



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA (RENORBIO-UFC)

FELIPE AUGUSTO CORREIA MONTEIRO

**DIVERSIDADE TAXONÔMICA DO MICROBIOMA DE NINHOS DE ESPUMA DE
SAPOS LEPTODACTILÍDEOS, SUA IMPORTÂNCIA E POTENCIAL
BIOTECNOLÓGICO**

FORTALEZA

2023

FELIPE AUGUSTO CORREIA MONTEIRO

DIVERSIDADE TAXONÔMICA DO MICROBIOMA DE NINHOS DE ESPUMA DE
SAPOS LEPTODACTILÍDEOS, SUA IMPORTÂNCIA E POTENCIAL
BIOTECNOLÓGICO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (RENORBIO) da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora:

Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo.

Coorientadora:

Profa. Dra. Denise Cavalcante Hissa.

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- M776d Monteiro, Felipe Augusto Correia.
Diversidade Taxonômica do Microbioma de Ninhos de Espuma de Sapos Leptodactilídeos, sua Importância e Potencial Biotecnológico / Felipe Augusto Correia Monteiro. – 2023.
89 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (Rede Nordeste de Biotecnologia), Fortaleza, 2023.
Orientação: Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo .
Coorientação: Profa. Dra. Denise Cavalcante Hissa.

1. Anfíbios. 2. Nordeste do Brasil. 3. Metagenoma. 4. Gene 16S rRNA. 5. Ranas puminas. I. Título.
CDD 660.6

FELIPE AUGUSTO CORREIA MONTEIRO

DIVERSIDADE TAXONÔMICA DO MICROBIOMA DE NINHOS DE ESPUMA DE
SAPOS LEPTODACTILÍDEOS, SUA IMPORTÂNCIA E POTENCIAL
BIOTECNOLÓGICO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (RENORBIO) da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Aprovada em: 27/02/2023.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo (Orientadora)
Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Francisca Andréa da Silva Oliveira Silva Oliveira
Central de Genômica e Bioinformática (CeGenBio) do Núcleo de Pesquisa e
Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM), Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Sueli Rodrigues
Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Paulo Cascon
Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Igor Joventino Roberto
Campus Brejo Santo, Universidade Federal do Cariri (UFCA)

A meus pais, minha família, meus amigos,
meus professores e meus gatos.

AGRADECIMENTOS

É uma tarefa difícil listar todos aqueles a quem eu gostaria de agradecer por terem contribuído de alguma forma com a realização deste trabalho, posso ter esquecido alguns nomes, por isso peço desculpas, é apenas uma questão de memória ruim.

Em primeiro agradeço a minha família: meu pai Pedro, minha mãe Amélia, minha “rimã” Samantha, meu cunhado Charles, meu sobrinho Pedro o “xeroso”, meu sobrinho Lucas o “de menor” e aos demais de quem sempre tive apoio durante o estudo e trabalho. A todo carinho e atenção envolvidos. Também a minhas queridas “Satanás” *in memorian*, “Lilith” e “Cevada”, as miadeiras e minhas companheiras de quarentena.

Agradeço as professoras Dra. Vânia Maria Maciel Melo e Dra. Denise Cavalcante Hissa, minhas orientadora e coorientadora por toda instrução, atenção e apoio ao desenvolvimento desse trabalho.

A Universidade Federal do Ceará (UFC) e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) pela minha formação acadêmica.

A equipe dos laboratórios LEMBIOTEC (Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia) e LARGEN (Laboratório de Recurso Genéticos), em especial a Dra. Mirella Leite Pereira (Mimi) e a Dra. Francisca Andréa da Silva Oliveira pela ajuda nas atividades de laboratório e ajuda no desenvolvimento dessa pesquisa.

Também sou grato ao LABBMAR (Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia Marinha), a CEGENBIO (Central de Genômica e Bioinformática) e ao Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da UFC, em especial a pessoa da Dra. Giovanna Riello Barbosa Correia por sua colaboração em atividades de bancada.

Da mesma forma sou grato ao Biólogo Me. Leonardo Ribeiro Oliveira Normando pela elaboração da análise de dados.

Pelo auxílio em atividades de campo agradeço aos biólogos Dra. Maria Juliana Borges-Leite, Me. Carlos Augusto Oliveira Meirelles, Me. Mirian dos Santos Mendes, Me. Saulo Gonçalves de Santiago Bezerra, John Allyson Andrade Oliveira e Luan Rebouças Castelo. Bem como aos professores Prof. Dr. Paulo Cascon e a Profª. Dra. Helena Matthews-Cascon. Pelo acesso a Fazenda Fazenda Maceió da Taíba agradeço a Dra. Maria Juliana Borges-Leite e a senhora Lucia Castro Cunha pelo acesso a RPPN Monte Alegre em Pacatuba.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE), Campus Jaguaribe, aos meus amigos, colegas e alunos, ao suporte e apoio dado para a realização deste trabalho.

Também agradeço às bancas de qualificação e de defesa, aos professores Andréa Oliveira, Sueli Rodrigues, Tallita Tavares, Paulo Cascon e Igor Roberto.

Reforço que aqui gostaria de agradecer a todos aqueles que de alguma forma ajudaram com o presente trabalho, seja direta ou indiretamente, e que por ventura não tenham sido devidamente mencionados, é muito difícil listar tanta gente que sempre tenha demonstrado afeto, atenção e apoio a esta jornada.

“Esses animais imundos e repugnantes são abomináveis por causa de seu corpo frio, cor pálida, pele imunda, aspecto feroz, olho calculista, cheiro ofensivo, voz áspera, habitação esqualida e veneno terrível; e assim seu Criador não exerceu seus poderes dele para fazer muitos deles” (LINNAEUS, 1758)



Fonte: <<https://www.instagram.com/tumdecassete/>>

RESUMO

Os anfíbios dependem da água ou de ambientes úmidos para reprodução. Assim, desenvolveram vários Modos de Reprodução (RM, derivado do inglês: Reproductive Mode). Alguns destes envolvem a deposição de ovos em Ninhos de Espuma (FN, do inglês: Foam Nest). Alguns estudos mostram que os ninhos são compostos principalmente por proteínas, como proteínas surfactantes, e carboidratos que ajudam na proteção dos ovos. Entretanto, o microbioma dos FN tem sido pouco estudado sendo o de anuros leptodactídeos ainda é desconhecido. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi descrever o microbioma dos FN de *Adenomera hylaedactyla*, *Leptodactylus vastus* e *Physalaemus cuvieri* da Família Leptodactylidae. Amostras de FN destas espécies foram coletadas, bem como amostras de solo e água de seus locais de deposição. O DNA total dessas amostras foi extraído e amplicons do gene rRNA 16S foram sequenciados e analisados. No microbioma dos FN dessas espécies predominam os clados Proteobacteria, Bacteroidetes e Firmicutes. Os gêneros mais abundantes foram *Pseudomonas*, *Sphingobacterium* e *Paenibacillus*. FN mais ricos em microorganismos eram aqueles depositados em solo, ambientes mais ricos em microorganismos. Contudo a composição de microorganismos dos FN dessas espécies é mais semelhante entre si que com seus ambientes de deposição. Nossos resultados sugerem que a peculiar composição química dos ninhos de espuma é o principal fator de seleção para aquisição de seu microbioma. Microorganismos dos ninhos de espuma podem atuar na proteção dos girinos e animais adultos contra doenças e produzem substâncias com potencial para aplicações tecnológicas, interferindo na saúde desses animais. Dessa forma, o conhecimento do microbioma de ninhos de espuma pode ser uma ferramenta útil para desenvolver estratégias de conservação desses animais.

Palavras-chave: anfíbios; Nordeste do Brasil; metagenoma; gene 16S rRNA; ranaspuminas.

ABSTRACT

Amphibians depend on water or humid environments for reproduction. Thus, they developed several Reproduction Modes (RM). Some of these involve laying eggs in Foam Nests (FN). Some studies show that the nests are mainly composed of proteins, such as surfactant proteins, and carbohydrates that help protect the eggs. However, the microbiome of NF has been little studied and that of leptodactylid anurans is still unknown. Thus, the aim of this study is describe the microbiome of the NF of *Adenomera hylaedactyla*, *Leptodactylus vastus* and *Physalaemus cuvieri* of the Family Leptodactylidae. FN samples from these species were collected, as well as soil and water samples from their deposition sites. Total DNA from these samples was extracted and 16S rRNA gene amplicons were sequenced and analyzed. The clades Proteobacteria, Bacteroidetes and Firmicutes were predominant in the NF microbiome. The most abundant genera were *Pseudomonas*, *Sphingobacterium* and *Paenibacillus*. NF richer in microorganisms were those deposited in soil, environments richer in microorganisms. However, the composition of microorganisms in the NF of these species is more similar to each other than to their deposition environments. Our results suggest that the peculiar chemical composition of foam nests is the main selection factor for acquiring their microbiome. Microorganisms from foam nests can act to protect tadpoles and adult animals against diseases and produce substances with potential for technological applications, interfering with the health of these animals. Thus, knowledge of the microbiome of foam nests can be a useful tool to develop conservation strategies for these animals.

Keywords: amphibian; Northeast Brazil; metagenome, 16S rRNA gene; ranaspumins.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Relações e principais representantes dos grupos de anfíbios viventes..... 14
- Figura 2 – Amplexo e a formação de ninho de espuma em *Physalaemus ephippifer*, Família Leptodactylidae. A – Fotografia mostrando casal de *P. ephippifer* em amplexo junto ao seu ninho em formação. B – Desenho esquemático representando a movimentação das pernas do macho de *P. ephippifer* para a formação da espuma, os ovos (círculos em preto) vão sendo inseridos na espuma durante esse processo..... 21
- Figura 3 – Desenho esquemático representando quatro dos 17 modos de reprodução de anuros da Família Leptodactylidae, parte dos 10 modos de reprodução que utilizam a deposição de ovos em ninhos de espuma em ambientes aquáticos e terrestres..... 22
- Figura 4 – Fatores que influenciam a variação natural do microbioma dos anfíbios, impactos relacionados à disbiose patogênica e a saúde do hospedeiro e a contribuição potencial dos microbiomas para a conservação dos anfíbios..... 25
- Figura 5 – Fatores determinantes no microbioma da pele de anfíbios..... 26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Modos de Reprodução de Anuros. Todos variam entre o local de deposição, principalmente entre água e solo, bem como sobre as formas de desenvolvimento das larvas (girinos).....	16
Tabela 2 – Proteínas isoladas e caracterizadas de ninhos de espuma de anuros.....	20

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	Anfíbios: Diversidade, Características Gerais e Modos de Reprodução	14
2.2	Ninhos de Espuma de Anuros: Evolução, Composição e Potenciais Biotecnológicos	19
2.2	Microbioma de Anfíbios: Importância e seu Potencial Biotecnológico	23
3	OBJETIVOS	34
4	HIPÓTESES	35
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
	REFERÊNCIAS	37
	APÊNDICE A - ARTIGO “NEOTROPICAL FROG FOAM NEST’S MICROBIOMES”	42
	APÊNDICE B - ARTIGO “DETECTION OF THE FUNGUS <i>BATRACHOCHYTRIUM DENDROBATIDIS</i> IN ANURANS FROM THE SEMIARID REGION OF BRAZIL: NEW INFECTION RECORDS FOR ENDEMIC SPECIES”	61

1 INTRODUÇÃO

Espécies de anfíbios necessitam de ambientes aquáticos ou úmidos para sua reprodução, pois geralmente a fertilização é externa, seus ovos não possuem casca e apresentam fase larval aquática. Nesse sentido, para proteger os ovos e garantir o desenvolvimento de seus embriões e larvas os anfíbios desenvolveram várias estratégias reprodutivas. Dentre os vertebrados os anfíbios apresentam a maior diversidade de modos de reprodução, a classificação de uma série de características reprodutivas que dentre outras envolvem diferentes tipos de deposição de ovos e desenvolvimento larval. Peixes também apresentam uma grande variedade de modos reprodutivos, mas, dentre os vertebrados, apenas os anfíbios apresentam essa variação de ambientes aquáticos a totalmente terrestres.

Tais características fazem com que os anfíbios possam ser considerados como um modelo único no estudo de vertebrados. Em especial para o estudo de seu microbioma, o conjunto de sua microbiota, seus microrganismos simbiotes, e suas funções correlatas. Tanto pelo estudo das modificações ocorridas no microbioma durante seus ciclos de vida, ou mesmo pela análise de variações apresentadas entre diferentes espécies, nessa transição entre ambientes aquáticos e terrestres.

Particularmente, este gradiente de variação é bem diversificado entre anfíbios anuros: os sapos, rãs e pererecas. Sendo a necessidade de ambientes aquáticos para reprodução bastante variável dentro desse subgrupo, de modo que eles apresentam a maior quantidade de modos de reprodução entre os anfíbios. Dentre estes, algumas espécies de diferentes partes do mundo, convergentemente, desenvolveram modos de reprodução que envolvem a deposição de ovos em ninhos de espuma.

Estes ninhos são compostos por proteínas e carboidratos secretados pelos tecidos maternos, a espuma se forma por movimentação dos animais durante a cópula, que em anuros é chamada de amplexo. Muitas funções já foram atribuídas aos ninhos de espuma, todas podem ser resumidas em ações de proteção aos ovos e larvas em desenvolvimento. Para os anuros da família Leptodactylidae, um grupo de rãs encontradas na América Central e do Sul, a formação de ninhos de espuma em seus modos reprodutivos parece ter sido uma inovação chave, o que promove um aumento na diversificação do grupo ao longo de sua evolução.

Por isso, é provável que esses ninhos de espuma tenham uma interação direta com o microbioma desses animais, atuando na seleção de microrganismos benéficos ao desenvolvimento dos ovos e larvas. Os ninhos de espuma podem ter um potencial biotecnológico a ser desvendado, semelhante ao que já foi constatado para o microbioma da

pele de anfíbios. Bactérias isoladas da pele de anfíbios apresentaram elevada atividade antifúngica, que pode ser inclusive utilizada para o desenvolvimento de medicamentos. A princípio estudadas na busca de medidas contra fungos patógenos de anfíbios, uma das principais ameaças a extinção de diversas espécies no mundo, este potencial também se apresentou elevado contra fungos causadores de doenças em humanos.

Contudo, apesar dos grandes avanços no estudo do microbioma de anfíbios, o microbioma dos ninhos de espuma de anuros ainda não foi devidamente determinado. Existe apenas um único estudo até o momento com ninhos de espuma de sapos da família Rhacophoridae, três espécies do gênero *Polypedates*: *P. leucomystax*, *P. macrotis* e *P. otilophus*. Evidências preliminares apontam para a presença de bactérias gram-positivas, que foram isoladas e cultivadas a partir desses ninhos. No entanto esse resultado deve representar apenas uma pequena fração de toda sua diversidade, uma vez que grande parte desses microrganismos não podem ser facilmente cultiváveis. Assim como são desconhecidas às influências do local de deposição, seja a água ou solo, e de fatores interespecíficos na composição dessa comunidade microbiana presente nos ninhos de espuma.

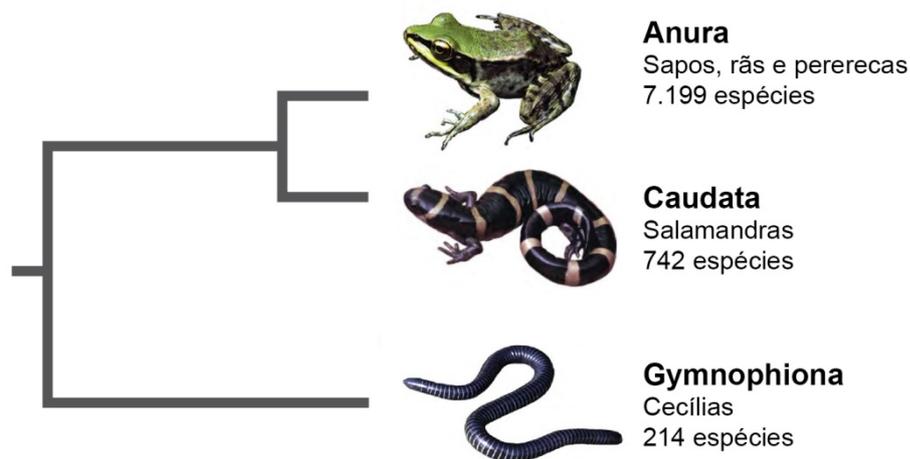
Desta forma, o trabalho pretende contribuir para o conhecimento sobre o microbioma de anfíbios através do uso de tecnologias de sequenciamento massivo de alto rendimento, também chamadas de “próxima geração”. Tendo como objetivo descrever o microbioma dos ninhos de espuma de anuros da Família Leptodactylidae, até o momento o primeiro trabalho a realizar essa caracterização. As análises tomaram como base três espécies neotropicais pertencentes à esta família: *Adenomera hylaedactyla* (Cope, 1868); *Leptodactylus vastus* Lutz, 1930 e *Physalaemus cuvieri* Fitzinger, 1826. Procuramos inferir quais fatores são os mais importantes para a formação do microbioma dos seus ninhos de espuma, se são fatores ligados ao ambiente de deposição, solo ou água, ou relacionados à variação interespecífica. Posteriormente, com base nos dados obtidos a partir da composição avaliar potenciais para o desenvolvimento de produtos biotecnológicos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Anfíbios: Diversidade, Características Gerais e Modos de Reprodução

Os anfíbios vivos são animais vertebrados identificados como pertencentes à Classe Amphibia, possuindo 8.579 espécies distribuídas entre três Ordens: Gymnophiona com 219 espécies de cecílias; Caudata, 798 espécies de salamandras; e Anura, apresentando em torno de 7.562 espécies de sapos, rãs e pererecas (Figura 1) (FROST, 2023). O Brasil é o país que possui a maior riqueza do grupo, com 1.188 espécies sendo: cinco espécies de salamandras, 39 de cecílias e 1.144 de anuros (SEGALLA et al., 2021).

Figura 1 – Relações e principais representantes dos grupos de anfíbios vivos.



Fonte: Adaptado a partir de Pyron e Wiens (2011); Vitt e Caldwell (2014); Catenazzi (2015) e Frost (2023).

Estes animais podem ser encontrados em quase todo o mundo, principalmente em regiões tropicais e temperadas, a exceção de sua distribuição são algumas ilhas oceânicas e o continente antártico (KARDONG, 2016). Todavia, estes animais possuem necessidades fisiológicas especiais, por serem ectotérmicos, apresentar pele permeável e ovos sem casca eles são especialmente sensíveis a variações ambientais (DUELLMAN; TRUEB, 1994; VITT; CALDWELL, 2014). Para superar essas dificuldades os anfíbios desenvolveram estruturas morfológicas, mecanismos fisiológicos e respostas comportamentais que os permitiram se adaptar a diversos ambientes terrestres no mundo (DUELLMAN; TRUEB, 1994; VITT;

CALDWELL, 2014).

Algumas dessas formas de adaptação ao ambiente terrestre envolveram a adoção de estratégias reprodutivas. Uma combinação de atributos morfofisiológicos e comportamentais que permitem a sobrevivência desses animais na transição entre diferentes ambientes (DUELLMAN; TRUEB, 1994; WELLS, 2007; VITT; CALDWELL, 2014). Uma dessas estratégias envolve a adoção de diferentes Modos de Reprodução, assim denominadas a combinação de diferentes características reprodutivas, principalmente as formas de deposição de ovos e os tipos de desenvolvimento larval, adotadas entre diferentes espécies de anfíbios (DUELLMAN; TRUEB, 1994; WELLS, 2007; VITT; CALDWELL, 2014).

Dentre os vertebrados, os anfíbios estão entre aqueles que apresentam a maior quantidade desses Modos de Reprodução (WELLS, 2007). Peixes ósseos também apresentam uma ampla variedade desses modos, podem até depositar seus ovos fora d'água, mas não apresentam nenhum totalmente terrestre, como os que ocorrem em anfíbios (WELLS, 2007).

Em anfíbios, esses diferentes Modos de Reprodução já foram considerados inovações evolutivas para a conquista do ambiente terrestre por parte dos vertebrados (DUELLMAN; TRUEB, 1994). Contudo, evidências recentes refutam essa ideia, bem como aquela que indica que os modos de desenvolvimento reprodutivo direto estejam ligadas diretamente ao aumento das taxas de diversificação de anfíbios (LIEDTKE et al., 2022). Estima-se que o modo reprodutivo ancestral do grupo seja aquele que envolve a fertilização externa, os ovos são depositados no ambiente aquático e as larvas se desenvolvem sem cuidados parentais (VITT; CALDWELL, 2014; LIEDTKE et al., 2022). No entanto, as cecílias desenvolveram a fertilização interna, apresentando espécies ovíparas e vivíparas, mas de hábitos gerais ainda pouco conhecidos devido seus comportamentos crípticos (DUELLMAN; TRUEB, 1994; WELLS, 2007; VITT; CALDWELL, 2014). As salamandras ainda apresentam o modo de reprodução ancestral e outros modos que envolvem a fertilização interna, com a variação da deposição de ovos, entre ambientes terrestres e aquáticos, ou ainda a ovoviviparidade, viviparidade e a pedomorfose (DUELLMAN; TRUEB, 1994; WELLS, 2007; VITT; CALDWELL, 2014). Os anuros também podem reter os ovos, mas apresentam poucas espécies ovovivíparas e vivíparas, em sua maioria são ovíparas e a fertilização quase sempre é externa (DUELLMAN; TRUEB, 1994; WELLS, 2007; VITT; CALDWELL, 2014). Dentre estas espécies ovíparas de anuros, a maioria das famílias apresentam modos de deposição aquáticos, as demais os depositam em ambientes não aquáticos, sejam eles terrestres ou arborícolas (DUELLMAN; TRUEB, 1994; HADDAD; PRADO, 2005; WELLS, 2007; VITT; CALDWELL, 2014).

A classificação destes modos reprodutivos é bem útil em estudos comparativos e evolutivos, mas dentre os vertebrados terrestres (tetrápodes) elas só são amplamente usadas e aceitas em estudos envolvendo anfíbios (NUNES-DE-ALMEIDA et al., 2021). A proposta mais recente de classificação soma 74 diferentes modos reprodutivos apresentados por anfíbios (NUNES-DE-ALMEIDA et al., 2021). Contudo classificação vigente tem como base a classificação de modos reprodutivos de Haddad e Prado (2005), que apresenta 39 diferentes modos reprodutivos de anfíbios (Tabela 1).

Os anuros são o grupo de anfíbios que apresenta a maior quantidade de modos de reprodução (DUELLMAN; TRUEB, 1994; HADDAD; PRADO, 2005; POMBAL JR; HADDAD, 2007; WELLS, 2007; VITT; CALDWELL, 2014; NUNES-DE-ALMEIDA et al., 2021). Os 39 modos estabelecidos por Haddad e Prado (2005) foram descritos com base em comportamentos reprodutivos de anuros, destes 16 envolvem a deposição de ovos em ambientes aquáticos, outros 21 a deposição em ambientes não aquáticos e dois restantes são de espécies que retêm os ovos em seus ovidutos, espécies vivíparas e ovovivíparas (Tabela 1) (HADDAD; PRADO, 2005; POMBAL JR; HADDAD, 2007; WELLS, 2007; VITT; CALDWELL, 2014). No mundo, a região biogeográfica denominada como Neotropical, na qual o Brasil está inserido, é a que apresenta maior diversidade desses modos, no total 31 (79,5%), no Brasil são encontrados 28 (71,8%) destes (DUELLMAN; TRUEB, 1994; HADDAD; PRADO, 2005; POMBAL JR; HADDAD, 2007).

Dentre as famílias de anuros, a Família Leptodactylidae é a que apresenta a maior quantidade de modos de reprodução (17), dos quais todos podem ser observados para aqueles gêneros e espécies encontrados entre biomas no Brasil e América do Sul (Tabela 1) (DUELLMAN; TRUEB, 1994; HADDAD; PRADO, 2005). Destes, oito modos que envolvem a deposição de ovos em ninhos de espuma, três modos envolvem a deposição na água e outros cinco envolvem a deposição no solo (Tabela 1) (HADDAD, PRADO, 2005; POMBAL JR., HADDAD, 2007; WELLS, 2007). Contudo, os ninhos de espuma não são exclusivos de anuros leptodactilídeos, eles representam 10 dos 39 dos Modos de Reprodução apresentados por anuros (Tabela 1) (DUELLMAN, TRUEB, 1986; HADDAD, PRADO, 2005; WELLS, 2007).

Tabela 1 – Modos de Reprodução de Anuros. Todos variam entre o local de deposição, principalmente entre água¹ e solo, bem como sobre as formas de desenvolvimento das larvas (girinos)².

Local de deposição	Modo
Aquáticos	
Ovos depositados na água	
Ovos e larvas exotróficas em corpos d'água lênticos.	1 +
Ovos e larvas exotróficas em corpos d'água lóticos.	2 +
Ovos e estágios larvais iniciais em tocas subaquáticas construídas, larvas exotróficas em corpos em d'água lóticos.	3
Ovos e estágios larvais iniciais em bacias naturais ou construídas; após inundação, larvas exotróficas em corpos d'água lênticos ou lóticos.	4
Ovos e estágios larvais iniciais em tocas subterrâneas construídas; após inundação, larvas exotróficas em corpos d'água lênticos ou lóticos.	5
Ovos e larvas exotróficas em água acumulada em buracos de troncos de árvores ou em plantas aéreas (fitotelmatas).	6 +
Ovos e larvas endotróficas em água acumulada em depressões.	7 +
Ovos e larvas endotróficas em água acumulada em buracos de troncos de árvores ou em plantas aéreas (fitotelmatas).	8
Ovos depositados em corpos de água lóticos e engolidos pela fêmea, ovos e larvas completam o desenvolvimento no estômago da fêmea.	9
Ovos em ninhos de bolhas	
Ovos em ninhos de bolhas flutuantes em corpos d'água lênticos; girinos exotróficos em corpos d'água lênticos.	10
Ovos em ninhos de espuma	
Ninhos flutuantes em corpo d'água lêntico; larva exotrófica em corpo d'água lêntico.	11 +*
Ninhos flutuantes em corpo d'água lêntico; larva exotrófica em corpo d'água lótico.	12 *
Ninhos flutuantes em água acumulada em bacias construídas; larva exotrófica em corpo d'água lêntico.	13 +*
Ninhos flutuantes em corpo d'água em bromélias terrestres; larva exotrófica em corpo d'água lótico.	14 +*
Ovos Incrustados no Dorso de Fêmeas aquáticas	
Ovos eclodem em larvas exotróficas aquáticas.	15
Ovos eclodem em pós-metamórficos.	16
Não aquáticos	
Ovos no solo, sobre rochas ou em tocas	
Ovos e larvas em estágios iniciais em ninhos escavados; após inundação, larvas exotróficas em corpos d'água lênticos ou lóticos.	17
Ovos no solo ou sobre rochas acima da água; após inundação, larvas exotróficas movem-se para a água.	18 +
Ovos sobre rochas, fendas de rochas úmidas ou raízes de árvores acima d'água; larvas exotróficas semiterrestres vivendo sobre rochas ou em fendas de rochas em uma película de água na interface água-terra.	19

Ovos no solo; larvas exotróficas são transportadas para a água por adultos.	20	
Ovos no solo; larvas endotróficas completam o desenvolvimento em ninho terrestre.	21	+
Ovos no solo; larvas endotróficas completam o desenvolvimento no dorso, saco vocal ou em um marsúpio do adulto	22	
Ovos terrestres com desenvolvimento direto.	23	+
Ovos arborícolas		
Ovos eclodem em larvas exotróficas que caem em corpos d'água lênticos.	24	
Ovos eclodem em larvas exotróficas que caem em corpos d'água lóticos.	25	
Ovos eclodem em larvas exotróficas que caem em água acumulada em cavidades de árvores.	26	
Ovos eclodem em juvenis (desenvolvimento direto).	27	+
Ovos em ninhos de espuma (terrestres ou arborícolas)		
Ninhos de espuma sobre o solo úmido da floresta; após inundação, larvas exotróficas em corpos d'água lênticos.	28	+*
Ninhos de espuma com ovos e larvas em estágios iniciais em bacias; após inundação, larvas exotróficas em corpos d'água lóticos ou lênticos.	29	+*
Ninhos de espuma com ovos e larvas em estágios iniciais em ninhos subterrâneos construídos; após inundação, larvas exotróficas em corpos d'água lênticos.	30	+*
Ninhos de espuma com ovos e larvas em estágios iniciais em ninhos subterrâneos construídos; após inundação, larvas exotróficas em corpos d'água lóticos.	31	+*
Ninhos de espuma com ovos em câmaras subterrâneas construídas; larvas endotróficas completam o desenvolvimento no ninho.	32	+*
Ninhos de espuma arborícolas; larvas eclodidas caem em corpos d'água lênticos ou lóticos.	33	*
Ovos carregados pelos progenitores		
Ovos carregados sobre as pernas dos machos por um mês; larvas exotróficas em corpos d'água lênticos.	34	
Ovos carregados em marsúpio dorsal da fêmea; larvas exotróficas em corpos d'água lênticos.	35	
Ovos carregados no dorso ou em marsúpio dorsal da fêmea; larvas endotróficas em água acumulada em bromélias ou em colmos de bambú.	36	
Ovos carregados no dorso ou em marsúpio dorsal da fêmea; desenvolvimento direto com eclosão de sapinhos completos.	37	
Ovos retidos nos ovidutos		
Ovoviviparidade (Viviparidade Lecitotrófica)	38	+
Viviparidade Matrotrofica	39	

Fonte: Tabela adaptada a partir de Haddad e Prado (2005).

