



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SISTEMÁTICA, USO E CONSERVAÇÃO**  
**DA BIODIVERSIDADE**

**VANESSA ARIANE SILVA DA COSTA**

**INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE *Pseudomonas putida* NO BACTERIOMA DO NINHO**  
**DE ESPUMA DE *Leptodactylus vastus*: UMA NOVA ABORDAGEM COM POTENCIAL**  
**PARA A CONSERVAÇÃO DE ANUROS**

**FORTALEZA**

**2024**

VANESSA ARIANE SILVA DA COSTA

INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE *Pseudomonas putida* NO BACTERIOMA DO NINHO DE  
ESPUMA DE *Leptodactylus vastus*: UMA NOVA ABORDAGEM COM POTENCIAL PARA  
A CONSERVAÇÃO DE ANUROS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sistemática, Uso e Conservação da Biodiversidade, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre. Linha de Pesquisa: Prospecção e Uso Sustentável da Biodiversidade.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Denise Cavalcante Hissa

FORTALEZA

2024

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)

---

- C876i Costa, Vanessa Ariane Silva da.  
Influência da adição de *Pseudomonas putida* no bacterioma do ninho de espuma de *Leptodactylus vastus*: uma nova abordagem com potencial para a conservação de anuros / Vanessa Ariane Silva da Costa. – 2024.  
93 f.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Sistemática, Uso e Conservação da Biodiversidade, Fortaleza, 2024.  
Orientação: Prof. Dr. Denise Cavalcante Hissa.
1. Probióticos. 2. Bioaugmentação. 3. Metagenômica. 4. Quitridiomiose. 5. Batrachochytrium dendrobatidis. I. Título.

CDD 578.7

---

VANESSA ARIANE SILVA DA COSTA

INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE *Pseudomonas putida* NO BACTERIOMA DO NINHO DE  
ESPUMA DE *Leptodactylus vastus*: UMA NOVA ABORDAGEM COM POTENCIAL PARA  
A CONSERVAÇÃO DE ANUROS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sistemática, Uso e Conservação da Biodiversidade, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre. Linha de Pesquisa: Prospecção e Uso Sustentável da Biodiversidade.

Aprovada em 02/04/2024.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Denise Cavalcante Hissa (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dr<sup>a</sup>. Tallita Cruz Lopes Tavares Normando  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dr. Andrés Eduardo Brunetti  
Instituto de Biología Subtropical, Universidade Nacional de Misiones - CONICET

Aos meus pais, Marinha Guimarães e Erineu Costa e a meu irmão Alef Guimarães.

## AGRADECIMENTOS

Quero primeiramente agradecer aos meus pais e meu irmão por todo o amor e apoio nesses anos de mestrado. Vocês foram essenciais para minha jornada acadêmica.

Agradeço a minha orientadora, **Profa. Dra. Denise Hissa** que me acolheu em seu laboratório. Agradeço por todo o ensinamento, paciência e dedicação em me formar como cientista. Obrigada por sempre se preocupar com meu bem-estar e por me fazer enxergar potencial em tudo que fazemos. Sua orientação foi extremamente valiosa e a tenho como modelo a ser seguido.

Agradeço a família Lembiotech, em especial à professora **Profa. Dra. Vânia Melo**, por toda sua mentoria, por ceder tão generosamente o espaço de seu laboratório para que nossos trabalhos sejam concretizados. Agradeço também a meus amigos e colegas de laboratório, a **Talita Camila** por sua força e alegria que contagia o ambiente, a **Mimi** que é parte fundamental do laboratório e sem ela tudo desanda. A minha amiga **Lívia**, pela alegria e todo companheirismo nos momentos mais difíceis. Ao meu amigo **João Victor** por toda a parceria nessa caminhada desde a graduação. Ao **Saulo** por todas as brincadeiras e **Cris** por ser parte fundamental do laboratório e ser exemplo de bondade e dedicação.

Aos meus companheiros do Largen. Ao **Paulo** que sempre esteve disposto a transmitir seu conhecimento na pesquisa, e que deu início a nosso lindo projeto. Ao **Eric**, meu “primeiro IC” que foi uma das grandes surpresas desse período e que teve uma evolução gigante, torço muito por você. Ao **Bruno** por todos os momentos em campo, nas disciplinas e no office. Ao **Victor** por ter me mergulhado no mundo da herpeto, por sempre acreditar em mim e por não ter medido esforços para me ajudar em diversos momentos, sem você esse trabalho não seria possível.

Agradeço a Central de Genômica e Bioinformática (CeGenBio) da Universidade Federal do Ceará, em especial a **Andrea** e **Maísa**, pelos seus esforços que possibilitaram a realização desse trabalho.

Agradeço ao Bioprospec, em especial a minha “Best” **Luiz**, não só pelo apoio técnico durante toda minha pesquisa, mas por todo carinho, pelas plantas e pelos cursos dados em conjunto.

Agradeço a professora **Profa. Dra. Erika Mota**, que me acompanhou desde a graduação enquanto Petiana, e que se manteve comigo em todo esse período, participando da minha qualificação, me orientando no Estágio à Docência e nesse um ano maravilhoso de Propag. Além de mentora a considero como amiga e exemplo de profissional.

Agradeço à equipe do Nurof por toda a ajuda na procura de ninhos de espuma no Campus.

Agradeço as minhas amigas **Andreza, Victória, Cath, Vanessa, Bea e Sofia** por manter o squad vivo e por não deixar nossa amizade morrer mesmo com todo o distanciamento que a vida adulta traz. Agradeço a **Angela e Amanda**, por estarem comigo a tantos anos e por terem presenciado tantas versões de mim, dando apoio em todos os momentos. Agradeço a **Jennifer** por todo amor e apoio em todos esses anos, pela paciência, por sempre torcer por mim e acreditar no meu potencial.

Agradeço ao LaHNAB, em especial ao **Prof. Dr. Luís Felipe Toledo** e a **Luisa Ribeiro** por terem sido tão receptivos na minha passagem por Campinas, obrigada por todo conhecimento transmitido.

E por fim agradeço ao meu programa de pós-graduação e à **Funcap** pela bolsa, que me permitiu exercer nesses dois anos a função que tanto amo, que é pesquisar. E agradeço aos órgãos de fomento **Capes e CNPq** pelos financiamentos de projetos que possibilitaram a realização desse e de muitos outros trabalhos. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Resignado, ouviu a gota, grossa, pesada, perfeita, que golpeava no outro mundo, no mundo equivocado e absurdo dos animais racionais.”

Gabriel García Márquez



## RESUMO

Os anuros são o grupo de vertebrados que se encontram atualmente mais ameaçados devido a fatores como mudanças climáticas, fragmentação, perda de habitat e doenças infecciosas como é o caso da quitridiomicose causada pelo fungo patogênico *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd). Tendo em vista a severidade dessa doença, diversos estudos e tentativas de mitigação vêm sendo pleiteadas. Até o momento, a abordagem considerada mais promissora é a introdução na pele de anuros de probióticos capazes de produzir metabólitos anti-Bd previamente isolados da pele desses animais. No entanto a presença de bactérias com atividade anti-Bd também pode ser detectada em outros locais como em ninhos de espumas, que são estruturas altamente complexas que servem de proteção para a prole. Apesar de sua microbiota ainda pouco caracterizada, diversos indícios mostram que parte do microbioma do ninho pode compor o microbioma da pele de girinos e jovens adultos, o que gera possibilidades de novas formas de utilização de probióticos. Dessa forma, o presente projeto propõe analisar o potencial antifúngico e anti-Bd de três bactérias provenientes de ninhos de espuma, do gênero *Pseudomonas*, já associado na literatura como possuindo ação anti-Bd e o impacto da inoculação de um desses microrganismos no bacterioma de ninhos de espuma de *Leptodactylus vastus*, a fim de dar à luz a novas possibilidades de utilização de probióticos anti-Bd na natureza. Para isso, as três cepas de *Pseudomonas* tiveram seus genomas sequenciados e a identificação a nível de espécie foi realizada utilizando genes *housekeeping*. O genoma das cepas foi avaliado quanto a presença de genes relacionados à atividade antifúngica, virulência e patogenicidade. Uma das cepas foi utilizada para realização de um ensaio de bioaugmentação *in vitro* em ninhos de espuma *in natura* de *L. vastus*. Para a avaliação do ensaio foram preparadas bibliotecas de amplicons rRNA 16s das amostras de 1 e 10 dias. As bibliotecas foram sequenciadas por NGS e o efeito da adição da bactéria na comunidade bacteriana foi avaliado. As três cepas sequenciadas foram determinadas como sendo *Pseudomonas putida*. Não foi possível detectar genes relacionados à resistência a antibióticos e à patogenicidade. Com relação à atividade antifúngica o isolado *P. putida* P119 apresentou o maior potencial genético. Não foi observado mudanças significativas na estrutura da comunidade bacteriana com a adição da bactéria, entretanto detectou-se uma mudança no perfil de interação de redes, em que a P119 demonstrou compatibilidade e participação com a comunidade bacteriana do ninho. Esse é um primeiro estudo voltado para compreender a resposta de ninhos de espuma à intervenção de introdução de um probiótico, ampliando o leque de possibilidades de profilaxias da quitridiomicose.

**Palavras-chave:** probióticos; bioaugmentação; metagenômica; quitridiomiose;  
*Batrachochytrium dendrobatidis*.

## ABSTRACT

Anurans are currently the most threatened group of vertebrates due to factors such as climate change, fragmentation, habitat loss, and infectious diseases, such as chytridiomycosis caused by the pathogenic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd). Given the severity of this disease, various studies and mitigation efforts have been pursued. So far, the most promising approach is considered to be the introduction of probiotics capable of producing anti-Bd metabolites into the skin of anurans, previously isolated from the skin of these animals. However, bacteria with anti-Bd activity can also be found in other locations such as foam nests, which are highly complex structures that serve as protection for offspring. Despite their poorly characterized microbiota, several indications show that part of the nest microbiome may compose the skin microbiome of tadpoles and young adults, which opens up possibilities for new uses of probiotics. Thus, this project proposes to analyze the antifungal and anti-Bd potential of three bacteria from foam nests, belonging to the genus *Pseudomonas*, already associated in the literature with anti-Bd action, and the impact of inoculating one of these microorganisms on the bacteriome of foam nests of *Leptodactylus vastus*, in order to shed light on new possibilities for the use of anti-Bd probiotics in nature. For this, the genomes of the three *Pseudomonas* strains were sequenced, and species-level identification was performed using housekeeping genes. The strain's genomes were evaluated for the presence of genes related to antifungal activity, virulence, and pathogenicity. One of the strains was used to perform an *in vitro* bioaugmentation assay in natural foam nests of *L. vastus*. For the assay evaluation, 16S rRNA amplicon libraries of the samples from 1 and 10 days were prepared. The libraries were sequenced by NGS, and the effect of adding the bacteria on the bacterial community was assessed. The three sequenced strains were determined to be *Pseudomonas putida*. It was not possible to detect genes related to antibiotic resistance and pathogenicity. Regarding antifungal activity, the *P. putida* P119 isolate showed the highest genetic potential. No significant changes in the structure of the bacterial community were observed with the addition of the bacteria; however, a change in the network interaction profile was detected, in which P119 demonstrated compatibility and participation with the nest bacterial community. This is a first study aimed at understanding the response of foam nests to the introduction of a probiotic, expanding the range of chytridiomycosis prophylaxis possibilities.

**Keywords:** probiotics; bioaugmentation; metagenomics; chytridiomycosis; *Batrachochytrium dendrobatidis*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Distribuição de 2.873 espécies de anfíbios globalmente ameaçadas .....	22
Figura 2	– Cronologia das declinações de anfíbios associadas à quitriodomicose .....	23
Figura 3	– Ciclo de vida do fungo <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> .....	24
Figura 4	– Evolução e distribuição das linhagens de Bd pelo mundo .....	25
Figura 5	– Severidade de declínios populacionais de anfíbios nos diferentes continentes continental .....	26
Figura 6	– Principais fatores que influenciam a diversidade e função da microbiota da pele dos anfíbios .....	28
Figura 7	– Mecanismos de ação de probióticos anti-Bd .....	31
Figura 8	– Secções verticais de ninhos de bolhas e espuma produzidos por anuros .....	33
Figura 9	– (A) Casal de anuros da espécie <i>Pleurodema borelli</i> produzindo ninho de espuma no momento do amplexo. (B) Ninho de <i>Leptodactylus latrans</i> contendo os ovos depositados .....	33
Figura 10	– Mapa do local de coleta no Campus do Pici – Fortaleza (CE) .....	39
Figura 11	– Ninho de espuma da espécie <i>Leptodactylus vastus</i> coletado no Campus do Pici, Fortaleza-Ce, Brasil .....	40
Figura 12	– Placa de 12 poços utilizada no ensaio de bioaugmentação <i>in vitro</i> em ninhos de espuma .....	44
Figura 13	– Qualidade média por base dos dados brutos e processados da bactéria <i>Pseudomonas</i> sp. P119 .....	49
Figura 14	– Qualidade média por base dos dados brutos e processados da bactéria <i>Pseudomonas</i> sp. P137 .....	49
Figura 15	– Qualidade média por base dos dados brutos e processados da bactéria <i>Pseudomonas</i> sp. B8 .....	50

Figura 16 – Comprimentos dos <i>scaffolds</i> gerados na montagem do genoma da bactéria <i>Pseudomonas</i> sp. P119 .....	50
Figura 17 – Comprimentos dos <i>scaffolds</i> gerados na montagem do genoma da bactéria <i>Pseudomonas</i> sp. P137 .....	51
Figura 18 – Comprimentos dos <i>scaffolds</i> gerados na montagem do genoma da bactéria <i>Pseudomonas</i> sp. B8 .....	51
Figura 19 – Árvore filogenética com as principais linhagens de <i>Pseudomonas</i> e a cepa P119, P137 e B8, montada a partir da análise concatenada dos genes <i>rpoB</i> – <i>gyrB</i> – rRNA 16s .....	52
Figura 20 – Comparação genômica de um genoma de referência de <i>Pseudomonas putida</i> NBRC 14164 contra o genoma das cepas P119, P137 e B8 .....	53
Figura 21 – Anotação gênica de <i>Pseudomonas putida</i> P119 mostrando genes de interesse .....	54
Figura 22 – Anotação gênica de <i>Pseudomonas putida</i> P137 mostrando genes de interesse .....	55
Figura 23 – Anotação gênica de <i>Pseudomonas putida</i> B8 mostrando genes de interesse .....	56
Figura 24 – Curvas de rarefação para as variantes de sequência de amplicon (ASVs) referente às amostras do teste de bioaumentação <i>in vitro</i> em ninho de espuma .....	57
Figura 25 – Índices de diversidade alfa referente aos tratamentos do teste de bioaumentação <i>in vitro</i> em ninho de espuma .....	58
Figura 26 – Índices de diversidade alfa referente aos tempos do teste de bioaumentação <i>in vitro</i> em ninho de espuma .....	59
Figura 27 – Diagrama de Venn de ASVs (Sequências Variáveis de Amplicon) associadas aos tratamentos do teste de bioaumentação <i>in vitro</i> em ninho de espuma .....	60
Figura 28 – Abundância relativa de ASVs de bactérias a nível de filo referente às amostras do teste de bioaumentação <i>in vitro</i> em ninho de espuma .....	61

Figura 29 – Abundância relativa de ASVs de bactérias a nível de gênero referente às amostras do teste de bioaumentação <i>in vitro</i> em ninho de espuma .....	64
Figura 30 – Análise diferencial de abundância a nível de gênero para as amostras em T1 .....	65
Figura 31 – Análise diferencial de abundância a nível de gênero para as amostras em T10 .....	66
Figura 32 – Dendrograma da análise de agrupamento UPGMA utilizando as Variantes de Sequências de Amplicon (ASVs) a nível de gênero bacteriano acima de 1 % de abundância relativa, ilustrando a relação as 12 amostras do ensaio de bioaumentação <i>in vitro</i> em ninhos de espuma .....	67
Figura 33 – Dendrograma da análise de agrupamento UPGMA utilizando as Variantes de Sequências de Amplicon (ASVs) a nível de gênero bacteriano abaixo de 1 % de abundância relativa, ilustrando a relação as 12 amostras do ensaio de bioaumentação <i>in vitro</i> em ninhos de espuma .....	68
Figura 34 – Análises de Coordenadas Principais (PCoA) de ASVs a nível de gênero, das 12 amostras analisadas .....	69
Figura 35 – Análises de Coordenadas Principais (PCoA) de ASVs a nível de gêneros (abundância < 1%) das 12 amostras analisadas .....	70
Figura 36 – Rede de interação bacteriana para os tratamentos do Ensaio de Bioaumentação <i>in vitro</i> em ninhos de espuma .....	71

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– <i>Pseudomonas</i> spp. com atividade inibitória contra Bd <i>in vitro</i> .....	37
Tabela 2	– Lista de metabólitos e genes buscados nos arquivos de anotação com atividade antifúngica e/ou anti-Bd .....	43
Tabela 3	– Cinco principais hits no BLAST para a identificação do espécime de girino do ninho de espuma coletado .....	47
Tabela 4	– Estatísticas da montagem genômica do isolado <i>Pseudomonas</i> sp. P119 .....	48
Tabela 5	– Estatísticas da montagem genômica do isolado <i>Pseudomonas</i> sp. P137 .....	48
Tabela 6	– Estatísticas da montagem genômica do isolado <i>Pseudomonas</i> sp. B8 .....	48
Tabela 7	– Genes relacionados à atividade antifúngica encontrados no genoma das cepas <i>Pseudomonas putida</i> P119, <i>Pseudomonas putida</i> P137 e <i>Pseudomonas putida</i> B8 .....	54
Tabela 8	– Riqueza e alfa diversidade de ASVs de bactérias referente ao teste de bioaugmentação <i>in vitro</i> em ninho de espuma de <i>L. vastus</i> .....	58
Tabela 9	– Abundância total, abundância relativa e média de abundância das amostras relativo ao gênero <i>Pseudomonas</i> no ensaio de Bioaugmentação em ninho de espuma de <i>L. vastus</i> .....	62
Tabela 10	– Propriedades das redes de interação bacteriana para os tratamentos do Ensaio de Bioaugmentação <i>in vitro</i> em ninhos de espuma <i>in natura</i> de <i>L. vastus</i> .....	70

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	18
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	21
2.1	Papel ambiental dos anfíbios e desafios para a sua conservação .....	21
2.2	O fungo <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> e sua atuação no declínio populacional dos anfíbios .....	23
2.3	A importância do microbioma na proteção contra patógenos e a bioaugmentação como forma de biorremediação da quitridiomiose .....	27
2.4	Ninhos de espuma, seu microbioma e importância na bioprospecção .....	32
2.5	O gênero <i>Pseudomonas</i> sp. como potencial fonte de bactérias anti-Bd .....	34
3	OBJETIVOS .....	38
3.1	Objetivos gerais .....	38
3.2	Objetivos específicos .....	38
4	MATERIAIS E MÉTODOS .....	39
4.1	Coleta de ninhos de espuma .....	39
4.2	Identificação de girinos .....	40
4.2.1	<i>Extração de DNA dos girinos e sequenciamento</i> .....	40
4.2.2	<i>Análises das sequências e identificação da espécie</i> .....	41
4.3	Sequenciamento genômico dos isolados P119, P137 e B8 .....	41
4.3.1	<i>Extração de DNA e sequenciamento</i> .....	41
4.3.2	<i>Montagem dos genomas</i> .....	42
4.4	Ensaio de bioaugmentação <i>in vitro</i> em ninhos de espuma e caracterização do bacterioma .....	43
4.4.1	<i>Teste em placa</i> .....	43
4.4.2	<i>Extração de DNA e sequenciamento</i> .....	44
4.4.3	<i>Processamento de dados</i> .....	45
4.4.4	<i>Análises estatísticas, alfa e beta diversidade</i> .....	46
4.4.5	<i>Análise de rede de interações microbianas (Network Analysis)</i> .....	46
5	RESULTADOS .....	47
5.1	Identificação da espécie do ninho de espuma .....	47
5.2	Genoma dos isolados P119, P137 e B8 .....	47
5.2.1	<i>Montagem dos genomas</i> .....	47



5.2.2	<i>Busca de genes antifúngicos e genes de patogenicidade</i> .....	53
5.3	<b>Ensaio de bioaugmentação <i>in vitro</i> em ninhos de espuma e caracterização do bacterioma</b> .....	56
5.3.1	<i>Estimativa de riqueza e diversidade bacteriana</i> .....	56
5.3.2	<i>Estrutura e composição da comunidade bacteriana</i> .....	60
5.3.3	<i>Beta diversidade da comunidade bacteriana</i> .....	66
5.3.4	<i>Análise de rede de interações microbianas (Network analysis)</i> .....	70
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	73
6.1	<b>Identificação molecular e potencial genômico dos isolados</b> .....	73
6.2	<b>Bacterioma de ninho de espuma de <i>L. vastus</i> após a adição da cepa <i>Pseudomonas putida</i> P119</b> .....	75
7	<b>CONCLUSÃO</b> .....	83
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	84

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente os anfíbios são considerados um dos grupos mais ameaçados de extinção. Diversos fatores como mudanças climáticas, perda e fragmentação de habitat além de doenças emergentes estão diretamente atrelados ao declínio populacional desse grupo (LUEDTKE *et al.*, 2023). Entre as doenças emergentes que afetam os anfíbios, podemos destacar a quitridiomicrose, que é causada pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd), que age na pele desses animais, causando hiperqueratinização e desequilíbrio hídrico na pele, o que está atrelado a mortalidade pela doença (VOYLES *et al.*, 2009). Estima-se que a quitridiomicrose já tenha ocasionado o declínio de 501 espécies e presumidamente a extinção de 90 (SCHEELE *et al.*, 2019), porém esses números podem estar atualmente subamostrados.

Os anuros são conhecidos por possuírem uma imensa diversidade de modos reprodutivos, dentre estes, o modo de reprodução por ninhos de espuma é bastante difundido, ocorrendo com grande frequência dentro dos 71 modos reprodutivos descritos para esse grupo. (NUNES-DE-ALMEIDA; HADDAD; TOLEDO, 2021). Essas estruturas reprodutivas podem ser depositadas (a depender da espécie) em corpos d'água, depressões ou buracos, troncos etc. (CRUMP, 2015). Esses ninhos, servem de proteção para os ovos e girinos contra dessecação, radiação, predação, dentre outras funções (GOULD, 2021). Estudos relacionados com a composição bioquímica dos ninhos de espuma, mostram uma predominância de proteínas, chamadas de ranaspuminas, e carboidratos; compondo uma bioestrutura bastante única na natureza (HISSA *et al.*, 2008; FLEMING *et al.*, 2009; COOPER *et al.*, 2017).

Além da composição bioquímica também foram realizados estudos sobre a microbiota associada a essas estruturas (HISSA *et al.*, 2008; CASTRO, 2019; MARTINS, 2020; BEZERRA, 2021; MCGRATH-BLASER *et al.*, 2021; MONTEIRO *et al.*, 2023) que mostraram uma seleção de microrganismos pelas condições únicas presentes nos ninhos, como composição bioquímica, umidade, aeração entre outros. No entanto ainda são necessários mais estudos que visem melhor entender a composição e o papel dessa microbiota, principalmente no que diz respeito à proteção contra patógenos.

Sabe-se que uma microbiota simbiote da pele de anfíbios pode desempenhar diversas funções para os seus hospedeiros, como a aquisição de nutrientes (DALE; MORAN, 2006) e proteção contra patógenos como Bd, através da produção de metabólitos secundários

(BRUCKER *et al.*, 2008). No entanto, ainda não é tão claro o papel da microbiota do ninho de espuma nas fases de desenvolvimento desses anuros.

Há indícios, no entanto, que microrganismos do ninho colonizam a pele desses indivíduos, mesmo que depois de adultos apareçam em menor proporção quando comparadas às adquiridas do ambiente (MCGRATH-BLASER *et al.*, 2021). Sabe-se que a estrutura da comunidade bacteriana antes da infecção pode prever os níveis de morbidade e mortalidade depois da infecção pelo fungo Bd (BECKER *et al.*, 2015a). Atualmente alguns microrganismos são relatados como possuindo uma ação anti-Bd, sendo alvos para a prospecção de medidas profiláticas contra a quitridiomiose. Muitos dos microrganismos com ação anti-Bd são encontrados, inclusive, de forma abundante na pele de muitas espécies de anfíbios anuros, como é o caso de cepas pertencentes ao gênero *Pseudomonas* (MYERS *et al.*, 2012).

Tendo isso em vista, diversos trabalhos utilizaram bactérias isoladas com capacidade anti-Bd *in vitro*, para testes *in vivo* em animais, a fim de avaliar se tratamentos com esses microrganismos seriam eficientes contra a infecção pelo Bd (HARRIS *et al.*, 2009; BECKER; HARRIS, 2010; MYERS *et al.*, 2012). Essa técnica é denominada de bioaugmentação, e tem como objetivo utilizar microrganismos com ação anti-Bd testada, como probióticos, aumentando a abundância desses microrganismos, geralmente na pele desses animais, promovendo assim uma ação protetora contra o fungo (BLETZ *et al.*, 2013).

Entre os trabalhos realizados para esse fim, vários mostraram resultados positivos (HARRIS *et al.*, 2009; BECKER; HARRIS, 2010; MULETZ WOLZ *et al.*, 2012; MYERS *et al.*, 2012; KUENEMAN *et al.*, 2016), com outros não observando uma proteção anti-Bd significativa, principalmente ao longo do tempo (BECKER *et al.*, 2011; KÜNG *et al.*, 2014), mostrando que ainda há muito o que se desvendar na busca por probióticos. No entanto, além de avaliar a eficiência desses probióticos utilizados, no que tange a sua ação anti-Bd, é necessário também avaliar sua segurança e os impactos que esses microrganismos podem causar no microbioma do hospedeiro.

De modo geral, faltam estudos acerca da composição da comunidade microbiana de ninhos de espuma, bem como do seu impacto na composição do microbioma da pele de girinos, jovens e adultos pós-metamórficos. Um entendimento mais aprofundado sobre o assunto e estudos utilizando microrganismos presentes nessas estruturas podem ser de grande importância na conservação desses indivíduos. Dessa forma, o presente projeto propõe analisar o impacto

da inoculação de bactérias do gênero *Pseudomonas*, já associadas na literatura como possuindo ação anti-Bd, no bacterioma de ninhos de espuma de *Leptodactylus vastus* Lutz, 1930, a fim de dar à luz a novas possibilidades de utilização de probióticos anti-Bd na natureza.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Papel ambiental dos anfíbios e desafios para a sua conservação

Os anfíbios são um grupo de vertebrados que irradiaram há milhares de anos e possuem características peculiares, como formas de vida bastante distintas sendo elas, em sua maioria, uma forma larval livre-natante e uma forma adulta terrestre, que exercem diferentes papéis ecológicos (LION *et al.*, 2019; SZÉKELY *et al.*, 2020). Os adultos possuem uma pele fina e mucosa, que auxilia na regulação térmica, hídrica, trocas gasosas (respiração cutânea) e imunidade (LARSEN, 2021; ROLLINS-SMITH, 2023). São animais ectotérmicos, ou seja, não são capazes de produzir seu próprio calor, dependendo assim da temperatura do ambiente. Todas essas características fazem dos anfíbios espécies únicas em termos ecológicos.

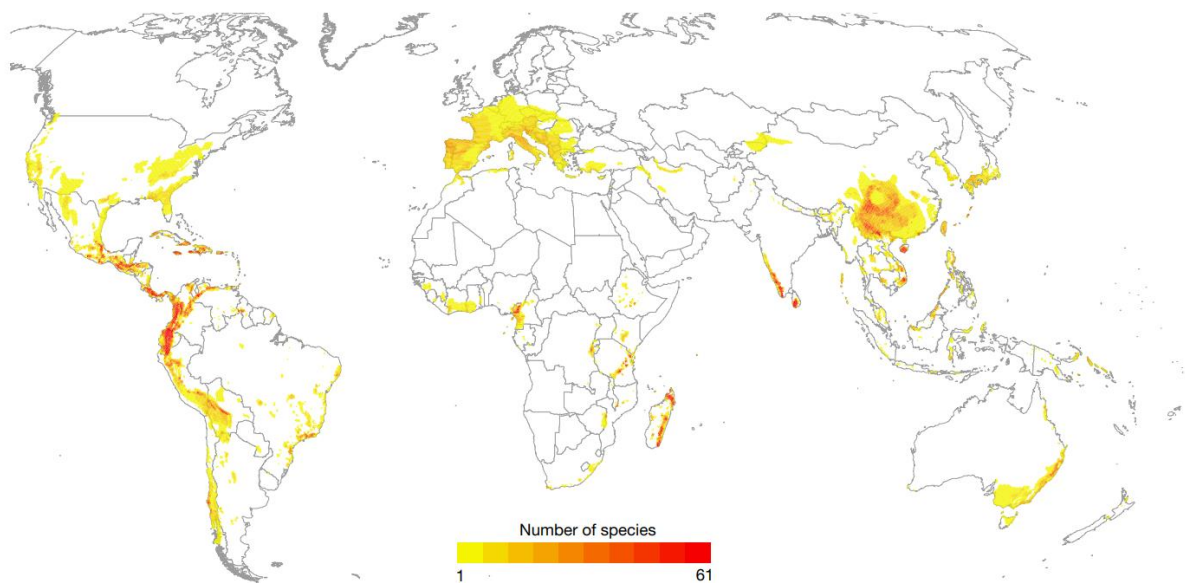
Os anfíbios podem ser divididos em três ordens, Gymnophiona ou Apoda (cecílias ou cobras-cegas), Urodela ou Caudata (salamandras), e Anura (sapos, rãs e pererecas. Atualmente, já foram descritas mais de 8.715 espécies, sendo cerca de 88% anuros, 9,5% caudatas e 2,5% gymnophionas (AmphibiaWeb, 2024). Só no Brasil podemos encontrar mais de 1.000 espécies de anfíbios, com novas espécies sendo descritas constantemente (STEIGERWALD *et al.*, 2021). Esses animais podem ser encontrados amplamente em quase todos os biomas do mundo, ocupando uma grande diversidade de habitats, existindo espécies semi-aquáticas, aquáticas, semi-arbóreas, arbóreas, terrestres, escansoriais e fossoriais (WELLS, 2019; BOLOCHIO *et al.*, 2020). Também podem ser encontrados em gradientes de elevação em diferentes partes do mundo, com considerável diversificação de nichos a depender da faixa altitudinal (ZHANG; LU, 2012; MOSKWIK, 2014; BOTTS; ERASMUS; ALEXANDER, 2015; STEIGERWALD *et al.*, 2021).

Por possuírem uma biologia tão única, esses animais podem exercer diversas funções no ambiente destacando-se a sua importância nas teias alimentares e processos ecossistêmicos, estando envolvidos em diversas dinâmicas ecológicas (PERRIN *et al.*, 2023). Por serem animais muito sensíveis a mudanças no ambiente e poluição por metais e diversos outros componentes, são também constantemente utilizados como indicadores de qualidade ambiental (TORNABENE *et al.*, 2023). Outros papéis desempenhados são a predação de vetores de doenças humanas e pragas agrícolas e importância farmacêutica devido a compostos antibacterianos, antivirais, antifúngicos, antiparasitários, anticâncer, antidiabéticos, anti-alzheimer, cardiotônicos, analgésicos, encontrados em secreções da pele desses animais, com

alto potencial terapêutico (MANS *et al.*, 2020; BARROS *et al.*, 2022; SPRINGBORN *et al.*, 2022; ZANNELLA *et al.*, 2022; PERRIN *et al.*, 2023).

Apesar de sua importância ecológica e econômica, o grupo encontra-se em constante declínio populacional. Dados da *International Union for Conservation of Nature* (IUCN, 2024), mostram que cerca de 41% dos anfíbios se encontram atualmente sob ameaça de extinção, maior número entre os vertebrados. As maiores causas de declínio populacional de espécies no Brasil e no mundo, estão ligadas à modificação de habitats, crescimento urbano e poluição (ICMBIO, 2018; LUEDTKE *et al.*, 2023). Outros fatores de ameaças são mudanças climáticas, superexploração, introdução de espécies invasoras e doenças emergentes (LUEDTKE *et al.*, 2023). No Brasil, a maior parte dessas espécies ameaçadas se encontra na região da Mata Atlântica (Figura 1), domínio fitofisionômico mais devastado nos últimos séculos, com efeitos também sobre sua fauna (BECKER *et al.*, 2007; LUEDTKE *et al.*, 2023).

