coccídios de aves silvestres em áreas de Mata Atlântica do Estado do Rio de Janeiro, os quais fomentarão estudos complementares sobre a dinâmica do parasitismo entre famílias, hábitos, condições ambientais, etc. As expectativas são que os estudos dos oocistos revelem espécies novas, redescrições e novos hospedeiros, verificando a transmissão de coccídios entre aves de famílias distintas e possibilitando a elaboração de chaves dicotômicas de identificação. As distintas características ambientais e diferentes nichos ecológicos poderão influenciar na distribuição das espécies de coccídios, densidades e nas morfologia e morfometria dos oocistos. Desta forma, espécies distintas, padrões morfométricos e/ou morfológicos dos oocistos, e densidades serão associadas a cada condição ambiental, dado biométrico/biológico e nicho ecológico da ave hospedeira. Finalmente, as identificações e/ou elevadas densidades em determinada família, espécie ameaçada/endêmica ou aves em determinado ambiente poderão orientar ou priorizar a conservação de determinada ave e/ou localidade.

Local do experimento: **Ambiente Silvestre**

Seropédica, 17 de outubro de 2016



UFRRJ

Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro

**Comissão de Ética no
Uso de Animais**
Instituto de Veterinária



Fabio B. Scott

Prof. Dr. Fabio Barbour Scott

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro

J. P. P.

Prof. Dr. Jonimar Pereira Paiva

Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro



Rio de Janeiro, 30 de agosto de 2019

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que foi APROVADO o protocolo de número 021/2019 intitulado "TAXONOMIA E ECOLOGIA DE COCCÍDIOS: IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE ESPÉCIES EM AVES SILVESTRES DO SUDESTE BRASILEIRO", encaminhado pelo pesquisador Dr. Bruno Pereira Berto do Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Informamos que este parecer foi emitido em reunião ordinária da CEUA | UNIGRANRIO realizada no dia 28 de agosto de 2019, após avaliação do plenário da referida Comissão.

Vigência: Setembro/2019 a Agosto/2022
Atividade: Captura e coleta de amostras fecais
Número SISBIO: 42798-2
Grupo animal: Aves silvestres (várias espécies)

DECLARATION OF APPROVAL

We hereby declare that protocol number 021/2019 entitled "TAXONOMY AND ECOLOGY OF COCCIDIANS: MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF SPECIES IN WILD BIRDS IN SOUTHEASTERN BRAZIL" has been APPROVED. This protocol was sent by Dr. Bruno Pereira Berto, Department of Animal Biology, Federal Rural University of Rio de Janeiro (UFRRJ). Please be informed that this opinion was delivered at the regular meeting of CEUA | UNIGRANRIO held on August 28, 2019, after evaluation by the plenary of that Committee.

Sergian Vianna Cardozo
Coordenador CEUA | UNIGRANRIO

Prof. Sergian V. Cardozo
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais
UNIGRANRIO



Número: 70132-6	Data da Emissão: 08/11/2021 18:11:24	Data da Revalidação*: 01/10/2022
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividade projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Nome: Bruno Pereira Berto	CPF: 103.532.617-50
Título do Projeto: TAXONOMIA E ECOLOGIA DE COCCÍDIOS: IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE ESPÉCIES EM AVES SILVESTRES DO SUDESTE BRASILEIRO	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 29.427.465/0001-05

SISBIO

Dados do titular

Cronograma de atividades

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	Mariana de Souza Oliveira	Bióloga (Doutoranda PPGBA)	152.850.237-00	Brasileira
2	Carlos Nei Ortúzar Ferreira	Bolsista IC (Discente de Graduação de Veterinária)	028.349.762-95	Brasileira
3	Jhon Lennon Genovez de Oliveira	Biólogo (Mestrando PPGBA)	142.851.307-85	Brasileira
4	Lucas de Assis Silva Andrade	Biólogo (Doutorando PPGBA)	147.520.527-92	Brasileira
5	Carla Maronezi	Veterinária	316.357.128-07	Brasileira
6	Sergian Vianna Cardozo	Veterinário (Professor UNIGRANRIO)	082.157.777-83	Brasileira
7	Ericson Ramos de Mello	Biólogo (Doutorando PPGCV)	113.246.467-64	Brasileira

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Publicação em periódicos e trabalhos de congressos	02/2020	09/2022
2	Levantamento bibliográfico	09/2019	09/2022
3	Estudo estatístico	09/2020	09/2022
4	Identificação morfológica e molecular	10/2019	09/2022
5	Captura de aves e coleta de amostras	09/2019	09/2022
6	Processamento das amostras	10/2019	09/2022

Equipe

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

Autorização para atividades com finalidade

Número: 70132-6	Data da Emissão: 08/11/2021 18:11:24	Data da Revalidação*: 01/10/2022
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Nome: Bruno Pereira Berto	CPF: 103.532.617-50
Título do Projeto: TAXONOMIA E ECOLOGIA DE COCCÍDIOS: IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE ESPÉCIES EM AVES SILVESTRES DO SUDESTE BRASILEIRO	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 29.427.465/0001-05

SISBIO

Dados do titular

Observações e ressalvas

1	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
2	Este documento NÃO exime o pesquisador titular da necessidade de atender ao disposto na Instrução Normativa Ibama nº 27/2002, que regulamenta o Sistema Nacional de Anilhamento de Aves Silvestres.
3	Deve-se observar as as recomendações de prevenção contra a COVID-19 das autoridades sanitárias locais e das Unidades de Conservação a serem acessadas.
4	Esta autorização NÃO libera o uso da substância com potencial agrotóxico e/ou inseticida e NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de atender às exigências e obter as autorizações previstas em outros instrumentos legais relativos ao registro de agrotóxicos (Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, entre outros).
5	Esta autorização NÃO libera o uso da substância com potencial agrotóxico e/ou inseticida e NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de atender às exigências e obter as autorizações previstas em outros instrumentos legais relativos ao registro de agrotóxicos (Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, entre outros).
6	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
7	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
8	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
9	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.

10	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infraestrutura da unidade.
11	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
Número: 70132-6 Data da Emissão: 08/11/2021 18:11:24 Data da Revalidação*: 01/10/2022	
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.	

Nome: Bruno Pereira Berto	CPF: 103.532.617-50
Título do Projeto: TAXONOMIA E ECOLOGIA DE COCCÍDIOS: IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE ESPÉCIES EM AVES SILVESTRES DO SUDESTE BRASILEIRO	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 29.427.465/0001-05

SISBIO

Dados do titular

Observações e ressalvas

12	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
----	---

Outras ressalvas

1	<p>1. Esta autorização não exige seu titular da necessidade de atender ao disposto na Instrução Normativa Ibama nº 27/2002, que regulamenta o Sistema Nacional de Anilhamento de Aves Silvestres. É obrigatório ao pesquisador portar autorização de anilhamento durante as expedições de campo que envolvam essa atividade.</p> <p>2. O intervalo máximo de tempo para a vistoria de cada rede não pode ultrapassar 20 minutos, se a área for ensolarada. Caso a área seja bem sombreada, os intervalos devem ser de 45 minutos, no máximo, de modo a evitar maior estresse aos animais.</p> <p>3. O número máximo de redes armadas não deve ultrapassar 10 unidades para cada vistoriador experiente presente.</p>	CEMAVE Cabedelo-PB
2	<p>- Comunicar ao PARNA S. Bocaina, com antecedência de 15 dias, quando serão feitas coletas/registros/amostragens de dados e informações no interior do Parque e em que localidade; e para solicitar apoio/alojamento, entrar em contato com o Parque com 03 semanas de antecedência.</p> <p>- Encaminhar listagem com a localização georreferenciada dos táxons ou dados coletados/registrados no PARNA S. Bocaina, indicando data das coletas/registros.</p> <p>- Encaminhar ao PARNA S. Bocaina cópia (física ou digital) das publicações decorrentes desta pesquisa, com endereço na rede mundial de computadores de onde podem ser encontradas.</p> <p>- Solicita-se a disponibilização de imagens registradas a fim de serem utilizadas em atividades do PARNA S. Bocaina, garantindo-se a indicação da autoria na veiculação.</p> <p>Todas as informações solicitadas e publicações resultantes da execução do projeto no interior do PARNA S. Bocaina deverão ser encaminhadas por meio eletrônico para: pesquisa.pnbocaina@icmbio.gov.br</p>	PARNA da Serra da Bocaina

3	<ul style="list-style-type: none"> - Em qualquer trilha utilizada durante a realização da pesquisa o pesquisador deverá fixar uma fita em uma árvore contendo o número da pesquisa no SISBIO; - Ao final da pesquisa o pesquisador deverá remover todas as fitas colocadas nas trilhas e outros objetos colocados em meio à floresta; - Todos os pontos, áreas e/ou caminhos de pesquisas deverão ser georreferenciados e os arquivos espaciais deverão ser fornecidos à equipe da REBIO União, por email (rebiouniao@gmail.com). Neste caso, o pesquisador deverá fornecer o arquivo georreferenciado do local onde as câmeras serão colocadas, bem como as trilhas de acesso a elas; - Caso o pesquisador não identifique as trilhas utilizadas e forneça os arquivos espaciais das áreas de pesquisas, a pesquisa poderá ser suspensa no SISBIO e as marcações ou objetos das pesquisas serem retirados da mata; - Em todas os trabalhos de campo na REBIO União a equipe de pesquisa deverá comunicar previamente à gestão da UC em quais locais andará durante a permanência na UC. 	REBIO União
---	---	-------------



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Dados do titular

Nome: Bruno Pereira Berto	CPF: 103.532.617-50
Título do Projeto: TAXONOMIA E ECOLOGIA DE COCCÍDIOS: IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE ESPÉCIES EM AVES SILVESTRES DO SUDESTE BRASILEIRO	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 29.427.465/0001-05

Número: 70132-6	Data da Emissão: 08/11/2021 18:11:24	Data da Revalidação*: 01/10/2022
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

SISBIO

Outras ressalvas

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Nome: Bruno Pereira Berto	CPF: 103.532.617-50
Título do Projeto: TAXONOMIA E ECOLOGIA DE COCCÍDIOS: IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE ESPÉCIES EM AVES SILVESTRES DO SUDESTE BRASILEIRO	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 29.427.465/0001-05

Dados do titular

SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

4	<p>"Ressalvas do PARQUE NACIONAL DA SERRA DOS ÓRGÃOS:</p> <p>COVID-19: O pesquisador somente poderá realizar atividade de campo após o término do estado de emergência devido à COVID - 19, assim declarado por ato da autoridade competente. Recomendamos a leitura do Guia Elaborado pelo ICMBIO , Biodiversidade e COVID19 através do link: https://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/comunicacao/publicacoes/publicacoes-diversas/recomendacoes_biodiversidade_e_covid19_ucs_e_outros_ambientes_naturais.pdf</p> <p>CONTATO PRÉVIO: dado o grande número de pesquisas em curso no Parque, a grande sobreposição espacial das mesmas e a potencial sobreposição nos focos de coleta de dados, sugerimos que a/o titular da autorização faça contato prévio <pesquisa.parnaso@icmbio.gov.br>, assim que recebê-la. Isso visa minimizar perda de tempo durante as expedições de campo e um melhor planejamento espacial da coleta de dados, evitando todas as possíveis interferências mútuas.</p> <p>AGENDAMENTO CAMPO / USO DE ESTRUTURAS: mensagem para < alojamento.icmbioteresopolis@icmbio.gov.br> com 15 dias antecedência. Informar nº autorização, total pessoas, datas (chegada e saída), necessidade ou não de alojamento, laboratório, salas etc.</p> <p>ATIVIDADES DIDÁTICAS: os locais de coleta devem ser informados para a Coordenação de Pesquisa do PARNASO de forma que não se sobreponham com outras pesquisas em andamento no Parque. Não está autorizada a coleta de espécimes da fauna e flora ameaçadas de extinção para atividades didáticas.</p> <p>ALTERAÇÕES EM CAMPO: devem ser discretas e no relatório final deve constar que ""todo o material da pesquisa foi retirado?.</p> <p>REGISTROS DE ESPÉCIES DE INTERESSE PARA A CONSERVAÇÃO (ex: ameaçadas, novos táxons, interesse comercial, cinético etc.) localizados em áreas de visitação devem ser informados à gestão do Parque para privilegiar sua proteção.</p> <p>PESSOAS E ATIVIDADES ESTRANHAS (ex: caçadores, visitantes fora da área adequada etc.): devem ser reportadas imediatamente à gestão do Parque (Chefia ou Coordenação de Pesquisa).</p> <p>UTILIZAÇÃO DE MÁQUINAS/MOTORES: devem ser feitos todos os esforços para minimizar a poluição visual e sonora. Não é permitido o uso de motores que derramem, mesmo que em quantidades pequenas, combustível ou óleo.</p> <p>PROCESSAMENTO/ARMAZENAMENTO DE MATERIAL: todo o material de coleta deve ser processado ou em campo ou no laboratório, jamais no alojamento, auditório ou refeitório! Materiais que exalem odores ou que obstruam passagem ou locais de assento devem ser retirados imediatamente e não podem ser armazenados também do lado de fora das estruturas por conta do</p>
---	--



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Est pod Cód	acesso de animais nativos que circulam (ex: quatis, primatas, serpentes, artrópodes). Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação, poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio Código de autenticação: 0701320620211108	cação abaixo, qualquer cidadão Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio). Página 5/9			
<table><tr><td>Número: 70132-6</td><td>Data da Emissão: 08/11/2021 18:11:24</td><td>Data da Revalidação*: 01/10/2022</td></tr></table>			Número: 70132-6	Data da Emissão: 08/11/2021 18:11:24	Data da Revalidação*: 01/10/2022
Número: 70132-6	Data da Emissão: 08/11/2021 18:11:24	Data da Revalidação*: 01/10/2022			
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.					



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Nome: Bruno Pereira Berto		CPF: 103.532.617-50
Título do Projeto: TAXONOMIA E ECOLOGIA DE COCCÍDIOS: IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE ESPÉCIES EM AVES SILVESTRES DO SUDESTE BRASILEIRO		
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO		CNPJ: 29.427.465/0001-05
Número: 70132-6	Data da Emissão: 08/11/2021 18:11:24	Data da Revalidação*: 01/10/2022
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

SISBIO

ANIMAIS CAPTURADOS/COLETADOS: O manejo de animais vivos ou mortos devem ser evitados em áreas de visitação/turismo. Só deve ser feito em campo (área sem visitação) ou no laboratório de apoio do Parque.

PLANTAS COLETADAS: duplicatas devem ser depositadas no JBRJ e no Herbário do PARNASO (conforme Plano de Manejo, mas recomenda-se antes consultar Coordenação de Pesquisa do Parque).

DEFESA PÚBLICAS: solicitamos que todas as defesas públicas (graduação, especialização, mestrado e doutorado, além de apresentações em eventos) relacionadas a esta autorização sejam, quando possível, comunicadas à gestão do Parque para que gestores possam conhecer os debates acerca dos dados que estão sendo produzidos pelas pesquisas feitas no

PARNASO. Pedimos que as mensagens sejam enviadas para: pesquisa.parnaso@icmbio.gov.br, parnasos@icmbio.gov.br"



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 70132-6	Data da Emissão: 08/11/2021 18:11:24	Data da Revalidação*: 01/10/2022
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Nome: Bruno Pereira Berto	CPF: 103.532.617-50
Título do Projeto: TAXONOMIA E ECOLOGIA DE COCCÍDIOS: IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE ESPÉCIES EM AVES SILVESTRES DO SUDESTE BRASILEIRO	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 29.427.465/0001-05

SISBIO

Dados do titular

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Município-UF	Bioma	Caverna?	Tipo
1	Ilha da Marambaia	Mangaratiba-RJ	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal
2	Condomínio Parque das Águas	Guapimirim-RJ	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal
3	Fragmentos de Mata Atlântica no distrito de Cacaria	Pirai-RJ	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal
4	Área de Relevante Interesse Ecológico Floresta da Cicuta	Volta Redonda-RJ	Mata Atlântica	Não	Dentro de UC Estadual
5	RPPN Reserva Porangaba	Itaguaí-RJ	Mata Atlântica	Não	Dentro de UC Estadual
6	Parque Nacional da Serra da Bocaina	RJ	Mata Atlântica	Não	Dentro de UC Federal
7	Campus IFRJ Pinheiral	Pinheiral-RJ	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal
8	Fragmentos de Mata Atlântica no distrito de Santa Rita de Cássia	Barra Mansa-RJ	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal
9	Floresta Nacional Mario Xavier	Seropédica-RJ	Mata Atlântica	Não	Dentro de UC Estadual
10	Campus UFRRJ Seropédica	Rio de Janeiro-RJ	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal
11	Parque Nacional da Serra dos Órgãos	RJ	Mata Atlântica	Não	Dentro de UC Federal
12	Parque Nacional do Itatiaia	RJ	Mata Atlântica	Não	Dentro de UC Federal

Atividades

#	Atividade	Grupo de Atividade
1	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Fora de UC Federal

Autorização para atividades com finalidade científica

2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Dentro de UC Federal
3	Captura de animais silvestres in situ	Fora de UC Federal
4	Captura de animais silvestres in situ	Dentro de UC Federal
5	Marcação de animais silvestres in situ	Fora de UC Federal
6	Marcação de animais silvestres in situ	Dentro de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtde.
1	Marcação de animais silvestres in situ	Aves	-
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Aves	-
3	Captura de animais silvestres in situ	Aves	-

A quantidade prevista só é obrigatória para atividades do tipo "Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ". Essa quantidade abrange uma porção territorial mínima, que pode ser uma Unidade de Conservação Federal ou um Município.

