



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

PAULO RICARDO SANTOS DE SOUSA

MICROBIOTA DE NINHOS DE ESPUMA NO COMBATE À QUITRIDOMICOSE:
ESTRATÉGIAS PARA CONSERVAÇÃO DE ANFÍBIOS

FORTALEZA

2024

PAULO RICARDO SANTOS DE SOUSA

MICROBIOTA DE NINHOS DE ESPUMA NO COMBATE À QUITRIDOMICOSE:
ESTRATÉGIAS PARA CONSERVAÇÃO DE ANFÍBIOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sistemática, Uso e Conservação da Biodiversidade da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do título de mestre em Sistemática, Uso e Conservação da Biodiversidade. Área de concentração: Prospecção e uso sustentável da biodiversidade.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Denise Cavalcante Hissa.

Coorientadora: Prof^ª. Dra. Vânia Maria Maciel Melo.

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)

- S698m Sousa, Paulo Ricardo Santos de.
Microbiota de ninhos de espuma no combate à quitridiomicosose : Estratégias para conservação de anfíbios / Paulo Ricardo Santos de Sousa. – 2024.
74 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Sistemática, Uso e Conservação da Biodiversidade, Fortaleza, 2024.
Orientação: Profa. Dra. Denise Cavalcante Hissa.
Coorientação: Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo.
1. Batrachochytrium dendrobatidis. 2. Anuros. 3. Probióticos. 4. Bioaugmentação. I. Título.
CDD 578.7
-

PAULO RICARDO SANTOS DE SOUSA

MICROBIOTA DE NINHOS DE ESPUMA NO COMBATE À QUITRIDOMICOSE:
ESTRATÉGIAS PARA CONSERVAÇÃO DE ANFÍBIOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sistemática, Uso e Conservação da Biodiversidade da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do título de mestre em Sistemática, Uso e Conservação da Biodiversidade. Área de concentração: Prospecção e uso sustentável da biodiversidade.

Aprovado em: 07/03/2024.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Denise Cavalcante Hissa (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Erika Freitas Mota
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Talita Camila Evaristo da Silva Nascimento
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Às minhas professoras, que investiram seu tempo e confiança em mim.

Ao meu esforço e à minha saúde mental.

Aos meus familiares, amigos e companheiros que acompanharam minha trajetória.

A todos os alunos que já me viram, ou verão, como pessoa inspiradora.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal do Ceará e o Departamento de Biologia, que me acolheram desde a graduação.

A Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo financiamento da bolsa de mestrado, no início do curso.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro em projetos.

Aos meus familiares, que sempre apoiaram e incentivaram meus estudos, dando o máximo de apoio possível para que eu crescesse como indivíduo.

A minha orientadora, Professora Dra. Denise Hissa, que me apoiou, escutou, acolheu e incentivou durante esses três difíceis anos, não me deixando desistir em momento algum.

A minha coorientadora, Professora Dra. Vânia Melo, que me ensinou várias lições desde o tempo de monitoria na graduação e não hesitou em me acolher junto à sua equipe com a Profa. Denise.

Aos membros da banca, por disponibilizarem na sua agenda corrida um tempo para apreciação de minha pesquisa.

Aos meus professores e professoras do PPGSIS, que contribuíram para complementar minha formação como biólogo, professor e cientista nesse mestrado.

A todos da equipe do LarGen e Lembiotech, que me apoiaram nessa trajetória e estiveram me fazendo companhia nos dias de trabalho e lazer.

Aos meus amigos do trabalho na escola CAIC Raimundo Gomes de Carvalho, que também me incentivaram nessa difícil jornada de conciliar o trabalho e o estudo.

Aos meus alunos e alunas, que me inspiram diariamente a me tornar um profissional cada vez mais capacitado.

A mim, por não ter desistido no caminho, apesar das frustrações e dificuldades, mesmo depois de surtar algumas vezes achando que não seria capaz, mas cá estou.

“As more details of the microbiome and its interaction with the host are discovered, it becomes more likely that we will have the information needed to develop effective probiotic therapies”. (McKENZIE; KUENEMAN; HARRIS, 2018).

RESUMO

Os anuros são os vertebrados que mais sofrem declínio populacional no mundo, sendo a quitridiomicose, causada pelo fungo patogênico *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd), relatada como a principal causa desse declínio. Já foi reportado que a microbiota da pele dos anuros tem um papel importante no controle do Bd. Essas bactérias são apontadas como uma estratégia promissora para o desenvolvimento de probióticos que atuam fortalecendo as defesas do hospedeiro, prevenindo a quitridiomicose. Os ninhos de espuma, constituem bioespumas compostas de proteínas ranaspuminas e carboidratos que permitem abrigar os ovos até seu desenvolvimento em girinos. Assim como a pele dos anuros, os ninhos de espuma possuem uma microbiota exclusiva, porém ainda não explorada quanto a presença de bactérias anti-Bd. Dessa forma, esta pesquisa teve por objetivo a prospecção de bactérias anti-Bd em ninhos de espuma das espécies de rãs *Adenomera hylaedactyla*, *Leptodactylus vastus* e *Physalaemus cuvieri* visando identificar potenciais isolados que possam atuar no controle do patógeno nas fases iniciais do desenvolvimento do girino. No estudo foram avaliados 182 isolados bacterianos provenientes de ninhos das três espécies de rãs. A atividade anti-Bd foi avaliada de forma direta, inoculando-se as bactérias-testes em pontos equidistantes da superfície de placas de Ágar Triptona 1% contendo uma camada padronizada de Bd. Os resultados foram analisados de acordo com a presença ou ausência de halos de inibição ao redor dos isolados. Para avaliar se a atividade era devida a um produto extracelular, a cultura de cada bactéria-teste foi co-cultivada com a cultura do fungo, e o sobrenadante do co-cultivo foi subsequentemente cultivado em meio líquido inoculado com uma suspensão padronizada de Bd. O resultado foi expresso pelo número de Bd viáveis totais. Com base nos resultados dos dois testes e no teste de compatibilidade entre os isolados foram selecionados 11 isolados candidatos a compor um consórcio probiótico anti-Bd, dos 55 que apresentaram resultados positivos. Os isolados foram combinados gerando 18 consórcios diferentes. Como resultados tem-se que 30,77% dos isolados foram capazes de inibir diretamente o crescimento do Bd, enquanto apenas 4,95% dos sobrenadantes das culturas apresentaram inibição significativa do Bd. Além disso, 64,84% dos sobrenadantes das culturas estimularam o crescimento do Bd. Em ambos os testes, os isolados mais promissores com atividade anti-Bd foram identificados como pertencentes ao gênero *Pseudomonas*. Dos 18 consórcios testados, 13 apresentaram inibição moderada. Cinco consórcios se destacaram, sendo compostos por bactérias pertencentes aos gêneros *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*, *Microbacterium*, *Pseudomonas* e *Serratia*. Os resultados desse estudo mostram que componentes da microbiota dos ninhos de espuma de rãs podem ser

a chave para o controle do Bd nas fases iniciais do desenvolvimento. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Palavras-chave: *Batrachochytrium dendrobatidis*; anuros; probióticos; bioaugmentação.

ABSTRACT

Anurans are the vertebrates experiencing the highest population decline globally, with chytridiomycosis caused by the pathogenic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) reported as the primary cause of this decline. It has been reported that the skin microbiota of anurans plays a crucial role in controlling Bd. These bacteria are considered a promising strategy for the development of probiotics that strengthen the host's defenses, preventing chytridiomycosis. Foam nests are biofoams composed of ranaspumin proteins and carbohydrates that provide shelter for eggs until they develop into tadpoles. Similar to anuran skin, foam nests have a unique microbiota, yet unexplored for the presence of anti-Bd bacteria. Thus, this research aimed to prospect anti-Bd bacteria in foam nests of the frog species *Adenomera hylaedactyla*, *Leptodactylus vastus*, and *Physalaemus cuvieri*, aiming to identify potential isolates that can act in controlling the pathogen during the early stages of tadpole development. The study evaluated 182 bacterial isolates from nests of the three frog species. Anti-Bd activity was assessed directly by inoculating the test bacteria at equidistant points on the surface of 1% Tryptone Agar plates containing a standardized Bd layer. Results were analyzed based on the presence or absence of inhibition halos around the isolates. To assess if the activity was due to an extracellular product, each test bacterium's culture was co-cultivated with the fungus, and the co-culture supernatant was cultured in liquid medium inoculated with a standardized Bd suspension. The result was expressed by the number of viable total Bd. Based on the results of the two tests and the compatibility test among the isolates, 11 candidates were selected to form an anti-Bd probiotic consortium from the 55 with ability to inhibit Bd growth. The isolates were combined in 18 different consortia. As a result, 30.77% of the isolates were capable of directly inhibiting Bd growth, while only 4.95% of the culture supernatants showed significant Bd inhibition. Additionally, 64.84% of the culture supernatants stimulated Bd growth. In both tests, the most promising isolates with anti-Bd activity were belonging to the genus *Pseudomonas*. Thirteen of the eighteen consortia showed moderate inhibition. Five consortia stood out, composed of bacteria belonging to the genera *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, and *Serratia*. The results of this study demonstrate that components of the microbiota in frog foam nests may be the key to Bd control in the early developmental stages. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

Keywords: *Batrachochytrium dendrobatidis*; anurans; probiotics; bioaugmentation.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	13
2.1	Conservação de anfíbios	13
2.2	A quitridiomíose e o declínio populacional dos anfíbios	16
2.3	Probióticos contra a quitridiomíose: os ninhos de espuma como fonte de bioprospeção de microrganismos	21
3	OBJETIVOS	29
3.1	Objetivo geral	29
3.2	Objetivos específicos	29
4	METODOLOGIA	30
4.1	Caracterização das coleções microbianas	30
4.2	Curva de contagem de zoósporos de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	31
4.3	Avaliação do potencial inibitório de Bd em meio sólido	33
4.4	Avaliação do potencial inibitório de Bd em meio líquido	34
4.5	Teste de compatibilidade microbiana	37
4.6	Avaliação de consórcios microbianos para inibição do fungo Bd	38
5	RESULTADOS	41
5.1	Curva de contagem de zoósporos	41
5.2	Caracterização dos microrganismos teste	41
5.3	Ensaio Anti-Bd em meio sólido	44
5.4	Ensaio Anti-Bd em meio líquido	46
5.5	Ensaio de compatibilidade microbiana (<i>Cross streak</i>)	52
5.6	Ensaio anti-Bd em meio líquido com os consórcios propostos	54
6	DISCUSSÃO	56
6.1	Diversidade bacteriana dos ninhos	56
6.2	Atividade anti-Bd dos isolados	57
6.3	Consórcios microbianos dos ninhos de espuma	60
6.4	Perspectivas sobre as bactérias de ninhos de espuma como probióticos	62
7	CONCLUSÕES	64
	REFERÊNCIAS	65

1 INTRODUÇÃO

Brasil é o país com a maior diversidade de anuros no mundo, possuindo cerca de 1144 espécies do grupo (SEGALLA *et al.*, 2021), sendo esse valor subestimado, pois as pesquisas herpetológicas vêm aumentando. Nos últimos 30 anos, foram descritas, em média, 40 espécies novas de anfíbios por ano em toda a América do Sul (VASCONCELOS *et al.*, 2019) e, no Brasil, 50 novas espécies de anuros foram adicionadas à Lista de Espécies de Anfíbios Brasileiros entre os anos de 2019 e 2021 (SEGALLA *et al.*, 2019; SEGALLA *et al.*, 2021).

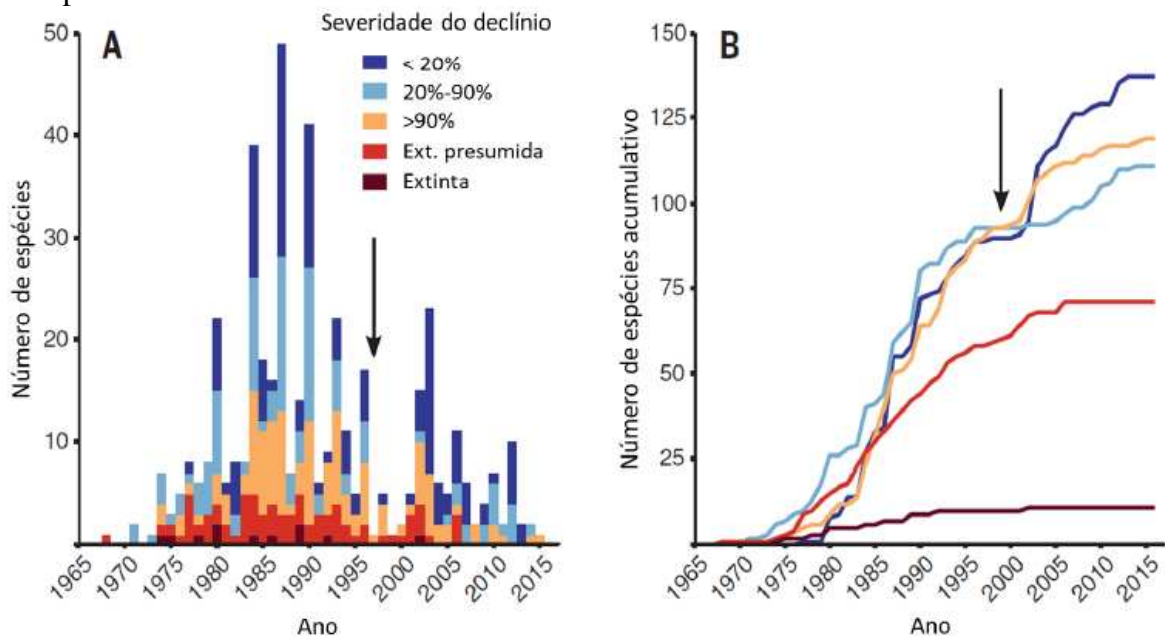
O grupo dos anuros é caracterizado pelo seu hábito intermediário entre água e terra e sua reprodução normalmente bifásica, com um vasto repertório de modos reprodutivos (GALLARDO, 1979), além de ser um grupo de grande importância ecológica devido à sua atuação como controle de pragas (insetos), atuantes nas teias alimentares e no fluxo de energia do ambiente, como indicadores ambientais de aquecimento e poluição devido a suas características fisiológicas (BLAUSTEIN, 1994; YÁNEZ-MUÑOZ; MÉZA-RAMOS, 2006).

Esse grupo também se caracteriza por ser fonte de estudos biomédicos e farmacológicos, pois sua pele é rica em compostos de potencial farmacológico e biotecnológico e de microbiotas específicas adaptadas às suas secreções, assim, esse órgão tem sido alvo de prospecção de substâncias e microrganismos para estudos (CABRAL, 2012).

Apesar de seu grande papel ecológico e sua importância para a sociedade, o grupo dos anuros é, dentre os vertebrados, o que tem maiores taxas de declínio populacional. Diversos fatores têm sido apontados sobre o declínio das populações de anfíbios pelo mundo todo, como poluição, aumento da temperatura, desmatamento, mas além disso, populações têm sido devastadas pela quitridiomiose, doença causada pelo fungo quitrídio *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd), que pode ser mortal (SCHEELE *et al.*, 2020), conforme mostra a Figura 1. Já existem estudos demonstrando a presença desse patógeno no Brasil (CARNAVAL *et al.*, 2005; TOLEDO *et al.*, 2006) e no Ceará (MENDES, 2021).

Na busca por estratégias de conservação dos anfíbios para combater o principal agente dizimador de espécies, o fungo *Bd*, tem-se como uma das opções relatadas na literatura o uso da microbiota cutânea dos anfíbios como probiótico e esse tipo de pesquisa tem se estendido para a comunidade microbiana relacionada a estágios de desenvolvimento e maturação, como os microrganismos presentes nos ninhos de espuma (REBOLLAR *et al.*, 2016; WOODHAMS *et al.*, 2019).

Figura 1 – Efeitos da quitridiomiose em espécies de anfíbios no mundo ao longo do tempo.



Fonte: Traduzido de Scheel *et al.* (2020). Em A são vistos os declínios por ano, com as barras indicando o número de quedas em cada período, agrupados por critério de gravidade. Para espécies cujo ano de declínio foi incerto, os autores colocaram intervalos intermediários a partir de dados disponíveis. Em B pode-se ver os declínios cumulativos, assim, as curvas indicam o número cumulativo de declínios em cada categoria de gravidade de declínio ao longo do tempo, conforme legenda de cores. Em A e B a seta marca a descoberta e descrição da quitridiomiose em 1998.

Os ninhos de espuma são estruturas compostas majoritariamente por proteínas e carboidratos, liberados por algumas espécies de anuros durante o amplexo e são aeradas durante a cópula através do movimento das pernas dos anuros (DALGETTY; KENNEDY, 2010).

Essas estruturas permitem a deposição dos ovos desses animais fora do corpo d'água (seja sobre a lâmina d'água ou até mesmo em câmaras subterrâneas) e permanecem estáveis até o desenvolvimento dos girinos. Essas bioconstruções além de serem alvos de estudos sobre sua composição proteica, também estão sendo estudadas quanto ao seu microbioma associado e o potencial biotecnológico desses agentes, para buscar entender características que tornam os ninhos resistentes e importantes para os anuros (HISSA *et al.*, 2008; FLEMING *et al.*, 2009; HISSA *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2019).

A estrutura proteica dos ninhos de espuma apresenta papel essencial na proteção física dos embriões, além de ações enzimáticas protetoras e atividade surfactante, por isso essa estrutura é resistente a períodos de dias em condições adversas, como nas zonas tropicais, onde há grande variação na temperatura ambiental e exposição a grande quantidade de raios UV (HISSA *et al.*, 2008; COOPER; KENNEDY, 2010; HISSA *et al.*, 2014)

Em adição, os microrganismos apresentam papel ecológico essencial também na proteção dos ninhos, devido a sua capacidade de competir com outros microrganismos indesejados (atividade antibiótica), secretar metabólitos que atuem como termoprotetores, agentes tamponantes, enzimas, pigmentos, entre diversos mecanismos de adaptação largamente descritos na ecologia microbiana (FERNANDEZ *et al.*, 2014; KOSKELLA; VOS, 2015).

Diante do exposto, o presente trabalho se propõe a avaliar o potencial inibitório anti-*Bd* de bactérias isoladas de ninhos de espuma de três espécies de rãs do Nordeste Brasileiro e debater seu efeito probiótico como estratégia para a conservação de anuros.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Conservação de anfíbios

Os anfíbios representam um grupo muito diverso e também de grande importância ecológica, atuando como bioindicadores devido a características de sua pele fina e mucosa, além de sua participação nas teias alimentares e níveis tróficos do ambiente, atuando como consumidores primários, secundários ou terciários. Por se alimentarem, em sua maioria, de insetos, acabam por atuar também como agentes de regulação populacional, servindo para o controle de pragas (GALLARDO, 1979; YÁNEZ-MUÑOZ; MEZA-RAMOS, 2006), além de serem importantes e inerentes em outras atividades, conforme a Figura 2.

Figura 2 – Importância dos Anfíbios.



Fonte: CASTRO (2019).

O grupo dos anfíbios é amplamente distribuído pelo planeta, com exceção do continente Antártida, sendo mais comum em regiões de clima quente e úmido, com pluviosidade sazonal, como a região entre os trópicos (GALLARDO, 1979). Os anuros compreendem o grupo que mais representa a Classe Amphibia, compreendendo 88,29 % das espécies desse táxon (FROST, 2021).

Segundo o site do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), o Brasil é o país com a maior diversidade de anfíbios do planeta, sendo que grande parte se encontra no bioma da Mata Atlântica, que atualmente é uma zona fragmentada e

espalhada pelo país e talvez por isso abrigue a maior parte de espécies de animais ameaçadas de extinção (SANTI; CORRÊA, 2018).

Os anuros podem apresentar diferentes hábitos em seu modo de vida, podendo ser aquáticos, terrestres, arborícolas ou intermédios entre esses, e isso é resultante de adaptação ao ambiente, especificamente à disponibilidade de água. A pele desses animais é mucosa e fina, servindo como órgão de respiração cutânea e troca gasosa, osmorregulador e auxilia o sistema imunológico, além de abrigar uma gama microrganismos residentes e vários compostos químicos com atividade protetora. Devido ao ciclo de vida complexo desses animais e seus estilos de comportamento variados, combinados a uma pele mucosa, fina e exposta, os anuros são susceptíveis a mudanças aquáticas, terrestres e atmosféricas (BLAUSTEIN, 1994; YÁNEZ-MUÑOZ; MEZA-RAMOS, 2006; BOLOCHIO *et al.*, 2020)

O declínio da população de anfíbios como um problema generalizado no mundo todo não é recente, este assunto foi percebido e estudado aproximadamente desde 1980, passando a ganhar maior importância na década seguinte, a partir de 1990, e culminando na publicação do *First Global Amphibian Assessment* (GAA) na década de 2000. Essa foi uma iniciativa liderada pela *International Union for Conservation of Nature* (IUCN) na busca de compilar todas as informações conhecidas sobre espécies de anfíbios e elaborar a *IUCN Red List* para esses animais, um documento sobre o risco de extinção das espécies de anfíbios (TOGNA *et al.*, 2020).

Yáñez-Muñoz e Méza-Ramos (2006) destacam no estudo de uma comunidade de anfíbios na região Andina que tem sua população majoritariamente ameaçada devido a atividade humana de caça para alimentação e pressão antropogênica devido à expansão urbana e, devido a esse processo de crescimento da sociedade sem um estilo sustentável de desenvolvimento, esse é um dos fatores mais preocupantes sobre o declínio populacional dos anfíbios, porque acarreta ainda na poluição ambiental e impacta as mudanças climáticas.

Dentre as causas listadas para o declínio populacional desses animais estão: captura e destruição acidental ou intencional por animais domésticos; falta de conhecimento da população em geral, que mata os animais por aversão; destruição ambiental por ação antrópica; contaminação industrial; mudanças climáticas; uso de agrotóxicos; utilização como animais domésticos; captura para alimentação; introdução de espécies exóticas e doenças emergentes (GALLARDO, 1979; WAKE, 1991; ROSSA-FERES *et al.*, 2011; PAZINATO, 2013; OLIVEIRA, 2016).

Além dos fatores de pressão antrópica, doenças emergentes têm causado uma grande e rápida redução de populações de anfíbios ao redor do globo, como a quitridiomicose,

doença causada pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd), que afeta tanto a região bucal de girinos quanto a pele de indivíduos adultos, e *B. salmodrivorans* (Bsal), que afeta salamandras, causando queratinização tecidual e provocando a morte dos indivíduos. Essa doença já é amplamente relatada em todo o mundo e já é apontada como a principal causa de declínio populacional dos anfíbios, preocupando estudiosos de anfíbios e de conservação ambiental (SPITZEN-VAN DER SLUIJS; ZOLLINGER, 2010).

No Brasil o Bd também se faz presente. Um estudo recente mostrou que 50 espécies de anuros brasileiros estão listadas com risco de extinção e, desse total, mais de 20 possuem a taxa de declínio superior a 90% ou estão presumidamente extintas e estes valores estão associados à mortalidade da quitridiomiose (SCHEELE *et al.*, 2020). Mendes (2021) demonstrou também a presença do Bd no Ceará, afetando diversas espécies de anuros, inclusive espécies endêmicas da região.

No trabalho de Borzée *et al.* (2021) é possível observar a relação que os autores trazem entre as doenças animais e o contexto da pandemia do novo Coronavírus desde o ano 2019. As zoonoses sempre foram descritas como doenças complicadas de tratar, devido ao complexo ciclo de vida do patógeno e os impactos ao desenvolvimento humano, porém, pode-se listar dois fatores diretos para o surgimento de novas doenças desse tipo nos últimos séculos: a interação do homem com ambientes quase não explorados causadas pela expansão urbana e a utilização de animais silvestres para alimentação, comércio doméstico e tráfico ilegal. Por conta disso, os autores reforçam medidas tomadas na Ásia Oriental contra o consumo, comércio e interação com animais silvestres, dado o receio do surgimento de novas doenças com potencial pandêmico semelhante ou ainda maior que o da COVID-19.