+ Modos de reprodução apresentados pelas espécies da Família Leptodactylidae (n=17).

* Modos de reprodução que utilizam a deposição de ovos em ninhos de espuma (n=10).

¹ Para água a principal variação se dá entre corpos d'água parada, como poças e lagos

(lênticos), e de água corrente, como rios e riachos (lóticos).

² Os girinos podem se alimentar livremente no ambiente em que se desenvolvem (chamadas de larvas exotróficas) e outras são totalmente dependentes do vitelo dos ovos até a metamorfose (são denominadas larvas endotróficas). Todavia algumas espécies podem ainda do ovo podem eclodir diretamente em pequenos sapos sem passar por fase larval.

2.2 Ninhos de Espuma de Anuros: Evolução, Composição e Potenciais Biotecnológicos

Ninhos de espuma representam um exemplo de convergência evolutiva, surgindo independentemente em várias espécies de anuros de linhagens distantemente relacionadas entre diferentes continentes (DUELLMAN, TRUEB, 1986; WELLS, 2007; PEREIRA et al., 2015; 2017; GOULD, 2021). Semelhante aos sapos leptodactídeos, algumas espécies de sapos australianos da Família Limnodynastidae depositam ninhos de espuma que podem flutuar sobre a água, estar no solo próximo à margem ou ainda dentro de cavidades no solo onde o girino irá completar seu desenvolvimento longe da água (WELLS, 2007; PEREIRA et al., 2017). Enquanto que para várias espécies africanas e asiáticas de anuros da Família Rhacophoridae e uma única espécie africana da Família Hyperoliidae (*Opisthophyllax immaculatus*) os ninhos de espuma são depositados sobre árvores, geralmente próximos a água onde os girinos irão completar o desenvolvimento (WELLS, 2007; PEREIRA et al., 2017). Outros anuros do gênero *Stumpffia*, pertencentes à Família Microhylidae, são encontrados em Madagascar e depositam ninhos de espuma sobre a serapilheira, onde seus girinos completam desenvolvimento longe da água (WELLS, 2007; PEREIRA et al., 2017). Por último, apenas a espécie Neotropical *Scinax rizibilis*, da família Hylidae, deposita ninhos de espuma que flutuam sobre a água onde seus girinos completaram o desenvolvimento (HADDAD, PRADO, 2005; POMBAL JR., HADDAD, 2007; WELLS, 2007).

Estas estruturas têm sua origem a partir de glândulas da pele ou de secreções cloacais, somente maternas ou do casal em amplexo (WELLS, 2007; VITT; CALDWELL, 2014; GOULD, 2021). A espuma se forma durante o amplexo, ela pode se formar a partir da movimentação dos membros posteriores dos machos (Leptodactylidae), pela movimentação dos membros posteriores do casal em amplexo (Rhacophoridae) ou a movimentação dos membros anteriores da fêmea (Limnodynastidae) (Figura 2) (DUELLMAN; TRUEB, 1994; WELLS, 2007; VITT; CALDWELL, 2014).

Estas secreções possuem uma composição química cuja base parece ser constituída principalmente por proteínas e carboidratos, cujas funções estão envolvidas na

manutenção da estrutura e proteção, química e física, dos ovos e girinos em desenvolvimento no ninho de espuma (HISSA et al., 2008; OKE et al., 2008; FLEMING et al., 2009; HISSA et al., 2014; 2016). Algumas proteínas identificadas no ninho de leptodactilídeos são denominadas como ranaspuminas, possuindo semelhanças com lectinas e cistatinas, que usualmente estão envolvidas em mecanismos de defesa contra microorganismos (Tabela 2) (FLEMING et al., 2009). Enquanto outras ranaspuminas identificadas em ninhos de espuma de *Leptodactylus vastus*, dessa mesma família, possuem propriedades surfactantes (Tabela 2) (HISSA et al. 2008; 2014; 2016).

Tabela 2 – Proteínas isoladas e caracterizadas de ninhos de espuma de anuros.

Proteína	Espécie*	Local	Função /Tipo	Estrutura	Fonte
Ranasmurfina	<i>Polypedates leucomystax</i>	Malásia	-	2VH3	1
Ep-RSN-1	<i>Engystomopus pustulosus</i>	Trindade	Tipo de cistatina	-	2
Ep-RSN-2	<i>E. pustulosus</i>	Trindade	Surfactante	2WGO_A	3
Ep-RSN-3	<i>E. pustulosus</i>	Trindade	Lectina	-	2
Ep-RSN-4	<i>E. pustulosus</i>	Trindade	Lectina	-	2
Ep-RSN-5	<i>E. pustulosus</i>	Trindade	Lectina	-	2
Ep-RSN-6	<i>E. pustulosus</i>	Trindade	Lectina	-	2
Lf-RSN-1	<i>Leptodactylus fuscus</i>	Trindade	-	-	4
Lv-RSN-1	<i>L. vastus</i>	Brasil	Surfactante	4K82, 4K83	5

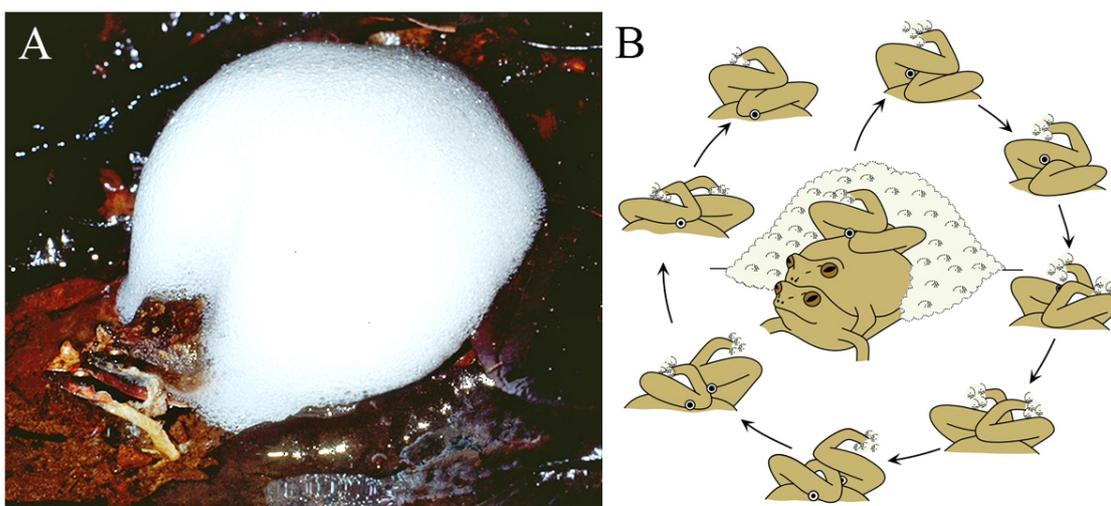
Fontes: (1) Oke et al. (2008); (2) Fleming et al. (2009); (3) Mackenzie et al. (2009); (4) GenBank: AAT66300.1; (5) Hissa et al. (2008, 2014 e 2016).

* Apenas a espécie *Polypedates leucomystax* pertence à Família Rhacophoridae. Todas as demais espécies pertencem a Família Leptodactylidae.

De fato, estas composições químicas parecem fornecer pistas sobre as funções desenvolvidas pelos ninhos de espuma na proteção dos ovos e larvas. Dentre essas funções de proteção podemos citar: Proteção contra radiação solar, manutenção da oxigenação do ninho, proteção contra dessecação e outras não diretamente relacionadas a essa composição, como a proteção contra predadores (ZINA, 2006; WELLS, 2007; HISSA et al., 2008; GOULD, 2021). De modo geral, os ninhos de espuma, parecem fornecer diversas vantagens para espécies de anuros que depositam seus ovos em ambientes de pequenas poças temporárias, quentes e pouco oxigenadas (WELLS, 2007). Ainda que sua composição química indique a possibilidade de proteção contra microorganismos, bactérias gram-positivas já foram isoladas e

cultivadas a partir de ninhos de espuma de anuros leptodactílídeos (HISSA et al., 2008; FLEMING et al., 2009). Bem como todo um conjunto único de microrganismos foi encontrado dentro dos ninhos de espuma de três espécies de anuros racoforídeos do gênero *Polypedates* (*Polypedates leucomystax*, *P. macrotis* e *P. otilophus*) encontradas na ilha de Bornéu (MCGRATH-BLASER et al., 2021). A presença desses microrganismos associados a anfíbios e seus ninhos será discutida adiante. Contudo, é provável que os ninhos de espuma atuem como barreira seletiva, permitindo que apenas certos tipos de microrganismos simbiotes possam se desenvolver naquele meio.

Figura 2 – Amplexo e a formação de ninho de espuma em *Physalaemus ephippifer*, Família Leptodactylidae. A – Fotografia mostrando casal de *P. ephippifer* em amplexo junto ao seu ninho em formação. B – Desenho esquemático representando a movimentação das pernas do macho de *P. ephippifer* para a formação da espuma, os ovos (círculos em preto) vão sendo inseridos na espuma durante esse processo.

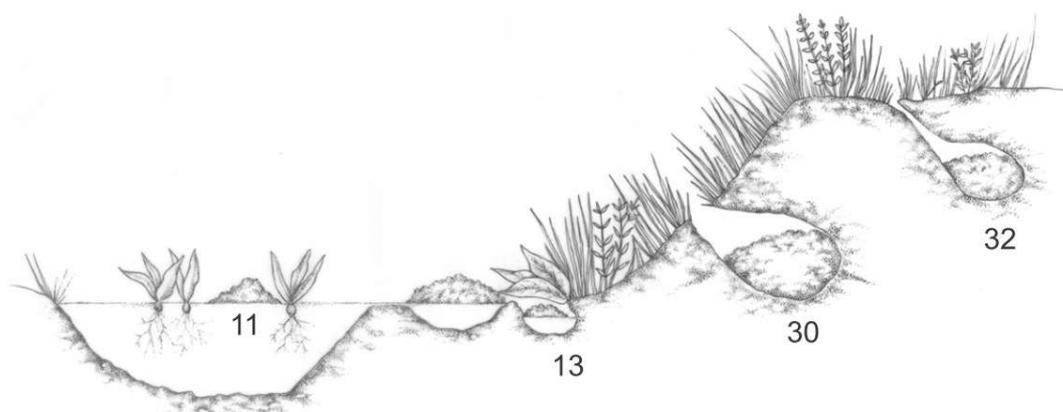


Adaptadas de: Ernst et al. (2014); Vitt e Caldwell (2014).

Em aspectos evolutivos já se foi discutido que os ninhos de espuma podem ter favorecido os anuros leptodactílídeos na conquista do ambiente terrestre, diminuindo a necessidade de água para a reprodução (HEYER, 1969). Todavia, não há um padrão linear nesse sentido. Contudo, a evolução do grupo demonstra diversos padrões convergentes e reversivos na Filogenia da Família Leptodactylidae, espécies cujo ancestral tinha modos de reprodução aquáticos passam para terrestres e outras reverterem da terra para água (PEREIRA et al., 2015). De modo geral estes ninhos não parecem estar diretamente relacionados à adaptação ao ambiente terrestre. Contudo, eles permitiram que estes animais se

desenvolvessem em ambientes antes considerados inóspitos (e.g. poças d'água temporárias), permitindo que eles explorem mais microhabitats seja na água ou na terra (Figura 3) (DUELLMAN & TRUEB, 1986; HADDAD & PRADO, 2005; POMBAL JR & HADDAD, 2007; WELLS, 2007; GOULD, 2021). Diversas espécies de anuros apresentam secreção de muco e movimentos complexos durante o seu amplexo reprodutivo, características tidas como percussoras ao desenvolvimento dos ninhos de espuma, mesmo assim, poucas espécies chegaram a desenvolveram essa característica, o que sugere essa mudança evolutiva ocorre em resposta a certas pressões seletivas comuns as diferentes linhagens que os produzem, mas não a todas as espécies de anuros (GOULD, 2021). Análises recentes indicam que apenas para os anuros da Família Leptodactylidae os ninhos de espuma podem ser caracterizados como inovação evolutiva, pois seu surgimento favoreceu a diversificação e aumentou as taxas de especiação do grupo (PEREIRA et al., 2017).

Figura 3 – Desenho esquemático representando quatro dos 17 modos de reprodução de anuros da Família Leptodactylidae, parte dos 10 modos de reprodução que utilizam a deposição de ovos em ninhos de espuma em ambientes aquáticos e terrestres.



Fonte: Pereira et al. (2015). Ninhos de espuma na água: Modos 11 e 13; Ninhos de espuma em ambiente terrestre: Modos 30 e 32. Descrição dos modos baseada em Haddad e Prado (2005) (Tabela 1).

Em relação a potenciais usos tecnológicos, com base em sua composição química e características, ninhos de espuma de anuros apresentam grande potencial como fontes de estudos de novas substâncias tensoativas, surfactantes naturais que são menos tóxicos e mais estáveis que os sintéticos que são os mais empregados convencionalmente (CHOI et al., 2012; BROZIO et al., 2021). Pois a espuma deve manter suas propriedades sem afetar fertilização do casal em amplexo e sem ser tóxica para os ovos que estão em desenvolvimento em seu

interior (GOULD, 2021). Em especial a proteína ranaspumina RSN-2 identificada nos ninhos do anuro leptodactídeo *Engystomopus pustulosus* (Tabela 2) apresentou grande potencial para usos industriais, na produção de medicamentos, atuando como veículo para administração de fármacos (MACKENZIE et al., 2009; CHOI et al., 2012; BROZIO et al., 2021). Todavia, este ainda é um ramo recente de estudo e pouco ainda se conhece sobre o potencial dessas substâncias. Contudo, o estudo desses microrganismos associados a anuros, seu microbioma na produção de fármacos e outros potenciais biotecnológicos, bem como o potencial daquele microbioma dos ninhos de espuma de anuros, também parece ser bastante promissor.

2.3 Microbioma de Anfíbios: Importância e seu Potencial Biotecnológico

Microbioma é definido como uma comunidade de microrganismos, a microbiota, e seus conjuntos de genes com respectivas funções correlatas (XI et al., 2018; REBOLLAR et al., 2020). Em um amplo sentido este termo representa um conjunto de microrganismos associado a um ambiente ou um determinado organismo, formando um pequeno ecossistema (XI et al., 2018). Sua riqueza e composição variam em relação às características do meio, principalmente entre aquáticos a terrestres, assim como das diferentes propriedades associadas aos órgãos e secreções nos quais podem ser encontrados em animais e plantas (THOMPSON et al., 2017).

Dentre os animais, o microbioma dos mamíferos é um dos mais estudados, com especial enfoque ao microbioma humano (CAPORASO et al., 2011; GOODRICH et al., 2014; XI et al., 2018). Todavia, vários esforços recentes têm sido aplicados ao estudo do microbioma de outros grupos de animais, dentre estes podemos destacar os significativos avanços sobre o estudo do microbioma de anfíbios (JIMÉNEZ; SOMMER, 2017; REBOLLAR; HARRIS, 2019; REBOLLAR et al., 2020).

Até o início do século XXI quase todos os estudos sobre microbioma eram baseados em métodos dependentes de isolamento e cultivo em condições de laboratório (XI et al., 2018). Todavia, a maioria dos microrganismos não é viável fora de seu ambiente natural, as condições *in vitro* não são adequadas a toda microbiota e por isso durante muito tempo o conhecimento sobre o microbioma era subestimado (XI et al., 2018).

Os maiores avanços no estudo do microbioma se deram a partir de 2005, com o advento das técnicas de sequenciamento massivo de nova geração (Next-Generation Sequencing, NGS) (XI et al., 2018). O que também foi observado para o microbioma de

anfíbios, onde os maiores avanços se deram a partir da utilização dessas novas técnicas moleculares aliadas a ferramentas de bioinformática (JIMÉNEZ; SOMMER, 2017; REBOLLAR; HARRIS, 2019; REBOLLAR et al., 2020). Não obstante, o cultivo e isolamento de microrganismos simbiossantes ainda é empregado como técnica complementar as técnicas de sequenciamento massivo (JIMÉNEZ; SOMMER, 2017; REBOLLAR et al., 2020).

A maior parte dos estudos baseados em técnicas de sequenciamento tem como foco a análise de sequências do gene 16S rRNA de células procarióticas (Bacteria e Archaea), considerado um excelente marcador para caracterização taxonômica e funcional do microbioma (JIMÉNEZ; SOMMER, 2017; XI et al., 2018). Alguns também avaliam o gene 18S rRNA, marcador para microeucariotos (fungos, protozoários e pequenos animais) (JIMÉNEZ; SOMMER, 2017; KUENEMAN et al., 2016b). Dentre estes, destaca-se o uso da análise do gene 18S rRNA para a identificação dos fungos baquitrídiomicetos *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) e *B. salamandrivorans* (Bs) que são de patógenos de anfíbios (BOYLE et al., 2004; MARTEL et al., 2013).

Todavia, majoritariamente os estudos de microbioma de anfíbios tem tido como enfoque somente os grupos de bactérias (Bacteria), sendo ainda escassos os estudos que avaliam a interação com simbiossantes de outros grupos (JIMÉNEZ; SOMMER, 2017; REBOLLAR et al., 2020). Geralmente, os estudos abordam anfíbios adultos (>65%) e em seu ambiente natural (>60%), estando os estudos sobre o microbioma de outros estágios de vida e sob condições experimentais estão em menor proporção, assim como em sua maior parte são sobre o microbioma da pele (>70%), com as demais pesquisas envolvendo o microbioma do trato digestivo (JIMÉNEZ; SOMMER, 2017; REBOLLAR et al., 2020).

Seguindo o padrão de riqueza de anfíbios, a maior parte dos animais estudados são anuros, seguido por algumas de salamandras (Ordem Caudata) e aparentemente não há registro de estudos sobre o microbioma de espécies de cecílias (Ordem Gymnophiona) (JIMÉNEZ; SOMMER, 2017; REBOLLAR et al., 2020). Para estudos sobre o microbioma da pele somam-se 331 espécies de anfíbios estudadas, o que corresponde a apenas 4,9% do total de espécies de anfíbios, em sua grande maioria de ambientes temperados e mais de 60% destas são classificadas como “pouco preocupantes” em relação ao seu risco de extinção (Least Concern – LC; International Union for Conservation of Nature – IUCN) (REBOLLAR et al., 2020).

Grande parte dos estudos sobre microbioma de anfíbios se desenvolve sobre três áreas: fatores que influenciam a amplitude e variação natural do microbioma dos anfíbios; impactos ambientais relacionados à disbiose patogênica e saúde do hospedeiro; e sobre

contribuição desses estudos sobre o microbioma para a conservação de anfíbios (Figura 4) (JIMÉNEZ; SOMMER, 2017).

Sobre a amplitude natural, pesquisas recentes ampliaram o conhecimento sobre o microbioma da pele de anfíbios. Da simples descrição de riqueza e composição taxonômica, as pesquisas avançaram no estudo da ação de fatores diversos sobre sua formação. Apontando a influência de características do hospedeiro, seus hábitos ecológicos e aspectos climáticos como os mais relevantes para a composição do microbioma da pele de anfíbios (Figura 5) (REBOLLAR et al., 2020).

Figura 4 – Fatores que influenciam a variação natural do microbioma dos anfíbios, impactos relacionados à disbiose patogênica e a saúde do hospedeiro e a contribuição potencial dos microbiomas para a conservação dos anfíbios.



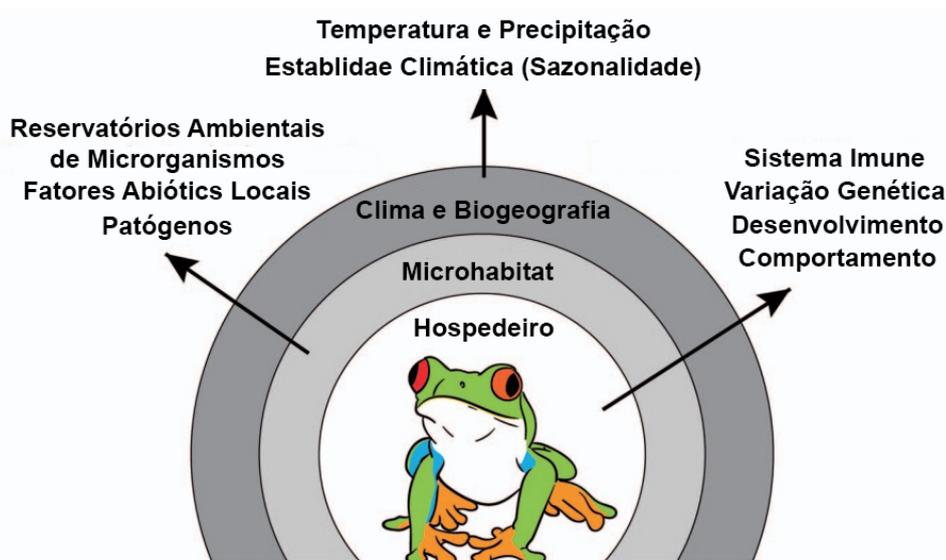
Fonte: Adaptado de Jiménez & Sommer (2017).

Certas evidências ainda indicam que variações genéticas, provavelmente aquelas ligadas diretamente ao sistema imune, parecem ser determinantes por certa variação no microbioma da pele de anfíbios, mas essa influência ainda não é totalmente compreendida e requer estudos mais aprofundados (JIMÉNEZ; SOMMER, 2017; REBOLLAR et al., 2020). Além disso, evidências recentes apontam que o microbioma da pele de anfíbios não é afetado pela distância filogenética entre diferentes espécies de sapos e salamandras, a filossimbiose (BLETZ et al., 2017; BIRD et al., 2018; KUENEMAN et al. 2019; REBOLLAR et al., 2020).

Diferente do que é observado para outros grupos de organismos, a diversidade do microbioma da pele está diretamente associada aos hábitos e modos de vida desses animais, em especial as diferenças observadas entre espécies arborícolas, terrestres e ripárias (ou aquáticas) de anfíbios (BLETZ et al., 2017; KUENEMAN et al. 2019; REBOLLAR et al.,

2020). Em geral a riqueza do microbioma da pele de anfíbios é menor em espécies arborícolas e maior em espécies aquáticas e terrestres, o que em geral corresponde às diferenças de riqueza observadas para o microbioma desses diferentes ambientes (BLETZ et al., 2017; THOMPSON et al., 2017; KUENEMAN et al. 2019).

Figura 5 – Fatores determinantes no microbioma da pele de anfíbios.



Fonte: Adaptado de Rebollar et al. (2020).

Contudo, no microbioma da pele, os grupos mais abundantes são em geral aqueles menos representativos de seus ambientes de origem (WALKE et al., 2014; BLETZ et al., 2017; REBOLLAR et al., 2020). Entretanto, tem sido demonstrado que reservatórios naturais são importantes para a manutenção do microbioma de pele dos anfíbios (REBOLLAR et al., 2020). Em menor proporção, ainda para o microbioma de pele, a transmissão vertical tem sido observada para algumas espécies que apresentam cuidados parentais, assim como também a transmissão horizontal possa acontecer direta ou indiretamente em seu ambiente de vida (REBOLLAR et al., 2020).

Em uma escala mais ampla, padrões biogeográficos estão sendo avaliados para as variações do microbioma, um destes estudos envolve uma avaliação global sobre o microbioma da pele de anfíbios (THOMPSON et al., 2017; KUENEMAN et al., 2019). Como resultado, foi constatado um decréscimo na riqueza do microbioma da pele de anfíbios quanto menor for a latitude, um gradiente biogeográfico considerado inverso aos demais, até mesmo para espécies de anfíbios, mas que se assemelha ao observado para outras comunidades de microrganismos já estudadas, alguns autores sugerem que este gradiente esteja relacionado a

tipos diferentes de substratos ou ainda em relação a variações entre temperaturas máximas e mínimas (WIENS, 2007; MITTELBACH et al., 2017; BAHRAM et al., 2018; KUENEMAN et al., 2019). Como para o microbioma de substratos naturais, de onde esses animais adquirem esses microrganismos, além do fato de que como animais ectotérmicos eles não fornecem proteção aos microrganismos da pele durante variações climáticas sazonais (BAHRAM et al., 2018; KUENEMAN et al. 2019).

A composição natural dessa microbiota, seja do trato digestivo ou da pele, varia bastante de entre as diferentes espécies de anfíbios. Apesar disso, certo padrão é observado na composição do microbioma da pele de anfíbios em escala global, em muitos casos há uma predominância (> 50%) do Filo Proteobacteria seguido em menores proporções (< 25%) pelos Filos Actinobacteria, Bacteroidetes e Firmicutes, além de outros mais esporádicos e escassos (Filos Verrucomicrobia, Chloroflexi, Cyanobacteria, Acidobacteria e Planctomycetes) (KUENEMAN et al., 2019). A variação climática também está relacionada à abundância de alguns filios, Bacteroidetes e Verrucomicrobia relacionados a climas mais temperados enquanto Proteobacteria está mais associado a climas mais quentes (KUENEMAN et al., 2019).

No trato digestivo os Filos Proteobacteria, Bacteroidetes e Firmicutes também estão entre os mais abundantes (KOHL et al., 2013; BLETZ et al., 2016; KOHL; YAHN, 2016; HUANG et al., 2018). Contudo, padrões globais e abrangentes ainda não foram devidamente estabelecidos, no geral os estudos sobre o microbioma do trato digestivo ainda são baseados em observações pontuais e experimentos locais que serão discutidos mais a frente.

De todo modo, tanto para o microbioma da pele ou trato digestivo, essas observações sobre a composição preponderante podem em parte ser explicadas pela ampla diversidade apresentada pelos Filos Bacteroidetes, Firmicutes e Proteobacteria, este último que é o mais rico e fenotipicamente amplo filo do Domínio Bacteria (OREN, 2004; GUPTA, 2000; KESTERS et al., 2006).