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

Autorização para atividades com finalidade

Número: 70132-6	Data da Emissão: 08/11/2021 18:11:24	Data da Revalidação*: 01/10/2022
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Nome: Bruno Pereira Berto	CPF: 103.532.617-50
Título do Projeto: TAXONOMIA E ECOLOGIA DE COCCÍDIOS: IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE ESPÉCIES EM AVES SILVESTRES DO SUDESTE BRASILEIRO	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 29.427.465/0001-05

SISBIO

Dados do titular

A quantidade significa: por espécie X localidade X ano.

Materiais e Métodos

Autorização para atividades com finalidade científica

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
1	Amostras biológicas (Aves)	Ectoparasita, Fezes, Penas
2	Método de captura/coleta (Aves)	Rede de neblina
3	Método de marcação (Aves)	Anilha de Alumínio (padrão CEMAVE), Anilha metálica (padrão CEMAVE)

Destino do material biológico coletado

	Nome local destino	Tipo destino
1	UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	Laboratório
Número: 70132-6		Data da Emissão: 08/11/2021 18:11:24
		Data da Revalidação*: 01/10/2022
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Nome: Bruno Pereira Berto	CPF: 103.532.617-50
Título do Projeto: TAXONOMIA E ECOLOGIA DE COCCÍDIOS: IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE ESPÉCIES EM AVES SILVESTRES DO SUDESTE BRASILEIRO	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 29.427.465/0001-05

SISBIO

Dados do titular

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de Amostra	Qtde.	Data



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

* Identificar o espécime do nível taxonômico possível.



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Nome: Bruno Pereira Berto	CPF: 103.532.617-50
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 29.427.465/0001-05
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.	

SISBIO

Dados do titular

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Processamento das amostras	08/2016	07/2019
2	Estudo estatístico	10/2016	07/2019
3	Captura de aves e coleta de amostras	07/2016	06/2019
4	Publicação em periódicos e trabalhos de congressos	11/2016	07/2019
5	Identificação dos coccídios	09/2016	07/2019

Observações e ressalvas

1	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
2	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
3	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
4	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.	
5	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
6	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
7	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .

Nome: Bruno Pereira Berto	CPF: 103.532.617-50
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 29.427.465/0001-05

SISBIO

Dados do titular

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Município-UF	Bioma	Caverna?	Tipo
1	Parque Nacional do Itatiaia	RJ	Mata Atlântica	Não	Dentro de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtde.
1	Captura de animais silvestres in situ	Aves	-
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Aves	-

Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
---	-----------------------------------	-----------



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		
1	Amostras biológicas (Aves)	Fezes
2	Método de captura/coleta (Aves)	Rede de neblina

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1	UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	Coleção

Nome: Bruno Pereira Berto	CPF: 103.532.617-50
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL R U R A L DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 29.427.465/0001-05

SISBIO

Dados do titular

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de Amostra	Qtde.	Data



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

* Identificar o espécime do nível taxonômico possível.



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

zoológico

Licença permanente para coleta de material

Número: 42798-4	Data da Emissão: 29/06/2020 17:35:50	Data da Revalidação*: 01/04/2021
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Nome: Bruno Pereira Berto	CPF: 103.532.617-50
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 29.427.465/0001-05

SISBIO

Dados do titular

Observações e ressalvas

1	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
2	O pesquisador somente poderá realizar atividade de campo após o término do estado de emergência devido à COVID-19, assim declarado por ato da autoridade competente.
3	A licença permanente não é válida para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) manutenção de espécimes de fauna silvestre em cativeiro; c) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e d) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna. A restrição prevista no item d) não se aplica às categorias Reserva Particular do Patrimônio Natural e Área de Proteção Ambiental constituídas por terras privadas.
4	Esta licença permanente não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais ou esportivos ou para realização de atividades integrantes do processo de licenciamento ambiental de empreendimentos.
5	Esta licença permanente NÃO exime o pesquisador titular da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
8	A licença permanente será válida enquanto durar o vínculo empregatício do pesquisador com a instituição científica a qual ele estava vinculado por ocasião da solicitação.

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

zoológico

9	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
10	O pesquisador titular da licença permanente, quando acompanhado, deverá registrar a expedição de campo no Sisbio e informar o nome e CPF dos membros da sua equipe, bem como dados da expedição, que constarão no comprovante de registro de expedição para eventual apresentação à fiscalização;
11	O titular da licença permanente deverá apresentar, anualmente, relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias após o aniversário de emissão da licença permanente.
12	O pesquisador titular da licença permanente será responsável pelos atos dos membros da equipe (quando for o caso)
13	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
14	Este documento NÃO exime o pesquisador titular da necessidade de atender ao disposto na Instrução Normativa Ibama nº 27/2002, que regulamenta o Sistema Nacional de Anilhamento de Aves Silvestres.

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

Licença permanente para coleta de material

Número: 42798-4	Data da Emissão: 29/06/2020 17:35:50	Data da Revalidação*: 01/04/2021
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Nome: Bruno Pereira Berto	CPF: 103.532.617-50
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 29.427.465/0001-05

SISBIO

Dados do titular

Outras ressalvas

1	No caso do uso simultâneo de mais de 10 redes de neblina, o pesquisador deverá estar acompanhado de ao menos uma pessoa experiente na manipulação de aves, a fim de conseguir revisar todas as redes em intervalos menores que 30 minutos.	CEMAVE Cabedelo-PB
---	--	--------------------

Atividades

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

zoológico

#	Atividade	Grupo de Atividade
1	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Fora de UC Federal
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Fora de UC Federal
3	Captura de animais silvestres in situ	Fora de UC Federal
4	Marcação de animais silvestres in situ	Fora de UC Federal

Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	Classe	Animalia > Chordata > Aves

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1	UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	Coleção

Licença permanente para coleta de material

Número: 42798-4	Data da Emissão: 29/06/2020 17:35:50	Data da Revalidação*: 01/04/2021
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Nome: Bruno Pereira Berto	CPF: 103.532.617-50
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL R U R A L DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 29.427.465/0001-05

SISBIO

Dados do titular

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).



zoológico

transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de Amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime do nível taxonômico possível.

Fungi Isolated from Wild Birds and Litter in the Itatiaia National Park in Southeastern Brazil

Jhon Lennon Genovez de Oliveira¹, Mário Mendes Bonci², Ana Beatriz da Silva Conceição¹, Louise Gabriela Silva³, Francisco

de Assis Baroni¹, Bruno Pereira Berto¹ & Águida Aparecida de Oliveira¹

Recebido em 04/05/2022 – Aceito em 18/07/2022

¹ Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro/UFRJ, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Seropédica/RJ, Brasil, CEP: 23.897-000. <jhongenovezoliveira30@gmail.com, anabia.sc@gmail.com, baronimicol@gmail.com, bertobp@ufrj.br, aguidaoliveira@gmail.com>.

² Universidade de São Paulo/USP, Instituto de Odontologia, Butantã, São Paulo/SP, Brasil. CEP: 05.508-000. <mariobonci@gmail.com>.

³ Centro Universitário Univeritas, Flamengo/RJ, Brasil. CEP: 22.230-060. <louiseg.sc@gmail.com>.

ABSTRACT – In Brazil, the Atlantic Forest has suffered from deforestation, which has caused impacts on its flora, fauna, and microbiota. This biome is considered one of the main tourist and birdwatching destinations due to the large number of species, especially Passeriformes. However, the fungal diversity present in these environments is little known and studied. In this work, a total of 148 samples from 74 wild birds (74 feathers and 74 feces) and 16 samples of litter were collected in Itatiaia National Park, southeastern Brazil. Filamentous fungi isolated from these samples were identified using macroscopic and microscopic characteristics. Among birds, *Aspergillus* spp., *Mucor* spp., *Cladosporium* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. and *Syncephalastrum* spp. were identified in higher abundance. In litter, *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. and *Penicillium* spp. were identified. These results indicate the presence of saprophytic fungi species in the feathers and feces of wild birds and in the litter of the capture site. Further studies should be conducted in order to elucidate if the mycobiota profile modifies with anthropization and if it interferes with bird health and environmental recovery.

Keywords: Passerines; microbiota; environment.

Fungos Isolados de Aves Silvestres e Serrapilheira no Parque Nacional do Itatiaia no Sudeste do Brasil

RESUMO – No Brasil, a Mata Atlântica tem sofrido com desmatamento, que vem causando impactos na sua flora, fauna e microbiota. Esse bioma é considerado um dos principais destinos turísticos e de observação de aves, devido ao grande número de espécies, sobretudo Passeriformes. Entretanto, a diversidade fúngica presente nesses ambientes é pouco estudada e conhecida. Neste trabalho, 148 amostras de 74 aves silvestres (74 de penas e 74 de fezes) e 16 amostras de serrapilheira foram coletadas no Parque Nacional do Itatiaia, no sudeste brasileiro. Fungos filamentosos isolados dessas amostras foram identificados utilizando características macroscópicas e microscópicas. Entre as aves, *Aspergillus* spp., *Mucor* spp., *Cladosporium* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e *Syncephalastrum* spp. foram identificados em maior abundância. Em serrapilheira, *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. foram identificados. Esses resultados indicam a presença de espécies de fungos saprófitas nas penas e nas fezes de aves silvestres e na serrapilheira do local de captura. Mais estudos devem ser realizados a fim de elucidar modificações no perfil da micobiota com a antropização e sua interferência na saúde das aves e recuperação ambiental.



Palavras-chave: Passeriformes; microbiota; meio ambiente.

Hongos Aislados de Aves Silvestres y Arpillera en el Parque Nacional de Itatiaia en el Sureste de Brasil

RESUMEN – En Brasil, la Mata Atlántica ha sufrido por la deforestación, lo que ha causado impactos en su flora, fauna y microbiota. Este bioma es considerado uno de los principales destinos turísticos y de observación de aves debido a la gran cantidad de especies, principalmente Passeriformes. Sin embargo, la diversidad fúngica presente en estos ambientes es poco conocida y estudiada. En este

2

trabajo, se recolectaron un total de 148 muestras de 74 aves silvestres (74 plumas y 74 heces) y 16 muestras de hojarasca en el Parque Nacional Itatiaia, en el sureste de Brasil. Los hongos filamentosos aislados de estas muestras se identificaron utilizando características macroscópicas y microscópicas. Entre las aves, *Aspergillus* spp., *Mucor* spp., *Cladosporium* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. y *Syncephalastrum* spp., se identificaron en mayor abundancia. En la hojarasca, *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. y *Penicillium* spp. fueron identificados. Estos resultados indican la presencia de especies de hongos saprofitos en las plumas y heces de las aves silvestres y en la hojarasca del sitio de captura. Se deben realizar más estudios para dilucidar los cambios en el perfil de la microbiota con la antropización y su interferencia en la salud de las aves y la recuperación ambiental.

Palabras clave: Paseriformes; microbiota; ambiente.

Introduction

The Atlantic Forest is a Brazilian moist tropical forest, considered one of the greatest biodiversity hotspots, however, it has been suffering from deforestation, which has been causing impacts on its flora and fauna (Rosa *et al.*, 2018). In Rio de Janeiro, the Itatiaia National Park was the first protected area created in Brazil and has 28,155 hectares of remaining forest in Serra da Mantiqueira (Rosa *et al.*, 2018). The Park is considered one of the main tourist and birdwatching destinations in Brazil due to the local species richness (Berto & Lopes, 2020). Birds are extremely important for the maintenance of this ecosystem, as they play an important role in plant pollination, seed dispersal, pest control, among others (Berto & Lopes, 2020).

On the other hand, birds are among the animals that can function as a reservoir and a disperser for various agents that cause zoonoses, among these microorganisms are fungi, which can be associated with feathers, when they bump into some substrate, and found in internal organs, entering through the feeding paths (Simi *et al.*, 2019).

The wild birds of the Atlantic Forest suffer from the stress caused by deforestation and anthropization, becoming more susceptible to infection of various types of microorganisms (Cordeiro *et al.*, 2021). Colonization by opportunistic fungi can be facilitated by morphological and physiological characters that favor their development, including poorly vascularized air sacs and defect uropygial glands with difficulty producing secretions to be distributed through the plumage by means of preening (Berto & Lopes, 2020). The



fungi, after associating with their host, if not eliminated by the cells of the immune system, enter a commensal or parasitic relationship with it, which can cause infection. This process depends on the general health status of the host (immunocompromised hosts are susceptible) and on the inherent characteristics of the microorganism, as efficient virulence factors (Casadevall & Pirofski, 2000; Feitosa *et al.*, 2020).

The vast majority of environmental fungi are saprophytes, commonly or occasionally found in soil, decomposing vegetation, seeds, and grains. Many of these are opportunistic, i.e., in contact with immunocompromised hosts they can cause disease (Pitt, 1994). Some of these species have been recognized as important pathogens in humans or immunocompromised domestic animals (Pitt, 1994; Simi *et al.*, 2019; Arné *et al.*, 2021). However, as the fungal diversity present in the tropical environment, most of it still needs to be discovered and understood; it is possible and common that fungi in the environment are capable of parasitizing animals (Nardoni & Mancianti, 2021; Arné *et al.*, 2021). This explains the importance of establishing the occurrence and frequency of fungi in the environment and in potential hosts.

Passeriformes birds living in wild environments are carriers and dispersers of fungi in nature (Della Vedova *et al.*, 2019; Nardoni & Mancianti, 2021). This dispersion in the environment can occur mostly in the following ways: through the release of their feces in the environment, and through contact with their body parts, as these fungi can be associated with the on feathers (Warner & French, 1970; Simi *et al.*, 2019; Kraisitudomsook *et al.*, 2021). Therefore, it is important to establish the profile of fungi found in feathers and feces (birds) and litter (environment) and to establish the incidence of total filamentous fungi. In this context, this work sought to identify filamentous fungi isolated from samples of wild birds and litter, in order to understand the diversity and frequency of fungal species within bird habitats in the Itatiaia National Park,

southeastern Brazil.

Material and Methods

Study site and sample collection

This study was carried out along the Travessia Ruy Braga in Itatiaia National Park, a protected area with a high degree of vulnerability, located in the Mantiqueira Mountains, Southeastern Brazil (22°26'17 "S; 44°37'33 "W). The expeditions were carried out in May, June and July 2021. The captures took place 3 days a month, and 10 mist nets were used, totaling 180 meters, and they remained open from 5 am to 5 pm, totaling 12 hours day and 36 hours a month. A total of 74 birds of different species were captured (Table 1). Birds were kept in individual boxes and feces were collected immediately after defecation and packed in sterilized centrifuge tubes. The birds were identified according to Pacheco *et al.* (2021). The feathers (plumage and tail) were removed with sterile tweezers and placed in previously sterilized white paper envelopes to eliminate moisture, thus preventing the growth of contaminating fungi and/ or bacteria. After obtaining the samples the birds were released in the same environment where they were captured. Additionally, a total of 19 samples of litter were collected every 500 meters from the beginning of the Travessia Ruy Braga in a course of 6.5km in the lower part of the Itatiaia National Park. All samples were properly labeled, packed in thermal bags at room temperature and transported to the Laboratory of Mycology and Mycotoxicology of the Federal Rural University of Rio de Janeiro.

Fungal isolation

Five to 10mg of feces were streaked on Sabouraud agar (Difco)



plus chloramphenicol and each sample was incubated directly in a Petri dish

3

size and septation of macroconidia; abundance and roughness of microconidia; presence or absence of chlamydoconium; presence or absence of forms of sexual reproduction; hyphal septation (Samsom *et al.*, 2000; Sidrim *et al.*, 2004; De Hoog *et al.*, 2021).

(90 x 15cm) at 28°C for up to 07 days (Simi *et al.*, 2019).

Whole and clipped feathers were streaked on Mycosel® Agar (Difco) and each sample was incubated in a Petri dish at 28°C for up to 07 days (Nardoni & Mancianti, 2021).

The litter samples were placed in Petri dishes, in which sterilized horsehair threads and distilled water (both sterile) were deposited. The samples were incubated at 25°C for up to four weeks following the methodology of Vanbreuseghem (1952).