Estudos das últimas décadas tem mostrado que o conhecimento dos cientistas brasileiros sobre a sua diversidade de anfíbios tem se mostrado fragmentado ou incompleto para fornecer subsídios práticos para projetos de conservação do grupo. A maioria dos estudos lançados são de caráter descritivo sobre distribuição espaço-temporal ou da história natural do grupo ou estão relacionados à viabilização de empreendimentos ou planos de gestão de Unidades de Conservação (UC), que são pesquisas importantes, porém, deveriam ser realizadas paralelamente a estudos ecológicos de interação com ambiente, outras espécies e mecanismos de regulação de populações e comunidades para fornecer dados sólidos para ações de conservação (NASCIMENTO *et al.*, 2009; ROSSA-FERES *et al.*, 2010; SANTI; CORRÊA, 2018)

O grupo *Amphibian Survival Alliance* (ASA) é uma unidade da IUCN que estuda e lança informações sobre o grupo geral dos anfíbios e lançou um documento em 2007 que foi

posteriormente atualizado em 2015, o *Amphibian Conservation Action Plan* (ACAP) que debate sobre os 11 pontos principais para se estudar e conhecer para elaboração de um plano de conservação efetivo (TOGNA *et al.*, 2020). As principais ações listadas são (GASCON *et al.*, 2007):

1. Identificar, priorizar e proteger áreas-chave de biodiversidade;
2. Manutenção de habitats de água-doce de qualidade e paisagens terrestres associadas;
3. Pesquisas sobre mudanças climáticas, perda de biodiversidade e declínio dos anfíbios;
4. Estudo sobre doenças infecciosas emergentes;
5. Cuidados com coleta excessiva (alimentação, comércio e pesquisa)
6. Mitigação dos impactos da contaminação ambiental nas populações de anfíbios;
7. Programas de criação em cativeiro;
8. Estudos de reintrodução de espécies de anfíbios em habitats favoráveis;
9. Avaliação e monitoramento das populações gerais de anfíbios;
10. Estudos de sistemática como base para a conservação;
11. Construção de bancos de biorecursos (germoplasma e material genético).

Silva *et al.* (2020) destacam que as pesquisas de herpetologistas tem construído um viés de pesquisa sobre a conservação de anfíbios devido a dificuldades de financiamento, provocando o aumento de pesquisas sobre grupos ou área bem conhecidas, causando falta de informações sobre populações ou regiões específicas. Para estratégias conservacionistas efetivas é necessário um vasto conhecimento científico e indivíduos capazes de interpretar essas informações para conseguir montar um plano estruturado, previsível, possível e eficiente, exercendo uma conservação baseada em evidências.

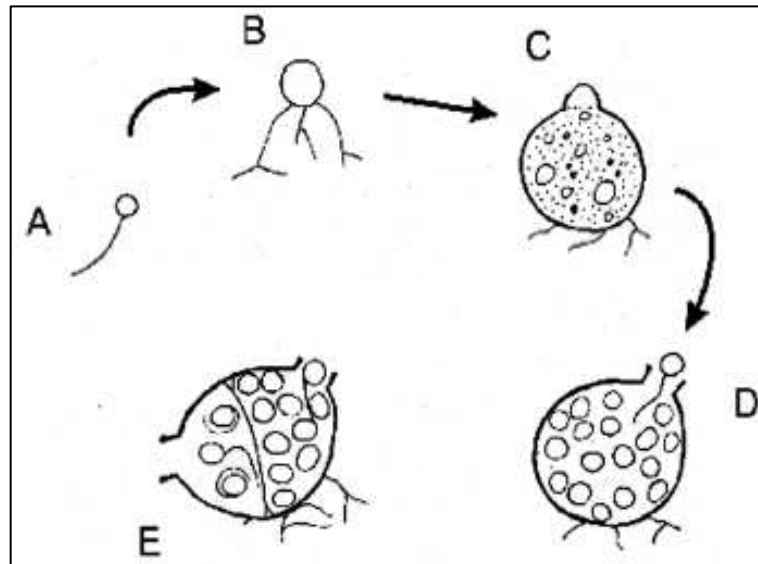
2.2 A quitridiomicose e o declínio populacional dos anfíbios

O fungo quitrídio *Batrachochytrium dendrobatidis* tem um hábito aquático e tornou-se amplamente conhecido no final do século XX, quando foi observado como um patógeno de anfíbios que causava morte de indivíduos de várias espécies através de uma infecção na epiderme, tecido vital para a homeostase dos anfíbios (BERGER; SPEARE, 1998; LONGCORE; PESSIER; NICHOLS, 1999). Existem evidências epidemiológicas de que esse patógeno tenha surgido originalmente no continente africano e tenha sido disseminado para o restante do mundo através do comércio e tráfico global de anfíbios (WELDON *et al.*, 2004).

A quitridiomicose atinge o hospedeiro através do contato do animal com os zoósporos flagelados do fungo em águas contaminadas. Este zoósporo matura-se formando um talo (corpo), que invade as células do hospedeiro, e um zoosporângio simples, que é responsável

pela reprodução do patógeno, processo mais comumente assexuado com quase nenhum registro de reprodução sexuada (VOYLES; ROSENBLUM; BERGER, 2011). O ciclo de vida do fungo está esquematizado na Figura 3.

Figura 3 – Esquema do ciclo de vida de *Batrachochytrium dendrobatidis* em cultura.



Fonte: Traduzido de Berger *et al.* (2005a). Após um período de normalmente menos de 24 horas o zoósporo (A) encista, reabsorvendo o flagelo e formando gemas (B). Rizoides se formam a partir de uma ou mais áreas e o zoosporângio começa a se desenvolver (C). O talo cresce e o zoosporângio se torna maduro em aproximadamente 4 a 5 dias (D). O zoosporângio pode ser dividido por septos finos do talo, formando pequenos zoosporângios cada um com seu próprio tubo de liberação dos zoósporos (E).

O Bd tem seu ciclo de vida dependente de água no ambiente para o deslocamento de seus zoósporos, que podem se manter viáveis e com potencial infectante por até 7 semanas em reservatórios aquáticos ambientais, porém, são muito susceptíveis à dessecação por temperatura (JOHNSON; SPEARE, 2003). Por conta desse hábito do fungo, normalmente os anfíbios adultos costumam se contaminar mais na parte do ventre, que entra em contato direto com a água, mas também pode afetar a parte dorsal no caso de espécies natantes. Alguns efeitos da quitridiomiose na pele dos sapos são mostrados na Figura 4.

Nos hospedeiros, o fungo se instala em zonas ricas em queratina, no estrato córneo da epiderme dos adultos e na zona bucal dos girinos, começando a desenvolver seu talo, que invade os espaços extra e intracelulares do tecido e pode causar hiperqueratose, hiperplasia, desordem das camadas de células, espongiose, erosão e ulcerações (BERGER *et al.*, 2005a). A ação do fungo na epiderme desses animais provoca redução da absorção de sódio do ambiente e perda de sódio, potássio, cloro e do plasma sanguíneo, podendo provocar parada cardíaca e

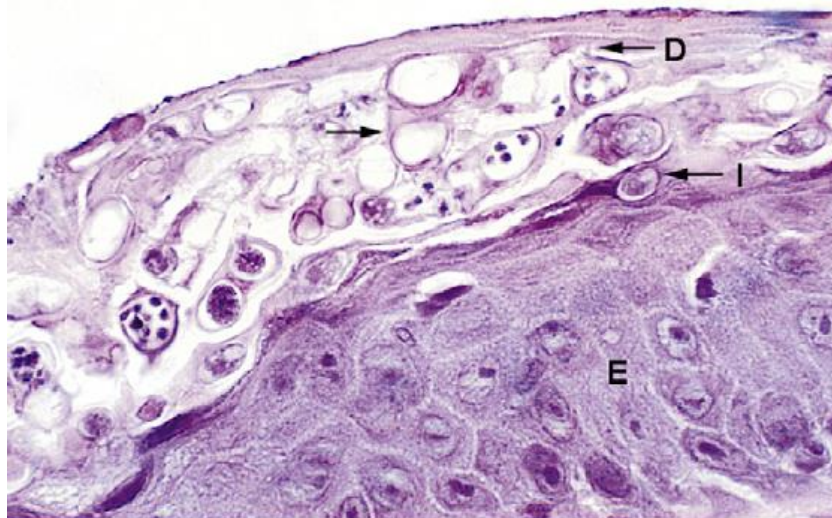
morte (CAMPBELL *et al.*, 2012). A Figura 5 mostra diferentes estágios do desenvolvimento do fungo afetando a pele de um anuro.

Figura 4 – Efeitos da quitridiomicosose na pele de *Litorea caerulea*.



Fonte: Adaptado de Wright (2014). A) Descoloração marrom da parte ventral devido a hiperqueratose; B) Hiperqueratose (pele ressecada) e postura curvada; C) Pontos de descamação de pele hiperqueratinizada.

Figura 5 – Seção histológica da epiderme de adulto de *Litorea caerulea* infectado por Bd.



Fonte: Traduzido de Voyles, Rosenblun e Berger (2011). O corte histológico acima mostra o estágio imaturo do fungo Bd (I), o zoosporângio com tubo de descarga contendo zoósporos (D) e zoosporângio vazio após descarga de zoósporos (indicado pela seta).

Mesmo com a restrição de hábitat a zonas aquáticas e úmidas, estudos tem mostrado outros potenciais reservatórios para o fungo que podem auxiliar na sua disseminação entre organismos da mesma ou de diferentes populações, como no solo e bicos e patas de aves aquáticas, embora o Bd tenha atração maior por superfícies em que ele consiga se desenvolver e maturar seus esporângios (JOHNSON; SPEARE, 2005). Nesse tipo de vetor, estima-se que o

fungo possa sobreviver por até 30 minutos de dessecação contínua, sendo que se a forma transportada for o zoosporângio, a resistência é maior do que do zoósporo livre (GARMYN *et al.*, 2012). A contaminação também pode ocorrer de forma cruzada entre adultos e girinos (RACHOWICZ; VRENDENBURG, 2004) e a disseminação principal pode ser feita pelos principais vetores, os próprios anfíbios contaminados, no caso de espécies que se deslocam entre habitats (KRIEGER; HERO, 2007).

A patogenicidade do fungo tem caráter sazonal nas populações de anfíbios, estando também relacionada a altitudes mais elevadas, temperaturas amenas, espécie e imunidade do hospedeiro, estado da microbiota residente, estágio de desenvolvimento, tamanho do corpo do animal, condições ambientais e cepa do patógeno (BERGER *et al.*, 2005b; BLAUSTEIN; DOBSON, 2006; SEARLE *et al.*, 2011; LAMBERTINI *et al.*, 2016).

O comércio e o tráfico de anfíbios podem ter provocado a expansão geográfica do Bd e persiste até a atualidade, com esses animais sendo usados para fins de controle de pragas, pesquisa, bioindicadores, alimentos, ornamento e domesticação (FISHER; GARNER, 2007). Essa expansão do fungo é responsável pelo declínio de populações de anfíbios ao redor de todo o globo e extinção de várias espécies desses animais, dificultando o trabalho de estudiosos da conservação acerca do controle da doença (STUART *et al.*, 2004).

Existem registros de Bd nas américas que relatam a presença da quitridiomiose desde o final do século XIX e estudos apontam que pode ter ocorrido um sistema de adaptação ou coevolução dos hospedeiros com o patógeno, através de modificações comportamentais, reprodutivas ou relacionadas ao microbioma (TALLEY *et al.*, 2015; BECKER *et al.*, 2016).

Nesse contexto, percebe-se que esse patógeno está presente na história dos anfíbios há bastante tempo, contudo, a contínua disseminação do fungo através do comércio desses animais, juntamente com as mudanças climáticas, expansão urbana e poluição ambiental estão relacionados diretamente com a expansão rápida da quitridiomiose (GALLARDO, 1979; POUNDS *et al.*, 2006; BORZÉE *et al.*, 2021).

No cultivo laboratorial de Bd observa-se o mesmo ciclo de vida que ocorre na pele do anfíbio, assim, o período de incubação do fungo é de 5 a 7 dias numa temperatura média que varia entre 17 e 25 ° C (PIETROWSKI; ANNIS; LONGCORE, 2004; VIEIRA; TOLEDO, 2012). Cepas locais podem ser coletadas por método de swab e isoladas em meios de culturas específicos, além da detecção de Bd por meio de análises moleculares, histoquímicas ou histopatológicas (HYATT *et al.*, 2007).

Apesar de ser muito susceptível a drogas antifúngicas e peptídeos antimicrobianos produzidos por sapos em estudos *in vitro*, o Bd é menos susceptível quando presente no

hospedeiro devido à diferenciação do talo na pele do animal, que fica mais protegido na camada de células da epiderme e se torna mais resistente em situação de infecção (BERGER *et al.*, 2005a; BERGER *et al.*, 2005b).

A plasticidade de comportamento do patógeno torna ainda mais difícil uma melhor compreensão dos mecanismos da quitridiomicose e a proposição de medidas de combate e prevenção. Alguns trabalhos têm avaliado métodos de tratamento para a doença, com estudos *in vitro* e *in vivo*, avaliando desinfetantes e agentes físicos como alternativas às drogas antifúngicas.

Alguns agentes químicos como etanol 70%, monopersulfato de potássio 1 mg/ml e cloreto de benzalcônio 1 mg/ml mostram um enorme potencial contra o Bd em laboratório, porém, existem diversas problemáticas no uso dessas substâncias nos animais, como os efeitos colaterais e a contaminação ambiental, fatores comuns com alguns antifúngicos. Luz UV no comprimento de onda utilizado para matar vírus e bactérias não se mostra como um agente efetivo na eliminação de zoósporos e zoosporângios de Bd, enquanto que temperaturas mais elevadas reforçam a previamente descrita sensibilidade do fungo ao calor, podendo observar eliminação completa de uma amostra exposta a 37 °C por 4 horas a dessecação térmica (JOHNSON *et al.*, 2003).

Chatfield e Richards-Zawacki (2011) mostraram que o tratamento térmico de anfíbios com quitridiomicose pode ser efetivo por meio de exposição a 30 °C por 10 dias, porém, apontam fragilidades nesse método, como a termossensibilidade intrínseca dos anfíbios, por serem ectotérmicos, a variabilidade de temperatura espécie-específica e a possibilidade de reinfecção ou sobrevivência do fungo na pele do animal na forma de zoósporo. Os autores propõem ainda tratamentos combinados entre temperatura e pequenas doses de antifúngicos.

Políticas de controle têm sido propostas para o combate e prevenção da quitridiomicose, como: redução da importação e exportação de animais, principalmente espécies exóticas; maior fiscalização em programas de experimentação de cativeiro para evitar liberação de resíduos contaminantes ou animais doentes; captura e tratamento de animais infectados (GALLARDO, 1979; FISHER; GARNER, 2007; FISHER; GARNER; WALKER, 2009).

As políticas públicas de conservação para o combate à quitridiomicose e conservação dos anfíbios ainda carecem de informações sobre a doença, a interação patógeno-hospedeiro-ambiente, mecanismos de resistência do fungo e medidas que se comprovem eficazes e não precisem de uma logística ostensiva para aplicação, além de não ter grandes

impactos ambientais, para isso, deve haver investimento em pesquisa de base e análise de aplicações ambientais (WOODHAMS *et al.*, 2011; GARNER *et al.*, 2016).

Outra alternativa para o combate à quitridiomiose é o uso de probióticos a partir de microrganismos com potencial antifúngico oriundos da pele dos próprios anfíbios. Esse assunto tem sido estudado recentemente e colaborado para o entendimento sobre o microbioma desses animais e mecanismos de resistência espécie-específicos, sendo uma potencial ferramenta na conservação do grupo (WOODHAMS *et al.*, 2019; REBOLLAR; MARTÍNEZ-UGALDE; ORTA, 2020).

É necessário compreender as atividades simbióticas e antibióticas do Bd com a microbiota relacionada a anfíbios para consolidar ferramentas de conservação do grupo, uma vez que o patógeno tem a capacidade de alterar a microbiota da pele quando infecta um animal, mudando sua composição devido a metabólitos antibióticos, podendo até mesmo crescer melhor na presença de uma bactéria ou seus metabólitos (JANI; BRIGGS, 2014).

2.3 Probióticos contra a quitridiomiose: os ninhos de espuma como fonte de bioprospecção de microrganismos

Dentre todas as alternativas existentes para o combate à quitridiomiose, a que tem sido mais visada e estudada é a utilização de probióticos como tratamento e profilaxia, uma vez que é um mecanismo capaz de ser aplicado em diferentes paisagens, populações e num tempo rápido, uma vez que já sejam conhecidos os mecanismos do microrganismo consórcio microbiano e não haja impacto para o ambiente, além de ter sido comprovada sua eficácia no combate do Bd (HARRISON *et al.*, 2020).

O termo probiótico pode ser definido como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício para a saúde do hospedeiro” (HILL *et al.*, 2014) e vem sendo discutido e atualizado de acordo com o avanço de estudos nas áreas médicas, farmacológicas, biomédicas e biológicas, assim, contemplando conceitos também de Produto Vivo Bioterapêutico (BLP, sigla em inglês) e Probióticos de Próxima Geração (NGP, sigla em inglês), termos que englobam o uso de microrganismos para tratamento e prevenção de doenças em humanos e uso de microrganismos identificados da microbiota natural usados como probióticos, respectivamente (MARTIN; LANGELLA, 2019).

Diversos trabalhos têm mostrado o potencial de secreções e bactérias da pele de anuros inibirem o crescimento de Bd *in vitro*. Assis (2011), isolou bactérias da pele de 4 espécies de sapos encontrando potencial antibiótico contra outras bactérias, conhecidamente

patogênicas para anfíbios, contudo, observou-se que essa ação antimicrobiana é normalmente densidade-dependente, ou seja, não é característica do indivíduo, mas sim da população bacteriana, que utiliza um sistema de *quorum sensing* para a ativação do gene relacionado ao poder antimicrobiano daqueles microrganismos

Algumas bactérias isoladas da pele de anfíbios já demonstraram atividade antifúngica eficiente contra o Bd quando testadas *in vitro*, devido a produção de substâncias antimicrobianas, como peptídeos e outros metabólitos secundários (WOODHAMS *et al.*, 2014; REBOLLAR *et al.*, 2016; WALKE; BELDEN, 2016; WOODHAMS *et al.*, 2016; BELL; GARLAND; ALFORD, 2018; ALMEIDA *et al.*, 2019), contudo, existem muitas variáveis que dificultam a pesquisa em laboratório, uma vez que além das características do Bd durante a infecção o tornarem resistente na pele do anfíbio (BERGER *et al.*, 2005a), fatores ambientais como temperatura, altitude, radiação UV, umidade, além da própria imunidade do animal, moldam a situação da dinâmica hospedeiro-patógeno no ambiente (BERNARDO-CRAVO *et al.*, 2020).

Grant e colaboradores (2018) listam 5 prioridades de pesquisa para buscar combater o declínio de anfíbios associado à quitridiomiose: 1) compreender a relação da comunidade-doença, com fatores bióticos e abióticos; 2) determinar mecanismos que possam influenciar a mortalidade da doença, como a presença de contaminantes ambientais; 3) identificar elementos ambientais ou da própria população animal que possam estabilizar, minimizar ou impedir o início da interação patógeno-hospedeiro; 4) avaliar planos de conservação das metapopulações de anfíbios para reduzir a velocidade, intensidade e disseminação da doença e seus surtos e 5) definir a relação entre o habitat e o hospedeiro como fator-chave na compreensão da doença.

Essas prioridades de pesquisa se devem à plasticidade genotípica das cepas de Bd, a variação da microbiota residente que existe entre os diferentes grupos de anfíbios, as alterações fisiológicas desses animais (no seu corpo e no seu microbioma) decorrentes de fatores ambientais como poluição e oscilações de temperatura, e tudo isso afeta a dinâmica da quitridiomiose, dessa forma, as pesquisa *in vitro* ainda possuem muito conhecimento para consolidar antes de serem testadas *in loco* no combate à doença.

Em pesquisas com várias bactérias obtidas da pele de anuros é comum encontrar diversos gêneros microbianos, porém, os filos mais representativos costumam ser Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Cyanobacteria, Gammaproteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes e Firmicutes. Em adição, alguns gêneros de bactérias já têm seu potencial anti-Bd conhecido, como as *Enterobacter*, entretanto, foi encontrado que existe variação do poder inibidor entre gêneros de uma família e até mesmo

entre espécies de um gênero, podendo inferir que pode existir uma relação muito próxima entre microbioma-hospedeiro a nível filogenético abaixo do táxon de filo, refletindo a história evolutiva de cada grupo (BECKER *et al.*, 2015; ROSS; HOFFMAN; NEUFELD, 2019).

A relação dos microrganismos anti-Bd com o fungo não são uniformes, seja no potencial facilitador, neutro ou inibidor, por fatores relacionados à dinâmica populacional dos anfíbios e sua relação com a quitridiomiose, principalmente porque uma única comunidade de anfíbios pode ser hospedeira de diferentes variantes do Bd, dessa forma, a etapa seguinte dos estudos *in vitro* após identificação de uma bactéria com potencial antifúngico contra esse quitrídio é a avaliação de consórcios microbianos, que podem ser gênero-único ou multi-gênero, para verificar como a relação de vários microrganismos se dará com o Bd, uma vez que eles terão potencial de inibição, capacidade de competição por espaço e recursos nutrientes, além da produção de metabólitos que podem ser tóxicos ao fungo (REBOLLAR *et al.*, 2016; ANTWIS; HARRISON, 2018).