**Figura 1** - Distribuição de 2.873 espécies de anfíbios globalmente ameaçadas.



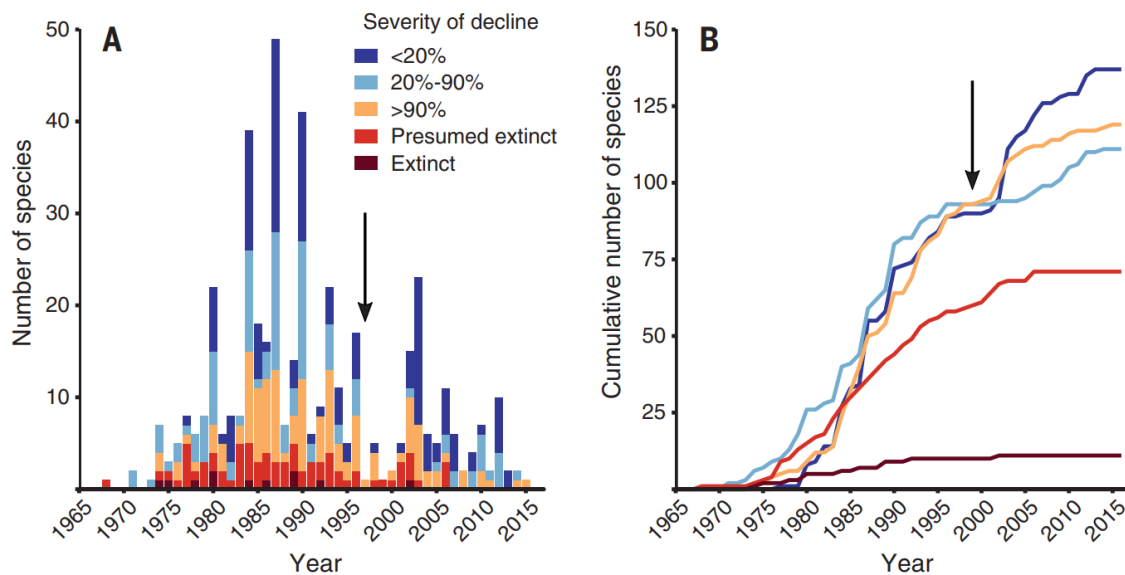
Fonte: Luedtke *et al.*, (2023).

Dentre todos os fatores de ameaças temos a disseminação de patógenos que causam doenças graves como uma das preocupações crescentes, quando falamos na conservação desse grupo. Alguns trabalhos demonstram também que fatores, como a fragmentação de habitats e poluição, aumentam mais ainda o risco de infecção, uma vez que essas ameaças diminuem a diversidade imunogenética dos animais, piorando o quadro de doenças, como é o caso da quitridiomiose (BELASEN *et al.*, 2019; JACINTO-MALDONADO *et al.*, 2023).

## 2.2 O fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* e sua atuação no declínio populacional dos anfíbios

A quitridiomiose é uma doença emergente que vem causando declínio nas comunidades de anfíbios desde o final do século passado (Figura 2) (BERGER *et al.*, 1998). Essa doença pode ser causada pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) ou *Batrachochytrium salamandrivorans*, o primeiro infectando majoritariamente anuros e o segundo aparentemente restrito a salamandras (SEWELL; LONGCORE; FISHER, 2021; STEGEN *et al.*, 2017).

**Figura 2** - Cronologia das declinações de anfíbios associadas à quitridiomiose.



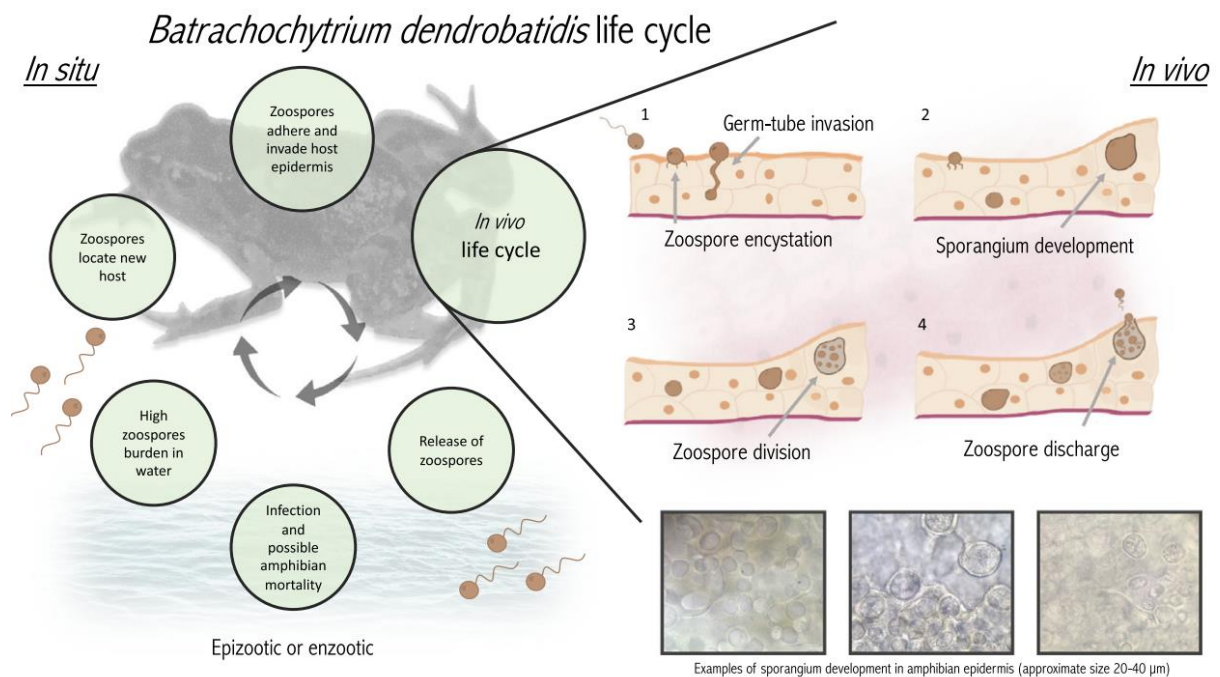
Fonte: Scheele *et al.*, (2019). (A) Declínios por ano. As barras indicam o número de declínios em um determinado ano, empilhados de acordo com a gravidade do declínio. Para espécies em que o ano exato do declínio é incerto, a figura mostra o ano do meio do intervalo de incerteza, conforme indicado por especialistas ou inferido a partir dos dados disponíveis. (B) Declínios acumulativos. As curvas indicam o número acumulado de declínios em cada categoria de gravidade ao longo do tempo. Em (A) e (B), as setas marcam a descoberta da quitridiomiose em 1998.

O Bd é um fungo aquático, pertencente à Classe dos Chytridiomycetes. Seu ciclo de vida consiste na progressão de zoósporos (esporos flagelados), para o organismo maduro chamado talo, produtor de um zoosporângio único que originará novos zoósporos que serão liberados completando o ciclo de vida (BERGER *et al.*, 2006). A infecção dos anfíbios ocorre na sua forma de zoósporos que se alojam na epiderme onde completam seu ciclo de vida dando início a infecção (Figura 3). Com relação a sua fisiologia as condições ideais de

desenvolvimento para Bd são temperaturas entre 10 e 25 °C e pH (6 – 7), condições normalmente encontradas em sistemas de água doce. Temperaturas e pH diferentes dessas faixas não favorecem seu desenvolvimento (PIOTROWSKI; ANNIS; LONGCORE, 2004). Estudos recentes mostram, no entanto, que a variedade de locais onde a presença desse fungo pode ser detectada, vai além do já analisado, sendo possível detectar a presença de zoósporos até mesmo na neblina (PRADO *et al.*, 2023).

Os principais sinais clínicos da quitridiomíose são letargia, falta de apetite, dificuldade de manutenção da postura com abdução dos membros e hiperqueratinização da pele do hospedeiro, provocando descamação e despigmentação (BERGER; SPEARE; HYATT, 1999). O excesso de descamação na pele dos indivíduos doentes e toxinas liberadas pelo patógeno, geram um desbalanço hídrico e iônico, prejudicando as atividades cardíacas desses animais, estando esse fator associado a mortalidade pela doença (VOYLES *et al.*, 2009).

**Figura 3** - Ciclo de vida do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*



Fonte: Seweel *et al.*, (2021).

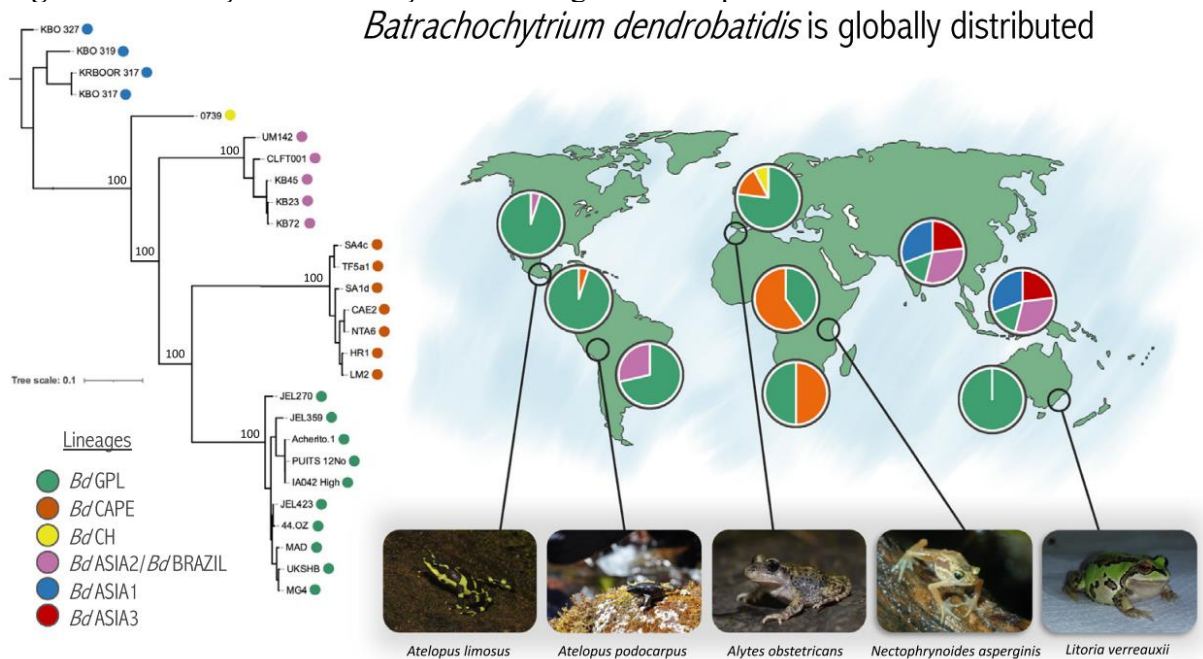
Com a grande severidade da doença, e ampla distribuição do fungo, constantes são os esforços de detecção tanto da presença do fungo, como de indivíduos infectados. Em 2013 foi divulgado um levantamento, que revelou a presença do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* ou Bd, como é também conhecido, em 71 países e 695 espécies (OLSON *et al.*, 2013). Alguns anos depois, utilizando como base o compilado bibliográfico de (CASTRO MONZON;



RÖDEL; JESCHKE, 2020) tivemos um trabalho de ocorrência taxonômica e geográfica de onde esses números foram aumentados para 1.375 espécies infectadas em 92 países (OLSON *et al.*, 2021). Ademais, em 2019 foi estimado que o Bd já possa ter causado o declínio de 501 espécies e presumidamente a extinção de 90, número esse atualmente subestimado (SCHEELE *et al.*, 2019).

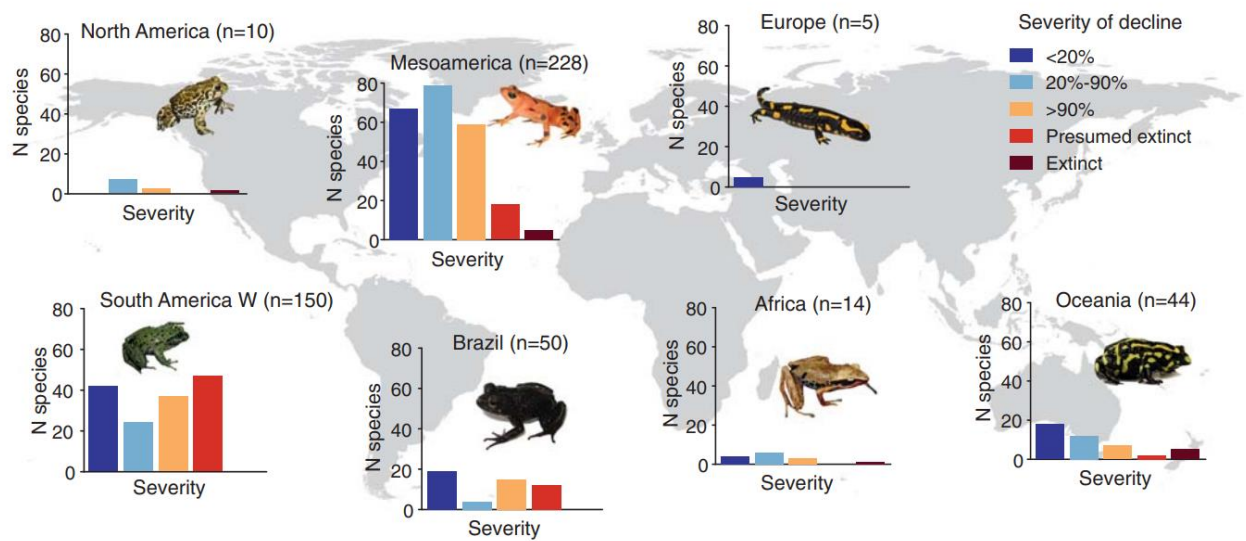
Atualmente, já se tem conhecimento de 5 linhagens do Bd, todas derivadas de uma cepa originada da Ásia com distribuição intensificada por atividades antrópicas (SEWELL; LONGCORE; FISHER, 2021). A distribuição dessas cepas é global (Figura 4), havendo detecção de pelo menos uma linhagem em todos os continentes onde os anfíbios são encontrados (SCHEELE *et al.*, 2019; OLSON *et al.*, 2021; SEWELL; LONGCORE; FISHER, 2021). As regiões da América Central e América do Sul possuem atualmente o maior percentual de espécies sob ameaça, sendo também preocupantes a situação na América do Norte, África e Oceania, onde já foram identificados casos reais de extinção (Figura 5).

**Figura 4** - Evolução e distribuição das linhagens de Bd pelo mundo.



Fonte: Seweel *et al.*, (2021).

**Figura 5** - Severidade de declínios populacionais de anfíbios nos diferentes continentes continental.



Fonte: Scheele *et al.* (2019).

No Brasil temos a prevalência das linhagens BdBrazil (enzoótica e menos virulenta) e BdGPL (panzootica e mais virulenta) (BYRNE *et al.*, 2019; SEWELL; LONGCORE; FISHER, 2021). A menor virulência da linhagem BdBrazil pode ser dada ao fato de ser uma das primeiras linhagens a se ramificar. Linhagens mais antigas se encontram na literatura menos relacionadas aos surtos infecciosos de Bd quando comparadas a linhagens mais novas e híbridos (GREENSPAN *et al.*, 2018; O'HANLON *et al.*, 2018). Até o início do século não se havia registros de Bd no Brasil, mas vários estudos já mostram sua ampla e crescente distribuição em vários cantos do país (BECKER *et al.*, 2015a; CARVALHO; BECKER; TOLEDO, 2017; AZAT *et al.*, 2022). Entretanto, a maior parte dos trabalhos concentram esforços no Sudeste, mais precisamente em fragmentos remanescentes de Mata Atlântica, *hotspot* de biodiversidade e detentora da maior diversidade de anfíbios do país (HADAD *et al.*, 2013).

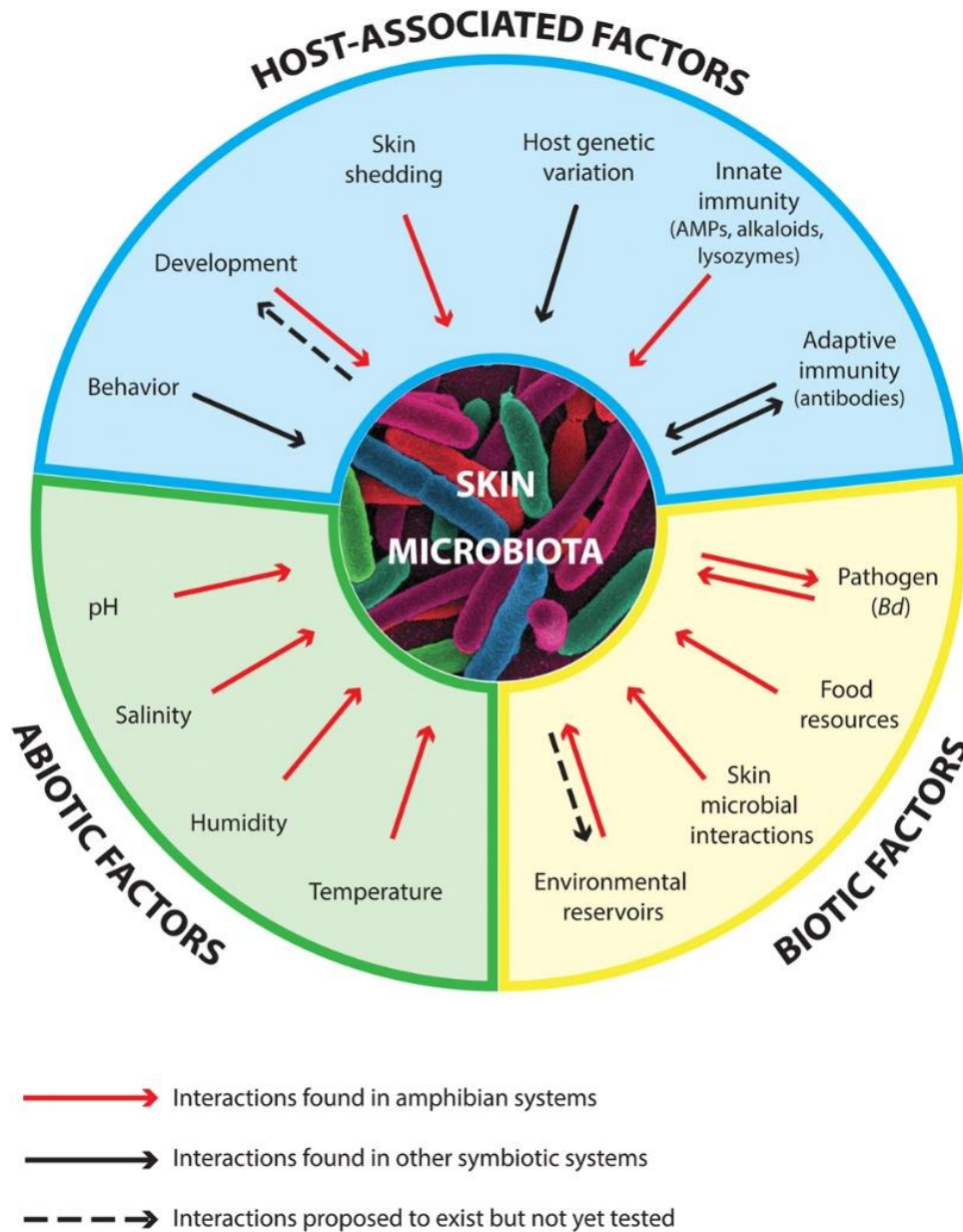
Dessa forma, faltam dados que mostrem a situação real do fungo em outras regiões como no Nordeste do Brasil, mesmo já havendo alguns esforços, como o estudo realizado na Bahia, que utilizou técnicas histológicas em coleções herpetológicas do estado, observando a presença de espécimes de adultos infectados, com 2 possuindo sinais clínicos da doença, estimando a presença do fungo pelo menos desde 1996 (AMORIM *et al.*, 2019). Alguns trabalhos, mostram alguns pontos outros pontos de detecção de Bd na Caatinga, demonstrando a adaptação desses fungos não apenas a ambientes úmidos (CARVALHO; BECKER; TOLEDO, 2017; BENÍCIO *et al.*, 2019). No Ceará, a amostragem é ainda mais insuficiente, no entanto, em 2021 houve a

detecção de Bd em 20 espécies dentre 28 analisadas, tendo sido observada a presença do fungo em todas as 6 localidades visitadas espalhadas pelo estado (MENDES, 2021).

### **2.3 A importância do microbioma na proteção contra patógenos e a bioaugmentação como forma de biorremediação da quitridiomicose**

Sabemos atualmente, que os microrganismos desempenham papéis importantes na saúde dos animais. Os organismos simbioses participam ativamente na manutenção da imunidade e geralmente são a primeira linha de defesa, juntamente com a pele (que em anuros podem secretar peptídeos antimicrobianos cutâneos (AMP)), contra organismos invasores (WOODHAMS *et al.*, 2007; BURKART *et al.*, 2017; ROLLINS-SMITH, 2023). Diversos fatores como, ambiente, geografia, sexo, dieta, filogenia, co-habitação, transferência parental, captividade e transferência humano-pet, podem influenciar a composição microbiana associada aos vertebrados (ROSS; RODRIGUES HOFFMANN; NEUFELD, 2019). Nos anfíbios os principais fatores que moldam a microbiota da pele estão ligados às características do hospedeiro, interações bióticas e condições ambientais (Figura 6) (REBOLLAR *et al.*, 2016a). Esses elementos complexos influenciam diretamente a saúde e a sobrevivência desses animais, sendo essencial compreendê-los para a conservação dessas espécies frente às mudanças ambientais.

**Figura 6** - Principais fatores que influenciam a diversidade e função da microbiota da pele dos anfíbios.



Fonte: Rebolar *et al.*, (2016). Setas em ambas as direções indicam interações bidirecionais que podem ocorrer entre a microbiota da pele e um fator específico. AMPs representam péptidos antimicrobianos. O tamanho de cada seção não é proporcional à contribuição de cada um dos fatores.

Em se tratando de proteção contra doenças, os microrganismos simbiotes podem atuar protegendo o hospedeiro através da produção de componentes que inibam a proliferação do patógeno (BECKER; HARRIS, 2010; LOUDON *et al.*, 2014). Dessa forma um bom entendimento da microbiota associada ao indivíduo, utilizando além de técnicas de cultivo, técnicas moleculares atuais como as “ômicas” (metagenômica, metatranscriptômica e metabolômica), pode gerar respostas e dicas de como mitigar os efeitos de doenças como a quitridiomicose nos anfíbios (REBOLLAR *et al.*, 2016a).

Com relação aos principais filos de bactérias encontrados na pele de anuros, vemos consistentemente, em termos de abundância, a predominância dos filos Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes e Firmicutes (BELDEN *et al.*, 2015; MADISON *et al.*, 2017; MCGRATH-BLASER *et al.*, 2021). No entanto, ao tratarmos do microbioma em anuros, é importante levar em consideração que a maioria desses animais passam por transformações drásticas na metamorfose, que geram grandes mudanças fisiológicas, na dieta e no habitat, o que acaba influenciando na composição das comunidades microbianas (KOHL *et al.*, 2013). Outro ponto é que mudanças de temperatura e contaminantes ambientais também podem modificar a estrutura microbiana da pele desses animais, diminuindo sua imunidade, os deixando mais suscetíveis a infecções (LONGO *et al.*, 2015; VARGA; BUI-MARINOS; KATZENBACK, 2019).

Nesse sentido, a interação entre Bd e microbioma da pele de anfíbios já vem sendo estudada há alguns anos, sendo observado que ao interagir com os microrganismos simbiotes da pele desses animais o Bd pode agir de duas formas principais: 1- estimulando a produção de metabólitos antifúngicos por microrganismos presentes na comunidade simbiote; 2- alterando a composição microbiana da pele desses indivíduos (WALKE; BELDEN, 2016). Além disso, também é possível delinear um terceiro cenário, onde o microbioma altera o padrão da infecção permitindo que o indivíduo infectado conviva com o fungo sem desenvolver sinais clínicos da doença (WOODHAMS *et al.*, 2007).

Na literatura, já existem alguns metabólitos descritos que atuam inibindo o crescimento do Bd. Como exemplo temos o 2,4-diacetylphloroglucinol produzido pela bactéria *Lysobacter gummosus* e os compostos indole-3-carboxaldehyde e violacein produzidos pela bactéria *Janthinobacterium lividum* todos obtido da pele da salamandra *Plethodon cinereus* (BRUCKER *et al.*, 2008). Em anuros temos como exemplo a produção de 2,4-diacetylphloroglucinol (2,4-DAPG) pela bactéria *Pseudomonas fluorescens*, normalmente encontrada na pele da espécie *Rana muscosa* (MYERS *et al.*, 2012). Além disso, também há relatos de gêneros de bactérias como *Serratia sp.*, *Stenotrophomonas sp.*, *Streptomyces sp.*, *Enterobacter sp.*, *Pseudomonas sp.* e *Klebsiella sp.* com atividade anti-Bd (MADISON *et al.*, 2017; ABARCA *et al.*, 2021).

Assim, a presença de bactérias anti-Bd compondo o microbioma da pele de anfíbios é de extrema importância, fato que foi confirmado no estudo que observou que espécies como *Rana sierrae* e *Rana muscosa* conseguiram evitar o declínio de suas populações ao longo de

vários anos coexistindo com Bd graças a uma grande proporção de espécies de bactérias anti-Bd em suas peles. Dessa forma, a utilização de bactérias anti-Bd como probióticos vem sendo bastante estudada nos últimos anos (LAM *et al.*, 2010). De forma geral, os benefícios proporcionados por probióticos na saúde dos animais são bastante conhecidos há muitos anos, sendo constante o surgimento de novos usos para essas chamadas “bactérias boas” (HAVENAAR; HUIS IN’TVELD, 1992). Um exemplo, é a utilização de probióticos em recifes de corais, técnica que vem sendo utilizada para prevenir o branqueamento relativo ao aumento de temperatura das águas marinhas, fazendo com que esses corais adquiram uma tolerância maior aos eventos de aquecimento global (PEIXOTO *et al.*, 2021).

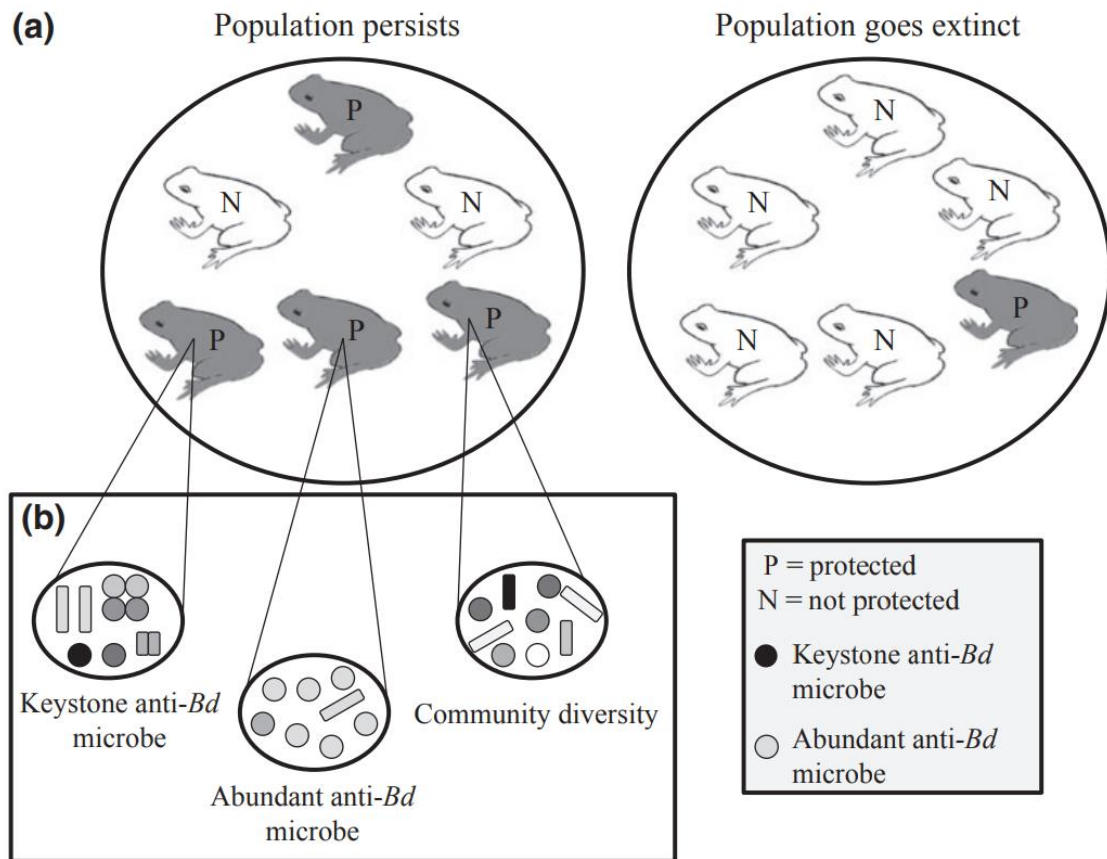
Nesse sentido, a metodologia mais desenvolvida nos últimos anos para a utilização de probióticos em anfíbios é a bioaugmentação, que se trata de uma técnica que visa aumentar a abundância de determinadas espécies de bactérias na pele desses animais (BLETZ *et al.*, 2017). Assim, a técnica de bioaugmentação consiste em aumentar em uma espécie alvo a concentração de algum isolado previamente testado e caracterizado como possuindo atividade anti-Bd, na maioria das vezes proveniente da própria pele da espécie alvo, visando aumentar a concentração dessas bactérias na pele do indivíduo (HARRIS *et al.*, 2009; BECKER; HARRIS, 2010; MYERS *et al.*, 2012).

Os trabalhos utilizando essa técnica obtiveram resultados mistos. Embora a técnica tenha se mostrado eficiente em diversos relatos (BECKER; HARRIS, 2010; HARRIS *et al.*, 2009; KUENEMAN *et al.*, 2016; MYERS *et al.*, 2012), a utilização de probióticos não se mostrou efetiva em alguns casos (BECKER *et al.*, 2011; KÜNG *et al.*, 2014). Um estudo recente não observou uma manutenção protetora do probiótico (inoculante de *J. lividum*) em *R. sierrae* a longo prazo, mostrando haver muitos pontos a serem trabalhados na obtenção de probióticos eficientes (KNAPP *et al.*, 2022). Para alguns autores, a divergência entre resultados positivos e negativos pode se dar pela escolha inadequada do probiótico (REBOLLAR *et al.*, 2016a).

Outros pontos a serem analisados é a segurança desses probióticos, que precisam ser bem avaliados evitando que causem danos ao hospedeiro, fato esse que ainda não foi relatado com os estudos até então. Essa segurança precisa estar atrelada tanto ao hospedeiro, como a sua microbiota, necessitando que o probiótico inoculado atue em sinergia contra o patógeno. Com isso, algumas hipóteses, como a do probiótico-chave discutem o papel desenvolvido por esses probióticos quando em contato com a microbiota nativa do hospedeiro. A hipótese sugere,

diferente da bioaugmentação, os microrganismos inoculados estariam presentes em baixa abundância e desenvolveria papéis chaves nas comunidades microbianas, não necessariamente agindo diretamente contra o patógeno, mas remodelando essa comunidade para que ela, como um todo, obtenha uma função defensiva (Figura 7) (BLETZ *et al.*, 2013).

**Figura 7** - Mecanismos de ação de probióticos anti-Bd.



Fonte: Bletz *et al.*, (2013). Em (a) a persistência de uma população graças a uma grande proporção de indivíduos portadores de microrganismos benéficos anti-Bd (esquerda) e a extinção de uma população devido a uma baixa proporção de indivíduos portadores de microrganismos benéficos anti-Bd (doreita). Em (b) uma das três formas de atuação de microrganismos anti-Bd, a primeira atuando como microrganismos fundamentais na estruturação da comunidade, fortalecendo-a e aumentando sua função protetora como um todo, a segunda atuando como microrganismos mais abundantes, fornecendo a maior parte da defesa contra o patógeno e a terceira compondo uma comunidade altamente diversa, que está associado a boas funções defensivas.

Em geral, os trabalhos realizados até o momento foram focados na pele dos animais como local de inoculação, onde os indivíduos estudados foram “banhados” com o probiótico e depois expostos ao patógeno, as chamadas “*bacterial baths*” (HARRIS *et al.*, 2009). Diferentemente alguns outros esforços focaram na bioaugmentação no solo, obtendo sucesso na transmissão da bactéria *J. lividum* para o hospedeiro *Plethodon cinereus*, e proteção contra a infecção por Bd (MULETZ WOLZ *et al.*, 2012). No entanto, levando em consideração a complexidade do microbioma da pele desses animais e os diversos fatores que podem

influenciar nos padrões e estrutura das comunidades microbianas, há a necessidade do desenvolvimento de outras metodologias visando uma melhor eficiência desses inoculantes e sua possibilidade de utilização na natureza.

#### **2.4 Ninhos de espuma, seu microbioma e importância na bioprospecção**

Os anuros além de serem o grupo de anfíbios mais diverso, também possuem o maior número de modos reprodutivos. Atualmente temos descritos cerca de 71 modos reprodutivos diferentes para anfíbios, sendo destes 56 exclusivos de anuros (NUNES-DE-ALMEIDA; HADDAD; TOLEDO, 2021). Esses modos reprodutivos podem variar entre ovoparidade e viviparidade, desenvolvimento indireto e direto, em aquático ou terrestre, os quais podem ser executados de diferentes formas, tais como colocação de ovos em tocas, bromélias, bolsas de pele, estômagos, sacos vocais e ninhos de espuma (HADDAD; PRADO, 2005; NUNES-DE-ALMEIDA; HADDAD; TOLEDO, 2021; WELLS, 2019).