For the identification of the fungi grown on the plates and on the manes, the following characteristics were observed: growth characteristics of the colonies, such as color and appearance (macromorphology) and characteristics of mycelium, presence, shape,

Results

A total of 148 samples from 74 wild birds captured were collected and included feathers (n=74) and feces (n=74) (Table 1), as well as 16 litter samples. From each sample it was possible to isolate one filamentous colony or more; therefore, the number of fungi isolated does not correspond to the total number of samples. Out of a total of 117 fungi isolated, 17 genera were identified, as shown in Table 2. The genera that occurred in greater numbers were *Aspergillus* and *Mucor* followed by *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, and *Syncephalastrum*. A total of 22 morphospecies could be identified (18%), among them *Aspergillus* section *Nigri*, *Aspergillus* section *Circumdati*, *Aspergillus* section *Fumigati* and *Penicillium citrinum*.

4



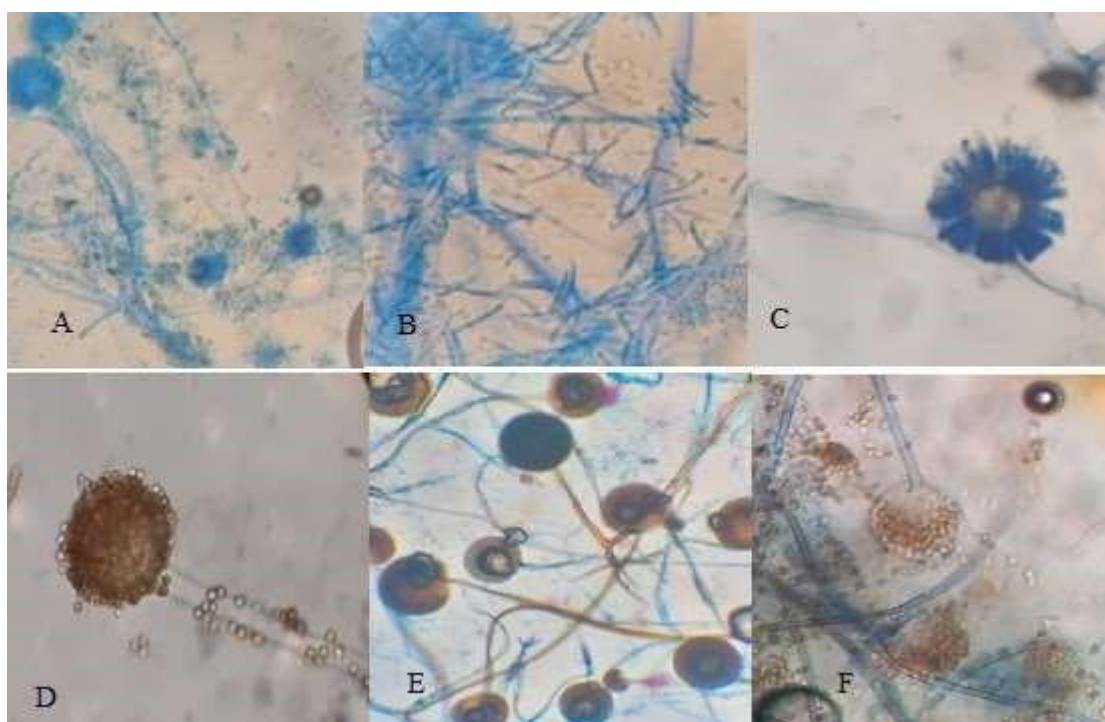


Figure 1 – Light microscopy of (A) *Aspergillus* sp. with lactophenol cotton blue; (B) *Fusarium* sp. with lactophenol cotton blue; (C) *Syncephalastrum* sp. with lactophenol cotton blue; (D) *Aspergillus* sp. with sodium hydroxide (20%); (E) *Rhizopus* sp. with lactophenol cotton blue; (F) *Mucor* sp. with lactophenol cotton blue.

Table 1 – Bird species (Pacheco et al., 2021), samples, and isolated fungi.

Family	Bird species	Feathers	Feces
	<i>Cissopis leverianus</i> (Gmelin, 1788)	<i>Mucor</i> sp.	<i>Geotrichum</i> sp., <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>
	<i>Saltator similis</i> (d'Orbigny & Lafresnaye, 1837)	<i>Mucor</i> sp. <i>Fusarium</i> sp.	<i>Aspergillus</i> section <i>Fumigati</i>
	<i>Saltator fuliginosus</i> (Daudin, 1800)		
	<i>Trichothraupis melanops</i> (Vieillot, 1818)	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>	<i>Eurotium</i> sp.
	<i>Tachyphonus coronatus</i> (Vieillot, 1818)	<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>	
	<i>Tachyphonus coronatus</i>	<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>	
	<i>Tachyphonus coronatus</i>	<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>	
	<i>Tachyphonus coronatus</i>	<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>	
	<i>Saltator fuliginosus</i>	<i>Mucor</i> sp.	<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>
	<i>Trichothraupis melanops</i>	<i>Mucor</i> sp.	<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>
	<i>Tachyphonus coronatus</i>	<i>Mucor</i> sp.	<i>Eurotium</i> sp.



Thraupidae	<i>Haplospiza unicolor</i> (Cabanis, 1851)	<i>Mucor</i> sp. <i>Fusarium</i> sp.	<i>Aspergillus</i> section <i>Fumigati</i>
	<i>Stephanophorus diadematus</i> (Temminck, 1823)		<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>
	<i>Stephanophorus diadematus</i>	<i>Lichtheimia</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.
	<i>Stephanophorus diadematus</i>		<i>Cladosporium</i> sp.
	<i>Saltator similis</i>		<i>Aspergillus</i> section <i>Circumdati</i> <i>Cladosporium</i> sp.
	<i>Stephanophorus diadematus</i>	<i>Alternaria</i> sp.	
	<i>Stephanophorus diadematus</i>		<i>Cladosporium</i> sp.
	<i>Saltator similis</i>		<i>Cladosporium</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.
	<i>Stephanophorus diadematus</i>	<i>Mucor</i> sp.	
	<i>Thachyphonus coronatus</i>	<i>Chrysonilia</i> sp.	
	<i>Stephanophorus diadematus</i>	<i>Acremonium</i> sp.	<i>Cladosporium</i> sp.
	<i>Tangara sayaca</i> (Linnaeus, 1766)		<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>
	<i>Tangara desmarestis</i> (Vieillot, 1819)	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.
	<i>Tangara desmarestis</i>		<i>Syncephalastrum</i> sp.
	<i>Tangara desmarestis</i>		<i>Curvularia</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.
	<i>Stephanophorus diadematus</i>	<i>Cladosporium</i> sp.	
	<i>Microspingus lateralis</i> (Nordmann, 1835)		<i>Rhizopus</i> sp.
	<i>Saltator similis</i>		<i>Rhizopus</i> sp.
	<i>Trichothraupis melanops</i>		<i>Rhizopus</i> sp.
	<i>Microspingus lateralis</i> (Nordmann, 1835)		<i>Rhizopus</i> sp.
	<i>Tangara desmarestis</i>		<i>Syncephalastrum</i> sp.
	<i>Trichothraupis melanops</i>		
	<i>Microspingus lateralis</i>	<i>Mucor</i> sp.	<i>Cladosporium</i> sp., <i>Mucor</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.

6

	<i>Chiroxiphia caudata</i> (Shaw & Nodder, 1793)		
	<i>Manacus manacus</i> (Linnaeus, 1766)	<i>Mucor</i> sp.	
	<i>Chiroxiphia caudata</i>		<i>Cladosporium</i> sp.
	<i>Neopelma chrysolophum</i> (Pinto, 1944)	<i>Chaetomium</i> sp.	
	<i>Myiothlypis leucoblephara</i> (Vieillot, 1817)		<i>Cladosporium</i> sp.



Parulidae	<i>Myiothlypis leucoblephara</i>	<i>Mucor</i> sp.	<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> , <i>Cladosporium</i> sp. <i>Mucor</i> sp.
	<i>Basileuterus culicivorus</i> (Deppe, 1830)		<i>Syncephalastrum</i> sp., <i>Mucor</i> sp.
	<i>Basileuterus culicivorus</i>		<i>Mucor</i> sp.
	<i>Basileuterus culicivorus</i>		
	<i>Myiothlypis leucoblephara</i>		
	<i>Myiothlypis leucoblephara</i>	<i>Curvularia</i> sp., <i>Mucor</i> sp.	<i>Syncephalastrum</i> sp.
Onychorhynchidae	<i>Myiobius atricaudus</i> (Lawrence, 1863)		<i>Aspergillus</i> section <i>Fumigati</i>
	<i>Myiobius atricaudus</i>		<i>Neosartorya</i> sp.
Thamnophilidae	<i>Thamnophilus caeruleus</i> (Vieillot, 1816)	<i>Lichtheimia</i> sp.	
	<i>Thamnophilus caeruleus</i>		<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> , <i>Mucor</i> sp.
	<i>Thamnophilus caeruleus</i>		<i>Penicillium</i> sp.
	<i>Pyriglena leucoptera</i> (Vieillot, 1816)		
	<i>Pyriglena leucoptera</i>	<i>Neosartorya</i> sp.	<i>Aspergillus</i> section <i>Fumigati</i>
	<i>Pyriglena leucoptera</i>	<i>Cladosporium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	
Furnariidae	<i>Anabazenops fuscus</i> (Vieillot, 1816)		<i>Aspergillus</i> section <i>Fumigati</i>
	<i>Anabacerthia amaurotis</i> (Temminck, 1823)	<i>Penicillium</i> sp.	
	<i>Cranioleuca pallida</i> (Wied, 1831)		<i>Fusarium</i> sp., <i>Cladosporium</i> sp.
Passerellidae	<i>Zonotrichia capensis</i> (Statius Muller, 1776)	<i>Mucor</i> sp.	<i>Curvularia</i> sp., <i>Chaetomium</i> sp.
	<i>Zonotrichia capensis</i>	<i>Mucor</i> sp.	
	<i>Zonotrichia capensis</i>	<i>Lichtheimia</i> sp.	
	<i>Phylloscartes difficilis</i> (Ihering & Ihering, 1907)		<i>Mucor</i> sp.
Rhyocyclidae	<i>Phylloscartes difficilis</i>		<i>Fusarium</i> sp.
	<i>Phylloscartes difficilis</i>		<i>Mucor</i> sp.
	<i>Phylloscartes difficilis</i>		<i>Curvularia</i> sp.
Vireonidae	<i>Hylophilus poicilotis</i> (Temminck, 1822)	<i>Penicillium</i> sp.	
	<i>Hylophilus poicilotis</i>		<i>Bipolaris</i> sp.
	<i>Hylophilus poicilotis</i>	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Syncephalastrum</i> sp.
Tyrannidae	<i>Knipolegus cyanostris</i> (Vieillot, 1818)		<i>Cladosporium</i> sp., <i>Mucor</i> sp.
	<i>Knipolegus cyanostris</i>	<i>Mucor</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.
Fringillidae	<i>Euphonia pectoralis</i> (Latham, 1801)	<i>Neosartorya</i> sp.	<i>Eurotium</i> sp.



<i>Conopophagidae</i>	<i>Conopophaga melanops</i> (Vieillot, 1818)		<i>Aspergillus</i> section <i>Fumigati</i> , <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>
<i>Dendrocolaptidae</i>	<i>Sittasomus griseicapillus</i> (Vieillot, 1818)	<i>Lichtheimia</i> sp.	
<i>Turdidae</i>	<i>Turdus flavipes</i> (Vieillot, 1818)		<i>Aspergillus</i> section <i>Fumigati</i>
<i>Tityridae</i>	<i>Schiffornis virescens</i> (Lafresnaye, 1838)	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Neosartorya</i> sp.
<i>Platyrinchidae</i>	<i>Platyrinchus mystaceus</i> (Vieillot, 1818)		

Table 2 – Frequency list of fungi identified in the three substrates analyzed.

Fungi	Feathers	Feces	Litter
<i>Acremonium</i> spp.	1		
<i>Alternaria</i> spp.	1		
<i>Aspergillus</i> spp.	6	17	2
<i>Bipolaris</i> spp.		1	
<i>Chaetomium</i> spp.	1	1	
<i>Chrysonilia</i> spp.	1		
<i>Cladosporium</i> spp.	2	11	
<i>Curvularia</i> spp.	1	3	
<i>Eurotium</i> spp.		3	
<i>Fusarium</i> spp.	3	8	5
<i>Geotrichum</i> spp.		1	
<i>Lichtheimia</i> spp.	4		
<i>Mucor</i> spp.	14	8	
<i>Neosartorya</i> spp.	2	2	
<i>Penicillium</i> spp.	5	1	5
<i>Rhizopus</i> spp.		4	
<i>Syncephalastrum</i> spp.		5	
Total	40	65	12

Discussion



Most of the species identified in this work can be considered environmental and opportunistic fungi (depending on the general condition of the host), however, the pathogenicity of the fungi was not evaluated in this study. The most abundant in the sampled areas were, *Aspergillus* spp. and *Mucor* spp. followed by *Cladosporium* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. and *Syncephalastrum* spp.

Similar results were found by Bills & Polishook (1994), when studying the abundance and diversity of fungi from Costa Rican moist forest litter, they found *Penicillium* spp., *Trichoderma* spp., *Paecilomyces* spp., *Aspergillus* spp., and Mucorales fungi, the latter two in larger quantities, as in this study. Research also in the Atlantic Forest of southeastern Brazil conducted by Bezerra *et al.*, (2020), in the Restinga de Jurubatiba National Park in Rio de Janeiro,

8

reported equivalent results, being isolated *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Curvularia* spp., *Pestalotiopsis* spp., *Bipolaris* spp., *Monilia* spp., *Nigrospora* spp., and *Trichoderma* spp.

It is noteworthy that studies involving the mycobiota present in wild birds, mainly Passeriformes, despite their great importance, are rare and, in the Itatiaia National Park, no survey of the mycobiota present in the feathers or feces of these animals has been done so far. This is the first study to report saprophytic fungi in wild birds in Itatiaia National Park.

The identification of the genera *Aspergillus* and *Penicillium* in migratory birds are carried out frequently, e.g., Akter *et al.* (2020) isolated *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. in feces of

migratory birds in Bangladesh. Simi *et al.*, (2019) identified *Aspergillus* spp. in feces of parrots and birds of prey in captivity in central-western Brazil. Among the fungi identified in the present study in Itatiaia National Park, we highlight *Aspergillus* spp., which occurred abundantly in feces. This genus can be found in soil, organic matter, and many other places. Aspergillosis, a disease caused by *Aspergillus* sp., can affect the respiratory tract of immunocompromised birds in general, and cause severe pneumonia, being one of the main causes of death in captive birds and, less frequently in free-living birds (Joseph, 2003, Talbot *et al.*, 2018; Della Vedova *et al.*, 2019). No physical characteristics of this disease in the acute form were found in the captured birds.

Other fungi that were isolated in abundance, mainly in fecal samples, were fungi of the order Mucorales, being the genus *Mucor* the most abundant. Fungi of this order have rapid growth and are commonly found in the soil and in decomposing plants. *Mucor* is the main genus of the order, they have simple or branched sporangiophores and form globular sporangia and lack rhizoids or have poorly developed rhizoids (De Souza *et al.*, 2018; De Hoog *et al.*, 2020; Cordeiro *et al.*, 2021). The sporangiospores of *Mucor* sp. vary in size and shape, with some irregular in shape (Freitas *et al.*, 2021). The prevalence of Mucorales and *Cladosporium* spp. and *Fusarium* spp. found growing in feathers and droppings of wild birds are little known, therefore, there is a need to continue further studies.

When analyzing the samples of collected litter, we observed that the diversity of filamentous fungi was lower, only three genera were isolated (*Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*), when compared to the feces (sixteen genera) and feathers (nine



genera) of surveyed birds (Table 1). Most microorganisms present in this environment are difficult to culture or depend on different microbiological techniques to obtain satisfactory growth. In this study, the technique of Vanbreuseghem (1952), was used to mainly isolate possible dermatophytes, fungi that can cause cutaneous mycoses in animals and humans (Vidal *et al.*, 2017). According to Takahashi *et al.* (2011) and Vidal *et al.* (2017) the non-positivity of dermatophyte fungi suggests that the use of more sensitive methods for the identification of these fungi, such as those involving molecular biology, should be performed in order to enable an analysis of keratinophilic species present in the studied environments. Therefore, further necessary investigation to complement the classical techniques of fungal identification are molecular biology techniques for the identification of microorganisms.

Studies carried out by Labrador *et al.* (2021), quantifying the microbial abundance in the feathers of birds in the southern region of Spain, showed fungi as the main microorganisms. However, with the methodology used by the authors, it was not possible to identify the genera and morphospecies present in the samples. The most modern molecular biology techniques should complement the basic techniques of cultivation and identification, in order to identify specifically through the sequencing of nuclear genes, such as the ITS gene, which is the main gene used for molecular identification and phylogeny (Lima *et al.*, 2017).

Birds may be involved in the transmission of fungal diseases in the following ways: as biological vectors and as mechanical vectors. Thus, in birds, fungi gain a diverse dispersion, since they are mechanically carried by their feathers or excreted in their feces (Hubalek, 2004). Fungi present in the soil, or on plant surfaces, are easily transferred to bird feathers. Inhalation of the spores or ingestion of grain containing

the fungus are also routes of infection (Johansson *et al.*, 2021). When inhaled or ingested, these fungi are excreted and dispersed in the environment, as reported by Akter *et al.*, (2020), which analyzing the feces of migratory birds in Bangladesh, finding that these birds had an important role in the dissemination of filamentous fungi, especially *Aspergillus* spp. in the environment, which could also be the case in our study.

