



UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ– UTFPR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE FRANCISCO BELTRÃO

EMELINE DA SILVA CECCON

**Parâmetros ambientais relacionados a incidência e prevalência do
fungo quitrídio na rã das corredeiras *Limnomedusa macroglossa***

FRANCISCO BELTRÃO
2017

EMELINE DA SILVA CECCON

Parâmetros ambientais relacionados a incidência e prevalência do fungo quitrídio na rã das corredeiras *Limnomedusa macroglossa*

Projeto de Pesquisa apresentado à banca examinadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná-UTFPR – Unidade Universitária de Francisco Beltrão, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Engenharia Ambiental.

Orientação: Prof. Dr. Rodrigo Lingnau

FRANCISCO BELTRÃO
2017

FOLHA DE AVALIAÇÃO

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	5
2 OBJETIVOS	6
2.1 Objetivo Geral	6
2.2 Objetivos Específicos	6
3 REVISÃO DA LITERATURA	7
3.1 Conservação dos anfíbios.....	7
3.1.1 Fungo quitrídio.....	8
3.1.2 Outras ameaças	8
3.2 <i>Limnomedusa macroglossa</i>	10
4 MATERIAL E MÉTODOS	11
4.1 Tipo de pesquisa	11
4.2 Local e período de estudo	11
4.3 Metodologia	12
5 CRONOGRAMA	13
REFERÊNCIAS	14

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é líder mundial na diversidade de anfíbios, abrigando cerca de 1.080 espécies (SEGALLA et al., 2016). Contudo, atualmente os anfíbios são considerados um dos grupos mais ameaçado entre os seres vivos, com 32% das espécies sob ameaça de extinção ou já extintas (IUCN, 2008). Ambos os fatores corroboram para a importância das pesquisas que visam conhecer cada vez mais a biologia e ecologia dos indivíduos deste grupo, com o intuito de viabilizar ações de proteção e conservação.

A quitridiomicose é uma doença causada pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) (VOYLES, et al., 2007), e tem sido relacionada como a principal causa do declínio e extinção de populações de anfíbios no Brasil e nas demais regiões tropicais globais. (CARVALHO, et al., 2017; JENKINSON, et al., 2016; SCHLOEGEL, et al., 2012). Alguns dos fatores que podem contribuir para uma epidemia do referido patógeno, são a alteração das condições ambientais como temperatura e precipitação, possibilitando desencadear como resposta o aumento do fator de crescimento frente a condições hostis (JAMES, et al., 2015). Neste sentido, conhecer a interação existente entre o patógeno, fatores ambientais e anuros infectados, pode instrumentalizar ações de conservação frente ao problema.

Além do patógeno *Bd*, é possível citar como importantes ameaças a perda de habitat, (CUSHMAN, 2006), a atividade agrícola (MACAGNAN, et al., 2016; VASCONCELOS, 2014), produtos químicos, radiação UV, poluição da água, solo e atmosfera e alterações climáticas (VERDADE, et al., 2010).

O presente projeto tem como objetivo Identificar se há relação entre a incidência e prevalência do fungo quitrídeo *Batrachochytrium dendrobatidis* em indivíduos adultos da rã das corredeiras *Limnomedusa macroglossa*, com fatores abióticos como: temperatura do ar da água, pH da água e cobertura de dossel; no Rio Guarani, município de Três Barras do Paraná. Sua relevância consiste em contribuir com maiores informações acerca da contaminação pelo fungo quitrídio e influência da mesma em anuros do Bioma Mata Atlântica, considerando os fatores abióticos locais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Identificar se há relação entre a incidência e prevalência do fungo quitrídio *Batrachochytrium dendrobatidis* em indivíduos adultos da rã das corredeiras *Limnomedusa macroglossa*, com fatores abióticos como: temperatura do ar e da água, pH da água e cobertura de dossel; no Rio Guarani, município de Três Barras do Paraná.

2.2 Objetivos específicos

- Comparar a taxa de infestação do fungo quitrídeo nos indivíduos adultos de *Limnomedusa macroglossa*, ao longo da estação reprodutiva, com variáveis ambientais (temperatura do ar, temperatura da água, pH e cobertura de dossel);
- Analisar se a prevalência do fungo quitrídeo em indivíduos adultos de *L. macroglossa* está exercendo influência sobre a atividade reprodutiva e sobrevivência dos mesmos, a partir de análise da vocalização e características (peso e tamanho) dos indivíduos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Conservação dos anfíbios

Os anfíbios possuem considerável importância ecológica, pois atuam como indicadores da qualidade ambiental devido as suas características morfológicas e fisiológicas, ao seu ciclo de vida parte aquático e parte terrestre, a limitação na sua capacidade de dispersão e por ocorrer nos mais diversos ambientes (BORGES-MARTINS, 2007).