Todavia, destes filios a frequência de seus gêneros parece estar diretamente relacionada aos diferentes hábitos de vida de seus hospedeiros, por exemplo, do Filo Proteobacteria, os gêneros *Pigmentiphaga* e *Achromobacter* são mais abundantes em anfíbios arborícolas, enquanto *Methylothera* é mais rico em espécies ripárias e *Agrobacterium* em espécies terrestres (BELDEN et al., 2015; BLETZ et al., 2017).

Diferentes ambientes possuem distintas comunidades microbianas e o microbioma desses anfíbios está exposto a essas distintas fontes, as diferenças observadas as comunidades do ambiente e destes animais são resultantes da seleção por parte destes diferentes hospedeiros (BLETZ et al., 2017). O que acarreta padrões convergentes para o microbioma da

pele, a semelhança entre as diferentes comunidades microbianas da pele de diferentes espécies de anfíbios não tem relação com seus parentescos filogenéticos (filosimbiose) (BLETZ et al., 2017; BIRD et al., 2018).

Dentre os gêneros mais frequentes e abundantes certo destaque tem sido dado àqueles que possam ser causadores de doenças e outros simbiontes isolados na busca por compostos antifúngicos, principalmente aqueles que tenham ação contra Bd (*Batrachochytrium* sp.). Dos simbiontes também associados a doenças de anfíbios estão representados pelos gêneros *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, entre outros (OROURKE e ROSEBAUM, 2015). Dos que foram isolados e cultivados *Bacillus*, *Chryseobacterium*, *Janthinobacterium* e *Paenibacillus* frequentemente apresentam bom potencial antifúngico contra Bd (HARRIS et al., 2006; ANTWINS et al. 2015; ASSIS et al., 2017; CATENAZZI et al., 2018).

Dentre todos os gêneros no microbioma de anfíbios, certa atenção deve ser destacada para as *Pseudomonas*. Elas estão presentes em diversos ambientes, sejam aquáticos ou terrestres, além de também apresentarem uma ampla variedade de interações com outros organismos vivos (SILBY et al., 2011). Algumas espécies de *Pseudomonas* são patógenas de anfíbios, sendo que alguns experimentos demonstraram que, em alguns casos, elas podem facilitar o desenvolvimento do fungo patógeno Bd (*Batrachochytrium dendrobatidis*). (LOUDON et al., 2014a; OROURKE e ROSEBAUM, 2015). Todavia, normalmente as cepas de *Pseudomonas* isoladas de anfíbios têm demonstrado grande potencial contra microrganismos patogênicos, incluindo contra o fungo Bd (HARRIS et al., 2006; ASSIS et al., 2017; CATENAZZI et al., 2018; MARTIN et al., 2019).

Contudo, as *Pseudomonas* aqui se destacam por ser um dos gêneros mais frequentes e abundantes no microbioma de anfíbios, principalmente para o microbioma da pele (HARRIS et al., 2006; KUENEMAN et al., 2014; LOUDON et al., 2014a; 2014b; WALKE et al., 2015; BLETZ et al., 2017; ASSIS et al., 2017; ABARCA et al., 2018; CATENAZZI et al., 2018; FONTAINE et al., 2018; GRIFFTHS et al., 2018; PASSOS et al., 2018; BRUNETTI et al., 2019; KUENEMAN et al., 2019). Além de registradas em adultos, também são abundantes no microbioma da pele e do trato digestivo de larvas (KUENEMAN et al., 2014; BLETZ et al., 2016; KUENEMAN et al., 2016b). Podem ainda ser o grupo dominante do microbioma core da pele de algumas espécies de anfíbios (LOUDON et al., 2014b; KUENEMAN et al., 2014).

Geralmente detectado por técnicas moleculares, *Pseudomonas* também pode ser identificado por técnicas convencionais de isolamento e cultivo (WALKE et al., 2015; de

ASSIS et al., 2017). Ainda como simbionte da pele, *Pseudomonas* foram recentemente destacadas a partir de outras funções biológicas, atuando diretamente na produção de ferormônios sexuais da espécie de perereca *Boana prasina* (BRUNETTI et al., 2019).

Outros estudos, para além daqueles sobre que descrevem as características naturais do microbioma de anfíbios, envolvem a avaliação de impactos antrópicos/antropogênicos sobre alterações no microbioma, a disbiose, em especial a avaliação da disbiose patogênica causada, com destaque aquela causada pelos fungos patogênicos *Batrachochytrium* sp., atualmente uma das maiores ameaças de extinção de várias espécies de anfíbios (CATENAZZI, 2015; JIMÉNEZ; SOMMER, 2017; FISHER; GARNER, 2020; REBOLLAR et al., 2020). Nesse sentido, tais estudos, quase sempre, estão visando à implementação de estratégias de conservação biológica, pois fornecem ferramentas que contribuem para o manejo e manutenção dessas espécies de anfíbios a partir do estudo de seus microrganismos simbiotes (CATENAZZI, 2015; JIMÉNEZ; SOMMER, 2017; REBOLLAR et al., 2020).

Certas modificações na riqueza e composição do microbioma de anfíbios são naturais e tem relação direta com seu ciclo de vida. Especialmente em anuros, cujas modificações morfofisiológicas envolvem a transição de larvas aquáticas para adultos terrestres. Os girinos têm um microbioma do trato digestivo mais diverso e mais semelhante ao de peixes, enquanto que o de sapos adultos é menos diverso e se assemelha ao dos demais vertebrados terrestres (KOHL et al., 2013; VENCES et al., 2016). O microbioma intestinal de girinos é especialmente afetado pela disponibilidade de alimento. (VENCES et al., 2016). Em larvas de salamandra, o microbioma da pele e trato digestivo é específico para o seu ambiente de vida, sejam riachos ou poças d'água, e somente microbiota intestinal é afetada pela mudança de ambiente, especialmente para a transição de lótico pra lântico (BLETZ et al., 2016).

Contudo, evidências experimentais demonstram que alterações no microbioma durante a fase de desenvolvimento larval podem diminuir a imunidade dos animais a infestações em sua vida adulta. Anuros da espécie *Osteopilus septentrionalis* que foram submetidos a tratamentos com antibióticos durante seu desenvolvimento larval eram três vezes mais susceptíveis ao estabelecimento de parasitas intestinais que aqueles que não submetidos a antibióticos, independente da riqueza e composição da microbiota intestinal em sua fase adulta (KNUTIE et al., 2017).

De modo semelhante, alterações no microbioma decorrentes de alterações na dieta também são observadas entre indivíduos adultos de ambientes distintos em certas espécies,

indicando que alterações ambientais podem acarretar mudanças no microbioma. O microbioma do trato digestivo de anuros da espécie *Fejervarya limnocharis* que ocupam áreas cultivadas é mais rico que aquele de indivíduos encontrados em áreas naturais, o que pode ser decorrente de alterações na dieta e aumentar a sua exposição desses animais a microrganismos patogênicos (CHANG et al., 2016).

Poluentes presentes no ambiente também podem afetar a pele o trato digestivo desses animais e, por consequência, afetar o microbioma desses sistemas (KOHL et al., 2015; KRYNAK et al., 2015; HUGHEY et al., 2016; ZHANG et al. 2016). A exposição a esses compostos também pode aumentar a exposição a microrganismos patógenos por meio do aumento da riqueza do microbioma do trato digestivo de girinos e adultos (KOHL et al., 2015). Em outros casos as mudanças ocorrem por meio de alterações na composição de táxons no microbioma, o que pode representar a perda de simbiontes importantes para a saúde do animal (ZHANG et al. 2016).

Em outros casos, condições de cativeiro podem acarretar em alterações no microbioma de anfíbios. Muitas vezes ocorrendo diminuição da diversidade de microrganismos da pele em espécies sob condições de cativeiro, o que demonstra a importância de fontes ambientais para a sua manutenção (MICHAELS et al., 2014; BECKER et al., 2014; LOUDON et al., 2014b; KUENEMAN et al., 2016a).

Infecções e infestações provocadas por patógenos e parasitas também causam alterações nas comunidades de microrganismos simbiontes de anfíbios. Os gêneros *Janthinobacterium*, *Pseudomonas* e *Flavobacterium*, que costumam apresentar atividade antifúngica, são menos abundantes no tegumento de rãs da espécie *Rana italica* que estão infestadas pelo protista *Amphibiocystidium* sp., o que pode indicar que esses simbiontes também atuam na proteção contra esses parasitas de pele (FEDERICI et al., 2015).

Dos patógenos e seus efeitos no microbioma de anfíbios, as infecções por quitridiomicose (*Batrachochytrium dendrobatidis* - Bd e *B. salamandrivorans* - Bs) são consideradas as mais relevantes por sua propagação global e os declínios e extinções de espécies decorrentes dessa ampla disseminação (CATENAZZI, 2015; FISHER; GARNER, 2020). Por isso vários estudos já foram feitos com base na identificação de microrganismos, principalmente bactérias, e avaliação do seu potencial de inibição de fungos do gênero *Batrachochytrium* (HARRIS et al., 2006; LOUDON et al., 2014a; ANTWIS et al., 2015; BELDEN et al., 2015; ABARCA et al., 2018; CATENAZZI et al., 2018). A partir dessa caracterização estratégias de aplicação são testadas, como a utilização de probióticos na proteção d (KUENEMAN et al., 2016a).

Uma análise recente demonstrou que a capacidade de inibição de fungos é filogeneticamente abrangente em comunidades de microrganismos simbioses de anfíbios, sendo que esta ampla abrangência pode representar uma seleção ao longo da história evolutiva de anfíbios, uma forma de proteção contra esses patógenos que são mais comuns em seus habitats que úmidos (BECKER et al., 2015). A ação desses simbioses no combate a infecções e parasitas se dá através da produção de metabolitos secundários, que podem diretamente inibir a propagação desses patógenos como também podem atuar na modulação do sistema imune de seus hospedeiros (WALKE et al., 2015; JIMÉNEZ; SOMMER, 2017; REBOLLAR et al., 2020).

As substâncias produzidas pelos microrganismos simbioses podem ainda possuir outras funções além daquelas relacionadas à proteção contra patógenos e parasitas. Como foi demonstrado que *Pseudomonas* simbioses da pele da perereca *Boana prasina* são as responsáveis pela produção de ferormônios sexuais (BRUNETTI et al., 2019). Provenientes de fontes ambientais estes microrganismos fazem parte de uma das linhagens de *Pseudomonas* constituintes do microbioma cerne (core) da pele dessa espécie de anfíbio (BRUNETTI et al., 2019).

Além disso, estes metabolitos secundários produzidos por simbioses de anfíbios podem ter aplicações biotecnológicas promissoras. No caso de substâncias antifúngicas, as mesmas que são avaliadas em seu potencial contra a quitridiomiose (*Batrachochytrium dendrobatidis*), têm apresentando elevado potencial contra fungos patógenos de humanos, como *Aspergillus fumigatus* (MARTIN et al., 2019). Produzida por *Pseudomonas cichorii*, a substância isolada com a maior atividade antifúngica foi caracterizada como um lipopeptídeo cíclico, identificado como uma viscosina (MARTIN et al., 2019).

Viscosinas caracterizadas para outras espécies de *Pseudomonas* também apresentavam atividades contra outros microrganismos, no entanto essas substâncias têm sido mais destacadas pelas suas potentes propriedades surfactantes, especialmente aquelas produzidas por *P. fluorescens* (LAYCOCK et al., 1991; ALSOHIM et al., 2014). Estes surfactantes naturais, definidos como biossurfactantes, são moléculas anfipáticas, possuindo partes hidrofílicas e hidrofóbicas, agindo na interface de líquidos e em superfícies sólidas, modificando a tensão superficial e interfacial (NITSCHKE; PASTORE, 2002; OLIVEIRA et al., 2018).

Biossurfactantes possuem muitas vantagens em relação aos surfactantes sintéticos, principalmente por causarem menos impactos ambientais, possuindo ampla aplicação industrial e representando um mercado em grande expansão (NITSCHKE; PASTORE, 2002;

OLIVEIRA et al., 2018). Da mesma forma, essas viscosinas como poderosas substâncias antifúngicas obtidas a partir de microrganismos simbiotes de anfíbios representam um grande potencial biotecnológico na prospecção de medicamentos (MARTIN et al., 2019).

Como foi mencionado anteriormente, dentre as substâncias conhecidas que compõem os ninhos de espuma de anfíbios anuros estão surfactantes naturais (Tabela 2). As chamadas ranaspuminas, essas proteínas biosurfactantes encontradas nos ninhos de espuma de sapos leptodactilídeos também apresentam elevado potencial biotecnológico (HISSA et al. 2008; 2014; 2016). Contudo, estas substâncias que compõe o ninho de espuma de leptodactilídeos aparentemente não possuem atividade contra microrganismos (HISSA et al. 2008).

Todavia, ainda conforme o que foi apresentado anteriormente, estes compostos presentes em ninhos de espuma criam proteção a ovos e girinos, pois atuam na manutenção de um microambiente próprio ao desenvolvimento desses animais (ZINA, 2006; WELLS, 2007; HISSA et al., 2008). Portanto eles podem servir de barreira seletiva a microrganismos, permitindo que somente aqueles benéficos possam se desenvolver.

No entanto, pouco se sabe sobre a diversidade de microrganismos presentes nos ninhos de espuma de anuros. A primeira, e até o momento a única, pesquisa do tipo envolveu a análise da composição do microbioma dos ninhos de espuma de três espécies de anuros arborícolas do gênero *Polypedates*, da Família Rhacophoridae, encontradas na ilha de Bornéu (MCGRATH-BLASER et al., 2021). Como anteriormente mencionado, os anuros dessa família são arborícolas, depositando seus ovos em ninhos de espuma em folhas de árvores próximas a água, onde os girinos podem completar o seu desenvolvimento (WELLS, 2007; PEREIRA et al., 2017; MCGRATH-BLASER et al., 2021). O microbioma dos ninhos de espuma desses anuros é composto principalmente pelos clados Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes e em menor proporção (< 10%) por outros (MCGRATH-BLASER et al., 2021). Há evidências de transferência vertical e ambiental, sendo a vertical mais significativa, assim os microrganismos dos ninhos de espuma de *Polypedates* têm sua origem a partir do microbioma parental (MCGRATH-BLASER et al., 2021)

Contudo, estas observações são preliminares e podem não corresponder a diversidade do microbioma de ninhos de espuma de outras espécies de racoforídeos ou mesmo de outras famílias que realizam este mesmo mecanismo para deposição de ovos. Conforme discutido anteriormente, este tipo de deposição evoluiu independentemente (convergentemente) em diferentes famílias de anuros que possuem comportamentos bastante distintos daqueles observados nos racoforídeos arborícolas (DUELLMAN, TRUEB, 1986;

WELLS, 2007; PEREIRA et al., 2015; 2017).

Como por exemplo nos anuros leptodactilídeos (Leptodactylidae), com comportamentos e modos de reprodução bastante distintos. Suas espécies são ripárias, que depositando seus ovos na água ou próximo a margem d'água, ou exclusivamente terrícolas, que depositando seus ovos em cavidades no solo (DUELLMAN, TRUEB, 1986; WELLS, 2007; PEREIRA et al., 2015; 2017). Apenas para ninhos de rãs da espécie *Leptodactylus vastus* bacilos gram-positivos já foram observados, mas nada além dessa observação (HISSA et al. 2008).

Deste modo, os microrganismos simbioss presentes nos ninhos de espuma precisam ser identificados e caracterizados quanto ao seu potencial biotecnológico. Eles podem possuir funções relacionadas à manutenção do ninho por meio da produção de surfactantes assim como atuar na produção de substâncias antimicrobianas, do mesmo modo que aqueles observados para o microbioma da pele.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Acessar o microbioma dos ninhos de espuma de três espécies de anuros da Família Leptodactylidae, *Adenomera hylaedactyla*, *Physalaemus cuvieri* e *Leptodactylus vastus*, que possuem distintos modos de reprodução, de seus ambientes de deposição e dos tecidos do hospedeiro, visando identificar os fatores que influenciam na aquisição do microbioma dos ninhos de espuma, bem como identificar táxons bioindicadores que possam ser manipulados biotecnologicamente para auxiliar na conservação de anuros.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a riqueza e diversidade de microrganismos por meio do sequenciamento massivo do gene rRNA 16S;
- Analisar a estrutura e composição do microbioma dos ninhos de espumas das três espécies de anuros selecionados no estudo;
- Analisar a estrutura e composição dos microbiomas dos ambientes de deposição dos ninhos de espumas (água, solo, interface solo/água);
- Analisar a estrutura e composição dos microbiomas da pele, cloaca e intestino da rã *L. vastus*.

4 HIPÓTESES

- Diferenças interespecíficas de composição química (proteínas) dos ninhos de espuma e seus diferentes modos de deposição entre a água e o solo irão afetar a composição do microbioma entre as diferentes espécies de sapos leptodactídeos estudados, no geral espera-se que o ambiente seja fator preponderante sobre o microbioma dos ninhos, uma tendência já observada para o microbioma de pele de anuros.
- O microbioma de anfíbios é uma fonte de microrganismos que produzem substâncias que protegem esses animais de patógenos e possuem elevado potencial biotecnológicos, dessa forma o microbioma dos ninhos de espuma também pode fornecer bons candidatos a exploração desses potenciais que visam a preservação dessas espécies pela produção de probióticos e que possam ter aplicações industriais.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os ninhos de espuma estudados apresentaram um microbioma distinto do encontrado em seus ambientes de deposição ou da pele, intestino e cloaca de animais adultos, sugerindo que as condições únicas fornecidas pela composição química peculiar dos ninhos de espuma selecionam um core de microrganismos característico desse microambiente. A caracterização bioquímica realizada através da quantificação de proteínas e carboidratos, atividade de redução da tensão superficial e perfil eletroforético SDS-PAGE mostram que, apesar das espécies de rãs pertencerem a uma mesma família possuem composição bioquímica diferente, sugerindo uma preponderante influência da composição de proteínas sobre a aquisição do microbioma.

Vale ressaltar, que a comunidade bacteriana presente nos ninhos de espuma de anfíbios, é o primeiro contato dos girinos; influenciando a microbiota destes e conseqüentemente dos adultos. Sabe-se que o microbioma de animais tem um importante papel na saúde e sistema imunológicos de seus hospedeiros, portanto, os resultados mostrados neste estudo podem ser uma ferramenta para guiar estratégias de conservação dessas espécies.

A identificação de gêneros predominantes como *Pseudomonas*, *Sphingobacterium*, e *Paenibacillus* mostram um grande potencial biotecnológico da microbiota presente nos ninhos de espuma de anfíbios.

Por exemplo, bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas* já foram relatadas por produzirem compostos surfactantes (viscosinas) com propriedades antimicrobianas, substâncias antifúngicas, com elevada ação contra patógenos de anfíbios (*Bd* - *Batrachochytrium dendrobatidis*) quanto aqueles que são de humanos (no caso contra *Aspergillus fumigatus*).

Do mesmo modo bactérias dos gêneros *Sphingobacterium* e *Paenibacillus* também são conhecidas pela produção de surfactantes e aquelas do microbioma da pele anuros também já foram identificadas como produtoras de substâncias antifúngicas contra *Bd*.

Dessa forma, nós expandimos o conhecimento acerca do microbioma de ninhos de espuma reforçando a importância deste para a conservação de anfíbios e seu potencial para aplicações biotecnológicas.

REFERÊNCIAS

- ABARCA, J. G. *et al.* Assessment of Bacterial Communities Associated With the Skin of Costa Rican Amphibians at La Selva Biological Station. **Frontiers in Microbiology**, [s.l.], v. 9, p. 2001, 2018.
- ALSOHIM, A. S. *et al.* The biosurfactant viscosin produced by *Pseudomonas fluorescens* SBW 25 aids spreading motility and plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 16, n. 7, p. 2267-2281, 2014.
- ANTWIS, R. E. *et al.* Amphibian symbiotic bacteria do not show a universal ability to inhibit growth of the global panzootic lineage of *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Applied and Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 81, n. 11, p. 3706-3711, 2015.
- ASSIS, A. B. de; BARRETO, C. C.; NAVAS, C. A. Skin microbiota in frogs from the Brazilian Atlantic Forest: Species, forest type, and potential against pathogens. **Plos One**, [s.l.], v. 12, n. 7, 2017.
- BAHRAM, M. *et al.* Structure and function of the global topsoil microbiome. **Nature**, [s.l.], v. 560, n. 7717, p. 233-237, 2018.
- BECKER, M. H. *et al.* Phylogenetic distribution of symbiotic bacteria from Panamanian amphibians that inhibit growth of the lethal fungal pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Molecular Ecology**, [s.l.], v. 24, n. 7, p. 1628-1641, 2015.
- BELDEN, L. K. *et al.* Panamanian frog species host unique skin bacterial communities. **Frontiers in Microbiology**, [s.l.], v. 6, p. 1171, 2015.
- BIRD, A. K. *et al.* Skin microbiomes of California terrestrial salamanders are influenced by habitat more than host phylogeny. **Frontiers in Microbiology**, [s.l.], v. 9, p. 442, 2018.
- BLETZ, M. C. *et al.* Amphibian gut microbiota shifts differentially in community structure but converges on habitat-specific predicted functions. **Nature Communications**, [s.l.], v. 7, p. 13699, 2016.
- BLETZ, M. C. *et al.* Host ecology rather than host phylogeny drives amphibian skin microbial community structure in the biodiversity hotspot of Madagascar. **Frontiers in Microbiology**, [s.l.], v. 8, p. 1530, 2017.
- BOYLE, D. G. *et al.* Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. **Diseases of Aquatic Organisms**, [s.l.], v. 60, n. 2, p. 141-148, 2004.
- BROZIO, S. *et al.* Frog nest foams exhibit pharmaceutical foam-like properties. **Royal Society Open Science**, [s.l.], v. 8, n. 9, p. 210048, 2021.
- BRUNETTI, A. E. *et al.* Symbiotic skin bacteria as a source for sex-specific scents in frogs. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s.l.], v. 116, n. 6, p. 2124-2129, 2019.

CAPORASO, J. G. *et al.* Moving pictures of the human microbiome. **Genome Biology**, [s.l.], v. 12, n. 5, p. R50, 2011.

CATENAZZI, A. State of the world's amphibians. **Annual Review of Environment and Resources**, [s.l.], v. 40, p. 91-119, 2015.

CATENAZZI, A. *et al.* Widespread elevational occurrence of antifungal bacteria in Andean amphibians decimated by disease: a complex role for skin symbionts in defense against chytridiomycosis. **Frontiers in Microbiology**, [s.l.], v. 9, p. 465, 2018.

CHOI, H. *et al.* Synthesis of nanoparticles with frog foam nest proteins. **Journal of Nanoparticle Research**, [s.l.], v. 14, n. 9, p. 1-13, 2012.

DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. **Biology of Amphibians**. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, EUA. 1994.

ERNST, R. *et al.* Whipped cream cravings in the rainforest: predation of foam nests of *Physalaemus ephippifer* (Anura: Leptodactylidae) by *Platemys platycephala* (Testudines: Chelidae) in central Guyana. 2014. **Salamandra**, [s.l.], v. 50, n. 1 p. 57–62, 2014

FEDERICI, E. *et al.* Characterization of the skin microbiota in Italian stream frogs (*Rana italica*) infected and uninfected by a cutaneous parasitic disease. **Microbes and Environments**, [s.l.], p. ME15041, 2015.

FISHER, M. C.; GARNER, T. W. J. Chytrid fungi and global amphibian declines. **Nature Reviews Microbiology**, [s.l.], p. 1-12, 2020.

FLEMING, R. I.; MACKENZIE, C. D.; COOPER, A.; KENNEDY, M. W. Foam nest components of the tungara frog: a cocktail of proteins conferring physical and biological resilience. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, [s.l.], v. 276, n. 1663, p. 1787-1795, 2009.

FONTAINE, S. S.; NOVARRO, A. J.; KOHL, K. D. Environmental temperature alters the digestive performance and gut microbiota of a terrestrial amphibian. **Journal of Experimental Biology**, [s.l.], v. 221, n. 20, 2018.

FROST, D. R. **Amphibian Species of the World: an Online Reference.. Version 6.2**. American Museum of Natural History, Nova Iorque, EUA. Disponível em: <<https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php>>. Acesso em: 10 mar. 2023.

GOODRICH, J. K. *et al.* Conducting a microbiome study. **Cell**, [s.l.], v. 158, n. 2, p. 250-262, 2014.

GOULD, J. Safety bubbles: a review of the proposed functions of froth nesting among anuran amphibians. **Ecologies**, [s.l.], v. 2, n. 1, p. 112-137, 2021.

GRIFFITHS, S. M. *et al.* Genetic variability and ontogeny predict microbiome structure in a disease-challenged montane amphibian. **The ISME Journal**, [s.l.], v. 12, n. 10, p. 2506, 2018.

- HADDAD, C. F. B.; PRADO, C. P. A. Reproductive modes in frogs and their unexpected diversity in the Atlantic Forest of Brazil. **BioScience**, [s.l.], v. 55, n. 3, p. 207-217, 2005.
- HARRIS, R. N. *et al.* Amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* is inhibited by the cutaneous bacteria of amphibian species. **EcoHealth**, [s.l.], v. 3, n. 1, p. 53, 2006.
- HEYER, R. W. The adaptative ecology of the species groups the genus *Leptodactylus* (Amphibians, Leptodactylidae). **Evolution**, [s.l.], v. 23, p. 421-428, 1969.
- HISSA, D. C. *et al.* Novel surfactant proteins are involved in the structure and stability of foam nests from the frog *Leptodactylus vastus*. **Journal of Experimental Biology**, [s.l.], v. 211, n. 16, p. 2707-2711, 2008.
- HISSA, D. C. *et al.* Unique crystal structure of a novel surfactant protein from the foam nest of the frog *Leptodactylus vastus*. **Chembiochem**, [s.l.], v. 15, n. 3, p. 393-398, 2014.
- HISSA, D. C. *et al.* Frog foam Nest protein diversity and synthesis. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology**, [s.l.], v. 325, n. 7, p. 425-433, 2016.
- HUANG, B. *et al.* Composition and functional specialists of the gut microbiota of frogs reflect habitat differences and agricultural activity. **Frontiers in Microbiology**, [s.l.], v. 8, p. 2670, 2018.
- JIMÉNEZ, R. R.; SOMMER, S. The amphibian microbiome: natural range of variation, pathogenic dysbiosis, and role in conservation. **Biodiversity and Conservation**, [s.l.], v. 26, n. 4, p. 763-786, 2017.
- KARDONG, K. V.; **Vertebrados: Anatomia Comparada, Função e Evolução**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil. 2016.
- KNUTIE, S. A. *et al.* Early-life disruption of amphibian microbiota decreases later-life resistance to parasites. **Nature Communications**, [s.l.], v. 8, n. 1, p. 1-8, 2017.
- KOHL, K. D. *et al.* Restructuring of the amphibian gut microbiota through metamorphosis. **Environmental Microbiology Reports**, [s.l.], v. 5, n. 6, p. 899-903, 2013.
- KOHL, K. D.; YAHN, J. Effects of environmental temperature on the gut microbial communities of tadpoles. **Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 18, n. 5, p. 1561-1565, 2016.
- KUENEMAN, J. G. *et al.* The amphibian skin - associated microbiome across species, space and life history stages. **Molecular Ecology**, [s.l.], v. 23, n. 6, p. 1238-1250, 2014.
- KUENEMAN, J. G. *et al.* Probiotic treatment restores protection against lethal fungal infection lost during amphibian captivity. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, [s.l.], v. 283, n. 1839, p. 20161553, 2016.
- KUENEMAN, J. G.; WEISS, S.; MCKENZIE, V. J. Composition of Micro-eukaryotes on the Skin of the Cascades Frog (*Rana cascadae*) and Patterns of Correlation between Skin

Microbes and *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Frontiers in Microbiology**, [s.l.], v. 8, p. 2350, 2017.