Conclusion

A diversity of filamentous fungi of various genera was isolated from feathers and bird droppings, as well as from litter. The most reported genera were *Aspergillus*, *Mucor*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, and *Syncephalastrum*. According to the results found, it can be considered that the Atlantic Forest, even having suffered several impacts with the exponential growth and expansion of urban areas, is still a source of richness of fungal species. In addition, as this region is still poorly investigated regarding the fungal interaction with passerines, it is necessary that new mycological studies are carried out to survey the fungal species in the region, and molecular biology techniques are applied in order to find microorganisms such as keratinophilic fungi. The study of loads and fungi at different scales (between feathers, feces, and litter), allows us to suggest that the microorganisms that live in the feathers are the result of the arrival of fungi from the external environment to the bird. Other processes, such as microbial dispersion through feces, may play a role and should be further studied.

The continuity of the research is of great importance to elucidate whether the profile of the mycobiota is affected by anthropization and whether this profile interferes with the health of birds and the environment. This is the first study to report saprophytic



filamentous fungi in wild birds and litter in the Itatiaia National Park in southeastern Brazil.

Acknowledgment

This study was supported by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) (scholarship 001), National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (scholarship 302437/2016- 9) and the Carlos Chagas Filho Foundation for Research Support of the State of Rio de Janeiro (concessions E-26/203.200/2016 and E26/202.797/2019). We would like to thank the Itatiaia National Park team, especially the research coordinator Dr. Léo Nascimento; which allowed us to access and use some facilities during expeditions.

References

- Akter M *et al.* Migratory birds as the potential source for the transmission of *Aspergillus* and other fungus to Bangladesh. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*. 7(2): 338-338, 2020.
- Arné P, Risco-Sastillo V, Jouvion G, LE Barzic C & Guillot J. Aspergillosis in Wild Birds. *Journal of fungi*. 7(3): 241-241, 2021.
- Berto BP & Lopes CWG. Coccidia of wild birds as ecological biomarkers: Some approaches on parasite- host-environment interaction. *Journal of Parasitology*. 106(5): 707-713, 2020.
- Bezerra AG, Mussi-Dias V, Dos Santos PHD, Carvalho BM, De Sousa PTP & Da Silveira S. Fungos endofíticos associados a bromélias de restingas, do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Rio de Janeiro, Brasil. *Research, Society and Development*. 9(7): 971974298-971974298, 2020.
- Bills GF & Polishook JD. Abundance and diversity of microfungi in leaf litter of a lowland rain forest in Costa Rica. *Mycologia*. 86(2): 187-198, 1994.
- Casadevall A & Pirofski LA. Host e pathogen interactions; basic concepts of microbial commensalisms, colonization, infection and disease. *Infection and Immunity*. 68(12): 6511-6518, 2000.
- Cordeiro L, Lee HB, Nguyen TTT, Gurgel LMS & De Azevedo ALCM. *Absidia bonitoensis* (Mucorales, Mucoromycota), a new species isolated from the soil of an upland Atlantic Forest in Northeastern Brazil. *Nova Hedwigia*. 112(1-2): 241-251, 2021.
- Della Vedova R, Hevia A, Vivot W, Fernández J, Córdoba SB & Reynaldi FJ. Aspergillosis in domestic and wild birds from Argentina. *Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science*. 56(2): 152460- 152460, 2019.
- De Hoog GS, Guarro J, Gené J, Ahmed S, Al-Hatmi AMS, Figueiras MJ & Vitale RG. 2020. *Atlas of Clinical Fungi* 4th ed. Hilversum.
- De Souza CA *et al.* A new species of *Mucor* (Mucoromycotina, Mucorales) isolated from an enclave of Upland Atlantic Forest in the semi-arid region of Brazil. *Phytotaxa*, 351(1): 53-53, 2018.
- Feitosa OTJ *et al.* Microbiota intestinal das aves de produção: revisão bibliográfica. *Research, Society and Development*. 9(5): 42952779-42952779, 2020.
- 9 Freitas LW *et al.* A new occurrence of *Mucor inaequisporus* Dade (Mucorales, Mucoromycota) from soil of the Atlantic Forest in the Brazilian Northeast. *Check List*. 17(3): 753, 2021.
- Hubalek Z. An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds. *Journal of Wildlife Diseases*. 40(4): 639-659, 2004.
- 10 Johansson NR, Kaasalainen U & Kikkinen J. Woodpeckers can act as dispersal vectors for fungi, plants, and microorganisms. *Ecology and Evolution*. 11(1): 7154-7163, 2021.
- Joseph V. 2003. Infections and parasitic diseases of captive passerines. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*. 12(1): 21-28, 2003.
- Kraisitudomsook N & Smith ME. Bird's Nest Fungi: Charismatic Mushrooms in Your Garden. *EDIS*. 2021 (1): 3-3, 2021.
- Labrador MDM, Doña J, Serrano D & Jovani R. Quantitative interspecific approach to the stylosphere: Patterns of bacteria and fungi





- abundance on passerine bird feathers. *Microbial Ecology*. 81(4): 1088-1097, 2021.
- Legrand D, Cote J, Fronhofer EA, Holt RD, Ronce O, Schtickzelle N & Clobert J. Eco-evolutionary dynamics in fragmented landscapes. *Ecography*. 40(1): 9-25, 2017.
- Lima AKSD, Rodrigues JR, Souza IDSD, Rodrigues JC, Souza TCD, Maia CR & Fernandes OCC. Fungos isolados da água de consumo de uma comunidade ribeirinha do médio Rio Solimões, Amazonas, Brasil: potencial patogênico. *Revista Ambiente & Água*. 12: 1017-1024, 2017.
- Nardoni S & Mancianti F. Survey of Keratinophilic Fungi from Feathers of Birds in Tuscany. *Biology*. 10(12): 1317, 2021.
- Pacheco JF, Silveira LF, Aleixo A, Agne CE, Bencke GA, Bravo GA & de Q Piacentini V. Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee-second edition. *Ornithology Research*. 29(2): 94-105, 2021.
- Pitt JI. The current role of *Aspergillus* and *Penicillium* in human and animal health. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*. 32(1): 17-32, 1994.
- Rosa CA, Pinto IA & Jardim NS. Controle do javali na Serra da Mantiqueira: um estudo de caso no Parque Nacional do Itatiaia e RPPN Alto-Montana. *Biodiversidade Brasileira*. 2(2): 285-303, 2018.
- Samson RA, Van Reenen-Hoekstra ES, Frisvad JC & Filtenborg O. 2000 Introduction to Food and Airborne Fungi. 6th ed., Utrecht, The Netherlands, Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences.
- Sidrim JJC, Meireles TEF, Oliveira LMP & Diógenes MJN. 2004. Aspectos clínico-laboratoriais das dermatofitoses. *Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 135-161p.
- Simi WB, Leite-JR, DP, Paula CR, Hoffmann-Santos HD, Takahara DT & Hahn RC. Leveduras e fungos filamentosos em excretas de psittacideos e aves de rapina em cativeiro na região centro-oeste do Brasil: um risco potencial para a saúde humana. *Revista Brasileira de Biologia*. 79(3): 414-422, 2019.
- Takahashi JP, Pelegrini A, Pereira CDQM & Souza MC. Levantamento de fungos queratinofílicos em solo de parques e praças públicas no município de São Bernardo do Campo. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*. 11(1): 47-53, 2011.
- Talbot JJ, Thompson P, Vogelnest L & Barrs VR. Identification of pathogenic *Aspergillus* isolates from captive birds in Australia. *Medical Mycology*. 56(8): 1038-1041, 2018.
- Vanbreuseghem R. Technique biologique pour l'isolement des dermatophytes du sol. *Annales des Sociétés Belges de Médecine Tropicale de Parasitologie et de Mycologie*. 32(2): 173-178, 1952.
- Vidal VV, Canto ESM, DE Sousa JSC, Frota JKC & Dos Santos TT. Ocorrência de fungos queratinofílicos em solo de áreas recreacionais de Santarém/PA, Brasil. *Revista Cereus*. 9(2): 03-15, 2017.
- Warner GM & French DW. Dissemination of fungi by migratory birds: survival and recovery of fungi from birds. *Canadian Journal of Botany*. 48(5): 907-910, 1970.
- Yepes MS & Carvalho J. New rust fungi records (Uredinales) from Brasil, collected at the Itatiaia National Park. *Acta Botanica Brasilica*. 24(2): 378-385, 2010.

Biodiversidade Brasileira – BioBrasil.
Fluxo Contínuo
n.4, 2022

Esta é uma publicação eletrônica científica do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, com foco em unidades de conservação e espécies ameaçadas.

ISSN: 2236-2886





Fungi isolated from wild birds in the Marambaia Island, Rio de Janeiro State, southeastern Brazil¹

Jhon Lennon Genovez-Oliveira², Lucas AS. Andrade², Mariana S. Oliveira²,
Viviane M. Lima³, Bruno P. Berto^{3*} and Águida A. de Oliveira⁴

ABSTRACT.- Genovez-Oliveira J.L., Andrade L.A.S., Oliveira M.S., Lima V.M., Berto B.P. & Oliveira Á.A. 2023. **Fungi isolated from wild birds in the Marambaia Island, Rio de Janeiro State, southeastern Brazil.** *Pesquisa Veterinária Brasileira* 44:e07383, 2024. Departamento de Biologia

Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR-465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-000, Brazil. E-mail: bertobp@ufrj.br

In Brazil, the Atlantic Forest has been suffering from deforestation, which has had impacts on its flora, fauna, and microbiota. However, the fungal diversity present in these environments is little known and studied. In this study, a total of 90 samples of 45 wild birds (45 feathers and 45 feces) were collected in Ilha da Marambaia, southeastern Brazil. Filamentous fungi isolated from these samples were identified through macroscopic and microscopic characteristics. Some isolates were identified by molecular biology using the PCR technique. *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cunninghamella*, *Curvularia*, *Eurotium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Neosartorya*, *Pestalotia*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor* and *Syncephalastrum* were identified. These results indicate the presence of saprophytic fungi species in the feathers and feces of wild birds of the capture site. Further studies should be conducted to elucidate if the mycobiota profile modifies with anthropization and if it interferes with bird health and environmental recovery.

INDEX TERMS: Fungi, microbiota, passerines, Atlantic Forest.

RESUMO.- [Fungos isolados de aves silvestres na Ilha da Marambaia, Estado do Rio de Janeiro, Sudeste do Brasil.] No Brasil, a Mata Atlântica vem sofrendo com o desmatamento, que tem impactado sua flora, fauna e microbiota. No entanto, a diversidade fúngica presente nesses ambientes é pouco conhecida e estudada. Neste trabalho, um total de 90 amostras de 45 aves

silvestres (45 penas e 45 fezes) foram coletadas na Ilha da Marambaia, Sudeste do Brasil. Fungos filamentosos isolados dessas amostras foram identificados por meio de características macroscópicas e microscópicas. Alguns isolados foram identificados por biologia molecular usando a técnica de PCR. Foram identificados *Acremonium*, *Alternaria*,



¹ Received on September 11, 2023.

Accepted for publication on October 14, 2023.

² Graduate Program in Animal Biology, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR-465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-000, Brazil.

³ Departamento de Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-000, Brazil.

*Corresponding author: hertobp@ufrrj.br

⁴ Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Instituto de Veterinária (IV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR-465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-000, Brazil.

Aspergillus, *Cunninghamella*, *Curvularia*, *Eurotium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Neosartorya*, *Pestalotia*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor* e *Syncephalastrum*. Esses resultados indicam a presença de espécies de fungos saprofíticos nas penas e fezes de aves silvestres do

local de captura. Novos estudos devem ser realizados a fim de elucidar se o perfil da microbiota se modifica com a antropização e se interfere na saúde das aves e na recuperação ambiental.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Fungos, microbiota, pássaros, Mata Atlântica.

INTRODUCTION

In Brazil, a high variety of bird species can be found, being among the three countries with the greatest diversity of birds in the world. In this context, the Atlantic Forest, a tropical forest biome that covers the east, northeast, southeast, and south coast of Brazil, is among the top five in the list of world hotspots, even though its remaining area is less than 8% of its original extension (Schweizer *et al.* 2022). The loss and fragmentation of habitats and biopiracy are the main threats to its biodiversity, generating direct impacts on the fauna, flora, and microbiota (Lindström 1999). Within this biome, Marambaia Island is considered a biological reserve, which



constitutes an environmental preservation area in accordance with Decree No. 9802 of March 12, 1987. The region is administered by the Brazilian Army, Air Force, and Navy, where they carry out armament experiments and military exercises. Moreover, around 430 remaining “quilombolas” are present in the area, making their living from fishing and agriculture. Access to the Island is restricted, which is only possible through navy vessels and with prior authorization (ICMBio 1987, Lima *et al.* 2020).

Pollination, insect control, and seed dispersal are examples of how birds act in the ecosystem chain (Howard 2003). These birds are among the animals that can act as reservoirs and dispersers for various microbial agents such as fungi, which can associate with feathers, when bumping into some substrate, and also with internal organs, entering through the air pathways and orally (Howard 2003, Reding 2003, Oliveira *et al.* 2022). Fungi are agents of the decomposition of organic matter and can be found in pollen, seeds, and soil (Simi *et al.* 2019, Kraistudomsook *et al.* 2021). Furthermore, many of these are opportunistic, that is when in contact with immunocompromised hosts, they can cause disease (Pitt 1994, Simi *et al.* 2019).

The diversity of fungi present in the tropical environment is very high and most of them are still unknown (Oliveira *et al.* 2022). More studies about the frequency of environmental fungi become important since most of them have an opportunistic profile (Oliveira *et al.* 2022). Therefore, it is of great importance to define the profile of the mycobiota residing in these places, as well as to establish the incidence of filamentous and/or opportunistic fungi.

When it comes to filamentous fungi, the most common descriptions are in broilers (Sugiharto 2019, Hamza & Gunyar 2022) in domestic birds, such as pigeons (Madsen *et al.* 2023), and captive birds (Talbot *et al.* 2018). However, in free-living birds, this interaction remains poorly studied.

In this scenario, this study aimed to establish the incidence of filamentous fungi from feathers and feces of birds in localities of Marambaia Island, in the Southeast of Brazil, to understand the diversity and frequency of fungal species in this habitat.

MATERIALS AND METHODS

Animal Ethics. Field-collecting permits were issued by the “Instituto Chico Mendes de Conservação da

Biodiversidade” (Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation - ICMBio), through the “Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade” (Biodiversity Authorization and Information System - SISBIO) under license number 70132, and Animal Ethics Committee (CEUA) of the “Universidade do Grande Rio” (UNIGRANRIO) under protocol number 021/2019.

Study site and sample collection. This study was conducted on Marambaia Island, a protected area located in the State of Rio de Janeiro, in the Southeast of Brazil (22°26'17" S; 44°37'33" W). The expeditions were carried out in May, June, and July 2021. The captures took place three days per month and 10 mist nets were used, totaling 180 meters, and they remained open from 5 a.m. to 5 p.m., that is, 12 hours per day and 36 hours per month. A total of 45 birds of different species were captured (Table 1). The birds were kept in individual boxes and feces were collected immediately after defecation and packed in sterilized centrifuge tubes. The birds were identified according to Pacheco *et al.* (2021). The feathers

Pesq. Vet. Bras. 44:e07383, 2024

(plumage and tail) were removed with sterile tweezers and placed in previously sterilized white paper envelopes to eliminate moisture, thus preventing the growth of contaminating fungi and/or bacteria. After obtaining the samples, the birds were released into the same environment where they were captured. All samples were properly labeled, packed in thermal bags at room temperature, and transported to the Laboratory of Mycology and Mycotoxicology at the “Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro” (UFRRJ).

Fungal isolation. Five to 10mg of feces were streaked on Sabouraud agar (Difco) plus chloramphenicol and each sample was incubated directly in a Petri dish (90 x 15cm) at 28°C for up to seven days (Simi *et al.* 2019). Whole and clipped feathers were streaked on Mycosel® Agar (Difco) and each sample was incubated in a Petri dish at 28°C for up to seven days (Nardoni & Mancianti 2021). For the identification of the fungi grown on the plates and manes, the following was observed: growth characteristics of the colonies, such as color and appearance (macromorphology), and characteristics of mycelium, presence, shape, size and septation of macroconidia; abundance and roughness of microconidia; presence or absence of chlamydoconium; presence or absence of forms of sexual reproduction; hyphal septation (Samson *et al.* 2000, Sidrim & Rocha 2004, De Hoog *et al.* 2020).