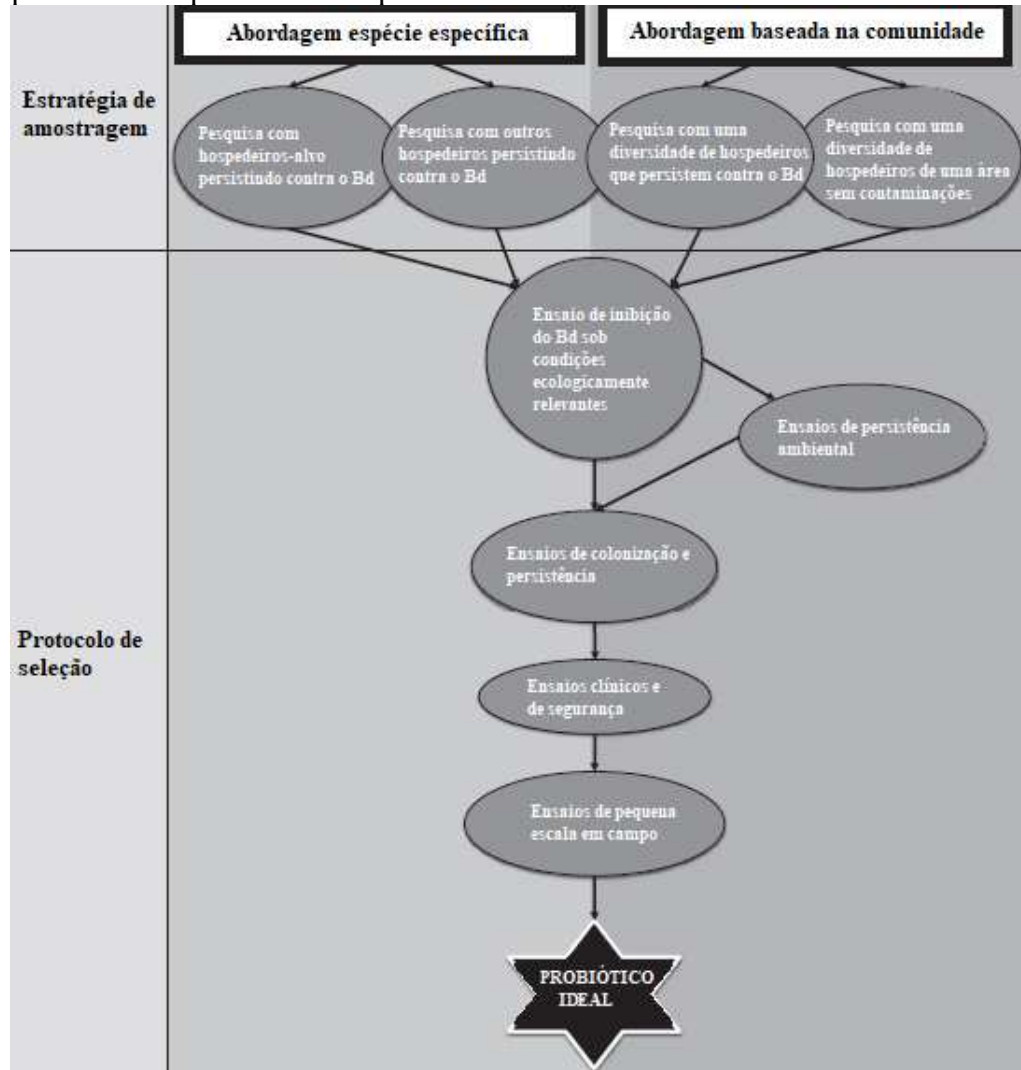
Com esse contexto variável sobre a interação probióticos-quitridiomiose, algumas preocupações surgem para os pesquisadores. Uma vez que fosse encontrado um ou mais candidatos de probióticos de amplo espectro, capaz de inibir minimamente as linhagens de Bd conhecidas, seria necessário acompanhar a plasticidade genotípica do fungo, além de continuação do combate à quitridiomiose utilizando ferramentas oferecidas pelas políticas públicas ou outras estratégias previamente conhecidas (ANTWIS *et al.*, 2015).

Dessa forma, os estudos existentes com probióticos que desafiaram consórcios microbianos contra o Bd não obtiveram 100% de eficácia por um ou mais dos seguintes fatores: i) variação da microbiota da pele entre diferentes espécies ou populações de diferentes regiões; ii) incapacidade dos probióticos competirem com o Bd em condição ambiental determinada; iii) ineficácia de inibição contra determinadas linhagens do patógeno; iv) incapacidade de inibição do fungo por conta de desvantagem competitiva, ou seja, baixo aumento populacional e ausência de *quorum sensing* ou outro fator intrínseco da dinâmica patógeno-microbioma-hospedeiro-ambiente (ASSIS, 2011; BECKER *et al.*, 2011; BECKER *et al.*, 2015; ANTWIS; HARRISON, 2018; BELL; GARLAND; ALFORD, 2018; BERNARDO-CRAVO *et al.*, 2020).

A Figura 6 mostra o que Bletz e colaboradores (2013) trazem em seu trabalho como a hipótese do probiótico-chave: uma vez estabelecido um modelo que se comprove eficiente em um grande número de testes, quando ele estiver presente em baixa abundância, poderá ter um impacto positivo na estrutura da microbiota do animal, estimulando funções defensivas, tendo impacto direto neutro na saúde do hospedeiro, mas causando mudanças na microbiota que beneficiariam a primeira linha de defesa do animal, estimulando as defesas imunológicas

dele, estimulando a produção de peptídeos e outros metabólitos antimicrobianos pela microbiota de sua pele, etc.

Figura 6 - Estratégias de amostragem e processos de filtragem para a seleção de probióticos específicos da espécie e baseados na comunidade.



Fonte: Traduzido e adaptado de Bletz *et al.* (2013).

Os pesquisadores explicam que um probiótico efetivo contra a quitridiomicose necessita: inibir a colonização do Bd na pele do anfíbio ou competir com o fungo, impedindo o desenvolvimento de um estágio letal da doença; tenha interações positivas com o hospedeiro, ou seja, não tenha potencial patogênico ou provoque alterações negativas na composição da microbiota residente e não causa impacto negativo para o meio ambiente, como por exemplo, não prejudicar a vida de outras espécies. Esses fatores listados seriam as características essenciais para um probiótico efetivo. Além disso, os autores também resumiram um protocolo de caracterização e busca do que seria o ideal como probiótico-chave.

Baseadas nessas características, as pesquisas atuais estão buscando cada vez mais compreender a relação entre microbioma-anfíbio e avaliar o potencial desses microrganismos como probióticos, pois através do maior entendimento sobre essa relação é que será mais provável entender como utilizar esses organismos como ferramenta de conservação do grupo dos anfíbios, desenvolvendo terapias probióticas que sejam eficazes (McKENZIE; KUENEMAN; HARRIS, 2018).

Para avaliar o potencial anti-Bd pode-se utilizar métodos qualitativos, com cultivo em meio de cultura em placa, que permite inferir sobre o comportamento de competição direta por espaço e recursos entre o fungo e a bactéria, ou quantitativos, através de avaliação da inibição do fungo em microplacas de 96 poços, que tem um caráter mais preciso na quantificação de inibição ou facilitação (HARRIS *et al.*, 2006; FLECHAS *et al.* 2012; ANTWIS *et al.*, 2015).

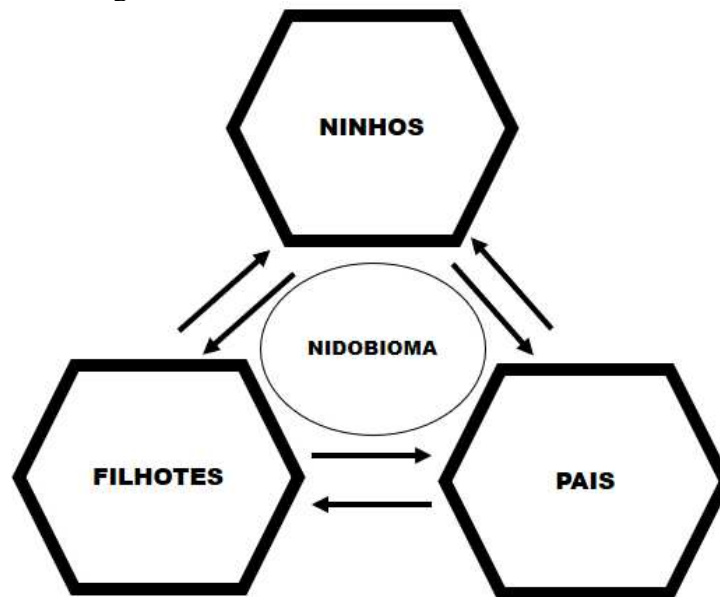
Avaliando a situação, outras alternativas de pesquisa têm surgido ou sido propostas pelos cientistas para a conservação de anfíbios, como por exemplo a análise de microrganismos não-cultiváveis e a possibilidade de inibição do Bd, ou até mesmo a comparação do sequenciamento do genoma completo do patógeno com dados de inibição de cepas bacterianas e consórcios testados, conforme abordam Antwis e Harrison (2018) nas considerações finais de seu trabalho.

Fontes alternativas de microrganismos têm sido avaliadas também para verificação de seu potencial biotecnológico, como os ninhos de espuma dos anfíbios, que já possuem propriedades físico-químicas bem conhecidas e estudadas, devido à sua rica composição proteica e seu potencial biotecnológico (FLEMING *et al.*, 2009; COOPER *et al.*, 2010; HISSA *et al.*, 2016; COOPER; KENNEDY, 2017), pois são estruturas relacionadas a um estágio inicial de desenvolvimento, ou seja, que necessita de maior proteção, por isso podem ser fontes de obtenção de microrganismos candidatos mais efetivos a probióticos funcionais (REBOLLAR *et al.*, 2016). Um estudo prévio do grupo de pesquisa já mostrou resultados que indicam haver microrganismos capazes de inibir o Bd oriundos de coleções microbianas de ninhos de espumas de rãs do Ceará, Brasil (BEZERRA, 2021).

Uma abordagem recente sobre os ninhos de animais foi proposta por Campos-Cerda e Bohannan (2020), que trazem o conceito de nidobioma, que integra os efeitos combinados da relação pais-ninho-filho como fator principal na constituição do microbioma da prole. Os autores partiram da premissa que a relação microbioma-hospedeiro não é apenas ecológica, traz também a história evolutiva do indivíduo e de seu grupo. Além disso, como os ninhos são a primeira barreira reguladora para a exposição dos filhotes a microrganismos, em sua

composição eles devem possuir compostos químicos e outros microrganismos que irão regular e mediar essa interação. Além disso, o conceito de nidobioma traz os pais como arquitetos do ninho, e seus frequentadores, como principais fontes de microrganismos diversos para o filho, que é o mais novo hospedeiro no ambiente, pronto para ser colonizado. A Figura 7 resume a dinâmica do conceito de nidobioma.

Figura 7 – Relação dos elementos do nidobioma e sua troca de microrganismos.



Fonte: Elaborado pelo autor com base em Campos-Cerda e Bohannan (2020). As setas indicam as trocas de microrganismos que ocorrem durante as interações entre os elementos desse conjunto, constituindo a microbiota do ninho, chamada nidobioma.

Algumas espécies de anuros se reproduzem por ninhos de espuma, estruturas produzidas durante o amplexo, quando o macho faz movimentos repetitivos com as suas pernas para aerar o líquido cloacal liberado pela fêmea, líquido esse que é rico em proteína e carboidratos, formando uma espuma onde a fêmea irá liberar os ovos para fertilização. Após a fertilização, os ovos possuem a proteção física e química dessa bioestrutura até completarem seu desenvolvimento, pois sua composição permite a proteção aos ovos contra dessecação, radiação ultravioleta, predadores, degradação, temperatura e patógenos, fornecendo oxigênio em quantidades suficientes. Além da composição físico-química, os ninhos de espuma também possuem microbiota associada que, embora pouco estudada, deve estar relacionada com a proteção contra patógenos (HISSA *et al.*, 2008; ARZABE *et al.*, 2009; FLEMING *et al.*, 2009; COOPER *et al.*, 2010; DALGETTY; KENNEDY, 2010; HISSA *et al.*, 2016; GOULD, 2021).

Até o presente momento não há estudos que investigaram a presença do fungo *Bd* nessas bioconstruções e tampouco estudos que detalham a microbiota e seu potencial biotecnológico, farmacológico e de interesse probiótico na conservação dos anfíbios, a não ser os trabalhos originados do grupo de pesquisa do presente projeto (CASTRO, 2019; MARTINS, 2020; BEZERRA, 2021; MONTEIRO, 2023a).

A construção de ninhos de espuma não é uma estratégia reprodutiva relacionada a todos os anuros, compreendendo 10 dentre 41 modos reprodutivos apresentados pelos anuros (HADDAD; PRADO, 2005). Comumente, é um comportamento adotado por algumas espécies das famílias Hyperoliidae Laurent, 1943, Leptodactylidae Werner, 1896, Limnodynastidae Lynch, 1969 e Rhacophoridae Hoffmann, 1932 (DUELLMAN, 1989), sendo a Família Leptodactylidae aquela com a maior diversidade de espécies que se reproduzem dessa forma (HADDAD; PRADO, 2005).

A família Leptodactylidae possui 231 espécies descritas atualmente, divididas em 12 gêneros, os quais pelo menos um representante de cada gênero pode ser encontrado em território brasileiro (FROST, 2021), e tem ampla distribuição de espécies no nordeste brasileiro (CASTRO, 2012), como os gêneros *Adenomera*, *Leptodactylus* e *Physalaemus*, apresentando ninhos de espuma normalmente colocados em regiões próximas a vegetação aberta, cuja disponibilidade de água é restrita, porém o solo tem caráter úmido, ou poças de água próximas a vegetação (SANTOS; AMORIM, 2005), conforme ilustrado na Figura 8. Acredita-se que isso seja uma estratégia para evitar possíveis alterações climáticas no local que alteram o fenótipo das paisagens aquáticas devido a um rápido e alto aquecimento, pois é um mecanismo conhecido, uma vez que pela composição do ninho de espuma eles podem permanecer por vários dias em condições adversas de temperatura, umidade e radiação e mesmo assim manterem os ovos em seu interior viáveis, podendo durar até 30 dias ou mais de forma viável (VIEIRA; SANTANA; ARZABE, 2008; COOPER *et al.*, 2010).

No trabalho de Bletz e colaboradores (2013) foi feita a técnica de bioaugmentação bacteriana no solo. Essa técnica consiste em introduzir microrganismos benéficos (consórcios microbianos) no solo para produzir um determinado efeito desejado e remonta da agricultura (enriquecimento de solo com microrganismos fixadores de nutrientes). Os pesquisadores utilizaram a bactéria *Janthinobacterium lividum* como inoculante no solo para avaliar seu potencial como probiótico, uma vez que sua ação anti-*Bd* já era conhecida. Eles obtiveram alguns resultados positivos para a cepa utilizada, apesar de terem destacados pequenas falhas metodológicas (como o tempo de exposição ao patógeno) e, em sua discussão, abordaram todos os fatores relacionados à dinâmica patógeno-hospedeiro-ambiente da quitridiomicose,

destacando a técnica de bioaumentação em si como uma saída viável para os estudos de conservação de anfíbios pelo uso de probióticos.

Figura 8 – Ninhos de espuma de algumas espécies de ocorrência no Nordeste Brasileiro.



Fonte: BEZERRA (2021). A) Ninho *Leptodactylus vastus*, flutuando sobre a água em cavidades construídas; B) Ninho de *Physalaemus cuvieri*, flutuando sobre a água em encostos de reservatórios abertos; C) Ninho de *Adenomera hylaedactyla* em câmaras subterrâneas construídas.

Dessa forma, avaliando a composição dos ninhos de espuma e sua riqueza microbiana ainda pouco estudada, além de sua importância para o desenvolvimento e maturação dos girinos e do nidobioma, essas bioconstruções podem se apresentar, inovadoramente, como fonte de prospecção de microrganismos com atividade anti-Bd e sítio de aplicação para probióticos através da técnica de bioaumentação *in vitro*, *in vivo* e *in loco*, sendo necessário mais estudos para descrever essa possibilidade.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial de bactérias isoladas dos ninhos de espuma de *Adenomera hylaedactyla*, *Leptodactylus vastus* e *Physalaemus cuvieri* inibirem o fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* e selecionar isolados para propor um consórcio microbiano como forma de controle desse patógeno.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade anti-*Bd* desses microrganismos através de dois métodos analíticos (em meio líquido e em meio sólido) ;
- Obter consórcios de bactérias eficientes contra a linhagem global do fungo *Bd* (GPL);
- Identificar a ação inibitória dos consórcios propostos contra o fungo *Bd* (GPL).

4 METODOLOGIA

4.1 Caracterização das coleções microbianas

Foram analisadas duas coleções microbianas oriundas de amostras de ninhos de espuma de rãs coletadas no estado do Ceará. A primeira foi coletada em 2018, em São Gonçalo do Amarante, sob a licença SISBIO 58036-6, de *A. hylaedactyla*, por Martins (2020), e a outra coletada em 2019, em Pacatuba, sob a licença SISBIO 58036-1, de *L. vastus* e *P. cuvieri*, por Castro (2019), totalizando 182 morfotipos. As coleções foram identificadas pelos autores por meio de sequenciamento do gene ribossomal 16S a nível de gênero, com exceção de 12 amostras. As coleções foram armazenadas no Laboratório de Recursos Genéticos (LARGEN) da Universidade Federal do Ceará (UFC), sob criopreservação, a -80 °C em freezer (coleção de estoque) e a -20 °C em congelador (coleção de uso), em tubos criogênicos contendo a cultura do microrganismo e glicerol a 20%. Os isolados estão cadastrados no SISGEN sob número A35A5E2.

A reativação dos microrganismos foi feita com alíquota de 200 µL da cultura criogênica em 5 mL de caldo TGE (triptona 5 g/L, glicose 1 g/L; extrato de levedura 2,5 g/L; pH final 7,0±0,2 a 25 °C) e incubados em *shaker* com agitação de 150 rpm a 35 °C por 24 horas. Após incubação, meios com turbidez elevada indicando crescimento, foi feito repique com alça de inoculação estéril através de estriamento em placas de ATGE (composição do caldo TGE com adição de ágar 15 g/L). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35 °C por 24 horas até a observação de crescimento e obtenção de culturas isoladas. Em caso de não crescimento das bactérias em TGE, foi utilizado caldo BHI (infusão de cérebro de vitelo 12,5 g/L; infusão de coração de boi 5 g/L; peptona 10 g/L; glicose 2g/L; cloreto de sódio 5 g/L; fosfato dissódico 2,5 g/L; pH final 7,4±0,2 a 25 °C), mais rico em nutrientes.

No caso de culturas repicadas em placa que não condiziam com a descrição original em ATGE ou estavam contaminadas, foram utilizados meios seletivos baseados na identificação de gênero previamente obtida. Os meios seletivos ou específicos necessários foram: CLED (lactose 10 g/L; digestão enzimática de gelatina 4 g/L; digestão enzimática de caseína 4 g/L; extrato de carne 3 g/L; l-cistina 0,128 g/L; azul de bromotimol 0,02 g/L; pH final 7,3±0,2 a 25 °C), Cetrimida (digestão enzimática de gelatina 20 g/L; cloreto de magnésio 1,4 g/L; sulfato de potássio 10 g/L; glicerol 10 g/L; cetrimida ou brometo de tetradeciltrimetilamônio 0,3 g/L; pH final 7,2±0,2 a 25 °C), Luria Bertani (hidrolisado enzimático de caseína 10 g/L; extrato de levedura 5 g/L; cloreto de sódio 10 g/L; pH final

7,5±0,2 a 25 °C), Bushnell Haas (sulfato de magnésio 0,2 g/L; cloreto de cálcio 0,02 g/L; fosfato monopotássico 1 g/L; fosfato dipotássico 1 g/L; nitrato de amônio 1 g/L; cloreto férrico 0,05 g/L; pH final 7,0±0,2 a 25 °C) e MacConkey (hidrolisado enzimático de gelatina 20 g/L; bile bovina bacteriológica 5 g/L; lactose 10 g/L; roxo de bromocresol 0,01 g/L; pH final 7,3±0,2 a 25 °C) todos como caldo, para enriquecimento do gênero alvo. Após apresentar turvação, foi feita inoculação em ATGE com alças estéreis para análise macroscópica.

As culturas isoladas foram caracterizadas pela morfologia macroscópica (aspectos coloniais), conforme aspectos descritos por Soares, Casimiro e Abreu (1987). Juntamente a uma foto da colônia, a descrição feita foi associada à identificação dos microrganismos em nível de gênero, junto com testes complementares, para a confecção de um catálogo visual das coleções bacterianas, para gerenciamento interno do laboratório.

Após repiques e renovação das culturas armazenadas, foram montadas novas coleções criogênicas para armazenamento a -20 °C, sendo uma de estoque e uma de uso. As bactérias foram armazenadas em tubos criogênicos de 1,5 ml estéreis, contendo 600 µl de cultura bacteriana crescida por 24 horas e 400 µl de glicerol a 50%, constituindo uma concentração final de 20% de glicerol. As coleções foram armazenadas no LARGEN.

4.2 Curva de contagem de zoósporos de *Batrachochytrium dendrobatidis*

O método de contagem de zoósporos de Bd é mais comumente realizado através de contagem em Câmaras de Neubauer, porém, esse método é laborioso e pode apresentar erros de imprecisão muito altos, por isso, seguiu-se o descrito por Lindauer e colaboradores (2019) para quantificar os zoósporos através de leitura de densidade óptica (OD) e padronizar os inóculos para os ensaios.

Foram preparados dois inóculos de Bd em meio líquido triptona 1% (T1% = triptona 10 g/L; pH final 7,0±0,2 a 25 °C) em tubos falcon estéreis com o auxílio de alças de inoculação descartáveis. A cultura foi incubada sob agitação de 150 rpm a 21° C por 72-96 horas. Após incubação, cada inóculo separadamente teve sua OD ajustada para aproximadamente 0,1 (valor padrão) na leitura de 490 nm (ROLLINS-SMITH *et al.*, 2002; PIOTROWSKI; ANNIS; LONGCORE, 2004; ROLLINS-SMITH *et al.*, 2006).

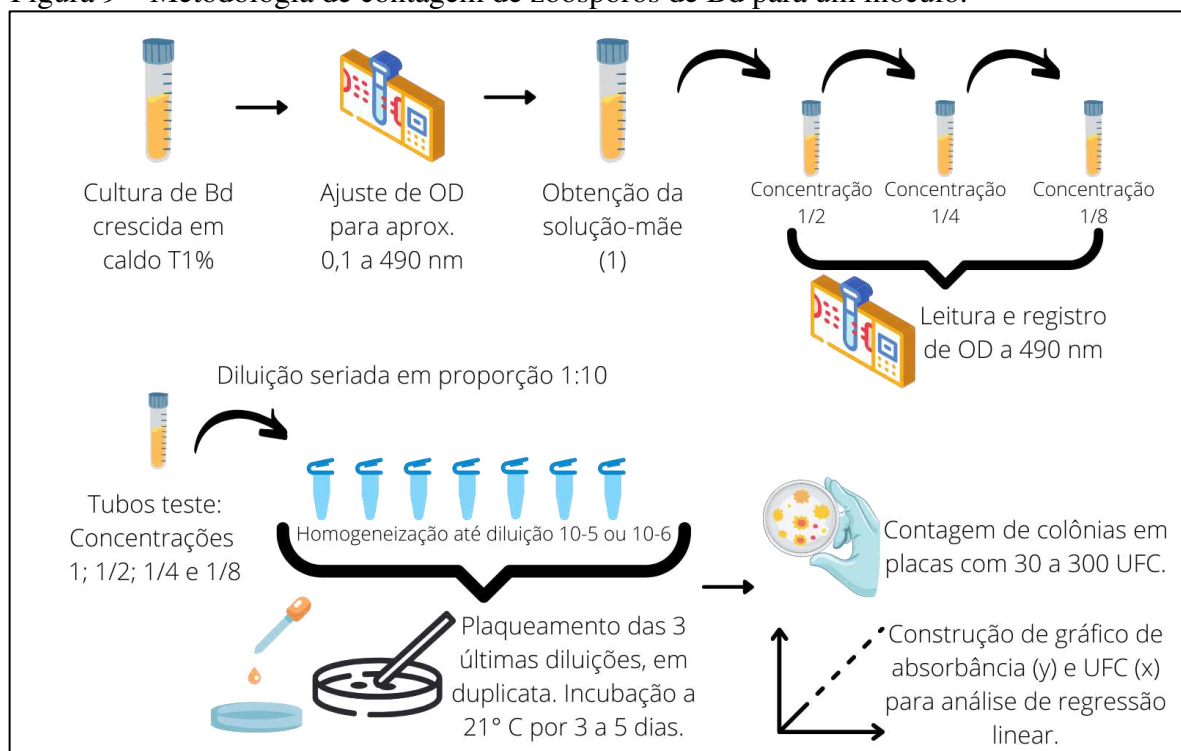
Essa primeira solução de cada inóculo foi denominada solução-mãe (SM). Cada SM foi diluída em série na proporção de volume 1:1, diminuindo a concentração por 2. O processo de diluição foi repetido três vezes. Dessa forma, para cada inóculo obteve-se: a SM com concentração 1, soluções de concentração 1/2, 1/4 e 1/8. Para cada diluição, foi feita a leitura

da OD a 490 nm. Para as diluições de concentração 1 e 1/2 foram feitas diluições seriadas em solução salina fisiológica a 0,9%: 100 µL de inóculo + 900 µL de salina, sendo essa a solução 10^{-1} . O processo continuou até obtenção da solução 10^{-6} . Para as diluições de concentração 1/4 e 1/8 foi feita a mesma diluição até obtenção da solução 10^{-5} .