KUENEMAN, J. G. *et al.* Community richness of amphibian skin bacteria correlates with bioclimate at the global scale. **Nature Ecology & Evolution**, [s.l.], v. 3, n. 3, p. 381-389, 2019.

LAYCOCK, M. V. *et al.* Viscosin, a potent peptidolipid biosurfactant and phytopathogenic mediator produced by a pectolytic strain of *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 39, n. 3, p. 483-489, 1991.

LOUDON, A. H. *et al.* Interactions between amphibians' symbiotic bacteria cause the production of emergent anti-fungal metabolites. **Frontiers in Microbiology**, [s.l.], v. 5, p. 441, 2014a.

LIEDTKE, H. C.; WIENS, J. J.; GOMEZ-MESTRE, I. The evolution of reproductive modes and life cycles in amphibians. **Nature Communications**, [s.l.], v. 13, n. 1, p. 7039, 2022.

LOUDON, A. H. *et al.* Microbial community dynamics and effect of environmental microbial reservoirs on red-backed salamanders (*Plethodon cinereus*). **The ISME Journal**, [s.l.], v. 8, n. 4, p. 830, 2014b.

MACKENZIE, C. D. *et al.* Ranaspumin-2: structure and function of a surfactant protein from the foam nests of a tropical frog. **Biophysical Journal**, [s.l.], v. 96, n. 12, p. 4984-4992, 2009.

MARTEL, A. *et al.* *Batrachochytrium salamandrivorans* sp. nov. causes lethal chytridiomycosis in amphibians. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s.l.], v. 110, n. 38, p. 15325-15329, 2013.

MARTIN, C. H. *et al.* Viscosin-like lipopeptides from frog skin bacteria inhibit *Aspergillus fumigatus* and *Batrachochytrium dendrobatidis* detected by imaging mass spectrometry and molecular networking. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 9, n. 1, p. 3019, 2019.

MCGRATH-BLASER, S. *et al.* Early life skin microbial trajectory as a function of vertical and environmental transmission in Bornean foam-nesting frogs. **Animal Microbiome**, [s.l.], v. 3, n. 1, p. 1-15, 2021.

MITTELBACH, G. G. *et al.* Evolution and the latitudinal diversity gradient: speciation, extinction and biogeography. **Ecology letters**, [s.l.], v. 10, n. 4, p. 315-331, 2007.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, [s.l.], v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

NUNES-DE-ALMEIDA, C. H. L.; HADDAD, C. F. B.; TOLEDO, L. F. A revised classification of the amphibian reproductive modes. **Salamandra**, [s.l.], v. 57, n. 1, p. 413-427, 2021.

OKE, M. *et al.* Unusual chromophore and cross - links in ranasmurfin: a blue protein from the foam nests of a tropical frog. **Angewandte Chemie International Edition**, [s.l.], v. 47, n. 41, p. 7853-7856, 2008.

OLIVEIRA, E. M. de *et al.* Surfactantes de origem microbiana para aplicações industriais. *In*: SILVA, C.A. et al. (Org.). **Tópicos Especiais em Biotecnologia e Biodiversidade**. [s.l.], 1ed. CRV, 2018. v.2, p. 57-78.

O'ROURKE, D. P.; ROSENBAUM, M. D. Biology and diseases of amphibians. *In*: **Laboratory Animal Medicine**. [s.l.], Academic Press, 2015. p. 931-965.

PASSOS, L. F.; GARCIA, G.; YOUNG, R. J. Comparing the bacterial communities of wild and captive golden mantella frogs: Implications for amphibian conservation. **Plos One**, [s.l.], v. 13, n. 10, 2018.

PEREIRA, E. B.; COLLEVATTI, R. G.; KOKUBUM, M. N. de C.; MIRANDA, N. E. de O.; MACIEL, N. M. Ancestral reconstruction of reproductive traits shows no tendency toward terrestriality in leptodactyline frogs. **BMC Evolutionary Biology**, [s.l.], v. 15, n. 91, p.1-12, 2015.

PEREIRA, E. B. *et al.* Evolution of the anuran foam nest: trait conservatism and lineage diversification. **Biological Journal of the Linnean Society**, [s.l.], v. 122, n. 4, p. 814-823, 2017.

POMBAL JR, J. P.; HADDAD, C. F. B. Estratégias e modos reprodutivos em anuros. *In*: NASCIMENTO, L. B.; OLIVEIRA, P. M. E. (Eds.) **Herpetologia no Brasil II**. 1. ed. Sociedade Brasileira de Herpetologia – SBH, Belo Horizonte, Brasil. p.101-116. 2007.

PYRON, R. A.; WIENS, J. J. A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, [s.l.], v. 61, n. 2, p. 543-583, 2011.

REBOLLAR, E. A.; HARRIS, R. N. Ecology of Amphibian-Microbial Symbioses. **Frontiers in Microbiology**, [s.l.], v. 10, n. 766, p. 7-9, 2019.

REBOLLAR, E. A.; MARTÍNEZ-UGALDE, E.; ORTA, A.H. The amphibian skin microbiome and its protective role against chytridiomycosis. **Herpetologica**, [s.l.], v. 76, n. 2, p. 167-177, 2020.

SEGALLA, M. V.; BERNECK, B.; CANEDO, C.; CARAMASCHI, U.; CRUZ, C.A.G.; GARCIA, P. C. A.; GRANT, T.; HADDAD, C. F. B.; LOURENÇO, A. C. C.; MÂNGIA, S.; MOTT, T.; NASCIMENTO, L. B.; TOLEDO, L. F.; WERNECK, F. P.; LANGONE, J. A. List of Brazilian amphibians. **Herpetologia Brasileira**, [s.l.], v. 10, n. 1, p. 121-216, 2021.

SILBY, M. W. *et al.* *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. **FEMS Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 35, n. 4, p. 652-680, 2011.

THOMPSON, L. R. *et al.* A communal catalogue reveals Earth's multiscale microbial diversity. **Nature**, [s.l.], v. 551, n. 7681, p. 457, 2017.

TIPTON, L.; DARCY, J. L.; HYNSON, N. A. A developing symbiosis: enabling cross-talk between ecologists and microbiome scientists. **Frontiers in Microbiology**, [s.l.], v. 10, p. 292, 2019.

VENCES, M. *et al.* Gut bacterial communities across tadpole ecomorphs in two diverse tropical anuran faunas. **The Science of Nature**, [s.l.], v. 103, n. 3-4, p. 25, 2016.

WALKE, J. B. *et al.* Amphibian skin may select for rare environmental microbes. **The ISME Journal**, [s.l.], v. 8, n. 11, p. 2207-2217, 2014.

WALKE, J. B. *et al.* Most of the dominant members of amphibian skin bacterial communities can be readily cultured. **Applied and Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 81, n. 19, p. 6589-6600, 2015.

WELLS, K. D. The natural history of amphibian reproduction. *In: The Ecology and Behavior of Amphibians*. The University of Chicago Press, Chicago, EUA. p. 451–515. 2007. cap. 10.

WIENS, J. J. Global patterns of diversification and species richness in amphibians. **The American Naturalist**, [s.l.], v. 170, n. S2, p. S86-S106, 2007.

XIA, Y.; SUN, J.; CHEN, D. Bioinformatic analysis of microbiome data. *In: Statistical Analysis of Microbiome Data with R*. Springer, Singapura, Singapura. p. 1-27. 2018. cap. 01.

ZINA, J. Communal nests in *Physalaemus pustulosus* (Amphibia: Leptodactylidae): experimental evidence for female oviposition preferences and protection against desiccation. **Amphibia-Reptilia**, [s.l.], v. 27, n. 1, p. 148-150, 2006.

APÊNDICE A - ARTIGO “NEOTROPICAL FROG FOAM NEST’S MICROBIOMES”

Artigo "Neotropical Frog Foam Nest's Microbiomes"* publicado no periódico de livre acesso *Microorganisms*** (ISSN 2076-2607).

*MONTEIRO, F.A.C.; BEZERRA, S.G. de S.; CASTRO, L.G.Z.D.; OLIVEIRA, F.A.D.S.; NORMANDO, L.R.O.; MELO, V.M.M.; HISSA, D.C. Neotropical Frog Foam Nest's Microbiomes. **Microorganisms**, v. 11, n. 900, 2023. doi: 10.3390/microorganisms11040900.

**Acesso via:<<https://www.mdpi.com/journal/microorganisms>>

O artigo descreve pela primeira vez o microbioma dos ninhos de espuma de anuros leptodactilídeos (Leptodactylidae), comparando três espécies de diferentes gêneros, que possuem composições químicas com diferentes proporções de proteínas e distintos modos reprodutivos. Resultados são comparados com o que se conhece sobre o microbioma de anfíbios e de ninhos de espuma de sapos racoforídeos (Rhacophoridae) que vivem em outros continentes, com composições de proteínas diferentes e distintos modos de reprodução que aqueles dos sapos leptodactilídeos, racoforídeos são arborícolas e leptodactilídeos são ripários. Do mesmo modo racoforídeos são filogeneticamente distantes de leptodactilídeos. Os resultados indicam diferença na obtenção dos microrganismos entre os racoforídeos e leptodactilídeos, onde a influência ambiental é mais significativa, por serem arborícolas racoforídeos estão mais isolados de fontes ambientais como solo e água onde os leptodactilídeos vivem e depositam seus ovos. Os microrganismos encontrados são semelhantes àqueles do microbioma da pele de anfíbios, organismos que protegem esses animais de doenças pela produção de compostos. Compostos que podem também ter aplicações industriais. Dessa forma estudar o microbioma dos ninhos de espuma de sapos pode auxiliar em estratégias de conservação desses animais e apresentam grande potencial biotecnológico.



Article

Neotropical Frog Foam Nest's Microbiomes

Felipe Augusto Correia Monteiro ^{1,2}, Saulo Gonçalves de Santiago Bezerra ³ ,
Luzia Gabrielle Zeferino de Castro ³ , Francisca Andrea da Silva Oliveira ⁴,
Leonardo Ribeiro Oliveira Normando ⁴, Vânia Maria Maciel Melo ^{1,4} and Denise Cavalcante Hissa ^{3,*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia—Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza 60020-181, Brazil; felipemonteiroifce@gmail.com (F.A.C.M.); vmmelo@gmail.com (V.M.M.M.)

² Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, Campus Jaguaribe, Rua Pedro Bezerra de Menezes, Jaguaribe 63475-000, Brazil

³ Laboratório de Recursos Genéticos, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará, Av. Humberto Monte 2977, Campus do Pici, Bloco 909, Fortaleza 60455-760, Brazil

⁴ Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará, Av. Humberto Monte 2977, Campus do Pici, Bloco 909, Fortaleza 60455-760, Brazil

* Correspondence: denisehissa@ufc.br

Abstract: Amphibian foam nests are unique microenvironments that play a crucial role in the development of tadpoles. They contain high levels of proteins and carbohydrates, yet little is known about the impact of their microbiomes on tadpole health. This study provides a first characterization of the microbiome of foam nests from three species of Leptodactylids (*Adenomera hylaedactyla*, *Leptodactylus vastus*, and *Physalaemus cuvieri*) by investigating the DNA extracted from foam nests, adult tissues, soil, and water samples, analyzed via 16S rRNA gene amplicon sequencing to gain insight into the factors driving its composition. The results showed that the dominant phyla were proteobacteria, bacteroidetes, and firmicutes, with the most abundant genera being *Pseudomonas*, *Sphingobacterium*, and *Paenibacillus*. The foam nest microbiomes of *A. hylaedactyla* and *P. cuvieri* were more similar to each other than to that of *L. vastus*, despite their phylogenetic distance. The foam nests demonstrated a distinct microbiome that clustered together and separated from the microbiomes of the environment and adult tissue samples. This suggests that the peculiar foam nest composition shapes its microbiome, rather than vertical or horizontal transference forces. We expanded this knowledge into amphibian foam nest microbiomes, highlighting the importance of preserving healthy foam nests for amphibian conservation.

Keywords: leptodactylidae; reproductive modes; biosurfactants; bacteriome; frog defenses



Citation: Monteiro, F.A.C.; Bezerra, S.G.d.S.; Castro, L.G.Z.d.; Oliveira, F.A.d.S.; Normando, L.R.O.; Melo, V.M.M.; Hissa, D.C. Neotropical Frog Foam Nest's Microbiomes.

Microorganisms **2023**, *11*, 900.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms11040900>

Academic Editors: Michael Hoppert and Joachim Reitner

Received: 16 February 2023

Revised: 23 March 2023

Accepted: 27 March 2023

Published: 30 March 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Many frogs have a peculiar mode of reproduction, such as laying eggs out of water in foam nests. This foam is composed of biomolecules released by the female, and the nest is built during amplexus with the aid of male frog's leg movements [1–3]. Foam nests can be constructed on puddles, directly on the ground, on leaves, or at the soil–water interface [4]. Regardless of the anuran species, foam nests are mainly composed of proteins known as ranaspumins [5] and carbohydrates. Among these proteins are surfactants, uncommon lectins, as well as carbohydrates, which are likely to be responsible for the architecture and stability of the nest [3,5,6]. Although the functions of the chemical components of frog foam nests remain in the hypothetical field, it is noteworthy that many proteins analyzed so far have novel primary sequences and conformational structures, which make these biofoams a reservoir of new molecules [5,6].

In particular, frogs of the Leptodactylidae family in the Brazilian Atlantic Forest have the largest number of known reproductive modes (RM) (17 types), most of which involve the deposition of eggs in foam nests (9 types) either built in water bodies or on

the ground [7,8]. For this family, such a variety of reproductive modes seems to have evolved as a strategy for the exploitation of microhabitats in the humid forests where they occur [1,8]. Foam nests protect eggs and embryos from direct contact with water from small, temporary, hot, and poorly oxygenated pools [1,9]; they provide defense against ultraviolet radiation, predators, and desiccation [3,6]; they increase the chances of egg fertilization [10]; and they serve as food reserves for tadpoles, which complete their development within the nests [11].

In addition to the chemical components, frog foam nests host a microbial community that has only recently begun to be fully characterized with the help of next-generation sequencing [12]. Studies have shown that in old-world rhacophorid frogs, the foam serves as a medium for vertical transmission of microbes to tadpoles, potentially playing a role in their healthy development [12]. The vital importance of foam nests for the reproduction, development, and health of the anurans reinforces the urgent need for environmental protective action. This is especially important given the increasing impact of anthropogenically driven environmental changes such as habitat destruction, chemical pollution, and climate change [13,14]. Furthermore, amphibian populations have been suffering constant threats due to epidermal infections caused by the fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), which has led to the extinction of 90 species and the decline in 501 populations [15].

Frog skin microbiota is well known to play an important role in its host's health, and disturbances to its composition can increase the host's susceptibility to pathogens [16]. This is also true for chytridiomycosis, as bacterial isolates from frog skin have been shown to inhibit the growth of *B. dendrobatidis* [17]. Despite the increasing focus on amphibian skin microbiome research, the role of the foam nest microbiome in shaping skin microbiota in species that develop entirely within foam nests remains unstudied.

In this study we characterize the foam nest microbiome of three neotropical frog species from the family Leptodactylidae, each representing a distinct mode of reproduction, as well as the microbiomes of associated environmental samples and host tissues. The goal is to identify the key factors influencing microbial community structure and composition. This knowledge is critical to understanding the impact of foam nest microbiomes on early and late host colonization and pathogen defense.

2. Materials and Methods

2.1. Sample Collection

Sample collection was performed during the rainy season, between January and March 2018, in two localities of the state of Ceará in northeastern Brazil, with proper regards to Brazilian regulations (license number 58036-2-SISBIO and AD025FF-SisGen released by national environmental agencies).

Foam nests of the frogs *Leptodactylus vastus* (two foam nests) and *Physalaemus cuvieri* (three foam nests), and samples of their associated water (two samples), were collected in RPPN Monte Alegre, located in Serra da Aratanha between the municipalities of Maranguape and Pacatuba (03°57'10" S, 38°36'48" W). Three foam nests of the frog *Adenomera hylaedactyla*, and their respective samples of associated soil, were collected in Fazenda Maceió, located in Taiba in the municipality of São Gonçalo do Amarante (03°30'54.9" S, 38°55'07.7" W) (Figure 1). Figure S1 in the Supplementary Material shows photographs of the collected foam nests.

All samples were collected aseptically using sterile material. Foam nests of *L. vastus* and *P. cuvieri* were carefully collected from the water surface or from the edges of temporary standing water and placed in sterile flasks. Nests from *A. hylaedactyla* were gently removed from their soil cavities, avoiding cross contamination with plant debris and soil particles. Samples of water and soil were also placed in sterile tubes, kept in a cool box, and brought to the laboratory. Eggs, sand, leaves, and branches were manually removed from foam nests under aseptic conditions, and the samples were subsequently stored at −20 °C until further use.

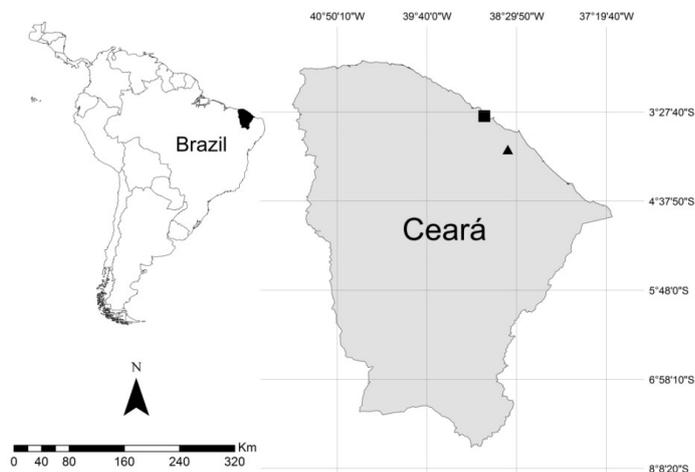


Figure 1. Geographical location of the collection sites; the square mark represents Fazenda Maceió-Taíba, and the triangle mark represents RPPN Monte Alegre.

This study also analyzed tissue samples of *L. vastus*, aiming to compare the origin and composition of the microbiomes. For this task, a female specimen was also collected in RPPN Monte Alegre and euthanized by intracephalic administration of 30 mg/kg of lidocaine hydrochloride 2%, according to international animal ethics standards of the American Veterinary Medical Association [18] with a permit from the Ethics Committee on Animal Use of the Federal University of Ceara (CEUA, license number 6200160418). Subsequently, three sections of intestine, three of cloaca, and two of skin were dissected, freeze-dried using liquid nitrogen, and stored at -20°C until further use. The specimen used in this study was deposited in the herpetological collection of the Federal University of Ceara (Voucher number: CHUFC A8618).

2.2. Biochemical Characterization of the Foam Nests

2.2.1. Protein and Carbohydrate Determination

Total protein levels were quantified using the Coomassie Blue method [19], using bovine serum albumin (BSA) as a standard. Total carbohydrate concentrations were determined using the sulfuric acid–UV method [20].

2.2.2. Surface Tension

The surface tension of the foam was measured at room temperature via the Du Noüy ring method [21] using a Krüss K6 tensiometer (Krüss GmbH, Hamburg, Germany). As a negative control, the surface tension of the water was evaluated, obtaining about 71 mN/m. For statistical analysis, a one-way ANOVA with Tukey test was performed using GraphPad Prism 8.0.1 software (San Diego, CA, USA) [22].

2.2.3. SDS-PAGE

The protein profile of the foam nests was revealed via tricine-SDS-PAGE [23]. The final concentration of the separating gel was 16.5% T, 3% C acrylamide/bis-acrylamide. A total of 5 μg of protein was applied in the gel. Molecular markers ranged from 10 to 225 kDa (Promega Corporation, São Paulo, Brazil). The gel was fixed in 50% ethanol/10% acetic acid/40% distilled water (*v/v/v*) for 1 h and washed for 10 min twice with distilled water. Next, it was stained using the colloidal Coomassie Brilliant Blue G-250 method [24]. Destaining was performed using acetic acid 1%.

2.3. DNA Extraction and Sequencing

DNA extraction was performed on three 0.5 g subsamples of each foam nest and three subsamples of the soil associated with the *A. hylaedactyla* foam nest using a DNeasy Power Lyzer Power Soil Kit (Qiagen, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. For the water samples associated with the nests of *P. cuvieri* and *L. vastus*, 50 mL of each sample was centrifuged, and the total DNA was extracted from the resulting pellet using the same protocol as for the foam nest and soil samples.

Regarding the tissue samples, intestine and cloaca were divided into three subsamples, and skin was divided into two subsamples. A total of 0.5 g of each subsample was incubated at 65 °C for 2 h in 750 µL of 20 mM of Tris-HCl pH 7.5, 100 mM EDTA, and 50 µL of Proteinase K. Then, 750 µL cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) solution was added (2% CTAB 2%, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, and 100 mM Tris-HCl pH 8.0) and incubated at 60 °C for 16 h. The CTAB protocol was based on the method described by Warner in 1996 [25]. The resulting DNA was resuspended in 50 µL Tris-HCl (10 mM; pH 8.0) containing 20 µg/µL of RNase.

Concentrations and quality of all DNA subsamples were evaluated through absorbance measurements at 260 nm, 280 nm, and 230 nm using a Nanodrop® ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop, Wilmington, DE, USA).

The V4 region of the 16S bacterial rRNA gene was amplified by PCR using the primers 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') and 806R (5'-GGACTACHVHHHTWTCTAAT-3') [26]. The PCR reaction was performed in a final volume of 25 µL containing 20 ng of genomic DNA (template), 1X buffer solution containing 12 mM MgCl₂, 0.3 mM of each dNTP, 0.3 µM of each primer, and 1.0 unit of platinum Taq polymerase high fidelity. A control reaction was performed by adding water instead of DNA. The PCR conditions were 94 °C for 4 min to denature the DNA, with 35 cycles at 94 °C for 45 s, 50 °C for 60 s, and 72 °C for 180 s, with a final extension at 72 °C for 10 min. After indexing, PCR products were purified using Agencourt AMPure XP-PCR beads (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), following the manufacturer's instructions. After quantification on a Qubit 2.0 fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), different volumes of each library were pooled into a single tube such that each amplicon was represented equally. The pool was diluted to 4 nM, denatured, and further diluted to a final concentration of 10.0 pM with 20% PhiX (Illumina, San Diego, CA, USA). Sequencing was performed with the MiSeq Reagent Kit v2 (300 cycles, paired-end sequencing 2 × 150 bp) on the Illumina MiSeq platform at the Genomics and Bioinformatics Center (CEGENBIO/NPDM) of the Federal University of Ceara (UFC), Brazil.

2.4. Data Processing

The 43 datasets obtained in the sequencing of the nests (9 subsamples of *A. hylaedactyla*, 6 of *L. vastus*, and 9 of *P. cuvieri*), soil (9 subsamples), water (two subsamples), and frog tissues (3 subsamples of gut, 3 of cloaca, and two of skin) were analyzed using bioinformatics tools as follows.

Illumina adapter sequences were trimmed from the already demultiplexed raw FASTQ files using Cutadapt v1.8 in paired-end mode. Quality control of the reads was performed using FastQC v0.11.8 [27] and vsearch v2.10.4 [28]. Subsequent analyses were performed within the R v3.5.3 environment [29], following the DADA2 v1.11.1 package [30] pipeline suggested by the authors and adjusting parameters to our data. It resulted in a table of non-chimeric amplicon sequence variants (ASVs) [31], which records the number of times each ASV (sequence differing by as little as one nucleotide) is observed in each sample. DADA2 identifies more real variants and outputs less spurious sequences than traditional operational taxonomic unit (OTU) clustering methods [30]. Taxonomy assignment and removal of non-bacterial sequences was performed against the SILVA database [32]. Samples were subsequently rarefied at 23,287 reads per sample to normalize read counts across samples. Samples that were outside of the rarefaction curve were eliminated, resulting in

20 foam nest datasets (8 subsamples of *A. hylaedactyla*, 5 of *L. vastus*, and 7 of *P. cuvieri*), comprising a total of 39 datasets.

2.5. Statistical Analysis

After rarefaction, a total of 20 foam nest subsamples were analyzed: 8 subsamples of *A. hylaedactyla*, 5 of *L. vastus*, and 7 of *P. cuvieri*. Alfa diversity estimators (Chao1, Shannon, and Inverse Simpson) were calculated, and we used Kruskal–Wallis tests for differences across host anuran species' foam nests. To estimate how representative our foam nest samples were of the bacterial community, Good's coverage estimator was calculated for all samples, as well as rarefaction curves. For beta diversity analysis, foam nest subsamples were clustered using an unweighted pair group method with an arithmetic mean (UPGMA), to determine clustering patterns across host species. UPGMA was used on Bray–Curtis distances of mean Hellinger-transformed ASV-relative abundances at the genus level. A UPGMA Bray–Curtis cluster was also made comparing the relative abundance of ASVs at the genus level of these foam nest microbial communities and those found in subsamples of their deposition environment (water and soil), parental tissues (*L. vastus* female gut, cloaca, and skin), and foam nests from three species of *Polypedates* belonging to the Rhacophoridae family in Borneo that were studied by McGrath-Blaser et al. [12]. Sequences were downloaded from the study by McGrath-Blaser et al. [12] under the access numbers SAMN18106736, SAMN18106737, SAMN18106738, SAMN18106756, SAMN18106757, SAMN18106758, SAMN18106776, SAMN18106775, and SAMN18106774 via BioProject ID PRJNA705959.

The diversity estimators, rarefaction curves, UPGMA Bray–Curtis heatmap and all statistics were completed using vegan package v2.5.4 [33] and an R statistical package [29]. All plots were generated using ggplot2 v3.2 [34].

3. Results

3.1. Biochemical Characterization of the Foam Nests

Protein and carbohydrate levels in foam nests varied among species, with *P. cuvieri* exhibiting the highest concentrations. The surface tension activity of surfactant proteins in the foam nests was found to be correlated with protein concentration, as demonstrated by the lower tension obtained in the sample from *P. cuvieri* (Table 1).

Table 1. Concentration of proteins and carbohydrates and surface tension activity in foam nests of neotropical frogs that have different modes of reproduction.

Species	Protein (mg/mL)	Carbohydrate (mg/mL)	Surface Tension (mN/m)	Reproductive Mode †
<i>P. cuvieri</i>	2.27 ± 0.48 ^a	1.16 ± 0.06 ^a	39.66 ± 0.50 ^a	RM 11
<i>L. vastus</i>	1.37 ± 0.24 ^b	0.23 ± 0.01 ^b	45.34 ± 0.70 ^b	RM 13
<i>A. hylaedactyla</i>	0.75 ± 0.15 ^b	N/A	50.73 ± 0.35 ^c	RM 32

† Amphibian reproductive modes based on Haddad and Prado, 2005 [7]. N/A—Not analyzed. Different letters in each column represent significant differences at $p < 0.05$.

The electrophoresis gel revealed distinct protein profiles for each foam nest (Figure 2), with the foam nest of *L. vastus* exhibiting a greater apparent protein richness. The nests displayed only a few bands with the same molecular mass, indicating that the foam composition is unique and characteristic of each species. The foam nest of *L. vastus* displayed more distinctive protein bands, including an intense band at 23.5 kDa corresponding to Lv-ranaspumin [35,36]. Furthermore, *L. vastus* showed more prominent bands above 50 kDa compared to *P. cuvieri* and *A. hylaedactyla*.