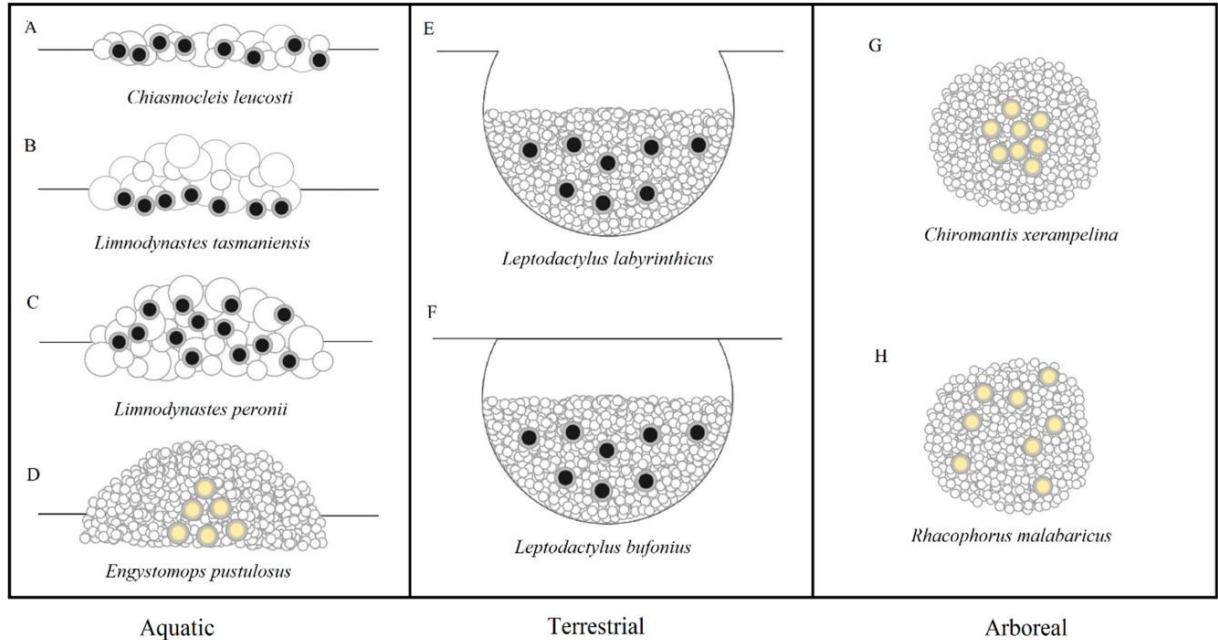
A reprodução por ninhos de espuma ocorre principalmente em ambientes secos ou com umidade sazonal e altas temperaturas relativas (CRUMP, 2015). Essa característica pode estar relacionada a uma das principais funções dos ninhos, que é evitar a dessecação dos ovos, o que se mostra importante, uma vez que essa estratégia é uma forma intermediária de reprodução entre modos de vidas aquáticos e terrestrialidade com desenvolvimento direto (GOMEZ-MESTRE; PYRON; WIENS, 2012; MEEGASKUMBURA *et al.*, 2015). Além da ação anti dessecação, podemos atribuir a essas estruturas várias outras funções, como controle termal dos ovos, defesa contra predadores e melhoria da oxigenação, além de possíveis benefícios adicionais como refúgio para girinos pós-eclosão, proteção contra insolação, fonte de nutrientes, proteção contra patógenos entre outros (GOULD, 2021).

Os ninhos de espuma podem possuir diferentes densidades e tamanhos de bolhas, podendo ser depositados na superfície da água no solo, em folhas, galhos ou troncos, diferentes cavidades ou buracos perto de lagoas, sempre envolvendo os ovos de forma a proteger a futura prole (Figura 8) (CRUMP, 2015; GOULD, 2021). Essas estruturas são formadas no momento do amplexo, onde o movimento das pernas do macho (nas famílias Rhacophoridae e Leptodactylidae) emulsionam seu esperma com o muco e ovos liberados pelo oviduto da fêmea (Figura 9) (CRUMP, 2015; FISCHER, 2023). Em algumas espécies gênero *Scinax sp.* da família Hilidea os ninhos são formados pelo movimento de pulo da fêmea em cima do muco excretado pelo seu oviduto (TOLEDO; HADDAD, 2005; BASTOS; HADDAD; POMBAL JR,



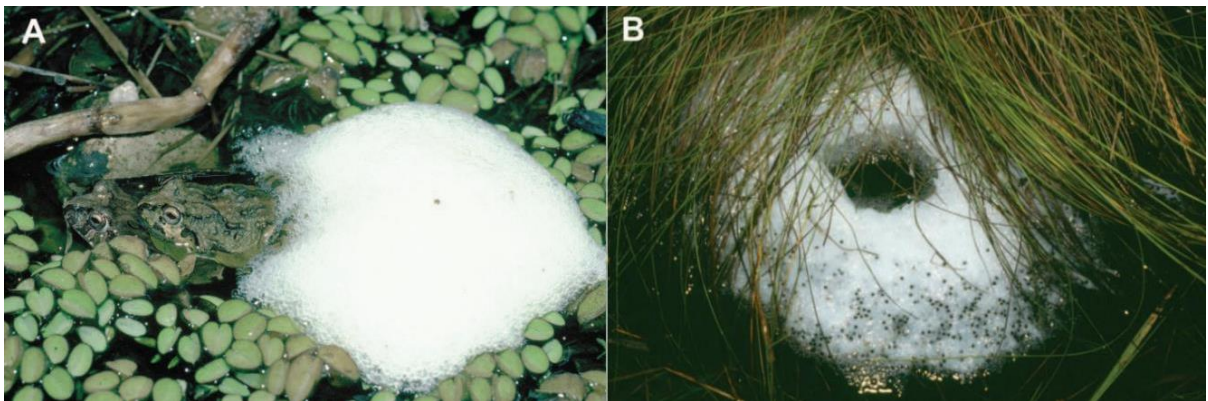
2010). Após a eclosão dos ovos há a liberação dos girinos, que normalmente continuam dentro dos ninhos até que sejam dissolvidos pela chuva (CRUMP, 2015).

**Figura 8** - Secções verticais de ninhos de bolhas e espuma produzidos por anuros.



Fonte: Gould (2021). O painel esquerdo mostra ninhos aquáticos o painel do meio mostra ninhos terrestres e o painel da direita mostra ninhos arborícolas. Ovos com pigmento são mostrados em preto, enquanto ovos não pigmentados são mostrados em amarelo claro. Círculos sem cor representam o tamanho relativo das bolhas de ar que formam os ninhos de espuma e bolha das espécies.

**Figura 9** - (A) Casal de anuros da espécie *Pleurodema borelli* produzindo ninho de espuma no momento do amplexo. (B) Ninho de *Leptodactylus latrans* contendo os ovos depositados.



Fonte: Crump (2015).

A estrutura desses ninhos vem sendo estudada nos últimos anos, e se mostrou bastante complexa, resiliente e com características biocompatíveis com sistemas biológicos (HISSA *et al.*, 2008; FLEMING *et al.*, 2009; COOPER *et al.*, 2017). Dentre as diversas atividades de componentes desses ninhos pode-se constatar a ação surfactante das proteínas, algumas denominadas de ranaspuminas e outras ranamurfinas, responsáveis pela estruturação do ninho

juntamente com carboidratos complexos, em menor quantidade (HISSA *et al.*, 2008; FLEMING *et al.*, 2009; MACKENZIE *et al.*, 2009; HISSA *et al.*, 2014; COOPER *et al.*, 2017). Além disso, outros estudos utilizando essas estruturas para fins farmacêuticos e biotecnológicos já vêm sendo realizados mostrando a importância científica dessas estruturas e relevância da conservação de espécies que as produzem (CHOI *et al.*, 2012; BROZIO *et al.*, 2021).

No entanto, embora haja um crescente entendimento sobre a estrutura bioquímica dos componentes desses ninhos ainda não se tem informações suficientes sobre o microbioma presente nessas estruturas. Alguns trabalhos avaliaram atividades de microrganismos cultiváveis, isolados de ninhos de diferentes espécies de anuros encontrados no Nordeste do Brasil, mais especificamente no estado do Ceará. Entre os testes foram analisados ação enzimática (CASTRO, 2019; MARTINS, 2020), ação antibacteriana (MARTINS, 2020) e inibição fúngica (MARTINS, 2020), incluindo contra o fungo Bd (BEZERRA, 2021).

Com relação ao microbioma temos a descrição recente dos ninhos das espécies *Adenomera hylaedactyla*, *Leptodactylus vastus* e *Physalaemus cuvieri* (MONTEIRO *et al.*, 2023). Outro estudo avaliou também tanto a transmissão vertical, quanto horizontal de microrganismos, comparando microbioma de adultos parentais, ninhos de espuma em seu interior e exterior, girinos e do meio circundante, mostrando haver uma relação entre o microbioma adultos -> exterior do ninho -> girinos, uma vez que as comunidades microbianas de girinos no ninho foram semelhantes às comunidades microbianas nos adultos e no exterior do ninho, mas distintas do interior do ninho e meio externo (MCGRATH-BLASER *et al.*, 2021). Alguns autores sugerem uma forte ligação entre o microbioma de pais, filhos e ninhos (de diferentes animais), cunhando o termo “nidobioma” (CAMPOS-CERDA; BOHANNAN, 2020). De fato, os ninhos são o primeiro contato da prole com microrganismos do ambiente externo (nos casos de modos de reprodução que utilizam ninhos), que iniciarão o processo de colonização da pele, podendo estar entre esses microrganismos os capazes de inibir o crescimento do Bd.

## **2.5 O gênero *Pseudomonas* sp. como potencial fonte de bactérias anti-Bd**

O gênero *Pseudomonas*, é um grupo de bactérias gram-negativa com formato de bastonete, reto ou levemente curvo, e presença de flagelos polares. Atualmente pertencente a classe Proteobacteria subclasse Gamma (CHU *et al.*, 2019). Devido à grande diversidade genética dentro desse gênero há uma grande distribuição de habitats, como água doce,

ambientes marinhos, solos, além de relações íntimas com animais e plantas, podendo algumas espécies apresentarem patogenicidade como é o caso da espécie *Pseudomonas aeruginosa* (SILBY *et al.*, 2011).

Devido a essa grande diversidade, espécies do gênero são frequentemente utilizadas com fins biotecnológicos. Na agricultura, cepas de *Pseudomonas* vêm sendo utilizadas para a promoção de crescimento vegetal (SINGH *et al.*, 2022). Espécies fluorescentes e não fluorescentes de *Pseudomonas* desempenham um papel essencial na promoção do crescimento e controle fitopatogênico já que produzem mecanismos antagonistas, como ISR e antibióticos, mantendo uma relação mutualística com as plantas, além de sintetizam auxinas, semelhantes a fito hormônios, para regular o crescimento das plantas (SAH; KRISHNANI; SINGH, 2021).

Na aquicultura há muitas décadas o gênero *Pseudomonas* também está entre os mais utilizados para fins de desenvolvimento de probióticos a fim de eliminar agentes infecciosos (GRAM *et al.*, 1999; VERSCHUERE *et al.*, 2000). Com isso, além da já bem documentada utilização como bioinoculantes e probióticos, podemos destacar também a produção de metabólitos antimicrobianos que podem atuar frente a uma grande diversidade de patógenos, como vírus, fungos, bactérias e parasitos (REMICKOVA *et al.*, 2008; NABRDALIK; GRATA, 2014; MARTIN H *et al.*, 2019; B. ASSIS *et al.*, 2020; SUN *et al.*, 2021; CHAUHAN *et al.*, 2023).

Na pele de anfíbios, o gênero *Pseudomonas* é um dos grupos mais abundantes encontrados tanto na microbiota cultivável como não cultivável (KRUGER, 2020; NAVAGONZÁLEZ *et al.*, 2021). O papel desse gênero na produção de metabólitos antimicrobianos é bem documentado, tanto contra bactérias patogênicas, como contra fungos, em especial o fungo Bd (BECKER *et al.*, 2011; B. ASSIS *et al.*, 2020).

Além da sua abundância, vários estudos avaliaram também o seu potencial de inibição contra o Bd demonstrando que diversos membros desse gênero são frequentemente avaliados como altamente inibitórios contra o fungo em testes *in vitro* (BROOKS; SISSON; BAKER, 2023; HARRIS *et al.*, 2006; MYERS *et al.*, 2012) (Tabela 1). Esse antagonismo pode se dar, além da produção de metabólitos, pela formação de biofilmes, que em *Pseudomonas lactis* está fortemente associada a uma diminuição tanto na contagem microscópica de Bd quanto nas cópias de qPCR (CHEN; ALEXIEV; MCKENZIE, 2022).

Além dos estudos *in vitro*, também foi avaliado o potencial de cepas de *Pseudomonas* sp. como probiótico na pele de anfíbios anuros, como *Rana sierrae*, mostrando que mesmo sem haver uma persistência e proteção direta dos animais contra a doença, a adição de probióticos pode agir regulando metabólitos já presentes na pele dos animais (WOODHAMS *et al.*, 2020). Todos esses fatores levam o gênero *Pseudomonas* a ser um forte candidato para a prospecção de probióticos.

**Tabela 1** – *Pseudomonas* spp. com atividade inibitória contra *Bd in vitro*.

Cepa	Espécie hospedeira	País	Referência
<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Plethodon cinereus</i> e <i>Hemidactylium scutatum</i>	USA	Harris <i>et al.</i> , 2006
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Rana muscosa</i>	USA	Myers <i>et al.</i> , 2012
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Atelopus elegans</i>	Colombia	
<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	<i>Atelopus spurrelli</i>	Colombia	
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	<i>Atelopus spurrelli</i>	Colombia	
<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Atelopus spurrelli</i> , <i>Atelopus aff. limosus</i> e <i>Atelopus elegans</i>	Colombia	Flechas <i>et al.</i> , 2012
<i>Pseudomonas straminea</i>	<i>Atelopus spurrelli</i>	Colombia	
<i>Pseudomonas tolaasii</i>	<i>Atelopus elegans</i>	Colombia	
<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Atelopus aff. limosus</i> e <i>Atelopus spurrelli</i>	Colombia	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Litoria serrata</i>	Australia	Bell <i>et al.</i> , 2013
<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Litoria serrata</i>	Australia	
<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Plethodon cinereus</i>	USA	Loudon <i>et al.</i> , 2014
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Litoria serrata</i> e <i>Litoria rheocola</i>	Australia	
<i>Pseudomonas koreensis</i>	<i>Litoria nannotis</i> e <i>Litoria rheocola</i>	Australia	
<i>Pseudomonas mosselli</i>	<i>Litoria nannotis</i>	Australia	
<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Litoria rheocola</i>	Australia	Daskin <i>et al.</i> , 2014
<i>Pseudomonas tolaasii</i>	<i>Litoria rheocola</i>	Australia	
<i>Pseudomonas</i> sp. SBR3-slima	<i>Litoria nannotis</i>	Australia	
<i>Pseudomonas</i> spp.	NE	Panamá	Becker <i>et al.</i> , 2015
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Litoria serrata</i> , <i>Litoria rheocola</i> e <i>Litoria nannotis</i>	Australia	
<i>Pseudomonas koreensis</i>	<i>Litoria rheocola</i>	Australia	Yasumiba; Bell; Alford, 2015
<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Litoria rheocola</i>	Australia	
<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>P. cylindraceus</i> , <i>P. cinereus</i> , <i>P. glutinosus</i>	USA	Muletz-Wolz <i>et al.</i> , 2017
<i>Pseudomonas azotoformans</i>	<i>Psychrophrynella usurpator</i>	Peru	
<i>Pseudomonas entomophila</i>	<i>Dendropsophus rhodopeplus</i>	Peru	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Telmatobius marmoratus</i>	Peru	
<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Gastrotheca excubitor</i>	Peru	Catenazzi <i>et al.</i> , 2018
<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Gastrotheca nebulanastes</i>	Peru	
<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pristimantis danae</i>	Peru	
<i>Pseudomonas</i> spp.	NE	Costa Rica	Abarca <i>et al.</i> , 2021
<i>Pseudomonas</i> sp.	NE	USA	Alexiev <i>et al.</i> , 2023

Fonte: Elaborado pela autora.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivos gerais

Analisar através do genoma o potencial probiótico de três cepas de *Pseudomonas* sp. contra o fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* e avaliar a influência da introdução por bioaugmentação de uma das cepas de *Pseudomonas* no bacterioma do ninho de espuma de *Leptodactylus vastus*.

#### 3.2 Objetivos específicos

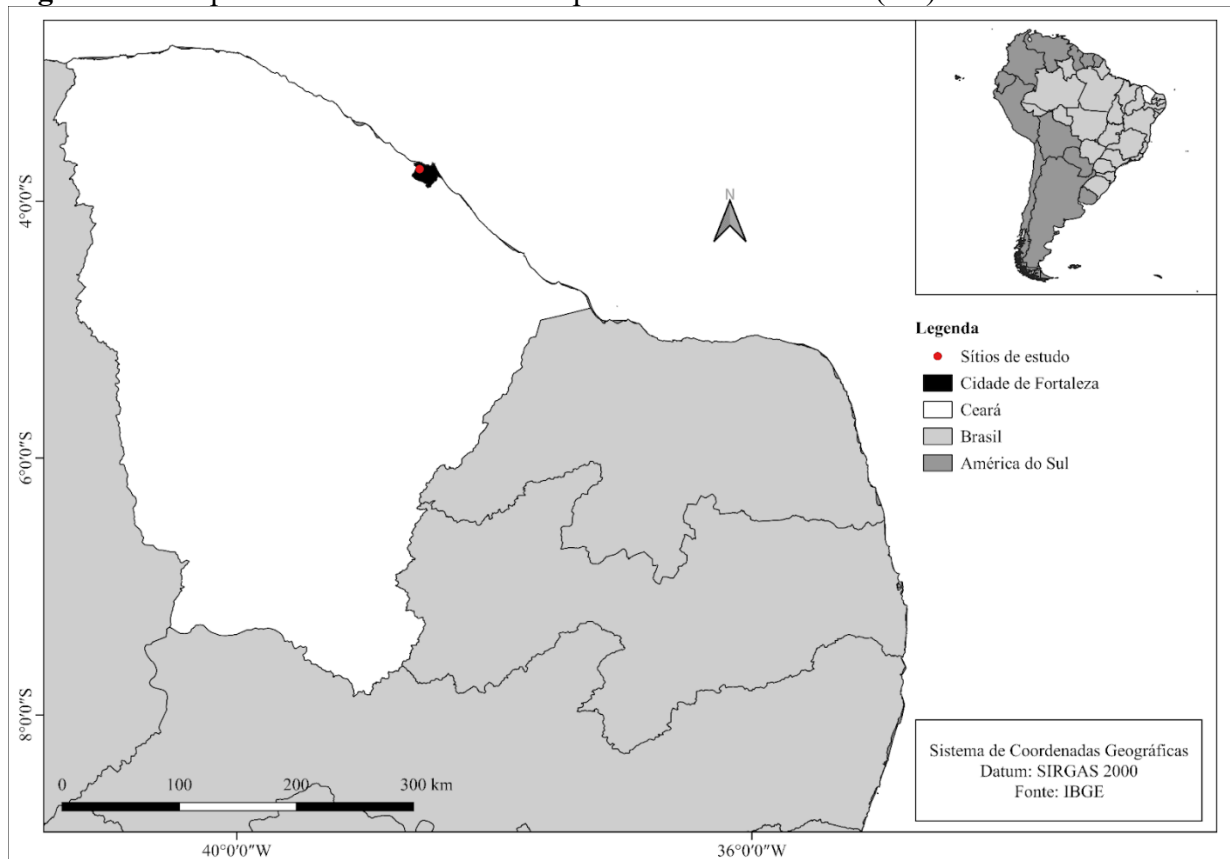
- Realizar a montagem do genoma das cepas *Pseudomonas* sp. P119, *Pseudomonas* sp. P137 e *Pseudomonas* sp. B8;
- Realizar a identificação molecular das cepas *Pseudomonas* sp. P119, *Pseudomonas* sp. P137 e *Pseudomonas* sp. B8;
- Buscar genes relacionados com a atividade anti-Bd nos genomas das cepas *Pseudomonas* sp. P119, *Pseudomonas* sp. P137 e *Pseudomonas* sp. B8;
- Buscar genes de interesse probiótico nos genomas das cepas *Pseudomonas* sp. P119, *Pseudomonas* sp. P137 e *Pseudomonas* sp. B8;
- Avaliar a alteração na comunidade bacteriana após a adição do isolado *Pseudomonas* sp. P119 na microbiota do ninho de espuma *in natura* de *L. vastus*.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Coleta de ninhos de espuma

A coleta do ninho de espuma *in natura* foi realizada no primeiro semestre de 2023, na quadra chuvosa, no Campus do Pici (Fortaleza- CE) (Figura 10), no dia 03/03/2023 (3° 44' 54.955" S, 38° 34' 45.831" W). O ninho escolhido para o trabalho foi referente à espécie *Leptodactylus vastus* (Figura 11). A coleta foi realizada utilizando espátula, luvas sanitizadas com álcool etílico 70% e frascos estéreis e transportados para o Laboratório de Recursos Genéticos – LARGEN onde foram realizados os experimentos. A coleta seguiu as normas da legislação vigente por meio da autorização e licença SISBIO, liberada pelo Ministério do Meio Ambiente (N. 58036-8) e aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFC N. 8320100323). Além do ninho também foram coletados 3 girinos para a confirmação da espécie. Os girinos coletados foram colocados em álcool etílico 70% e armazenados a -20 °C para análises posteriores.

**Figura 10** - Mapa do local de coleta no Campus do Pici – Fortaleza (CE).



Fonte: Elaborado por Bruno Guillon.

**Figura 11** - Ninho de espuma da espécie *Leptodactylus vastus* coletado no Campus do Pici, Fortaleza-Ce, Brasil.



Fonte: Elaborado pela autora.

## 4.2 Identificação de girinos

### 4.2.1 Extração de DNA dos girinos e sequenciamento

O DNA genômico dos girinos foi extraído utilizando o protocolo de SDS com adaptações (ROBLES *et al.*, 2007). Para a extração, uma parte da cauda dos girinos foi cortada em pequenos pedaços com a ajuda de um bisturi e pinças sanitizadas com álcool etílico 70%. As amostras foram levadas a centrifuga três vezes por 1 minuto a 6000 rpm com 1 mL de água ultrapura, em seguida as amostras foram ressuspensas em 600µl de solução SDS com 10µl de proteinase K e incubadas a 65 °C por aproximadamente 3 horas. Em seguida, foram adicionados às amostras 200 µl de acetato de amônio 7,5 M. Posteriormente os tubos foram centrifugados por 30 minutos a 12.000 rpm. Em seguida, transferimos 700µl do sobrenadante para outro tubo e adicionamos de 600µl de isopropanol gelado seguido de condicionamento no freezer por 10 minutos. Após essa etapa, levamos as amostras à centrifuga (4 °C) por 6 '20 " a 12.000 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e observamos a presença do pellet no *ependorf*. Posteriormente adicionamos 450 µl de etanol 70% e colocamos novamente na centrifuga por 6 min, depois os tubos foram secos a 37 °C no *Thermomixer* por 30 min. Por fim, o pellet foi ressuspenso com 40 µl de uma solução 10 mM Tris-HCl pH 8,5. As concentrações e qualidades das extrações de DNA foram avaliadas por medidas de absorbância em 260 nm, 280 nm e 230 nm, em espectrofotômetro Nanodrop® ND-1000 (NanoDrop, Wilmington, DE, EUA).

Em seguida, a região mitocondrial 16S foi amplificada por PCR utilizando primers 16Sar (5' CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT 3') e 16Sbr (5' CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG 3') (PALUMBI, 1991). As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 35 µL,



contendo aproximadamente 20 ng de DNA e os seguintes reagentes de PCR: 0,14 mM de cada dNTP; 0,7X de Tampão GoTaq (Promega), 0,7  $\mu$ M de cada primer, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 3 mM de BSA e 1 unidade da enzima GoTaq polimerase (Promega, USA). As PCRs foram feitas em termociclador (Eppendorf Mastercycler® Hamburgo, Alemanha) programado para uma etapa de desnaturação inicial (10 min 94 °C), seguido por 44 ciclos de 1 min a 94 °C, 45 seg a 48 °C e 1 min e 45 seg a 72 °C. O último ciclo foi seguido por uma extensão final de 10 min a 72 °C. Os produtos das amplificações foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) corado com SYBR® Safe DNA (Invitrogen, EUA).

O sequenciamento do material amplificado foi feito pelo método de sequenciamento de SANGER pela Central de Genômica e Bioinformática (CeGenBio) localizada no Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

#### **4.2.2 Análises das sequências e identificação da espécie**

Como resultado do sequenciamento foram obtidas sequências parciais que foram tratadas utilizando o programa Codon Code Aligner versão 11.0.2. (Codon Code Corp, USA). Para isso, foram retiradas as extremidades com baixa qualidade obtendo sequências de alta qualidade (Phred > 30) e em seguida foi realizado o alinhamento *de novo* para a formação da sequência *contig*. A sequência *contig* foi então submetida a ferramenta de alinhamento local BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1990), utilizando o banco de dados *nucleotide collection*. A identificação foi feita com a espécie que obteve identidade maior que 99,8% - 100%.

### **4.3 Sequenciamento genômico dos isolados P119, P137 e B8**

#### **4.3.1 Extração de DNA e sequenciamento**

Os microrganismos selecionados para o sequenciamento foram 3 cepas de *Pseudomonas* sp. reativadas das coleções pertencentes ao Laboratório de Recursos Genéticos – LARGEN de trabalhos anteriores (CASTRO, 2019; MARTINS, 2020). As cepas escolhidas foram P119 e P137, isoladas de ninhos de espuma de *Physalaemus cuvieri* e B8 isolada de ninhos de espuma de *Adenomera hylaedactyla* e se encontram cadastradas no SisGen - Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (A35A5E2). A extração de DNA foi realizada utilizando placas de culturas puras das bactérias. Foram pesadas 200 mg de massa bacteriana proveniente de colônias isoladas. O DNA foi extraído utilizando o

kit DNeasy PowerSoil Pro Kit (Qiagen, Germany), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração de DNA e a qualidade foi avaliada com um espectrofotômetro NanoDrop 1000 (ThermoFisher Scientific, EUA) e o material foi armazenado em freezer -20 °C até o uso.

Para a realização do sequenciamento NGS, foram construídas bibliotecas genômicas utilizando o kit Illumina DNA Prep (Illumina, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. A preparação consistiu em etapas de fragmentação enzimática do genoma com uso de *bead-linked transposomes*, purificação, amplificação do material fragmentado com inserção dos adaptadores Nextera DNA CD Indexes (Illumina, EUA) e uma nova purificação com Illumina Purification Beads (Illumina, EUA). Em seguida, as bibliotecas foram quantificadas utilizando o kit dsDNA High Sensitivity (Invitrogen, EUA) em fluorímetro Qubit 2.0 (Thermo Fischer Scientific, EUA) e o tamanho médio dos fragmentos verificado no TapeStation 4150 com kit D1000 (Agilent, EUA). Quantidades equimolares de cada uma das amostras indexadas foram misturadas em uma única solução, formando um pool que foi diluído a 10 pMol e desnaturado com 5% de PhiX a 12,5pMol (Illumina, EUA) para a introdução no sequenciador. O sequenciamento foi realizado na Central de Genômica e Bioinformática (CeGenBio), na plataforma Illumina MiSeq (Illumina, EUA) utilizando o kit de reagente Miseq V2-500 ciclos (Illumina, EUA).

#### 4.3.2 Montagem dos genomas

Para a realização da montagem *de novo*, a qualidade das leituras foi avaliada utilizando o programa FastQC v0.11.9, Em seguida as sequências foram trimadas e filtradas utilizando o programa Trimmomatic v0.38 com os seguintes parâmetros: HEADCROP:20 SLIDINGWINDOW:4:15 MINLEN:50. Com as leituras pareadas obtidas a partir da trimagem o genoma foi montado através do SPAdes v3.13.1, a contiguidade dos *scaffolds* formados avaliada no QUAST v5.2.0, e a completude dos genes ortólogos anotados a partir dos *scaffolds* foi feita usando o Busco v.5.4.6. A partir dos genes *rpoB*, *gyrB* e 16s rRNA foi construída uma árvore filogenética, pelo método Neighbour Joining com modelo de substituição Tamura-Nei, distribuição discreta gamma (T92 + G) e bootstrap de 1000 replicações, utilizando a cepa *Escherichia Coli* K-12 como grupo externo.

Para obter informações das sequências montadas realizou-se a anotação gênica no Prokka v5.4.6 e programa Proksee.ca. Para isso, foram procurados os principais genes envolvidos na produção de metabólitos bem caracterizados, responsáveis por atividade antifúngica em bactérias do gênero *Pseudomonas* (HAAS; KEEL, 2003) e genes envolvidos na

produção de metabólitos anti-Bd (WOODHAMS *et al.*, 2018) (Tabela 2). A busca por genes que indicassem virulência e patogenicidade foi realizada utilizando o programa ABRicate v1.0.1.

**Tabela 2** – Lista de metabólitos e genes buscados nos arquivos de anotação com atividade antifúngica e/ou anti-Bd.

Metabólito Antifúngico	Genes envolvidos na via metabólica	Sigla do metabólito
*Phenazines	phzA - G / phzI	Phz
*Pyoluteorin	pltA - G/ plt L/ plt M/ plt R	Plt
*Pyrrolnitrin	prnA - prnD	Prn
*Hydrogen cyanide	hcnA - C	HCN
*2,4-diacetylphloroglucino	phlD	Phl
*Prodigiosin	pigA - pigN	Pig
Indole-3-carboxaldehyde	AHR	I3C
Violacein	vioA - G, vio K, vioN	-

Fonte: Elaborada pela autora. Na tabela temos os genes procurados nos arquivos genômicos das três cepas e o metabólito ao qual participam da síntese. Metabólitos com (\*) são referentes a metabólitos que cepas do gênero *Pseudomonas* foram capazes de produzir.

#### 4.4 Ensaio de bioaugmentação *in vitro* em ninhos de espuma e caracterização do bacterioma

##### 4.4.1 Teste em placa

Para a realização do teste, foram utilizadas placas de 12 poços contendo em cada poço 1g de ninho de espuma fresco coletado no dia do início do experimento (Figura 12). A bactéria utilizada para o ensaio foi a cepa *Pseudomonas sp.* P119, para isso três colônias da bactéria foram adicionadas em tubos falcons de 15 ml, contendo 3 ml de meio de cultura TGE (triptona 5 g/L, glicose 1 g/L; extrato de levedura 2,5 g/L) e incubadas a 21° C sob agitação de 150 rpm por 24h. A concentração celular da cultura foi estabelecida pela determinação da OD (densidade óptica) ajustada para  $1,0 \pm 0,05$  sob leitura de 600 nm ( $10^5$  UFC/mL). Após o ajuste, a cultura foi centrifugada a 10.000 RPM e seu sobrenadante descartado. O *pellet* foi ressuscitado em solução de NaCl 0,15 M e lavado duas vezes. Nos poços teste, foi adicionado 100 µL da suspensão celular ( $10^5$  UFC/mL) e nos poços controle 100 µL de NaCl 0,15 M. As placas foram incubadas em câmara úmida por 10 dias, e seus poços sacrificados nos dias 1 e 10 do

experimento. O conteúdo dos poços sacrificados foi retirado com espátulas sanitizadas com álcool etílico 70% e congelado a - 20 °C para análises posteriores.

**Figura 12** - Placa de 12 poços utilizada no ensaio de bioaugmentação *in vitro* em ninhos de espuma.



Fonte: Elaborado pela autora. Cada poço contém aproximadamente 1 g de ninho de espuma de *Leptodactylus vastus*. As colunas de poços 1 e 2 são referentes aos poços sem adição do inoculante sacrificados nos tempos 1 e 10 respectivamente. As colunas de poços 3 e 4 são referentes aos poços com adição do inoculante sacrificados nos tempos 1 e 10 respectivamente.

#### 4.4.2 Extração de DNA e sequenciamento

De cada uma das 12 amostras congeladas, foram pesados aproximadamente 0,25 g de ninho. O DNA do conteúdo pesado foi extraído utilizando o kit DNeasy PowerSoil Pro Kit (Qiagen, Germany), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração de DNA e a qualidade foi avaliada com um espectrofotômetro NanoDrop 1000 (ThermoFisher Scientific, EUA) e o material foi armazenado em freezer -20 °C até o uso.

Posteriormente, foram construídas bibliotecas metataxonômicas utilizando o DNA extraído como substrato para amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) da região V4 do gene RNAr 16S com os iniciadores (515 F-Y e 806R) (CAPORASO *et al.*, 2011; PARADA; NEEDHAM; FUHRMAN, 2016). Cada reação de PCR foi realizada em um volume de 30 µL, no qual foram adicionados 2µL de DNA metagenômico (5 ng/µL), 0,75 µL de cada iniciador (10 µM), 6,0 µL GoTaq G2 HotStart Promega (5X), 3,6 µL de MgCl<sub>2</sub> Promega (25

mM), 0,6  $\mu$ L de dNTPs Promega (10 mM), 0,2  $\mu$ L de Taq Polimerase Promega (5U/ $\mu$ L) e 16,1  $\mu$ L de água ultrapura livre de nucleases (Promega, USA). As reações foram incubadas no termociclador Veriti 96-well Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA) usando o seguinte programa: desnaturação inicial do DNA a 95 ° C por 3 min, seguidos por 35 ciclos a 98 ° C por 30 s, 55 ° C por 30 s e 72 ° C por 45 s, com extensão final a 72 ° C por 5 min. A confirmação da amplificação foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (m/v) e a purificação usando beads da Agentcourt AMPure XP-PCR (Beckman Coulter, EUA).