Com todas as diluições prontas, foi realizada a técnica de *spread plate* para quantificar o número de zoósporos de Bd nas suspensões preparadas através da contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC). Para cada diluição do inóculo foram quantificadas as três últimas diluições em solução salina, feitas em duplicata através da alíquotagem de 100 µL da suspensão em placa de Ágar Triptona 1% (AT1% = ágar 10 g/L; triptona 10 g/L). As placas deverão ser incubadas a 21° C por 72-120 horas. A Figura 9 representa o desenho metodológico utilizado.

A contagem de colônias foi feita nas placas com crescimento entre 30 e 300 unidades formadoras de colônias (UFC), correspondentes aos zoósporos de Bd. Foi feita uma média entre os crescimentos de cada diluição do inóculo para plotagem em gráfico de regressão linear, relacionando absorbância e contagem, para avaliar a equação da reta e o coeficiente de variação ($r^2 \geq 0,95$).

Figura 9 – Metodologia de contagem de zoósporos de Bd para um inóculo.



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3 Avaliação do potencial inibitório de Bd em meio sólido

A avaliação do potencial inibidor do patógeno Bd foi feita *in vitro*, por metodologia de crescimento em placa, baseado nos trabalhos de Harris *et al.* (2006).

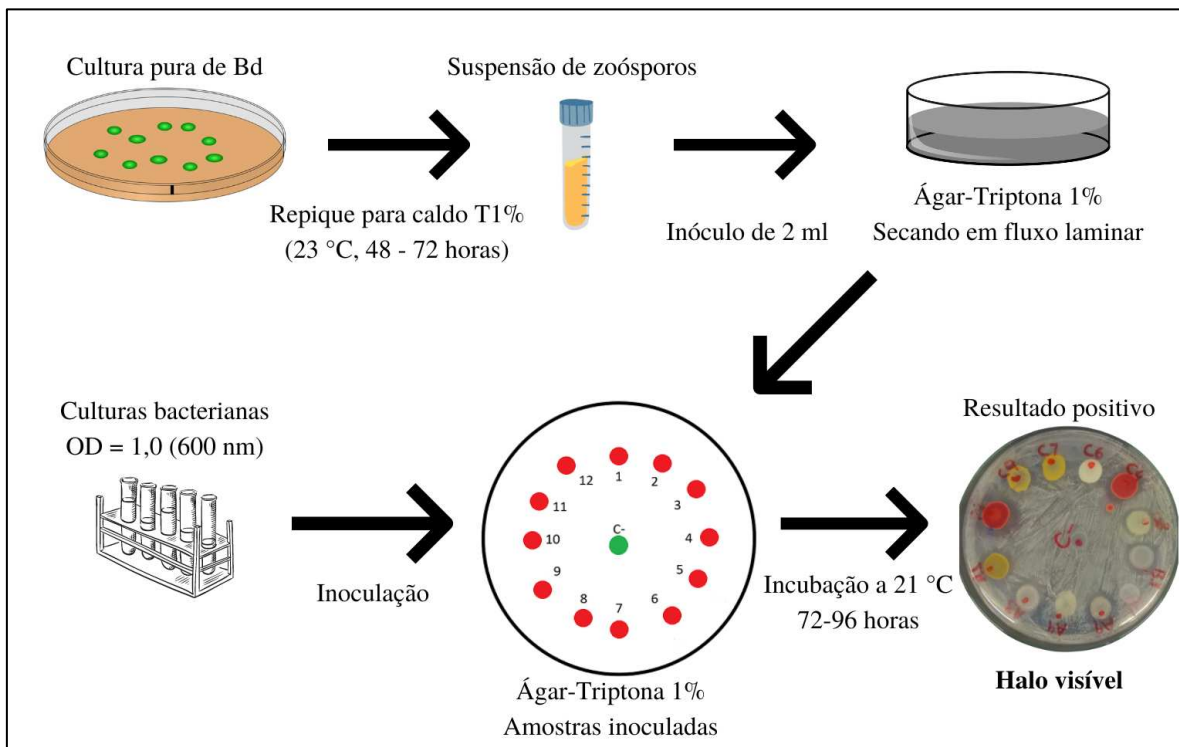
Para obtenção de uma suspensão de zoósporos de Bd com densidade aproximada de 10^5 zoósporos/mL, uma cultura pura do patógeno Bd foi repicada para meio líquido T1% em tubo Falcon estéril contendo 10 mL de meio de cultura e incubada a 21 °C por 72 – 96 horas, sob agitação de 150 rpm. A suspensão foi ajustada para OD de $0,015 \pm 0,001$ sob leitura de 490 nm (aprox. 10^6 zoósporos/mL) e depois diluída na proporção 1:10, até obtenção de uma suspensão de 10^5 zoósporos/mL.

As culturas de bactérias (testes e controle negativo) foram preparadas a partir de uma colônia isolada repicada para caldo T1% e incubadas a 35 °C por 18 – 24 horas sob agitação de 150 rpm. Como controle negativo de inibição foi utilizada a bactéria *Escherichia coli* ATCC 25922, cepa padrão. O inóculo das bactérias foi ajustado para OD de $1,0 \pm 0,05$ sob leitura de absorvância de 600 nm em espectrofotômetro.

O teste foi feito em placa de Petri 120 mm x 20 mm contendo 20 ml de meio de cultura AT1%. Foram inoculados 2 ml da suspensão de zoósporos sobre o meio em placa e homogeneizado com Alça de Drigalsky estéril para o líquido cobrir toda a superfície do ágar. As placas ficaram abertas no interior da capela de fluxo laminar até que o líquido estivesse seco. Com auxílio de ponteiros estéreis, foram feitos inóculos de 10 µL na placa, com distância marcada de aproximadamente 30° entre uma e outra, com um centímetro da borda da placa. No total, foram feitos até 12 inóculos teste e um controle negativo (sem inibição do Bd). As placas foram preparadas em duplicata. Após inoculação das bactérias, as placas foram incubadas a 21° C por 72 – 96 horas. A Figura 10 apresenta o esquema do experimento.

Foi preparada uma placa de controle positivo apenas com a suspensão de zoósporos de Bd para ser observada a formação da camada de crescimento do fungo. A avaliação de resultados levou em conta a formação de halo aparente ao redor da colônia de bactérias.

Figura 10 – Esquema do teste de inibição de Bd em placa de Petri.



Fonte: Elaborado pelo autor, com imagens de Flechas *et al.*, 2012.

4.4 Avaliação do potencial inibitório de Bd em meio líquido

A metodologia de quantificação da atividade inibitória contra o *Bd* foi realizada conforme o método de Bell *et al.* (2013), com as modificações de Becker *et al.* (2015), Bletz *et al.* (2017), Rebollar *et al.* (2020) e Bezerra (2021).

Os inóculos de *Bd* foram preparados a partir de uma cultura pura do fungo crescida em caldo triptona 1% por 3-5 dias, a 21 °C e sob agitação de 150 rpm. Após crescimento, cultura teve a OD ajustada para $0,015 \pm 0,001$ sob leitura de 490 nm (aprox. 10^6 zoósporos/mL).

As culturas de bactérias foram preparadas a partir de uma colônia isolada repicada para caldo T1% e incubadas a 35 °C por 18 – 24 horas sob agitação de 150 rpm. O inóculo das bactérias foi ajustado para OD de $1,0 \pm 0,05$ sob leitura de absorvância de 600 nm em espectrofotômetro.

O co-cultivo foi realizado com 2 mL de cada suspensão, do *Bd* e da bactéria teste, após ajuste de OD, e incubado a 21° C por 72-96 horas sob agitação de 150 rpm. Após incubação, os tubos de cultura foram centrifugados a 7500 rpm (equivalente a 7546 RCF na centrífuga utilizada) por 20 minutos, a 4 °C, e os sobrenadantes foram aliquotados para filtração

em membrana de poro 0,22 μm , obtendo um sobrenadante livre de células (SLC). Os sobrenadantes foram congelados a -20°C até o momento da análise em microplaca.

O ensaio de inibição do Bd foi feito em placas de 96 poços com fundo chato estéreis. Todas as amostras e controles testados foram analisados em triplicata e a distribuição dos volumes em placa está descrita na Tabela 1.

Tabela 1 – Descrição das alíquotas utilizadas no ensaio de inibição de Bd em meio líquido.

MATERIAL	SLC	Suspensão de zoósporos	Água destilada estéril	T1%
Amostra	50 μL	50 μL	-	-
C+	-	100 μL	-	-
C-	-	-	-	100 μL
CMC	-	50 μL (mortos por calor)	-	50 μL
CDN	-	50 μL	50 μL	-

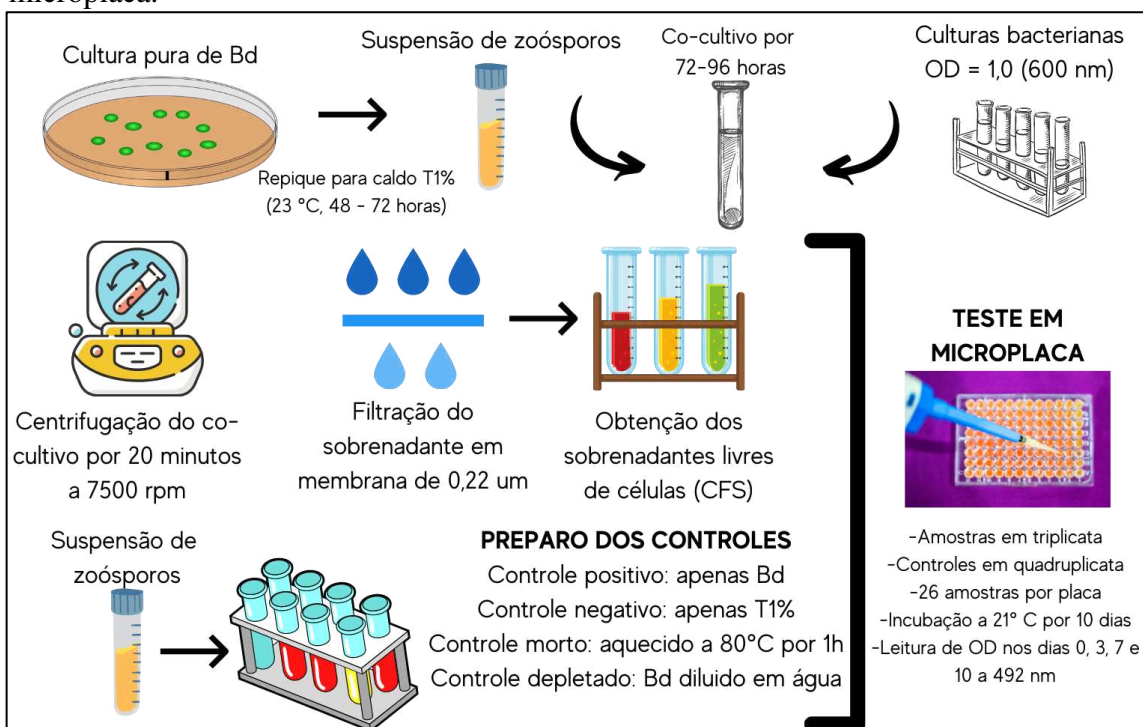
Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: SLC = Sobrenadante livre de células; T1% = Caldo Triptona a 1%; C+ = Controle positivo; C- = Controle negativo; CMC = Controle morto pelo calor; CDN = Controle depletado de nutrientes.

Para os poços-testes foram adicionados 50 μL de SLC e 50 μL de suspensão contendo aproximadamente 10^6 zoósporos de Bd/mL. Serão preparados 4 controles a serem analisados em quadruplicata: 1) 100 μL de suspensão contendo aproximadamente 10^6 zoósporos de Bd/mL em caldo triptona 1% (controle positivo – C+); 2) 50 μL de suspensão contendo aproximadamente 2×10^6 zoósporos de Bd/mL adicionado de 50 μL água destilada estéril (controle depletado de nutrientes – CDN); 3) 50 μL de suspensão contendo aproximadamente 10^6 zoósporos de Bd/mL em caldo triptona 1% mortos pelo calor adicionados de 50 μL de caldo triptona 1% estéril (controle morto pelo calor – CMC) e 4) 100 μL de caldo triptona 1% estéril (controle negativo – C-). O controle morto pelo calor foi preparado através da exposição de tubo contendo suspensão de 10^6 zoósporos de Bd/mL em caldo triptona 1% a calor de 80°C por 1 hora em banho-maria. A Figura 11 mostra o desenho metodológico seguido.

As placas de ensaio foram incubadas a 21°C com crescimento microbiano medido através da análise de densidade óptica (OD) em leitor de microplacas ELISA, no comprimento de onda 492 nm, nos dias 0, 3, 7 e 10, em intervalos de horas regulares, com as placas sendo homogeneizadas em agitador de placas a 1000 rpm por um minuto. As leituras foram plotadas em reta de regressão linear das leituras de OD ao longo dos dias através da média dos valores das triplicatas. A inclinação média de cada isolado foi dividida pela inclinação média do CDN,

para que fosse determinada a proporção de crescimento (PC). Esse valor será subtraído de 1 para determinar a pontuação de inibição para o fungo, assim, valores positivos indicam inibição e eventuais valores negativos indicam facilitação de crescimento do Bd. Serão avaliadas cinco categorias: (1) inibição forte quando o valor obtido for $\geq 0,75$; (2) inibição moderada quando o valor for $< 0,75$, mas $\geq 0,50$; (3) inibição fraca quando o valor for $< 0,50$, mas $\geq 0,25$; (4) sem inibição quando o valor for $< 0,25$, mas $\geq -0,25$ e (5) facilitação quando o valor for $< -0,25$. A interpretação dos resultados está resumida na Figura 12.

Figura 11 – Resumo ilustrado do ensaio quantitativo de inibição do fungo Bd em microplaca.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 12 – Instruções para obtenção dos valores e interpretação dos resultados do teste de inibição de Bd em meio líquido seguindo Rebollar *et al.* (2020).

Leitura realizada	Média da triplicata	Interpretação de resultados	
Obtenção do <i>slope</i> (inclinação média)	Regressão linear das leituras nos dias 0, 3, 7 e 10	$PC \geq 0,75$	Inibição alta
		$0,50 \leq PC < 0,75$	Inibição moderada
		$0,25 \leq PC < 0,50$	Inibição baixa
Cálculo da proporção de crescimento (PC)	$PC = \frac{\text{slope SLC}}{\text{slope CDN}}$	$0,25 \leq PC < 0,25$	Sem inibição
		$PC < 0,25$	Facilitação

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5 Teste de compatibilidade microbiana

Após avaliar os microrganismos com melhores resultados nos testes de inibição do Bd foram selecionados os microrganismos candidatos para construção de um consórcio microbiano. Para avaliar sua compatibilidade, foi feita a metodologia do *cross streak*, que consiste em avaliar, em placa, a presença ou não de antibiose entre as bactérias. O teste foi feito com 12 cepas.

A técnica foi feita conforme o descrito por Sharma e colaboradores (2013), porém utilizando o meio Muller Hinton (MH) em caldo (extrato de carne bovina 2 g/L; hidrolisado ácido de caseína 17,5 g/L; amido 1,5 g/L; pH final $7,3 \pm 0,2$ a 25 °C) e placa (composição do caldo adicionado de ágar 15 g/L).

As culturas de bactérias foram preparadas a partir de uma colônia isolada repicada para caldo MH e incubadas a 35 °C por 18 – 24 horas sob agitação de 150 rpm. O inóculo das bactérias foi ajustado para OD de $0,1 \pm 0,02$ sob leitura de absorvância de 600 nm em espectrofotômetro.

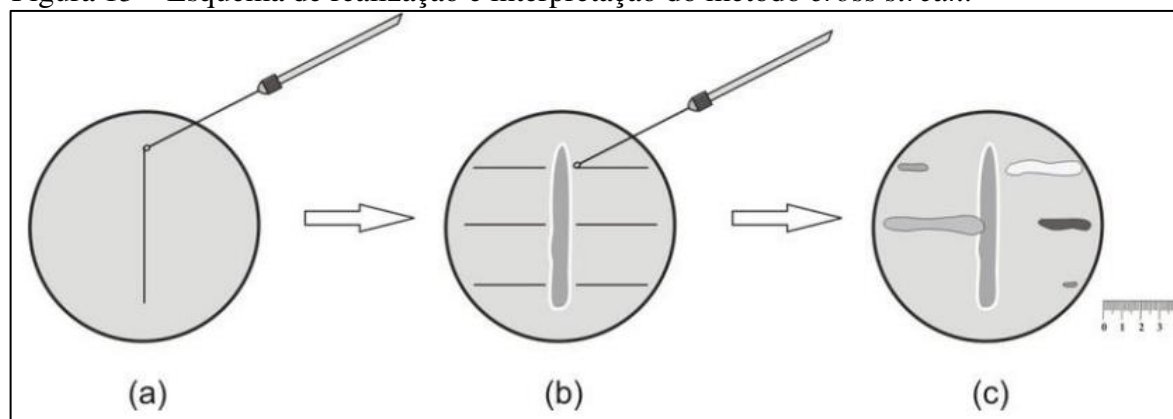
Numa placa de Petri contendo 20 mL de ágar MH foi feita uma estria central de um dos morfotipos a partir da cultura em meio líquido, de uma extremidade à outra da placa, caracterizando a estria central. A placa foi inicialmente incubada em estufa a 35° C por 48 horas para liberação de seus metabólitos no meio de cultura. Após esse período, os outros microrganismos utilizados foram inoculados, a partir de culturas em meio líquido, em estrias perpendiculares à central, partindo da extremidade da placa até o mais próximo possível da colônia já crescida, conforme Figura 12.

Em cada placa foram feitas 5 ou 6 estrias perpendiculares, em lados opostos, com distância de aproximadamente 2 cm. Para cada conjunto (estria central + perpendiculares) foi preparada uma duplicata, como critério de confiabilidade do teste. Após feitas todas as estrias perpendiculares, a placa foi incubada a 35° C por 24 horas para avaliar o crescimento dos inóculos.

O resultado foi interpretado como compatibilidade (+) quando não houve halo ou zona de inibição entre a linha principal e a perpendicular ou incompatibilidade (-) quando houve halo visível. Todos os 12 morfotipos avaliados foram colocados como estria central para desafiar sua relação com as outras amostras.

As bactérias que apresentaram compatibilidade foram combinadas em consórcio microbiano para teste de inibição do Bd.

Figura 13 – Esquema de realização e interpretação do método *cross streak*.



Fonte: VASABHAI (2019). A) Inoculação da cepa a ser avaliada quanto à liberação de compostos antimicrobianos; B) Após incubação da cepa principal, inocula-se as bactérias que serão testadas contra o primeiro microrganismo; C) Avalia-se o crescimento e a formação ou não de zona de inibição (relação de compatibilidade) entre a estria central e as perpendiculares.

4.6 Avaliação de consórcios microbianos para inibição do fungo Bd

A metodologia de quantificação da atividade inibitória dos consórcios contra o Bd foi realizada conforme o método de Bell *et al.* (2013), com as modificações de Becker *et al.* (2015), Bletz *et al.* (2017), Rebollar *et al.* (2020) e Bezerra (2021).

Os inóculos de Bd foram preparados a partir de uma cultura do fungo crescida em caldo triptona 1% por 3-5 dias, a 21 °C e sob agitação de 150 rpm. A teve a OD ajustada para $0,015 \pm 0,001$ sob leitura de 490 nm (aprox. 10^6 zoósporos/mL).

Foram testadas 18 proposições de consórcios a partir do resultado do teste de compatibilidade, que delimitou a combinação de 11 cepas, das 12 avaliadas. Uma das cepas apresentou relação de antibiose contra todas as outras (P49).

Para construção dos consórcios, as culturas de bactérias foram preparadas a partir de uma colônia isolada repicada para caldo T1% e incubadas a 35 °C por 18 – 24 horas sob agitação de 150 rpm. O inóculo das bactérias foi ajustado para OD de $1,0 \pm 0,05$ sob leitura de absorvância de 600 nm em espectrofotômetro. Com as culturas padronizadas, os consórcios foram combinados a partir de mistura de volumes iguais das suspensões microbianas e homogeneizados em vórtex.

O co-cultivo foi feito com 2 mL de cada suspensão, do Bd e do consórcio teste, após ajuste de OD, e incubado a 21° C por 72-96 horas sob agitação de 150 rpm. Após incubação, os tubos de cultura foram centrifugados a 7500 rpm (equivalente a 7546 RCF na centrífuga utilizada) por 20 minutos, a 4 °C, e os sobrenadantes foram aliquotados para filtração

em membrana de poro 0,22 μm , obtendo um sobrenadante livre de células (SLC). Os sobrenadantes foram congelados a -20°C até o momento da análise em microplaca.

O ensaio de inibição do Bd pelos consórcios foi feito em placas de 96 poços com fundo chato estéreis. Todas as amostras e controles testados foram analisados em quadruplicata e a distribuição dos volumes em placa está descrita na Tabela 2. O racional para o ensaio seguiu as proporções do teste de avaliação inibitória em meio sólido, porém, com volume duplicado, pois foram feitas leituras diárias entre os dias 0 e 10, necessitando agitação por mais vezes. O volume foi aumentado para evitar ressecamento das amostras nos poços.

As placas de ensaio foram incubadas a 21°C com crescimento microbiano medido através da análise de densidade óptica (OD) em leitor de microplacas ELISA, no comprimento de onda 492 nm, nos dias 0 a 3 e 6 a 10, em intervalos de horas regulares, com as placas sendo homogeneizadas em agitador de placas a 1000 rpm por um minuto.

Tabela 2 – Descrição das alíquotas utilizadas no ensaio de inibição de Bd em meio líquido para avaliação dos consórcios.

MATERIAL	SLC	Suspensão de zoóporos	Água destilada estéril	T1%
Amostra	100 μL	100 μL	-	-
C+	-	200 μL	-	-
C-	-	-	-	200 μL
CMC	-	100 μL (mortos por calor)	-	100 μL
CDN	-	100 μL	100 μL	-

Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: SLC = Sobrenadante livre de células; T1% = Caldo Triptona a 1%; C+ = Controle positivo; C- = Controle negativo; CMC = Controle morto pelo calor; CDN = Controle depletado de nutrientes.

A interpretação de resultados seguiu o descrito para a avaliação da inibição em meio líquido, mas o cálculo da regressão linear incluiu os dias extras de leitura, como forma de buscar avaliar qual consórcio seria mais efetivo (critério de eliminação e escolha), conforme mostra a Figura 14.

Figura 14 – Instruções para obtenção dos valores e interpretação dos resultados do teste de inibição de Bd em meio líquido para os consórcios.