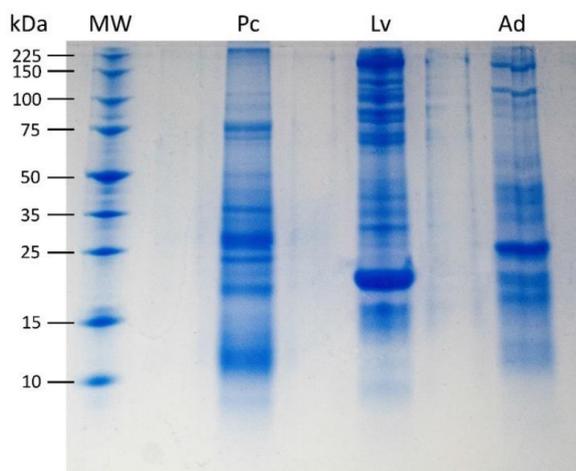


Figure 2. Tricine-SDS-PAGE of 5 µg foam nest fluid from *P. cuvieri* (Pc), *L. vastus* (Lv), and *A. hylaedactyla* (Ad). Molecular weight (MW) range of 10 to 225 kDa. The most intense band in Lv, of 23.5 kDa, corresponds to Lv-ranaspumin as described in Hissa et al., 2014 [35].

3.2. Estimation of Bacterial Richness and Diversity in Foam Nests

A total of 20 foam nest 16S rRNA libraries were sequenced from the studied frog species: 8 from *A. hylaedactyla*, 5 from *L. vastus*, and 7 from *P. cuvieri*. After filtering out low-quality and short-sequence reads, a total of 774,363 raw sequences were obtained, with an average of 38,718 sequences/sample (ranging from a maximum of 86,865 to a minimum of 26,711). The largest variation was observed in the samples of *A. hylaedactyla*, ranging from a maximum of 86,865 to a minimum of 26,711, with an average of 42,209. The samples from *L. vastus* showed less variation (ranging from a maximum of 67,934 to a minimum of 23,287, with an average of 45,246), as did the samples of *P. cuvieri* (ranging from a maximum of 39,044 to a minimum of 23,433, with an average of 30,066). The rarefaction curves for the observed amplicon sequence variants (ASVs) approached the asymptotes, indicating that the sequencing and sampling efforts adequately captured the taxonomic diversity within each sample (Figure 3).

The richness of *A. hylaedactyla* was found to be higher and more statistically significant as compared to the other two species, as determined by both the Kruskal–Wallis test for observed richness ($p = 0.001$) and Chao1 ($p = 0.001$) (Table 2). No difference was observed between *L. vastus* and *P. cuvieri* (Kruskal–Wallis, observed richness $p = 0.372$ and Chao1 $p = 0.371$). The Shannon index was highest for *A. hylaedactyla* samples, followed by *P. cuvieri* and *L. vastus*, with a significant difference among the three species (Kruskal–Wallis, $p = 0.019$). However, the distinction did not occur between *A. hylaedactyla* and *P. cuvieri* (Kruskal–Wallis, $p = 0.418$) or *P. cuvieri* and *L. vastus* (Kruskal–Wallis, $p = 0.088$), with a significant difference only between the values of *A. hylaedactyla* and *L. vastus* (Kruskal–Wallis, $p = 0.003$). For the inverse Simpson index, *A. hylaedactyla* and *L. vastus* showed similar values (Kruskal–Wallis, $p = 0.29$), indicating a higher dominance level compared to *P. cuvieri*, which showed a value significantly higher than the other two species (Kruskal–Wallis, $p = 0.05$).

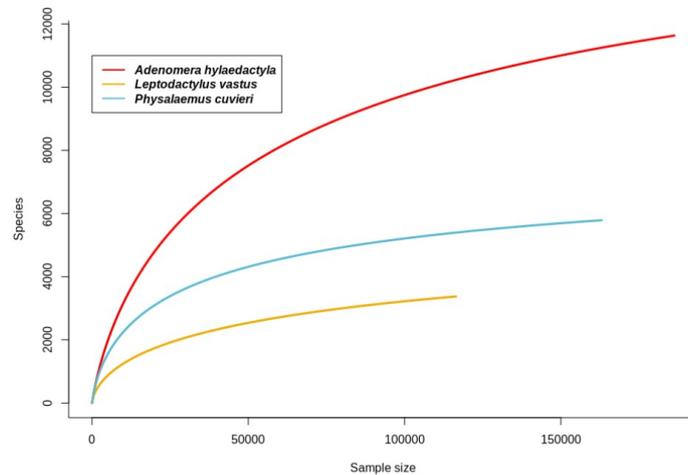


Figure 3. Rarefaction curves for observed amplicon sequence variants (ASVs) in foam nests from neotropical frogs *A. hylaedactyla*, *L. vastus*, and *P. cuvieri*.

Table 2. Richness and alpha diversity of amplicon sequence variants (ASVs) in the foam nests of *A. hylaedactyla*, *P. cuvieri*, and *L. vastus*.

Richness/ α -Diversity Index	Leptodactylidae Species		
	<i>A. hylaedactyla</i>	<i>P. cuvieri</i>	<i>L. vastus</i>
ASVs	3555.38 \pm 167.89	1706.43 \pm 307.93	1198.60 \pm 159.07
Chao1	4631.60 \pm 316.39	1977.25 \pm 355.38	1544.21 \pm 219.95
Shannon	6.21 \pm 0.15	5.93 \pm 0.31	4.95 \pm 0.20
Inverse Simpson	57.83 \pm 11.48	165.86 \pm 56.58	40.89 \pm 6.89

3.3. Microbial Community Structure and Composition

High-resolution community profiles were generated by processing reads using a de-noised pipeline to resolve 16S rRNA gene ASVs at the single-nucleotide level. Bacterial sequences were predominant, accounting for 29,159 sequences, while only 116 sequences were identified as archaea. Out of the 12 phyla identified in the samples, those with an abundance above 1% were Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Cyanobacteria, Epsilonbacteraeota, Firmicutes, Gemmatimonadetes, Planctomycetes, Proteobacteria, Thaumarchaeota and Verrucomicrobia (Figure 4). Among these, Proteobacteria were the most abundant, present in all samples at levels above 50%, followed by Bacteroidetes, Firmicutes and Actinobacteria. The other phyla comprised <5% of the total.

In *A. hylaedactyla*, the most frequent phyla were Proteobacteria (60.3%), with the majority belonging to the class Gamma-proteobacteria (56.6%) and a small proportion belonging to Alpha-proteobacteria (3.7%). The next most abundant phyla were Bacteroidetes (11%) and Actinobacteria (6.1%). In *L. vastus*, there was a predominance of Proteobacteria (58.2%), including Gamma-proteobacteria (42.9%) and Alpha-proteobacteria (15.3%). The next most abundant phyla were Bacteroidetes (26.9%) and Firmicutes (7.3%). The nests of *P. cuvieri* were predominantly composed of Proteobacteria (72.8%), primarily from the Gamma-proteobacteria class (71.2%) with a small contribution from Alpha-proteobacteria (2.0%) and Bacteroidetes (8.5%).

It is noteworthy that some bacterial genera such as *Pseudomonas*, *Vogesella*, *Chryseobacterium*, *Chininophaga*, *Paenibacillus*, *Comamonas*, *Paucibacter*, *Brevundimonas*, and *Sphingobacterium* were the most abundant genera in the nests of the three frog species, comprising more than 10% of all bacterial taxa observed (Figure 5).

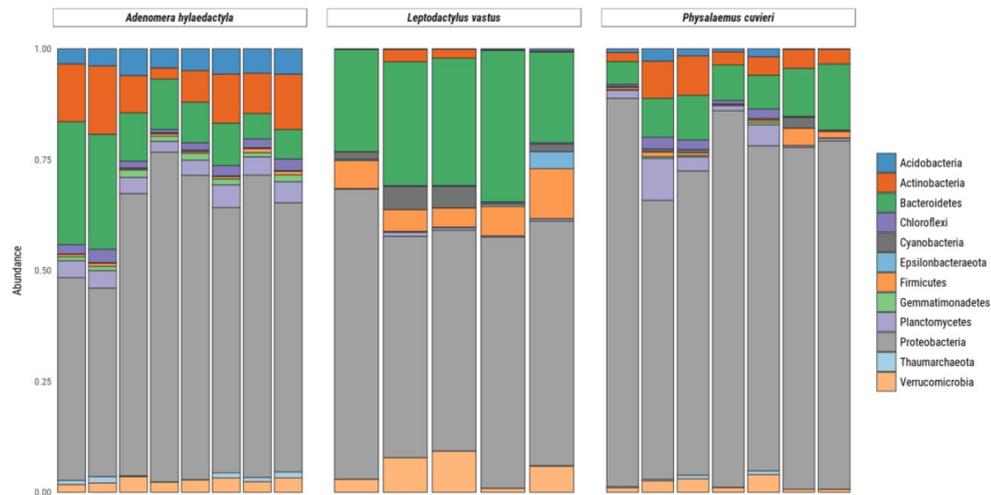


Figure 4. Relative abundance of bacteria and archaea amplicon sequence variants at phylum levels present in frog foam nests. Stacked bar plot of the relative abundance above 1%.

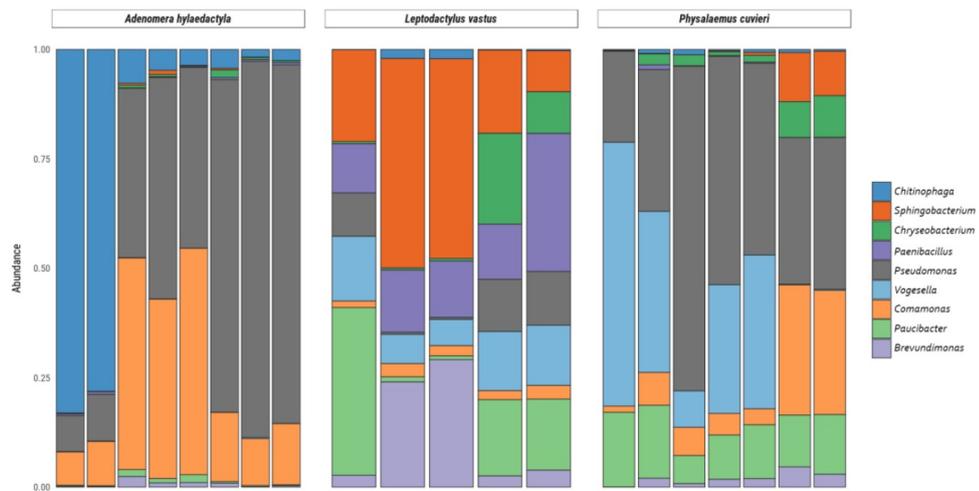


Figure 5. Relative abundance of bacteria and archaea amplicon sequence variants at the genus level present in frog foam nests. Stacked bar plot of the relative abundance above 10%.

Among the Proteobacteria phylum, the genus *Pseudomonas* accounted for 49.2% of the diversity in *A. hylaedactyla*, 41.7% in *P. cuvieri*, and only 7.0% in *L. vastus*. Likewise, the genus *Comamonas* showed higher mean frequencies in *A. hylaedactyla* (24.9%) and *P. cuvieri* (11.7%) compared to *L. vastus* (2.4%). The genus *Vogesella* was more prevalent in the nests of *P. cuvieri* (24.3%) and *L. vastus* (11.0%) compared to *A. hylaedactyla* (<1.0%). Similarly, the genus *Paucibacter* was more abundant in the nests of *L. vastus* (14.8%) and *P. cuvieri* (12.6%), with minimal representation in *A. hylaedactyla* (<1%). The genus *Brevundimonas* was only representative in *L. vastus* nests (12.5%).

In the phylum Bacteroidetes, the genus *Chitinophaga* was predominantly present in the nests of *A. hylaedactyla*, with a mean frequency of 23.2%, while it had minimal representation in the other foam nest microbiomes (<1%). The genus *Sphingobacterium* was significant only in the nests of *L. vastus*, with a mean frequency of 28.6%. The genus *Chryseobacterium* presented low frequencies, with significant presence only in the nests of *L. vastus* (6.4%) and *P. cuvieri* (3.6%). The phylum Firmicutes showed a significant presence of the genus *Paenibacillus* only in the nests of *L. vastus*, with a mean frequency of 16.5%.

3.4. Beta Diversity of Foam Nest Bacterial Community

To assess the bacterial beta diversity, the unweighted pair-group method with arithmetic mean (UPGMA) was carried out using the Bray–Curtis algorithm. The differences among the samples were further confirmed via clustering analysis. The analysis showed that the bacterial genus level ASVs were grouped into two main clusters (Figure 6). One cluster subdivided into two clear subgroups, one containing all replicates of *A. hylaedactyla* and the other containing most replicates of *P. cuvieri*. The second main cluster subdivided in two subgroups, one consisting of three *L. vastus* replicates and two *P. cuvieri* replicates, indicating similarity between them, while the other group only consisted of *L. vastus* replicates.

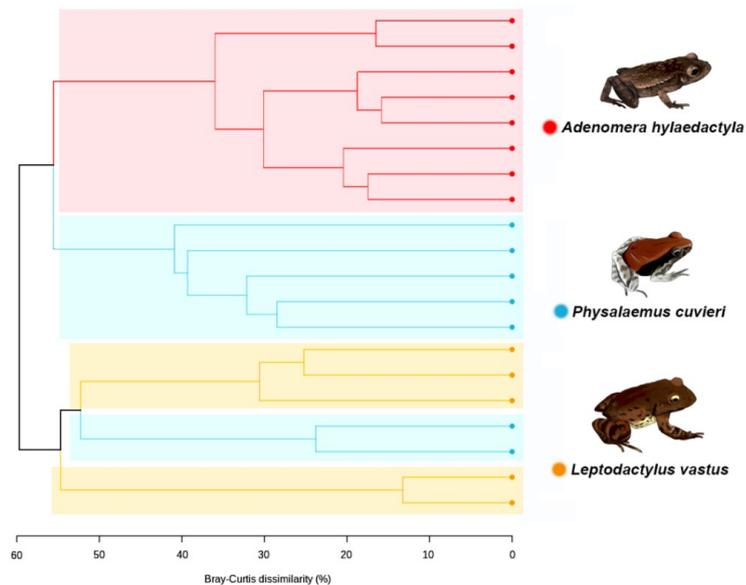


Figure 6. Dendrogram generated via UPGMA clustering analysis using the amplicon sequence variants (ASVs) at bacterial genus level, showing the relationship among the frog species.

The UPGMA dendrogram was used to assess the differences between foam nests, nest environments, and host tissues to understand their relationships. The analysis revealed two main clusters, the first of which was divided into two subgroups, one containing foam nests and the other containing environmental samples. The second major group consisted solely of *L. vastus* tissue samples, with skin grouped separately from gut and cloaca microbiomes (Figure 7).

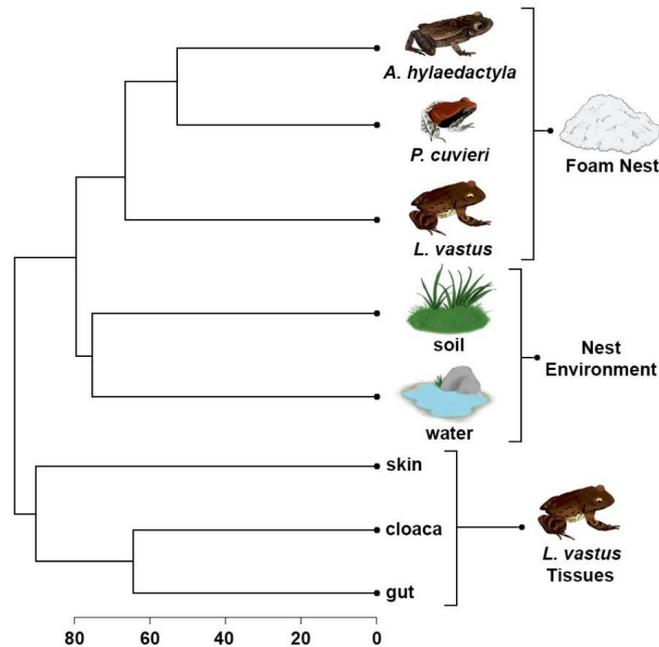


Figure 7. UPGMA cluster based on Bray–Curtis dissimilarities between bacterial amplicon sequence variants at the genus level presents in the foam nests, nest environments, and tissues of *L. vastus*.

These results confirm the closer similarity between the foam nest microbiomes of *A. hylaedactyla* and *P. cuvieri*, despite the former laying eggs on land and the latter in water. Additionally, the closest species, *L. vastus* and *A. hylaedactyla*, were grouped separately, suggesting that microbiome composition is not driven by phylogeny. Although host-associated microbes are presumably acquired from the environment, the composition of the foam nest microbiome is distinct from that of free-living microbial communities. We performed an in-silico comparative analysis that included microbiome samples from three old-world rhacophorid species, all of which build their foam nests in trees—RM33 [7]. This analysis aimed to further investigate the influence of chemical composition on the structure of the microbial community (Figure S2, Supplementary Material). The results showed that, regardless of the reproductive mode (aquatic, terrestrial, riparian, and arboreal) or phylogenetic relationship (Leptodactylidae versus Rhacophoridae), the foam nests grouped together in a common cluster that was distinct from all other analyzed microbial communities. The unique chemical composition of frog foam nests supports this hypothesis.

4. Discussion

4.1. Biochemical Characterization of the Foam Nests

Despite the biological relevance of foam nests for frog development and evolutionary success, our understanding of their chemical composition is limited to a few species [3,37,38]. However, we do know that foam nests are rich in novel surfactant proteins [6,35], along with other proteins, lectins, and carbohydrates [3,5,38]. The microbiome of frog foam nests is even less well understood, and we are just beginning to learn about their composition and role on early host colonization [12]. The effects of variation in nest size and foam consistency between species on microbiome composition are still unknown.

Biochemical analysis of fluid from foam nests of *A. hylaedactyla*, *P. cuvieri*, and *L. vastus*, which spawn on land, water, and land–water interface (riparian), respectively, confirmed the presence of carbohydrates and protein in varying proportions (Table 1). Electrophoresis gel analysis revealed that each nest has its own set of proteins and that protein richness varies among species, with *L. vastus* having the most protein bands and *A. hylaedactyla* the fewest. A strong protein band stands out in each sample. In *L. vastus*, the apparent 23.5 kDa band corresponds to Lv-Rsn-1, its main surfactant protein [35]. Although electrophoresis is not robust enough to reveal the proteome of the foam nests, it did show that protein composition is species-specific (Figure 2). Thus, we suggest that the proteome plays a role not only in nest building and stability [6], but also in the selection and establishment of the nest microbiome.

According to Fleming et al. [6], initial foam formation involves a specific surfactant protein (Rsn-2) establishing hydrophobic interactions with lectins (Rsn-3 to Rsn-6), which then bind to carbohydrates to give rise to the nest architecture. This model, established for the fluid secreted by the túngara frog (*Engystomops pustulosus*), explains the stability of the nest during the tadpole's development until metamorphosis, when the nest disintegrates. Whether this model applies to other species remains to be proven. So far, nine ranaspumins have been isolated from frog foam nests, but only two of them, Rsn-2 from *Engystomops pustulosus* [39] and Lv-Rsn-1 from *L. vastus* [35], have been studied due to their surfactant activity. Despite this, these two proteins have different molecular weights, amino acid sequences, and 3D structures [35,39]. Furthermore, we have not yet been able to demonstrate the occurrence of lectins in the foam nest of *L. vastus* (unpublished data) that supports a similar model of foam nest stabilization.

4.2. A distinctive Frog foam Nest Community

Our study provides new insights into the composition and structure of the microbiome in frog foam nests. The results of our analyses showed that the richness and alpha diversity of nests are not linked to frog phylogeny, since closer species presented significantly different results (Table 2). Although the three species belong to the Leptodactylidae family, *L. vastus* and *A. hylaedactyla* are closely related, belonging to the Leptodactylinae subfamily, whereas *P. cuvieri* belongs to the Leiuperinae subfamily (sensu [40,41]). Our findings also suggest that nest size and environment influence ASV richness and diversity. The smaller foam nest of *A. hylaedactyla*, which is laid on land and measures about 2.5 cm, had significantly higher bacterial richness and diversity compared to the larger aquatic and riparian nests of *P. cuvieri* (5.0 cm) and *L. vastus* (15.0 cm). This could be because smaller nests have a greater surface area in contact with the environment, and terrestrial environments in general have higher bacterial richness than non-marine aquatic environments [42]. Similarly, amphibian skin microbiomes tend to be richer in species with terrestrial habits, whereas aquatic and arboreal species have lower richness values [43,44].

Our study showed that beta diversity in foam nests is clearly different from that found in the other groups herein studied (Figure 8). The main driver of the clustering of the foam nest assemblage was the dominance of Proteobacteria (between 58% for Gamma-proteobacteria and 73% for Alpha-proteobacteria), while the water and soil also presented a high amount of Proteobacteria (approximately 50% for water and 25% for soil) together with Actinobacteria (approximately 11% for water and 17% for soil) and Acidobacteria (approximately 6% for water and 14% for soil).

Leptodactylus vastus gut and cloaca presented higher amounts of Firmicutes (between 17 and 29%), followed by Bacteroidetes (between 12 and 24%). Skin samples, together with foam nests, presented a higher abundance of Proteobacteria (between 46 and 59%), followed by Bacteroidetes (between 4 and 10%) and Firmicutes (between 4 and 5%); however, other phyla composed less than 2% in skin samples.

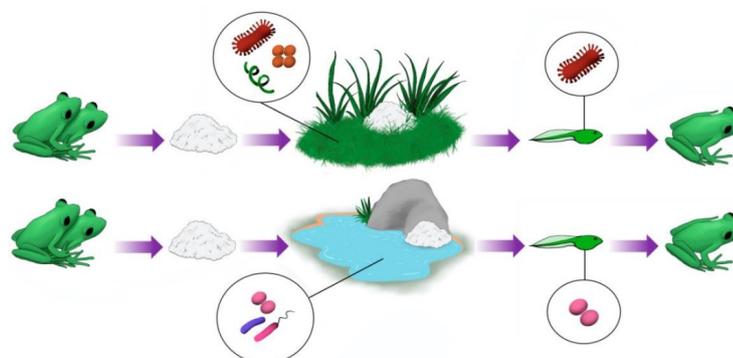


Figure 8. Anuran foam nest microbiomes originate from the microbiome of the environment where these nests are deposited. However, certain groups of microorganisms are clearly enriched in nests compared to their natural environments. This suggests that these microorganisms may be beneficial to tadpoles in the early stages of development.

Members of Proteobacteria and Bacteroidetes taxa have been shown to dominate the bacterial community of the rhacophorid frogs' foam nests from Borneo and the skin microbiomes from several anuran species [12]. They also influence the secretion of volatile compounds of the South American tree frog *Boana prasina* [45], production of antifungal molecules [43,46], and/or antimicrobial peptides [47]. The phylum Firmicutes has similarly been reported as frequent in amphibian skin microbiomes [43,44,47,48].

The studied foam nests had low representation of the phyla Acidobacteria, Actinobacteria, Chloroflexi, Cyanobacteria, Epsilonbacteraeota, Gemmatimonadetes, Planctomycetes, Thaumarchaeota, and Verrucomicrobia, which are also found at low frequencies in the digestive tracts and skin microbiomes of other amphibian species [44,49]. Although not very expressive in foam nest microbiomes, the phylum Actinobacteria was found with high frequency in the skin of the frog *Rhinella horribilis* in Costa Rica [48] and is dominant in adult *Anaxyrus boreas*, replacing Proteobacteria that is dominant in tadpoles [50]. Experiments have also shown a significant increase in the frequency of Actinobacteria and Planctomyces in the digestive tract microbiomes of tadpoles exposed to higher temperatures [51].

The bacterial genus *Pseudomonas* was found to be one of the most abundant in the foam nests studied, being especially abundant in *A. hylaedactyla*. *Pseudomonas* species are known as both environmental and host-specific symbionts and are commonly found in the skin microbiome of amphibians, where they are reported to play an important role [43–45,47,48,52–60]. *Pseudomonas* strains isolated from amphibians have demonstrated great potential against pathogenic microorganisms, including the panzootic *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) and the human pathogen *Aspergillus fumigatus* [47,52,56,57]. This highlights the significance of *Pseudomonas* in amphibian defense and its potential for biotechnological applications, such as the isolation of pharmacological molecules. Notably, as skin symbionts, *Pseudomonas* strains were recently reported to be involved in the production of volatile sex pheromones in the frog *Boana prasina* [45,61].

The genera *Vogesella* and *Paucibacter* most frequently found in the foam nests of *P. cuvieri* and *L. vastus*, deposited in an aquatic environment, are mainly found in freshwater sources in temperate climates [62–67], pointing out an environmental contribution to the foam nest microbiome. Their ecological role is poorly studied, but it is known that *Vogesella mureinivorans* is capable of degrading the polysaccharides chitin and peptidoglycan [63]. The presence of carbohydrates in foam nests may contribute to colonization by *Vogesella* [3].

The genera *Chitinophaga*, *Chryseobacterium*, and *Sphingobacterium* are common in several environments or in symbiosis with several groups of organisms; however, *Chryseobacterium* is also a pathogen associated with several diseases, being commonly found in anura skin

related to infections in the group [68]. On the other hand, *Chitinophaga* and *Sphingobacterium* are commonly found in environmental samples of soil and water, also related to fungi and plants endosymbionts [69–73]. Loudon et al. [54] showed that a *Chitinophaga arvensicola* isolate, together with a *Bacillus* sp., had a higher inhibitory effect against *Bd* compared to the *Bacillus* sp. alone.

Paenibacillus was shown to colonize the intestine of *Lithobates pipiens* tadpoles [74] and the salamander *Plethodon cinereus* [58]. This genus is noteworthy for its production of antifungal molecules.

McGrath-Blaser et al. have already demonstrated the presence of an exclusive bacterial community that colonizes frog foam nests [12]. These foam nests, produced by rhacophorid frogs, present a unique bacterial structure distinct from the environment, skin of tadpoles, and skin and cloaca of adult frogs. Although the structure of the foam nests is unique, some components of this community have already been reported as originating from the environment or the skin and digestive tract of adult frogs, suggesting that foam nests acquire their microbial communities from these sources.

The rhacophorid frogs are arboreal and lay their eggs in foam nests on tree leaves close to water, where tadpoles can complete their development [1,11,12]. While this study provides evidence of vertical transfer of the foam nest microbiome [12], these observations are preliminary and may not account for the diversity of foam nest microbiomes in other rhacophorid species or in other families that lay eggs in foam nests. This type of egg deposition evolved independently (convergently) in different anuran families with distinctive behaviors compared to arboreal rhacophorids [1,11,75].

Our findings indicate that the chemical composition of foam nests varies between the studied frog species, with each nest having a unique protein profile. Foam nests typically consist of 85–65% proteins and 35–15% sugars, many of which have been identified as novel proteins [3,6]. Currently, we have only limited knowledge of the foam nest chemical composition from two species of Leptodactylidae, *Leptodactylus vastus* [3] and *Egystomops pustulosus* [6], and one species of Rhacophoridae (*Polypedates leucomystax*) [76]. The major known protein in each nest, Lv-RSN-1 (from *L. vastus*) [3,35,36], RSN-2 (from *E. pustulosus* [39]), and Ranasmurfin (from *P. leucomystax* [76]), does not significantly share amino acid sequence or conformational structure. These novel proteins likely play a crucial role in nest architecture and stability [35,37] and, together with other well-known defense proteins detected in foam nests, represent an efficient protection strategy for the development of tadpoles [3, 36, 38]. We have recently analyzed the proteome of the foam nests of *L. vastus*, *L. macrosternum*, *P. cuvieri* and *P. albifrons*, which revealed a high number of unidentified protein spectra as well as a significant number of species-exclusive spectra, ranging from 75% exclusive to *L. vastus* to 55% exclusive to *P. cuvieri* (unpublished data), suggesting a diverse range of proteins across different species. However, many of these unidentified proteins are due to the lack of annotated genomes of foam nest-producing frogs, which is further highlighted by the fact that there are only 25 anuran genomes available, none of which correspond to species from Brazil or foam nest-producing species (www.ncbi.nlm.nih.gov, accessed on 25 November 2022). This underscores the need for more research to fully understand the relationship between the foam nest proteome and microbiome.