Além disso, os anfíbios promovem o controle de populações de pragas ao alimentarem-se principalmente de insetos, logo, sua extinção em determinado local, pode ocasionar a proliferação de pragas (TOLEDO et al., 2010). Despertam também a atenção para os compostos presentes em sua pele, que possibilitam deter o ataque de bactérias, fungos e predadores, e cujos estudos viabilizam o desenvolvimento de medicamentos como analgésicos, cicatrizantes, fungicidas e remédios contra parasitas protozoários (HADDAD, TOLEDO e PRADO, 2008).

Atualmente, os anfíbios são considerados um dos grupos mais ameaçado entre os seres vivos, com 32% das espécies sob ameaça de extinção ou já extintos (IUCN, 2008). Considerando que poucos estudos documentam recuperações significativas em populações de anfíbios (KNAPP, et al., 2016; ADUM, et al., 2013; HILJE e AIDE, 2012) há uma forte tendência para que o declínio global na diversidade dos mesmos seja acentuado nos próximos anos, caso medidas de conservação efetivas não sejam adotadas.

Tendo em vista que o Brasil é líder mundial na diversidade de anfíbios, abrigando cerca de 1.080 espécies (SEGALLA et al., 2016), é de suma importância o fomento às pesquisas visando conhecer cada vez mais a biologia e ecologia dos indivíduos deste grupo, com o intuito de viabilizar ações de proteção e conservação.

Dentre as ações de conservação do referido grupo, cabe destacar a importância da classificação do estado de conservação das espécies, realizada pela International Union for the Conservation of Nature (IUCN) através da Lista Vermelha (em termos globais), e a publicação do Livro Vermelho da fauna ameaçada no estado do Paraná, em 2004, (avaliação regional). Tal classificação possibilita determinar espécies com maior prioridade de conservação, auxiliando no

planejamento, gerenciamento, monitoramento e tomada de decisões (RODRIGUES, et al., 2006).

3.1.1 Fungo quitrídeo

A quitridiomicose é uma doença causada pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), que infecta o tecido epitelial dos anfíbios, causa desequilíbrio osmótico, provocando a perda de eletrólitos e podendo levar a morte (VOYLES, et al., 2007). Trabalhos recentes (CARVALHO, et al., 2017; JENKINSON, et al., 2016; SCHLOEGEL, et al., 2012) a relacionam como a principal causa do declínio e extinção de populações de anfíbios no Brasil e nas demais regiões tropicais globais.

Alguns dos fatores que podem contribuir para uma epidemia do referido patógeno, são a alteração das condições ambientais como temperatura e precipitação, possibilitando desencadear como resposta o aumento do fator de crescimento frente a condições hostis (JAMES, et al., 2015). Variáveis ambientais como cobertura de dossel, pH da água, além da temperatura da água e do ar, podem ser preditores significativos da prevalência do fungo em determinadas espécies de anuros (VALLENCIA-AGUILAR, et al. 2016).

O desmatamento em áreas de vegetação nativa afeta a conservação dos anfíbios duplamente: ao reduzir seu habitat e ao provocar o aumento de infecções por *Bd*. No que se refere a influência do desmatamento sobre a quitridiomicose, ocorre que alterações tanto nos macroclimas quanto em microclimas são provocadas, aumentando assim a carga do patógeno e modificando os atributos de comunidades, tornando-as mais suscetíveis a infecção pelo fungo (BECKER, et al., 2016).

Embora o *Bd* tenha sido alvo de diversas pesquisas na última década, o que se sabe sobre este patógeno, como origem, biologia e epidemiologia, ainda é restritivo para uma ação de conservação realmente efetiva, tornando necessária a continuidade dos estudos com o mesmo.

3.1.2 Outras ameaças

Muitos são os fatores que tem contribuído ao longo das últimas décadas para o declínio e extinção dos anfíbios. Além do patógeno *Bd*, é possível citar como

importante ameaça a perda de habitat, que além de reduzir ambientes viáveis para a sobrevivência dos mesmos, provoca a diminuição do fluxo gênico das populações ao restringir sua capacidade de dispersão geográfica (CUSHMAN, 2006).