Leitura realizada	Média da triplicata	Interpretação de resultados	
		Obtenção do <i>slope</i> (inclinação média)	Regressão linear das leituras nos dias 0, 2, 3, 6, 7, 8, 9 e 10
$0,50 \leq PC < 0,75$	Inibição moderada		
$0,25 \leq PC < 0,50$	Inibição baixa		
Cálculo da proporção de crescimento (PC)	$PC = \frac{\text{slope SLC}}{\text{slope CDN}}$	$0,25 \leq PC < 0,25$	Sem inibição
		$PC < 0,25$	Facilitação

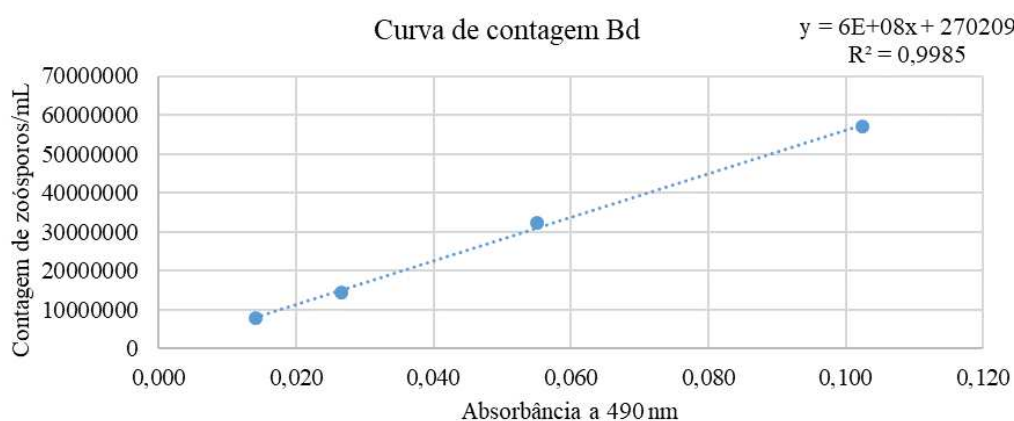
Fonte: Elaborado pelo autor.

5 RESULTADOS

5.1 Curva de contagem de zoósporos

A curva de contagem de zoósporos do Bd apresentou alta confiabilidade, conforme mostrado na Figura 15, possibilitando a quantificação de zoósporos através de absorbância. A partir da equação da reta obtida, para que o valor de absorbância seja extrapolado para quantidade de zoósporos na concentração de 10^6 , a leitura de trabalho delimitada para os ensaios foi de $0,015 \pm 0,001$.

Figura 15 – Curva de Contagem Bd sob OD de 490 nm.



Artigos recentes têm buscado estabelecer métodos por absorbância combinados com corantes para diferenciar e quantificar células viáveis e não viáveis de zoósporos e zoosporângios do Bd (LINDAUER *et al.*, 2019; WEBB *et al.*, 2019), para padronizar ensaios, devido ao alto tempo de incubação de algumas linhagens, de 7 a 10 dias.

O Bd utilizado nesta pesquisa apresenta alta taxa de crescimento com 48-72 horas incubado a 21° C, caracterizando ainda um período de alta viabilidade celular, portanto, as absorbâncias obtidas para a construção da curva, junto da contagem de viáveis em placa, possibilitou uma confiabilidade grande para a leitura de trabalho estabelecida.

5.2 Caracterização dos microrganismos teste

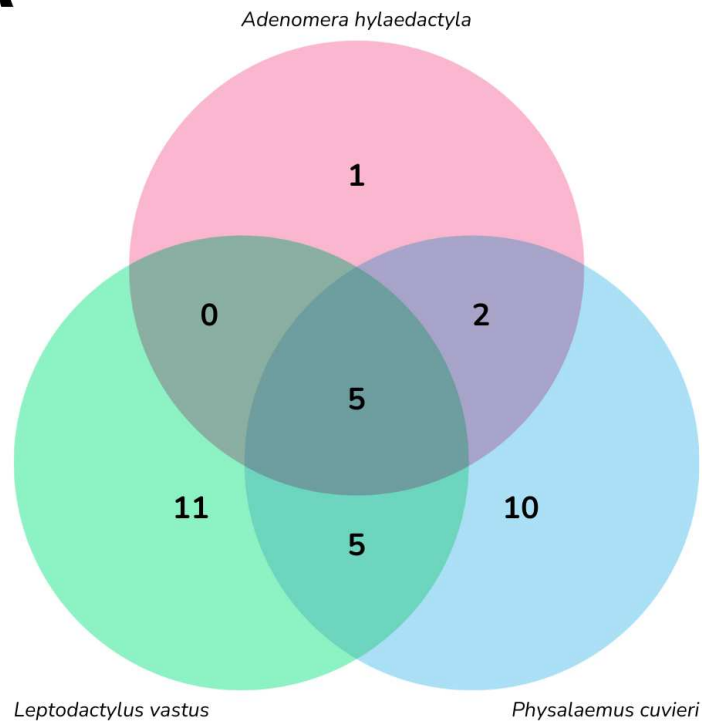
Os 182 morfotipos das três coleções microbianas de trabalho tiveram seus estoques renovados e armazenados a -20 °C no LARGEN. Foi confeccionado um catálogo padronizado, para gerenciamento interno do laboratório.

Os morfotipos trabalhados estão distribuídos em 34 gêneros biológicos e um grupo, denominado *Unknown*, que reúne os morfotipos que não tiveram seus gêneros identificados pela análise de sequenciamento do gene rDNA 16S. Na Figura 16 pode-se observar a relação entre a distribuição dos gêneros entre os ninhos de espuma através de um diagrama de Venn, sendo que apenas 5 gêneros estão presentes nos três ninhos de espuma e não há gêneros comuns para os ninhos de *A. hylaedactyla* e *L. vastus*.

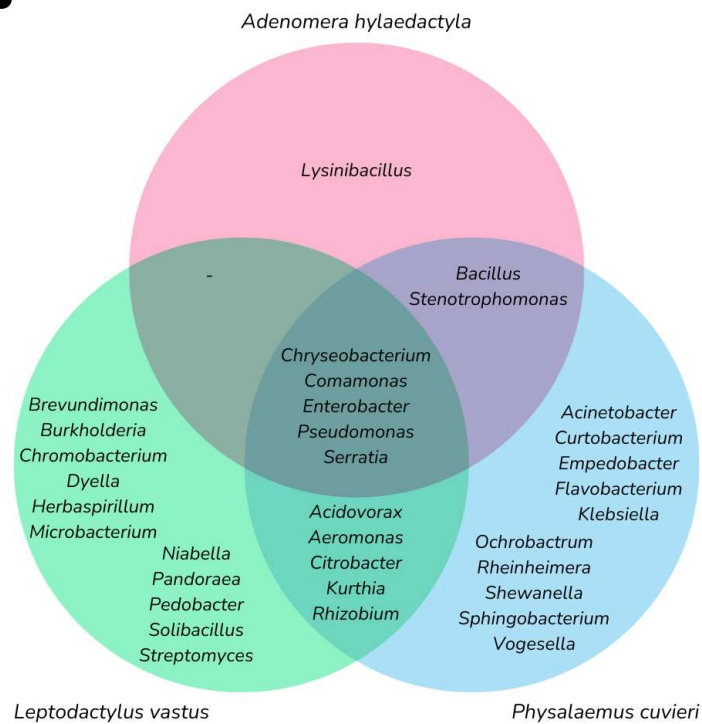
Na análise de diversidade das dos isolados, mostrado na Figura 17, observa-se que *Pseudomonas* foi o gênero mais abundante das 182 amostras (27,47%), seguido por *Enterobacter* (8,24%) e *Aeromonas* (6,59%). *Pseudomonas* foi o gênero mais presente nos ninhos de espuma de *L. vastus* (20%) e *P. cuvieri* (39,17%) e os outros gêneros apresentaram quantidades menores que 10%, enquanto que para a espécie *A. hylaedactyla* os gêneros mais abundantes foram *Enterobacter* (30%), *Bacillus* (23,33%) e *Serratia* (16,67%).

Figura 16 – Comparativo dos gêneros dos isolados bacterianos entre os ninhos de espuma.

A

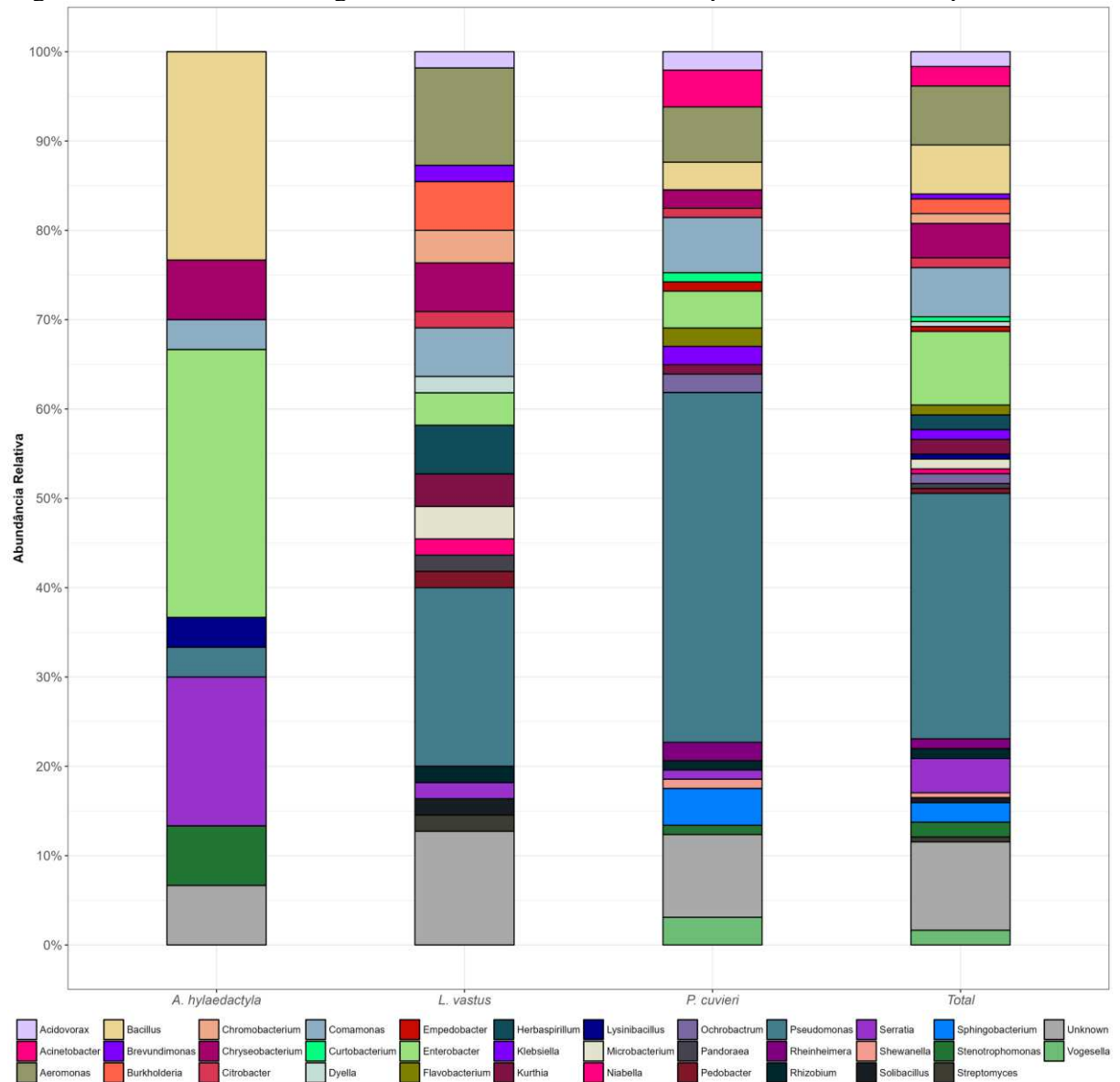


B



Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: A = Quantidade de gêneros exclusivas ou compartilhadas entre os ninhos de espuma; B = Relação dos gêneros bacterianos e sua distribuição entre os ninhos.

Figura 17 – Diversidade de gêneros bacterianos dos morfotipos dos ninhos de espuma.



Fonte: Victor Rodrigues (2024).

5.3 Ensaio Anti-Bd em meio sólido

O teste em meio sólido consistiu em apresentação ou não de inibição direta do Bd através da presença do microrganismo. A Figura 18 mostra um exemplo de como o ensaio foi executado, apresentando colônias com halo evidente (ausência ou grande diminuição do Bd ao redor da colônia) e sem halo evidente.

Dos 182 morfotipos testados, 54 (29,67%) apresentaram formação de halo, distribuídas em 11 gêneros e o grupo *Unknown*, com o gênero mais representativo sendo *Pseudomonas* (35,18%), de acordo com a Figura 19. O ninho com maior percentual de bactérias

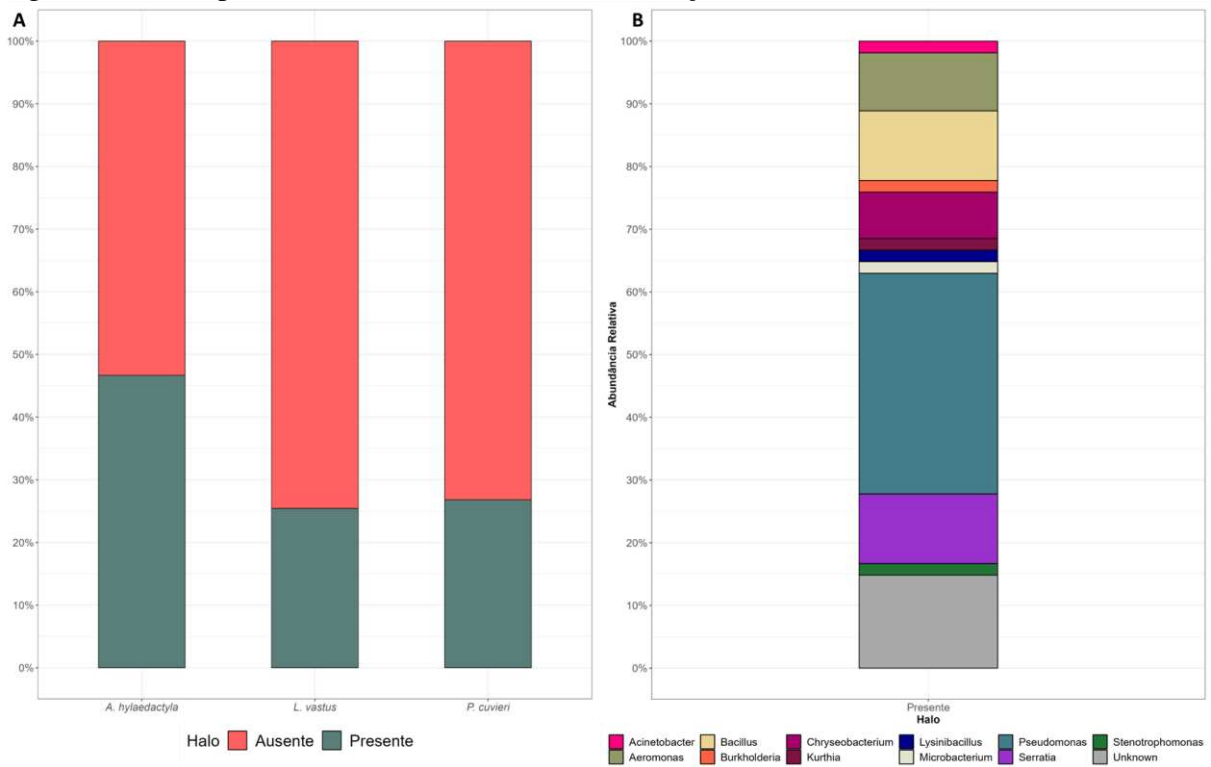
formadoras de halo foi o de *A. hylaedactyla* (46,67% dos morfotipos do ninho), porém a maior quantidade foi encontrada no ninho de *P. cuvieri*, um total de 26 morfotipos (14,28% do total).

Figura 18 – Exemplo de placa do teste em meio sólido.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 19 – Compilado de resultados do teste de inibição em meio sólido.

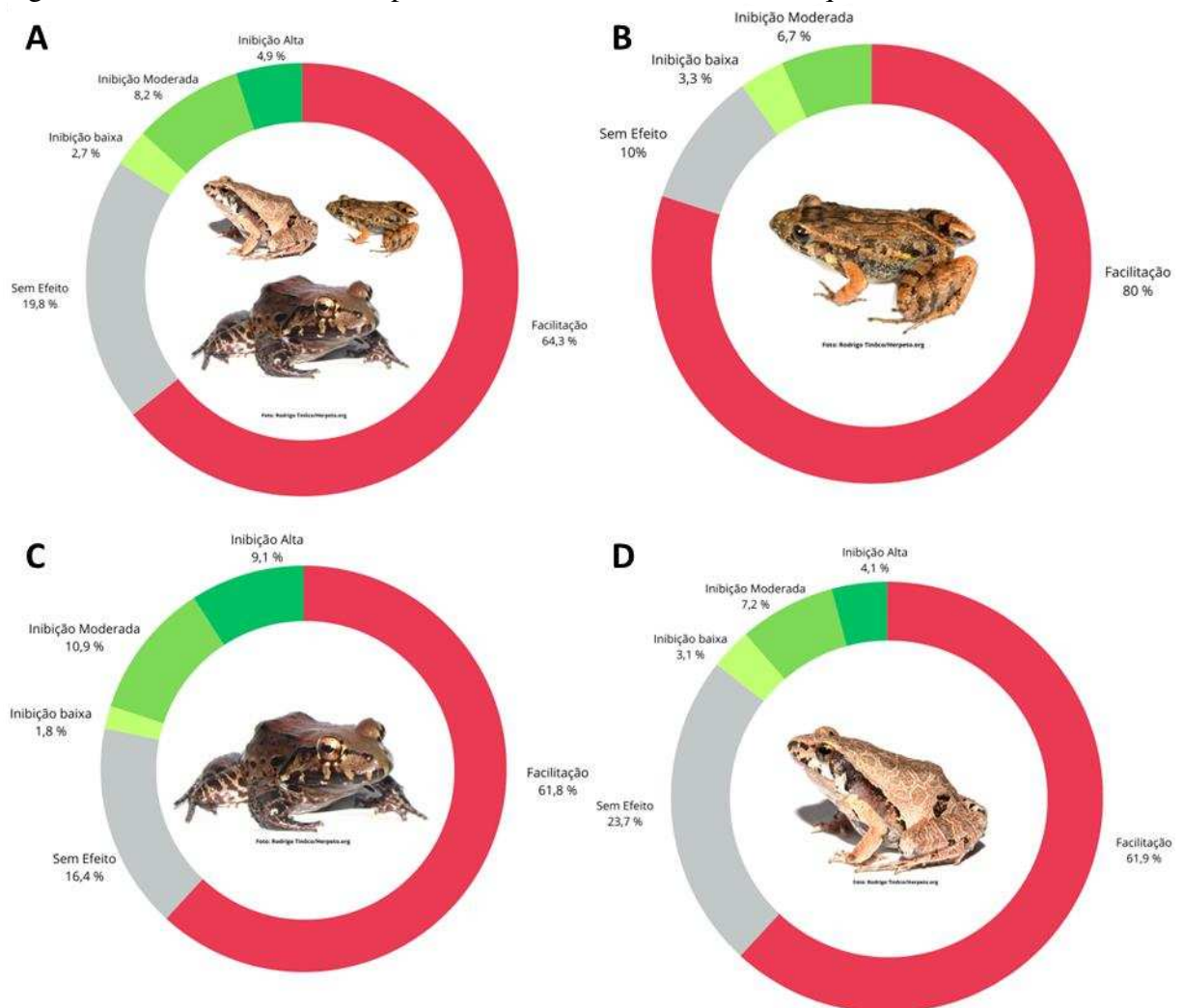


Fonte: Victor Rodrigues (2024). Legenda: A = Morfotipos que formaram halos classificados por ninhos de espuma; B = Abundância relativa de gêneros que apresentaram formação de halo.

5.4 Ensaio Anti-Bd em meio líquido

O teste em meio líquido foi realizado com os 182 morfotipos e apenas 29 (15,80%), divididos em 6 gêneros, apresentaram algum grau de inibição contra o Bd, sendo 2,7% baixa, 8,2% moderada e 4,9% alta. No ninho de *A. hylaedactyla* não foram encontrados morfotipos com inibição alta, enquanto que em *L. vastus* apresentou a maior porcentagem de inibição alta (9,1%) e *P. cuvieri* teve o maior quantitativo de representantes com qualquer taxa inibitória, num total de 14 morfotipos, conforme mostrado na Figura 20.

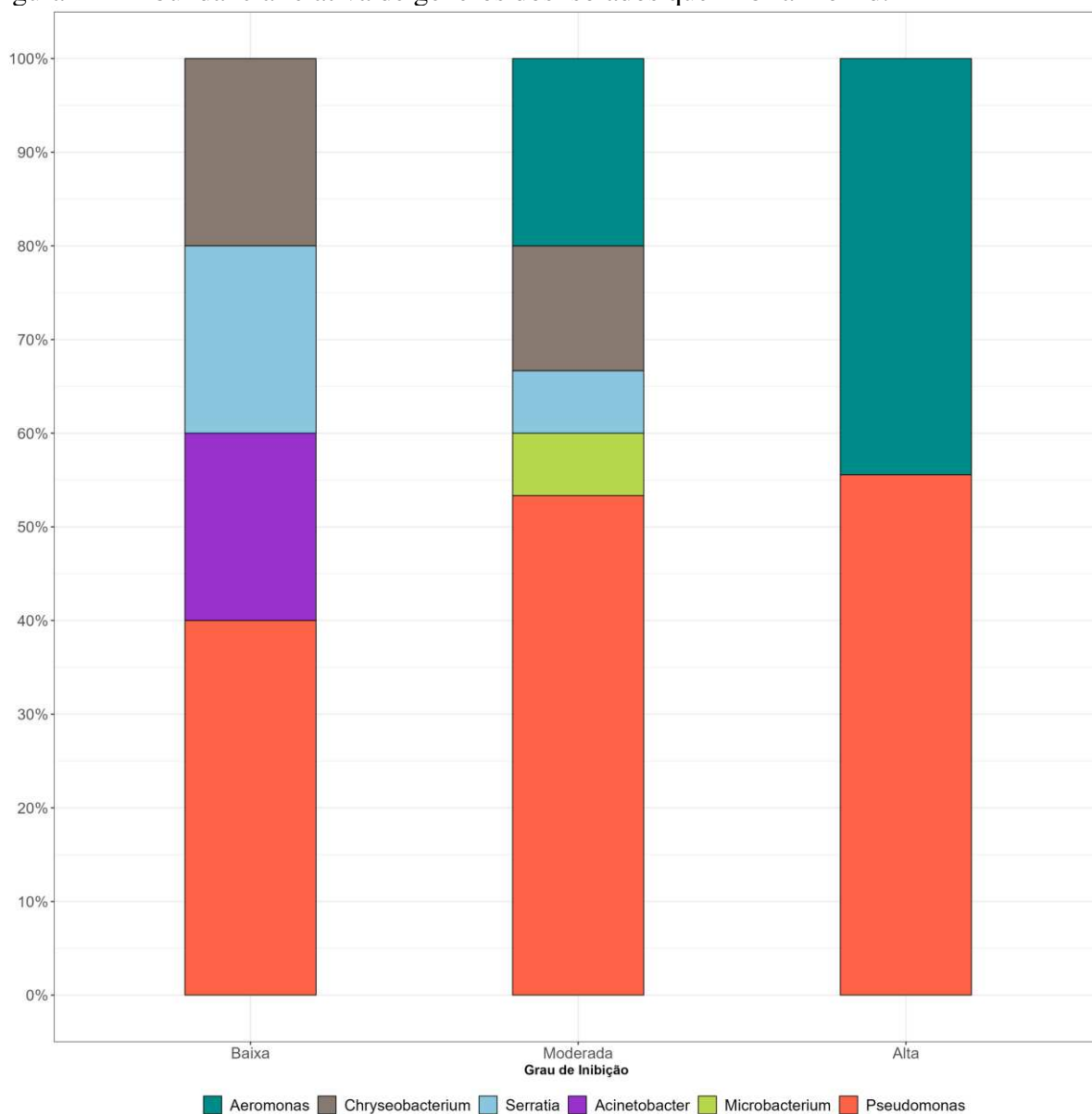
Figura 20 – Efeitos dos morfotipos sobre o Bd no teste em meio líquido.