Molecular identification. DNA was extracted from a total of eight strains of different species, identified according to the morphological taxonomy, and the results of these identifications were compared. After



isolating and obtaining pure cultures, total DNA extraction was performed using the commercial kit DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen), following the manufacturer's recommendations. Then, amplification was performed using the polymerase chain reaction (PCR) technique, in the region corresponding to the internal transcribed spacer (ITS) ITS1 – 5.8S – ITS2. The PCR reaction contained 12.5 µl of GoTaq® G2 Hot Start Colorless Master Mix (Promega Labs, São Paulo, Brazil) (1×), 0.25 µl of each primer (0.2 µM), 9 µl of nuclease-free water and 3 µl of DNA (for the primary reaction) or 3 µl primary PCR product (for the secondary reaction). This reagent mixture was subjected to amplification with a temperature profile that consisted of an initial denaturation step at 94°C for 5 minutes, followed by 35 cycles with denaturation at 94°C for 30 seconds, annealing at 60°C for 1 minute, and extension at 72°C for 2 minutes. At the end of the 35 cycles, a final extension was performed at 72°C for 10 minutes

(Lima *et al.* 2017). The primers used for amplification were ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') and ITS4 (5' TCCTCCGCTTATGATATGC 3') (White *et al.* 1990). The PCR amplicons were purified using the

Qiagen MinElute PCR Purification (Qiagen, São Paulo, Brazil). All PCR amplicons were sequenced using the PCR forward and reverse primers by Ludwig Biotechnology, where an ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California) was used for Sanger sequencing.

RESULTS

A total of 90 samples from 45 wild birds captured were collected, which included feathers (n=45) and feces (n=45) (Table 1). From each sample, it was possible to isolate one or more filamentous colonies, while in others there was no growth and, therefore, the number of isolated fungi does not correspond to the total number of samples. Out of a total of 68 isolated fungi, 15 genera were identified, as shown in Table 2. The genera with a greater number of occurrences were *Mucor* and *Fusarium*, followed by *Syncephalastrum*, *Penicillium*, and *Aspergillus*.

The vast majority of fungal species isolated from the feathers and feces of birds in this study are considered to belong to the saprophytic fungi genera, occasionally being opportunistic pathogens. Based on the phenotypic characteristics and corresponding taxonomic keys, we can verify that, among the

isolated samples, 15 genera were identified, namely *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cunninghamella*, *Curvularia*, *Eurotium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Neosartorya*, *Pestalotia*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor* and *Syncephalastrum* (Table 2).

Table 1. Bird species, samples, and isolated fungi

Family	Species	Feces	Feathers
	<i>Myiarchus ferox</i>	<i>Fusarium</i> sp.	-
	<i>M. ferox</i>	<i>Fusarium</i> sp.	-
	<i>Myiozetetes similis</i>	<i>Fusarium</i> sp.	-
	<i>M. ferox</i>	<i>Eurotium</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-
	<i>M. ferox</i>	<i>Syncephalastrum</i> sp.	-

Tyrannidae		<i>Syncephalastrum</i> sp.	
		<i>Fusarium</i> sp.	
		<i>Syncephalastrum</i> sp.	
		<i>Syncephalastrum</i> sp.	
		-	
		<i>Mucor</i> sp.	
		<i>Mucor</i> sp.	
		<i>Mucor</i> sp.	
		<i>Penicillium</i> sp., <i>Pestalotia</i> sp.	
	<i>M. ferox</i>	<i>Fusarium</i> sp.	-
Turdidae	<i>M. ferox</i>		<i>Penicillium</i> sp.
	<i>M. ferox</i>	<i>Pestalotia</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	<i>Syncephalastrum</i> sp.
	<i>M. ferox</i>	<i>Mucor</i> sp.	-
	<i>M. ferox</i>	<i>Mucor</i> sp.	-
	<i>M. similis</i>	<i>Mucor</i> sp.	-
	<i>M. similis</i>	<i>Syncephalastrum</i> sp.	-
	<i>Elaenia flavogaster</i>	<i>Mucor</i> sp., <i>Syncephalastrum</i> sp.	-
	<i>M. ferox</i>	<i>Syncephalastrum</i> sp.	-
	<i>Tyrannus melancholicus</i>		<i>Syncephalastrum</i> sp.
	<i>Turdus rufiventris</i>	-	<i>Cunninghamella</i> sp.
Columbidae	<i>T. rufiventris</i>	<i>Acremonium</i> sp.	
	<i>T. rufiventris</i>	<i>Rhizopus</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp., <i>Geotrichum</i> sp.
	<i>Turdus amaurochalinus</i>	-	-
	<i>Turdus leucomelas</i>	<i>Fusarium</i> sp., <i>Paecilomyces</i> sp.	-
	<i>T. rufiventris</i>	<i>Fusarium</i> sp.	-
	<i>T. leucomelas</i>	<i>Alternaria</i> sp.	-
	<i>T. leucomelas</i>	<i>Rhizopus</i> sp.	<i>Mucor</i> sp.
	<i>Leptotila verreauxi</i>	<i>Mucor</i> sp.	<i>Mucor</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Mucor</i> sp., <i>Rizopus</i> sp.
	<i>L. verreauxi</i>	-	-
	<i>Columbina talpacoti</i>	<i>Eurotium</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.
Hirundinidae	<i>L. verreauxi</i>	<i>Mucor</i> sp.	-
	<i>Leptotila rufaxilla</i>	<i>Curvularia</i> sp., <i>Mucor</i> sp.	-
	<i>L. verreauxi</i>	<i>Mucor</i> sp.	-
	<i>Progne chalybea</i>	<i>Mucor</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.
	<i>P. chalybea</i>	<i>Penicillium</i> sp.	-
	<i>P. chalybea</i>	<i>Mucor</i> sp.	<i>Aspergillus</i> sp.
	<i>P. chalybea</i>	<i>Acremonium</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp.
	<i>P. chalybea</i>	<i>Acremonium</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	<i>Rhizopus</i> sp.
	<i>Vireo chivi</i>	<i>Syncephalastrum</i> sp.	-
	<i>V. chivi</i>	<i>Fusarium</i> sp.	-
Vireonidae	<i>V. chivi</i>	<i>Neosartorya</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp.
	<i>V. chivi</i>	48	-
	<i>V. chivi</i>		-
	<i>Ramphocelus bresilia</i>		-
	<i>R. bresilia</i>		-
	<i>R. bresilia</i>		-
	<i>Thraupis palmarum</i>		<i>Curvularia</i> sp.
	<i>Chloroceryle americana</i>		-
	<i>Molothrus bonariensis</i>		-
	<i>Veniliornis maculifrons</i>		-
Alcedinidae			
Icteridae			
Picidae			
TOTAL	45		20

DISCUSSION

It should be noted that studies involving the mycobiota present in wild birds, mainly Passeriformes, despite their great importance, are

scarce, and, in Marambaia Island, no survey of the mycobiota present in the feathers or feces of these animals has been conducted so far. This seems to be the first study to report saprophytic fungi in wild birds on Marambaia Island.

The Tyrannidae family was the most prevalent

in the capture (Fig.1). It is important to point out that tyrants are one of the most diverse and numerous groups of birds worldwide and, consequently, also in the neotropical region (Chaves *et al.* 2008). These birds have spread to every conceivable habitat (Ridgely & Tudor 1994) and they adapt to a wide variety of ecological niches as they occupy all different vertical strata

Table 2. Frequency list of fungi identified in the substrates analyzed

Fungi	Feces	Feathers
<i>Acremonium</i>	3	-
<i>Alternaria</i>	1	-
<i>Aspergillus</i>	-	3
<i>Cunninghamella</i>	-	1
<i>Curvularia</i>	1	1
<i>Eurotium</i>	2	-
<i>Fusarium</i>	12	4
<i>Geotrichum</i>	-	1
<i>Mucor</i>	13	3
<i>Neosartorya</i>	1	-
<i>Penicillium</i>	2	3
<i>Pestalotia</i>	2	-
<i>Paecilomyces</i>	1	-
<i>Rhizopus</i>	2	2
<i>Syncephalastrum</i>	8	2
TOTAL	48	20

within tropical forests (Sick 1997). When separately analyzing fungal isolates from this family, we noticed that the most prevalent genus was *Fusarium*, found only from the feces of these animals and none from the feathers, which suggests the presence of these fungi in the diet and gastrointestinal tract of these birds. The vast

majority of tyrannids are insectivores and a few feed on fruits (Brum *et al.* 2012). These results reinforce the need for further studies involving the presence of fungi and the correlation with the food consumed by these animals. The genus *Fusarium* sp. is common in grains and commercial feed used for captive birds, as reported by Köptcke *et al.* (2021), who evaluated contamination by fungi and their mycotoxins in feed offered to birds of the species *Nymphicus hollandicus*, popularly known as cockatiels. Over six months, the feed intended for consumption by these birds was collected for a mycological analysis, resulting in a high fungal activity of the genus *Fusarium*.

Birds can carry pollen, seeds, small parasites, and even fungi on their feet, feathers and beak, thus acting as dispersers in an ecologically balanced environment (Hubalek, 2004). Therefore, it is possible to assume the importance of isolating fungi from the feces and feathers, as it was performed in the present study.

Among the 15 genera reported, the most frequent ones in this research were *Mucor*, *Fusarium*, and *Syncephalastrum*, followed by *Penicillium*, *Aspergillus*, and *Rhizopus* (Fig.2-7), and when analyzing the total number of fungi present in the substrates (feces and feathers), we observed a greater number of isolated genera in the feces than in the feathers (Table 1). Similar results were found by Oliveira *et al.* (2022) who, when studying the fungal diversity present in the birds of the Itatiaia National Park in Brazil, reported the presence of *Aspergillus* spp., *Mucor* spp., *Cladosporium* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. and

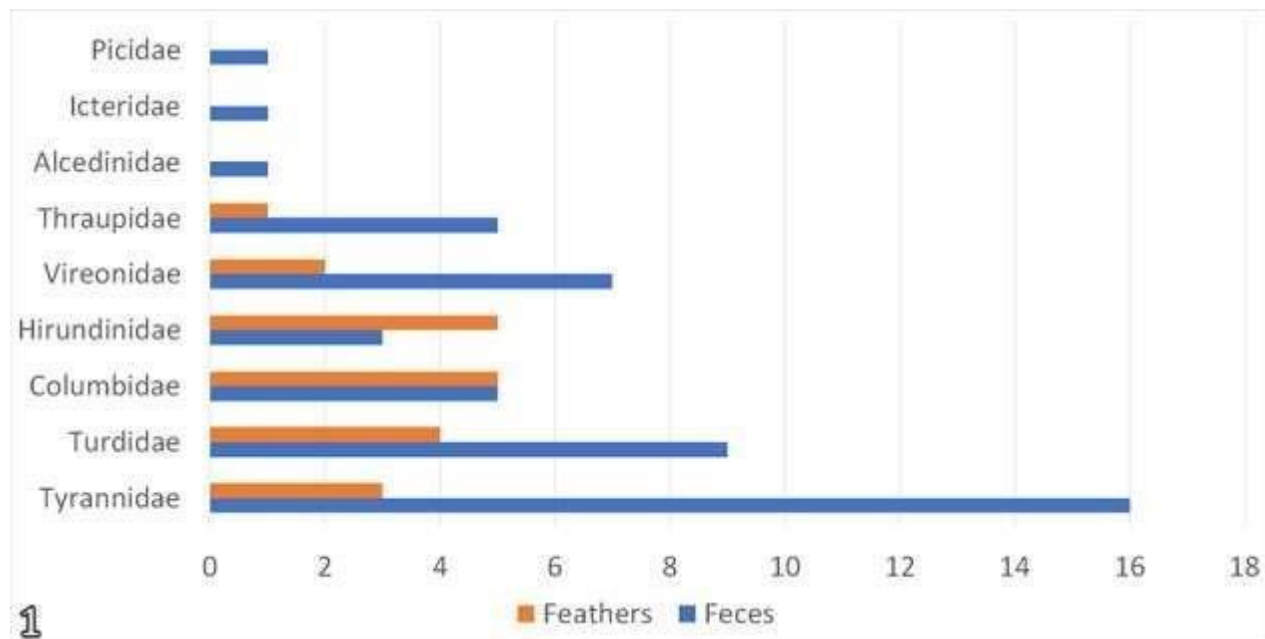


Fig.1. Distribution of fungi isolated from the collected substrates, according to the bird family

Syncephalastrum spp. The same authors showed a higher prevalence of fungi in the feces than in the feathers of the captured birds.

Another genus largely found was *Mucor*, belonging to the order of Mucorales. These fungi have fast-growing and woolly colonies. *Mucor* is the main genus of the order, which has simple or branched sporangiophores, forms globular sporangia, and does not have rhizoids (De Hoog *et al.* 2020, Freitas *et al.* 2021). Further, when analyzing the presence of this fungus in the substrates, we noticed that it was reported in greater quantity in the feces than in the feathers, as also evidenced by Oliveira *et al.* (2022), reinforcing the need for further studies involving the feeding of these animals.

According to Oliveira *et al.* (2022), it is difficult to observe the dispersion of filamentous fungi through feces in the wild environment, since when the feces are dispersed, whether, in soil or litter, they generate cross-contamination with fungi that were present in these substrates, making it difficult to know its origin. Thus, the capture methodology of this study allows a more precise identification, since the feces are collected and kept in sterilized paper envelopes, therefore, avoiding cross-contamination. These results ensure that these fungi were present in the feces of the birds and that they are by them dispersed into the environment. Other studies have already reported this dispersion using different methodologies, such as Correia *et al.* (2019). The authors analyzed the feces with intact seeds, which were placed in sterilized soil and kept for four months in a protected environment to avoid contamination. As a result, seven seedlings of *Rubus ulmifolius* obtained from four independent

feces of *Erithacus rubecula* and *Sylvia melanocephala*, were colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. As for the genetic analysis, nucleotide sequences were obtained from the regions of interest (ITS) ITS1 – 5.8S – ITS2, and all these sequences were subjected to species-level identification through comparison with sequences deposited in the GenBank database, which made it possible to identify species such as *Syncephalastrum racemosum*, *Pestalotiopsis microspora*, *Alternaria alternata*, *Penicillium herquei*, *Trichoderma asperellum* and *Fusarium* sp. (Table 3). Despite the sequenced regions being widely used in several studies for the characterization of fungal species, for some isolates, these regions were not sensitive enough for amplification. Because it covers the diversity of the mycobiota of the Atlantic Forest, we may be dealing with new species that have not yet been described or a primer that does not have enough similarity for amplification.

The most modern techniques of molecular biology should complement (and not replace) the basic techniques of cultivation and identification to avoid identification errors, using morphological taxonomic keys and sequencing of nuclear genes, such as the ITS gene, which is the main gene used for molecular identification and phylogeny (Lima *et al.* 2017). Studies conducted by Labrador *et al.* (2021) verified the prevalence of Kingdom Fungi in relation to other microorganisms in the feathers of birds from southern Spain, showing fungi as the main microorganisms. However, the methodology used by the authors did not prioritize the description of morphospecies.

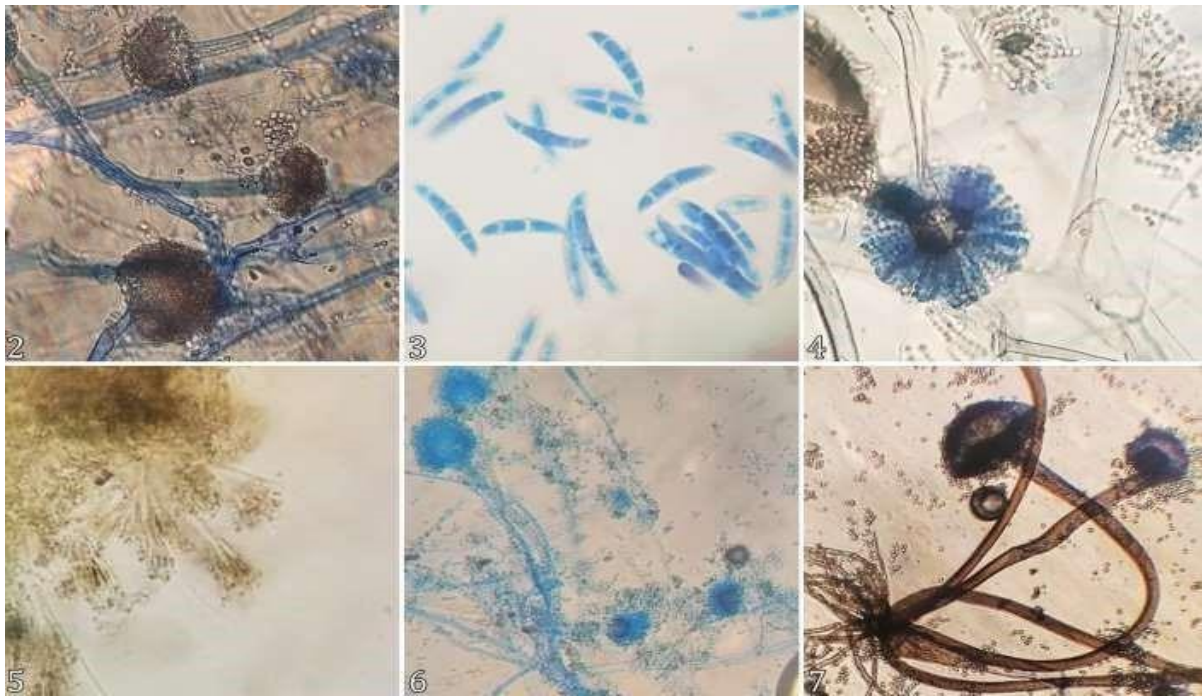


Fig.2-7. Light microscopy of isolated fungi. (2) *Mucor* sp. with lactophenol cotton blue. (3) *Fusarium* sp. with lactophenol cotton blue. (4) *Syncephalastrum* sp. with lactophenol cotton blue. (5) *Penicillium* sp. with sodium hydroxide (20%). (6) *Aspergillus* sp. with lactophenol cotton blue. (7) *Rhizopus* sp. with lactophenol cotton blue. Isolate from feces.