A agricultura, uma das principais atividades econômicas do Brasil, embora extremamente relevante e necessária para garantia de subsistência da população, tem causado forte impacto ambiental da forma como é realizada. O Brasil é o maior consumidor de agrotóxico no mundo e diversas doenças tem sido associadas ao uso dos mesmos, além do impacto gerado ao meio ambiente ao contaminar solo, rios e lençol freático e afetar a biodiversidade, sem contar a devastação das floresta nativas para o cultivo de monoculturas. Tais fatores influenciam diretamente nas comunidades de anfíbios ao seu entorno, e podem estar relacionados a casos de má-formação, atraso no desenvolvimento larval, morte de girinos e indivíduos adultos e modificação no comportamento dos mesmos (MACAGNAN, et al., 2016; VASCONCELOS, 2014).

A poluição, incêndios e alterações climáticas, são outros fatores que podem influenciar negativamente a conservação das populações de anfíbios, tendo em vista que os mesmos possuem a pele permeável (POUGH, JANIS e HEISER, 2008), o que os torna mais sensíveis a produtos químicos, radiação UV, poluição da água, solo e atmosfera e alterações climáticas (VERDADE, et al., 2010). Esta última, tem contribuído de forma direta com o declínio de populações de anfíbios por afetar seus microambientes como corpos d'água de pequena profundidade utilizados para deposição dos ovos e desenvolvimento dos girinos, os quais, com a elevação de temperatura e consequente evaporação da água, tornam-se mais suscetíveis a predadores e tornam o ambiente favorável à proliferação de hospedeiros de parasitas (COSTA, CARNAVAL e TOLEDO, 2012).

Neste sentido, é importante destacar que o aquecimento global é inegável e desde 1950, muitas mudanças observadas são sem precedentes ao longo de milênios. A atmosfera e oceanos têm aquecido, a quantidade de gelo diminuído e o nível do mar aumentado. As três últimas décadas têm sido sucessivamente mais quentes na superfície terrestre do que qualquer década anterior desde 1850, e entre 1983 a 2012 foi provavelmente o período mais quente dos últimos 800 anos no Hemisfério Norte (IPCC, 2014).

3.1.3 *Limnomedusa macroglossa*

Limnomedusa macroglossa é um anuro de médio porte (machos 42-65mm, fêmeas 42-62mm), pertencente à família Alsodidae. Possui pupilas verticais, a coloração dorsal varia entre cinza ou marrom, com grânulos alongados organizados em linhas longitudinais irregulares, faixas transversais escuras nos membros anteriores e posteriores, ventre branco, focinho arredondado e não possui membrana interdigital. Ocorre em afloramentos rochosos e leitos de rios, com distribuição geográfica em todos os estados do sul do Brasil, e também no Uruguai, Argentina e Paraguai (KWET, LINGNAU e DI-BERNARDO, 2010).

O canto de anúncio emitido pelos machos de *L. macroglossa*, normalmente é iniciado após o anoitecer e durante os meses mais quentes do ano, possuindo como sítio de vocalização, substratos rochosos, mantendo o corpo parcialmente submerso ou totalmente fora da água. Possui estratégia reprodutiva prolongada e altamente sazonal, com postura de cerca de 390 ovos em média, com estágio larval de no mínimo um mês de duração (KAEFER, BOTH e CECHIN, 2009).

De acordo com o Livro Vermelho da fauna ameaçada no estado do Paraná, publicado em 2004, *L. macroglossa* está categorizada como “criticamente em perigo” (CR). O declínio de populações de *L. macroglossa* no estado está relacionada com a construção de usinas hidrelétricas, como as usinas de Salto Caxias e Salto Segredo. (MIKICH e BÉRNILS, 2004). Neste contexto, é imprescindível o esforço no sentido de localizar e monitorar novas populações de *L. macroglossa*, bem como, promover ações de conservação da mesma e de seu hábitat.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Tipo de pesquisa

O presente projeto consiste em uma pesquisa de campo, que pode ser definida como aquela onde há a manipulação direta sobre o objeto de estudo em seu local de ocorrência, utilizando-se técnicas e materiais específicos para a obtenção de esclarecimentos em relação ao fenômeno em foco. (CERVO, BERVIAN e DA SILVA, 2007).

4.2 Local e período de estudo

A pesquisa será desenvolvida em um trecho de 140 m no Rio Guarani (25° 24' 13.89" S, 53° 06' 54.03" O) (Fig. 01), com acesso através de uma área particular localizada na zona rural do município de Três Barras do Paraná, estado do Paraná, além de buscas no interior do Parque Estadual do Rio Guarani, no mesmo município, para verificar a existência de populações da referida espécie. A escolha do local deve-se ao fato das condições favoráveis para reprodução da espécie alvo, que ocupa afloramentos rochosos em leitos de rios, e ainda, por já terem sido avistados indivíduos adultos de *Limnomedusa macroglossa* no local, em expedições realizadas no ano de 2013.