The exact relevance of the foam nest microbiome to host development, immunity, and nutrition is yet to be determined, but our results suggest a key functional role, considering that distinct frog species select their own microbiomes, despite sharing some common taxa across different environments. However, due to the vulnerability of foam nests to anthropic pressure, there is a pressing need for conservation efforts to protect amphibian species that reproduce by depositing eggs in foam nests.

5. Conclusions

This study provides significant evidence that neotropical frogs of the Leptodactylidae family acquire their foam nest microbiota from the environment, with the unique chemi-

cal composition of the foam nest being a more important driver of the microbiome than phylogeny and the environment of nest deposition. Despite the diversity of reproductive modes among Leptodactylidae, the foam nest microbiomes share a core of phyla including Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Cyanobacteria, Epsilonbacteraeota, Firmicutes, Gemmatimonadetes, Planctomycetes, Proteobacteria, Thaumarchaeota, and Verrucomicrobia, suggesting convergent evolution. The enrichment of certain taxa in foam nests, such as *Pseudomonas*, which is a key player in the anura skin microbiome, highlights the host's early selection of beneficial microbes for defense against pathogens, such as the fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/microorganisms11040900/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, F.A.C.M., V.M.M.M. and D.C.H.; methodology, F.A.C.M., S.G.d.S.B. and F.A.d.S.O.; software, L.G.Z.d.C. and L.R.O.N.; validation, F.A.C.M. and L.G.Z.d.C.; formal analysis, F.A.C.M., S.G.d.S.B., F.A.d.S.O. and L.R.O.N.; investigation, F.A.C.M., V.M.M.M. and D.C.H.; resources, V.M.M.M. and D.C.H.; data curation, F.A.d.S.O. and L.R.O.N.; writing—original draft preparation, F.A.C.M., F.A.d.S.O. and D.C.H.; writing—review and editing, V.M.M.M. and D.C.H.; visualization, F.A.C.M. and L.R.O.N.; supervision, V.M.M.M. and D.C.H.; project administration, V.M.M.M.; funding acquisition, V.M.M.M. and D.C.H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ, Process N. 407456/2018-0) and Serrapilheira Institute (grant number Serra-1709-16322).

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the Animal Ethics Committee of Federal University of Ceará (CEUA, license number 6200160418).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are available from corresponding authors under reasonable request.

Acknowledgments: The authors would like to thank the Genomics and Bioinformatics Center (CEGENBIO/NPDM) of the Universidade Federal do Ceará (UFC) for their aid with the DNA sequence. Thanks are also due to Giovanna Riello Barbosa Correia for the help with the amplicon library preparation, Juliana Borges and Paulo Cascon for the help with foam nest collection, and Marcos Vieira da Silva for the help with graphical illustrations. The authors also thanks to Lucia Castro Cunha for permission to work in the RPPN Monte Alegre and André Antunes for revising the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Wells, K.D. Chapter 10: The natural history of amphibian reproduction. In *The Ecology and Behavior of Amphibians*; Wells, K.D., Ed.; University of Chicago Press: Chicago, IL, USA, 2007; pp. 451–515.
2. Vitt, L.J.; Caldwell, J.P. *Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles*, 4th ed.; Academic Press: San Diego, CA, USA, 2014.
3. Hissa, D.C.; Vasconcelos, I.M.; Carvalho, A.F.U.; Nogueira, V.L.R.; Cascon, P.; Antunes, A.S.L.; de Macedo, G.R.; Melo, V.M.M. Novel surfactant proteins are involved in the structure and stability of foam nests from the frog *Leptodactylus vastus*. *J. Exp. Biol.* **2008**, *211*, 2707–2711. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Heyer, R.W. The adaptative ecology of the species groups the genus *Leptodactylus* (Amphibians, Leptodactylidae). *Evolution* **1969**, *23*, 421–428. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Cooper, A.; Kennedy, M.W.; Fleming, R.I.; Wilson, E.H.; Videler, H.; Wokosin, D.L.; Su, T.-J.; Green, R.J.; Lu, J.R. Adsorption of frog foam nest proteins at the air–water interface. *Biophys. J.* **2004**, *88*, 2114–2125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Fleming, R.I.; Mackenzie, C.D.; Cooper, A.; Kennedy, M.W. Foam nest components of the tungara frog: A cocktail of proteins conferring physical and biological resilience. *Proc. Royal Soc. B Biol. Sci.* **2009**, *276*, 1787–1795. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Haddad, C.F.B.; Prado, C.P.A. Reproductive modes in frogs and their unexpected diversity in the Atlantic Forest of Brazil. *BioScience* **2005**, *55*, 207–217. [[CrossRef](#)]
8. Pombal, J.P., Jr.; Haddad, C.F.B. Estratégias e modos reprodutivos em anuros. In *Herpetologia no Brasil II*; Nascimento, L.B., Oliveira, M.E., Eds.; Sociedade Brasileira de Herpetologia: Belo Horizonte, Brazil, 2007; pp. 101–116.

9. Méndez-Narváez, J.; Flechas, S.V.; Amézquita, A. Foam nests provide context-dependent thermal insulation to embryos of three leptodactylid frogs. *Physiol. Biochem. Zool.* **2015**, *88*, 246–253. [[CrossRef](#)]
10. Arzabe, C. Reproductive activity patterns of anurans in two different altitudinal sites within the Brazilian Caatinga. *Rev. Bras. Zool.* **1999**, *16*, 851–864. [[CrossRef](#)]
11. Pereira, E.B.; Pinto-Ledezma, J.N.; de Freitas, C.G.; Villalobos, F.; Collevatti, R.G.; Maciel, N.M. Evolution of the anuran foam nest: Trait conservatism and lineage diversification. *Biol. J. Linn. Soc.* **2017**, *122*, 814–823. [[CrossRef](#)]
12. McGrath-Blaser, S.; Steffen, M.; Grafe, T.U.; Torres-Sánchez, M.; McLeod, D.S.; Muletz-Wolz, C.R. Early life skin microbial trajectory as a function of vertical and environmental transmission in Bornean foam-nesting frogs. *Anim. Microbiome* **2021**, *3*, 83. [[CrossRef](#)]
13. Hopkins, W.A. Amphibians as models for studying environmental change. *ILAR J.* **2007**, *48*, 270–277. [[CrossRef](#)]
14. Relyea, R.A.; Schoeppner, N.M.; Hoverman, J.T. Pesticides and amphibians: The importance of community context. *Ecol. Appl.* **2005**, *15*, 1125–1134. [[CrossRef](#)]
15. Scheele, B.C.; Rebouças, R.; Toledo, L.F. Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity. *Science* **2019**, *363*, 1459–1463. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Knutie, S.A.; Wilkinson, C.L.; Kohl, K.D.; Rohr, J.R. Early-life disruption of amphibian microbiota decreases later-life resistance to parasites. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 86. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Lam, B.A. Proportion of individuals with anti-*Batrachochytrium dendrobatidis* skin bacteria is associated with population persistence in the frog *Rana muscosa*. *Biol. Conserv.* **2010**, *143*, 529–531. [[CrossRef](#)]
18. Leary, S.; Underwood, W.; Anthony, R.; Cartner, S.; Corey, D.; Grandin, T.; Greenacre, C.; Gwaltney-Brant, S.; McCrackin, M.A.; Meyer, R.; et al. *AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals*; American Veterinary Medical Association: Schaumburg, IL, USA, 2013.
19. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254. [[CrossRef](#)]
20. Albalasmeh, A.A.; Berhe, A.A.; Ghezzehei, T.A. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *97*, 253–261. [[CrossRef](#)]
21. Du Nöuy, P.L. An interfacial tensiometer for universal use. *J. Gen. Physiol.* **1925**, *7*, 625. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Swift, M.L. GraphPad prism, data analysis, and scientific graphing. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1997**, *37*, 411–412. [[CrossRef](#)]
23. Schägger, H.; Von Jagow, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **1987**, *166*, 368–379. [[CrossRef](#)]
24. Neuhoff, V.; Arold, N.; Taube, D.; Ehrhardt, W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **1988**, *9*, 255–262. [[CrossRef](#)]
25. Warner, S.A.J. Genomic DNA isolation and lambda library construction. In *Plant Gene Isolation. Principles and Practice*; Foster, G.D., Twell, D., Eds.; John Wiley and Sons: Chichester, NH, USA, 1996; pp. 51–74.
26. Caporaso, J.G.; Lauber, C.L.; Costello, E.K.; Berg-Lyons, D.; Gonzalez, A.; Stombaugh, J.; Knights, D.; Gajer, P.; Ravel, J.; Fierer, N.; et al. Moving pictures of the human microbiome. *Genome Biol.* **2011**, *12*, R50. [[CrossRef](#)]
27. Andrews, S.; Krueger, F.; Segonds-Pichon, A.; Biggins, L.; Krueger, C.; Wingett, S. *FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data*; Babraham Bioinformatics: Cambridge, UK, 2010. Available online: www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/ (accessed on 16 February 2023).
28. Rognes, T.; Flouri, T.; Nichols, B.; Quince, C.; Mah, E.F. VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* **2016**, *4*, e2584. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical: Vienna, Austria, 2020. Available online: <https://www.r-project.org/\T1\textgreater{}> (accessed on 16 February 2023).
30. Callahan, B.J.; McMurdie, P.J.; Rosen, M.J.; Han, A.W.; Johnson, A.J.A.; Holmes, S.P. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* **2016**, *13*, 581–583. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Callahan, B.J.; McMurdie, P.J.; Holmes, S.P. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME J.* **2017**, *11*, 2639–2643. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Pruesse, E.; Quast, C.; Knittel, K.; Fuchs, B.M.; Ludwig, W.; Peplies, J.; Glöckner, F.O. SILVA: A comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acid. Res.* **2007**, *35*, 7188–7196. [[CrossRef](#)]
33. Oksanen, J.; Blanchet, F.; Friendly, M.; Kindt, R.; Legendre, P.; McGlenn, D.; Minchin, P.R.; O'Hara, R.B.; Simpson, G.L.; Solymos, P.; et al. *Vegan: Community Ecology Package*. R Package Version 2.5-7. 2013. Available online: <https://CRAN.R-project.org/package=vegan> (accessed on 9 May 2022).
34. Wickham, H. *Ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*; Springer: New York, NY, USA, 2016.
35. Hissa, D.C.; Bezerra, G.A.; Birner-Gruenberger, R.; Silva, L.P.; Usón, I.; Gruber, K.; Melo, V.M.M. Unique Crystal Structure of a Novel Surfactant Protein from the Foam Nest of the Frog *Leptodactylus vastus*. *ChemBioChem* **2014**, *15*, 393–398. [[CrossRef](#)]
36. Hissa, D.C.; Bezerra, W.M.; Freitas CD, T.D.; Ramos, M.V.; Lopes JL, D.S.; Beltramini, L.M.; Cascon, I.J.R.P.; Melo, V.M.M. Frog foam Nest protein diversity and synthesis. *J. Exp. Zool. A Ecol. Genet. Physiol.* **2016**, *325*, 425–433. [[CrossRef](#)]
37. Cooper, A.; Kennedy, M.W. Biofoams and natural protein surfactants. *Biophys. Chem.* **2010**, *151*, 96–104. [[CrossRef](#)]

38. Shigeri, Y.; Nakata, M.; Kubota, H.Y.; Tomari, N.; Yamamoto, Y.; Uegaki, K.; Haramoto, Y.; Bumb, C.; Tanaka, Y.; Kinumi, T.; et al. Identification of novel proteins in foam nests of the Japanese Forest Green Tree Frog, *Rhacophorus arboreus*. *Zool. Sci.* **2020**, *38*, 8–19. [CrossRef]
39. Mackenzie, C.D.; Smith, B.O.; Meister, A.; Blume, A.; Zhao, X.; Lu, J.R.; Kennedy, M.W.; Cooper, A. Ranaspumin-2: Structure and function of a surfactant protein from the foam nests of a tropical frog. *Biophys. J.* **2009**, *96*, 4984–4992. [CrossRef]
40. Pyron, R.A.; Wiens, J.J. A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. *Mol. Phylogenet. Evol.* **2011**, *61*, 543–583. [CrossRef]
41. Frost, D.R. *Amphibian Species of the World: An Online Reference*; Version 6.0; American Museum of Natural History: New York, NY, USA, 2019; Available online: <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html/> (accessed on 10 August 2019).
42. Thompson, L.R.; Sanders, J.G.; McDonald, D.; Amir, A.; Ladau, J.; Locey, K.J.; Prill, R.J.; Tripathi, A.; Gibbons, S.M.; Ackermann, G.; et al. A communal catalogue reveals Earth's multiscale microbial diversity. *Nature* **2017**, *551*, 457–463. [CrossRef] [PubMed]
43. Bletz, M.C.; Archer, H.; Harris, R.N.; McKenzie, V.J.; Rabemananjara, F.C.; Rakotoarison, A.; Vences, M. Host ecology rather than host phylogeny drives amphibian skin microbial community structure in the biodiversity hotspot of Madagascar. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1530. [CrossRef]
44. Kueneman, J.G.; Bletz, M.C.; McKenzie, V.J.; Becker, C.G.; Joseph, M.B.; Abarca, J.G.; Archer, H.; Arellano, A.L.; Bataille, A.; Becker, M.; et al. Community richness of amphibian skin bacteria correlates with bioclimate at the global scale. *Nat. Ecol. Evol.* **2019**, *3*, 381–389. [CrossRef]
45. Brunetti, A.E.; Lyra, M.L.; Melo, W.G.; Andrade, L.E.; Palacios-Rodríguez, P.; Prado, B.M.; Haddad, C.F.B.; Pupo, M.T.; Lopes, N.P. Symbiotic skin bacteria as a source for sex-specific scents in frogs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 2124–2129. [CrossRef]
46. Becker, M.H.; Walke, J.B.; Murrill, L.; Woodhams, D.C.; Reinert, L.K.; Rollins-Smith, L.A.; Burzynski, E.A.; Umile, T.P.; Minbiole, K.P.C.; Belden, L.K. Phylogenetic distribution of symbiotic bacteria from Panamanian amphibians that inhibit growth of the lethal fungal pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Mol. Ecol.* **2015**, *24*, 1628–1641. [CrossRef]
47. Martin, H.C.; Ibáñez, R.; Nothias, L.F.; Boya, P.C.A.; Reinert, L.K.; Rollins-Smith, L.A.; Dorresteijn, P.C.; Gutiérrez, M. Viscosin-like lipopeptides from frog skin bacteria inhibit *Aspergillus fumigatus* and *Batrachochytrium dendrobatidis* detected by imaging mass spectrometry and molecular networking. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 3091. [CrossRef] [PubMed]
48. Abarca, J.G.; Vargas, G.; Zuniga, I.; Whitfield, S.M.; Woodhams, D.C.; Kerby, J.; McKenzie, V.J.; Murillo-Cruz, C.; Pinto-Tomas, A.A. Assessment of bacterial communities associated with the skin of costa rican amphibians at la selva biological station. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2001. [CrossRef]
49. Kueneman, J.; Woodhams, D.; Van Treuren, W.; Archer, H.M.; Knight, R.; McKenzie, V.J. Inhibitory bacteria reduce fungi on early life stages of endangered Colorado boreal toads (*Anaxyrus boreas*). *ISME J.* **2016**, *10*, 934–944. [CrossRef]
50. Kohl, K.D.; Yahn, J. Effects of environmental temperature on the gut microbial communities of tadpoles. *Environ. Microbiol.* **2016**, *18*, 1561–1565. [CrossRef]
51. Harris, R.N.; James, T.Y.; Lauer, A.; Simon, M.A.; Patel, A. Amphibian Pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* Is Inhibited by the Cutaneous Bacteria of Amphibian Species. *EcoHealth* **2006**, *3*, 53. [CrossRef]
52. Kueneman, J.G.; Parfrey, L.W.; Woodhams, D.C.; Archer, H.M.; Knight, R.; McKenzie, V.J. The amphibian skin-associated microbiome across species, space and life history stages. *Mol. Ecol.* **2014**, *23*, 1238–1250. [CrossRef]
53. Loudon, A.H.; Woodhams, D.C.; Parfrey, L.W.; Archer, H.; Knight, R.; McKenzie, V.; Harris, R.N. Microbial community dynamics and effect of environmental microbial reservoirs on red-backed salamanders (*Plethodon cinereus*). *ISME J.* **2014**, *8*, 830–840. [CrossRef]
54. Walke, J.B.; Becker, M.H.; Hughey, M.C.; Swartwout, M.C.; Jensen, R.V.; Belden, L.K. Most of the dominant members of amphibian skin bacterial communities can be readily cultured. *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81*, 6589–6600. [CrossRef]
55. De Assis, A.B.; Barreto, C.C.; Navas, C.A. Skin microbiota in frogs from the Brazilian Atlantic Forest: Species, forest type, and potential against pathogens. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0179628. [CrossRef]
56. Catenazzi, A.; Flechas, S.V.; Burkart, D.; Hooven, N.D.; Townsend, J.; Vredenburg, V.T. Widespread elevational occurrence of antifungal bacteria in Andean amphibians decimated by disease: A complex role for skin symbionts in defense against chytridiomycosis. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 465. [CrossRef]
57. Fontaine, S.S.; Novarro, A.J.; Kohl, K.D. Environmental temperature alters the digestive performance and gut microbiota of a terrestrial amphibian. *J. Exp. Biol.* **2018**, *221*, jeb187559. [CrossRef]
58. Griffiths, S.M.; Harrison, X.A.; Weldon, C.; Wood, M.D.; Pretorius, A.; Hopkins, K.; Fox, G.; Preziosi, R.F.; Antwis, R.E. Genetic variability and ontogeny predict microbiome structure in a disease-challenged montane amphibian. *ISME J.* **2018**, *12*, 2506–2517. [CrossRef]
59. Passos, L.F.; Garcia, G.; Young, R.J. Comparing the bacterial communities of wild and captive golden mantella frogs: Implications for amphibian conservation. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0205652. [CrossRef]
60. Brunetti, A.E.; Bunk, B.; Lyra, M.L.; Fuzo, C.A.; Marani, M.M.; Spröer, C.; Haddad, C.F.B.; Lopez, N.P.; Overmann, J. Molecular basis of a bacterial-amphibian symbiosis revealed by comparative genomics, modeling, and functional testing. *ISME J.* **2022**, *16*, 788–800. [CrossRef]
61. Grimes, D.J.; Woese, C.R.; MacDonell, M.T.; Colwell, R.R. Systematic study of the genus *Vogesella* gen. nov. and its type species, *Vogesella indigofera* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **1997**, *47*, 19–27. [CrossRef]

62. Jørgensen, N.O.; Brandt, K.K.; Nybroe, O.; Hansen, M. *Vogesella mureinivorans* sp. nov., a peptidoglycan-degrading bacterium from lake water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2010**, *60*, 2467–2472. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Sheu, S.Y.; Chen, J.C.; Young, C.C.; Chen, W.M. *Vogesella fluminis* sp. nov., isolated from a freshwater river, and emended description of the genus *Vogesella*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2013**, *63*, 3043–3049. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Rapala, J.; Berg, K.A.; Lyra, C.; Niemi, R.M.; Manz, W.; Suomalainen, S.; Paulin, L.; Lahti, K. *Paucibacter toxinivorans* gen. nov., sp. nov., a bacterium that degrades cyclic cyanobacterial hepatotoxins microcystins and nodularin. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2005**, *55*, 1563–1568. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Pheng, S.; Lee, J.J.; Eom, M.K.; Lee, K.H.; Kim, S.G. *Paucibacter oligotrophus* sp. nov., isolated from fresh water, and emended description of the genus *Paucibacter*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2017**, *67*, 2231–2235. [[CrossRef](#)]
66. Nam, Y.H.; Choi, A.; Hwang, J.M.; Yim, K.J.; Kim, J.H.; Choi, G.G.; Chung, E.J. *Paucibacter aquatile* sp. nov. isolated from freshwater of the Nakdong River, Republic of Korea. *Arch. Microbiol.* **2018**, *200*, 877–882. [[CrossRef](#)]
67. Thomas, F.; Hehemann, J.H.; Rebuffet, E.; Czjzek, M.; Michel, G. Environmental and gut bacteroidetes: The food connection. *Front. Microbiol.* **2011**, *2*, 93. [[CrossRef](#)]
68. Proença, D.N.; Nobre, M.F.; Morais, P.V. *Chitinophaga costaii* sp. nov., an endophyte of *Pinus pinaster*, and emended description of *Chitinophaga niabensis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2014**, *64*, 1237–1243. [[CrossRef](#)]
69. Kämpfer, P.; Busse, H.J.; Kleinhagauer, T.; McInroy, J.A.; Glaeser, S.P. *Sphingobacterium zeae* sp. nov., an endophyte of maize. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2016**, *66*, 2643–2649. [[CrossRef](#)]
70. Lee, Y.; Jin, H.M.; Jung, H.S.; Jeon, C.O. *Sphingobacterium humi* sp. nov., isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2017**, *67*, 4632–4638. [[CrossRef](#)]
71. Shaffer, J.P.; U'Ren, J.M.; Gallery, R.E.; Baltrus, D.A.; Arnold, A.E. An endohyphal bacterium (*Chitinophaga*, Bacteroidetes) alters carbon source use by *Fusarium keratoplasticum* (*F. solani* species complex, Nectriaceae). *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 350. [[CrossRef](#)]
72. Xu, L.; Sun, J.Q.; Wang, L.J.; Gao, Z.W.; Sun, L.Z.; Wu, X.L. *Sphingobacterium alkalisolii* sp. nov., isolated from a saline-alkaline soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2017**, *67*, 1943–1948. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Kohl, K.D.; Cary, T.L.; Karasov, W.H.; Dearing, M.D. Restructuring of the amphibian gut microbiota through metamorphosis. *Environ. Microbiol. Rep.* **2013**, *5*, 899–903. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Pereira, E.B.; Collevatti, R.G.; Kokubum, M.N.D.C.; Miranda, N.E.D.O.; Maciel, N.M. Ancestral reconstruction of reproductive traits shows no tendency toward terrestriality in leptodactyline frogs. *BMC Evol. Biol.* **2015**, *15*, 91. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Duellman, W.E.; Trueb, L. Chapter 2: Reproductive Strategies. In *Biology of Amphibians*; The Johns Hopkins University Press: Baltimore, MD, USA, 1994.
76. Oke, M.; Ching, R.T.Y.; Carter, L.G.; Johnson, K.A.; Liu, H.; McMahon, S.A.; White, M.F.; Bloch, C., Jr.; Botting, C.H.; Walsh, M.A.; et al. Unusual chromophore and cross-links in ranasurfurin: A blue protein from the foam nests of a tropical frog. *Angew. Chem.* **2008**, *47*, 7853–7856. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

APÊNDICE B – ARTIGO “DETECTION OF THE FUNGUS *BATRACHOCHYTRIUM DENDROBATIDIS* IN ANURANS FROM THE SEMIARID REGION OF BRAZIL: NEW INFECTION RECORDS FOR ENDEMIC SPECIES”

Manuscrito do artigo “DETECTION OF THE FUNGUS *BATRACHOCHYTRIUM DENDROBATIDIS* IN ANURANS FROM THE SEMIARID REGION OF BRAZIL: NEW INFECTION RECORDS FOR ENDEMIC SPECIES” submetido ao periódico *South American Journal of Herpetology** (ISSN 1808-9798)

*Acesso via:<<https://bioone.org/journals/south-american-journal-of-herpetology>>

Este artigo trata de uma pesquisa que foi conduzida paralelamente aquela realizada sobre a caracterização do microbioma dos ninhos de espuma. Trata-se da primeira avaliação da presença do fungo patógeno de anfíbios *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) em anuros no estado do Ceará, Região Nordeste do Brasil. Sapos de diferentes regiões do estado, áreas de matas úmidas e de vegetação típica de Caatinga foram coletados durante entre o ano de 2019 e 2020. A pele de cada animal foi analisada por meio de swabs estéreis. O DNA total foi extraído e analisado para presença do fungo *Bd* através da amplificação com uso de *primers* específicos. O fungo *Bd* foi detectado pela primeira vez nas espécies *Adenomera juikitam*, *Boana raniceps*, *Dendropsophus nanus*, *D. soaresi*, *Leptodactylus troglodytes*, *L. vastus*, *Physalaemus cicada*, *Proceratophrys ararype*, *Pseudopaludicola mystacalis* e *Scinax x-signatus*. Entre outros casos positivos a ocorrência do fungo *Bd* nas espécies *Proceratophrys ararype* e *Pseudopaludicola mystacalis* estão entre as mais preocupantes por se tratarem de espécies com distribuição restrita e por isso se encontram mais ameaçadas pela ação humana.

1 DETECTION OF THE FUNGUS *BATRACHOCHYTRIUM DENDROBATIDIS* IN
2 ANURANS FROM THE SEMIARID REGION OF BRAZIL: NEW INFECTION RECORDS
3 FOR ENDEMIC SPECIES

4 MIRIAN DOS SANTOS MENDES ¹, FRANCISCA ANDRÉA DA SILVA OLIVEIRA ¹,
5 LUZIA GABRIELLE ZEFERINO DE CASTRO ¹, ROBSON WALDEMAR ÁVILA ¹,
6 FELIPE AUGUSTO CORREIA MONTEIRO ¹, VÂNIA MARIA MACIEL MELO ¹,
7 PAULO CASCON ¹ AND DENISE CAVALCANTE HISSA^{1*}

8 ¹Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará - UFC, Av. Humberto Monte, s/n,
9 Campus do Pici, CEP 60455760, Fortaleza, CE, Brazil

10 *Corresponding author. denisehissa@ufc.br

11
12 ABSTRACT. Chytridiomycosis, caused by the fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), has affected
13 amphibians globally since the 1970s, comprising the main cause of their decline worldwide. The present study
14 aimed to carry out the first assessment on the presence of the *Bd* in anuran resident populations in dry and wet
15 tropical forests in the Ceará state, northeastern Brazil. Samplings were carried out at different municipalities in
16 the Ceará State aiming to coverage distinct environmental landscapes (Monte Alegre Private Natural Heritage
17 Reserve, Ibiapaba Plateau, Maranguape Mountain Range, Araripe Plateau, Farias Brito and Campos Sales).
18 Anurans skin samples were taken from captured adults using swabs. Total extracted DNA was amplified by PCR
19 employing specific *Bd* primers. A total of 125 samples were analyzed, comprising 28 species belonging to eight
20 anuran families, with 20 (69%) of the sampled species tested positive for the *Bd*. This is the first record on *Bd*
21 infection for *Adenomera juikitam*, *Boana raniceps*, *Dendropsophus nanus*, *D. soaresi*, *Leptodactylus troglodytes*,
22 *L. vastus*, *Physalaemus cicada*, *Proceratophrys ararype*, *Pseudopaludicola mystacalis* and *Scinax x-signatus*.
23 Among the *Bd*-positive species, *P. ararype* and *Pristimantis relictus*, in particular, were among the *Bd*-positive
24 species, were the ones that arouse the biggest concerns indicating severe concerns, as they present a restricted
25 distribution to high-altitude “brejos”, which comprise forest refuges currently under severe climate changes and
26 anthropic threats.