Em seguida, os fragmentos foram submetidos a uma nova PCR para a inserção dos identificadores de sequenciamento (indexes ou barcodes), usando 25,0  $\mu$ L de 2X KAPA HiFi Ready Start Mix (Roche, Switzerland) o kit Nextera XT Index (Illumina, EUA). Em seguida, houve uma nova purificação com beads Agentcourt AMPure XP-PCR (Beckman Coulter, EUA). As bibliotecas foram então quantificadas por fluorimetria, utilizando o kit dsDNA BRAssay (Invitrogen, EUA) em fluorímetro Qubit 2.0 (Thermo Fischer Scientific, EUA).

Quantidades equimolares de cada uma das amostras indexadas foram misturadas em uma única solução, formando um pool que foi diluído a 10 pMol e desnaturado com 25% de PhiX (Illumina, EUA) para a introdução no sequenciador. O sequenciamento foi realizado na Central de Genômica e Bioinformática (CeGenBio), na plataforma Illumina MiSeq (Illumina, EUA) utilizando o kit de reagente Miseq V2-300 ciclos (Illumina, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

#### **4.4.3 Processamento de dados**

Os 12 *datasets* obtidos no sequenciamento foram analisados utilizando ferramentas bioinformáticas através do programa RStudio (R v4.3.1.). Após a obtenção dos arquivos FASTQ demultiplexados foi realizada a remoção dos primers e dos adaptadores por meio do Cutadapt v3.5. A qualidade das leituras *forward* e *reverse* foram analisadas utilizando o pipeline do DADA2 v1.16, bem como o processo de construção dos dados de ASV (Variante de Sequência de Amplicon) que são sequências únicas diferenciadas por apenas um nucleotídeo. Como resultado foi obtida uma tabela de ASV sem quimeras. A assinatura taxonômica foi realizada utilizando como base o banco de dados SILVA 138 SSU. Para as análises posteriores foram eliminadas as sequências de Eukaryota e Archaea, bem como de mitocôndrias e cloroplastos. Para as análises de bacterioma foi utilizado o pacote Phyloseq (v1.46.0). Para estimar a representatividade da amostragem para a determinação da comunidade bacteriana, foram feitas curvas de rarefação.

#### 4.4.4 Análises estatísticas, alfa e beta diversidade

Todas as estatísticas foram realizadas usando o pacote Vegan v2.6.4, e os gráficos gerados usando Ggplot2 v3.5.0. Para estimar os índices de diversidade alfa foram utilizados os testes (Chao1, Shannon e InvSimpson). A análise do diagrama de Venn foi realizada para calcular as ASVs compartilhadas entre os quatro conjuntos de tratamentos, bem como a determinação das bactérias centrais ou “*bacteria core*”, consistentemente presentes em todos os tratamentos (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>). Uma análise diferencial de abundância foi realizada a fim de observar o impacto da adição do inoculante em gêneros específicos. Para a visualização de diversidade beta, foi calculada uma matriz de dissimilaridade de Bray-Curtis, com base na abundância relativa das ASVs, a qual foi utilizada para realizar Método de Agrupamento não Ponderado de Média Aritmética (UPGMA) e Análises de Coordenadas Principais (PCoA) a nível de gênero. Para observar a diferença entre os tratamentos (adição de *Pseudomonas* sp. P119 e tempo) foi utilizado o teste Teste t de Student.

#### 4.4.5 Análise de rede de interações microbianas (*Network Analysis*)

A fim de avaliar as interações entre o bacterioma do ninho, bem como o impacto da adição do inoculante nessas interações, foi realizada uma análise de interações microbianas (*Network Analysis*). Toda a construção das redes foi realizada no programa RStudio (R v4.3.1.). Para a obtenção da matriz de dissimilaridade de Bray-Curtis e criação das redes foi utilizado o programa Phyloseq (v1.46.0). Em seguida foi realizada a montagem das redes e extração das métricas através do pacote Igraph (v1.5.0). A medida de Bray-Curtis foi utilizada para avaliar as dinâmicas nas comunidades microbianas através da análise da similaridade na composição taxonômica entre diferentes amostras visando a identificação de padrões de comunidade ou diferenças na abundância de espécies microbianas.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Identificação da espécie do ninho de espuma

A espécie de girino coletado do ninho de espuma utilizado no trabalho foi identificada como *Leptodactylus vastus*. Na Tabela 3 são mostrados os cinco principais *hits*, resultados do BLAST a partir dos dados do GenBank, que se encontram ordenados por porcentagem de identificação, sendo os dois primeiros 100% semelhantes à sequência do espécime analisado. A porcentagem mínima de similaridade entre as sequências analisadas (Query Cover) e as sequências encontradas no banco de dados foi de 89%.

**Tabela 3** – Cinco principais hits no BLAST para a identificação do espécime de girino do ninho de espuma coletado.

Identificações mais relacionadas no GenBank	Nome da espécie	Query Cover	ID (%)	Número de acesso
<i>Leptodactylus vastus</i> voucher TG423 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	<i>Leptodactylus vastus</i>	97%	100.00%	KU495363.1
<i>Leptodactylus vastus</i> voucher CFBHT13593 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	<i>Leptodactylus vastus</i>	89%	100.00%	KU495362.1
<i>Leptodactylus vastus</i> voucher UFBA 184/6239 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	<i>Leptodactylus vastus</i>	98%	99.83%	MH004305.1
<i>Leptodactylus vastus</i> voucher TG429 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	<i>Leptodactylus vastus</i>	97%	99.82%	KU495368.1
<i>Leptodactylus vastus</i> voucher TG428 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	<i>Leptodactylus vastus</i>	97%	99.82%	KU495367.1

Fonte: Elaborado pela autora. O resultado do BLAST indica a espécie como sendo *Leptodactylus vastus*.

### 5.2 Genoma dos isolados P119, P137 e B8

#### 5.2.1 Montagem dos genomas

Como resultado da montagem dos três genomas completos dos três isolados analisados, foram obtidos três genomas rascunhos. De forma geral, a montagem *de novo* dos genomas apresentou uma baixa contiguidade ( $N50 < 60\text{Kpb}$ ), isso ocorreu devido à baixa cobertura e qualidade das sequências (Tabela 4; Tabela 5; Tabela 6; Figura 13; Figura 14; Figura 15; Figura 16; Figura 17; Figura 18).

**Tabela 4** – Estatísticas da montagem genômica do isolado *Pseudomonas* sp. P119

Dados do sequenciamento		Estatística da montagem		Estatística da anotação gênica	
N° de leituras	2.242.656	N° de scaffolds (>500pb)	269	N° de genes	5.689
Total pares de base (pb)	336.135.524	Tamanho total da montagem (pb)	6.233.933	N° rRNA	4
Comprimento das leituras (pb)	50 - 131	N50 (pb)	51.512	N° tRNA	52
		Scaffold L50	37°	N° tmRN	1
		Conteúdo GC (%)	62.22		

Fonte: Elaborado pela autora.

**Tabela 5** – Estatísticas da montagem genômica do isolado *Pseudomonas* sp. P137

Dados do sequenciamento		Estatística da montagem		Estatística da anotação gênica	
N° de leituras	1.419.850	N° de scaffolds (>500pb)	248	N° de genes	5.778
Total pares de base (pb)	261.214.698	Tamanho total da montagem (pb)	6.338.338	N° rRNA	5
Comprimento das leituras (pb)	50 - 131	N50 (pb)	53.401	N° tRNA	59
		Scaffold L50	38°	N° tmRN	1
		Conteúdo GC (%)	62.78		

Fonte: Elaborado pela autora.

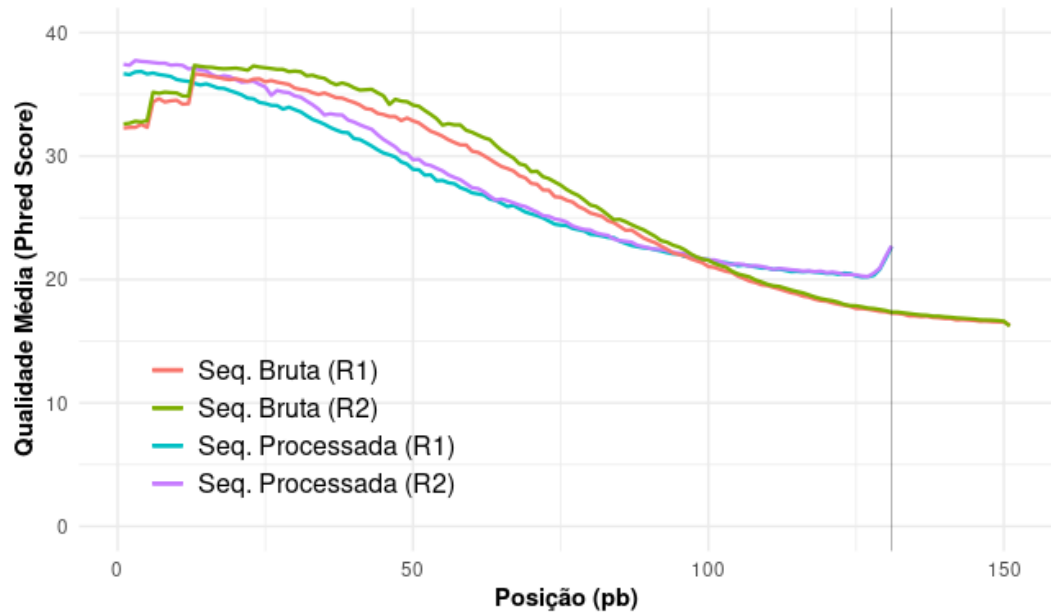
**Tabela 6** – Estatísticas da montagem genômica do isolado *Pseudomonas* sp. B8

Dados do sequenciamento		Estatística da montagem		Estatística da anotação gênica	
N° de leituras	1.409.576	N° de scaffolds (>500pb)	226	N° de genes	5.594
Total pares de base (pb)	258.123.561	Tamanho total da montagem (pb)	6.156.165	N° rRNA	4
Comprimento das leituras (pb)	50 - 131	N50 (pb)	56.076	N° tRNA	55
		Scaffold L50	36°	N° tmRN	1
		Conteúdo GC (%)	62.8		

Fonte: Elaborado pela autora.

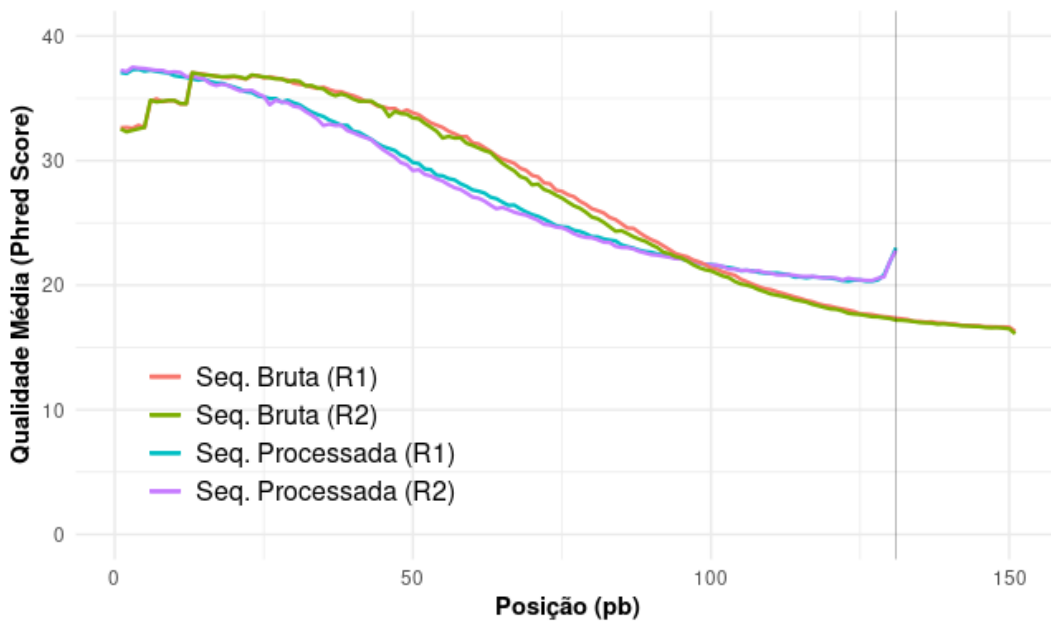


**Figura 13** - Qualidade média por base dos dados brutos e processados da bactéria *Pseudomonas* sp. P119.



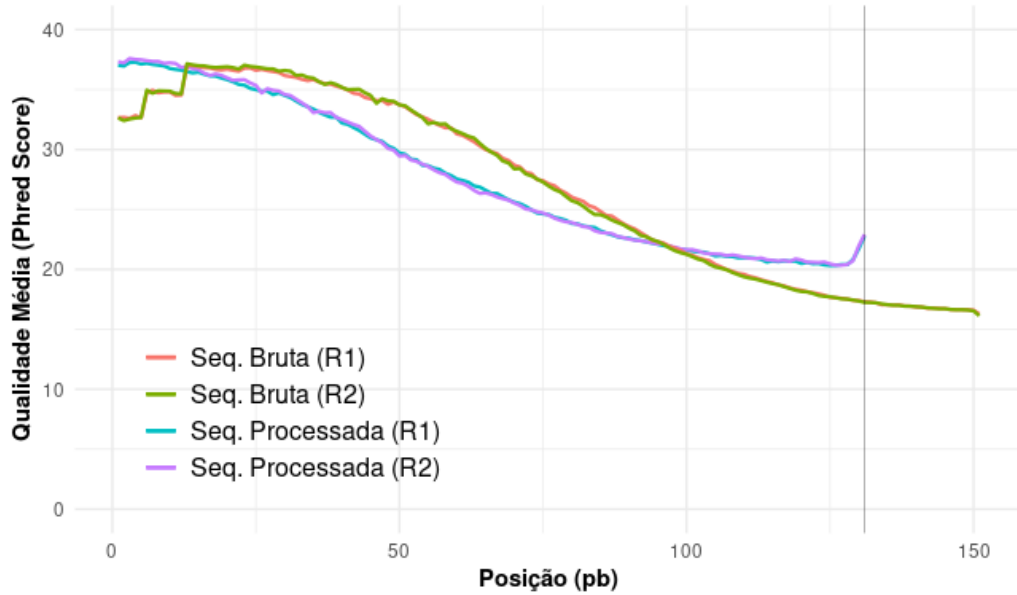
Fonte: Elaborado pela autora.

**Figura 14** - Qualidade média por base dos dados brutos e processados da bactéria *Pseudomonas* sp. P137.



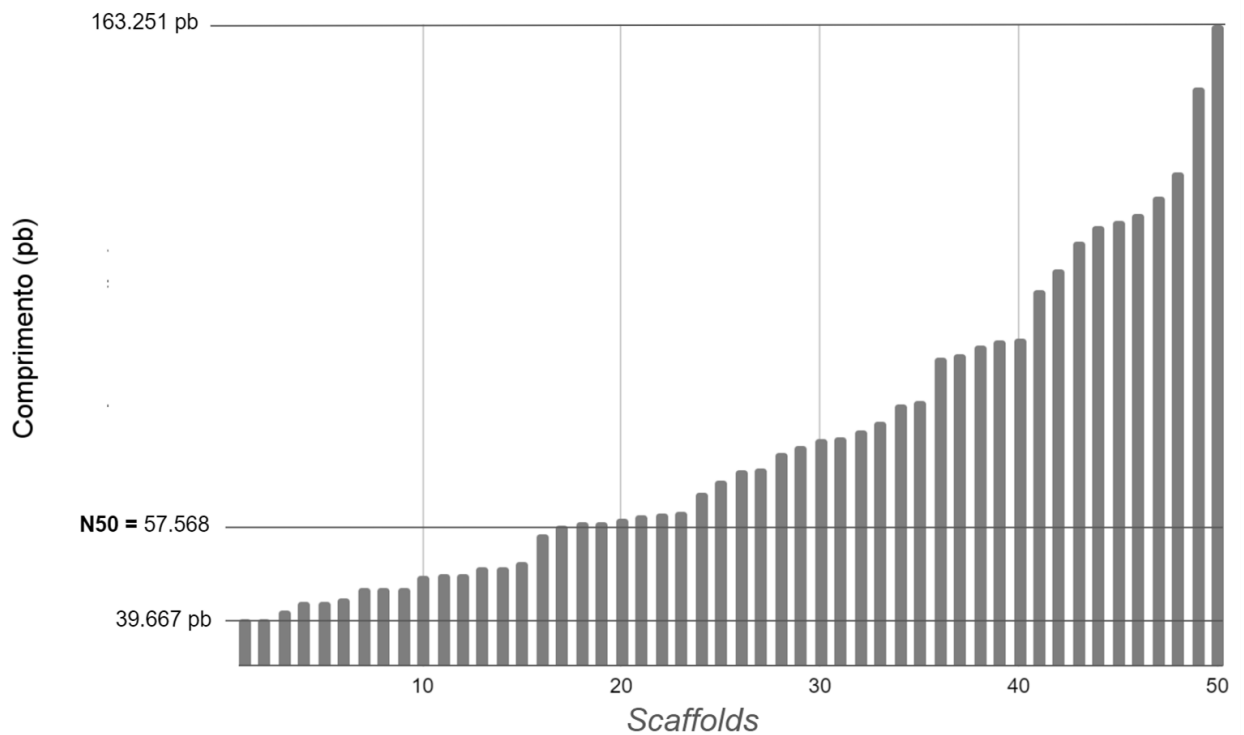
Fonte: Elaborado pela autora.

**Figura 15** - Qualidade média por base dos dados brutos e processados da bactéria *Pseudomonas* sp. B8.



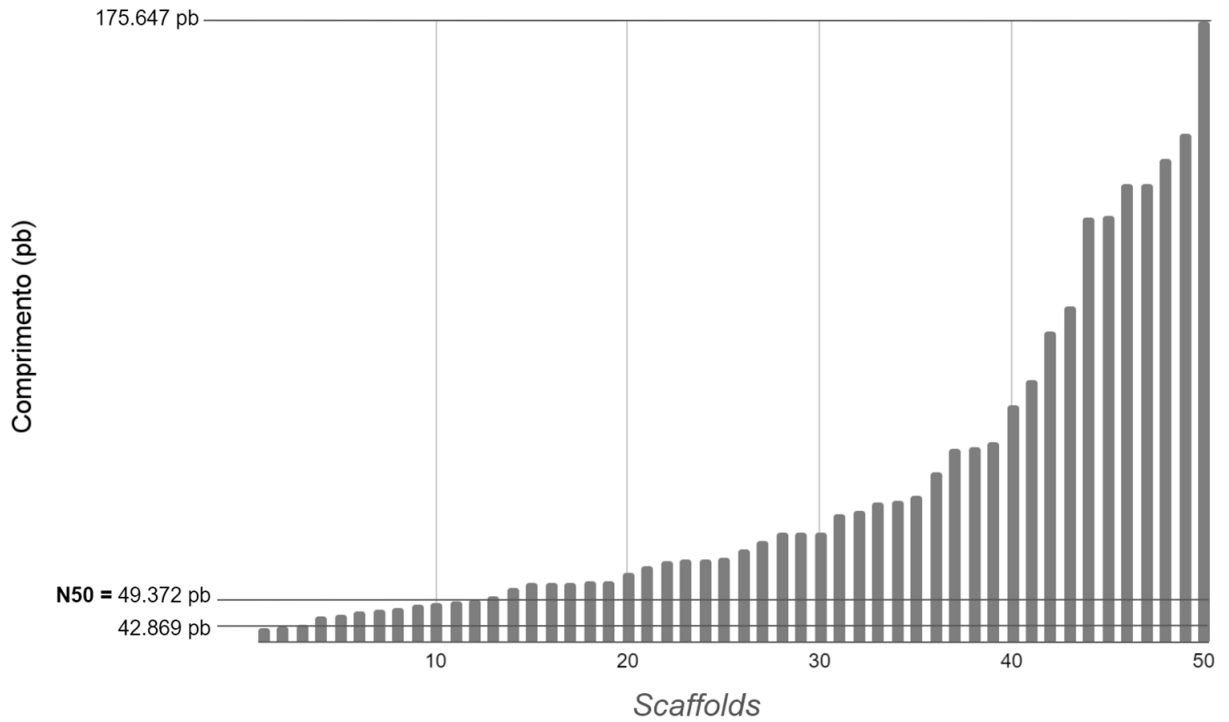
Fonte: Elaborado pela autora.

**Figura 16** - Comprimentos dos *scaffolds* gerados na montagem do genoma da bactéria *Pseudomonas* sp. P119.



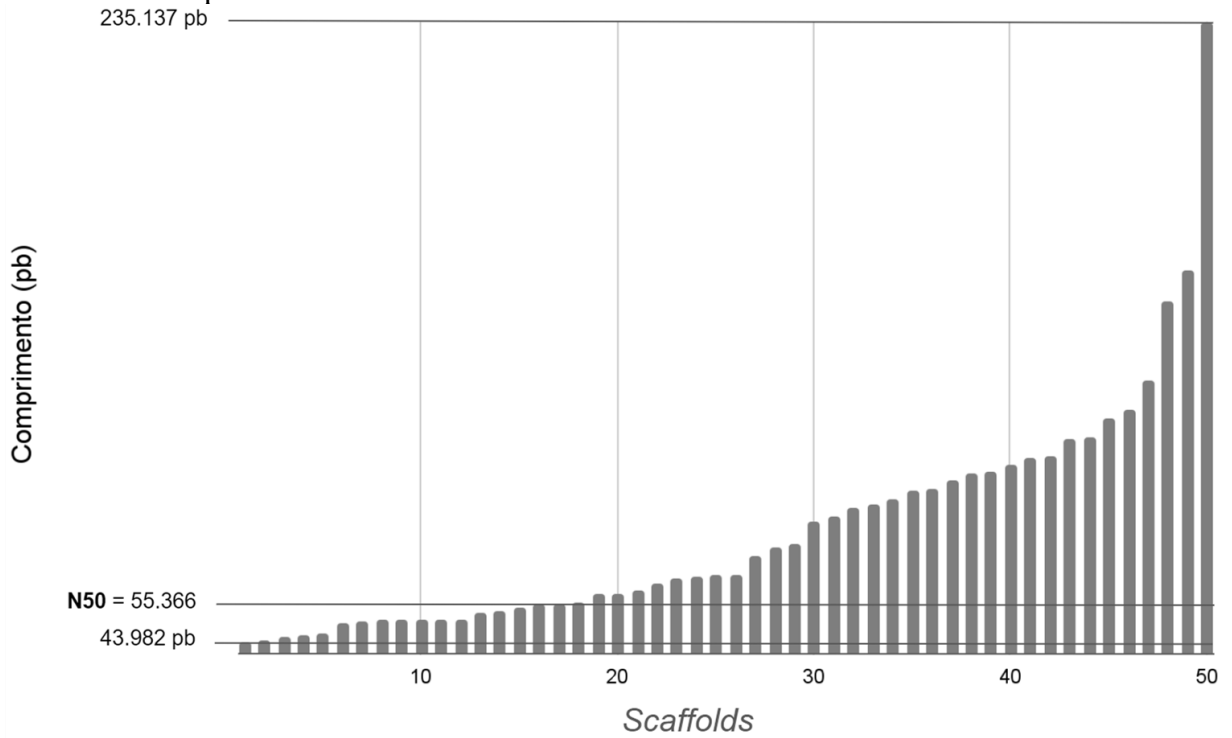
Fonte: Elaborado pela autora.

**Figura 17** - Comprimentos dos *scaffolds* gerados na montagem do genoma da bactéria *Pseudomonas* sp. P137.



Fonte: Elaborado pela autora.

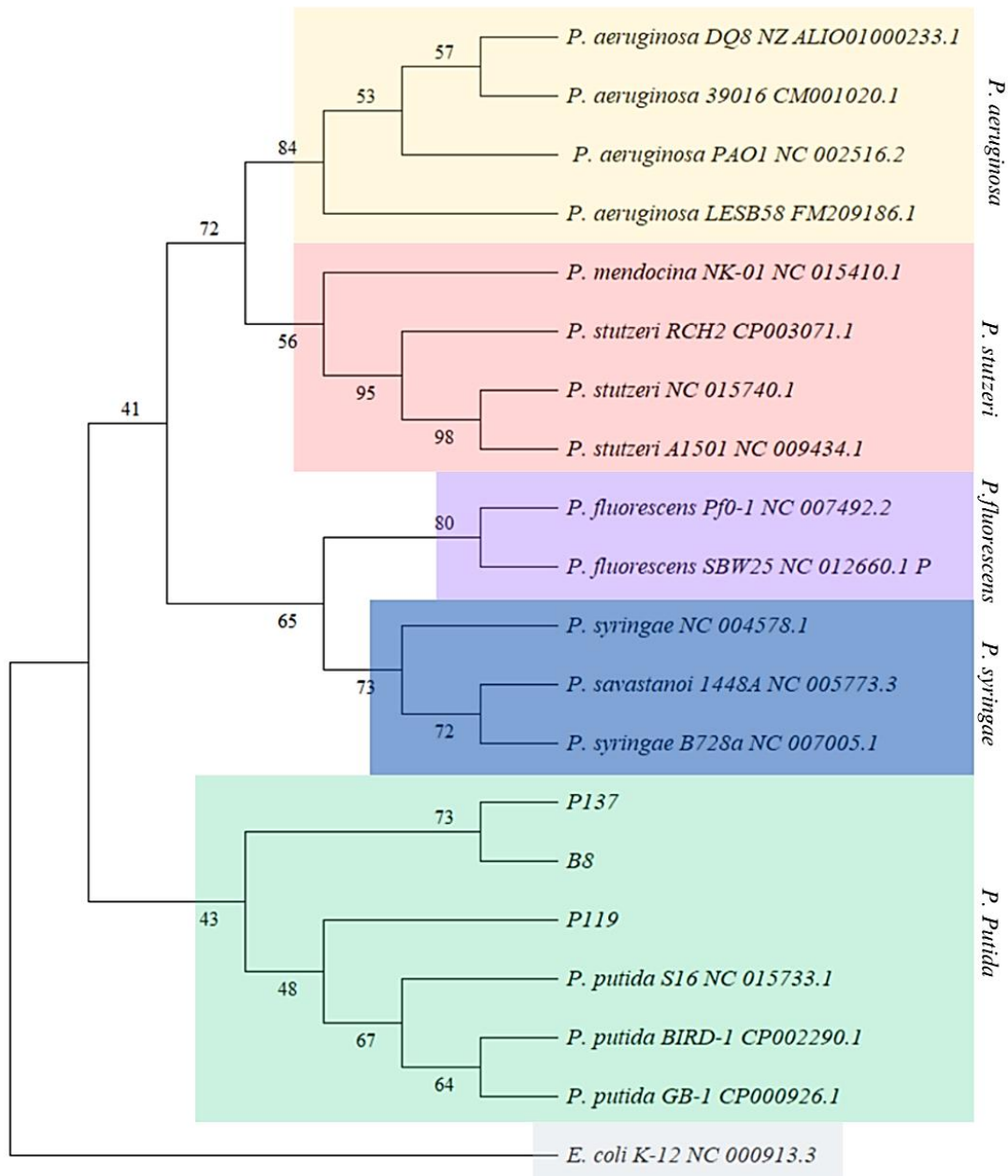
**Figura 18** - Comprimentos dos *scaffolds* gerados na montagem do genoma da bactéria *Pseudomonas* sp. B8.



Fonte: Elaborado pela autora.

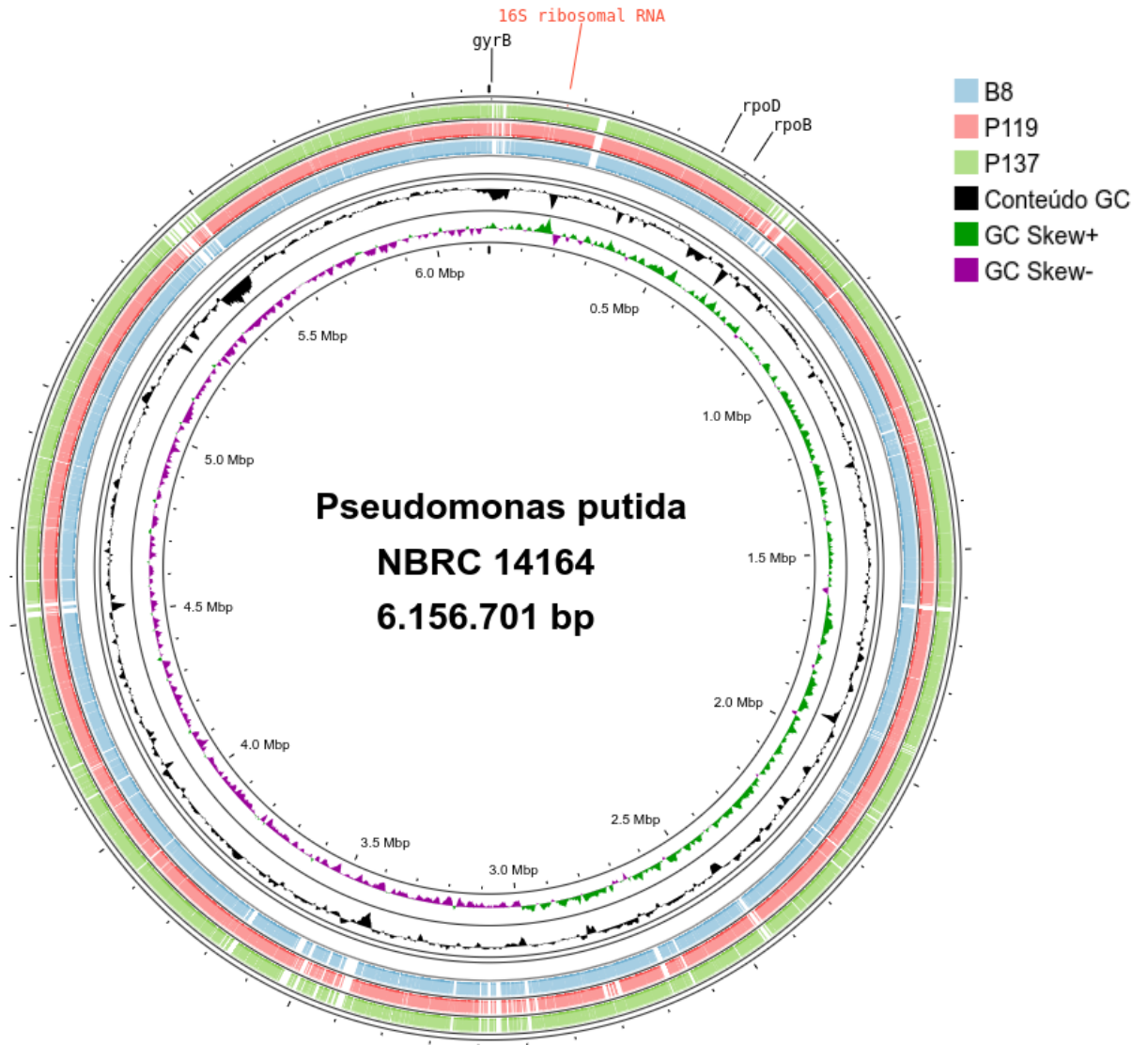
Mesmo com a baixa contiguidade do genoma foi possível realizar a busca por genes de interesse que possibilitaram a identificação das espécies dos isolados, sendo então possível determinar que as três cepas se encontram contidas dentro do grupo de *Pseudomonas putida* (Figura 19). As três cepas são demonstradas alinhadas contra o genoma de referência de *Pseudomonas putida* NBRC 14164 (Figura 20).

**Figura 19** - Árvore filogenética com as principais linhagens de *Pseudomonas* e a cepa P119, P137 e B8, montada a partir da análise concatenada dos genes rpoB – gyrB – rRNA 16s.



Fonte: Elaborado pela autora.

**Figura 20** - Comparação genômica de um genoma de referência de *Pseudomonas putida* NBRC 14164 contra o genoma das cepas P119, P137 e B8.



Fonte: Elaborado pela autora. De fora para dentro os três anéis mais externos representam os genomas das cepas P119, P137 e B8. O mais interno contém os gráficos do conteúdo GC. Os genes utilizados para a identificação molecular aparecem representados na figura.