Table 3. Species identified by traditional taxonomy and molecular biology

Primer	Identification blast	Identity	Morphological analysis
ITS1	<i>Alternaria</i> sp.	99.81%	<i>Alternaria</i> sp.
ITS4	<i>Alternaria alternata</i>	100%	
ITS1	<i>Fungal endophyte culture</i>	100%	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
ITS4	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	99.61%	
ITS1	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	100%	<i>Syncephalastrum</i> sp.
ITS4	<i>S. racemosum</i>	99.31%	
ITS1	<i>Fungal</i> sp.	100%	<i>Syncephalastrum</i> sp.
ITS4	<i>S. racemosum</i>	98.97%	
ITS1	<i>Trichoderma asperellum</i>	99.65%	<i>Mucor</i> sp.
ITS4	There was no similarity		
ITS1	<i>Penicillium herquei</i>	98.84%	<i>Penicillium</i> sp.
ITS4	<i>P. herquei</i>	99.82%	
ITS1	<i>S. racemosum</i>	99.82%	<i>Aspergillus</i> sp.
ITS4	There was no similarity		
ITS1	<i>Fusarium</i> sp.	96.96%	<i>Fusarium</i> sp.
ITS4	<i>Fusarium</i> sp.	100%	

CONCLUSIONS

A diversity of filamentous fungi of various genera was isolated from the feathers and feces of birds. The most reported genera were *Mucor*, *Fusarium*, *Syncephalastrum*, *Penicillium*, *Aspergillus*, and *Rhizopus*.

According to the results found, it can be considered that the Atlantic Forest, even though it has suffered several impacts with the exponential growth and expansion of urban areas, is still a rich source of fungal species. The creation of new primers should be encouraged to shed light on a greater range of fungal species.

Moreover, as this region is still poorly investigated regarding the interaction of fungi with passerines, it is necessary that new mycological studies be conducted to survey the fungal species in the region, and molecular biology techniques be concomitantly applied (polyphasic taxonomy) to assist in the identification of these microorganisms.

Acknowledgments.- We are thankful to the staff at the “Centro de Avaliação da Ilha da Marambaia” (CADIM) of the Brazilian Navy, and to the coordinator of the agreement between the “Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro” (UFRRJ) and CADIM, Prof. Dr. Marcelo da Costa Souza (Departamento de Botânica – UFRRJ), that allowed us to access and use some facilities during the expeditions. This study was supported by “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” (CNPq), “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior” (CAPES) and “Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro” (FAPERJ). JLGO has a scholarship from CAPES (Grant/Award Number: 001). MSO has a postdoctoral scholarship from FAPERJ (Grant/Award Number: E-26/204.228/2021). VML has a fellowship from FAPERJ (Grant/Award Number: E-27/211.566/2021). BPB has a fellowship from CNPq (Grant/Award Number: 302345/2022-1) and FAPERJ (Grant/Award Number: E-26/200.565/2023).

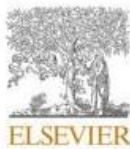
Conflict of interest statement.- The authors declare that there are no conflicts of interest.

REFERENCES

- Brum F.T., Kindel A., Hartz S.M. & Duarte L.D.S. 2012. Spatial and phylogenetic structure drive frugivory in Tyrannidae birds across the range of
- Pesq. Vet. Bras. 44:e07383, 2024
- Brazilian *Araucaria* forests. *Oikos* 121(6):899-906. <<https://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0706.2011.19978.x>>
- Chaves A.V., Clozato C.L., Lacerda D.R., Sari E.H.R. & Santos F.R. 2008. Molecular taxonomy of Brazilian tyrant-flycatchers (Passeriformes: Tyrannidae). *Mol. Ecol. Resour.* 8(6):1169-1177. <<https://dx.doi.org/10.1111/j.1755-0998.2008.02218.x>> <PMid:21586004>
- Correia M., Heleno R., Silva L.P., Costa J.M. & Rodríguez-Echeverría S. 2019. First evidence for the joint dispersal of mycorrhizal fungi and plant diaspores by birds. *New Phytol.* 222(2):1054-1060. <<https://dx.doi.org/10.1111/nph.15571>> <PMid:30372538>
- De Hoog G.S., Guarro J., Gené J., Ahmed S., Al-hatmi A.M.S., Figueiras M.J. & Vitale R.G. 2020. *Atlas of Clinical Fungi*. 4th ed. Hilversum. 1595p.
- Freitas L.W.S., Lima C.L.F., Souza C.A.F., Cunha G.C.L., Leitão J.D.A., Silva S.B.G., Cruz M.O., Oliveira R.J.V. & Santiago A.L.C.M.A. 2021. A new occurrence of *Mucor inaequisporus* Dade (Mucorales, Mucoromycota) from soil of the Atlantic Forest in the Brazilian Northeast. *Check List* 17(3):753-758. <<https://dx.doi.org/10.15560/17.3.753>>
- Hamza A.A. & Gunyar O.A. 2022. Nutritional value of commercial broiler feed supplemented with olive mill waste fermented with probiotic *Rhizopus oryzae* strains. *J. Appl. Microbiol.* 133(3):1872-1881. <<https://dx.doi.org/10.1111/jam.15694>> <PMid:35771120>
- Howard D.H. 2003. *Pathogenic Fungi in Humans and Animals*. Marcel Dekker, New York. 808p.
- Hubalek Z. 2004. An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds. *J. Wild. Dis.* 40(4):639-659. <<https://dx.doi.org/10.7589/0090-3558-40.4.639>> <PMid:15650082>
- ICMBio 1987. Decreto nº 9.802 de 12 de março de 1987. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Available at <<http://www.icmbio.gov.br>> Accessed on Nov. 1, 2021.
- Köptcke F.B.N., Pinto L.A., Moraes T.T., Farias V.M., Aronovich M. & Keller L.A.M. 2021. Determinação da microbiota e micotoxinas em rações comerciais destinadas para calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) no Rio de Janeiro, Brasil. *Braz. J. Anim. Environ. Res.* 4(3):4385-4394. <<https://dx.doi.org/10.34188/bjaerv4n3-123>>
- Kraisitudomsook N., Healy R.A. & Smith M.E. 2021. Molecular systematics and taxonomic overview of the bird's nest fungi (Nidulariaceae). *Fungal Biol.* 125(9):693-703. <<https://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2021.04.003>> <PMid:34420696>

- Labrador M.D.M., Doña J., Serrano D. & Jovani R. 2021. Quantitative interspecific approach to the stylosphere: Patterns of bacteria and fungi abundance on passerine bird feathers. *Microb. Ecol.* 81(4):1088-1097. <<https://dx.doi.org/10.1007/s00248-020-01634-2>> <PMid:33225409>
- Lima A.K.S., Rodrigues J.R., Souza I.S., Rodrigues J.C., Souza T.C., Maia C.R. & Fernandes O.C.C. 2017. Fungos isolados da água de consumo de uma comunidade ribeirinha do médio Solimões, Amazonas - Brasil: potencial patogênico. *Revta Amb. Água* 12(6):1017-1024. <<https://dx.doi.org/10.4136/ambi-agua.2018>>
- Lima D.A., Novo S.P.C., Santos F.N. & Maciel E.M.S.G. 2020. Aspectos epidemiológicos, sociais e ambientais relacionados a transmissão e ao controle da leishmaniose visceral canina na Ilha da Marambaia, Mangaratiba - Rio de Janeiro. *Revta Saúde Meio Amb.* 10(1):157-174.
- Lindström J. 1999 Early development and fitness in birds and mammals. *Trends Ecol. Evol.* 14(9):343-348. <[https://dx.doi.org/10.1016/S0169-5347\(99\)01639-0](https://dx.doi.org/10.1016/S0169-5347(99)01639-0)> <PMid:10441307>
- Madsen A.M., Zhang F., Zeng Y. & Frederiksen M.W. 2023. Airborne methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, other bacteria, fungi, endotoxin, and dust in a pigeon exhibition. *Environ. Res.* 216(Pt 2):114642. <<https://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2022.114642>> <PMid:36306875>
- Nardoni S. & Mancianti F. 2021. Survey of keratinophilic fungi from feathers of birds in Tuscany. *Biology* 10(12):1317. <<https://dx.doi.org/10.3390/biology10121317>> <PMid:34943235>
- Oliveira J., Bonci M.M., Conceição A.B.S., Silva L.G., Barone F.A., Berto B.P. & Oliveira Á. 2022. Fungi isolated from wild birds and litter in the Itatiaia National Park in Southeastern Brazil. *Biodiv. Bras.* 12(4):1-10. <<https://dx.doi.org/10.37002/biodiversidadebrasileira.v12i4.2261>>
- Pacheco J.F., Silveira L.F., Aleixo A., Agne C.E., Bencke G.A., Bravo G.A., Brito G.R.R., Cohn-Haft M., Maurício G.N., Naka L.N., Olmos F., Posso S.R., Lees A.C., Figueiredo L.F., Carrano E., Guedes R.C., Cesari E., Franz I., Schunck F. & Piacentini V.Q. 2021. Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee - second edition. *Ornithol. Res.* 29:94-105. <<https://dx.doi.org/10.1007/s43388-021-00058-x>>

- Pitt J.I. 1994. The current role of *Aspergillus* and *Penicillium* in human and animal health. J. Med. Vet. Mycol. 32(Supl.1):17-32. <<https://dx.doi.org/10.1080/02681219480000701>>
- Reding P. 2003. Fungal diseases, p.275-291. In: Samour J. (Ed.), Avian Medicine. Edinburgh, UK.
- Ridgely R.S. & Tudor G. 1994. The Birds of South America: the suboscine passerines. University of Texas Press, Texas. 940p.
- Samson R.A., Hoekstra E.S., Frisvad J.C. & Filtenborg O. 2000. Introduction to Food and Airborne Fungi. 6th ed. Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Utrecht. 396p.
- Schweizer D., Petter G., César R.G., Ferraz S., Moreno V.S., Brancalion P.H.S. & Bugmann H. 2022. Natural forest regrowth under different land use intensities and landscape configurations in the Brazilian Atlantic Forest. For. Ecol. Manag. 508:120012. <<https://dx.doi.org/10.1016/j.foreco.2022.120012>>
- Sick H. 1997. Ornitologia Brasileira. Editora Nova Fronteira, Rio de Janeiro. 1700p.
- Sidrim J.J.C. & Rocha M.F.G. 2004. Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 396p.
- Simi W.B., Leite Jr. D.P., Paula C.R., Hoffmann-Santos H.D., Takahara D.T. & Hahn R.C. 2019. Yeasts and filamentous fungi in psittacidae and birds of prey droppings in midwest region of Brazil: a potential hazard to human health. Braz. J. Biol. 79(3):414-422. <<https://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.181192>> <PMid:30304251>
- Sugiharto S. 2019. A review of filamentous fungi in broiler production. Ann. Agricult. Sci. 64(1):1-8. <<https://dx.doi.org/10.1016/j.aos.2019.05.005>>
- Talbot J.J., Thompson P., Vogelnest L. & Barrs V.R. 2018. Identification of pathogenic *Aspergillus* isolates from captive birds in Australia. Med. Mycol. 56(8):1038-1041. <<https://dx.doi.org/10.1093/mmy/myx137>> <PMid:29228225>
- White T.J., Bruns T., Lee S. & Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, p.315-322. In: Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J. & White T.J. (Eds), PCR Protocols: a guide to methods and applications. Academic, San Diego.



Isoospora pichororei n. sp. (Chromista: Apicomplexa: Eimeriidae) from rufous-capped spinetails *Synallaxis ruficapilla* Vieillot, 1819 (Passeriformes: Furnariidae: Synallaxiinae) in South America

Jhon Lennon Genovez-Oliveira^a, Carlos Nei Ortúzar-Ferreira^a, Mariana de Souza Oliveira^a, Águida Aparecida de Oliveira^b, Viviane Moreira de Lima^c, Bruno Pereira Berto^{c,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR-465 km 7, 23897-000 Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil

^b Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR-465 km 7, 23897-000 Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil

^c Departamento de Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR-465 km 7, 23897-000 Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
coccidia
Oocysts
Morphology
Taxonomy
Sequencing
Phylogeny
Neotropical birds
Parque Nacional do Itatiaia
Brazil

ABSTRACT

Spinetails are a suboscine passerines of the genus *Synallaxis* Vieillot, 1818 which have great interest for ornithology, given the wide diversity of 37 species that are distributed throughout the Neotropical region. Despite this wide diversity and distribution, *Synallaxis* spp. have never been recorded as hosts of coccidian parasites. In this context, the current study describes a new species of *Isoospora* Schneider, 1881 from rufous-capped spinetails *Synallaxis ruficapilla* Vieillot, 1819 captured in the Itatiaia National Park, which is a federal conservation unit in Southeastern Brazil. The oocysts of *Isoospora pichororei* Genovez-Oliveira & Berto n. sp. are subspheroidal to ovoidal, measuring on average 25 by 21 µm. Micropyle is present, but discrete. Oocyst residuum absent, but one or two polar granules are present. Sporocysts are ellipsoidal with slightly pointed posterior end, measuring on average 17 by 10 µm. Stieda and sub-Stieda bodies are present. Sporocyst residuum is clustered among the vermiform sporozoites, which have striations, refractile bodies and nucleus. This morphology was different from the other *Isoospora* spp. recorded in the host family Furnariidae. Molecular identification was targeted by the amplification and sequencing of a locus of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 (*cox1*) gene. This sequence had the highest similarity of 99.5% with a sequence deposited for *Isoospora oliveirai* Ortúzar-Ferreira & Berto, 2020, which is a coccidian species that parasitizes suboscine tityrids *Schiffornis virescens* (Lafresnaye, 1838), also in the Itatiaia National Park. Phylogenetic analysis grouped some species in subclades, including *I. pichororei* with *I. oliveirai*; however, it was inconclusive in an expectation of parasite-host coevolution. Finally, *I. pichororei* is established as new to science, being the first description from Synallaxiinae and the third description from Furnariidae. Furthermore, this is the first *Isoospora* sp. from the host family Furnariidae to have a molecular supplementation by sequencing a locus of the *cox1* gene of the mitochondrial genome.

1. Introduction

The avifauna of South America is remarkably diverse, with countless species from the most different orders, families and genera [1,2]. Spinetails of the genus *Synallaxis* Vieillot, 1818 are suboscine passerines of great interest for ornithology, given the wide diversity of 37 species that are distributed throughout the Neotropical region [1,3]. One of the species of spinetails that occurs in Brazil is the rufous-capped spinetail

Synallaxis ruficapilla Vieillot, 1819, which is distributed throughout Southeastern Brazil, reaching as far as Argentina and Paraguay [1,2].

Research on parasites of wild birds has been important for monitoring the health of wild bird populations and evaluating the conservation status of certain ecosystems, in addition to determining the diversity and distribution of parasitic species in the wild [4]. However, despite significant advances in recent decades, the diversity of parasites from wild birds is little known, especially some parasitic groups, such as

* Corresponding author.

E-mail address: bertobp@ufrj.br (B.P. Berto).

<https://doi.org/10.1016/j.parint.2024.102936>

Received 25 June 2024; Received in revised form 19 July 2024; Accepted 22 July 2024

Available online 24 July 2024

1383-5769/© 2024 Elsevier B.V. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

coccidians, which are rarely, or even not, reported from some taxa [5]. This is the case of the subfamily Synallaxiinae, which despite having a diversity of 17 genera and 59 species distributed throughout Brazil [2], does not have any described coccidian species. This lack of descriptions should be associated with no, or few, fecal exams performed in this subfamily, rather than negative parasitism [5].

In this context, the present study provides a description and molecular identification of a new species of *Isospora* Schneider, 1881 from rufous-capped spinetails *S. ruficapilla* captured in the Itatiaia National Park, which is a federal conservation unit in Southeastern Brazil.