27
28 KEYWORDS: Amphibians; Caatinga; Ceará; Chytridiomycosis; Pathogen; *Bd*.

29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53

INTRODUCTION

Brazil is home to a significant portion of the world's biodiversity and also boasts the greatest amphibian richness on Earth (Segalla et al., 2021). Global biodiversity is, however, constantly threatened by anthropic actions, and there is a great concern among biologists and health professionals in relation to raising society's awareness of the importance of nature conservation. Decreased biodiversity leads to severe consequences including alterations in the ecosystem goods and services and increased risks of pathogen spreading (Costanza et al., 1997; Berger et al., 1998; Cragg and Newman, 2013).

Among the vertebrates, the Amphibians, that play important ecological roles, are the most threatened, as declines are noted for 501 species worldwide, comprising 6.5% of all described amphibian species. This includes 90 extinctions (18%) (Scheele et al., 2019), the highest extinction rate among vertebrates (Stuart et al., 2004; Carvalho et al., 2017). Habitat loss, climate change, the introduction of exotic species and pollution are among the amphibian decline causes (Collins and Storfer, 2003). However, the main cause for these high decline rates is the pathogenic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) (Longcore, Pessier, and Nichols, 1999), which causes chytridiomycosis, a severe skin disease. Chytridiomycosis attacks the epidermis, causing a condition called hyperkeratosis, consisting of the thickening of the outer skin keratin-containing layer, which protects the body against water, and chemical and biological agent infiltrations. Hyperkeratosis caused by *Bd* in amphibians spreads quickly and overwhelmingly (Fisher et al., 2009), causing osmotic imbalances and electrolyte disturbances, which result in breathing difficulties, cardiac arrest and death (Berger et al., 1998; Voyles et al., 2009).

This fungus has spread across several continents and resulted in the death of huge numbers of amphibians worldwide (Fisher and Garner, 2020). Chytridiomycosis is, therefore, considered the main extinction agent for this taxonomic group on a global scale (Burrowes

54 and De La Riva, 2017; Scheele et al., 2019).

55 Chytridiomycosis is caused by two fungi species belonging to the Chytridiomycota
56 phylum, *B. dendrobatidis* (*Bd*), described by Longcore et al. (1999) and *B. salamandrivorans*
57 (*Bsal*) (Martel, Blooi, Bossuyt and Pasmans, 2013), described by Martel et al. (2013). Studies
58 concerning *Bd* genome sequences have revealed at least six strains of this fungus: a panzootic
59 strain, *Bd*-GPL, the Swiss lineage, *Bd*-CH, the Cape strain, *Bd*-Cape, the Asian strains *Bd*
60 ASIA-1 (which displays an ancestral relationship to other strains) and *Bd* ASIA-3, and, finally,
61 *Bd*-Brazil (Fisher and Garner 2020). The *Bd*-Brazil lineage was one of the first to diverge
62 from other lineages in phylogenetic history (Rosenblum et al., 2013). Fisher and Garner (2020)
63 reported other *Bd* variant strains, such as the *Bd* variant ASIA-2/BRASIL in both Korea and
64 Brazil, detected in the Atlantic Forest biome, evidencing sexual *Bd* reproduction (Schloegel et
65 al., 2012).

66 In Brazil, few studies have investigated the number of infected amphibian species and
67 their geographic distribution (Rodriguez et al., 2014; Woodhams et al., 2015; Carvalho et al.,
68 2017). Chytridiomycosis has spread throughout the country, with a greater number of infected
69 populations detected in the Atlantic Rainforest (Carvalho et al., 2017), due, at least in part, to
70 the higher number of studies performed in this biome. The number of *Bd* sites registered in
71 Brazil has, however, recently increased, heightening concerns regarding the containment of
72 this disease (Amorim et al., 2019; Benício et al., 2019). In addition to affecting anuran
73 diversity, the problem extends to other species, as amphibians represent an important food
74 chain component. Thus, amphibian declines can affect pest control and cause the decline of
75 amphibian predators, *i.e.*, snakes (Shuman-Goodier et al., 2019; Zipkin et al., 2020), affecting
76 the entire Brazilian biodiversity.

77 In this context, assessments concerning the *Bd* fungus in non-investigated Brazilian
78 regions, as well as the monitoring of areas where the fungus has already been registered, are

79 required. These evaluations are paramount, as they may support measures aimed at global
80 amphibian conservation. In this context, this study aimed to investigate whether *Bd* is already
81 present resident in anuran populations residing in dryland and wet tropical forests from
82 semiarid region of the northeastern Brazil.

83 MATERIAL AND METHODS

84 Data sampling

85 Samplings were carried out in the dry (July and August 2019) and in the rainy (January,
86 February and March 2020) seasons in six locations in the state of Ceará, northeastern Brazil
87 (Fig. 1), including wetter areas in relict altitudinal forests called “brejos de altitude” and drier
88 caatinga *sensu stricto* areas, as follows: Monte Alegre Private Natural Heritage Reserve
89 (PNHR) located in Pacatuba (3°59'22.1”S, 38°37'44.5”W – relict altitudinal forest); Araripe
90 Plateau (7°16'47.5”S, 39°26'18”W – relict altitudinal forest), municipality of Crato; Farias
91 Brito (6°49'41.8”S, 39°31'33.7”W - Caatinga); Maranguape Mountain Range (03°53'05”S,
92 38°41'06”W, in a relict altitudinal forest), Ibiapaba Plateau (3°53'05”S, 38°41'06”W, in a relict
93 altitudinal forest) and Campos Sales (7°04'53.6”S, 40°19'23.7”W - Caatinga). Only one
94 sampling was carried out for each location, with the exception of the Monte Alegre PNHR,
95 where five field expeditions were carried out. Five specimens of each species were sampled,
96 on average, per location. Collection licenses (68784 and 29613) were issued by the Brazilian
97 Ministry of Environment - SISBIO.

98 Anuran specimens were manually captured through active searches. Immediately
99 following their capture, the specimens were washed with ultrapure water, photographed and
100 identified at the species level. Skin samples were collected using ready-to-use sterile swabs,
101 which were passed 5 to 7 times on the animal's ventral and inguinal parts, thighs and feet, in
102 order to ensure reliable sampling (Hyatt et al., 2007). Individual gloves were used for each
103 collected specimen according to Mesquita et al. (2017), ensuring sample integrity and

104 avoiding cross contamination. The collected swab samples were placed in 1.5 mL dry
105 cryogenic tubes in ice-cooled coolers and immediately taken to the laboratory and stored at -
106 20°C until the DNA extraction process.

107 The presence of clinical chytridiomycosis signs, such as abnormal skin pigmentation,
108 epidermal desquamation, epithelial tissue irregularities, erosions (hyperkeratosis) or
109 hyperplasia (Alvarado-Rybak et al., 2021), were also investigated in the captured individuals.
110 All animals were released following inspection and sampling.

111 Genetic material extraction

112 DNA swab extraction was performed according to Boyle et al. (2004), modified by
113 Lambertini et al. (2013). Briefly, 50 µL of the PrepMan ULTRA® reagent (Applied
114 Biosystems) were added to each eppendorf tube containing the swabs, followed by vortexing
115 for 45 seconds, centrifugation for 30 seconds at 12.000 rpm, another vortexing step for 45
116 seconds and centrifugation for 30 seconds at 12.000 rpm. The samples were then heated for
117 10 minutes in a ThermoMixer, cooled to room temperature for 2 minutes and centrifuged for 1
118 minute at 12.000 rpm. The swabs were then inverted inside the eppendorfs, using buckled
119 tweezers at each inversion, centrifuged for 5 minutes at 12.000 rpm and finally, discarded.
120 The tubes were then centrifuged for a few seconds and 45 µL of the resulting solution were
121 transferred to new eppendorf tubes, where they were centrifuged one last time for 10 minutes
122 at 12.000 rpm.

123 DNA amplification and sequencing

124 *Bd*-specific primers (*Bd* 1a: 5'-CAGTGTGCCATATGTCACG-3', *Bd* 2a: 5'-
125 CATGGTTCATATCTGTCCAG-3') developed by Annis et al. (2004) were employed to
126 amplified a 300 bp (base pairs) product. The PCR was performed according to Kosch and
127 Summers (2013), with modifications. The reaction consisted of 5 µL of 5x GoTaq Buffer, 3µL
128 of MgCl₂ (25mM), 0.5 dNTPs (1000 µM), 5 µL of each primer (5 µM), 0.2 µL of Taq

129 Polymerase (5U) and 1.3 μL of water, resulting in a 20 μL mix, which were then mixed with
130 BSA at a final concentration of 400ng/ μL for each tube containing the PCR mixture, and 5 μL
131 (dilution to 100ng) of sample DNA in a total reaction volume of 35 μL , including BSA. A
132 negative control with distilled water was used to replace the DNA that was added to the
133 reaction. The applied Thermocycler conditions were as follows: an initial denaturation step at
134 95°C for 5 minutes, followed by 44 45-second cycles at 93°C, 45 seconds at 60°C, 1 minute
135 at 72°C, and a final extension step at 72°C for 10 minutes. Following the PCR completion, 8
136 μL of each amplified sample were run on a 2% agarose gel, along with a DNA ladder as a
137 DNA size standard. The gel was stained with SYBRsafe and visualized using an ultraviolet
138 light photodocumenter.

139 To validate the PCR protocol, some amplified PCR products were purified with
140 potassium acetate and alcohol and confirmation of impurity removal was validated by final
141 concentrations (ng/ μL) higher than 50 ng/ μL , and by the 260/230 nm and 260/280 nm ratios
142 quantified employing a Nanodrop® ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop, Wilmington, DE,
143 USA). Briefly, 72 μL of each PCR product were mixed with 7.2 μL of a 3 M potassium
144 acetate solution (pH 5.5) and 2 times the total volume of the 100% ethanol solution.
145 Following homogenization by inversion, the obtained solutions were maintained at -80 °C for
146 30 min. The samples were then centrifuged at 14,000 rpm, 4°C, for 15 min, the supernatants
147 were discarded and the pellets were resuspended in 150 μL of cold 70% ethanol and
148 centrifuged at 14,000 rpm, 4°C, for 5 min. The supernatants were discarded and the pellets
149 dried in a heating block at 36°C for approximately 20 min. Following alcohol evaporation, the
150 purified and precipitated DNA was resuspended in 30 μL of DNase and RNase-free ultrapure
151 water.

152 DNA sequencing was performed using the Sanger sequencing method developed by
153 Macrogen Inc., Seoul, Korea (www.macrogen.com). The sequencing reactions were

154 performed using *Bd*-specific primers (Bd 1a: 5'-CAGTGTGCCATATGTCACG-3', (Bd 2a: 5'-
155 CATGGTTCATATCTGTCCAG-3') developed by Annis et al. (2004). The samples chosen for
156 sequencing were CS11, CS13 – Campos Sales, FB02 – Farias Brito, PA27 – Monte Alegre
157 PNHR, PI01 – Ibiapaba Plateau and SA18 – Araripe Plateau. The partial sequences provided
158 by Macrogen Inc. were of high quality (Phred >20) and used to generate consensus sequences
159 using the Codon Code Aligner version 6.0.2 program (Codon Code Corp, USA). The
160 consensus sequences were subsequently submitted to molecular identification employing the
161 BLAST local alignment tool (Altschul et al., 1990) employing the nucleotide collection
162 database.

163 RESULTS

164 Sampling

165 Samples were collected from 210 individuals, 57 sampled at the Monte Alegre PNHR,
166 17 at Campos Sales, 18 at Araripe Plateau, 22 at Farias Brito, 42 at the Maranguape Mountain
167 Range and 54 at the Ibiapaba Plateau (Fig. 1), distributed among 28 different species (Table 1,
168 Fig. 2). The samples belonging to each species were analyzed by location until *Bd* detection,
169 comprising a total of 125 samples submitted to DNA extraction and PCR analyses, totaling 40
170 positive samples.

171 *Batrachochytrium dendrobatidis* PCR detection

172 Among the 28 sampled species, 20 (69%) tested positive for *Bd* in at least one
173 sampling site from the total number of samples tested by PCR (125 samples). All six sampled
174 locations presented specimens belonging to at least one species positive for *Bd* (Table 1). This
175 assessment reports this pathogen for the first time in anuran populations from the state of
176 Ceará. The 20 *Bd*-contaminated species are distributed among six families, Bufonidae,
177 Craugastoridae, Hylidae, Leptodactylidae, Odontophrynidae and Phyllomedusidae.

178 The 20 anuran species with *Bd*-contaminated individuals in the present study exhibit

179 varied pattern of distribution (Table 2).

180 **Molecular identification**

181 Table 3 presents the molecular identification of six samples randomly chosen for
182 sequencing. All of them were identified as *B. dendrobatidis*, confirming the presence of this
183 fungus in the tested isolates.

184 **DISCUSSION**

185 This study provides new registration of the *B. dendrobatidis* in Brazil and expand
186 our knowedgment on the presence of this pathogen in anuran populations from the semiarid
187 region. The present work is the first to investigate the presence of the fungus
188 *Batrachochytrium dendrobatidis* in anuran populations in the state of Ceará, Brazil. The
189 individuals were collected in several locations covering more than one phytophysognomy in
190 Ceará, in order to bring an updated result on the presence of the pathogen in the
191 aforementioned state.

192 This region is defined based on its dominant climatic conditions, which is
193 characterized by low annual rainfall and high evapotranspiration, in addition to a prolonged
194 period of drought lasting for 7 to 10 months in the year. The predominant vegetation is the
195 Caatinga biome, a phytogeographic domain specific to Brazil (Silva et al., 2017). The
196 specimens were sampled from several areas in the Ceará state covering more than one state
197 phytophysognomy, comprising typical Caatinga vegetation (Farias Brito and Campos Sales)
198 and wet tropical forests (Maranguape Mountain Range, Monte Alegre PNHR, Chapada do
199 Araripe and Planalto da Ibiapaba) to obtain updated results on the presence of *Bd* in this state.

200 Since the discovery of chytridiomycosis, several detection techniques have been
201 described and improved, and technical advances have significantly increased their reliability.
202 The detection by polymerase chain reaction (PCR) identifies *Bd* quickly with a high degree of
203 sensitivity and specificity, from a non-invasive sample collection method. Annis et al. (2004)

204 developed specific *Bd* primers, greatly contributing to the speed and accuracy of this test.
205 Other major advances in molecular technologies comprise, for example, real-time PCR assays.
206 These tests are fast and more sensitive than conventional PCR, and allow for the
207 quantification of target DNA (Boyle et al., 2004). In the present study, our PCR assay was
208 validated by sequencing the PCR products of six samples, confirming that our assay was
209 actually detecting the presence of the *Bd* fungus, as the sequenced samples displayed high
210 similarity to *Bd* species deposited in the GenBank database.

211 One of the most consistent PCR problems comprises sample inhibition due to swab
212 contamination with soil, debris and other components present in the amphibian epidermis
213 itself (Hyatt et al., 2007). These authors indicate that 25% of their PCR experiments revealed
214 complete inhibition concerning the detection of the *Bd* fungus, and false negatives are also
215 possible. Phenolic compounds, tannic acids and humic acids (HA) are the most significant
216 PCR inhibitors, produced from the decomposition of plant materials usually present in the soil,
217 sediments and natural environments with water and debris (Garland et al., 2010). One way to
218 counteract this inhibition is the use of PCR additives, such as bovine serum albumin (BSA)
219 (Wilson, 1997), which was employed in the present study and proven effective.

220 The Caatinga biome biodiversity has been historically underestimated, even
221 though a significant number of animal species, including some endemic ones, are found in
222 this region. The amphibian fauna of the Caatinga biome, for example, comprises at least 98
223 species, including 20 endemic forms (Garda et al., 2017). However, although local
224 herpetofauna assessments have intensified in the last few years, the Caatinga biome is still
225 among the most neglected Brazilian regions regarding conservation efforts (Roberto and
226 Loebmann, 2016; Ferreira et al., 2018).

227 The occurrence of the *Bd* fungus in anurans from the semiarid region of others
228 northeastern Brazilian states has been previously investigated. Amorim et al. (2019)

229 performed tests on 190 individuals of 85 species, collected in the state of Bahia and preserved
230 in collections, with 16 samples within 14 species showing a positive result for *Bd*. Regarding
231 the state of Piauí, 20 samples of the species *Rhinella granulosa* and 20 of *R. diptycha* were
232 tested, obtaining 20% and 30% of the samples, respectively, positive for *Bd* (Benício et al.,
233 2019).

234 When we compare works carried out with collection material and works carried
235 out with fresh samples, i.e. collected and tested in a short period of time, it is possible to
236 obtain different results. Works carried out in collections have the advantage of providing
237 information on the presence of *Bd* in different years and thereby revealing the history of *Bd*
238 infection in a given place, such as the work carried out by Carvalho et al. (2017). On the other
239 hand, the effectivity of assays with *Bd* with animals from a collection depends on the storage
240 status of the samples. On the other hand, studies carried out with the capture of the animal in
241 the field provide a current response to contamination with *Bd* in a given location (Lambertini
242 et al., 2021).

243 In other regions of Brazil, several other studies investigated the presence of the *Bd*
244 fungus, Ramalho (2015) carried out a study in Lagoa Bonita, at the Águas Emendadas
245 Ecological Station (AEECSST), in the Planaltina region of the Federal District. This work had
246 a sampling effort of 318 individuals, which included 16 species from 5 families, having
247 obtained 46 positive samples (14.47%), in which 10 species showed positive results for the
248 fungus. The same work also brings the first record of 2 endemic species of the Cerrado biome
249 infected with *Bd*, located in the state of Goiás, *Bokermannohyla pseudopseudis* (Miranda-
250 Ribeiro, 1937) and *Bokermannohyla sapiranga* (Brandão, Magalhães, Garda, Campos,
251 Sebben, and Maciel, 2012), with prevalences of 60% and 71%, respectively.

252 Valencia-Aguilar et al. (2015) collected 90 individuals within 27 species,
253 obtaining a positive result for *Bd* in 22 species (39 specimens). This study consisted of

254 evaluating the incidence of the fungus in less explored regions distributed in 4 localities of the
 255 Brazilian Atlantic Forest: Bahia, Pernambuco, Minas Gerais, Alagoas and a locality in the
 256 Amazon Forest in Pará. The same work contributed with the first positive record for *Bd* in an
 257 anuran captured in the wild in the Amazon (*Adelphobates galactonotus* [Steindachner, 1864]).

258 Ceccon (2019) collected samples from 132 individuals, 33 of which were
 259 recaptured more than once in the field of the species *Limnomedusa macroglossa* (Duméril and
 260 Bibron, 1841). The study was carried out in the municipality of Três Barras do Paraná, in the
 261 state of Paraná, resulting in 31 samples positive, with a prevalence of 17.4%.

262 Some studies covered a greater number of Brazilian localities and species of
 263 adult frogs or tadpoles, such as: Rodriguez et al. (2014) that tested 2,799 post-metamorphic
 264 frogs from collections between the years 1894 to 2010, focusing on the Atlantic Forest of
 265 Brazil, and obtaining the record of the oldest *Bd* in Brazil (1894); Becker et al. (2016) that
 266 verified the presence of the *Bd* fungus in 1,391 preserved frogs, post-metamorphic specimens
 267 from the Amazon and ecoregions from 1895 to 2014, and Carvalho et al. (2017) that
 268 evaluated 32,551 museum tadpoles from 1930 to 2015.

269 Among the 20 species that tested positive for *Bd*, a little more than half (11) present a
 270 wide distribution that encompasses much of South America and different biomes, while the
 271 other nine species (*Corythomantis greeningi*, *Dendropsophus soaresi*, *Leptodactylus*
 272 *troglydytes*, *L. vastus*, *Physalaemus albifrons*, *P. cicada*, *Pithecopus gonzagai*, *Pristimantis*
 273 *relictus* and *Proceratophrys ararype*) are restricted to the Caatinga biome of northeastern
 274 Brazil, with some occurring also in areas in neighboring Northeastern states. Among species
 275 restricted to the Northeast and neighboring states, *C. greeningi*, *D. soaresi*, *L. troglodytes*, *L.*
 276 *vastus* and *P. gonzagai* occur both in wet forests and in open vegetation formations (Cerrado
 277 and Caatinga), *P. albifrons* and *P. cicada* occur only in Cerrado and Caatinga areas, *P. ararype*
 278 and *Pristimantis relictus* are endemic in wet forests located in high-altitude “brejos”, with *P.*

279 *ararype* being endemic to the Araripe Plateau.

280 The Maranguape mountain location was particularly interesting, presenting the highest
281 number of sampled species (14), although only one (*Physalaemus cuvieri*) testing positive for
282 *Bd*. It is important to note that *Adelophryne maranguapensis*, an endemic species to this high-
283 altitude marsh and considered threatened with extinction (Silvano 2004), was negative for *Bd*
284 in the present study.

285 Among the 20 *Bd* positive species, 10 represent the first records concerning *Bd*
286 infection in Brazil, as follows: *Adenomera juikitam*, *Boana raniceps*, *Dendropsophus nanus*,
287 *D. soaresi*, *Leptodactylus troglodytes*, *L. vastus*, *Physalaemus cicada*, *Proceratophrys*
288 *ararype*, *Pseudopaludicola mystacalis* and *Scinax x-signatus*.

289 Among the species analyzed here, *Pristimantis relictus* Roberto, Loebmann, Lyra,
290 Haddad and Ávila, 2022, recently described. This species inhabits humid forests, occurring in
291 the Serras da Meruoca, Uruburetama, Baturité, Maranguape and Aratanha and Planalto da
292 Ibiapaba (Roberto and Loebmann, 2016; Roberto et al., 2022). The captured individuals were
293 located in trees or undergrowth. Positive samples for *Bd* were detected in the Planalto de
294 Ibiapaba, while samples obtained in Maranguape and PNHR Monte Alegre were negative.

295 Species of the genus *Pristimantis* lay terrestrial eggs presenting direct development.
296 Terrestrial species that reproduce out of water are less exposed to contamination by an aquatic
297 fungus such as *Bd*, although infection has been reported for some anurans that have these
298 characteristics (Mesquita et al. 2017). On the other hand, studies have shown that lower
299 exposure can lead to a lack of adaptive responses to the fungus and, consequently, greater
300 susceptibility compared to species that develop from aquatic larvae (Mesquita et al. 2017).

301 This makes the record of this pathogen in *Pristimantis relictus* particularly worrisome,
302 as this species is restricted to high-altitude swamps that already suffer significant anthropic
303 impacts. *Bd* records for other *Pristimantis* species were presented by Valencia-Aguilar et al.

304 (2015) for *P. ramagii* (Boulenger, 1888) and *P. vinhai* (Bokermann, 1975) and by Amorim et
305 al. (2019) for *P. paulodutra* (Bokermann, 1975).

306 *Proceratophrys ararype* (Odontophrynidae) was recently described from the Chapada
307 do Araripe plateau, in the northeastern Caatinga ecoregion. As this species is endemic to this
308 high-altitude wet relictual forest, which suffers strong pressure from anthropic activities, it is
309 probably already threatened with extinction (Mângia et al. 2018) and infection by the *Bd*
310 fungus, as discovered herein, further aggravates the conservation status of this species.

311 *Adelophryne maranguapensis* (Eleutherodactylidae), an anuran endemic to the wet
312 forests of the Serra de Maranguape Mountain range (Roberto and Loebmann 2016) was a
313 noteworthy *Bd* negative species. Besides its restricted distribution area, this species presents a
314 specialized mode of reproduction, performing oviposition in bromeliads and presenting direct
315 development (Cassiano-Lima et al. 2011), which makes it even more vulnerable, due to high
316 bromeliad extraction for commercial purposes, in addition to deforestation (Roberto and
317 Loebmann 2016). No *Bd* infection records for *Adelophryne* species in Brazil are available.

318 Populations of 20 anuran species in the state of Ceará are already infected by the *Bd*
319 pathogen in Caatinga biome areas and in relict altitudinal forests called “brejos de altitude”,
320 totaling six localities. Most of the analyzed species were *Bd*-infected, leading to concerns
321 regarding Ceará biodiversity conservation. This assessment also highlights the importance of
322 further studies on the total diversity of amphibians in this state, including tadpole monitoring,
323 which was not addressed herein. Our findings are relevant both for the scientific community
324 and regarding decision-making on biodiversity conservation, especially as chytridiomycosis is
325 identified as one of the main amphibians decline and extinction causes, both globally and in
326 Brazil.

327 **ACKNOWLEDGEMENTS**

328 This study was supported by the Cearense Foundation for Support to Scientific and

329 Technological Development (FUNCAP) through a scholarship granted to MS Mendes, by the
330 National Council for Scientific and Technological Development through CNPq project
331 407456/2018-0 assigned to D. C. Hissa, as well as by the Coordination for Improvement
332 Higher Education Personnel (CAPES). RWA thanks CNPq for productivity research grant (PQ
333 305988/2018-2; 307722/2021-0). The authors thank researchers Cícero Ricardo de Oliveira,
334 Ana Carolina Brasileiro Melo, and Roberta Braga for field support and anuran identification
335 and Lucia Castro Cunha for permission to work in the PNHR Monte Alegre.

336 LITERATURE CITED

- 337 Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. 1990. Basic local alignment search
338 tool. *Journal of Molecular Biology* 215:403–410. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- 339 Andrade F.S., Haga I.A., Ferreira J.S., Recco-Pimentel S.M., Toledo L.F., Bruschi D.P. 2020. A
340 new cryptic species of pithecopus (Anura, phyllomedusidae) in north-eastern brazil.
341 *European Journal of Taxonomy* 2020:108–134. doi: 10.5852/ejt.2020.723.1147
- 342 Alvarado-Rybak M., Lepe-Lopez M., Peñafiel-Ricaurte A., Valenzuela-Sánchez A., Valdivia C.,
343 Mardones F.O., ... Azat, C. 2021. Bioclimatic and anthropogenic variables shape the
344 occurrence of *Batrachochytrium dendrobatidis* over a large latitudinal gradient. *Scientific*
345 *Reports* 11, 17383. doi: 10.1038/s41598-021-96535-w
- 346 Amorim F.O., Pimentel L.A., Machado L.F., Cavalcanti A.D.C., Napoli M.F., Juncá F.A. 2019.
347 New records of *Batrachochytrium dendrobatidis* in the state of Bahia, Brazil: Histological
348 analysis in anuran amphibian collections. *Diseases of Aquatic Organisms* 136:147–155. doi:
349 10.3354/dao03402
- 350 Annis S.L., Dastoor F.P., Ziel H., Daszak P., Longcore J.E. 2004. A Dna-based assay identifies
351 *Batrachochytrium dendrobatidis* in Amphibians. *Journal of Wildlife Diseases* 40:420–428.
352 doi: 10.7589/0090-3558-40.3.420
- 353 Benício R.A., Carvalho T., Barbosa M.D.R., Costa J. M., Da Silva F.C.C., Fonseca M.G. 2019.