### 5.2.2 Busca de genes antifúngicos e genes de patogenicidade

No genoma anotado também foi possível encontrar alguns genes envolvidos na biossíntese de antifúngicos como fenazina (*phzF*) e cianeto de hidrogênio (*hcnC* e *hcnB*) (Tabela 7). A estirpe *Pseudomonas putida* P119 se demonstrou a mais promissora com três genes detectados no seu genoma (Tabela 7; Figura 21). Na estirpe *Pseudomonas putida* P137 foi detectado um gene (Tabela 7; Figura 22) e na estirpe *Pseudomonas putida* B8 não foi possível identificar genes relacionados a atividade antifúngica (Tabela 7; Figura 23). Não foram

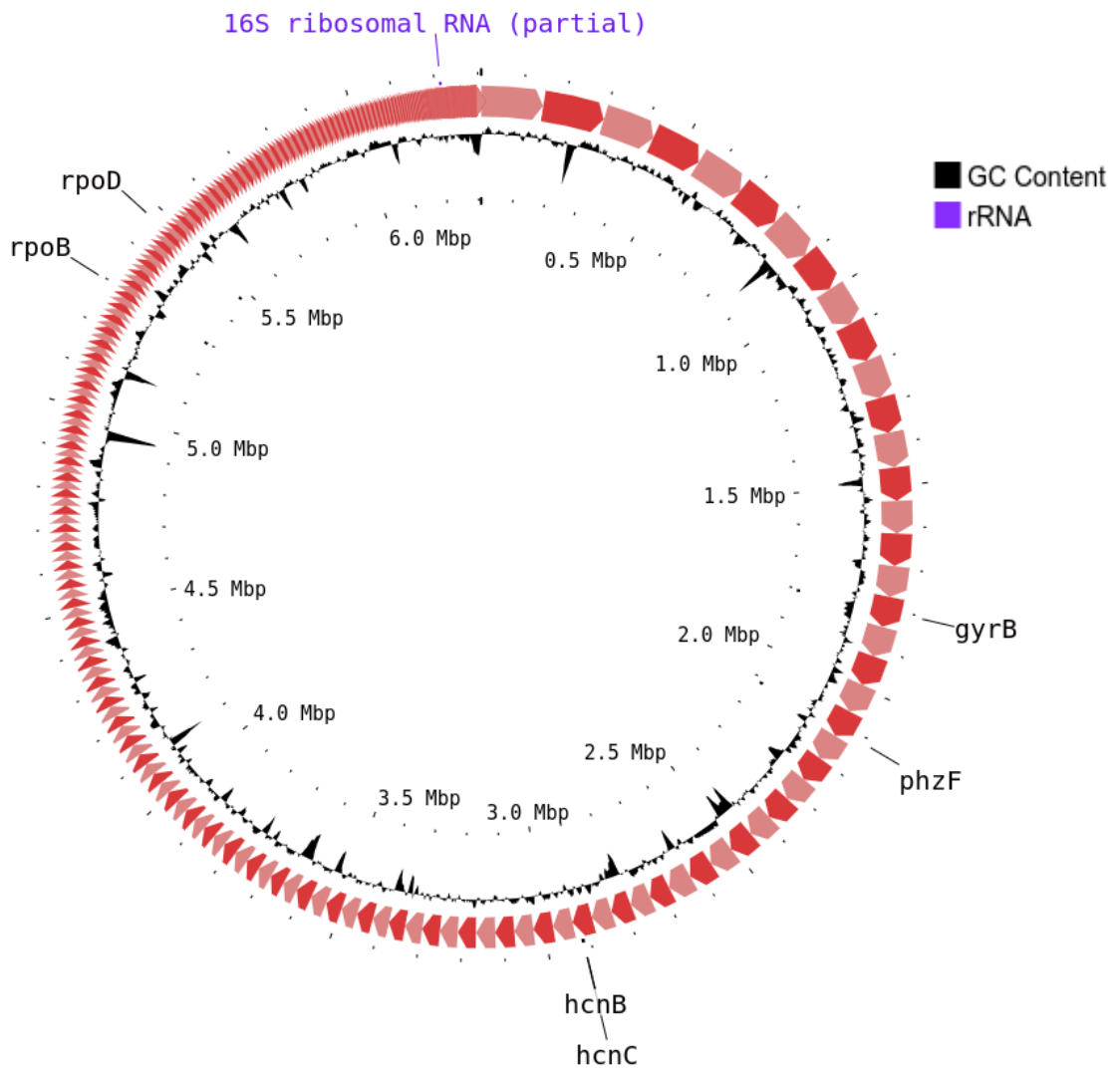
encontrados genes já relatados na literatura pela produção de metabólitos anti-Bd. E por fim, não foram encontrados genes relacionados à resistência à antibióticos.

**Tabela 7** – Genes relacionados à atividade antifúngica encontrados no genoma das cepas *Pseudomonas putida* P119, *Pseudomonas putida* P137 e *Pseudomonas putida* B8.

Estirpe	Genes
P119	phzF, hcnC e hcnB
P137	phzF
B8	na

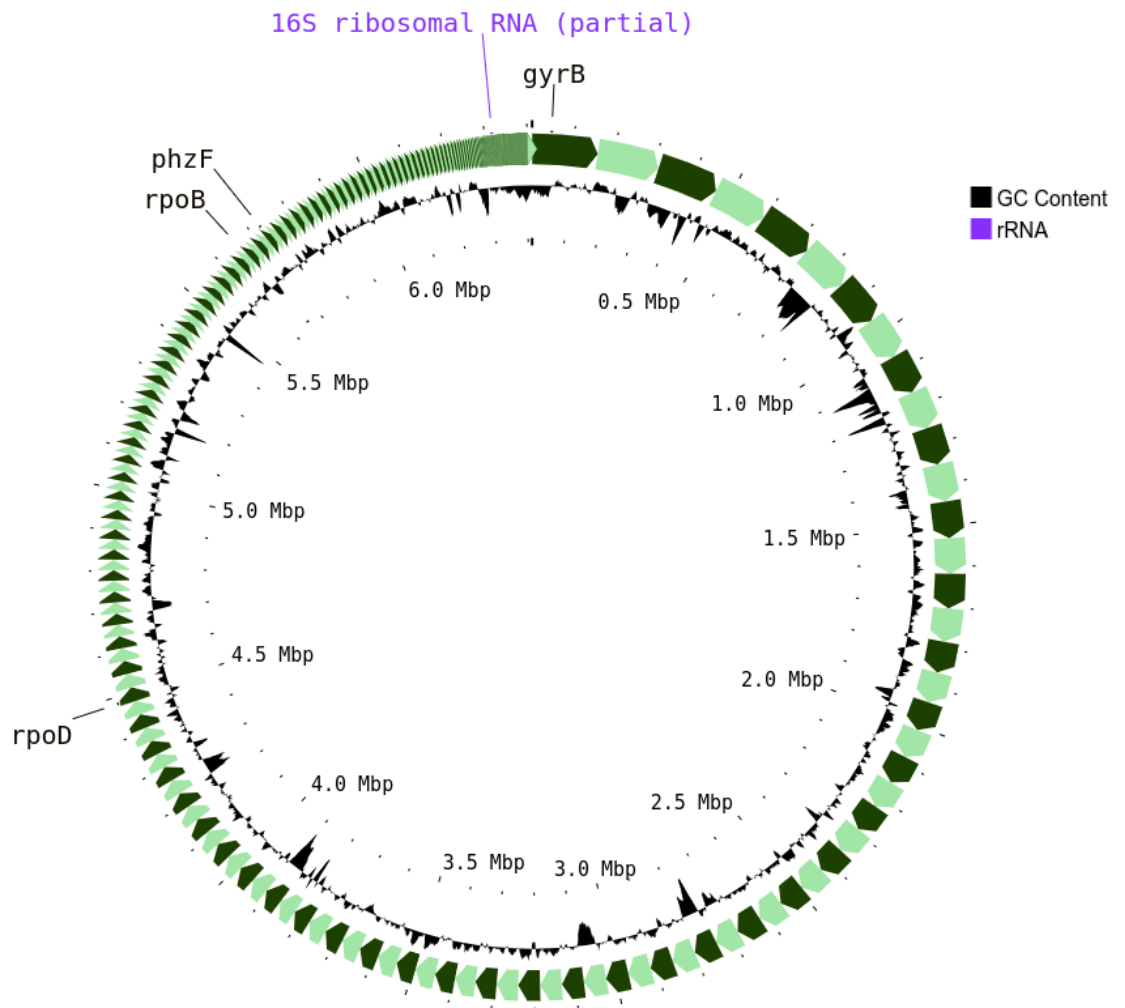
Fonte: Elaborado pela autora.

**Figura 21** - Anotação gênica de *Pseudomonas putida* P119 mostrando genes de interesse.



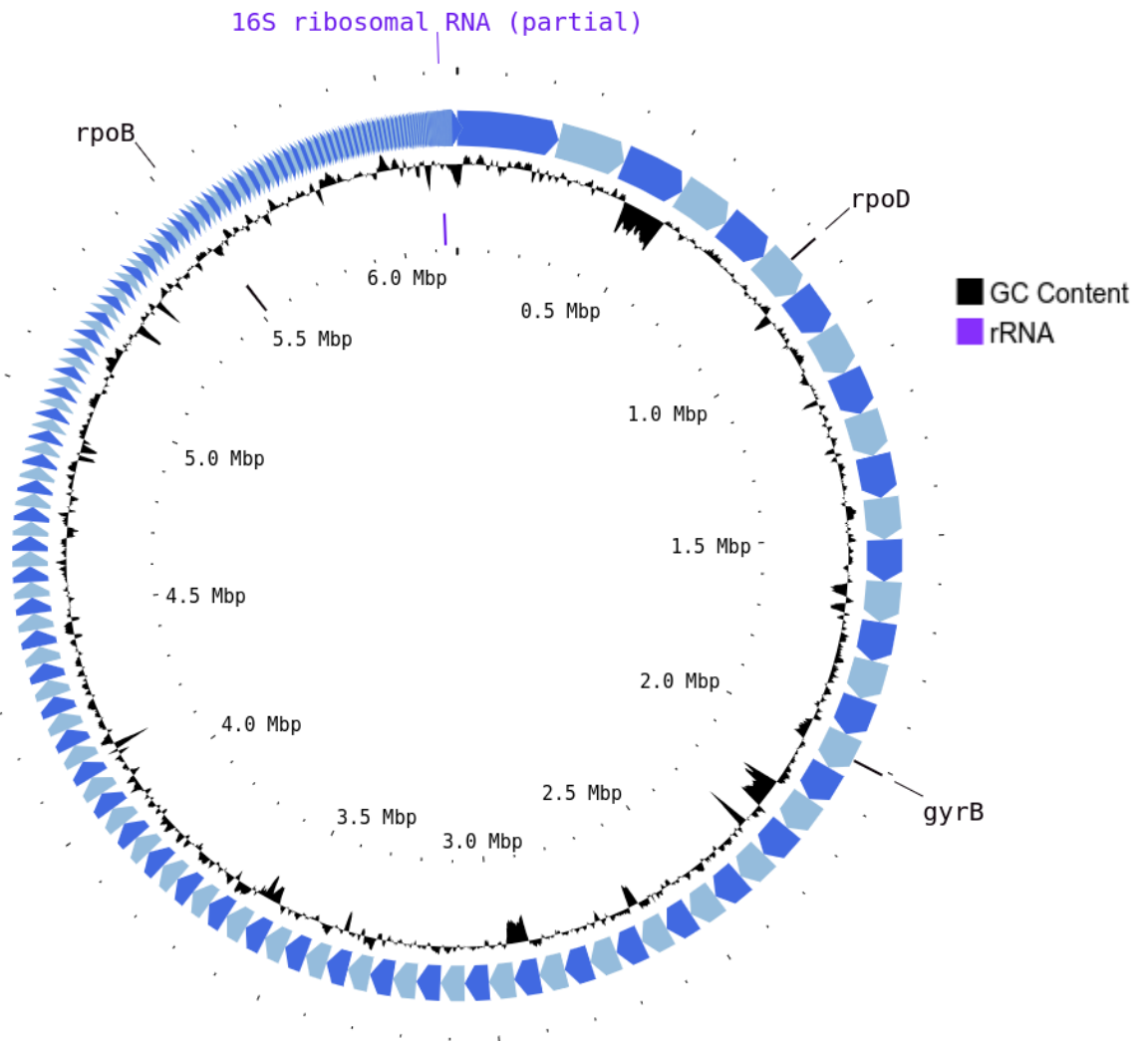
Fonte: Elaborado pela autora.

**Figura 22** - Anotação gênica de *Pseudomonas putida* P137 mostrando genes de interesse.



Fonte: Elaborado pela autora.

**Figura 23** - Anotação gênica de *Pseudomonas putida* B8 mostrando genes de interesse.



Fonte: Elaborado pela autora.

### 5.3 Ensaio de bioaumentação *in vitro* em ninhos de espuma e caracterização do bacterioma.

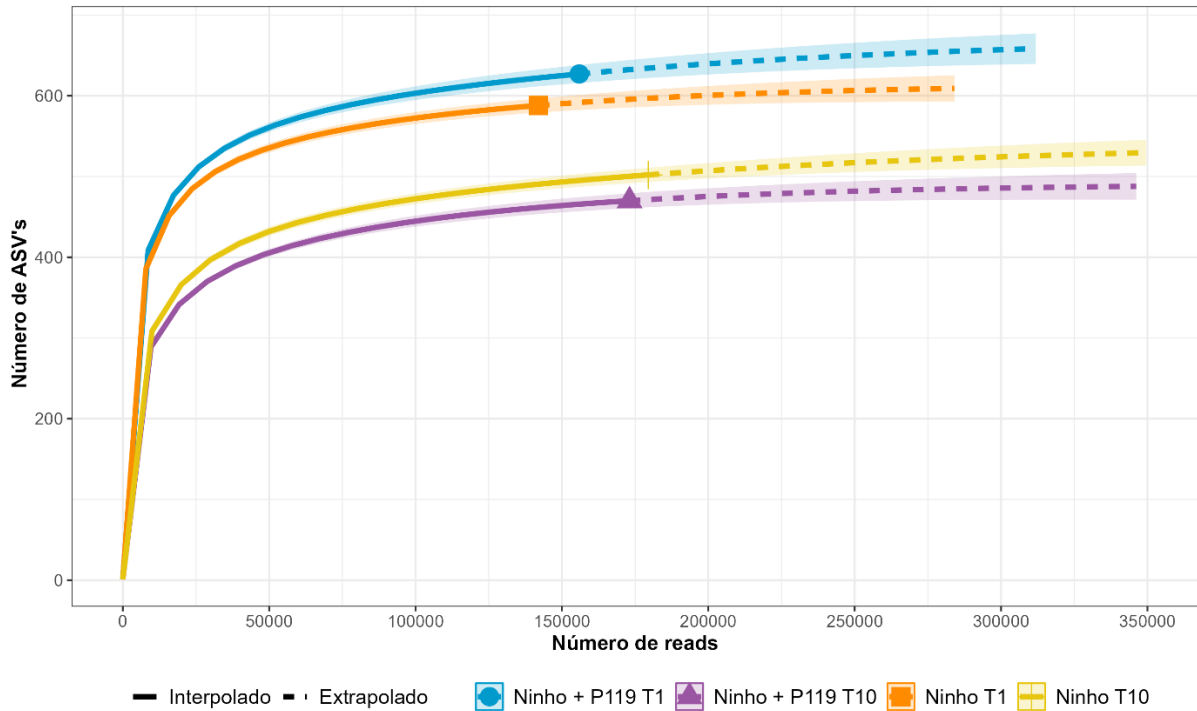
#### 5.3.1 Estimativa de riqueza e diversidade bacteriana

Como resultado do sequenciamento das 12 amostras, foram obtidas 12 bibliotecas de alta qualidade, com o total de 1.736.941 seqüências brutas, restando 650.524 após a exclusão de seqüências de baixa qualidade, seqüências curtas, seqüências quimeras e seqüências de Arqueias, Mitocôndrias e Cloroplastos. No geral foram obtidas mais seqüências das amostras relativas ao Tempo 1 quando comparado ao Tempo 10, independente do tratamento com o inoculante. Foi possível observar que mesmo as curvas de rarefação feitas para as Variantes de



Sequência de Amplicon (ASVs) não atingindo as assíntotas, os valores se encontraram bastante próximos, não comprometendo dessa forma a realização das análises (Figura 24).

**Figura 24** - Curvas de rarefação para as variantes de sequência de amplicon (ASVs) referente às amostras do teste de bioaugmentação *in vitro* em ninho de espuma.



Fonte: Elaborado pela autora.

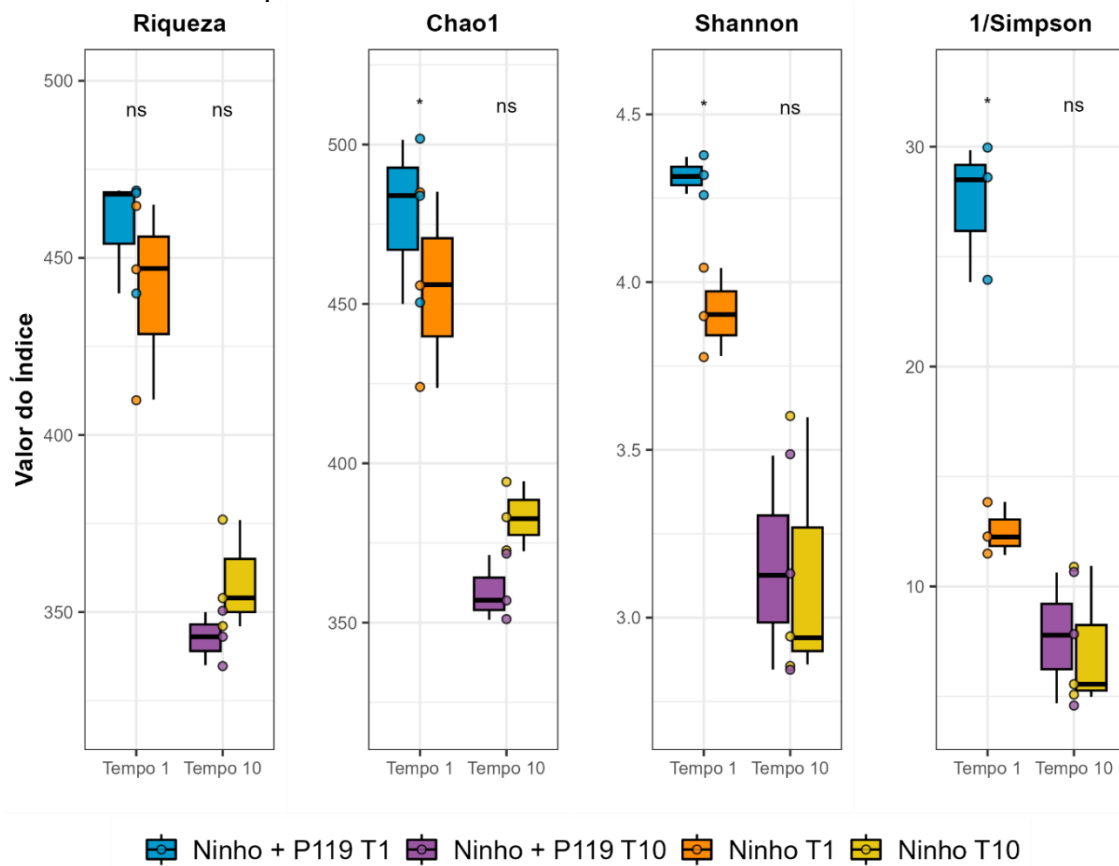
Com os dados obtidos foram gerados os índices de alfa diversidade apresentados na Tabela 8. A riqueza entre os tratamentos foi comparada nos tempos 1 e 10, revelando a ausência de diferenças significativas. Entretanto, ao analisar o Índice de Shannon, verificou-se uma diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos apenas no Tempo 1 ( $p = 0,027$ ), juntamente com o estimador Chao1 ( $p = 0,023$ ) e o índice de 1/Simpson ( $p = 0,01$ ) (Figura 25). Já ao contrastar cada tratamento em ambos os tempos, nota-se que todos os índices não apresentaram diferenças significativas no Tempo 1. Por outro lado, no Tempo 10, todos os índices exibiram diferenças significativas (Riqueza observada  $p = 0,008$ ; Shannon  $p = 0,02$ ; Chao1  $p = 0,013$ ; 1/Simpson  $p = 0,013$ ), demonstrando que o tempo foi um fator determinante na mudança da alfa diversidade dos tratamentos (Figura 26).

**Tabela 8** – Riqueza e alfa diversidade de ASVs de bactérias referente ao teste de bioaumentação *in vitro* em ninho de espuma.

Riqueza/alfa diversidade	Ninho		Ninho + P119	
	T1	T10	T1	T10
ASVs	588	502	627	470
Chao1	613,62 ± 10,54	540,89 ± 14,76	671,2 ± 16,13	490,02 ± 8,53
Shannon	3,94	3,31	4,37	3,29
Simpson Inverso	12,56	7,45	29,57	8,12

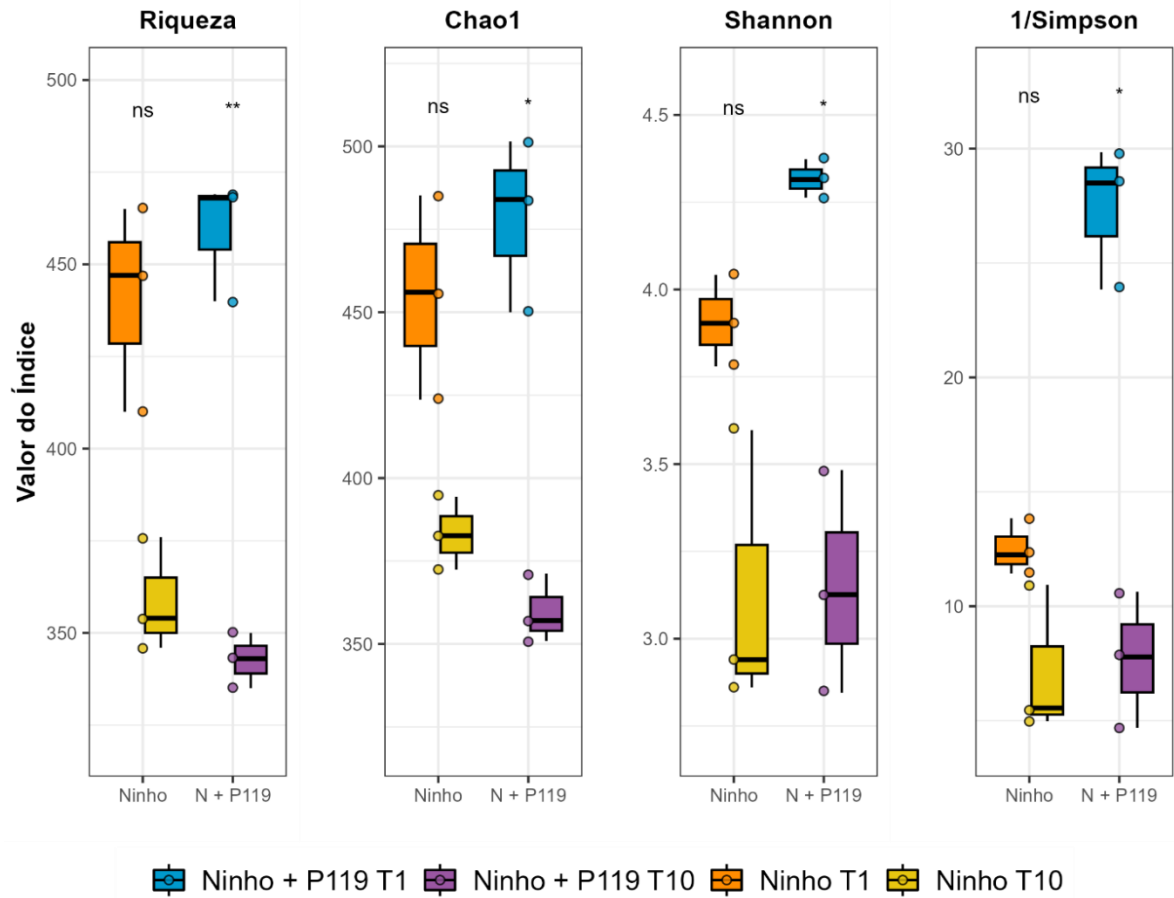
Fonte: Elaborado pela autora.

**Figura 25** - Índices de diversidade alfa referente aos tratamentos do teste de bioaumentação *in vitro* em ninho de espuma.



Fonte: Elaborado pela autora.

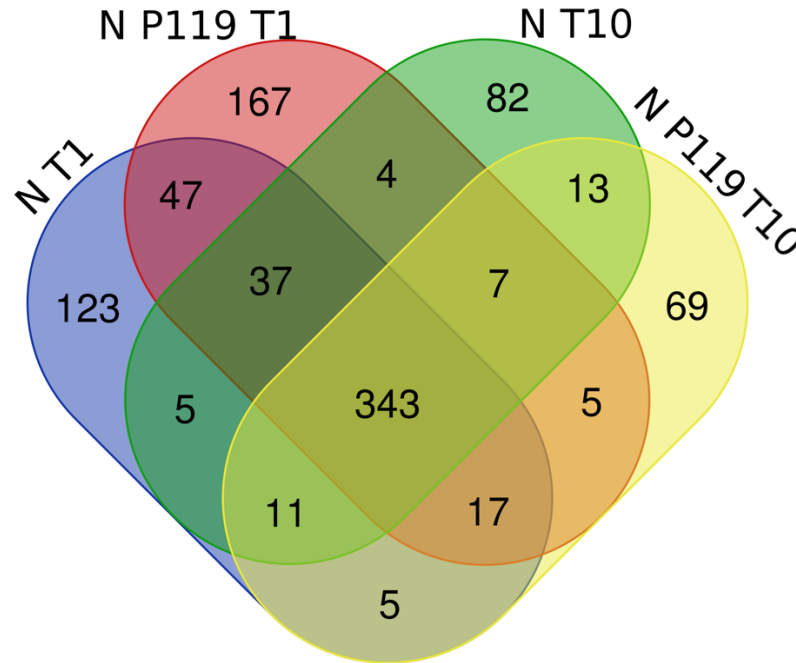
**Figura 26** - Índices de diversidade alfa referente aos tempos do teste de bioaumentação *in vitro* em ninho de espuma.



Fonte: Elaborado pela autora.

Com base em uma análise de diagrama de Venn, o número médio de ASVs únicas associadas à Ninho + P119 T1 ( $n = 167$ ) foi maior do que em Ninho T1 ( $n = 123$ ) (Figura 27). Já quando consideramos o número de ASVs únicas nas amostras do Tempo 10, temos um maior número de ASVs em Ninho T10 ( $n = 82$ ) do que em Ninho + P119 T10 ( $n = 69$ ). O número de ASVs comuns entre todos os tratamentos foi 343. Consideramos essas ASVs comuns como um grupo de ASVs centrais nesses bacteriomas (Core ASVs). O bacterioma central consistiu majoritariamente nos filos Proteobacteria ( $n = 197$ ) e Bacteroidota ( $n = 36$ ), representando no total de sequências 41,17% e 45,79%. A maior representatividade de sequências para Bacteroidota mesmo com um número de ASVs menor, se deu em função de algumas ASVs muito abundantes dentro do filo.

**Figura 27** – Diagrama de Venn de ASVs (Sequências Variáveis de Amplicon) associadas aos tratamentos do teste de bioaumentação *in vitro* em ninho de espuma.

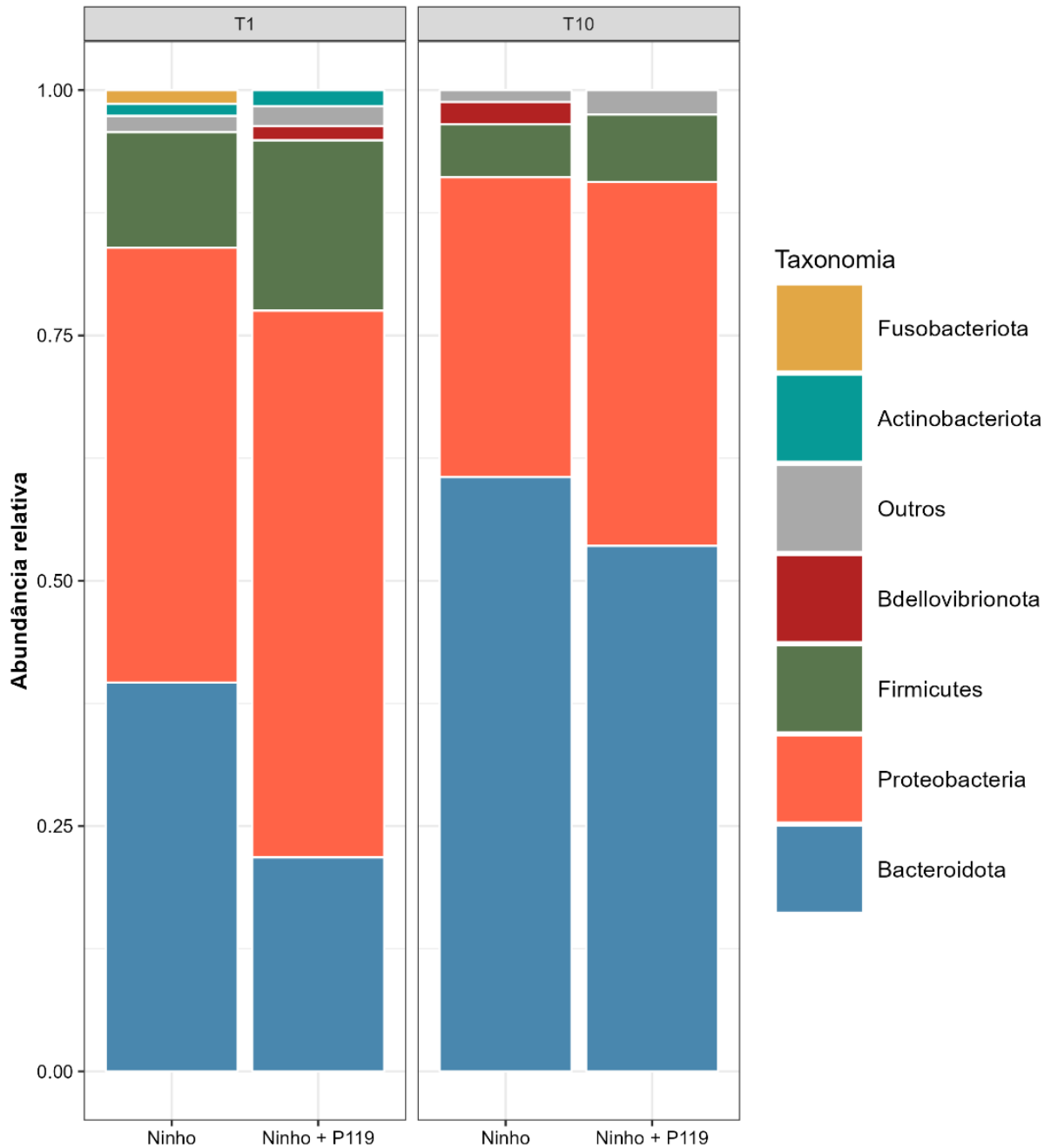


Fonte: Elaborado pela autora.

### 5.3.2 Estrutura e composição da comunidade bacteriana

Considerando todas as amostras, foram identificados 6 filos cujas abundâncias foram superiores a 1%, sendo eles Proteobacteria, Bacteroidota, Firmicutes, Actinobacteriota, Fusobacteriota e Bdellovibrionota (Figura 28). No Tempo 1, sem e com a adição do inoculante, obtivemos uma predominância do Filo Proteobacteria, possuindo uma abundância 44,26% e 55,67% respectivamente, seguido por Bacteroidota, Firmicutes e Actinobacteriota, este último possuindo abundância menor que 5%. O filo Fusobacteriota só se fez presente (1,39%) na ausência de inoculante, enquanto o filo Bdellovibrionota só apareceu em abundância (2,26%) no tratamento Ninho + P119 também com proporções menores que 5%. No Tempo 10, observou-se uma mudança com relação ao filo mais abundante, sendo agora a predominância do filo Bacteroidota, com 60,61% no tratamento Ninho e 53,65% no tratamento Ninho + P119. No tratamento Ninho o filo Proteobacteria apresentou abundâncias de 30,52%, seguido de Firmicutes com 5,4%, similar ao observado no tratamento Ninho + P119, onde tivemos Proteobacteria com 37% e Firmicutes com 6,87%. Nesse tempo foi possível observar também a presença de Bdellovibrionota (2,26%) apenas no tratamento Ninho. Em ambos os tempos e tratamentos, a porcentagem de filos com abundância menor que 1% não ultrapassou os 5%.

**Figura 28** - Abundância relativa de ASVs de bactérias a nível de filo referente às amostras do teste de bioaumentação *in vitro* em ninho de espuma.



Fonte: Elaborado pela autora. Os filos representados possuem abundância acima de 1%. Os demais gêneros com abundância menor que 1% aparece somados como “Outros”.

No Tempo 1 onde houve a predominância de Proteobacteria tivemos no tratamento Ninho, a predominância de duas Classes, Gammaproteobacteria com 22,38% e Alphaproteobacteria com 21,88%. No entanto, a Classe de bactérias mais dominante nesse tempo e tratamento foi Bacteroidia com 39,70%, responsável também pela composição total do filo Bacteroidota. Dentro do Filo Firmicutes a Classe que mais contribuiu para a composição bacteriana do ninho foi Bacilli com 9%. No tratamento Ninho + P119, a predominância foi da

Classe Alphaproteobacteria com 32,86%, seguida de Gammaproteobacteria com 22,81%, Bacteroidia com 21,88% e Bacilli com 13,6%.

Já no Tempo 10, onde houve a predominância de Bacteroidota, obtivemos como consequência uma predominância da Classe Bacteroidia, com 60,61% no tratamento Ninho e 53,65 no tratamento Ninho + P119. Com isso foi observada uma diminuição de contribuição dentro de Proteobacteria, com a Classe Gammaproteobacteria diminuindo sua abundância para 8,7% no tratamento ninho e 15,3% para Ninho + P119. O mesmo não foi observado na Classe Alphaproteobacteria, que manteve percentuais parecidos, com 21,76% para Ninho e 21,69% para Ninho + P119, mostrando que nem o tempo e nem o tratamento possuíram impactaram nesse grupo de microrganismos.

Com relação a composição de gêneros novamente não foi possível observar grandes diferenças quando comparamos os tratamentos sem e com adição do inoculante, sendo observada uma mudança maior entre o Tempo 1 e Tempo 10 (Figura 29). O gênero *Pseudomonas*, relativo ao gênero do inoculante utilizado, apresentou no geral uma frequência muito baixa, estando em abundância menor que 1% nos dois tempos em ambos os tratamentos (Tabela 9). Também não foi possível observar diferença significativa entre os tratamentos (T-test,  $p = 0,11$ ) e nem entre os tempos (T- test,  $p = 0,14$ ).