Fonte: Victor Rodrigues (2024). Legenda: A = Agrupamento dos isolados dos três ninhos de espuma; B = Isolados de *A. hylaedactyla*; C = Isolados de *L. vastus*; D = Isolados de *P. cuvieri*.

Na Figura 21 pode-se observar que os gêneros mais representativos nas taxas de inibição foram *Pseudomonas* e *Aeromonas*, e foram os únicos gêneros que apresentaram inibição alta.

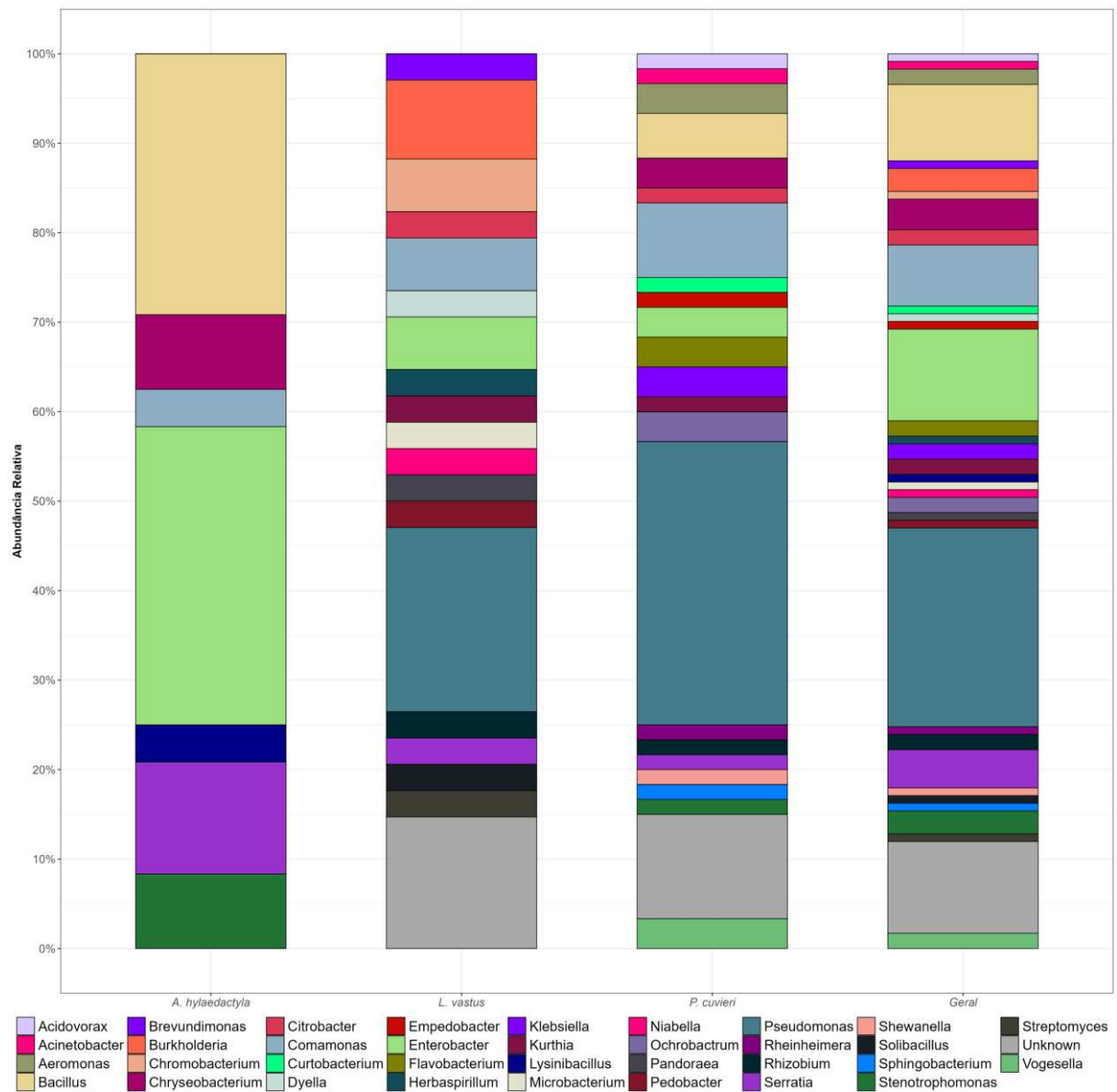
Figura 21 – Abundância relativa de gêneros dos isolados que inibiram o Bd.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Na Figura 22 pode-se observar que os gêneros mais representativos nas taxas de facilitação foram *Pseudomonas* (22,22%) e *Aeromonas* (10,25%), assim como na inibição. No ninho de *A. hylaedactyla* os gêneros mais facilitadores foram os mesmos mais inibidores, *Enterobacter* (33,33%) e *Bacillus* (29,17%). Em *L. vastus* e *P. cuvieri* os gêneros mais facilitadores foram *Pseudomonas* e *Comamonas*.

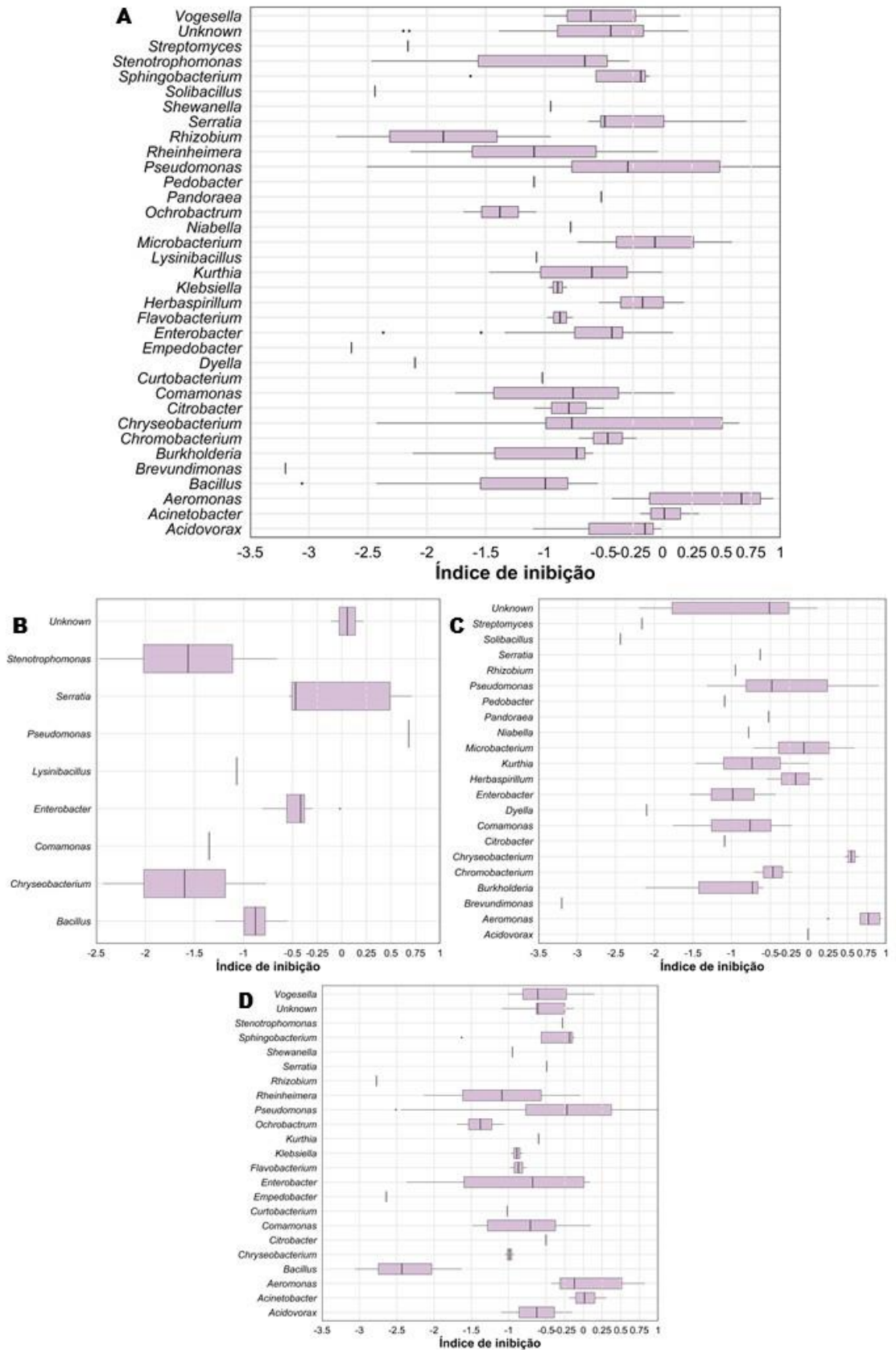
Figura 22 – Gêneros facilitadores do Bd por ninho de espuma.



Fonte: Victor Rodrigues (2024).

A Figura 23 mostra um agrupamento geral dos resultados dos índices de inibição obtidos a partir do cálculo descrito na metodologia. O índice de inibição tem seu valor máximo em 1 (inibição total do Bd) e seu valor negativo indica facilitação do crescimento fúngico, portanto, quanto mais o fungo cresce, maior é o número de taxa negativa, sem valor limítrofe.

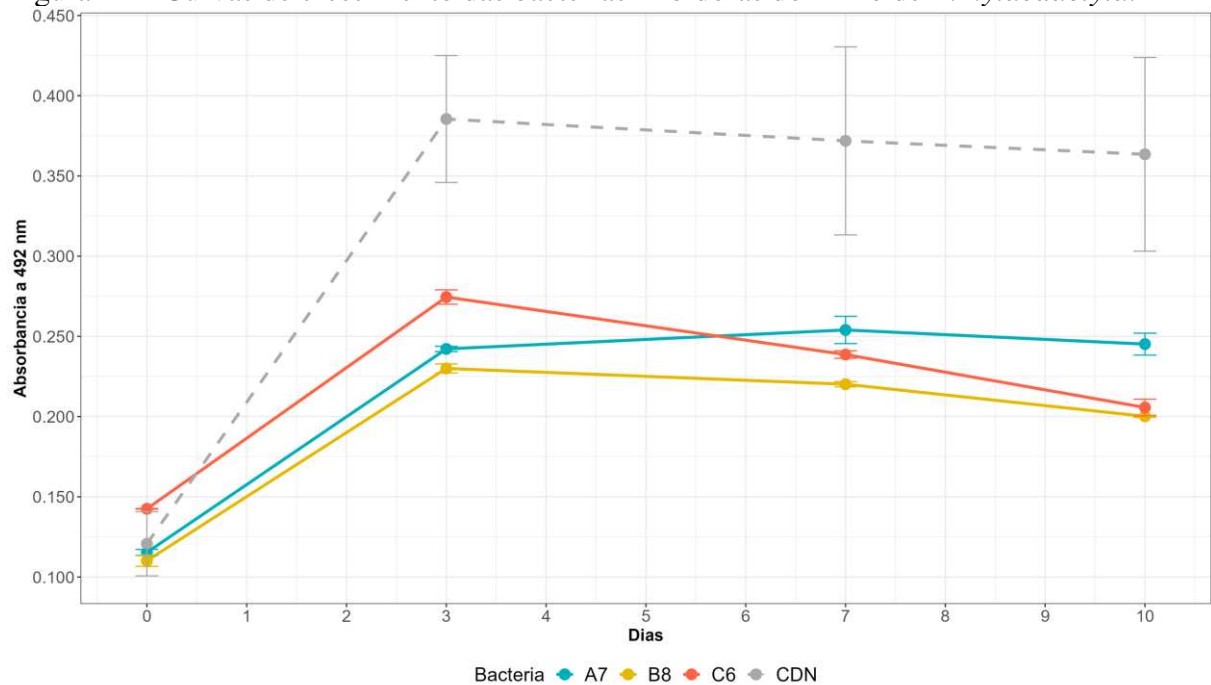
Figura 23 – Taxas relativas de interação das bactérias-teste contra o fungo Bd.



Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: A = Dados completos de todas as bactérias; B = Dados das bactérias de ninhos de espuma de *A. hylaedactyla*; C = Dados das bactérias de ninhos de espuma de *L. vastus*; D = Dados das bactérias de ninhos de espuma de *P. cuvieri*.

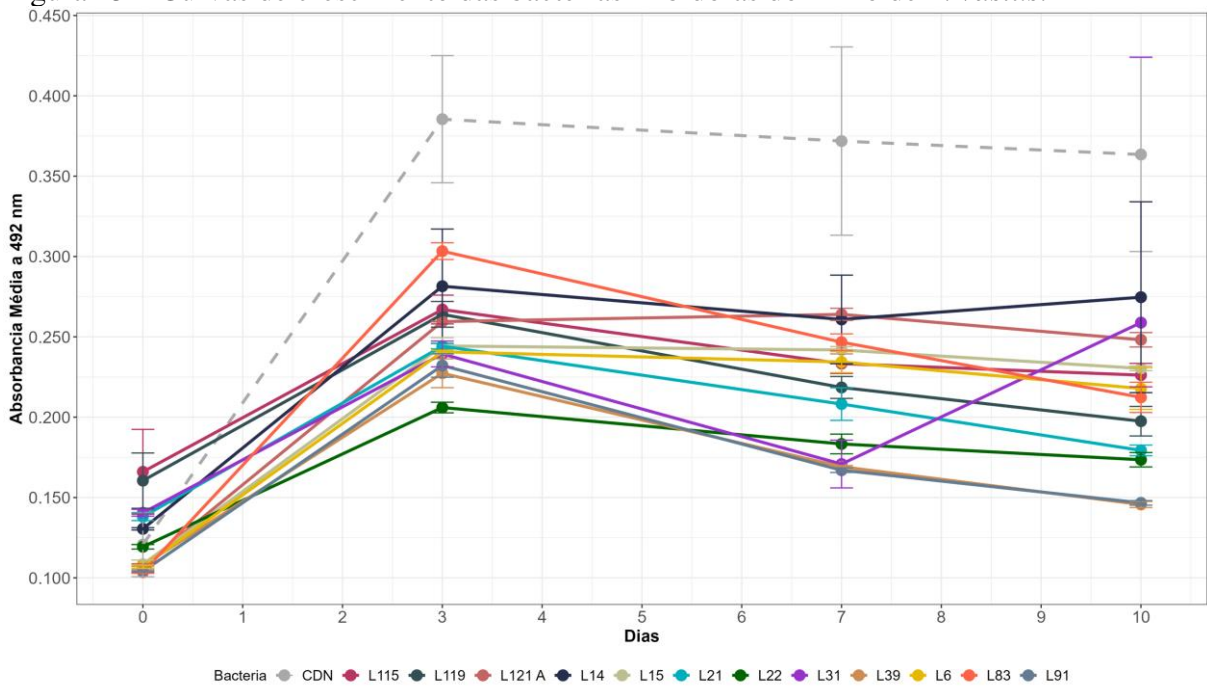
As Figuras 24, 25 e 26 mostram as curvas de crescimento de todas bactérias não-facilitadoras, ou seja, que apresentaram algum tipo de inibição (leve, moderada ou alta), separadas por ninho de espuma. Após a avaliação dos resultados dessas curvas, foram selecionadas 12 bactérias para a etapa da construção de um consórcio microbiano, buscando variar os critérios entre: gênero, taxa inibitória, presença de atividade hemolítica (dados de pesquisa do grupo) e a inibição em meio sólido. Os critérios foram estabelecidos para minimizar a combinação de microrganismos com características muito semelhantes em relação à inibição do Bd.

Figura 24 – Curvas de crescimento das bactérias inibidoras do ninho de *A. hylaedactyla*.



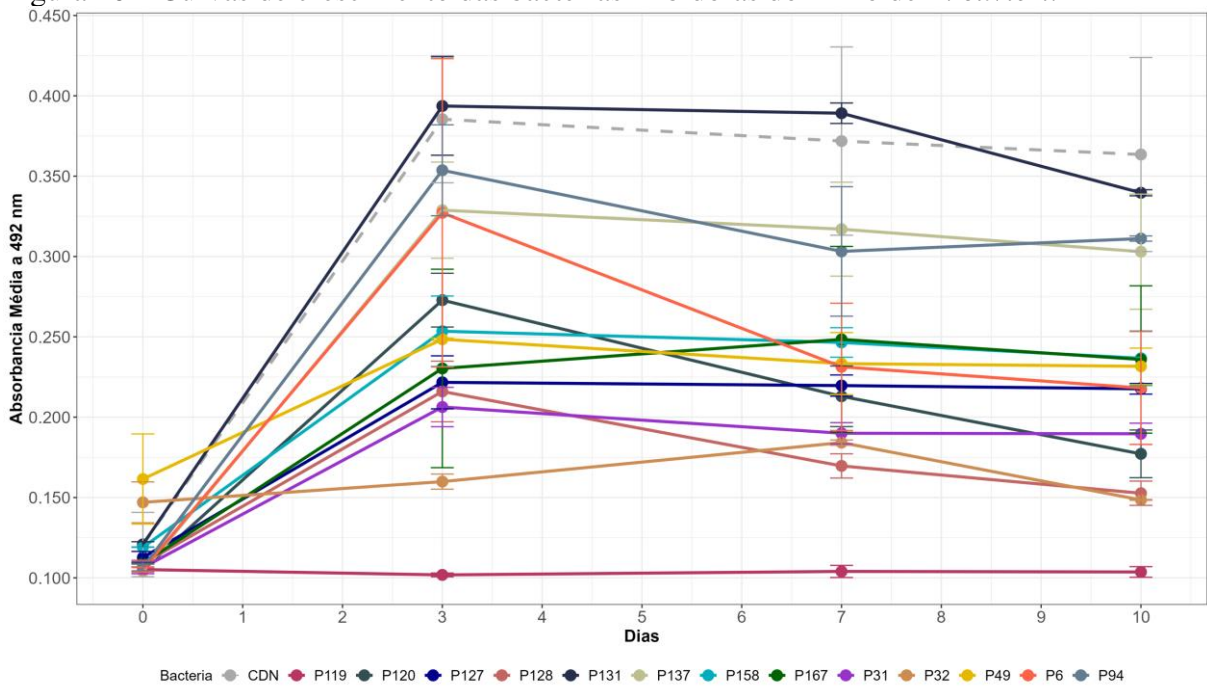
Fonte: Victor Rodrigues (2024). Legenda: CDN = Controle depletado de nutrientes.

Figura 25 – Curvas de crescimento das bactérias inibidoras do ninho de *L. vastus*.



Fonte: Victor Rodrigues (2024). Legenda: CDN = Controle depletado de nutrientes.

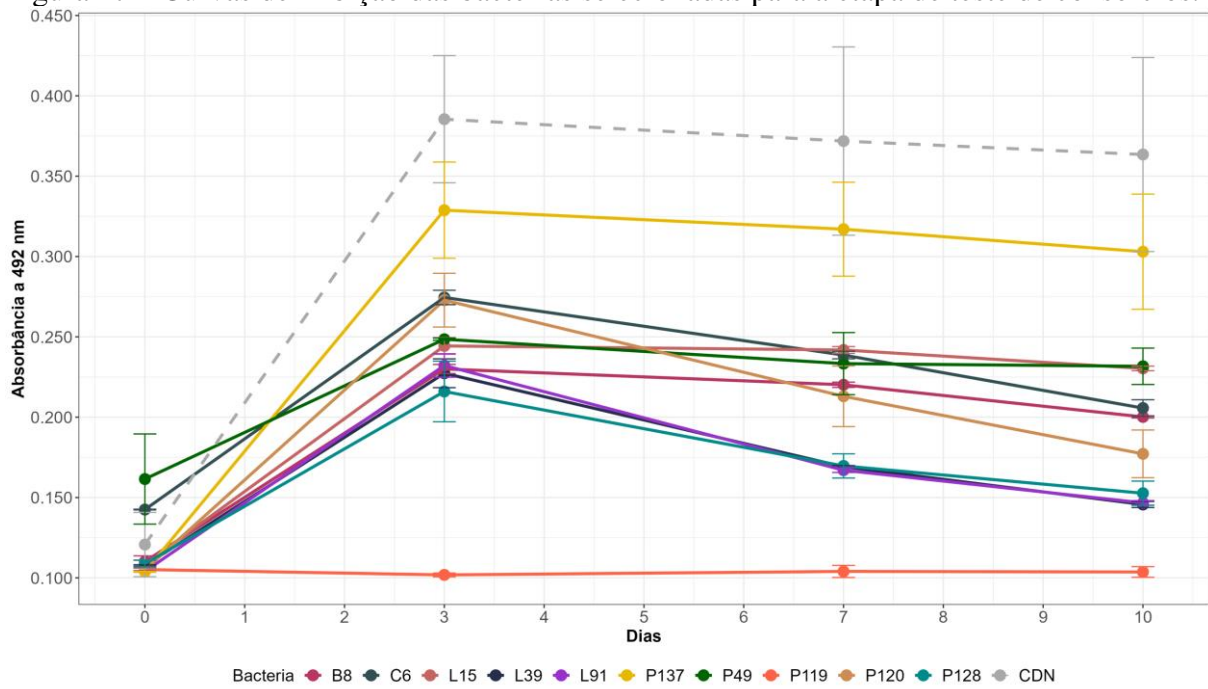
Figura 26 – Curvas de crescimento das bactérias inibidoras do ninho de *P. cuvieri*.



Fonte: Victor Rodrigues (2024). Legenda: CDN = Controle depletado de nutrientes.

As bactérias selecionadas para a etapa seguinte foram: *Pseudomonas* B8, *Serratia* C6, *Microbacterium* L6, *Chryseobacterium* L15, *Aeromonas* L39, *Aeromonas* L91, *Pseudomonas* P49, *Acinetobacter* P94, *Pseudomonas* P119, *Aeromonas* P120, *Pseudomonas* P128 e *Pseudomonas* P137. E suas curvas estão organizadas na Figura 27.

Figura 27 – Curvas de inibição das bactérias selecionadas para a etapa de teste de consórcios.



Fonte: Victor Rodrigues (2024). Legenda: CDN = Controle depletado de nutrientes.

5.5 Ensaio de compatibilidade microbiana (Cross streak)

O teste de compatibilidade foi realizado conforme o descrito na metodologia e foi observado a inibição entre alguns morfotipos, conforme a Figura 28 demonstra. O morfotipo P49 (estria central transparente) foi retirado das combinações de consórcios porque apresentou inibição contra todos os outros 11 testes.

Figura 28 – Resultados do teste de compatibilidade microbiana.

ESTRIA CENTRAL	ESTRIAS LATERAIS											
	B8	C6	L6	L15	L39	L91	P49	P94	P119	P120	P128	P137
B8	■											
C6		■										
L6			■	X								
L15			X	■					X	X		
L39			X	X	■							
L91						■						
P49	X	X	X	X	X	X	■	X	X	X	X	X
P94							■					
P119								■				
P120			X						■			
P128										■		
P137												■

Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: X = Inibição.

Diante disso, foram elaboradas 20 proposições de consórcio, denominados Consórcios de Ninhos de Espuma (CNE), numerados de 1 a 20, mas CNE7 e CNE8 eram repetições, por isso foram removidos da lista, sem alterações na nomenclatura para evitar confusão. A Figura 29 mostra os consórcios, suas respectivas bactérias e a justificativa da proposição. O morfotipo P119 foi separado como padrão por apresentar a maior inibição do Bd.