As expedições serão realizadas a partir do mês de setembro de 2017, com término em fevereiro de 2019, quinzenalmente, iniciando às 19h e encerrando às 23h.



Fonte: Google Maps, 2017 (adaptado)

Figura 01- Foto via satélite do município de Três Barras do Paraná, destacando o local de estudo.

O município de Três Barras do Paraná possui uma área total de 504,171 Km², com 11.824 habitantes em 2010. Seu bioma característico é a Mata Atlântica (IBGE, 2010); o clima da Região é classificado como Cfa – Clima Subtropical Úmido Mesotérmico de acordo com a classificação de Köppen, com precipitação média anual de 1.800 a 2.000 mm e umidade relativa anual de 75 a 80%, a altitude é cerca de 562 metros.

4.3 Metodologia

Os animais serão localizados através de busca ativa, segundo o método do animal focal. Após localizados, serão coletados os seguintes dados: gravação da vocalização dos machos emissores, com auxílio do gravador digital Tascam DR-40; tamanho, com uso de um paquímetro digital; peso, com uso de balança; fluído epitelial utilizando o método de *swabing* nas regiões inguinal direita, inguinal esquerda e interdigitais dos membros inferiores e superiores, direitos e esquerdos (LAMBERTINI *et al.* 2013 *apud* HYATT *et al.* 2017); temperatura do ar e da água, por termômetro de mercúrio; pH da água, utilizando um pHmetro portátil Lutron PH-221. Para cada animal, serão utilizadas um par de luvas, para evitar falsos positivos por contaminação cruzada entre as amostras. Os *swabs* serão acondicionados em tubos "*ependorf*", mantidos congelados a -20° C e enviados ao Laboratório de Antígenos Bacterianos, Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, do Instituto de Biologia, da Universidade Estadual de Campinas-SP, para determinação

incidência e prevalência do fungo nos indivíduos amostrados. Cada animal será identificado com microetiquetas alfanuméricas, a fim de verificar modificações nos padrões de incidência e prevalência do fungo quitrídio ao longo do período de pesquisa, assim como, na vocalização dos mesmos. Os animais serão liberados imediatamente após a coleta de material.

Para as análises estatísticas, serão utilizados: teste de Kruskal-Wallis (KW) para expor a variação sazonal na prevalência do fungo; teste de Mann-Whitney para avaliarmos se o tamanho do corpo e peso diferiram entre indivíduos infectados e não infectados; modelo de regressão múltipla, utilizando a variável dependente (prevalência de *Bd*) e as variáveis independentes (pH da água e temperatura da água e do ar); e *software* Raven Pro 1.5.0, para análise do padrão das vocalizações. Os testes estatísticos serão realizados utilizando o *software* R.

5 CRONOGRAMA DAS ATIVIDADES

Quadro 1 – Cronograma das atividades a serem desenvolvidas

[illegible]