**Tabela 9** – Abundância total, abundância relativa e média de abundância das amostras relativo ao gênero *Pseudomonas* no ensaio de Bioaugmentação em ninho de espuma.

Métricas	Ninho T1	Ninho + P119 T1	Ninho T10	Ninho + P119 T10
N.º de ASVs	379	52	63	11
Abundância Relativa	0,062%	0,033%	0,036%	0,009%
Média	126,33 ± 88,99	17,33 ± 18,61	21 ± 18,35	3,66 ± 5,50

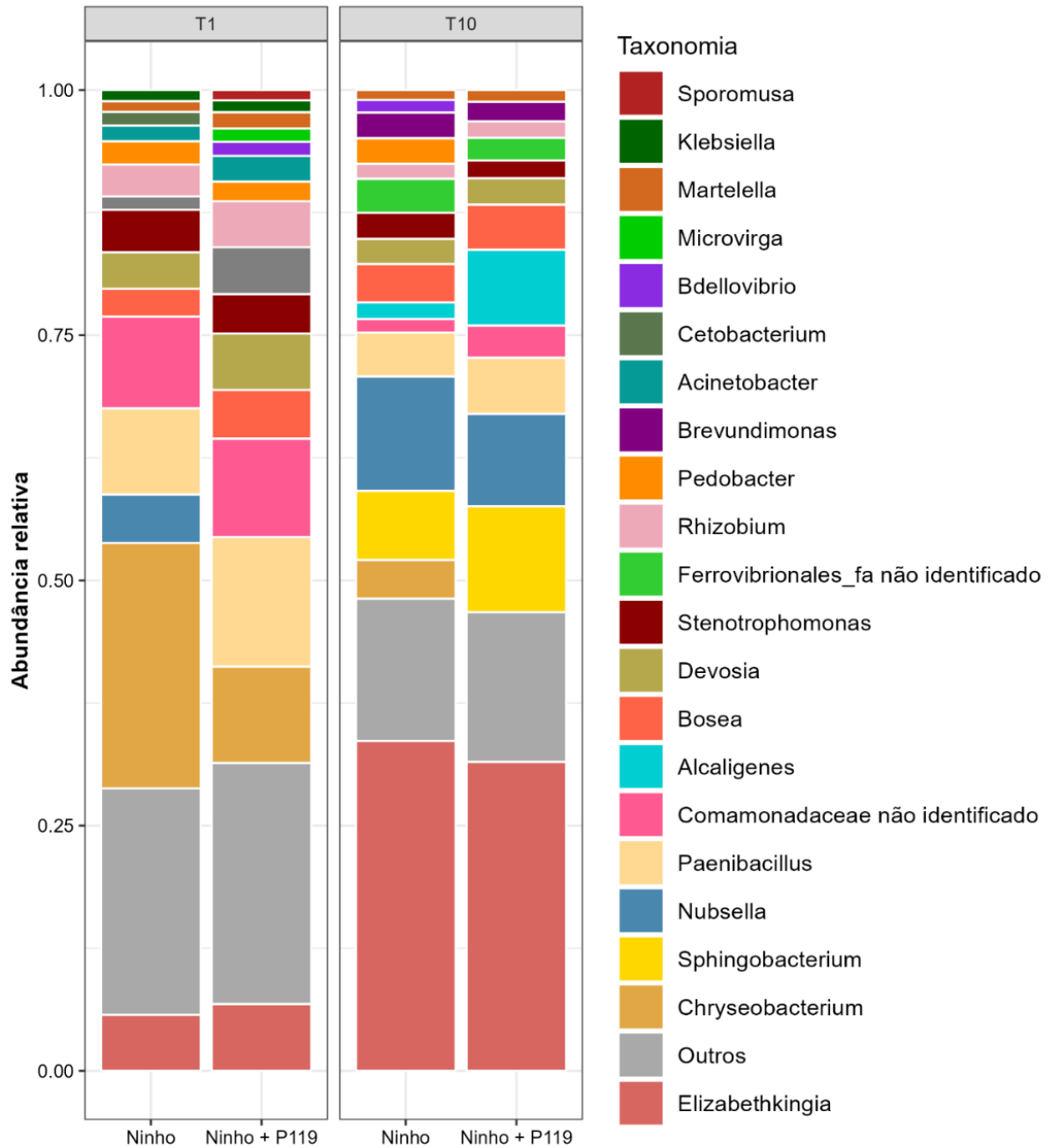
Fonte: Elaborado pela autora.

No Tempo 1 no tratamento Ninho sem inoculante os três gêneros mais abundantes foram os gêneros *Chryseobacterium* com 25%, seguido de um gênero não classificado de Comamonadaceae com 9,42% e *Paenibacillus* com 8,74%. Já no tratamento Ninho + P119 tivemos uma redução na abundância de *Chryseobacterium* para 9,86%, ficando atrás de *Paenibacillus* com 13,18%, que nesse tratamento teve sua abundância aumentada, seguido por um gênero não classificado de Comamonadaceae com 10,16%. Outras diferenças encontradas é que os gêneros *Nubsela* e *Cetobacterium* só apareceram no tratamento Ninho, enquanto os

gêneros *Bdellovibrio*, *Microvirga* e *Sporomusa* se fazem presentes apenas no tratamento Ninho + P119, todos esses gêneros, no entanto, apareceram em abundâncias menores que 5%. Outro ponto interessante é que foram obtidas grandes proporções de gêneros raros, com abundância menor que 1% em ambos os tempos e tratamentos.

No Tempo 10, tivemos um aumento considerável na abundância do gênero *Elizabethkingia* se tornando esse o mais abundante em ambos os tratamentos com 33,65% no tratamento Ninho sem inoculante e 31,55% no tratamento Ninho + P119. Os dois gêneros que completam os três gêneros mais abundantes, também em ambos os tratamentos, foram *Nubsella*, com 11,67% no tratamento Ninho sem inoculante e 9,45% no tratamento Ninho + P119 e *Sphingobacterium* com tratamentos com 7% no tratamento Ninho e 10,82% no tratamento Ninho + P119. O gênero *Chryseobacterium*, que no Tempo 1 se fazia presente em ambos os tratamentos, agora aparece apenas no tratamento Ninho sem inoculante. Outros gêneros que também só se fazem presentes no tratamento Ninho sem inoculante são *Pedobacter* e *Bdellovibrio*, ambos com abundância menor que 5%. No tratamento Ninho + P119 não foi possível observar a ocorrência de gêneros abundantes que não se faziam presentes no tratamento Ninho. Assim, como no Tempo 1, foi possível observar uma grande proporção de bactérias com abundância menor que 1%.

**Figura 29** - Abundância relativa de ASVs de bactérias a nível de gênero referente às amostras do teste de bioaumentação *in vitro* em ninho de espuma.



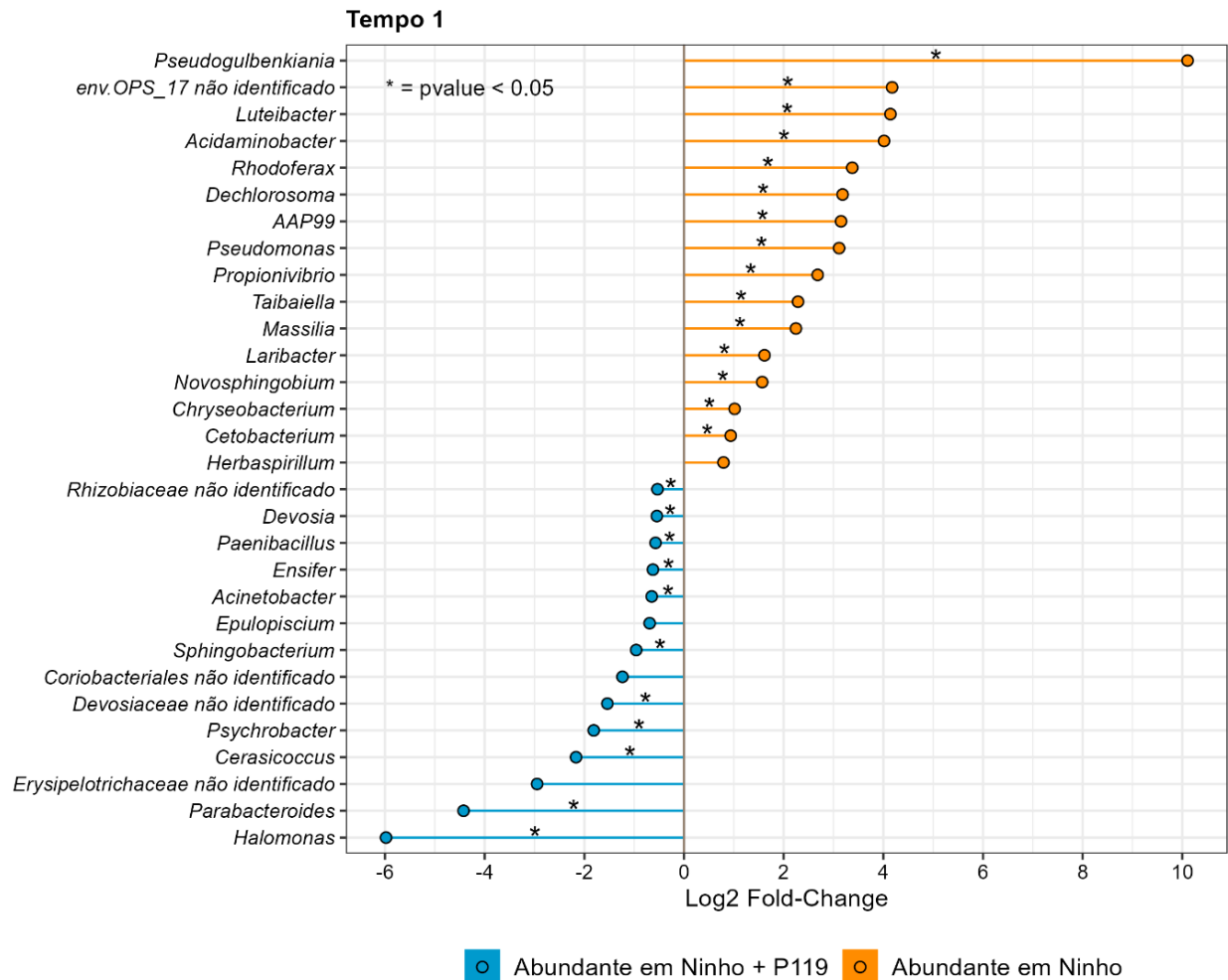
Fonte: Elaborado pela autora. Os gêneros representados possuem abundância acima de 1 %, os demais gêneros com abundância menor que 1% aparece somados como “Outros”.

A análise diferencial de abundância a nível de gênero mostrou quais gêneros tiveram sua abundância influenciada pela adição da bactéria *Pseudomonas putida* P119. No Tempo 1 podemos observar um maior número de gêneros que possuíam mudanças significativas com 11 gêneros influenciados positivamente pela bactéria e 15 gêneros influenciados negativamente (Figura 30). Já no Tempo 10 apenas um gênero foi significativamente influenciado de forma negativa pela bactéria e 3 de forma positiva (Figura 31).

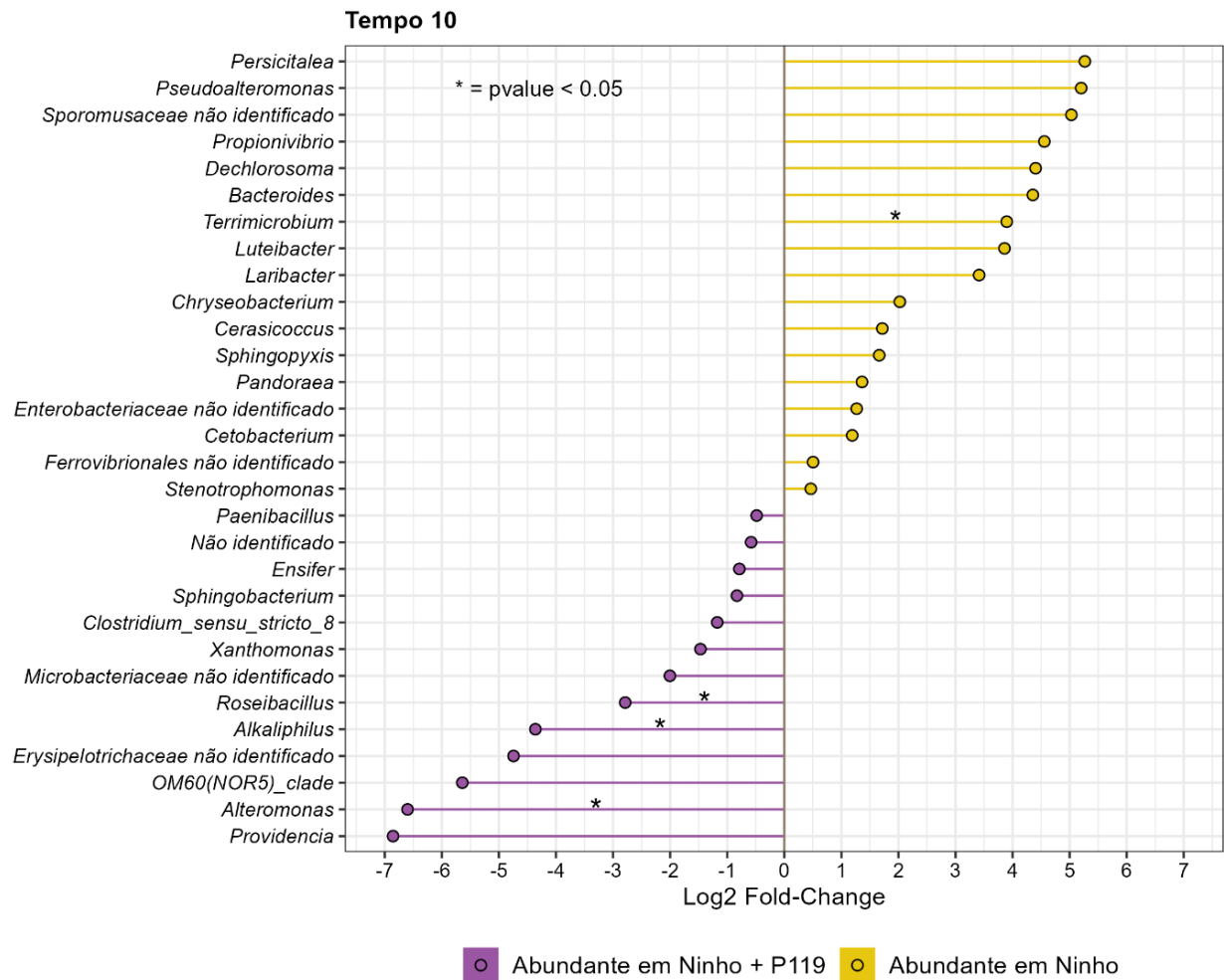


No Tempo 1 com a adição da bactéria tivemos um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) dos gêneros *Unclassified Rhizobiaceae*, *Devosia*, *Paenibacillus*, *Ensifer*, *Acinetobacter*, *Sphingobacterium*, *Unclassified Devosiaceae*, *Psychrobacter*, *Cerasicoccus*, *Parabacteroides* e *Halomonas*, e diminuição dos gêneros *Pseudogulbenkiania*, *Unclassified env.OPS\_17*, *Luteibacter*, *Acidaminobacter*, *Rhodofera*, *Dechlorosoma*, *AAP99*, *Pseudomonas*, *Propionivibrio*, *Taibaiella*, *Massilia*, *Laribacter*, *Novosphingobium*, *Chryseobacterium* e *Cetobacterium*. No Tempo 10 observamos que um menor número de gêneros foi influenciado pela adição da bactéria, com diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) apenas do gênero *Terrimicrobium* e aumento ( $p < 0,05$ ) dos gêneros *Alteromonas*, *Alkaliphilus* e *Roseibacillus*.

**Figura 30** - Análise diferencial de abundância a nível de gênero para as amostras em T1.



Fonte: Elaborado pela autora. Os gêneros que aparecem em laranja indicam quem teve a abundância aumentada com a adição da bactéria *Pseudomonas putida* P119 e os gêneros em azul indicam quem teve a abundância reduzida com a adição da bactéria *Pseudomonas putida* P119, os gêneros que aparecem com asterisco possuem valor de  $p < 0,05$ .

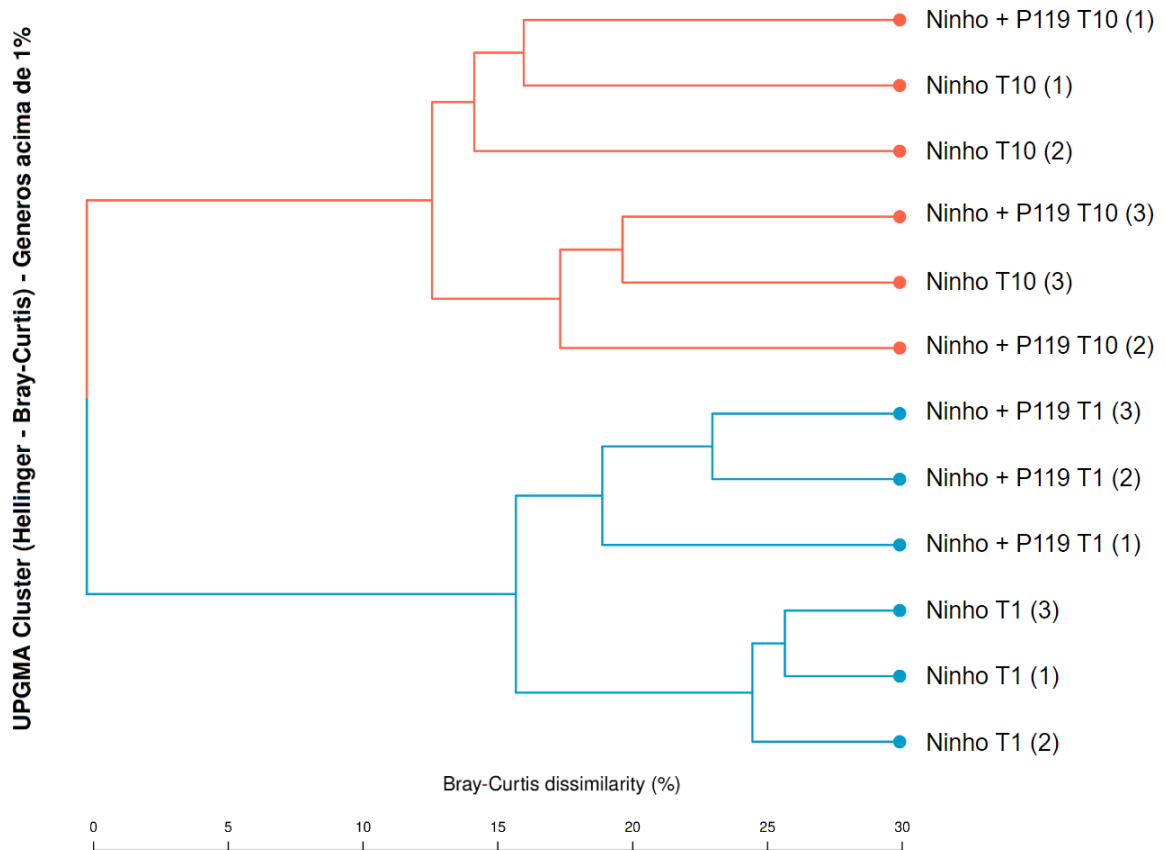
**Figura 31** - Análise diferencial de abundância a nível de gênero para as amostras em T10.

Fonte: Elaborado pela autora. Os gêneros que aparecem em amarelo indicam quem teve a abundância aumentada com a adição da bactéria *Pseudomonas putida* P119 e os gêneros em roxo indicam quem teve a abundância reduzida com a adição da bactéria *Pseudomonas putida*. P119, os gêneros que aparecem com asterisco possuem valor de  $p < 0,05$ .

### 5.3.3 Beta diversidade da comunidade bacteriana

Para avaliar a beta diversidade bacteriana das 12 amostras, foi realizado o método de agrupamento não ponderado de média aritmética (UPGMA) utilizando o algoritmo de Bray-Curtis. Com essa análise para os gêneros mais abundantes ( $> 1\%$ ) foi possível identificar a formação de dois grandes agrupamentos distintos, o primeiro (em vermelho) sendo relativo as amostras do Tempo 10 e o segundo (em azul) as amostras do Tempo 1 (Figura 32). No grupo do Tempo 1 observamos uma a separação das amostras por tratamento, estando as 3 amostras do tratamento Ninho mais próximas quando comparadas as 3 amostras do tratamento Ninho + P119, também mais próximas. Já no Tempo 10, não conseguimos observar essa separação de agrupamentos entre os tratamentos, mostrando haver uma menor diferença entre as amostras ao longo do tempo.

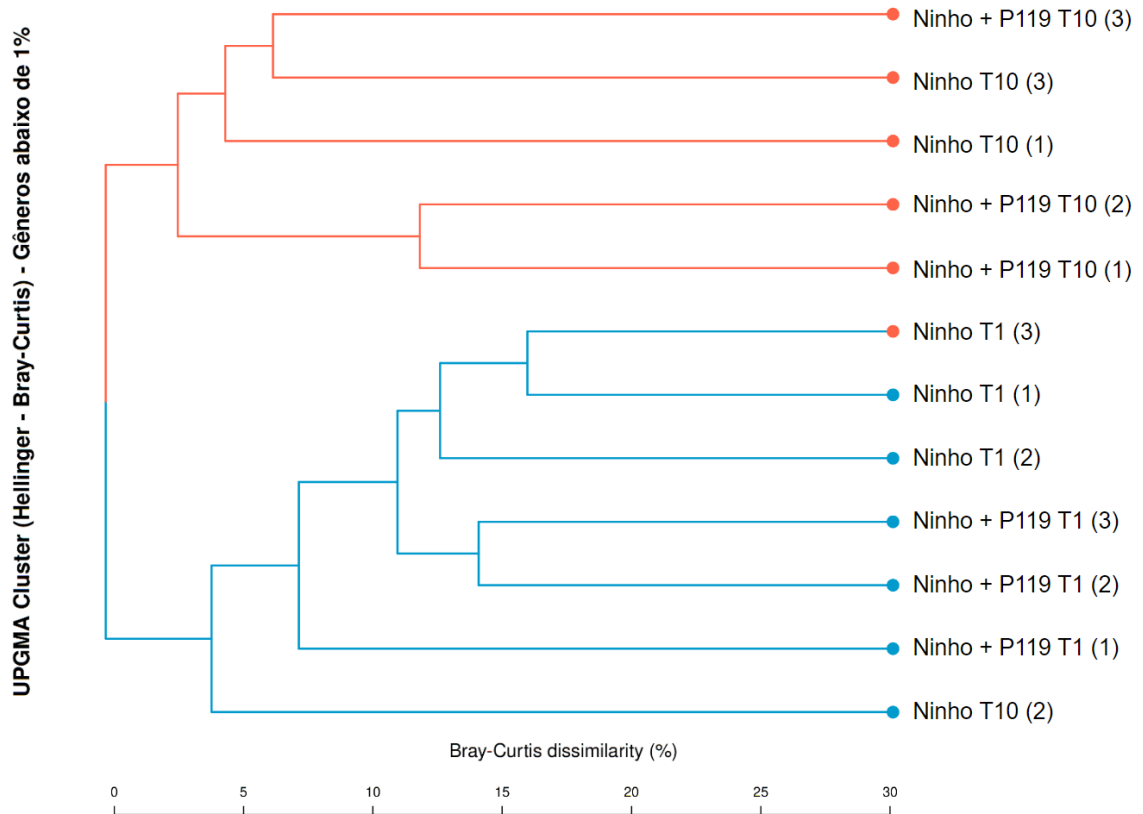
**Figura 32** - Dendrograma da análise de agrupamento UPGMA utilizando as Variantes de Sequências de Amplicon (ASVs) a nível de gênero bacteriano acima de 1 % de abundância relativa, ilustrando a relação as 12 amostras do ensaio de bioaumentação *in vitro* em ninhos de espuma.



Fonte: Elaborado pela autora. No dendrograma é possível observar que os dois grandes agrupamentos foram gerados em função tempo.

Já quando levamos em consideração os gêneros menos abundantes (< 1 %) foi novamente possível identificar a formação de dois grandes agrupamentos distintos, com essa divisão sendo feita majoritariamente em função do tempo (Figura 33). Vemos dessa forma, um primeiro grupo (em vermelho) formado exclusivamente por amostras do Tempo 10. Nesse agrupamento, assim como visto na análise de agrupamento anterior (Figura 34), não temos uma separação bem definida das amostras por tratamento, demonstrando uma maior similaridade entre as amostras desse grupo. No segundo grupo (em azul) já conseguimos ver um agrupamento das amostras do tratamento Ninho. Nesse grupo também temos a presença isolada da amostra Ninho T10 (2), estando apenas ela mais similar as amostras do Tempo 1.

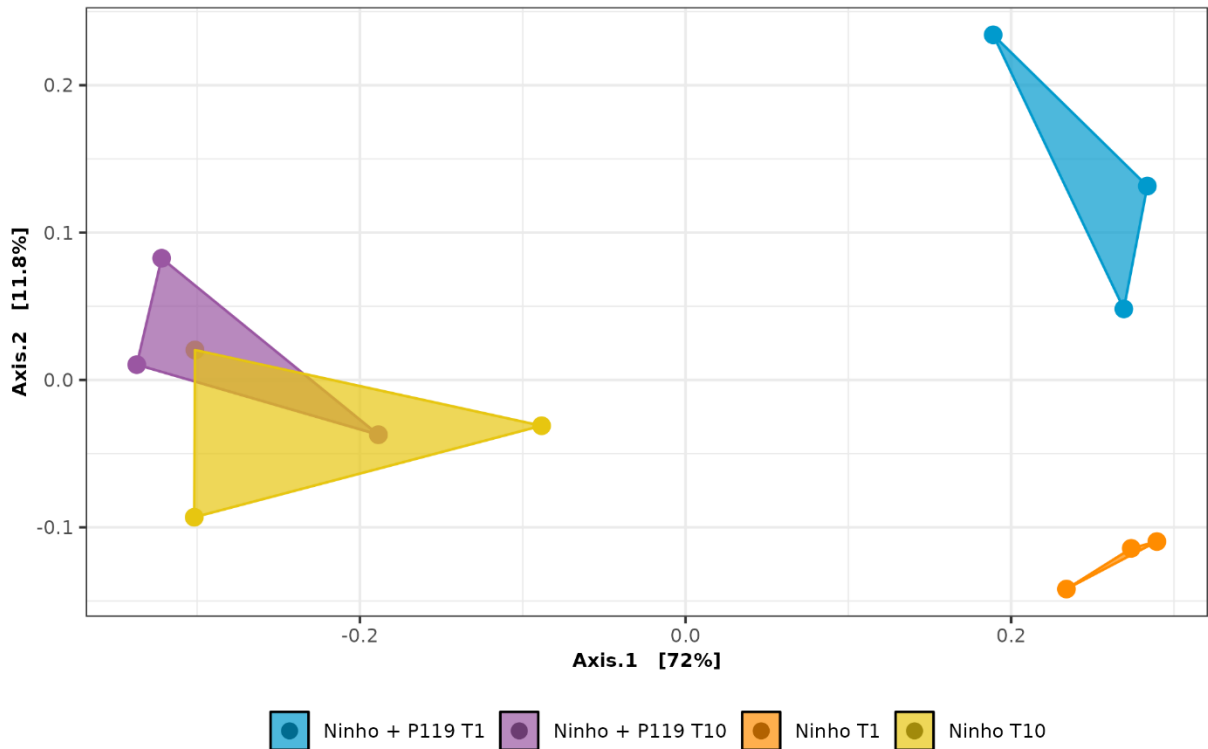
**Figura 33** - Dendrograma da análise de agrupamento UPGMA utilizando as Variantes de Sequências de Amplicon (ASVs) a nível de gênero bacteriano abaixo de 1 % de abundância relativa, ilustrando a relação as 12 amostras do ensaio de bioaumentação *in vitro* em ninhos de espuma.



Fonte: Elaborado pela autora. No dendrograma é possível observar que os dois grandes agrupamentos foram gerados majoritariamente em função tempo.

A confirmação do padrão de beta diversidade observado no dendrograma foi obtida através da Análises de Coordenadas Principais (PCoA) de ASVs a nível de gênero, utilizando o algoritmo de Bray-Curtis. Dessa forma pudemos observar, que assim como na composição da comunidade, o fator que mais diferencia as amostras é o tempo e não os tratamentos (adição ou não adição do inoculante) (Figura 34).

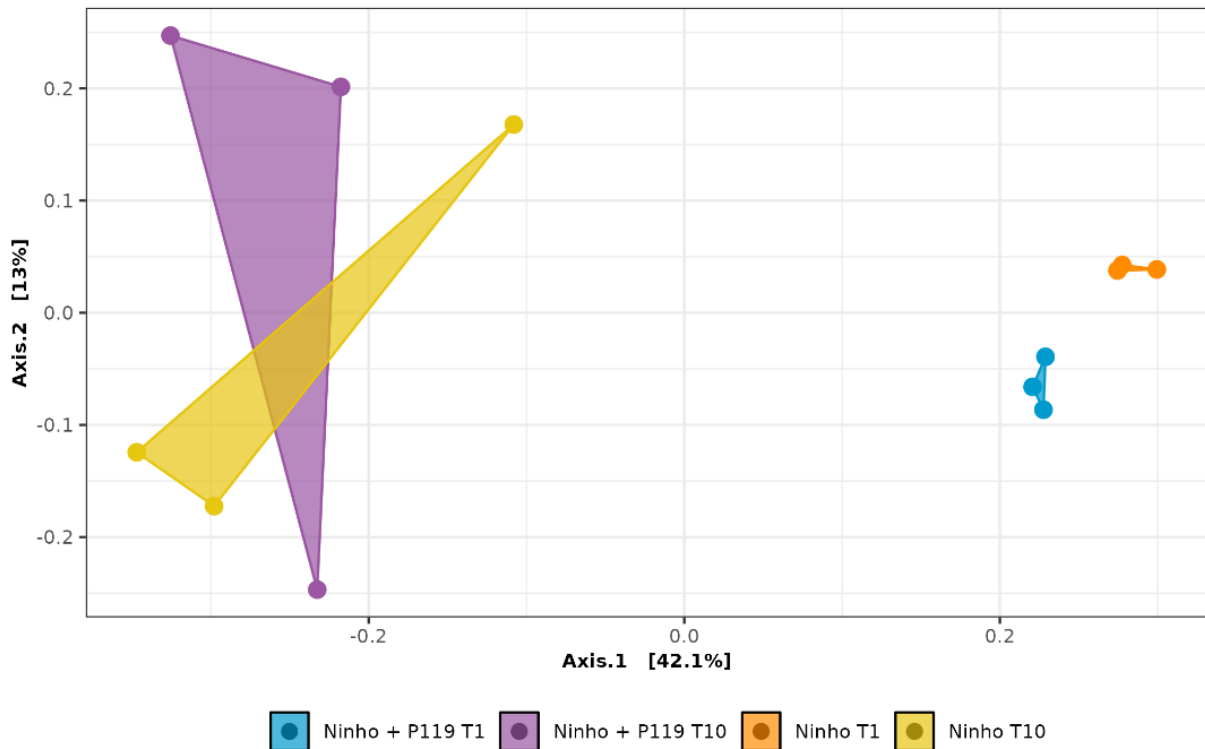
**Figura 34** - Análises de Coordenadas Principais (PCoA) de ASVs a nível de gênero, das 12 amostras analisadas.



Fonte: Elaborado pela autora. No gráfico é possível observar que a similaridade entre as amostras é mais influenciada pelo tempo, do que pelo tratamento com o inoculante.

Para verificar modificações na beta diversidade nos microrganismos raros, foi realizada uma segunda Análises de Coordenadas Principais (PCoA) com os gêneros de abundância relativa menor que 1% (Figura 35). Com isso, foi possível observar que o padrão já observado se manteve, com a diferença entre as amostras sendo mais influenciada pelo tempo do que pela adição do inoculante.

**Figura 35** - Análises de Coordenadas Principais (PCoA) de ASVs a nível de gêneros (abundância < 1%) das 12 amostras analisadas.



Fonte: Elaborado pela autora. No gráfico é possível observar que a similaridade entre as amostras é mais influenciada pelo tempo, do que pelo tratamento com o inoculante.