Figura 29 – Proposições de consórcios dos ninhos de espuma (CNE).

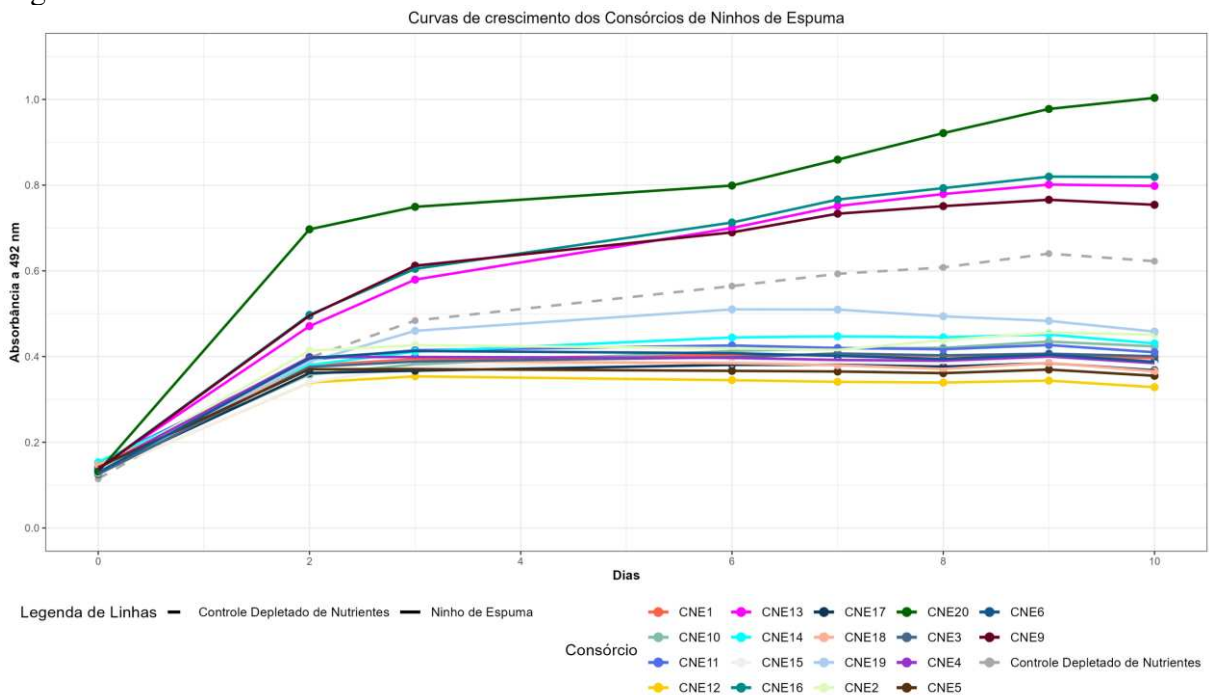
CONSÓRCIOS						JUSTIFICATIVA
CNE1	C6	L6	L91	P94	P128	Gêneros variados com <i>Pseudomonas</i> Forte_v1
	<i>Serratia</i>	<i>Microbacterium</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Pseudomonas</i>	
CNE2	C6	L15	L91	P94	P128	Gêneros variados com <i>Pseudomonas</i> Forte_v2
	<i>Serratia</i>	<i>Chryseobacterium</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Pseudomonas</i>	
CNE3	C6	L6	L91	P94		Gêneros variados sem <i>Pseudomonas</i> _v1
	<i>Serratia</i>	<i>Microbacterium</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>Acinetobacter</i>		
CNE4	C6	L15	L91	P94		Gêneros variados sem <i>Pseudomonas</i> _v2
	<i>Serratia</i>	<i>Chryseobacterium</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>Acinetobacter</i>		
CNE5	C6	L6	L91	P94	P137	Gêneros variados com <i>Pseudomonas</i> Fraca_v1
	<i>Serratia</i>	<i>Microbacterium</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Pseudomonas</i>	
CNE6	C6	L15	L91	P94	P137	Gêneros variados com <i>Pseudomonas</i> Fraca_v2
	<i>Serratia</i>	<i>Chryseobacterium</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Pseudomonas</i>	
CNE9	L39	L91	P128			Gêneros variados de inibição alta com <i>Pseudomonas</i>
	<i>Aeromonas</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>Pseudomonas</i>			
CNE10	B8	C6	L6			Gêneros variados de inibição baixa_v1
	<i>Pseudomonas</i>	<i>Serratia</i>	<i>Microbacterium</i>			
CNE11	B8	C6	L15			Gêneros variados de inibição baixa_v2
	<i>Pseudomonas</i>	<i>Serratia</i>	<i>Chryseobacterium</i>			
CNE12	P94	P137				Bactérias com inibição baixa
	<i>Acinetobacter</i>	<i>Pseudomonas</i>				
CNE13	L39	L91	P120			Gêneros variados de inibição alta sem <i>Pseudomonas</i>
	<i>Aeromonas</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>Aeromonas</i>			
CNE14	B8	P119	P128			Intragênero de <i>Pseudomonas</i>
	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>			
CNE15	B8	P128				Intragênero de <i>Pseudomonas</i> sem P119
	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>				
CNE16	B8	C6				Bactérias de <i>A. hylaedactyla</i>
	<i>Pseudomonas</i>	<i>Serratia</i>				
CNE17	L6	L91				Bactérias de <i>L. vastus</i> _v_1
	<i>Microbacterium</i>	<i>Aeromonas</i>				
CNE18	L15	L91				Bactérias de <i>L. vastus</i> _v_2
	<i>Chryseobacterium</i>	<i>Aeromonas</i>				
CNE19	P94	P119	P120	P128	P137	Bactérias de <i>P. cuvieri</i> com P119
	<i>Acinetobacter</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>	
CNE20	P94	P120	P128	P137		Bactérias de <i>P. cuvieri</i> sem P119
	<i>Acinetobacter</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>		

Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: CNE = Consórcio de Ninhos de Espuma; v1 e v2 = Variações do consórcio com mudança de um dos morfotipos, com base no teste de compatibilidade.

5.6 Ensaio anti-Bd em meio líquido com os consórcios propostos

O ensaio foi conduzido com dias extras de leitura, conforme descrito na metodologia. Dos 18 consórcios testados, 13 apresentaram inibição moderada, 1 com inibição baixa, 1 sem efeito e 3 com facilitação. A curva de crescimento dos consórcios está detalhada na Figura 30. A Tabela 3 mostra os índices e a faixa de inibição do CNE. Os consórcios com melhores resultados no índice, combinados com a observação das curvas de crescimento, foram CNE4, CNE5, CNE12, CNE17 e CNE18.

Figura 30 – Curvas de crescimento dos CNE.



Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: CNE = Consórcio de Ninho de Espuma; CDN = Controle depletado de nutrientes.

Tabela 3 – Índices de inibição dos consórcios testados em meio líquido.

CONSÓRCIO	TAXA DE INIBIÇÃO	INTERAÇÃO COM Bd
CNE1	0,60	INIBIÇÃO MODERADA
CNE2	0,53	INIBIÇÃO MODERADA
CNE3	0,57	INIBIÇÃO MODERADA
CNE4	0,66*	INIBIÇÃO MODERADA
CNE5	0,70*	INIBIÇÃO MODERADA
CNE6	0,64	INIBIÇÃO MODERADA
CNE9	-0,19	SEM EFEITO
CNE10	0,51	INIBIÇÃO MODERADA
CNE11	0,60	INIBIÇÃO MODERADA
CNE12	0,72*	INIBIÇÃO MODERADA
CNE13	-0,33	FACILITAÇÃO
CNE14	0,52	INIBIÇÃO MODERADA
CNE15	0,59	INIBIÇÃO MODERADA
CNE16	-0,35	FACILITAÇÃO
CNE17	0,64*	INIBIÇÃO MODERADA
CNE18	0,69*	INIBIÇÃO MODERADA
CNE19	0,41	INIBIÇÃO BAIXA
CNE20	-0,53	FACILITAÇÃO

Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: CNE = Consórcios de Ninhos de Espuma; *= Consórcios com melhores resultados.

6 DISCUSSÃO

6.1 Diversidade bacteriana dos ninhos

Os morfotipos microbianos associadas aos ninhos de espuma de anuros revelam funções importantes para o hospedeiro, no que diz respeito à presença de morfotipos exclusivos e abundância de filós. Por exemplo, uma abordagem metagenômica do microbioma de ninhos de espuma de rãs do gênero *Polypedates* obtidos de Bornéu evidenciou a abundância superior em ninhos dos filós Proteobacteria (67%), Bacteroidetes (18%), Firmicutes (10%), Actinobacteria (4%), e Tenericutes (0,4%), quando comparado com amostras de microbioma de adultos e girinos (McGrath-Blaser *et al.*, 2021). Similarmente, Monteiro e colaboradores (2023b) mostraram que os ninhos de espuma de rãs da família Leptodactylidae obtidos de duas localidades no estado do Ceará, Brasil, possuem uma maior abundância de bactérias pertencentes aos filós Proteobacteria (58 a 73%), seguido de Bacteroidetes (8 a 27%), Firmicutes (7%) e Actinobacteria (6%). Monteiro *et al.* (2023) analisou através de métodos independentes de cultivo, ninhos das mesmas espécies de rãs estudados no atual estudo: *L. vastus*, *P. cuvieri* e *A. hylaedactyla*.

Da mesma forma, neste estudo, através de métodos dependentes de cultivo, o filo Proteobacteria (79%) mostrou-se o mais abundante, seguido por Bacteroidetes (10%), Firmicutes (9%) e Actinobacteria (2%).

O microbioma dos ninhos de espuma dos anuros trabalhados nesta pesquisa destaca *Pseudomonas* como o gênero mais abundante para os ninhos das espécies *L. vastus* e *P. cuvieri*, sendo um gênero amplamente associado também à microbiota cutânea desses animais (MONTEIRO *et al.*, 2023b), por outro lado, os ninhos de espécies de *A. hylaedactyla* apresentaram uma maior abundância dos gêneros *Enterobacter* (33 %) e *Bacillus* (29 %).

A diferente composição de microbiota entre os ninhos de espuma deve-se ao fato de, além de cada espécie de anuro ter uma microbiota cutânea associada às suas particularidades do ciclo de vida e condições ambientais, os locais de deposição dos ninhos de espuma diferem: *A. hylaedactyla* se utilizada de câmaras subterrâneas; *L. vastus* se reproduz em corpos d'água permanentes ou temporários e os ninhos flutuam na superfície ou se aderem a vegetação próxima e *P. cuvieri* prefere locais com abrigo e umidade suficiente, como plantas aquáticas e arbustos terrestres (ARZABE, 1999; SANTOS; AMORIM, 2005).

Vale ressaltar que a composição de gêneros encontrado no atual estudo por métodos dependentes de cultivo foi similar ao resultado obtido por Monteiro *et al.* (2023) por métodos

independentes de cultivo. Que além de *Pseudomonas*, encontrou outros gêneros com abundância acima de 10%: *Vogesella*, *Chryseobacterium*, *Chitinophaga*, *Paenibacillus*, *Comamonas*, *Paucibacter*, *Brevundimonas* and *Sphingobacterium*. No atual estudo, obtivemos representantes cultiváveis de todos os gêneros acima citados, com exceção de *Chitinophaga*, *Paenibacillus* e *Paucibacter*.

As diferenças encontradas entre o presente trabalho e o artigo citado acima deve-se ao fato de que métodos dependentes e independentes de cultivo fornecem resultados distintos, já que o primeiro conjunto está relacionado a ensaios diretos para acessar as atividades dos morfotipos coletados e o segundo baseia-se em evidências moleculares e análise de dados. Apesar das diferenças, o grupo Proteobacteria prevalece como o mais presente para os dois métodos, o que está diretamente relacionado a descrições prévias como microrganismos residentes na pele dos anfíbios (BELL, GARLAND & ALFORD, 2018; ROSS; HOFFMAN; NEUFELD, 2019).

6.2 Atividade anti-Bd dos isolados

Nos dois métodos utilizados para avaliar a atividade anti-Bd dos isolados bacterianos o resultado encontrado foi uma proporção pequena de morfotipos inibidores, 54 (29,67%) no teste em meio sólido e 29 (15,93%) no teste em meio líquido, distribuídos em gêneros pontuais.

No teste em meio sólido (avaliação qualitativa) os gêneros que apresentaram maior quantidade de inibidores do fungo foram *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Serratia*, *Aeromonas* e *Chryseobacterium*. Para o teste em meio líquido (avaliação quantitativa) foram os mesmos grupos, exceto o gênero *Bacillus*, que não apresentou morfotipos inibidores, e com a adição de *Acinetobacter* e *Microbacterium*. Por outro lado, os gêneros que apresentaram maiores índices de morfotipos facilitadores foram *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Comamonas*, *Serratia* e *Chryseobacterium*. Destes 6 gêneros, apenas os dois últimos não apresentaram atividade inibitória nos testes.

Antwis e colaboradores (2015) realizaram pesquisa com 56 morfotipos isolados de duas espécies de anuros do mesmo gênero e encontraram 15 inibidores do fungo através do teste em meio sólido. Em sua discussão, ressaltaram que o método de quantificação da inibição de Bd utilizando placas de 96 poços é mais preciso na quantificação de inibição do que o ensaio em ágar, porém não permite inferências sobre a competição direta (por espaço, recursos, etc.) que poderiam ocorrer entre o Bd e a bactéria *in vitro*, simulando a realidade na pele do anfíbio.

A metodologia utilizada remonta dos trabalhos de Harris e colaboradores (2006) e Flechas e colaboradores (2012).

Bell e colaboradores (2013) apresentaram o ensaio de quantificação da inibição do Bd através de ensaio de espectrofotometria, destacando a criação de um método semi-quantitativo dessa inibição baseado não em contato direto bactéria-fungo, mas sim com o teste de sobrenadantes bacterianos livres de células, ricos em metabólitos e outros produtos oriundos do crescimento microbiano no meio de cultura. A vantagem dessa técnica seria eliminar interpretações subjetivas da formação ou não de halos na placa de Petri, permitindo que o ensaio fosse executado de forma mais controlada.

O método foi modificado em alguns trabalhos posteriores, introduzindo-se testar o sobrenadante dos produtos bacterianos produzidos na presença do fungo, ou seja, o co-cultivo entre morfotipos teste e o patógeno Bd (BECKER *et al.*, 2015; BLETZ *et al.*, 2017; REBOLLAR *et al.*, 2020). Foi a partir dessas modificações que o presente trabalho realizou a detecção de atividade anti-Bd em meio líquido.

A diferença de execução entre esses três testes pode gerar uma variabilidade dos resultados para um mesmo morfotipos, baseados na relação doença-hospedeiro-patógeno-ambiente (BERNARDO-CRAVO *et al.*, 2020) uma vez que: i) no ensaio em ágar, o inóculo bacteriano é colocado para crescer simultaneamente ao fungo, baseado no crescimento mais rápido da bactéria e difusão de metabólitos no ágar; ii) no ensaio apenas com o sobrenadante da bactéria, faz-se o teste apenas dos produtos e metabólitos produzidos a partir da reprodução do microrganismos que ficam dissolvidos no ágar; iii) no ensaio com o sobrenadante do co-cultivo as substâncias bacterianas podem ser metabolizadas pelo fungo durante o crescimento ou sofrer alguma alteração química devido a interação com substâncias produzidas pelo patógeno, fazendo com que a composição do sobrenadante do isolado seja diferente do sobrenadante do co-cultivo do fungo com essa mesma amostra (JANI; BRIGGS, 2014).

Além da diferença de resultados para um mesmo isolado através de diferentes tipos de ensaio, pode ser observado que dentre um mesmo grupo bacteriano (Família ou Gênero), não há uma padronização entre microrganismos inibidores e facilitadores para o crescimento do Bd. Podendo ocorrer variação intergênero (entre gêneros de uma mesma família taxonômica) ou intragênero (entre espécies de um mesmo gênero) (BECKER *et al.*, 2015).

O gênero *Pseudomonas* foi o mais abundante na relação de diversidade dos ninhos de espuma de *L. vastus* e *P. cuvieri*, sendo também o gênero mais significativo nos índices de facilitação e inibição, numa proporção de inibidor:facilitador de 1:1,7 (15 inibidores e 26 facilitadores). *Bacillus* e *Enterobacter* apresentaram apenas morfotipos facilitadores.

Diferentes trabalhos têm mostrado que as bactérias do grupo *Pseudomonas* apresentam-se com potencial anti-Bd (BRESCIANO *et al.*, 2015; BURKART *et al.*, 2017; JIMÉNEZ *et al.*, 2019; NAVA-GONZÁLEZ *et al.*, 2021), normalmente associadas à microbiota cutânea de diferentes espécies de anuros, em variados locais do planeta, mostrando a ubiquidade desses organismos e a importância que o grupo tem na relação quitridiomicoso-anuro.

O conhecimento sobre microrganismos com potencial anti-Bd oriundos de anfíbios, sejam da microbiota cutânea, oral ou associada aos estágios iniciais de desenvolvimento do animal, é essencial para elaboração de estratégias de conservação desses animais.

Os probióticos tem surgido como alternativa para a inoculação de microrganismos anti-Bd em animais ou ambientes como estratégia de prevenção e combate à quitridiomicoso, baseando-se na aplicação de microrganismos isolados ou consórcios microbianos diretamente nos animais ou no ambiente em que eles vivem (BECKER *et al.*, 2011; MULETZ *et al.*, 2012; McKENZIE; KUENEMAN; HARRIS, 2020).

A produção de um probiótico totalmente efetivo contra a quitridiomicoso apresenta uma série de desafios, pois a doença é complexa e a interação entre o fungo causador da doença e os anfíbios hospedeiros é influenciada por diversos fatores, como o ambiente, a genética do hospedeiro, a virulência do fungo e a composição da microbiota associada ao animal, tudo isso tendo contribuído para diferentes formas de coevolução entre o patógeno e os hospedeiros (KRIGER; HERO, 2007; SEARLE *et al.*, 2011; TALLEY *et al.*, 2012).

Alguns dos desafios na produção de um probiótico efetivo incluem a seleção de uma ou mais cepas adequadas; a capacidade de sobrevivência nos microrganismos frente a peptídeos microbianos naturais dos animais e, conseqüentemente, seu potencial colonizador no organismo inoculado e coexistência com a microbiota residente; resistência ao Bd e capacidade inibitória contra o fungo; garantia de que o probiótico não cause efeitos adversos nos anfíbios hospedeiros ou interações indesejadas com outros microrganismos benéficos presentes na microbiota natural (ANTWIS *et al.*, 2015; ANTWIS; HARRISON, 2018; HARRISON *et al.*, 2020).

Diante dessa perspectiva, os microrganismos avaliados no presente trabalho apresentam-se como bons candidatos para a proposição de consórcios microbianos para atuarem como probióticos no combate à quitridiomicoso, inovando na perspectiva de utilizar bactérias do ninho de espuma, associado aos estágios iniciais de vida dos anuros, unido duas hipóteses debatidas na literatura recente: o nidobioma (CAMPOS-CERDA; BOHANNAN, 2020) e o probiótico-chave (BLETZ *et al.*, 2013).

6.3 Consórcios microbianos dos ninhos de espuma

Ao elaborar consórcios microbianos é necessário levar em conta a compatibilidade metabólica e físico-química; a estabilidade do crescimento conjunto ao longo do tempo; a diversidade biológica e a redundância funcional dos microrganismos, avaliando ainda qual será o objetivo final (aplicação) dessa combinação. A utilização de consórcios como probióticos deve considerar a promoção de benefícios para a saúde do hospedeiro ou do ambiente em que ele será inoculado (HILL *et al.*, 2014).

Os consórcios microbianos propostos aqui foram constituídos unicamente por microrganismos que apresentaram alguma atividade inibitória contra o Bd, seja baixa, alta ou moderada. Os critérios de escolha basearam-se na variação de taxas de inibição entre morfotipos do mesmo gênero ou de gêneros diferentes, mas filogeneticamente próximos (pertencentes a uma mesma família). Ao trabalhar com corais, por exemplos, alguns trabalhos tem mostrado que as combinações para elaboração de consórcios devem levar em conta critérios preestabelecidos, como eficácia, abundância amostral, diversidade, entre outros fatores, para compor as amostras a serem testadas (PEIXOTO *et al.*, 2017; VOOLSTRA *et al.*, 2021), sempre destacando que o objetivo final é obter a combinação mais efetiva na ação biológica que se busca e a segurança ambiental e do hospedeiro.

Apesar de que todos os consórcios testados foram resultados de combinação de bactérias com algum grau de inibição do Bd, dos 18 consórcios testados, apenas 14 apresentaram inibição, um não apresentou nenhum efeito (CNE9) e três agiram como facilitadores (CNE13, CNE16, CNE20). A combinação do Bd com os consórcios (inóculos mistos) pode ter provocado alterações na ação dos microrganismos por diferentes motivos.

Algumas cepas bacterianas podem apresentar atividade anti-Bd apenas mediante um determinado *quorum sensing*, ou seja, uma densidade populacional definida (ASSIS, 2011). Considerando que a alíquota das bactérias para a composição do consórcio foi feita em condições proporcionalmente iguais (mesmo volume e mesma faixa de densidade óptica), deve-se levar em conta que os microrganismos apresentam uma curva de crescimento com velocidades diferentes.

Além disso, apesar de algumas cepas apresentarem sinergia no teste de compatibilidade em placa (*cross streak*), o teste leva em conta a presença de maior concentração de metabólitos do microrganismo na estria central, enquanto que na composição de consórcios com duas ou mais cepas, a composição química dos produtos metabólicos irá variar em

concentração e composição, devido a um fenômeno denominado de *cross feeding* (alimentação cruzada). Este fator é uma das estratégias de elaboração de consórcios microbianos sintéticos, pois numa comunidade bacteriana uma cepa pode fabricar produtos essenciais para outro, porém, apresenta desvantagens porque as bactérias ainda podem acabar competindo entre si por algum recurso do meio (LIANG; MA; ZHUANG, 2022).

Os cinco consórcios com maiores taxas de inibição foram CNE4, CNE5, CNE12, CNE17 e CNE18, apresentando índices na faixa de inibição moderada, enquanto que algumas bactérias isoladas apresentaram inibição alta. Estes consórcios são compostos por combinações de 2 a 5 bactérias dos gêneros *Aeromonas* (L91), *Acinetobacter* (P94), *Chryseobacterium* (L15), *Microbacterium* (L6), *Pseudomonas* (P137) e *Serratia* (C6). O mais interessante de destacar é que o CNE12 apresentou a maior taxa de inibição dentre os consórcios (0,72) e é formado por apenas duas bactérias, *Acinetobacter* P94 e *Pseudomonas* P137, que apresentaram índices de inibição baixa como isolados, respectivamente 0,31 e 0,27.

Outros consórcios que se destacaram quanto a taxa de inibição foram os consórcios CNE4, CNE5, CNE17 e CNE18, que são consórcios compostos por combinações de bactérias de diferentes gêneros, todos amplamente relatados como comumente presentes em ninhos de espuma e pele de anfíbios. Dessa forma, nesse estudo desenvolvemos 5 consórcios diferentes com potencial de aplicação de probióticos, seja em ninhos de espuma seja em pele de anfíbios.

Antwis e Harrison (2018) testaram isolados e consórcios microbianos de gênero único e multigênero, obtendo maiores scores de inibição do Bd naqueles de grupos variados. Diferentes formas do patógeno Bd encontrado na vida selvagem podem variar em sua suscetibilidade a bactérias probióticas, ou seja, não se pode esperar que a eficácia probiótica seja a mesma em todas as variantes genéticas ou características do fungo, no entanto, ter uma maior diversidade de consórcios probióticos, tanto em termos de quantidade quanto de linhagens, pode oferecer uma proteção mais eficaz contra o patógeno do que o uso de bactérias isoladas. Essa afirmativa foi corroborada ainda em outros trabalhos desse grupo de pesquisa (HARRISON *et al.*, 2020).