- 354 Worrying News for Brazilian Caatinga: Prevalence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in
355 Amphibians. *Tropical Conservation Science* 12. doi: 10.1177/1940082919892626
- 356 Becker C.G., Rodriguez D., Lambertini C., Toledo L.F., Haddad C.F.B. 2016. Historical
357 dynamics of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Amazonia. *Ecography* 39:954–960. doi:
358 10.1111/ecog.02055
- 359 Berger L., Speare R., Daszak P., Green D.E., Cunningham A.A., Goggin C.L., Parkes, H. 1998.
360 Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the
361 rain forests of Australia and Central America. *Proceedings of the National Academy of*
362 *Sciences* 9031–9036. doi: 10.1073/pnas.95.15.9031
- 363 Bokermann W.C.A. 1966. Lista Anotada das Localidades Tipo de Anfíbios Brasileiros. *Serviço*
364 *de Documentação – RUSP*, São Paulo, 183 pp.
- 365 Bokermann W.C.A. 1975. Três espécies novas de Eleutherodactylus do sudeste da Bahia, Brasil
366 (Anura, Leptodactylidae). *Revista Brasileira de Biologia* 34:11–18
- 367 Boulenger G.A. 1888. V.—On some Reptiles and Batrachians from Iguarasse, Pernambuco.
368 *Annals and Magazine of Natural History* 2: 40–43. doi: 10.1080/00222938809460873
- 369 Boulenger G.A. 1889. On a collection of batrachians made by Prof. Charles Spegazzini at
370 Colonia Resistencia, South Chaco, Argentine Republic. *Annali del Museo Civico di Storia*
371 *Naturale di Genova. Serie 2, 7: 246–249*
- 372 Boulenger G.A. 1896. Descriptions of new batrachians in the British Museum. *Annals and*
373 *Magazine of Natural History* 17: 401-406
- 374 Boyle D.G., Boyle D.B., Olsen V., Morgan J.A., Hyatt A.D. 2004. Rapid quantitative detection
375 of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-
376 time Taqman PCR assay. *Diseases of Aquatic Organisms* 60:141–148. doi:
377 10.3354/dao060141
- 378 Brandão R.A., Magalhães R.F., Garda A.A., Campos L.A., Sebben A., Maciel N.M. 2012. A

- 379 new species of Bokermannohyla (Anura: Hylidae) from highlands of central Brazil.
380 *Zootaxa*: 28–42. doi: 10.11646/zootaxa.3527.1.2
- 381 Burrowes P.A., De La Riva I. 2017. Detection of the amphibian chytrid fungus
382 *Batrachochytrium dendrobatidis* in museum specimens of Andean aquatic birds:
383 Implications for pathogen dispersal. *Journal of Wildlife Diseases* 53:349–355. doi:
384 10.7589/2016-04-074
- 385 Caramaschi U., Jim J. 1983. Uma nova espécie de Hyla do grupo marmorata do nordeste
386 brasileiro (Amphibia, Anura, Hylidae). *Revista Brasileira de Biologia* 43(2): 195-198
- 387 Carvalho T., Becker C.G., Toledo L.F. 2017. Historical amphibian declines and extinctions in
388 Brazil linked to chytridiomycosis. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*
389 20162254–. doi: 10.1098/rspb.2016.2254
- 390 Carvalho T.R., Giaretta A.A. 2013. Taxonomic circumscription of *Adenomera martinezi*
391 (Bokermann, 1956) (Anura: Leptodactylidae: Leptodactylinae) with the recognition of a
392 new cryptic taxon through a bioacoustic approach. *Zootaxa* 3701: 207–237. doi:
393 10.11646/zootaxa.3701.2.5
- 394 Cassiano-Lima D., Borges-Nojosa D.M., Cascon P., Cechin S.Z. 2011. The reproductive
395 mode of *Adelophryne maranguapensis* Hoogmoed, Borges and Cascon, 1994, (Anura,
396 Eleutherodactylidae) an endemic and threatened species from Atlantic Forest remnants in
397 northern Brazil. *North-Western Journal of Zoology* 7:92–97.
- 398 Ceccon, E. S. 2019. Fatores abióticos relacionados à incidência e prevalência do fungo
399 quitrídio na rã-das-corredeiras *Limnomedusa macroglossa*. Dissertation, Federal University
400 of Technology Parana, Francisco Beltrão.
- 401 Collins J.P., Storfer A. 2003. Global amphibian declines: Sorting the hypotheses. *Diversity and*
402 *Distributions* 9:89–98. doi: 10.1046/j.1472-4642.2003.00012.x
- 403 Cope E.D. 1862. Catalogue of the Reptiles obtained during the explorations of the Parana,

- 404 Paraguay, Vermejo and Uruguay Rivers, by Capt. Thos. J. Page, U.S.N.; and those
405 procured by Lieut. N. Michler, U.S: Top. Eng., Commander of the Expedition conducting
406 the survey of the Atrato River. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of*
407 *Philadelphia* 14, 346–359
- 408 Cope E.D. 1887. Synopsis of the Batrachia and Reptilia obtained by H. H. Smith, in the
409 province of Mato Grosso, Brazil. *Proceedings of the American Philadelphia Society* v. 24,
410 p. 44–60
- 411 Costanza R., D’Arge R., De Groot R., Farber S., Grasso M., Hannon B., ... Van Den Belt, M.
412 1997. The value of the world’s ecosystem services and natural capital. *Nature* 387:253–260.
413 doi: 10.1038/387253a0
- 414 Cragg G.M., Newman D.J. 2013. Natural products: A continuing source of novel drug leads.
415 *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1830:3670–3695. doi:
416 10.1016/j.bbagen.2013.02.008
- 417 Duméril A.M.C., Bibron G. 1841. *Erpétologie Générale ou Histoire naturelle complète des*
418 *Reptiles. Tome Huitième, comprenant l’histoire générale des batraciens, et la description*
419 *des cinquante–deux genres et des cent soixante– trois espèces des deux premiers sous–*
420 *ordres: Les péromèles qui n’ont pas de membres, et les anoures qui sont privés de la queue.*
421 Roret, Paris, ii + 792 pp.
- 422 Ferreira A., Claudio M.R.W. 2018. Herpetofauna da Bacia Hidrográfica do Rio Salgado, Estado
423 do Ceará, Nordeste do Brasil. *Bol Mus Biol Mello Leitão* 40:23–48.
- 424 Fisher M.C., Garner T.W.J. 2020. Chytrid fungi and global amphibian declines. *Nature Reviews*
425 *Microbiology* 18:332–343. doi: 10.1038/s41579-020-0335-x
- 426 Fisher M.C., Garner T.W.J., Walker S.F. 2009. Global emergence of *Batrachochytrium*
427 *dendrobatidis* and amphibian chytridiomycosis in space, time, and host. *Annual Review of*
428 *Microbiology* 63:291–310. doi: 10.1146/annurev.micro.091208.073435

- 429 Fitzinger L. 1826. Neue classification der Reptilien nach ihren natürlichen verwandtschaften.
430 Nebst einer verwandtschafts – tafel und einem verzeichnisse der Reptilies – Sammlung des
431 K. K. Zoologischen Museum's zu Wien. J.G. Heubner, Wien, vi + 66 pp. + 1 pl.
- 432 Frost D.R. 2021. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.1 (29
433 January 2021). Accessible at <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/>
- 434 Garda A.A., Stein M.G., Machado R.B., Lion M.B., Juncá F.A., Napoli M.F. 2017. Ecology,
435 biogeography, and conservation of amphibians of the Caatinga. In: Caatinga: The Largest
436 Tropical Dry Forest Region in South America. *Springer International Publishing* 133–149.
437 doi: 10.1007/978-3-319-68339-3_5
- 438 Garland S., Baker A., Phillott A.D., Skerratt L.F. 2010. BSA reduces inhibition in a TaqMan®
439 assay for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms*
440 92:113–116. doi: 10.3354/dao02053
- 441 Hoogmoed M.S., Borges D.M., Cascon P. 1994. Three new species of the genus *Adelophryne*
442 (Amphibia: Anura: Leptodactylidae) from northeastern Brazil, with remarks on the species
443 of the genus. *Zoologische Mededelingen* 68: 271-300
- 444 Hyatt A., Boyle D., Olsen V., Boyle D., Berger L., Obendorf D., ... Colling, A. 2007.
445 Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium*
446 *dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 73, 175–192. doi: 10.3354/dao073175
- 447 Kosch T.A., Summers K. 2013. Techniques for minimizing the effects of PCR inhibitors in the
448 chytridiomycosis assay. *Molecular Ecology Resources* 13:230–236. doi: 10.1111/1755-
449 0998.12041
- 450 Lambertini C., Becker C.G., Belasen A.M., Valencia-Aguilar A., Nunes-De-Almeida C.H.L.,
451 Betancourt-Román C.M., ... Toledo, L.F. 2021. Biotic and abiotic determinants of
452 *Batrachochytrium dendrobatidis* infections in amphibians of the Brazilian Atlantic Forest.
453 *Fungal Ecology* 49. doi: 10.1016/j.funeco.2020.100995

- 454 Lambertini C., Rodriguez D., Brito F.B., Da Silva Leite D., Toledo L.F. 2013. Diagnóstico do
455 fungo Quitrídio: *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Herpetologia Brasileira* 2:12–17
- 456 Linnaeus C. 1758. Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera,
457 species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. Tomus I. Editio decima,
458 reformata Salvius Holmiae 4 + 824 pp.
- 459 Longcore J.E., Pessier A.P., Nichols D.K. 1999. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp.
460 nov., a Chytrid Pathogenic to Amphibians. *Mycologia* 91:219. doi: 10.2307/3761366
- 461 Lutz A. 1926. Observações sobre batrachios brasileiros. Parte I: O gênero *Leptodactylus*
462 Fitzinger. Observations on brasilian batrachians. Part I: The genus *Leptodactylus*.
463 *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 19 (2): 139-174
- 464 Lutz A. 1930. Segunda memória sobre espécies brasileiras do gênero *Leptodactylus*, incluindo
465 outras aliadas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 23 (1): 1-34, 5pls.
- 466 Magalhães F.M., Loebmann D., Kokubum M.N.C., Haddad C.F.B., Garda A.A. 2014. A new
467 species of *Pseudopaludicola* (Anura: Leptodactylidae: Leiuperinae) from northeastern
468 Brazil. *Herpetologica* 70: 77–88. doi: 10.1655/HERPETOLOGICA-D-13-00054
- 469 Mângia S., Koroiva R., Nunes P.M.S., Roberto I.J., Ávila R.W., Sant’Anna A.C., ... Garda, A.A.
470 2018. A New Species of *Proceratophrys* (Amphibia: Anura: Odontophrynidae) from the
471 Araripe Plateau, Ceará State, Northeastern Brazil. *Herpetologica* 74:255–268. doi:
472 10.1655/Herpetologica-D-16-00084.1
- 473 Martel A., Spitzen-Van Der Sluijs A., Blooi M., Bert W., Ducatelle R., Fisher M. C., ...
474 Pasmans, F. 2013. *Batrachochytrium salamandrivorans* sp. nov. causes lethal
475 chytridiomycosis in amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*
476 *United States of America* 15325–15329. doi: 10.1073/pnas.1307356110
- 477 Mesquita A.F.C., Lambertini C., Lyra M., Malagoli L.R., James T.Y., Toledo L.F., ... Becker,
478 C.G. 2017. Low resistance to chytridiomycosis in direct-developing amphibians. *Scientific*

- 479 *Reports* 1–7. doi: 10.1038/s41598-017-16425-y
- 480 Miranda-Ribeiro A. 1920. Os Engystomatideos do Museu Paulista (com um genero e tres
481 especies novos). *Revista do Museu Paulista* 12, 280–288
- 482 Miranda-Ribeiro A. 1926. Notas para servirem ao estudo dos Gymnobatrachios (Anura)
483 Brasileiros. *Arquivos do Museu Nacional*, Rio de Janeiro 27: 1-227
- 484 Miranda-Ribeiro A. 1937. Espécies Novas do Gênero “Stombus” da Série de Appendices
485 Oculares Reduzidos. *O Campo* 8 (88), 24
- 486 Müller F. 1883. Dritter Nachtrag. Katalog der herpetologischen Sammlung des Basler
487 Museums. *Basel, Birkhäuser* 7, 274-297. doi:10.5962/bhl.part.2387
- 488 Peters W.C.H. 1872. Über eine Sammlung von Batrachiern aus Neu Freiburg in Brasilien.
489 Monatsberichte der Königlichen Preussische Akademie des Wissenschaften zu Berlin 1872:
490 680–684
- 491 Ramalho A.C. 2015. Correlatos ecológicos da quitridiomicose em anuros do Cerrado. v, 53 f., il.
492 Ph.D. Universidade de Brasília, Brasília.
- 493 Rivero J.A. 1971. Tres nuevos records y una nueva especie de anfibios de Venezuela.
494 *Caribbean Journal of Science* vol. 11, p. 1-9. doi: 10.1590/1519-6984.22912
- 495 Roberto I.J., Loebmann D. 2016. Composition, distribution patterns, and conservation priority
496 areas for the herpetofauna of the state of Ceará, northeastern Brazil. *Salamandra* 52:134–
497 152.
- 498 Roberto I.J., Loebmann D., Lyra M.L., Haddad C.F.B., Ávila R.W. 2022. A new species of
499 *Pristimantis* Jiménez de la Espada, 1870 (Anura: Strabomantidae) from the “Brejos de
500 Altitude” in Northeast Brazil. *Zootaxa* 5100:521–540.
- 501 Rodriguez D., Becker C.G., Pupin N.C., Haddad C.F.B., Zamudio K.R. 2014. Long-term
502 endemism of two highly divergent lineages of the amphibian-killing fungus in the Atlantic
503 Forest of Brazil. *Molecular Ecology* 23:774–787. doi: 10.1111/mec.12615

- 504 Rosenblum E.B., James T.Y., Zamudio K.R., Poorten T.J., Ilut D., Rodriguez D., ... Stajich, J.E.
505 2013. Complex history of the amphibian-killing chytrid fungus revealed with genome
506 resequencing data. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 9385–9390. doi:
507 10.1073/pnas.1300130110
- 508 Scheele B.C., Pasmans F., Skerratt L.F., Berger L., Martel A., Beukema W., ... Canessa, S.
509 2019. Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity.
510 *Science* 1459–1463. doi: 10.1126/science.aav0379
- 511 Schloegel L.M., Toledo L.F., Longcore J.E., Greenspan S.E., Vieira C.A., Lee M., ... James,
512 T.Y. 2012. Novel, panzootic and hybrid genotypes of amphibian chytridiomycosis
513 associated with the bullfrog trade. *Molecular Ecology* 5162–5177. doi: 10.1111/j.1365-
514 294X.2012.05710.x
- 515 Schneider J.G. 1799. *Historiae amphibiorum naturalis et literariae. Fasciculus primus continens*
516 *ranas, calamitas, bufones, salamandras et hydros in genera et species descriptos notisque*
517 *suis distinctos. Frommann, Ienae, xiii + 264 + 1 pp. + 1 pl.*
- 518 Segalla M.V., Berneck B., Canedo C., Caramaschi U., Cruz C.A.G., Garcia P.C.A., ... Langone,
519 J.A. 2021. List of Brazilian Amphibians. *Herpetologia Brasileira* 121-216. doi:
520 10.5281/zenodo.4716176
- 521 Shuman-Goodier M.E., Diaz M.I., Almazan M.L., Singleton G.R., Hadi B.A.R., Propper C.R.
522 2019. Ecosystem hero and villain: Native frog consumes rice pests, while the invasive cane
523 toad feasts on beneficial arthropods. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 279:100–
524 108. doi: 10.1016/j.agee.2019.04.008
- 525 Silva J.M.C., Barbosa L.C.F., Leal I.R., Tabarelli M. 2017. The Caatinga: Understanding the
526 Challenges. In: Silva J.M.C., Leal I.R., Tabarelli M. (Eds), *Caatinga* 3-19. doi:
527 10.1007/978-3-319-68339-3_1
- 528 Steindachner F. 1864. *Batrachologische Mittheilungen. Verhandlungen des Zoologisch-*

- 529 *Botanischen Vereins in Wien* 14, 239–288
- 530 Silvano D., Borges-Nojosa D. 2004. *Adelophryne maranguapensis*. The IUCN Red List of
531 Threatened Species 2004, 2004: T56302A11452757. (13 April 2021). Accessible at
532 <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2004.RLTS.T56302A11452757>
- 533 Spix J.B. 1824. *Animalia Nova sive species novæ Testudinum et Ranarum, quas in itinere per*
534 *Brasiliam annis MDCCCXVII–MDCCCXX jussu et auspices Maximiliani Josephi I*
535 *Bavariae Regis. Franc. Seraph, Hubschmanni, Monachii* iv + 53 pp. doi:
536 10.5962/bhl.title.3665
- 537 Stuart S.N. 2004. Status and Trends of Amphibian Declines and Extinctions Worldwide.
538 *Science* 1783–1786. doi:10.1126/science.1103538
- 539 Valencia-Aguilar A., Ruano-Fajardo G., Lambertini C., Da Silva Leite D., Toledo L., Mott T.
540 2015. Chytrid fungus acts as a generalist pathogen infecting species-rich amphibian
541 families in Brazilian rainforests. *Diseases of Aquatic Organisms* 65–77. doi:
542 10.3354/dao02845
- 543 Voyles J., Young S., Berger L., Campbell C., Voyles W.F., Dinudom A., ... Speare, R.
544 2009. Pathogenesis of Chytridiomycosis, a Cause of Catastrophic Amphibian Declines.
545 *Science* 582–585. doi:10.1126/science.1176765
- 546 Wilson I.G. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ*
547 *Microbiol* 63:3741–3751. doi: 10.1128/aem.63.10.3741-3751.1997
- 548 Woodhams D.C., Alford R.A., Antwis R.E., Archer H., Becker M.H., Belden L.K., ...
549 Mckenzie, V. 2015. Antifungal isolates database of amphibian skin-associated bacteria and
550 function against emerging fungal pathogens. *Ecology* 595–595. doi: 10.1890/14-1837.1
- 551 Zipkin E.F., Drenzo G.V., Ray J.M., Rossman S., Lips K.R. 2020. Tropical snake diversity
552 collapses after widespread amphibian loss. *Science* 367:814–816. doi:
553 10.1126/science.aay5733

554

555

TABLE LEGENDS

556

557 Table 1. Sampled anuran species and their respective taxonomic families and sampling sites.

558 (NC) represents a species not collected on site, (+) represents a species that tested positive for

559 *Batrachochytrium dendrobatidis* at the sampling site, and (-) represents a species that tested

560 negative for *Bd*.

561

562 Table 2. Anuran species that presented *Batrachochytrium dendrobatidis*-positive individuals

563 in the present study, with their distribution areas, Biome/Vegetation of occurrence and

564 conservation status according to the IUCN (2021), Source: (Frost 2021).

565

566 Table 3. Species most related in GenBank with the consensus sequences related to 5.8S rRNA

567 obtained from samples CS11, CS13, FB02, PA27, PI01 and CA18. CS = Campos Sales, FB =

568 Farias Brito, PA = Monte Alegre PNHR, PI = Ibiapaba Plateau, CA = Araripe Plateau.

- 1 Table 1. Sampled anuran species and their respective taxonomic families and sampling sites. (NC) represents a species not collected on site, (+) represents a
 2 species that tested positive for *Batrachochytrium dendrobatidis* at the sampling site, and (-) represents a species that tested negative for *Bd*.

Family	Species	Campos Sales	Araripe Plateau	Farias Brito	Ibiapaba Plateau	PNHR Monte Alegre	Maranguape
Bufonidae	<i>Rhinella diptycha</i> (Cope, 1862)	-	+	NC	+	-	-
	<i>Rhinella granulosa</i> (Spix, 1824)	-	-	NC	-	-	NC
Craugastoridae	<i>Pristimantis relictus</i> (Roberto, Loebmann, Lyra, Haddad and Ávila, 2022)	NC	NC	NC	+	-	-
	<i>Adelophryne maranguapensis</i> (Hoogmoed, Borges and Cascon 1994)	NC	NC	NC	NC	NC	-
Eleutherodactylidae		NC	NC	NC	NC	NC	-
Hylidae	<i>Boana raniceps</i> (Cope, 1862)	NC	NC	+	+	NC	-
	<i>Corythomantis greeningi</i> (Boulenger, 1896)	NC	NC	NC	+	NC	NC
	<i>Dendropsophus minusculus</i> (Rivero, 1971)	NC	NC	NC	NC	-	-
	<i>Dendropsophus minutus</i> (Peters, 1872)	NC	+	NC	-	+	-
	<i>Dendropsophus nanus</i> (Boulenger, 1889)	NC	NC	+	+	NC	NC
	<i>Dendropsophus soaresi</i> (Caramaschi and Jim, 1983)	+	NC	NC	-	NC	NC
	<i>Scinax x-signatus</i> (Spix, 1824)	-	+	+	-	+	NC
	<i>Trachycephalus typhonius</i> (Linnaeus, 1758)	NC	NC	NC	NC	NC	-
Leptodactylidae	<i>Adenomera juikitam</i> (Carvalho and Giaretta, 2013)	NC	+	NC	NC	-	-
	<i>Leptodactylus fuscus</i> (Schneider, 1799)	+	NC	+	NC	-	NC
	<i>Leptodactylus macrosternum</i> (Miranda-Ribeiro, 1926)	+	NC	+	-	NC	-

	<i>Leptodactylus mystaceus</i> (Spix, 1824)	NC	NC	NC	NC	+	-
	<i>Leptodactylus troglodytes</i> (Lutz, 1926)	+	-	NC	+	NC	NC
	<i>Leptodactylus vastus</i> (Lutz, 1930)	NC	-	NC	NC	+	-
	<i>Physalaemus albifrons</i> (Spix, 1824)	+	NC	-	NC	NC	NC
	<i>Physalaemus cicada</i> (Bokermann, 1966)	+	NC	NC	NC	NC	NC
	<i>Physalaemus cuvieri</i> (Fitzinger, 1826)	NC	+	+	-	+	+
	<i>Pseudopaludicola mystacalis</i> (Cope, 1887)	NC	NC	+	NC	NC	NC
	<i>Pseudopaludicola pocoto</i> (Magalhães, Loebmann, Kokubum, Haddad and Garda, 2014)	-	NC	NC	NC	NC	NC
Microhylidae	<i>Elachistocleis cesarii</i> (Miranda-Ribeiro, 1920)	NC	NC	NC	NC	-	NC
Odontophrynidae	<i>Proceratophrys ararype</i> (Mângia, Koroiva, Nunes, Roberto, Ávila, Sant'Anna, Santana and Garda, 2018)	NC	+	NC	NC	NC	NC
	<i>Proceratophrys cristiceps</i> (Müller, 1883)	NC	NC	NC	-	-	-
	<i>Proceratophrys renalis</i> (Miranda-Ribeiro, 1920)	NC	NC	NC	NC	NC	-
Phyllomedusidae	<i>Pithecopus gonzagai</i> (Andrade, Haga, Ferreira, Recco-Pimentel, Toledo and Bruschi, 2020)	+	NC	NC	-	NC	NC
Total of sampled species		11	9	8	17	13	14

Table 2. Anuran species that presented *Batrachochytrium dendrobatidis*-positive individuals in the present study, with their distribution areas, Biome/Vegetation of occurrence and conservation status according to the IUCN (2021), Source: (Frost 2021).

Species	Distribution	Biome/Vegetation	IUCN
<i>Rhinella diptycha</i>	Pará, Northeast of Brazil south to Argentina, Uruguay. Bolivia and Paraguay	Wet Forests/Cerrado/Caatinga	Least Concern
<i>Pristimantis relictus</i>	Northeastern Brazil	Endemic to Wet Forests in Altitudinal “Brejos”	Not on the IUCN list
<i>Boana raniceps</i>	Amazonian Colombia, Venezuela, French Guiana, eastern Brazil, Ceará, Paraguay, northern Argentina and eastern Bolivia	Wet Forests/Cerrado/Caatinga	Least Concern
<i>Corythomantis greeningi</i>	Northeastern Brazil. Tocantins and Goiás	Wet Forests/Cerrado/Caatinga	Least Concern
<i>Dendropsophus minutus</i>	South America east of the Andes, from Venezuela and Guyanas southwards to Argentina	Wet Forests/Cerrado/Caatinga	Least Concern
<i>Dendropsophus nanus</i>	Northern and Northeastern Brazil towards South to Argentina, Paraguay and Bolivia	Wet Forests/Cerrado/Caatinga	Least Concern
<i>Dendropsophus soaresi</i>	Northeastern Brazil and Minas Gerais	Wet Forests/Cerrado/Caatinga	Least Concern
<i>Scinax x-signatus</i>	Colombia, Venezuela, Guyana, Suriname and Northeast, Southeast and South Brazil	Wet Forests/Cerrado/Caatinga	Least Concern
<i>Adenomera juikitam</i>	Amazon and Northeastern Brazil Altitudinal “Brejos”	Wet Forests	Least Concern
<i>Leptodactylus fuscus</i>	Panama and South America east of the Andes to northern Argentina	Wet Forests/Cerrado/Caatinga	Least Concern
<i>Leptodactylus macrosternum</i>	South America, from the Amazon region to northern Argentina	Wet Forests/Cerrado/Caatinga	Least Concern
<i>Leptodactylus mystaceus</i>	Amazon region of South America. Altitudinal “brejos” in northeast Brazil. Minas Gerais, São Paulo and Paraná in the Atlantic Forest area	Wet Forests/Cerrado	Least Concern
<i>Leptodactylus troglodytes</i>	Northeastern Brazil, Minas Gerais and Goiás	Wet Forests/Cerrado/Caatinga	Least Concern

<i>Leptodactylus vastus</i>	Northeastern Brazil	Wet Forests/Cerrado/Caatinga	Least Concern
<i>Physalaemus albifrons</i>	Northeastern Brazil and Minas Gerais	Caatinga and Cerrado	Least Concern
<i>Physalaemus cicada</i>	Northeastern Brazil and Minas Gerais	Caatinga and Cerrado transition zones	Least Concern
<i>Physalaemus cuvieri</i>	Northeastern, Center and Southern Brazil. Argentina, Paraguay, Bolivia and Venezuela	Wet Forests/Cerrado/Caatinga	Least Concern
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Northeastern, Southeastern and South Brazil. Argentina and Paraguay	Altitudinal “Brejos”/Wet Forests	Least Concern
<i>Proceratophrys ararype</i>	Chapada do Araripe in Ceará State, Northeast Brazil	Wet Forests in Altitudinal “Brejos”	Not on the IUCN list
<i>Pithecopus gonzagai</i>	Northeastern Brazil, north of the São Francisco river	Wet Forests/Cerrado and Caatinga	Least Concern

Table 3. Species most related in GenBank with the consensus sequences related to 5.8S rRNA obtained from samples CS11, CS13, FB02, PA27, PI01 and CA18. CS = Campos Sales, FB = Farias Brito, PA = Monte Alegre PNHR, PI = Ibiapaba Plateau, CA = Araripe Plateau.

Samples	pb	Most related species on GenBank (accession number)	Identity	Coverage	E-value
CS11	292	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> (HQ176489.1)	99.00%	100%	3.00E-147
CS13	293	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> (JQ582937.1)	99.00%	100%	6.00E-130
FB02	296	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> (JQ582937.1)	100.00%	100%	1.00E-151
PA27	291	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> (JN870749.1)	99.00%	92%	2.00E-144
PI01	285	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> (JQ582940.1)	99.85%	99%	1.00E-141
CA18	295	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> (JQ582937.1)	100.00%	97%	3.00E-147

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Map of the state of Ceará, Brazil, indicating the sampling locations investigated herein. The circle diameters are proportional to the percentage of *Bd-contaminated* species detected at each location. Number of species sampled/number and percentage of species with positive results: 1- Campos Sales 11/7 (63.64%). 2- Farias Brito 8/7 (87.5%). 3- Araripe Plateau 9/6 (66.6%). 4- Ibiapaba Plateau 14/6 (42.96%). 5- Maranguape 14/1 (7.14%). 6- Monte Alegre 13/5 (38.46%).

Figure 2. Percentage of *Bd* infections within locations where the study was carried out.