### 5.3.4 Análise de rede de interações microbianas (*Network analysis*)

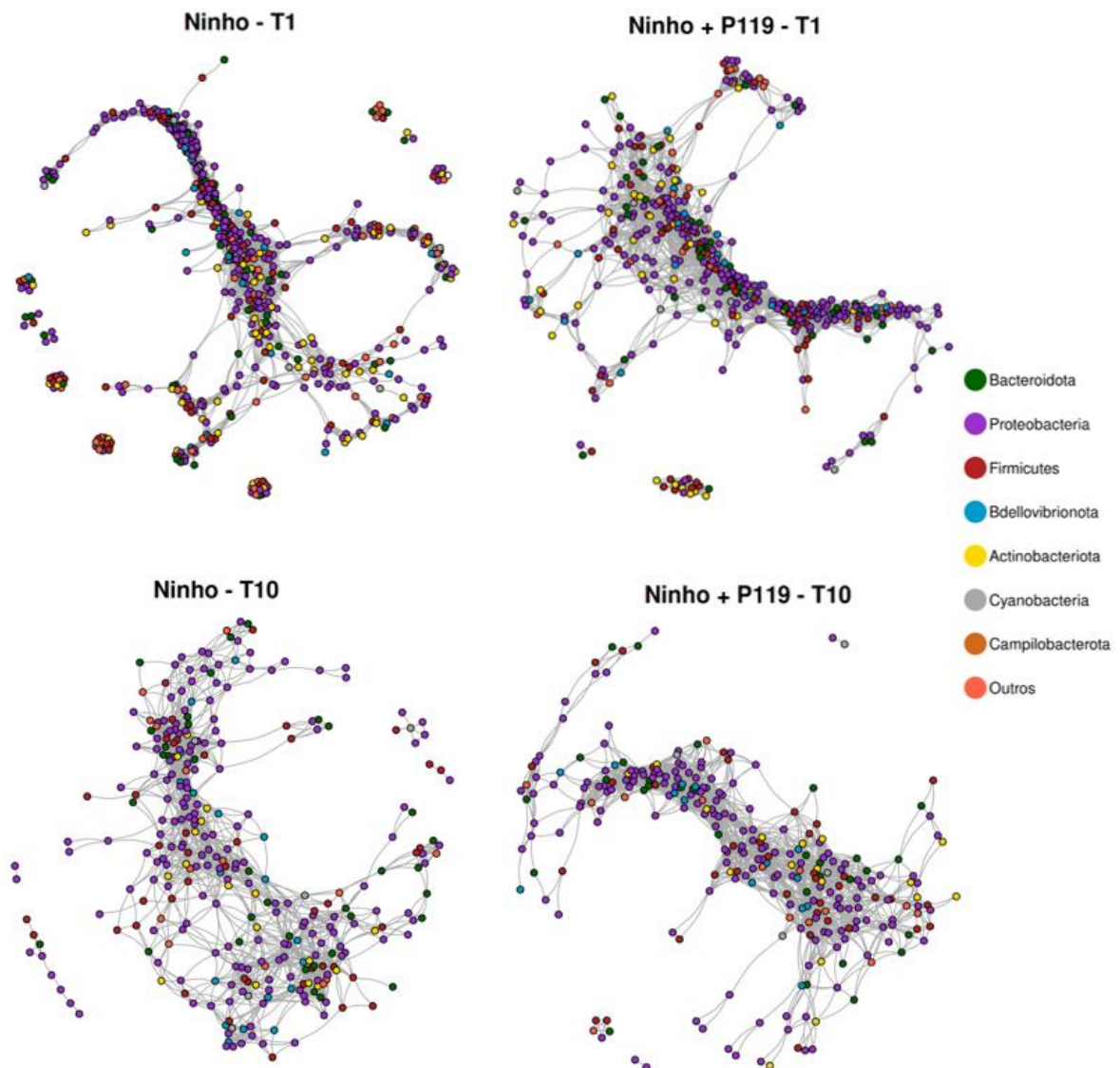
Como resultado da análise de rede de interações bacterianas foram obtidas 4 redes, referentes as 4 combinações das condições experimentais (Figura 36) e uma tabela contendo as propriedades das redes (Tabela 10).

**Tabela 10** – Propriedades das redes de interação bacteriana para os tratamentos do Ensaio de Bioaumentação *in vitro* em ninhos de espuma.

Parâmetros	Ninho T1	Ninho + P119 T1	Ninho T10	Ninho + P119 T10
Arestas	7.128	5.194	1.905	2.333
Vertices	585	425	314	283
Modularidade	0,65273	0,625596	0,62420	0,59641
Transitividade	0,66057	0,61875	0,51439	0,56323
Densidade gráfica	0,04172	0,05764	0,03876	0,05846
Diâmetro da rede	21	19	14	18

Fonte: Elaborado pela autora.

**Figura 36** – Rede de interação bacteriana para os tratamentos do Ensaio de Bioaugmentação *in vitro* em ninhos de espuma.



Fonte: Elaborado pela autora.

De forma global temos uma diminuição de vértices e arestas com o tempo, comparando os tratamentos de T1 vs T10. Em T1, o número de arestas e vértices é maior em Ninho com relação a Ninho +P119, indicando uma comunidade mais homogênea em termos de abundância no tratamento sem o inoculante. No Tempo 10 observamos uma pequena diminuição do número de vértices no tratamento Ninho + P119, no entanto, temos um aumento do número de conexões, implicando em uma possível manutenção da complexidade da rede. Essa complexidade se refere a uma maior homogeneidade da comunidade bacteriana, em comparação ao observado em Ninho T10.

Com relação à modularidade, valores mais altos indicam uma rede mais modular, com grupos distintos de elementos interagindo mais entre si do que com o restante da rede. Dessa forma, vemos que em Ninho T1 temos uma rede mais modular. Já em Ninho + P119 T10 temos uma rede menos modular, indicando uma maior interação global entre os elementos da rede. Já na transitividade, que representa a tendência de nós conectados estarem agrupados em pequenos clusters, onde quanto maior, mais agrupada é a rede, vemos que em Ninho T1 temos o maior nível de agrupamento em pequenos clusters. Já no Tempo 10 observamos que Ninho + P119 T10 temos uma transitividade mais alta do que em Ninho T10, indicando uma possível manutenção da característica de agrupamento observado em Ninho T1.

Quando observamos a densidade gráfica, em Ninho T1, temos uma maior densidade gráfica quando comparado a Ninho + P119 T1. Já no Tempo 10, o tratamento Ninho + P119 é que obteve valores maiores de densidade gráfica, quando comparado ao tratamento sem o inoculante. Redes com uma densidade gráfica mais alta indicam que há um maior número de conexões ou interações entre os elementos na rede em comparação com o número total possível de conexões. Outro parâmetro analisado foi o diâmetro das redes, que é caracterizado pelo comprimento máximo do caminho mais curto entre dois nós na rede, indicando a distância máxima entre quaisquer dois elementos na rede. Comparando o diâmetro das 4 redes, observamos uma maior diminuição do diâmetro entre os tratamentos Ninho T1 (21) x Ninho T10 (14), comparado com Ninho + P119 T1 (19) x Ninho + P119 T10 (18).

Com relação aos principais grupos de microrganismos desempenhando papel nas redes, observamos que filo Proteobacteria, tem um maior destaque tanto no Tempo 1, quanto no Tempo 10 mesmo que em termos de composição sua abundância relativa tenha diminuído em relação a Bacterioidota que foi mais abundante no tempo 10.



## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Identificação molecular e potencial genômico dos isolados

A utilização do gênero *Pseudomonas* para a prospecção de isolados com capacidade de inibição contra o fungo Bd vem há algum tempo se mostrando promissora, uma vez que isolados de anfíbios, pertencente a esse gênero já demonstraram atividade antifúngica (LAUER *et al.*, 2007; MARTIN H *et al.*, 2019), inclusive anti-Bd *in vitro* (Tabela 1).

O gênero *Pseudomonas* aparece, frequentemente, como sendo o ou um dos mais abundantes na pele de algumas espécies de anfíbios (SHAW *et al.*, 2014; BECKER *et al.*, 2015b; NAVA-GONZÁLEZ *et al.*, 2021). Alguns trabalhos também relacionam a alta abundância de *Pseudomonas* na pele de animais com indivíduos negativos para Bd (JIMÉNEZ *et al.*, 2019). Um trabalho com a comparação de indivíduos de *Rana italica*, mostrou que bactérias pertencentes à família Pseudomonadaceae, em especial do gênero *Pseudomonas*, foram mais abundantes em indivíduos não infectados do que em infectados por Bd (FEDERICI *et al.*, 2015). Também há indícios que o microbioma, especialmente aqueles predominado por *Pseudomonas*, pode estar envolvido na resistência de espécies infectadas por Bd, não havendo o comprometimento da sua sobrevivência, devido à sua provável atuação na dinâmica estabelecida entre microbioma e patógeno (NAVA-GONZÁLEZ *et al.*, 2021).

As cepas sequenciadas foram identificadas como *Pseudomonas putida*. Na literatura, essa espécie é bastante relatada por sua ampla produção de metabólitos, sendo estudada inclusive para o emprego na agricultura visando a promoção do crescimento vegetal (MEHNAZ *et al.*, 2010; GEORGIEVA *et al.*, 2023), mesmo sob estresse salino (COSTA-GUTIERREZ *et al.*, 2020). A alta produção de metabólitos, também confere uma ampla capacidade antagônica contra fungos e bactérias (AGARAS *et al.*, 2015; OLIVER *et al.*, 2019; MAES *et al.*, 2020), incluindo anti-Bd (FLECHAS *et al.*, 2012; DASKIN *et al.*, 2014). Além disso, *P. putida* vem se demonstrando uma promessa como hospedeiro de reações trans-metabólicas, similar ao já estabelecido com *Escherichia coli*, além de possuir capacidade de adesão controlada a superfícies-alvo aumentando o seu valor biotecnológico (MARTÍNEZ-GARCÍA; DE LORENZO, 2024).

Como probiótico, um estudo recente, utilizou uma cepa de *P. putida* em Tilápias-do-Nilo demonstrando efeitos positivos após aplicação, como aprimoramento da taxa de sobrevivência, ganhos de peso corporal além do aprimoramento da resposta imune, com o

aumento nas atividades séricas de lisozima, fagocitose e nitroblue tetrazolium, acarretando uma maior resistência contra a infecção por *Aeromonas hydrophila* (ALY *et al.*, 2024). Além disso, através de exames histopatológicos, foi observado que *P. putida* aumentou significativamente a resposta imune inespecífica em Tilápia do Nilo (ALY *et al.*, 2024). Tudo isso demonstra a versatilidade dessa espécie no seu uso em atividades agrônômicas, biotecnológicas e ambientais.

Mesmo com a baixa qualidade do sequenciamento foi possível, através da utilização de genes *housekeeping* (*rpoB* – *gyrB* – rRNA 16s) realizar a identificação dos três isolados alvos para o desenvolvimento do probiótico, incluindo a cepa P119, utilizada no ensaio de Bioaugmentação. A utilização desses e de outros genes para uma análise multiloco, é uma forma já estabelecida e ainda atual de realização da identificação de espécies do gênero *Pseudomonas* (MULET; LALUCAT; GARCÍA-VALDÉS, 2010), em especial de espécies novas (POBLETE-MORALES *et al.*, 2020; SAWADA; FUJIKAWA; HORITA, 2020; DUMAN *et al.*, 2021; CARVALHO *et al.*, 2022).

É importante salientar que a classificação do gênero *Pseudomonas* é bastante complicada, pela sua grande quantidade de grupos e subgrupos filogenéticos, que variam constantemente com novas revisões, podendo acarretar uma identificação incorreta a depender da metodologia escolhida (MULET; GARCÍA-VALDÉS; LALUCAT, 2013). As grandes tentativas de classificação do gênero eram baseadas em atividades bioquímicas (LYSENKO, 1961). Atualmente, os métodos mais precisos de taxonomia bacteriana são a hibridização DNA-DNA e a *Análise de Sequências Multi-Locus (MLSA)*, que consiste na análise concatenada de determinados genes *housekeeping*, como as sequências codificantes da subunidade beta da DNA girase (*gyrB*), subunidade beta da RNA polimerase (*rpoB*) e RNA ribossomal 16s (*16s rRNA*), que já estão bem estabelecidas na taxonomia bacteriana (MULET *et al.*, 2009). A taxonomia do gênero *Pseudomonas* já foi revisada diversas vezes nos últimos anos, sendo *P. aeruginosa*, *P. straminea*, *P. stutzeri*, *P. syringae* e *P. putida* alguns dos grupos de *Pseudomonas* (HESSE *et al.*, 2018).

No geral, o sequenciamento do genoma completo de isolados bacterianos, nos fornece informações importantes, que vão desde a identificação da espécie, até a identificação de genes que possam confirmar ou não virulência e/ou atividades de interesse. Dessa forma, o sequenciamento genômico dos isolados foi importante não apenas para a determinação da espécie de *Pseudomonas*, sugerindo, portanto, que as cepas trabalhadas não se trata de uma espécie patogênica, mas também foi importante para a busca de genes que possam indicar uma

produção de metabólitos antifúngicos como foi o caso de *phzF*, *hcnC* e *hcnB*, cujas funções estão associadas, juntamente com outros genes, à biossíntese de fenazina e cianeto de hidrogênio, respectivamente. As fenazinas são moléculas versáteis e multifuncionais que desempenham papéis essenciais em diversos aspectos da biologia microbiana, desde a defesa contra agentes patogênicos até a regulação de processos metabólicos e de sinalização celular (MENTEL *et al.*, 2009). Já o cianeto de hidrogênio cianeto é outro antimicrobiano produzido por *Pseudomonas* spp. que é conhecido por ser altamente tóxico para muitos organismos, incluindo microrganismos, devido à sua capacidade de interferir nas vias metabólicas e causar danos celulares (FLURY *et al.*, 2017). É preciso frisar, no entanto, que a presença desses genes não assegura, necessariamente, a expressão desses metabólitos, mas constituem indícios de um potencial intrínseco que os isolados analisados possuem.

Também é importante ressaltar que a não detecção de genes que participam da síntese de metabólitos especificamente anti-Bd, não implicam, necessariamente, na incapacidade dos isolados em inibir o fungo. Com isso, mesmo não tendo sido possível fechar os genomas sequenciados, conseguimos inferir informações importantes e fundamentais acerca dos isolados, sendo possível selecionar uma cepa de interesse mais promissora, para a etapa seguinte do estudo. A escolha do isolado *P. putida* P119 para a realização do ensaio de bioaumentação em ninho de espuma, em detrimento dos demais isolados que obtiveram a mesma identificação, se deu em especial, pela melhor qualidade do seu sequenciamento, o que possibilitou uma melhor avaliação de possíveis genes de virulência e de resistência, sugerindo uma maior segurança desse isolado, bem como um potencial intrínseco do genoma dessa cepa.

## **6.2 Bacterioma de ninho de espuma de *L. vastus* após a adição da cepa *Pseudomonas putida* P119.**

Com relação ao ensaio de bioaumentação *in vitro* em ninho de espuma *in natura* foi possível observar que o inóculo da bactéria *P. putida* P119 não alterou significativamente a riqueza, diversidade e a composição da comunidade bacteriana do ninho, tanto com 1 dia do inóculo, quanto com 10. A única alteração significativa observada com a adição do inoculante foi na riqueza de ASVs, onde no Tempo 1 foi obtido um pequeno aumento do número de ASVs. No entanto, esse aumento significativo não foi observado no Tempo 10. Isso pode ter ocorrido por uma tendência desse bacterioma a um retorno de equilíbrio com o tempo. Essa não modificação significativa na comunidade microbiana também foi observada no trabalho que utilizou a bactéria *J. lividum* para bioaumentação em *Lithobates clamitans*, que mesmo tendo

sua abundância aumentada, não alterou significativamente a alfa e beta diversidade dos do microbioma dos girinos testados (REBOLLAR *et al.*, 2016c). Características como essas podem ser importantes no desenvolvimento de probióticos, já que mudanças severas no microbioma podem causar disbioses que afetem a saúde do animal.

Os resultados mostram que o maior fator de impacto na mudança no bacterioma foi o tempo, tanto em seus índices de riqueza quanto na diversidade beta, sugerindo que o tempo exerceu uma influência mais pronunciada nas alterações observadas no bacterioma. Essa análise reforça a relevância do tempo na dinâmica das comunidades bacterianas, evidenciando a importância de considerar o contexto temporal em estudos microbiológicos. É conhecido que as comunidades microbianas podem mudar rapidamente com o passar do tempo, e alguns estudos do microbioma da pele de rãs e salamandras mantidas em cativeiro demonstraram uma diminuição da diversidade microbiana comparada ao encontrado na natureza (BECKER *et al.*, 2014; LOUDON *et al.*, 2014). Além disso, o microambiente dos ninhos de espuma é muito dinâmico, já que são estruturas muito ricas biologicamente e que sofrem mudanças na sua estrutura com o passar do tempo, uma vez que se configuram como estruturas temporárias. Dessa forma, mudanças químicas e biológicas ocasionadas pelas mudanças estruturais do ninho, alteram a composição química dos ninhos ao longo do tempo, o que também ocasiona um impacto direto na sua microbiota.

A alta abundância no ninho do filo Proteobacteria e classe Gammaproteobacteria, tanto no Tempo 1 como no Tempo 10, está de acordo com o já encontrado em ninhos de espuma da mesma espécie e de outras espécies da Família Leptodactylidae (MONTEIRO *et al.*, 2023). O mesmo foi encontrado em outro trabalho que avaliou a composição da microbiota da pele de anuros do gênero *Polypedates* e seus ninhos de espuma (MCGRATH-BLASER *et al.*, 2021). Nesses trabalhos os filos Bacteroidota e Firmicutes também aparecem entre os mais abundantes, similar também ao encontrado na pele de diferentes espécies de anuros pós-metamórficos (BECKER *et al.*, 2015b; FEDERICI *et al.*, 2015). O filo Proteobacteria é comumente encontrado abundantemente em diversos ambientes, se fazendo também predominante no solo (JANSSEN, 2006). A predominância desse grupo no ninho de espuma e na pele de anuros pode ser importante, já que muitos membros deste filo são conhecidos por produzirem metabólitos anti-Bd, incluindo o gênero *Pseudomonas* (MYERS *et al.*, 2012).

Com relação aos gêneros, podemos observar que há uma diferença na composição dos gêneros mais abundantes comparado ao já observado em ninhos de *L. vastus*, mudando tanto a composição como na quantidade de gêneros com abundância superior a 10% (MONTEIRO *et*

*al.*, 2023). Monteiro *et al.* (2023) demonstraram uma maior abundância dos gêneros *Sphingobacterium* (28,6 %), *Paenibacillus* (16,5%) e *Paucibacter* (14,8%) em ninhos de espuma de *L. vastus* coletados em uma Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) no município de Pacatuba, Ceará, Brasil. Enquanto no atual estudo, os gêneros mais abundantes nos ninhos sem a adição do inoculante no Tempo 1 foram *Cryseobacterium* (25%), gênero não classificado de Comamonadaceae (9,42%) e *Paenibacillus* com (8,74%). Uma das razões para essa diferença pode estar relacionado ao nível de antropização do local de coleta, onde no atual trabalho se deu dentro de um Campus Universitário, próximo a comunidades habitacionais, na cidade de Fortaleza (~ 2,5 milhões de habitantes). Um reflexo dessa antropização foi o aparecimento em alta proporção do gênero de bactéria *Elizabethkingia*, o que não foi observado em outros ninhos da mesma e/ou de outras espécies (MCGRATH-BLASER *et al.*, 2021; MONTEIRO *et al.*, 2023).

O grande aumento de abundância do filo Bacteroidota do Tempo 1 para o Tempo 10, está relacionado principalmente a esse aumento no gênero de *Elizabethkingia*, que já se encontrava abundante no Tempo 1, mas que teve sua abundância ultrapassando os 30%, sendo o gênero mais abundantes nos dois tempos e dois tratamentos, com relação aos demais gêneros do ninho. Fatores como a composição bioquímica do ninho, podem ter favorecido esse aumento substancial do gênero.

O gênero *Elizabethkingia* é caracterizado por serem bactérias raras em forma de bastonete, gram-negativas, associadas a infecções pulmonares e do trato urinário. São normalmente encontradas no solo e na água, sendo a espécie *Elizabethkingia meningoseptica* a mais conhecida, uma vez que causa doenças em humanos, como é o caso de sepse e meningite mais comum em crianças neonatas (FRANCIS *et al.*, 2023; SWAMI *et al.*, 2024). Infelizmente, a patogenicidade desse gênero não se restringe a humanos. A espécie *Elizabethkingia miricola*, que já demonstrou causar complicações clínicas em humanos imunocomprometidos como sepse (KALCHEV *et al.*, 2022; ZHUO; ZHOU; LIU, 2023), vem sendo associada a doenças em anuros (YANG *et al.*, 2023).

Nas espécies *Bombina microdeladigitora*, *Lithobates pipiens*, *Pipa parva* e *Theloderma bicolor*, por exemplo, a infecção por *E. miricola* demonstrou causar diversas complicações clínicas que variaram entre edema, ascite, protrusão da bexiga urinária, depressão, opacidade unilateral do olho, cegueira posterior, inchaço abdominal, hemorragia, torcicolo e falta de coordenação (TRIMPERT *et al.*, 2021). Dessa forma, temos a emergência de mais um patógeno causador de doença em anuros, que além de afetar potencialmente uma ampla gama de

hospedeiros, também vem-se demonstrando altamente resistente a antimicrobianos, tornando seu controle e tratamento ainda mais difíceis (LI *et al.*, 2023; TRIMPERT *et al.*, 2021; WEI *et al.*, 2023; YANG *et al.*, 2023). Essa resistência a tratamentos clínicos, pode estar relacionada inclusive à capacidade que algumas espécies do gênero como a própria *E. miricola* e, também, *E. anophelis* têm, de formar biofilmes (PUAH *et al.*, 2022). Algo a ser comentado é que a espécie *E. meningoseptica* foi capaz de inibir Bd *in vitro*, demonstrando que ainda temos muito a conhecer sobre a interação entre microrganismos patogênicos que atualmente atingem os anfíbios (FLECHAS *et al.*, 2012).

Entretanto, o atual estudo faz o primeiro relato da presença abundante do gênero *Elizabethkingia* em ninhos de espuma. Sendo importante ressaltar que esse gênero foi enriquecido ao longo de 10 dias em ninhos de espuma (período aproximado de eclosão dos ovos e desenvolvimento dos girinos), mostrando que os ninhos podem favorecer tanto o desenvolvimento de microrganismos do bem como microrganismos patogênicos.

O microbioma de estruturas reprodutivas, como é o caso dos ninhos de espuma, sofre influência tanto dos indivíduos como do ambiente onde são depositados. Assim, a antropização além de trazer mudanças notáveis no microbioma, muitas vezes negativas, podem auxiliar no aparecimento e manutenção de altas concentrações de microrganismos patogênicos, tanto para humanos como para os próprios animais. Na região da Amazônia por exemplo, vêm-se aumentando o alerta com relação a detecção de *E. miricola* que além de estar afetando os anfíbios anuros locais também gera problemas para a população ameríndia da região (FONSECA *et al.*, 2024).

Mesmo que no geral, a composição do bacterioma não tenha mostrado grandes diferenças, é preciso olhar também para o impacto do inoculante na microbiota menos abundante. Esse impacto foi observado na realização da análise diferencial de abundância, onde foi possível observar o efeito da adição do inoculante nas bactérias que se encontravam em abundância menor que 1%. Com isso, foi possível observar que o número de gêneros impactados pelo inoculante foi maior nas bactérias raras do que nas mais abundantes e que a quantidade de gêneros influenciados significativamente tanto positiva, quanto negativamente pela adição do inoculante tende a diminuir com o tempo, podendo ser um demonstrativo novamente da tendência da comunidade a voltar ao equilíbrio ou da predominância da composição química do ninho na estrutura da comunidade microbiana. Com o passar o tempo, o ninho deixa de sofrer influência do microbioma parental e ambiental e passar a ser mais influenciado pela composição intrínseca do ninho.

Bactérias abundantes geralmente desempenham um papel crucial nos ecossistemas, contribuindo com pelo menos 1% da abundância e apresentando uma biomassa significativa. Além de influenciarem o fluxo de carbono e a ciclagem de nutrientes, também possuem uma taxa de crescimento mais elevada e uma maior resistência à predação e a vírus (PEDRÓS-ALIÓ, 2012). Em contrapartida, as bactérias raras têm uma abundância inferior, geralmente abaixo de 0,1%, e uma biomassa reduzida. Apesar disso, podem exibir uma biodiversidade maior e contribuir significativamente, em alguns casos, para a ciclagem de nutrientes, embora sua influência no fluxo de carbono seja menor (PEDRÓS-ALIÓ, 2012). No entanto, é fundamental destacar que as funções específicas das bactérias raras ainda são pouco compreendidas e continuam a ser objeto de estudo em pesquisas científicas. De qualquer forma, um impacto, tanto positivo quanto negativo nessa parcela do microbioma, pode acarretar diferença nas dinâmicas gerais do ninho, sendo esse, portanto, um ponto a ser levado em consideração em análises de microbiomas e possíveis impactos da adição de probióticos, a fim de melhor entender, por exemplo, o papel dessas bactérias na função antagônica contra patógenos como o Bd.

Apesar das poucas mudanças que o bacterioma do ninho demonstrou com a adição do inoculante, é necessário que testes subsequentes com o isolado sejam realizados, tanto para a determinação da melhor concentração de células inicial do inóculo, como para a escolha do melhor veículo o qual essas células serão entregues no ninho, além da periodicidade que esses inóculos serão realizados. Atualmente, se estima que a concentração média celular de um inóculo com células procarióticas para tratamento da vida selvagem esteja entre  $10^4$  e  $10^6$  células/ml, podendo ser uma inoculação única ou algumas aplicações intercaladas (GARCIAS-BONET *et al.*, 2023). Estudos com a utilização de probióticos na pele de anuros foram feitos utilizando concentrações tão altas quanto  $10^9$  células/ml (WOODHAMS *et al.*, 2020) e que mesmo assim, não demonstraram efeito aumentativo na pele do animal inoculado, demonstrando ainda a dificuldade em se estimar concentrações específicas para esse fim. A concentração final do inóculo utilizada neste trabalho ficou em  $10^4$  células/ml, podendo concentrações maiores ocasionarem mudanças mais significativas no bacterioma do ninho.

Alguns estudos foram realizados também visando determinar a densidade mínima de células bacterianas necessárias para a produção de compostos anti-Bd, bem como a avaliação da importância da densidade celular na eficácia dessas bactérias como probióticos (YASUMIBA; BELL; ALFORD, 2016). O que foi observado é que densidades iniciais mínimas podem resultar em uma produção mais eficiente de compostos inibitórios e que, portanto, a

seleção de bactérias que produzem esses compostos em densidades celulares mais baixas e que possuem rápido crescimento, pode ser preferível para estratégias de bioaugmentação contra Bd (YASUMIBA; BELL; ALFORD, 2016). Outro ponto levantado é que há muito tempo já se sabe, que muitas bactérias, incluindo *Pseudomonas* spp. utilizam do *quorum sensing* para a regulação da produção de metabólitos secundários, o que pode ser relevante para a eficácia das bactérias como probióticos na proteção dos anfíbios contra a infecção por Bd (WALSH; MORRISSEY; O’GARA, 2001).

Outro ponto a ser destacado foi a baixa abundância de *Pseudomonas* nas amostras analisadas. Além da concentração celular mais baixa, o modo de inoculação pode também ter sido um dos fatores pelos quais não foi observada uma grande abundância de *Pseudomonas* nas amostras, em especial as inoculadas, estando sempre abaixo de 1%. No solo, por exemplo, uma das técnicas desenvolvidas para a inoculação é a utilização de células imobilizadas em esferas de quitosana que desempenham diversos papéis ajudando os microrganismos imobilizados a terem mais sucesso na bioaugmentação (ANGELIM *et al.*, 2013). Dessa forma, além da escolha de um isolado promissor, é necessário avaliar diversas técnicas de inóculos, a fim de garantir a sobrevivência deste probiótico no local alvo, permitindo que haja uma “aclimação” do inoculante no novo ambiente, não sofrendo dessa forma, tão severamente com estresses ambientais e interações negativas com outros microrganismos.

De qualquer maneira mesmo levando em consideração a forma de inóculo e o ambiente do ninho, possivelmente hostil para o probiótico, vale ressaltar que a abundância de *Pseudomonas* foi menor do que o esperado, mesmo nas amostras não bioaugmentadas no Tempo 1, levando em consideração ao já observado na literatura, incluindo em ninhos de espuma da mesma espécie (MONTEIRO *et al.*, 2023). Monteiro *et al* (2023) relataram uma abundância de 7 % de *Pseudomonas* quando estudando o microbioma de ninho de espuma também de *L. vastus*, porém da localidade Pacatuba-CE, diferente da localidade do atual estudo. Fatores como competição com outros microrganismos abundantes podem ter influenciado essa discrepância com o normalmente observado. É importante destacar que, mesmo que a bactéria não tenha aumentado de forma expressiva a sua abundância no ninho de espuma, não podemos descartar que os probióticos podem agir de diferentes formas, e que, mesmo em baixa abundância podem atuar em conjunto com o restante da microbiota regulando-o e promovendo a ação contra o Bd (BLETZ *et al.*, 2013).



A análise comparativa das redes microbianas nos tempos T1 e T10, considerando os tratamentos Ninho e Ninho + P119, revelou *insights* significativos. Foi observado uma transição global para redes menos densas e mais desconectadas no T10, indicando uma diminuição na homogeneidade da comunidade. Especificamente em T10 a adição da bactéria implicou em uma possível preservação da complexidade das redes, sugerindo uma manutenção da homogeneidade das comunidades ao longo do tempo. Padrões temporais influenciam nas dinâmicas das comunidades, com o desaparecimento de microrganismos, tendo ou não suas funções substituídas por outros. Tal fator poderia explicar a mudança na complexidade das redes.

O tratamento com o probiótico também implicou em uma manutenção positiva nos parâmetros como diâmetro de rede e densidade gráfica, que nesse contexto, podem indicar novamente uma maior complexidade e conexões mais fortes entre os elementos na rede, contribuindo para a estabilidade da comunidade. Em sistemas biológicos como recife de corais, foi observado que redes mais complexas podem sugerir uma maior estabilidade e resistência da comunidade microbiana a perturbações externas (LEITE *et al.*, 2018). A adição do probiótico, também impactou na homogeneidade da comunidade, fazendo com que no Tempo 10 obtivéssemos redes mais homogêneas. Essa maior homogeneidade pode garantir um ecossistema microbiano onde não há apenas uma grande diversidade de microrganismos, mas também uma distribuição equitativa das populações dentro dessa diversidade, caracterizada pelo fato de que nenhuma espécie domina completamente, permitindo que várias espécies coexistam em um estado de equilíbrio relativo.

De forma geral, a adição de *Pseudomonas putida* P119 apresentou efeitos distintos nos tempos T1 e T10, influenciando, mesmo que de forma discreta a estrutura e as interações nas redes microbianas de maneiras específicas em cada um dos tempos. O efeito de adição de *Pseudomonas putida* P119 no auxílio da manutenção da complexidade das redes com o passar do tempo pode ser um indicativo de uma compatibilidade do isolado com a comunidade bacteriana, se tornando desta forma um isolado promissor para o desenvolvimento de um probiótico. Discute-se atualmente que um probiótico ideal não perturbaria outros sistemas microbianos, incluindo aqueles de organismos hospedeiros não alvo, ao ser introduzido (REBOLLAR *et al.*, 2016a).

Outro ponto importante, é a grande participação do filo Proteobacteria nas dinâmicas das redes, que pode, dentre outros motivos, estar relacionado às bactérias centrais, que em

termos gerais possuíam uma maior diversidade dentro do filo Proteobacteria. Essa diversidade, e os papéis ecológicos que diversos membros desse filo comumente desempenham nas comunidades microbianas, podem ser fatores importantes para essa permanência do filo como mais participativo nas interações das redes, independente do tempo. Contudo, é importante ressaltar que todas essas mudanças analisadas estão fortemente atreladas ao contexto do trabalho. Para maiores informações acerca da dinâmica de interações, tipos de interações (positiva e negativas) dentro da comunidade é necessário a aplicação de outras metodologias de construção e análises de redes de interações.

Por fim, é importante ressaltar que, todas as mudanças ocorridas no microbioma ainda precisam ser transmitidas verticalmente para a prole, portanto as mudanças iniciais no ninho podem ser fundamentais para a microbiota transmitida, tendo efeito protetivo na prole. Sabemos que a microbiota é passada de forma vertical, e que há mudanças significativas em cada fase do desenvolvimento, no entanto características intrínsecas da microbiota podem ser preservadas, características estas que confirmam efeito protetivo (MCGRATH-BLASER *et al.*, 2021). Dessa forma é importante no desenvolvimento de probióticos como o proposto no presente trabalho, em que sua utilização se dará no ninho de espuma, a investigação da colonização e na mudança do microbioma na pele da prole e indivíduos adultos. Contudo, é importante ressaltar que as tentativas até então estabelecidas de desenvolvimento de probióticos, possuem dificuldades em relação a sua utilização na natureza, uma vez que coletar indivíduos da natureza e banhá-los com os probióticos se torna inviável em termos práticos.

Nesse aspecto, tentativas de efetuar uma transmissão horizontal desses probióticos desde a prole podem se mostrar promissoras (REBOLLAR *et al.*, 2016b), sendo uma estratégia inovadora. O desenvolvimento desses probióticos precisam, no entanto, de um processo de validação, passando desde a confirmação da sua capacidade inibidora, avaliação do seu impacto no microbioma do ninho de espuma, em diferentes condições experimentais além de sua capacidade de colonizar a pele de girinos e persistir em adultos, garantindo assim a proteção contra o patógeno. Com isso, o presente trabalho se trata, portanto, de uma primeira tentativa de utilização de probióticos em ninhos de espuma visando no futuro a sua aplicação *in situ*. Contribuindo, portanto, para uma nova perspectiva no desenvolvimento de probióticos anti-Bd e sua utilização na natureza.