REFERÊNCIAS

- ADUM, G. B., et al. **Two-Stage Recovery of Amphibian Assemblages Following Selective Logging of Tropical Forests. Conservation Ecology**, v. 27, p. 354-363, 2013.
- BECKER, C. G. **et al.** Deforestation, host community structure, and amphibian disease risk. **Basic and Applied Ecology**, v. 17, p. 72-80, 2016.
- BORGES-MARTINS, M. Anfíbios. In: BECKER, F. G.; RAMOS, R.A. & MOURA, L.A. (orgs.) **Biodiversidade: Regiões da Lagoa do Casamento e dos Butiazais de Tapes, Planície Costeira do Rio Grande do Sul**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2007. p. 276-291.
- CARVALHO, T. et al. Historical amphibians declines and extinctions in Brazil linked to chytridiomycosis. **The Royal Society**. 2017. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.6084/m9.fig-share.c.367300>. Acesso em: 29 de abril de 2017.
- CONTE, C. E. et al. Amphibia, Anura, Limnomedusa macroglossa, Dendropsophus anceps, D. berthalutzae, D. seniculus, Scinax littoralis: new state records, distribution extension and filling gaps. **Check List**, v. 5, n. 8, p. 202-209, 2009.
- CUSHMAN, S. A. Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: A review and prospectus. **Biological Conservation**, v. 128, p. 231-240, 2006.
- DE PAULA, C.D.; TOLEDO, L. F. Anfíbios. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C.; CATÃO-DIAS, J. L. (Eds.). **Tratado de Animais Selvagens**. Medicina Veterinária, 2ª Ed., v. 1. São Paulo. Roca, pp. 132-151.
- HADDAD, C. F. B.; TOLEDO, L. F.; PRADO, C. P. A. **Anfíbios da Mata Atlântica**. São Paulo: Neotropica, 2008, 243. p.
- HILJE, B.; AIDE, T. M. Recovery of amphibian species richness and composition in a chronosequence of secondary forests, northeastern Costa Rica. **Biological Conservation**, v. 146, p. 170-176, 2012.
- IPCC – Intergovernmental Panel on Climate Change. **Summary for Policymakers**. 2014. Disponível em: http://www.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar5/syr/AR5_SYR_FINAL_SPM.pdf. Acesso em: 28 de abril de 2017.
- IUCN - International Union for Conservation of Nature Red List of Threatened Species. **Red list. Version** 2016. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org>. Acesso em: 27 de abril de 2017.
- JAMES, T. Y. et al. Disentangling host, pathogen, and environmental determinants of a recently emerged wildlife disease: lessons from the first 15 years of amphibian chytridiomycosis research. **Ecology and evolution**, v. 5, n.18, p. 4079-4097, jul. 2015.

JENKINSON, T. S., et al. Amphibian-killing chytrid in Brazil comprises both locally endemic and globally expanding populations. **Molecular Ecology**, v. 25, p. 2978-2996, 2016.

KAEFER, I. L.; BOTH, C.; CECHIN, S. Z. Breeding biology of the rapids frog *Limnomedusa macroglossa* (Anura: Cycloramphidae) in southern Brazil. **Journal of Natural History**, v. 43, n. 19, p. 1195-1206, maio, 2009.

KNAPP, R. A., et al. Large-scale recovery of an endangered amphibian despite ongoing exposure to multiple stressors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.113, n. 42, p.11889-11894, out. 2016.

KWET, A; LINGNAU, R; DI-BERNARDO, M. **Pró-Mata: anfíbios da Serra Gaúcha, sul do Brasil**. Porto Alegre: Edipucrs, 2010. 108 p.

MACAGNAN, N. et al. **Toxicidade dos inseticidas Deltametrina e Cipermetrina em embriões e larvas de *Physalaemus gracilis*** (Anura: Leptodactylidae). 2016. Disponível em: <https://periodicos.uffs.edu.br/index.php/JORNADA/article/viewFile/4667/2175>. Acesso em: 29 de abril de 2017.

POUGH, F. H.; JANIS, C.M.; HEISER, J.B. **A vida dos vertebrados**. 4ª ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 683 p.

RODRIGUES, A. S. L. et al. The value of the IUCN Red List for conservation. Trends in **Ecology and Evolution**, v. 21, n. 2, fev. 2006.

SCHLOEGEL, L. M. et al. Novel, panzootic and hybrid genotypes of amphibian chytridiomycosis associated with the bullfrog trade. **Molecular Ecology**, v. 21, p. 5162-5177, 2012.

SEGALLA, M.V.; LANGONE, J.A. Anfíbios. In: MIKICH, S.B.; BÉRNILS, R.S. **Livro vermelho da fauna ameaçada no estado do Paraná**. Curitiba: Instituto Ambiental do Paraná, 2004. p. 5.

SEGALLA, M. V. et al. **Lista de anfíbios do Brasil**. 2014. Disponível em: <http://www.sbherpetologia.org.br/index.php/anfibios>. Acesso em: 29 abr. 2017.

TOLEDO, L. F. et al. A revisão do código florestal brasileiro: impactos negativos para a conservação de anfíbios. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 4, p. 35-38, out. 2010.

VASCONCELOS, A. M. **Avaliação dos efeitos do agrotóxico Vertimec 18CE sobre girinos de *Lithobates catesbeianus* (Amphibia, Anura, Ranidae)** / Ana Maria Vasconcelos; orientador Evaldo L. G. Espindola. São Carlos, 2014.

VERDADE, V. K.; DIXO, M.; CURCIO, F. F. Os riscos de extinção de sapos, rãs e pererecas em decorrência das alterações ambientais. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 68, p. 161-172, fev. 2010.

VOYLES, J. et al. Electrolyte depletion and osmotic imbalance in amphibians with chytridiomycosis. **Diseases of aquatic organism**, v. 77, p. 113-118, 2007.