2. Materials and methods

2.1. Sample collection

Twelve expeditions, between 2014 and 2022, were conducted in the Itatiaia National Park, a protected area with a high degree of vulnerability, located in the Serra da Mantiqueira on the border of the States of Rio de Janeiro, Minas Gerais and São Paulo [6]. Eleven of these expeditions were conducted in three different locations in the lower part of the park, at altitudes ranging from 600 to 1200 m: (1) First to the fifth kilometre of the Ruy Braga Crossing (22°26'17"S, 44°37'33"W) (five expeditions); (2) Butterfly Trail (22°26'57"S, 44°36'25"W) (four expeditions); and (3) Trail near the Park entrance (22°27'38"S, 44°35'34"W) (two expeditions). Only one of these expeditions was conducted in the high-altitude plateau of the park (22°22'07"S 44°44'44"W), at an altitude of approximately 2000 m. Mist nets were used for the capture of the birds. A total of 18 specimens of *S. ruficapilla* were captured, of which only one was captured on the high-altitude plateau of the park. The captured birds were specifically identified [7,8], photographed and banded with numbered metal rings provided by the Brazilian bird-ringing agency (Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Aves Silvestres – CEMAVE) [9]. Subsequently, the birds were kept in individual boxes lined with clean paper until defecation, when they were released at the same place of capture. Each fresh droplet of feces from each individual bird was placed individually in a centrifuge tube with a potassium dichromate 2.5% ($K_2Cr_2O_7$) solution [10].

2.2. Morphological analysis

Samples were examined at the Laboratory of Biology of Coccidians (Laboratório de Biologia de Coccídios – LABIOCOC), Federal Rural University of Rio de Janeiro (Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ). All samples were incubated at room temperature (25 °C) for 7 days. Oocysts were isolated by flotation in Sheather's sugar saturated solution (specific gravity: 1.20) [11]. Prevalence was calculated as the number of hosts positive for coccidian oocysts divided by the number of hosts examined [12]. Density refers to the number of oocysts per fecal droplet (OPD) [10,12]. Morphological observations and measurements were made following the guidelines of Duszynski and Wilber [11] and Berto et al. [13], using an Olympus BX binocular microscope (Olympus Optical, Tokyo, Japan) equipped with a digital camera Eureka 5.0 (BEL Photonics, Monza, Italy). Line drawings, photomicrographs and other figures were edited using two software applications (Corel DRAW and Corel PHOTO-PAINT) from CorelDRAW® (Corel Draw Graphics Suite, Version 2020, Corel Corporation, Canada). All measurements are in micrometres and are given as the range followed by the mean in parentheses.

2.3. Molecular analysis

Thirty-two oocysts of the same morphotype under light microscopy, which were recovered from a single fecal droplet, were isolated, resuspended in 0.9% (v/v) phosphate buffered saline (PBS) and washed by centrifuging until the supernatant became clear [14]. DNA was extracted from the oocysts using the Quick DNA Kit (Zymo Research)

Table 1
Comparative morphology of *Isospora* spp. recorded from Fumariidae in New World.

Coccidian species	Host species (family, Subfamily)	Reference	Oocyst			Sporozoyst							Residium			
			Shape	L ¹ (µm)	W ² (µm)	L/W ³	Wall (µm)	Microspyle	Polar granule	Shape	L ¹ (µm)	W ² (µm)		L/W ³	Stieda body	Substieda body
<i>Isospora hyalocistum</i> McQuiston & Capparella, 1994	<i>Automolus subulatus</i> (Spix, 1824) (Fumariidae: Philydorinae)	McQuiston & Capparella [18]	ovoidal	15–21 (17.5)	14–19 (16.0)	1.0–1.3 (1.09)	smooth	absent	present, 1, large, irregular, 2.0–3.5	ovoidal	11–15 (12.4)	6–11 (8.0)	1.4–2.2 (1.55)	small, nipple-like	rectangular	uniform granules in a subspherical cluster
<i>Isospora azumoli</i> McQuiston, Barber & Capparella, 1999	<i>Automolus azobolus</i> (Tschudi, 1844); <i>Automolus infuscatus</i> (Slater, 1856) (Fumariidae: Philydorinae)	McQuiston et al. [19]	subspheroidal to ovoidal	18–28 (23.4)	17–24 (21.3)	1.0–1.2 (1.10)	smooth	absent	present, 1	ovoidal	14–17 (15.4)	8–11 (9.9)	1.4–1.9 (1.60)	small, nipple-like	small, acentric	subspherical cluster of coarse granules
<i>Isospora picharelli</i> Genoves-Oliveira & Berto n. sp.	<i>Synallaxis ruficapilla</i> Vieillot, 1819 (Fumariidae: Synallaxinae)	current study	ovoidal to elongate ellipsoidal	21–32 (25.5)	18–24 (21.1)	1.1–1.7 (1.21)	smooth, 1.5–1.9 (1.7)	present, discrete or barely discernible, 3.8–4.3 (4.1)	present, 1 or infrequently 2, 3.0–3.3 × 2.4–2.6 (3.1 × 2.5)	ellipsoidal with a slightly pointed posterior end	15–19 (16.6)	9–12 (10.2)	1.5–1.8 (1.63)	prominent, knob-like to bubble-shaped, 1.0–1.6 × 1.5–2.0 (1.2 × 1.8)	rectangular to trapezoidal, 1.1–1.7 × 2.1–2.8 (1.4 × 2.5)	numerous granules in a large and irregular cluster, 5.7–7.0 × 4.3–6.0 (6.2 × 5.1)

¹ Length.

² Width.

³ Ratio of length to width.

according to the manufacturer's instructions. Four freeze-thaw cycles were applied prior to DNA extraction in order to achieve complete lysis of the oocysts. PCR amplification for a locus (COIBF1) of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 (*cox1*) gene were targeted [14,15]. For amplification, a 25 µl PCR reaction was prepared using 3 µl of genomic DNA (<1 µg), 12.5 µl of GoTaq® G2 Hot Start Colorless Master Mix (Promega Labs) (1×), 0.25 µl of each Primer (0.2 µM) and 9 µl of Nuclease Free Water. PCR amplification was conducted using the cycling conditions originally indicated by Ortúzar-Ferreira et al. [15]. Amplicons from the nested PCR was purified using the ReliaPrep™ DNA Clean-Up and Concentration System.

2.4. DNA sequence analyses

PCR product was sequenced using the PCR forward and reverse primers by Ludwig Biotechnology, where an ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California) was used for Sanger sequencing. The result of the sequencing reaction was analyzed and edited in the Chromas 2.6 program. Sequence was compared with other coccidian parasites available on the GenBank database using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Alignment was created in MEGA v10.2.6 using Clustal W (<http://www.clustalw.genome.jp>). Phylogenetic relationship was reconstructed using Bayesian Inference in the MrBayes v3.2.7 [16] and using Maximum likelihood method in the MEGA [17]. The best fitting evolutionary model for the phylogenetic analysis was selected by the Model Selection in MEGA. Bayesian Inference analysis was conducted under the GTR + G evolutionary model for 1000,000 generations, and the tree was summarized after removing 25% of burn-in. Maximum likelihood analysis was conducted under the TN93 + G evolutionary model, and the bootstrap values were calculated by 1000 replicates. The resultant phylogenetic tree was visualized in the MrBayes and MEGA and exported in FigTree v1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/>).

3. Results

3.1. Prevalence and description

Nine of 18 (50%) *S. ruficapilla* captured in the Itatiaia National Park were positive for coccidian oocysts. The only specimen captured in the high-altitude plateau of the park was positive. The observed coccidian oocysts were classified in the genus *Isoospora*; however, they did not share equivalent taxonomic characters with any *Isoospora* sp. previously recorded from passerines of the same genus, subfamily or family as the host (Table 1). This material is described below.

Isoospora pichororei Genoves-Oliveira & Berto n. sp. (Figs. 1, 2).

Kingdom: Chromista Cavalier-Smith, 1981.

Phylum: Miozoa Cavalier-Smith, 1987.

Infraphylum: Apicomplexa Levine, 1970.

Class: Coccidiomorpha Doflein, 1901.

Subclass: Coccidia Leuckart, 1879.

Family: Eimeriidae Minchin, 1903.

Genus: *Isoospora* Schneider, 1881.

Oocyst ($n = 114$) ovoidal to elongate ellipsoidal, $21\text{--}32 \times 18\text{--}24$ (25.5×21.1); L/W ratio 1.1–1.7 (1.21). Wall bi-layered, 1.5–1.9 (1.7) thick, outer layer smooth, c.2/3 of total thickness. Micropyle is present, but discrete or barely discernible in some oocysts, 3.8–4.3 (4.1) wide. Oocyst residuum absent, but one (infrequently two) polar granule is present, 3.0–3.3 \times 2.4–2.6 (3.1 \times 2.5). Sporocyst ($n = 114$) ellipsoidal with a slightly pointed posterior end, $15\text{--}19 \times 9\text{--}12$ (16.6×10.2); L/W ratio 1.5–1.8 (1.63). Stieda body present, prominent, knob-like to bubble-shaped, 1.0–1.6 high \times 1.5–2.0 wide (1.2 \times 1.8). Sub-Stieda body present, rectangular to trapezoidal, 1.1–1.7 high \times 2.1–2.8 wide (1.4 \times 2.5). Para-Stieda body absent. Sporocyst residuum present, consisting of numerous granules in a large and irregular cluster, 5.7–7.0 \times 4.3–6.0 (6.2 \times 5.1). Sporozoites vermiform, with striations on the

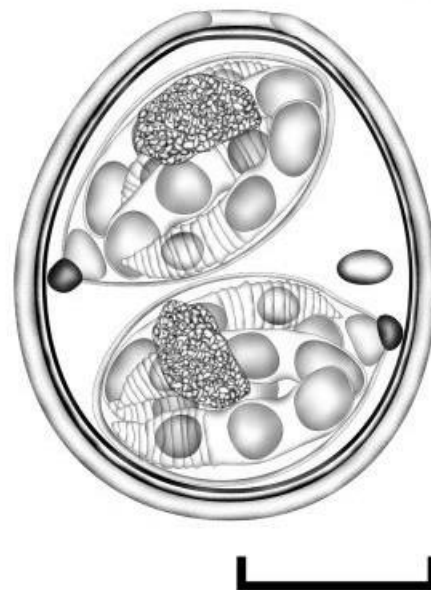


Fig. 1. Composite line drawing of the sporulated oocyst of *Isoospora pichororei* from rufous-capped spinetails *Synallaxis ruficapilla* in Southeastern Brazil. Scale bar: 10 µm.

entire anterior half, anterior and posterior refractile bodies and a central nucleus.

3.2. Diagnosis

Isoospora pichororei is the third coccidian species recorded for Furnariidae, but the first record in the subfamily Synallaxiinae. This species is different in most taxonomic characters from *Isoospora hyloctistum* McQuistion & Capparella, 1994 and *Isoospora automoli* McQuistion, Barber & Capparella, 1999, which are recorded in the same host family, but from a different subfamily, Philydorinae (Table 1) [2,18,19]. Typical characteristic features of *I. pichororei* are the discrete micropyle, prominent Stieda body, and striations in the sporozoites. Furthermore, *I. pichororei* can be easily differentiated from *I. hyloctistum* and *I. automoli* by the larger oocysts, elongate ellipsoidal shape (as seen by the L/W ratio of up to 1.7), up to two polar granules, sporocysts with pointed end, and large and irregular sporocyst residuum.

3.3. Taxonomic summary

Type host: *Synallaxis ruficapilla* Vieillot, 1819 (Aves: Passeriformes: Tyranni: Furnariida: Furnarioidea: Furnariidae: Synallaxiinae), chivi vireo.

Type locality: Itatiaia National Park (22°26'S, 44°36'W), South-eastern Brazil.

Type-material: Photosyntypes, line drawing and oocysts in 2.5% K₂Cr₂O₇ solution [20] are deposited and available (<http://r1.ufrj.br/1/abico/colecao.html>) in the Parasitology Collection of the Laboratório de Biologia de Coccídios, at UFRJ, under the repository number P-138/2024. Photographs of the type-host specimen (syntype) are deposited in the same collection.

Representative DNA sequence: DNA amplification of the COIBF1 locus [15] showed clear band around ~250 bp. Representative sequence was deposited in the GenBank database under the accession number: PP944376.

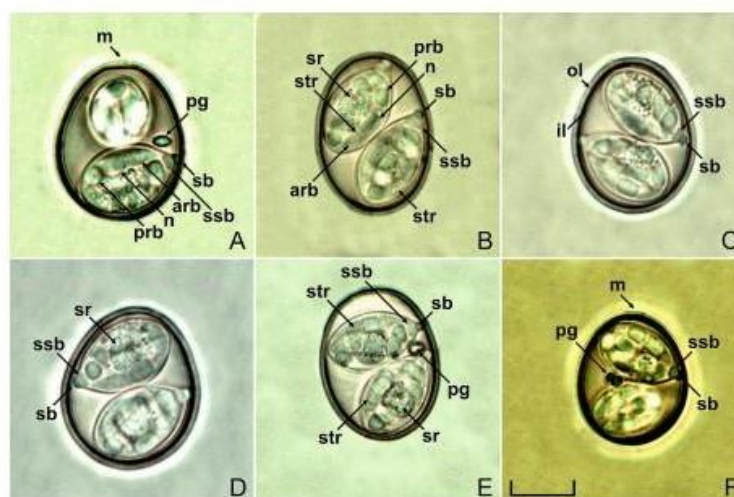


Fig. 2. Photomicrographs of sporulated oocysts of *Isospora pichororei* from rufous-capped spinetails *Synallaxis ruficapilla* in Southeastern Brazil. Note the anterior (arb) and posterior (prb) refractile bodies, micropyle (m), nucleus (n), outer (ol) and inner (il) layer of the oocyst wall, polar granule (pg), sporocyst residuum (sr), Stieda body (sb) and sub-Stieda (ssb) bodies and striations (str). All photomicrographs are at the same scale. Scale-bar: 10 μ m.

ZooBank registration: To comply with the regulations set out in Article 8.5 of the amended 2012 version of the International Code of Zoological Nomenclature [21] details of the new species have been submitted to ZooBank. The Life Science Identifier (LSID) of the article is urn:lsid:zoobank.org:pub:A2EE5479-9147-48A7-A84F-8E325B4E6FFD. The LSID for the new name *Isospora pichororei* Genovez-Oliveira & Berto n. sp. is urn:lsid:zoobank.org:act:B72E021E-9149-4C8E-BF7E-33CF41A33C46.

Site of infection: Unknown, oocysts were recovered from feces.

island canaries *Serinus canaria* (Linnaeus, 1758) which has a worldwide distribution [24].

3.5. Phylogenetic analyses

Phylogenetic analyses based on the CO1BF1 locus included sequences from coccidians available in GenBank (Fig. 3). *Eimeria tenella* (Railliet & Lucet, 1891) was used as the outgroup. *Isospora pichororei* sat in a monophyletic group with *I. oliveirai* with high posterior probabilities

Prevalence : 50%(9/18) in total; 47%(8/17) in the lower part of the Itatiaia National Park; and 100%(1/1) in the high – altitude plateau.

Density: Mean of 658 (ranging from 7 to 4576) OPD. The positive specimen in the high-altitude plateau shed 250 OPD.

Etymology: The specific name is derived from the common local name for the host, which is 'pichororé'.

3.4. Molecular analysis

Molecular analysis at CO1BF1 locus of the oocysts morphologically identified as *I. pichororei* recovered from *S. ruficapilla* resulted in a sequence that differed from other *Isospora* spp. deposited in the GenBank database.

The sequence of *I. pichororei* had the highest similarity of 99.5% with a sequence deposited for *Isospora oliveirai* Ortúzar-Ferreira & Berto, 2020, which is a species that parasitizes the greenish schiffornis *Schiffornis virescens* (Lafresnaye, 1838), a suboscine passerine from the Tityridae family. *Isospora oliveirai* also has the Itatiaia National Park as type locality [22]. More distantly, with about 98% similarity, are two coccidian parasites of oscine passerines: (1) *Isospora trincaferri* Berto, Balthazar, Flausino & Lopes, 2008 from green-winged saltators *Saltator similis* d'Orbigny & Lafresnaye, 1837, which was recently reported in Itatiaia National Park [23]; and (2) *Isospora canaria* Box, 1975 of the

and bootstrap supports, corresponding to similarity of 99.5% between these *Isospora* spp. Considering the preceding clade, there are also *Isospora* spp. of oscine and suboscine passerines from different families, as also observed in the sister clades.

4. Discussion

In the taxonomic review of coccidians from New World passerine birds by Berto et al. [25] three *Isospora* spp. are recorded for the host family Furnariidae. This is due to the fact that the leaflossers *Sclerurus* spp. were classified in Furnariidae at that time; however, these passerines are currently the type genus of Scleruridae [2]. In contrast, it is noteworthy that BirdLife International [1] still classifies the leaflossers *Sclerurus* spp. as furnariid birds. In any case, the only species described from this passerine genus is *Isospora scleruri* McQuistion & Capparella, 1994, which was recovered from black-tailed leaflossers *Sclerurus caudatus* (Vieillot, 1816) and tawny-throated leaflossers *Sclerurus mexicanus* Sclater, 1857 in Ecuador. This species is similar in size and shape to *I. pichororei*, but can be differentiated mainly by the absence of micropyle and the wavy shape of the sub-Stieda body [18]. In addition to this, no other *Isospora* sp. has been described from former furnariids.