## 7 CONCLUSÃO

Através do sequenciamento genômico de três isolados selecionados e utilização de genes *housekeeping* foi possível identificar três cepas de *Pseudomonas*. A análise do genoma possibilitou detectar a presença de genes relacionados à atividade antifúngica, sendo o isolado *Pseudomonas putida* P119 escolhido para técnica de bioaugmentação em ninho de espuma. Com a adição da bactéria, vimos que as mudanças na alfa e beta diversidade das comunidades foram discretas, sugerindo que a adição desse isolado nas proporções utilizadas não foi capaz de gerar grandes mudanças na estrutura do bacterioma do ninho de espuma, sendo essa uma característica promissora para uma potencial utilização *in silico* como probiótico. De forma geral, o tempo exerceu um maior impacto na estrutura das comunidades bacterianas, sendo responsável pelas maiores mudanças. Levando em consideração as análises de redes foi destacado a importância da dinâmica temporal e da adição de *Pseudomonas putida* P119 na evolução das redes microbianas, fornecendo um entendimento inicial de possíveis mudanças nessas comunidades microbianas ao longo do tempo e em resposta a tratamentos específicos, como foi a adição do probiótico. Dessa forma, por não ter impactado fortemente e negativamente na estrutura e dinâmicas da comunidade bacteriana do ninho de espuma de *L. vastus*, consideramos o isolado *Pseudomonas putida* P119, como um candidato promissor para uma possível utilização na natureza em ninhos de espuma, visando o combate a quitridiomicose.

## REFERÊNCIAS

- ABARCA, J. G. *et al.* Genotyping and differential bacterial inhibition of *Batrachochytrium dendrobatidis* in threatened amphibians in Costa Rica. **Microbiology**, v. 167, n. 3, p. 001017, 2021.
- AGARAS, B. C. *et al.* Quantification of the potential biocontrol and direct plant growth promotion abilities based on multiple biological traits distinguish different groups of *Pseudomonas* spp. isolates. **Biological Control**, v. 90, p. 173–186, 1 nov. 2015.
- ALSOHIM, A. S. *et al.* The biosurfactant viscosin produced by *Pseudomonas fluorescens* SBW25 aids spreading motility and plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, v. 16, n. 7, p. 2267–2281, 2014.
- ALTSCHUL, S. F. *et al.* Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, 5 out. 1990.
- ALY, S. M. *et al.* Potential of *Pseudomonas putida* probiotic feed mixture for improving growth, immune response, and disease resistance in Nile Tilapia compared to *Saccharomyces cerevisiae* probiotic. **North American Journal of Aquaculture**, v. 86, n. 1, p. 26–38, 2024.
- AMORIM, F. *et al.* Amorim *et al.*, 2019. New records of Bd in the state of Bahia, Brazil - histological analysis in anuran amphibian collections. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 136, p. 147–155, 6 dez. 2019.
- AmphibiaWeb**. Disponível em: <https://amphibiaweb.org/>. Acesso em: 3 jan. 2024.
- ANGELIM, A. L. *et al.* An innovative bioremediation strategy using a bacterial consortium entrapped in chitosan beads. **Journal of Environmental Management**, v. 127, p. 10–17, 30 set. 2013.
- AZAT, C. *et al.* Synthesis of *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in South America: amphibian species under risk and areas to focus research and disease mitigation. **Ecography**, v. 2022, n. 7, p. e05977, 2022.
- B. ASSIS, A. *et al.* Environmental influences on and antimicrobial activity of the skin microbiota of *Proceratophrys boiei* (Amphibia, Anura) across forest fragments. **Ecology and Evolution**, v. 10, n. 2, p. 901–913, 7 jan. 2020.
- BARROS, A. L. *et al.* The arsenal of bioactive molecules in the skin secretion of urodele amphibians. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 810821, 2022.
- BASTOS, R. P.; HADDAD, C. F. B.; POMBAL JR, J. P. Foam nest in *Scinax rizibilis* (Amphibia: Anura: Hylidae). **Zoologia (Curitiba)**, v. 27, p. 881–886, 2010.
- BECKER, C. G. *et al.* Habitat split and the global decline of amphibians. **Science**, v. 318, n. 5857, p. 1775–1777, 2007.
- BECKER, C. G. *et al.* Historical Dynamics of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Amazonia. **Ecography**, v. 39, 1 dez. 2015a.

- BECKER, M. H. *et al.* Towards a Better Understanding of the Use of Probiotics for Preventing Chytridiomycosis in Panamanian Golden Frogs. **EcoHealth**, v. 8, n. 4, p. 501–506, 1 dez. 2011.
- BECKER, M. H. *et al.* The effect of captivity on the cutaneous bacterial community of the critically endangered Panamanian golden frog (*Atelopus zeteki*). **Biological Conservation**, v. 176, p. 199–206, 1 ago. 2014.
- 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**, v. 24, n. 7, p. 1628–1641, 2015b.
- BECKER, M. H.; HARRIS, R. N. Cutaneous Bacteria of the Redback Salamander Prevent Morbidity Associated with a Lethal Disease. **PLOS ONE**, v. 5, n. 6, p. e10957, 4 jun. 2010.
- BELASEN, A. M. *et al.* Long-Term Habitat Fragmentation Is Associated With Reduced MHC IIB Diversity and Increased Infections in Amphibian Hosts. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 6, 2019.
- BELDEN, L. K. *et al.* Panamanian frog species host unique skin bacterial communities. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 2015.
- BENÍCIO, R. *et al.* Worrying News for Brazilian Caatinga: Prevalence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Amphibians. **Tropical Conservation Science**, v. 12, p. 194008291989262, 1 jan. 2019.
- BERGER, L. *et al.* Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 15, p. 9031–9036, 21 jul. 1998.
- BERGER, L. *et al.* Life cycle stages of *Batrachochytrium dendrobatidis* (Longcore), the amphibian chytrid. **Diseases of aquatic organisms**, v. 68, p. 51–63, 1 jan. 2006.
- BERGER, L.; SPEARE, R.; HYATT, A. Chytrid Fungi and Amphibian Declines: Overview, Implications and Future Directions. **Declines and Disappearances of Australian Frogs. Environment Australia, Canberra**, v. 1999, 1 jan. 1999.
- BEZERRA, S. G. DE S. Ação de ninhos de espuma de anuros e da sua microbiota associada na quitridiomycose. 2021.
- BLETZ, M. *et al.* Mitigating amphibian chytridiomycosis with bioaugmentation: characteristics of effective probiotics and strategies for their selection and use. **Ecology letters**, v. 16, 3 mar. 2013.
- BLETZ, M. C. *et al.* Estimating Herd Immunity to Amphibian Chytridiomycosis in Madagascar Based on the Defensive Function of Amphibian Skin Bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017.
- BOLOCHIO, B. E. *et al.* A functional perspective for global amphibian conservation. **Biological Conservation**, v. 245, p. 108572, 2020.

- BOTTS, E. A.; ERASMUS, B. F.; ALEXANDER, G. J. Observed range dynamics of South African amphibians under conditions of global change. **Austral Ecology**, v. 40, n. 3, p. 309–317, 2015.
- BROOKS, J. M.; SISSON, A. E.; BAKER, M. A. Bacteria from the skin of salamanders inhibit *Batrachochytrium dendrobatidis*. **BIOS**, v. 94, n. 3, p. 136–143, out. 2023.
- BROZIO, S. *et al.* Frog nest foams exhibit pharmaceutical foam-like properties. **Royal Society open science**, v. 8, n. 9, p. 210048, 2021.
- BRUCKER, R. *et al.* The Identification of 2,4-diacetylphloroglucinol as an Antifungal Metabolite Produced by Cutaneous Bacteria of the Salamander *Plethodon cinereus*. **Journal of chemical ecology**, v. 34, p. 39–43, 1 fev. 2008.
- BURKART, D. *et al.* Cutaneous bacteria, but not peptides, are associated with chytridiomycosis resistance in Peruvian marsupial frogs. **Animal Conservation**, v. 20, 25 maio 2017.
- BYRNE, A. Q. *et al.* Cryptic diversity of a widespread global pathogen reveals expanded threats to amphibian conservation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 41, p. 20382–20387, 8 out. 2019.
- CAMPOS-CERDA, F.; BOHANNAN, B. J. The nidobiome: a framework for understanding microbiome assembly in neonates. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 35, n. 7, p. 573–582, 2020.
- CAPORASO, J. G. *et al.* Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108 Suppl 1, n. Suppl 1, p. 4516–4522, 15 mar. 2011.
- CARVALHO, R. *et al.* *Pseudomonas californiensis* sp. nov. and *Pseudomonas quasicaspiana* sp. nov., isolated from ornamental crops in California. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 72, n. 11, p. 005565, 2022.
- CARVALHO, T.; BECKER, C. G.; TOLEDO, L. F. Historical amphibian declines and extinctions in Brazil linked to chytridiomycosis. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 284, n. 1848, p. 20162254, 8 fev. 2017.
- CASTRO, L. G. Z. DE. Prospecção de microrganismos isolados de ninho de espuma de *Leptodactylus vastus* e *Physalaemus cuvieri* com potencial biotecnológico. 2019.
- CASTRO MONZON, F.; RÖDEL, M.-O.; JESCHKE, J. M. Tracking *Batrachochytrium dendrobatidis* Infection Across the Globe. **EcoHealth**, v. 17, n. 3, p. 270–279, 1 set. 2020.
- CHAUHAN, M. *et al.* Cold adapted *Pseudomonas*: ecology to biotechnology. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, p. 1218708, 17 jul. 2023.
- CHEN, M. Y.; ALEXIEV, A.; MCKENZIE, V. J. Bacterial Biofilm Thickness and Fungal Inhibitory Bacterial Richness Both Prevent Establishment of the Amphibian Fungal Pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 88, n. 5, p. e01604-21, 8 mar. 2022.

- CHOI, H.-J. *et al.* Synthesis of nanoparticles with frog foam nest proteins. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 14, 1 set. 2012.
- CHU, T. N. *et al.* Plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas* PS01 induces salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **BMC Research Notes**, v. 12, n. 1, p. 11, 11 jan. 2019.
- COOPER, A. *et al.* Frog foams and natural protein surfactants. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 534, p. 120–129, 2017.
- COSTA-GUTIERREZ, S. B. *et al.* Plant growth promotion by *Pseudomonas putida* KT2440 under saline stress: role of *eptA*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 10, p. 4577–4592, 1 maio 2020.
- CRUMP, M. Anuran Reproductive Modes: Evolving Perspectives. **Journal of Herpetology**, v. 49, p. 1–16, 1 mar. 2015.
- DALE, C.; MORAN, N. A. Molecular interactions between bacterial symbionts and their hosts. **Cell**, v. 126, n. 3, p. 453–465, 11 ago. 2006.
- DASKIN, J. H. *et al.* Cool Temperatures Reduce Antifungal Activity of Symbiotic Bacteria of Threatened Amphibians – Implications for Disease Management and Patterns of Decline. **PLOS ONE**, v. 9, n. 6, p. e100378, 18 jun. 2014.
- DUMAN, M. *et al.* *Pseudomonas anatoliensis* sp. nov and *Pseudomonas iridis* sp. nov. isolated from fish. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 126198, 1 maio 2021.
- 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**, v. 30, n. 3, p. 262–269, 2015.
- FISCHER, E. K. Form, function, foam: evolutionary ecology of anuran nests and nesting behaviour. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 378, n. 1884, p. 20220141, 10 jul. 2023.
- FLECHAS, S. V. *et al.* Surviving Chytridiomycosis: Differential Anti-Batrachochytrium dendrobatidis Activity in Bacterial Isolates from Three Lowland Species of *Atelopus*. **PLOS ONE**, v. 7, n. 9, p. e44832, 10 set. 2012.
- FLEMING, R. I. *et al.* Foam nest components of the túngara frog: a cocktail of proteins conferring physical and biological resilience. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 276, n. 1663, p. 1787–1795, 25 fev. 2009.
- FLURY, P. *et al.* Antimicrobial and Insecticidal: Cyclic Lipopeptides and Hydrogen Cyanide Produced by Plant-Beneficial *Pseudomonas* Strains CHA0, CMR12a, and PCL1391 Contribute to Insect Killing. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 3 fev. 2017.
- FONSECA, E. L. *et al.* Emergence of *Elizabethkingia miricola* in the Brazilian Amazon region. **Science of the Total Environment**, v. 907, 2024.
- FRANCIS, F. *et al.* Neonatal Meningitis Outbreak by *Elizabethkingia*: A Case Series and Epidemiological Investigation Findings. **Journal of Neonatology**, 2023.

GARCÍAS-BONET, N. *et al.* Horizon scanning the application of probiotics for wildlife. **Trends in Microbiology**, v. 0, n. 0, 25 set. 2023.

GEORGIEVA, G. *et al.* Study of the plant growth-promoting capacity of *Pseudomonas putida* 1046 in a model plant system. **BioRisk**, v. 20, p. 115–128, 15 maio 2023.

GOMEZ-MESTRE, I.; PYRON, R. A.; WIENS, J. J. Phylogenetic Analyses Reveal Unexpected Patterns in the Evolution of Reproductive Modes in Frogs. **Evolution**, v. 66, n. 12, p. 3687–3700, 2012.

GOULD, J. Safety Bubbles: A Review of the Proposed Functions of Froth Nesting among Anuran Amphibians. **Ecologies**, v. 2, n. 1, p. 112–137, mar. 2021.

GRAM, L. *et al.* Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. **Applied and environmental microbiology**, v. 65, n. 3, p. 969–973, 1999.

GREENSPAN, S. E. *et al.* Hybrids of amphibian chytrid show high virulence in native hosts. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 9600, 25 jun. 2018.

HAAS, D.; KEEL, C. **Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease - PubMed**. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12730389/>. Acesso em: 6 mar. 2024.

HADAD, C. *et al.* **Guia dos anfíbios da Mata Atlântica: diversidade e biologia / Guide to the amphibians of the Atlantic Forest: diversity and biology**. [s.l.: s.n.].

HADDAD, C.; PRADO, C. Reproductive Modes in Frogs and Their Unexpected Diversity in the Atlantic Forest of Brazil. **BioScience**, v. 55, p. 207–217, 1 mar. 2005.

HARRIS, R. *et al.* Harris RN, James TY, Lauer A, Simon MA, Patel A.. Amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* is inhibited by the cutaneous bacteria of Amphibian species. *Ecohealth* 3: 53-56. **EcoHealth**, v. 3, p. 53–56, 1 mar. 2006.

HARRIS, R. N. *et al.* Skin microbes on frogs prevent morbidity and mortality caused by a lethal skin fungus. **The ISME Journal**, v. 3, n. 7, p. 818–824, jul. 2009.

HAVENAAR, R.; HUIS IN'T VELD, J. H. J. Probiotics: A General View. Em: WOOD, B. J. B. (Ed.). **The Lactic Acid Bacteria Volume 1: The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease**. Boston, MA: Springer US, 1992. p. 151–170.

HESSE, C. *et al.* Genome-based evolutionary history of *Pseudomonas* spp. **Environmental Microbiology**, v. 20, n. 6, p. 2142–2159, 2018.

HISSA, D. *et al.* Unique Crystal Structure of a Novel Surfactant Protein from the Foam Nest of the Frog *Leptodactylus vastus*. **ChemBiochem : a European journal of chemical biology**, v. 15, 10 fev. 2014.

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**, v. 211, n. 16, p. 2707–2711, 15 ago. 2008.



ICMBIO. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume IV? Répteis. 2018.

IUCN. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org/en>. Acesso em: 3 jan. 2024.

JACINTO-MALDONADO, M. *et al.* Water Pollution Increases the Risk of Chytridiomycosis in Mexican Amphibians. **EcoHealth**, v. 20, n. 1, p. 74–83, 1 mar. 2023.

JANSSEN, P. H. Identifying the Dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries of 16S rRNA and 16S rRNA Genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 3, p. 1719–1728, mar. 2006.

JIMÉNEZ, R. R. *et al.* Moving Beyond the Host: Unraveling the Skin Microbiome of Endangered Costa Rican Amphibians. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 2060, 12 set. 2019.

KALCHEV, Y. *et al.* Elizabethkingia miricola Recovered from a Peritoneal Fluid Sample – A Clinical Case Report with Diagnostic Challenges. **Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences**, v. 10, n. C, p. 28–31, 2022.

KNAPP, R. A. *et al.* Effectiveness of antifungal treatments during chytridiomycosis epizootics in populations of an endangered frog. **PeerJ**, v. 10, p. e12712, 2022.

KOHL, K. D. *et al.* Restructuring of the amphibian gut microbiota through metamorphosis. **Environmental Microbiology Reports**, v. 5, n. 6, p. 899–903, dez. 2013.

KRUGER, A. Functional Redundancy of Batrachochytrium dendrobatidis Inhibition in Bacterial Communities Isolated from Lithobates clamitans Skin. **Microbial Ecology**, v. 79, n. 1, p. 231–240, 1 jan. 2020.

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**, v. 283, n. 1839, p. 20161553, 28 set. 2016.

KÜNG, D. *et al.* Stability of Microbiota Facilitated by Host Immune Regulation: Informing Probiotic Strategies to Manage Amphibian Disease. **PLOS ONE**, v. 9, n. 1, p. e87101, 29 jan. 2014.

LAM, B. A. *et al.* Proportion of individuals with anti-Batrachochytrium dendrobatidis skin bacteria is associated with population persistence in the frog Rana muscosa. **Biological Conservation**, v. 143, n. 2, p. 529–531, 1 fev. 2010.

LARSEN, E. H. Dual skin functions in amphibian osmoregulation. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 253, p. 110869, 1 mar. 2021.

LAUER, A. *et al.* Common Cutaneous Bacteria from the Eastern Red-Backed Salamander Can Inhibit Pathogenic Fungi. **Copeia**, v. 2007, n. 3, p. 630–640, set. 2007.

LEITE, D. C. A. *et al.* Coral Bacterial-Core Abundance and Network Complexity as Proxies for Anthropogenic Pollution. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2018.

- LI, S. *et al.* Co-infections of *Klebsiella pneumoniae* and *Elizabethkingia miricola* in black-spotted frogs (*Pelophylax nigromaculatus*). **Microbial Pathogenesis**, v. 180, 2023.
- LION, M. B. *et al.* Global patterns of terrestriality in amphibian reproduction. **Global Ecology and Biogeography**, v. 28, n. 6, p. 744–756, jun. 2019.
- LONGO, A. *et al.* Seasonal and ontogenetic variation of skin microbial communities and relationships to natural disease dynamics in declining amphibians. **Royal Society Open Science**, v. 2, p. 140377, 1 jul. 2015.
- LOUDON, A. H. *et al.* Interactions between amphibians' symbiotic bacteria cause the production of emergent anti-fungal metabolites. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, 2014.
- LUEDTKE, J. A. *et al.* Ongoing declines for the world's amphibians in the face of emerging threats. **Nature**, v. 622, n. 7982, p. 308–314, 12 out. 2023.
- LYSENKO, O. *Pseudomonas*—An attempt at a general classification. **Microbiology**, v. 25, n. 3, p. 379–408, 1961.
- MACKENZIE, C. *et al.* Ranaspumin-2: Structure and Function of a Surfactant Protein from the Foam Nests of a Tropical Frog. **Biophysical journal**, v. 96, p. 4984–92, 1 jul. 2009.
- MADISON, J. D. *et al.* Characterization of *Batrachochytrium dendrobatidis* Inhibiting Bacteria from Amphibian Populations in Costa Rica. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017.
- MAES, S. *et al.* *Pseudomonas putida* as a potential biocontrol agent against *Salmonella* Java biofilm formation in the drinking water system of broiler houses. **BMC Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 373, 11 dez. 2020.
- MANS, D. *et al.* Exploring the global animal biodiversity in the search for new drugs - Amphibians. **Journal of Translational Science**, v. 7, p. 1–17, 1 jan. 2020.
- MARTIN H, C. *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**, v. 9, n. 1, p. 3019, 2019.
- MARTÍNEZ-GARCÍA, E.; DE LORENZO, V. *Pseudomonas putida* as a synthetic biology chassis and a metabolic engineering platform. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 85, p. 103025, 1 fev. 2024.
- MARTINS, D. V. Estudo da composição e das atividades biológicas dos microrganismos isolados do ninho de espuma do anuro *Adenomera hylaedactyla*. 2020.
- 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**, v. 3, p. 1–15, 2021.
- MEEGASKUMBURA, M. *et al.* Patterns of reproductive-mode evolution in Old World tree frogs (Anura, Rhacophoridae). **Zoologica Scripta**, v. 44, n. 5, p. 509–522, 2015.

- MEHNAZ, S. *et al.* Growth promoting effects of corn (*Zea mays*) bacterial isolates under greenhouse and field conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 10, p. 1848–1856, 1 out. 2010.
- MENDES, M. DOS S. Detecção do Fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* em Anuros no estado do Ceará, Brasil. 2021.
- MENTEL, M. *et al.* Of Two Make One: The Biosynthesis of Phenazines. **ChemBioChem**, v. 10, n. 14, p. 2295–2304, 2009.
- MONTEIRO, F. A. C. *et al.* Neotropical Frog Foam Nest's Microbiomes. **Microorganisms**, v. 11, n. 4, p. 900, abr. 2023.
- MOSKWIK, M. Recent elevational range expansions in plethodontid salamanders (Amphibia: Plethodontidae) in the southern Appalachian Mountains. **Journal of Biogeography**, v. 41, n. 10, p. 1957–1966, 2014.
- MULET, M. *et al.* An *rpoD*-based PCR procedure for the identification of *Pseudomonas* species and for their detection in environmental samples. **Molecular and Cellular Probes**, v. 23, n. 3, p. 140–147, 1 jun. 2009.
- MULET, M.; GARCÍA-VALDÉS, E.; LALUCAT, J. Phylogenetic affiliation of *Pseudomonas putida* biovar A and B strains. **Research in Microbiology**, v. 164, n. 4, p. 351–359, maio 2013.
- MULETZ WOLZ, C. *et al.* Soil bioaugmentation with amphibian cutaneous bacteria protects amphibian hosts from infection by *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Biological Conservation**, v. 152, p. 119–126, 1 ago. 2012.
- MYERS, J. M. *et al.* Synergistic inhibition of the lethal fungal pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*: the combined effect of symbiotic bacterial metabolites and antimicrobial peptides of the frog *Rana muscosa*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 38, n. 8, p. 958–965, ago. 2012.
- NABRDALIK, M.; GRATA, K. Antifungal activity of *Pseudomonas fluorescens* against phytopathogenic strains of *Rhizoctonia solani*. **Proceedings of ECOpole**, v. 8, n. 1, p. 65–69, 2014.
- NAVA-GONZÁLEZ, B. *et al.* Inhibition of *Batrachochytrium dendrobatidis* Infection by Skin Bacterial Communities in Wild Amphibian Populations. **Microbial Ecology**, v. 82, n. 3, p. 666–676, 1 out. 2021.
- NUNES-DE-ALMEIDA, C. H.; HADDAD, C.; TOLEDO, L. F. A revised classification of the amphibian reproductive modes. **Salamandra**, v. 57, p. 413–427, 15 ago. 2021.
- O'HANLON, S. J. *et al.* Recent Asian origin of chytrid fungi causing global amphibian declines. **Science**, v. 360, n. 6389, p. 621–627, 11 maio 2018.
- OLIVER, C. *et al.* *Pseudomonas putida* strain B2017 produced as technical grade active ingredient controls fungal and bacterial crop diseases. **Biocontrol Science and Technology**, v. 29, n. 11, p. 1053–1068, 2019.

- OLSON, D. H. *et al.* Mapping the Global Emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the Amphibian Chytrid Fungus. **PLOS ONE**, v. 8, n. 2, p. e56802, 27 fev. 2013.
- OLSON, D. H. *et al.* Global Patterns of the Fungal Pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* Support Conservation Urgency. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, 2021.
- PALUMBI, S. Simple fool's guide to PCR. 1991.
- PARADA, A. E.; NEEDHAM, D. M.; FUHRMAN, J. A. Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 5, p. 1403–1414, maio 2016.
- PEDRÓS-ALIÓ, C. The Rare Bacterial Biosphere. **Annual Review of Marine Science**, v. 4, n. 1, p. 449–466, 2012.
- PEIXOTO, R. S. *et al.* Coral Probiotics: Premise, Promise, Prospects. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 9, n. 1, p. 265–288, 2021.
- PERRIN, A. *et al.* Amphibian abundance is associated with reduced mosquito presence in human-modified landscapes. **Ecosphere**, v. 14, n. 3, p. e4484, 2023.
- PIOTROWSKI, J.; ANNIS, S.; LONGCORE, J. Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. **Mycologia**, v. 96, p. 9–15, 1 jan. 2004.
- POBLETE-MORALES, M. *et al.* *Pseudomonas atacamensis* sp. nov., isolated from the rhizosphere of desert bloom plant in the region of Atacama, Chile. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 113, n. 8, p. 1201–1211, 1 ago. 2020.
- PRADO, J. S. *et al.* Chytrid in the clouds: an alternative passive transport of a lethal pathogen for amphibians. **Hydrobiologia**, v. 850, n. 9, p. 2061–2073, 1 maio 2023.
- PUAH, S. M. *et al.* Molecular identification and biofilm-forming ability of *Elizabethkingia* species. **Microbial Pathogenesis**, v. 162, 2022.
- REBOLLAR, E. A. *et al.* Using “Omics” and Integrated Multi-Omics Approaches to Guide Probiotic Selection to Mitigate Chytridiomycosis and Other Emerging Infectious Diseases. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016a.
- REBOLLAR, E. A. *et al.* Direct and Indirect Horizontal Transmission of the Antifungal Probiotic Bacterium *Janthinobacterium lividum* on Green Frog (*Lithobates clamitans*) Tadpoles. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 8, p. 2457–2466, abr. 2016b.
- REBOLLAR, E. A. *et al.* Skin bacterial diversity of Panamanian frogs is associated with host susceptibility and presence of *Batrachochytrium dendrobatidis*. **The ISME Journal**, v. 10, n. 7, p. 1682–1695, jul. 2016c.
- REMICKOVA, M. *et al.* Anti-herpesvirus activities of *Pseudomonas* sp. S-17 rhamnolipid and its complex with alginate. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 63, n. 1–2, p. 75–81, 2008.

- ROBLES, R. *et al.* Molecular phylogeny of the American Callinectes Stimpson, 1860 (Brachyura: Portunidae), based on two partial mitochondrial genes. **Marine Biology**, v. 150, n. 6, p. 1265–1274, 1 mar. 2007.
- ROLLINS-SMITH, L. A. The importance of antimicrobial peptides (AMPs) in amphibian skin defense. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 142, p. 104657, 1 maio 2023.
- ROSS, A. A.; RODRIGUES HOFFMANN, A.; NEUFELD, J. D. The skin microbiome of vertebrates. **Microbiome**, v. 7, n. 1, p. 79, 23 maio 2019.
- SAH, S.; KRISHNANI, S.; SINGH, R. Pseudomonas mediated nutritional and growth promotional activities for sustainable food security. **Current Research in Microbial Sciences**, v. 2, p. 100084, 1 dez. 2021.
- SAWADA, H.; FUJIKAWA, T.; HORITA, H. Pseudomonas brassicae sp. nov., a pathogen causing head rot of broccoli in Japan. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 10, p. 5319–5329, 2020.
- SCHEELE, B. *et al.* Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity. **Science**, v. 363, p. 1459–1463, 29 mar. 2019.
- SEWELL, T. R.; LONGCORE, J.; FISHER, M. C. Batrachochytrium dendrobatidis. **Trends in Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 933–934, 2021.
- SHAW, S. D. *et al.* BASELINE CUTANEOUS BACTERIA OF FREE-LIVING NEW ZEALAND NATIVE FROGS (LEIOPELMA ARCHEYI AND LEIOPELMA HOCHSTETTERI) AND IMPLICATIONS FOR THEIR ROLE IN DEFENSE AGAINST THE AMPHIBIAN CHYTRID (BATRACHOCHYTRIUM DENDROBATIDIS). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 50, n. 4, p. 723–732, 1 out. 2014.
- SILBY, M. W. *et al.* Pseudomonas genomes: diverse and adaptable. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 35, n. 4, p. 652–680, 1 jul. 2011.
- SINGH, P. *et al.* Unlocking the strength of plant growth promoting Pseudomonas in improving crop productivity in normal and challenging environments: a review. **Journal of Plant Interactions**, v. 17, n. 1, p. 220–238, 31 dez. 2022.
- SOUSA, C. A. *et al.* Phenazines: Natural products for microbial growth control. **hLife**, 28 nov. 2023.
- SPRINGBORN, M. R. *et al.* Amphibian collapses increased malaria incidence in Central America\*. **Environmental Research Letters**, v. 17, n. 10, p. 104012, set. 2022.
- STEGEN, G. *et al.* Drivers of salamander extirpation mediated by Batrachochytrium salamandrivorans. **Nature**, v. 544, n. 7650, p. 353–356, abr. 2017.
- STEIGERWALD, E. *et al.* Elevational range extension of the marsupial frog, Gastrotheca marsupiata (Duméril & Bibron, 1841)(Anura, Hemiphraetidae), from southern Peru. **Check List**, v. 17, n. 1, p. 145–150, 2021.

- SUN, X. *et al.* Biocontrol of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by a nematocidal bacterium *Pseudomonas simiae* MB751 with cyclic dipeptide. **Pest management science**, v. 77, n. 10, p. 4365–4374, 2021.
- SWAMI, M. *et al.* Elizabethkingia meningoseptica Outbreak in NICU: An Observational Study on a Debilitating Neuroinfection in Neonates. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 43, n. 1, p. 63–68, 2024.
- SZÉKELY, D. *et al.* Adult—Juvenile interactions and temporal niche partitioning between life-stages in a tropical amphibian. **PLOS ONE**, v. 15, n. 9, p. e0238949, 14 set. 2020.
- TOLEDO, L. F.; HADDAD, C. F. B. Reproductive biology of *Scinax fuscomarginatus* (Anura, Hylidae) in south-eastern Brazil. **Journal of Natural History**, v. 39, n. 32, p. 3029–3037, 27 set. 2005.
- TORNABENE, B. J. *et al.* Broad-Scale Assessment of Methylmercury in Adult Amphibians. **Environmental Science & Technology**, v. 57, n. 45, p. 17511–17521, 14 nov. 2023.
- TRIMPERT, J. *et al.* Elizabethkingia miricola infection in multiple anuran species. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 68, n. 2, p. 931–940, 2021.
- VARGA, J. F. A.; BUI-MARINOS, M. P.; KATZENBACK, B. A. Frog Skin Innate Immune Defences: Sensing and Surviving Pathogens. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 2019.
- VERSCHUERE, L. *et al.* Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 4, p. 655–671, dez. 2000.
- VOYLES, J. *et al.* Pathogenesis of Chytridiomycosis, a Cause of Catastrophic Amphibian Declines. **Science (New York, N.Y.)**, v. 326, p. 582–5, 1 out. 2009.
- WALKE, J. B.; BELDEN, L. K. Harnessing the Microbiome to Prevent Fungal Infections: Lessons from Amphibians. **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 9, p. e1005796, 8 set. 2016.
- WALSH, U. F.; MORRISSEY, J. P.; O’GARA, F. Pseudomonas for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 12, n. 3, p. 289–295, jun. 2001.
- WEI, D. *et al.* Natural occurrences and characterization of Elizabethkingia miricola infection in cultured bullfrogs (*Rana catesbeiana*). **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 13, 2023.
- WELLS, K. D. **The ecology and behavior of amphibians**. [s.l.] University of Chicago press, 2019.
- WOODHAMS, D. *et al.* Symbiotic bacteria contribute to innate immune defenses of the threatened mountain yellow-legged frog, *Rana muscosa*. **Biological Conservation**, v. 138, p. 390–398, 1 set. 2007.
- WOODHAMS, D. C. *et al.* Prodigiosin, Violacein, and Volatile Organic Compounds Produced by Widespread Cutaneous Bacteria of Amphibians Can Inhibit Two Batrachochytrium Fungal Pathogens. **Microbial Ecology**, v. 75, n. 4, p. 1049–1062, 1 maio 2018.

- WOODHAMS, D. C. *et al.* Probiotics Modulate a Novel Amphibian Skin Defense Peptide That Is Antifungal and Facilitates Growth of Antifungal Bacteria. **Microbial Ecology**, v. 79, n. 1, p. 192–202, 1 jan. 2020.
- YANG, S. *et al.* Septicemia caused by an emerging pathogen, *Elizabethkingia miricola*, in a laboratory colony of African dwarf frogs (*Hymenochirus curtipes*). **Veterinary Pathology**, v. 60, n. 3, p. 394–401, 1 maio 2023.
- YASUMIBA, K.; BELL, S.; ALFORD, R. Cell Density Effects of Frog Skin Bacteria on Their Capacity to Inhibit Growth of the Chytrid Fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Microbial Ecology**, v. 71, n. 1, p. 124–130, 1 jan. 2016.
- ZANNELLA, C. *et al.* Broad-spectrum antiviral activity of the amphibian antimicrobial peptide Temporin L and its analogs. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 4, p. 2060, 2022.
- ZHANG, L.; LU, X. I. N. Amphibians live longer at higher altitudes but not at higher latitudes. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 106, n. 3, p. 623–632, 2012.
- ZHUO, X.; ZHOU, Y.; LIU, L. Acute bacterial encephalitis complicated with recurrent nasopharyngeal carcinoma associated with *Elizabethkingia miricola* infection: A case report. **Frontiers in Neurology**, v. 13, 2023.