All *Isospora* spp. of furnariid and sclerurid birds were described by the research group of Dr. Thomas McQuistion in the 1990s in the



Fig. 3. Phylogenetic relationship of *Isospora pichororei* from rufous-capped spinetails *Synallaxis ruficapilla* inferred by Bayesian analysis for a locus (COIBF1) within *cox1* gene of the mitochondrial genome. Branch lengths correspond to mean posterior estimates of evolutionary distances (scale-bar: 0.006). Branch labels at the nodes show posterior probabilities (left) under the Bayesian Inference analysis and bootstrap values (right) derived from Maximum likelihood analysis. Only posterior probabilities higher than 0.5 are displayed. The phylograms were outgrouped using *Eimeria tenella* (Railliet & Lucet, 1891).

Provinces of Sucumbios and Esmeraldas in Ecuador [18,19,25]. Despite the distance of these type localities to the type locality of *I. pichororei* in southeastern Brazil, it is worth highlighting that all of these hosts *Automolus* spp. e *Sclerurus* spp. have only cis-Andean distribution, or cis-Andean and trans-Andean distribution, in addition to being distributed in the Brazilian Amazon. This observation highlights the possibility of dispersion and transmission of these *Isospora* spp., originally recorded in Ecuador, to susceptible birds in Brazil [4]. In this context, although *S. ruficapilla* is not sympatric with these host species due to its distribution being almost restricted to southeastern Brazil, other susceptible furnariid birds that have wide distributions could disperse these *Isospora* spp. throughout the Neotropical region, including southeastern Brazil [4]. This dispersal dynamic was observed for *Isospora sagittulae* McQuistion & Capparella, 1992 from antbirds, which was originally described from Ecuador [26], posteriorly reported in the Brazilian Amazon [27] and, finally, in the Atlantic Forest of southeastern Brazil [28].

On the other hand, the foliage-gleaners *Automolus* spp. are furnariid birds classified in the subfamily Philydorinae, unlike *S. ruficapilla*, which is classified in the subfamily Synallaxiinae; while leaf-tossers *Sclerurus* spp. are currently classified in Scleruridae as mentioned previously [2]. Therefore, when considering specificity at the host sub-family level, *Isospora* spp. recorded from *Automolus* spp. would not be infective for *S. ruficapilla*; and to consider that *I. scleruri* can infect *S. ruficapilla*, specificity beyond the host family should be considered. In this sense, in the current work it was decided to consider only *Isospora* spp. recorded from *Automolus* spp. for taxonomic comparison in Table 1, according to the concept of specificity at the host-family level for eimeriid coccidians widely disseminated in the scientific literature [11,25].

Aiming to evaluate the susceptibility of *S. ruficapilla* to *Isospora* spp. recorded from *Automolus* spp. and *Sclerurus* spp., in addition to the basic morphological comparison of their oocysts, a direct experimental infection and/or molecular analysis by sequencing certain gene loci should be carried out [11,13]. In the current work, the COIBF1 locus was targeted, which was a pioneer in molecular studies of *Isospora* spp. of passerines, and is the locus that has the largest number of deposits of *Isospora* spp. in GenBank. This locus was originally targeted by Dolnik et al. [14] because it belongs to the *cox1* gene, which is the most suitable for species delimitation and differentiation [15,29], and because it is the most successful for DNA amplification from a single or few oocysts [14].

The phylogenetic analysis constructed for the COIBF1 locus was inconclusive for *Isospora* spp. of passerines despite the large number

deposited in GenBank, as already highlighted in previous works [15,22,30]. In the cladogram (Fig. 3) three coherent subclades with two *Isospora* spp. are observed, including the subclade with *I. pichororei* and *I. oliveirai*; however, the larger clades group together *Isospora* spp. from oscine and suboscine passerines from different host families. This inconclusive observation is based on the expectation of coevolution, where parasites evolve together with their hosts and, therefore, should form monophyletic groups according to their host families [4]. On the other hand, other morphological, biological and/or ecological characteristics may be observed that support these phylogenetic results. For example, *I. pichororei* and *I. oliveirai*, which were the most similar and sat in monophyly in the phylogenetic analysis, despite parasitizing distinct suboscine passerine families, have some similar characteristic features in their oocysts, such as: oocyst size, shape of the Stieda and sub-Stieda bodies, and size and shape of the sporocyst; despite being absolutely distinct in the oocyst wall, polar granule and oocyst residuum [22]. There is also the observation that many of the coccidian species in the clades and subclades were recorded in the Itatiaia National Park, which would support the perspective of monophyletic groups formed from geographic regions; however, some species in these clades are recorded from distant localities, including other zoogeographic regions. In any case, there is currently no evidence or approaches that parsimoniously support the phylogenetic results observed from sequences at the COIBF1 locus of *Isospora* spp. from passerines, mainly from a co-evolutionary perspective.

5. Conclusion

Finally, after analyzing the morphological and molecular data of the species identified in the current study in comparison with related species recorded in the scientific literature, *I. pichororei* is established as new to science, being the first description from Synallaxiinae and the third description from Furnariidae. Furthermore, this is the first *Isospora* sp. from the host family Furnariidae to have a molecular supplementation by sequencing a locus of the *cox1* gene of the mitochondrial genome.

Ethics statement

Field-collecting permits were issued by the Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio), through the Biodiversity Authorization and Information System (Sistema de Autorização e Informação em

Biodiversidade – SISBIO) under license numbers 45200, 54951 and 70132; and the Animal Ethics Committee (Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA) of the UFRRJ under protocol numbers 036/2014(IV), 008/2015(II), 6606250616(IV) and University of Grande Rio (Universidade do Grande Rio – UNIGRANRIO) under protocol number 021/2019. Banding permits and metal rings were issued by CEMAVE/ICMBio (Senior Ringer: BPB, registration 5967850). All applicable institutional, national, and international guidelines for the care and use of animals were followed.

Funding

This study was supported by the Brazilian Council for Scientific and Technological Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq), Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES) and Carlos Chagas Filho Foundation for Research Support in the State of Rio de Janeiro (Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ). JLG-O and CNO-F have scholarships from CAPES (Grant/Award Number: 001). MSO has a postdoctoral scholarship from FAPERJ (Grant/Award Number: E-26/204.228/2021). VML has a fellowship from FAPERJ (Grant/Award Number: E-27/211.566/2021). BPB has a fellowship from CNPq (Grant/Award Number: 302345/2022-1) and from FAPERJ (Grant/Award Number: E-26/200.565/2023).

CRediT authorship contribution statement

Jhon Lennon Genoves-Oliveira: Writing – review & editing, Writing – original draft, Validation, Methodology, Investigation. **Carlos Nei Ortúzar-Ferreira:** Writing – review & editing, Validation, Methodology, Investigation. **Mariana de Souza Oliveira:** Writing – review & editing, Validation, Supervision, Methodology, Investigation. **Águida Aparecida de Oliveira:** Writing – review & editing, Validation, Supervision, Methodology, Investigation. **Viviane Moreira de Lima:** Writing – review & editing, Validation, Supervision, Project administration, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Conceptualization. **Bruno Pereira Berto:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Validation, Supervision, Software, Resources, Project administration, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Formal analysis, Data curation, Conceptualization.

Declaration of competing interest

The authors declare no competing interests.

Data availability

The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Acknowledgments

We are thankful to the staff at the Parque Nacional do Itatiaia, mainly to the research coordinators Dr. Léo Nascimento (previous) and Marcelo Souza Motta (current), who allowed us to access and use some facilities during the expeditions.

References

- [1] BirdLife International, The IUCN Red List of Threatened Species. <http://www.iucnredlist.org>, 2024 accessed 19.06.24.
- [2] J.F. Pacheco, L.F. Silveira, A. Aleixo, C.E. Agne, G.A. Bencke, G.A. Bravo, G.R. Brito, M. Cohn-Haft, G.N. Maurício, L.N. Naka, F. Olmos, S. Posso, A.C. Lees, L.F. A. Figueiredo, E. Carrano, R.C. Guedes, E. Cesari, I. Franz, F. Schunck, V. Q. Piacentini, Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian ornithological records committee – second edition, *Ornithol. Res.* 29 (2021) 94–105, <https://doi.org/10.1007/s43388-021-00058-x>.
- [3] H. Sick, *Ornitologia Brasileira*, Nova Fronteira, Rio de Janeiro, 1997.
- [4] B.P. Berto, C.W.G. Lopes, Coccidia of wild birds as ecological biomarkers: some approaches on parasite-host-environment interaction, *J. Parasitol.* 106 (2020) 707–713, <https://doi.org/10.1645/19-148>.
- [5] D.W. Duszynski, Biodiversity of the Coccidia (Apicomplexa: Conoidasida) in vertebrates: what we know, what we do not know, and what needs to be done, *Folia Parasitol.* 68 (2021) 001, <https://doi.org/10.14411/fp.2021.001>.
- [6] ICMBIO, Parque Nacional do Itatiaia. <http://www.icmbio.gov.br/parnaatiaia>, 2024 accessed 19.06.24.
- [7] D.J.M. Mello, G.J.M. Mello, F. Maillet-Rodrigues, L.M. Lima, *Aves do Sudeste do Brasil: Guia de identificação*, Editoração Irmãos Mello, Rio de Janeiro, 2020.
- [8] R.S. Ridgely, J.A. Gwynne, G. Tudor, M. Argel, *Aves do Brasil: Mata Atlântica do Sudeste*, Horizonte Geográfico, São Paulo, 2015.
- [9] A.E.B.A. Sousa, P.P. Serafini, *Manual de Anilhamento de Aves Silvestres*, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Aves Silvestres, Brasília, 2020.
- [10] O.V. Dolnik, The relative stability of chronic *Isospora sylvianthina* (Protozoa: Apicomplexa) infection in blackcaps (*Sylvia atricapilla*): evaluation of a simplified method of estimating isosporan infection intensity in passerine birds, *Parasitol. Res.* 100 (2006) 155–160, <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0253-5>.
- [11] D.W. Duszynski, P.G. Wilber, A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeriidae, *J. Parasitol.* 83 (1997) 333–336, <https://doi.org/10.2307/3284470>.
- [12] A.O. Bush, K.D. Lafferty, J.M. Lotz, A.W. Shostak, Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited, *J. Parasitol.* 83 (1997) 575–583, <https://doi.org/10.2307/3284227>.
- [13] B.P. Berto, D. McIntosh, C.W.G. Lopes, Studies on coccidian oocysts (Apicomplexa: Eucoccidiorida), *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 23 (2014) 1–15, <https://doi.org/10.1590/S1984-29612014001>.
- [14] O.V. Dolnik, V. Palinauskas, S. Bensch, Individual oocysts of *Isospora* (Apicomplexa: Coccidia) parasites from avian feces: from photo to sequence, *J. Parasitol.* 95 (2009) 169–174, <https://doi.org/10.1645/GE-1873.1>.
- [15] C.N. Ortúzar-Ferreira, M.S. Oliveira, L.D.A.S. Andrade, E.R. Mello, V.M. Lima, B. P. Berto, Molecular and statistical approaches to the delimitation of Eimeriidae species: a case of extreme polymorphism in eimerian oocysts from the plumebeous pigeon *Patagioenas plumbea* (Vieillot, 1818) (Columbiformes) in South America, *Parasitol. Res.* 123 (2024) 42, <https://doi.org/10.1007/s00436-023-08045-5>.
- [16] F. Ronquist, M. Teslenko, P. Van Der Mark, D.L. Ayres, A. Darling, S. Höhna, B. Larget, L. Liu, M.A. Suchard, J.P. Huelsenbeck, MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space, *Syst. Biol.* 61 (2012) 539–542, <https://doi.org/10.1093/sysbio/syb029>.
- [17] S. Kumar, G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, K. Tamura, MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms, *Mol. Biol. Evol.* 35 (2018) 1547–1549, <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.
- [18] T.E. McQuiston, A.P. Capparella, Two new species of *Isospora* (Apicomplexa: Eimeriidae) from ovenbirds (Passeriformes: Furnariidae) of South America, *Trans. Am. Microsc. Soc.* 113 (1994) 90–95, <https://doi.org/10.2307/3226584>.
- [19] T.E. McQuiston, C.Y. Barber, A.P. Capparella, *Isospora automoli*, a new coccidian parasite (Apicomplexa: Eimeriidae) from the buff-throated foliage-gleaner *Automolus ochrolaemus* and the olive-backed foliage-gleaner *A. infuscatus* from South America, *Syst. Parasitol.* 44 (1999) 73–75, <https://doi.org/10.1023/A:1006121923716>.
- [20] R.B. Williams, P. Thebo, R.N. Marshall, J.A. Marshall, Coccidian oocysts as type specimens: long-term storage in aqueous potassium dichromate solution preserves DNA, *Syst. Parasitol.* 76 (2010) 69–76, <https://doi.org/10.1007/s11230-010-9234-2>.
- [21] ICZN, International Commission on Zoological Nomenclature, Amendment of articles 8, 9, 10, 21 and 78 of the international code of zoological nomenclature to expand and refine methods of publication, *Bull. Zool. Nomencl.* 69 (2012) 161–169, <https://doi.org/10.21805/iczn.v69i3.a8.161>.
- [22] C.N. Ortúzar-Ferreira, J.L. Genoves-Oliveira, M.S. Oliveira, E.R. Mello, S. Thode-Filho, Á.A. Oliveira, V.M. Lima, I. Ferreira, B.P. Berto, *Isospora oliveirai* n. sp. (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from the greenish schiffornis *Schiffornis virens* (Lafresnaye, 1838) (Passeriformes: Tyranni: Tityridae) in South America, *Acta Parasitol.* 65 (2020) 843–851, <https://doi.org/10.1007/s11686-020-00237-8>.
- [23] C. Maronezi, V.N. Ortúzar-Ferreira, L.A.S. Andrade, C.M.S. Caruncho, M. S. Oliveira, B.P. Berto, Report of coccidiosis in a free-living green-winged saltator *Saltator similis* in Itatiaia National Park in southeastern Brazil, *Pesq. Vet. Bras.* 44 (2024) e07451, <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-7451>.
- [24] B.P. Berto, E.L. Machado, C.M.D.S. Hossotani, B.M.S. Beretta, D.R.R. Silva, A. A. Nakamura, M.V. Meireles, Integrative taxonomy for the traditional coccidians (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from island canaries (Aves: Passeriformes: Fringillidae): worldwide distribution, morphological and molecular characterization, revaluations and establishment of junior synonyms, *Syst. Parasitol.* 100 (2023) 245–259, <https://doi.org/10.1007/s11230-023-10084-6>.
- [25] B.P. Berto, W. Flausino, D. McIntosh, W.L. Teixeira-Filho, C.W.G. Lopes, Coccidia of new world passerine birds (Aves: Passeriformes): a review of *Eimeria* Schneider, 1875 and *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae), *Syst. Parasitol.* 80 (2011) 159–204, <https://doi.org/10.1007/s11230-011-9317-8>.
- [26] T.E. McQuiston, A. Capparella, *Isospora sagittulae*, a new coccidian parasite (Apicomplexa: Eimeriidae) from the spotted antbird (*Hylophylax naevoides*), *Trans. Am. Microsc. Soc.* 111 (1992) 365–368, <https://doi.org/10.2307/3226711>.
- [27] B.P. Berto, B.B. Lopes, R.D. Melinski, A. Souza, C. Ribas, F. Abreu, I. Ferreira, C.W. G. Lopes, Coccidial dispersion across trans- and cis-Andean antbirds

- (Passeriformes: Thamnophilidae): *Isospora sagittulae* McQuistion and Capparella, 1992 (Apicomplexa: Eimeriidae) from non-sympatric hosts, Can. J. Zool. 92 (2014) 383–388, <https://doi.org/10.1139/cjz-2013-0277>.
- [28] L.M. Silva-Carvalho, D.G.N. Pastura, M.B. Rodrigues, J.V. Gomes, M.S. Oliveira, P. B. Siqueira, J.L.G. Oliveira, S.S. Soares, Á.A. Oliveira, V.M. Lima, I. Ferreira, B. P. Berto, *Isospora sagittulae* McQuistion & Capparella, 1992 (Apicomplexa: Eimeriidae) from antbirds (Passeriformes: Thamnophilidae) in the Amazon and Atlantic Forest of Brazil: with notes on its distribution and dispersion in the Neotropical region, Parasitol. Res. 117 (2018) 2635–2641, <https://doi.org/>
- [29] J.D. Ogedengbe, R.H. Hanner, J.R. Barta, DNA barcoding identifies *Eimeria* species and contributes to the phylogenetics of coccidian parasites (Eimeriina, Apicomplexa, Alveolata), Int. J. Parasitol. 41 (2011) 843–850, <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.03.007>.
- [30] M.E. Ogedengbe, S. El-Sherry, J.D. Ogedengbe, H.D. Chapman, J.R. Barta, Phylogenies based on combined mitochondrial and nuclear sequences conflict with morphologically defined genera in the eimeriid coccidia (Apicomplexa), Int. J. Parasitol. 48 (2018) 59–69, <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.07.008>.