A cepa de *Pseudomonas* P119 foi o isolado com maior taxa inibitória dentre os 182 testados (1,0), mas os consórcios em que estava inserida não estiveram entre os melhores resultados (CNE14, taxa de inibição 0,52; CNE19, taxa de inibição 0,41). O CNE14 é um consórcio de gênero único com três bactérias do gênero *Pseudomonas*, enquanto CNE19 é um consórcio multigênero que engloba *Acinetobacter*, *Aeromonas* e *Pseudomonas*.

Para entender de maneira mais efetiva como a ação dos isolados é modificada quando combinados num consórcio microbiano, seriam necessários estudos mais aprofundados

sobre a curva de crescimento de cada uma das bactérias, para estabelecer uma densidade populacional equivalente de cada cepa com atividade anti-Bd; além de identificação dos metabólitos produzidos por cada bactéria e de que forma eles poderiam interagir no co-cultivo, tanto entre as bactérias como com o Bd.

6.4 Perspectivas sobre as bactérias de ninhos de espuma como probióticos

O Brasil é o país com maior diversidade de anuros, entretanto possui poucos estudos relacionados à contenção da quitridiomiose, doença emergente apontada como a principal causa de declínio desse grupo. Os principais estudos realizados no Brasil nesse tema, estão voltados para o monitoramento de Bd, principalmente na Mata Atlântica (TOLEDO *et al.*, 2023).

Nosso grupo de pesquisa fez monitoramento no estado mostrou a presença no Bd no Ceará, no município de Campos Sales, na Chapada do Araripe inclusive em espécies produtoras de ninhos de espuma como *Physalaemus cuvieri* (MENDES, 2021). Até o presente momento não foram encontrados trabalhos do Brasil que tenham testado a atividade anti-Bd de bactérias, mas é comum que sejam estudadas as secreções da pele dos anuros e seus peptídeos. O presente trabalho traz uma abordagem ainda mais diferente por utilizar como fonte de microrganismos os ninhos de espuma, estruturas associadas ao desenvolvimento das primeiras fases de vida dos anuros.

Com um foco diferente do monitoramento, nosso grupo mostrou ainda que ninhos de espuma atuam como um ambiente facilitador para o crescimento do Bd. Bezerra (2021) testou os ninhos de espuma das espécies *Adenomera hylaedactyla*, *Leptodactylus macrosternum*, *L. podicipinus*, *L. vastus*, *Physalaemus albifrons* e *Physalaemus macrosternum*, mostrando que os ninhos de espuma possuem carboidratos e proteínas que são utilizados pelo Bd para crescimento. Entretanto, este mesmo trabalho testou os ninhos estéreis, não avaliando se a comunidade presente nos ninhos de espuma pode interferir nesse crescimento. Dessa forma, nosso estudo foi motivado pensando-se num cenário de contaminação dos ninhos de espuma pelo Bd e no desenvolvimento de um probiótico que possa colonizar a pele dos girinos e atuar contra o Bd desde a fase de prole.

A ideia proposta a partir disso seria a pesquisa de um probiótico anti-Bd que fosse inoculado nos ninhos de espuma através da técnica de bioaugmentação (MULETZ *et al.*, 2012), levando em consideração a relação de infecção do Bd nos diferentes estágios de vida dos anfíbios (GARNER *et al.*, 2009) e a possibilidade de transferência da microbiota dos ninhos de

espuma para os girinos e posteriormente para as fases pós-metamorfose (BRESCIANO *et al.*, 2015; ROSS; HOFFMAN; NEUFEULD, 2019). Através desse procedimento, a expectativa seria a colonização da pele dos anfíbios por bactérias anti-Bd oriundas do inóculo do ninho, em combinação com os microrganismos nativos da microbiota do animal, agindo de maneira preventiva e como possível tratamento para a infecção por quitridiomicose.

A eficácia da aplicação do probiótico poderia induzir a uma imunidade de rebanho, relacionando a proporção de indivíduos com bactérias anti-Bd e a coexistência com o fungo, ou seja, uma parte de determinada população deveria possuir bactérias que auxiliassem no combate e prevenção da doença para proteger todo o grupo (estima-se que cerca de 80% dos indivíduos), dessa forma uma população com uma grande proporção de indivíduos com bactérias protetoras controlaria a sobrevivência e reprodução do Bd, evitando um foco de epidemia (LAM *et al.*, 2010).

Uma menor carga de infecção por Bd em populações de rãs selvagens está correlacionada com a ocorrência de um maior número cepas de diferentes gêneros inibidores do fungo, ressaltando a importância de buscar combinações de múltiplos isolados, promovendo potencial sinergia, ao testar candidatos a probiótico ambientais, para que além de combater o patógeno, haja colonização da pele e convivência harmoniosa com a microbiota natural dos animais (BECKER *et al.*, 2015; ANTIWIS; HARRISON, 2018; BELL; GARLAND; ALFORD, 2018).

Diante disso, a proposição desta pesquisa de um consórcio multigênero como agente probiótico anti-Bd pode se sobressair a aplicações potencialmente falhas de isolados específicos (BECKER *et al.*, 2011; BECKER *et al.*, 2021), pois possuem uma diversidade de espécies bacterianas, o que pode melhorar a capacidade de combater a doença, uma vez que diferentes bactérias possuem mecanismos de ação distintos contra o Bd, tornando pouco provável que o fungo desenvolva resistência simultânea a todos esses mecanismos, e ainda podem auxiliar no processo de restabelecer o equilíbrio microbiano de anuros afetados pela doença, partindo da técnica de bioaugmentação (MULETZ *et al.*, 2012) e com as características de um probiótico-chave (BLETZ *et al.*, 2013).

Nesse estudo desenvolvemos 18 consórcios diferentes, dos quais 5 se destacaram com potencial de aplicação de probióticos contra a quitridiomicose, visando uma aplicação seja em ninhos de espuma seja em pele de anfíbios. Como passo seguinte, sugerimos a realização de testes de segurança ambiental dessas cepas e testes de validação em ninhos de espuma da eficiência desses consórcios.

7 CONCLUSÕES

Os ninhos de espuma das rãs *Adenomera hylaedactyla*, *Leptodactylus vastus* e *Physalaemus cuvieri* apresentaram uma prevalência de bactérias anti-Bd que variou entre 10 e 22%, compreendendo 29 isolados com atividade anti-Bd em meio líquido e 54 isolados em meio sólido, sendo a cepa de *Pseudomonas* P119 a que apresentou maior índice de inibição. Cinco consórcios (CNE4, CNE5, CNE12, CNE17 e CNE18) se destacaram quanto à sua atividade anti-Bd, sendo compostos por bactérias pertencentes a gêneros já relados como bons inibidores do Bd: *Aeromonas* (L91), *Acinetobacter* (P94), *Chryseobacterium* (L15), *Microbacterium* (L6), *Pseudomonas* (P137) e *Serratia* (C6). Os consórcios microbianos testados apresentam-se como potencial candidatos para um modelo de probiótico.

O presente trabalho traz em sua perspectiva uma nova fonte de bioprospecção microbiana, os ninhos de espuma dos anuros, colocando-os em destaque na possibilidade de enfrentamento contra a quitridiomiose. A partir deste trabalho, novas ideias podem surgir dentro da ideia de conservação ambiental e uso da biodiversidade.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, D. A. *et al.* Antibacterial activity of the skin secretion of *Phyllomedusa azurea* (Anura: Hylidae) from the Central Brazil Cerrado. **Revista de Biología Tropical**, v. 67, n. 1, p. 1-10, 2019.
- ANTWIS, R. E. *et al.* Amphibian symbiotic bacteria do not show universal ability to inhibit growth of the global pandemic lineage of *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 11, p. 3706-3711, 2015.
- ANTWIS, R. E.; HARRISON, X. A. Probiotic consortia are not uniformly effective Against diferente amphibian chytrid pathogen isolates. **Molecular Ecology**, v. 27, p. 577-589, 2018.
- ARZABE, C. Reproductive activity patterns of anurans in two different altitudinal sites within the Brazilian Caatinga. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 16, n. 3, p. 851-854, 1999.
- ASSIS, A. B. **Análise sobre a microbiota cutânea de anfíbios em fragmentos de Floresta Atlântica e sua eficácia contra agentes patogênicos**. 2011. 103 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- BECKER *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, 2015.
- BECKER, C. G. *et al.* Historical dynamics of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Amazonia. **Ecography**, v. 39, p. 954-960, 2016.
- 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, 2011.
- BECKER, M. H. *et al.* Genetically modifying skin microbe to produce violacein and augmenting microbiome did not defend Panamanian golden frogs from disease. **ISEM Communications**, v. 1, n. 57, p. 1-10, 2021.
- BELL, S. C. *et al.* Screening bacterial metabolites for inhibitory effects against *Batrachochytrium dendrobatidis* using a spectrophotometric assay. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 103, p. 77-85, 2013.
- BELL, S. C.; GARLAND, S.; ALFORD, R. A. Increased Numbers of Culturable Inhibitory Bacterial Taxa May Mitigate the Effects of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Australian Wet Tropics Frogs. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 1604, p. 1-14, 2018.
- BERGER, L. *et al.* Life cycle stages of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Diseases of aquatic organisms**, v. 68, p. 51-63, 2005a.
- BERGER, L. *et al.* Virulence of the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* varies with the strain. **Diseases of aquatic organisms**, v. 68, p. 47-50, 2005b.

BERGER, L.; SPEARE, R. Chytridiomycosis: A new disease of wild and captive amphibians. **ANZCCART News**, v. 11, n. 4, p. 1-3, 1998.

BERNARDO-CRAVO, A. P. *et al.* Environmental factors and host microbiomes shape host-pathogen dynamics. **Trends in Parasitology**, v. 36, n. 7, p. 616-633, 2020.

BEZERRA, S. G. S. **Ação de Ninhos de Espuma de Anuros e da sua Microbiota Associada na Quitridiomycose**. 2021. 71 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Recursos Naturais) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2021.

BLAUSTEIN, A. R.; DOBSON, A. A message from the frogs. **Nature**, v. 439, n. 12, p. 142-144, 2006.

BLAUSTEIN, A.R. Chicken Little or Nero's fiddle? A perspective on declining amphibian populations. **Herpetologica**, v. 50, n. 1, p. 85-97, 1994.

BLETZ, M. C. *et al.* Mitigating amphibian chytridiomycosis with bioaugmentation: characteristics of effective probiotics and strategies for their selection and use. **Ecology Letters**, v. 16, p. 807-820, 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, n. 1751, p. 1-12, 2017.

BRESCIANO, J. C. *et al.* Variation in the Presence of Anti-*Batrachochytrium dendrobatidis* Bacteria of Amphibianns Across Life Stages and Elevations in Ecuador. **EcoHealth**, v. 12, n. 2, p. 310-319, 2015.

BOLOCHIO, B. E. *et al.* A functional perspective for global amphibian conservation. **Biological Conservation**, v. 245, n. April, p. 1-9, 2020.

BORZÉE, A., *et al.* Using the 2020 global pandemic as a springboard to highlight the need for amphibian conservation in eastern Asia. **Biological Conservation**, v. 255, p. 1-10, 2020.

BURKART, D. *et al.* Cutaneous bacteria, but not peptides, are associated with chytridiomycosis resistance in Peruvian marsupial frogs. **Animal Conservation**, v. 20, n. 6, p. p 483-491.

CABRAL, M. E. S. **Identificação química, análise microbiológica e farmacológica das gorduras corporais de *Leptodactylus macrosternum* (Miranda-Ribeiro, 1926) e *Leptodactylus vastus* (Adolf Lutz, 1930) da região do Cariri**. 2012. 109 f. Dissertação (Mestrado em Bioprospecção Molecular) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Regional do Cariri, Crato, 2012.

CAMPBELL, C. R. Frog skin epithelium: Electrolyte transport and chytridiomycosis. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 44, p. 431-434, 2012.

- CAMPOS-CERDA, F.; BOHANNAN, B. J. M. The Nidobiome: A framework for understanding microbiome assembly in neonates. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 35, n. 7, p. 573-582, 2020.
- CARNAVAL, A.C.O.Q. *et al.* Chytrid fungus infects stream-dwelling *Hylodes magalhaesi* (Leptodactylidae) in the Brazilian Atlantic rainforest. **Froglog**, v. 70, n. 3, p. 1-4, 2005.
- CASTRO, D. P. **Composição, distribuição estacional e uso de habitats em uma Assembleia de anuros de afloramentos rochosos do semiárido brasileiro**. 2012. 98 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) – Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.
- CASTRO, L. G. Z. **Prospecção de microrganismos isolados de ninho de espuma de *Leptodactylus vastus* e *Physalaemus cuvieri* com potencial biotecnológico**. 2019. 51 f. Monografia (Graduação em Biotecnologia) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.
- CHATFIELD, M. W. H.; RICHARDS-ZAWACKI, C. L. Elevated temperature as a treatment for *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in captive frogs. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 94, p. 235-238, 2011.
- COOPER, A. *et al.* Frog foams and natural protein surfactants. **Collodis and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 534, p. 120-129, 2017.
- COOPER, A.; KENNEDY, M. W. Biofoams and natural protein surfactants. **Biophysical Chemistry**, v. 151, n. 3, p. 96–104, 2010.
- DALGETTY, L.; KENNEDY, M. W. Building a home from tungara frog foam nest architecture and three-phase construction process. **Biology letters**, v. 6, n. 3, p. 293-296, 2010.
- DUELLEMAN, W. E. Alternative life-history styles in anuran amphibians: evolutionary and ecological implications. *In*: BRUTON, M. N. (Eds.) **Alternative Life-History Styles of Animals**. Perspectives in vertebrate science, vol. 6. Dordrecht: Springer, 1989.
- FERNANDEZ L. *et al.* Adaptation to environmental factors shapes the organization of regulatory regions in microbial communities. **BMC Genomics**, v. 15, n. 877, p. 1-12, 2014.
- FISHER, M. C.; GARNER, T. W. J. The relationship between the emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the international trade in amphibians and introduced amphibian species. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, n. 1, p. 2-9, 2007.
- FISHER, M. C.; GARNER, T. W. J.; WALKER, S. F. Global Emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and Amphibian Chytridiomycosis in Space, Time and Host. **Annual Review Microbiology**, v. 63, p. 291-310, 2009.
- 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. 1-7, 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, 2009.

FROST, D. R. **Anura**. 2021. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.1. American Museum of Natural History, New York, United States of America. Disponível em: <https://amphibiansoftheworld.amnh.org>. Acesso em: 28 dez. 2021.

FROST, D. R. **Leptodactylidae**. 2021. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.1. American Museum of Natural History, New York, United States of America. Disponível em: <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/Amphibia/Anura/Leptodactylidae>. Acesso em: 11 mai. 2021.

GALLARDO, J. M. Importancia de la conservación de las faunas de anfibios y reptiles. **Acta Zoologica Lilloana**, Tucumán, v. 34, p. 101-106.

GARMYN, A. *et al.* Waterfowl: Potential Environmental Reservoirs of the Chytrid Fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. 1-5, 2012.

GARNER, T. W. J. *et al.* Life history tradeoffs influence mortality associated with the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Oikos**, v. 118, p. 783-791, 2009.

GARNER, T. W. J. *et al.* Mitigating amphibian chytridiomycosis in nature. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 371, p. 1-9, 2016.

GASCON, C. *et al.* (Eds.). **Amphibian Conservation Action Plan**. IUCN/SSC Amphibian Specialist Group. 1 ed. Gland: The World Conservation Union (IUCN), 2007. 64 p.

GOULD, J. Safety Bubbles: A review of the proposed functions of froth nesting among Anuran Amphibians. **Ecologies**, v. 2, p. 112-137, 2021.

GRANT, E. H. C. *et al.* Identifying management-relevant research priorities for responding to disease-associated amphibian declines. **Global Ecology and Conservation**, v. 16, p. 1-9, 2018.

HADDAD, C. F. B.; PRADO, C. P. A. Reproductive Modes in Frogs and Their Unexpected Diversity in the Atlantic Forest of Brazil. **BioScience**, v. 55, n. 3, p. 207-217, 2005.

HARRIS, R. N. *et al.* Amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* is inhibited by the cutaneous bacteria of Amphibian species. **EcoHealth**, v. 3, p. 53-56, 2006.

HARRISON, X. A. *et al.* Designing probiotic therapies with broad-spectrum activity against a wildlife pathogen. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 3134, p. 1-11, 2020.

HILL *et al.* The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic, **Nature Reviews: Gastroenterology & Hepatology**, v. 11, p. 506-514, 2014.

HISSA, D. C. *et al.* Frog Foam Nest Protein Diversity and Synthesis. **Journal of Experimental Zoology Part A – Ecological Genetics and Physiology**, v. 325, p. 425-433, 2016.

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, 2008.

HISSA, D. C. *et al.* Unique Crystal Structure of a Novel Surfactant Protein from the Foam Nest of the Frog *Leptodactyllus vastus*. **ChemBioChem**, v. 15, p. 393-398, 2014.

HYATT, A. D. *et al.* Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 73, p. 175-192, 2007.

JANI, A. J.; BRIGGS, C. J. The pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* disturbs the frog skin microbiome during a natural epidemic and experimental infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 47, p. E5049-E5058, 2014.

JIMÉNEZ, R. R. *et al.* Moving Beyond the Host: Unraveling the Skin Microbiome of Endangered Costa Rican Amphibians. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 2060, p. 1-18, 2019.

JOHNSON, M. L. *et al.* Fungicidal effects of chemical disinfectants, UV light, desiccation and heat on the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 57, p. 255-260, 2003.

JOHNSON, M. L.; SPEARE, R. Possible modes of dissemination of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* in the environment. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 65, p. 181-186, 2005.

JOHNSON, M. L.; SPEARE, R. Survival of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Water: Quarantine and Disease Control Implications. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 8, p. 922-925, 2003.

KOSKELLA, B.; VOS, M. Adaptation in Natural Microbial Populations. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v. 46, p. 503-522, 2015.

KRIGER, K. M.; HERO, J. The chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* is non-randomly distributed across amphibian breeding habitats. **Diversity and Distributions**, v. 13, p. 781-788, 2007.

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

LAMBERTINI, C. *et al.* Local phenotypic variation in amphibian-killing fungus predicts infection dynamics. **Fungal Ecology**, v. 20, p. 15-21, 2016.

- LIANG, Y.; MA, A.; ZHUANG, G. Construction of Environmental Synthetic Microbial Consortia: Based on Engineering and Ecological Principles. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, n. 829717, p. 1-16, 2022.
- LINDAUER, A. *et al.* Quantifying *Batrachochytrium dendrobatidis* and *Batrachochytrium salamandrivorans* Viability. **EcoHealth**, v. 16, p. 346-350, 2019.
- LONGCORE, J. E.; PESSIER, A. P.; NICHOLS, D. K. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. **Mycologia**, v. 91, n. 2, p. 219-227, 1999.
- MARTEL *et al.* *Batrachochytrium salamandrivorans* sp. nov. causes lethal chytridiomycosis in amphibians. **PNAS**, v. 110, n. 38, p. 15325-15329, 2013.
- MARTIN, R.; LANGELLA, P. Emerging Health Concepts in the Probiotics Field: Streamlining the Definitions. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 1047, p. 1-5, 2019.
- MARTINS, D. V. **Estudo da composição e das atividades biológicas dos microrganismos isolados do ninho de espuma do anuro *Adenomera hylaedactyla***. 2020. 58 p. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 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. 83, n. 3, p. 1-15, 2021.
- McKENZIE, V. J.; KUENEMAN, J. G.; HARRIS, R. N. Probiotics as a tool for disease mitigation in wildlife: insights from food production and medicine. **Annal of The New York Academy of Sciences**, v. 1429, n. 1, p. 18-30, 2018.
- MENDES, M. S. **Detecção do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* em anuros no estado do Ceará, Brasil**. 2021. 58 f. Dissertação (Mestrado em Sistemática, Uso e Conservação da Biodiversidade) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2021.
- MONTEIRO, F. A. C. **Diversidade taxonômica do microbioma de ninhos de espuma de sapos Leptodactídeos, sua importância e potencial biotecnológico**. 2023. 89 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2023a.
- MONTEIRO, F. A. C. *et al.* Neotropical Frogs Foam Nest's Microbiomes. **Microorganisms**, v. 11, n. 900, p. 1-17, 2023b.
- MULETZ, C. R. *et al.* Soil bioaugmentation with amphibian cutaneous bacteria protects amphibian hosts from infection by *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Biological Conservation**, v. 152, p. 119-126, 2012.
- NASCIMENTO, L. B. *et al.* (2009). Anfíbios - biota minas. *In*: DRUMMOND, M. G. *et al.* (Eds.). **Diagnóstico do Conhecimento sobre a Biodiversidade no Estado de Minas Gerais - Subsídio ao Programa BIOTA MINAS**. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 2009, p. 221-327.

NAVA-GONZÁLEZ, B. *et al.* Inhibition of *Batrachochytrium dendrobatidis* Infection by Skin Bacterial Communities in Wild Amphibian Populations. **Environmental Microbiology**, v. 82, n. 3, p. 666-676, 2021.

OLIVEIRA, I. S. D. E. **Conhecimento ecológico local sobre espécies de anfíbios anuros e biocontrole de insetos pragas em sistemas agrícolas de região semiárida brasileira: subsídios à etnoconservação.** 2016. 108 p. Tese (Doutorado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) – Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2016.

PAZINATO, D. M. M. **Estudo etnoherpetológico: conhecimentos populares sobre anfíbios e répteis no município de Caçapava do Sul, Rio Grande do Sul.** 2013. 65 p. Monografia (Especialização em Educação Ambiental) – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa maria, 2013.

PEIXOTO, R. S. *et al.* Beneficial Microorganisms for Corals (BMC): Proposed Mechanisms for Coral Health and Resilience. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 341, p. 1-16, 2017.

PIOTROWSKI, J. S.; ANNIS, S. L.; LONGCORE, J. E. Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. **Mycologia**, v. 96, n. 1, p. 9-15, 2004.

POUNDS, J. A. *et al.* Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. **Nature**, v. 439, n. 12, p. 161-167, 2006.

RACHOWICZ, L. J.; VREDENBURG, V. T. Transmission of *Batrachochytrium dendrobatidis* within and between amphibian life stages. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 61, p. 75-83, 2004.

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, n. Feb, p. 1–19, 2016.

REBOLLAR, E. A.; MARTÍNEZ-UGALDE, E.; ORTA, A. H. The Amphibian Skin Microbiome and Its Protective Role Against Chytridiomycosis. **Herpetologica**, v. 76, n. 2, p. 167-177, 2020.

ROLLINS-SMITH, L. A. *et al.* Activity of antimicrobial skin peptides from ranid frogs against *Batrachochytrium dendrobatidis*, the chytrid fungus associated with global amphibian declines. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 26, p. 471-479, 2002.

ROLLINS-SMITH, L. A. *et al.* Antimicrobial peptide defenses of the mountain yellow-legged frog (*Rana mucosa*). **Developmental & Comparative Immunology**, v. 30, p. 831-842, 2006.

ROSS, A. A.; HOFFMAN, A. R.; NEUFELD, J. D. The skin microbiome of vertebrates. **Microbiome**, v. 7, n. 79, p. 1-14, 2019.

ROSSA-FERES, D. D. C. *et al.* Anfíbios do Estado de São Paulo, Brasil : conhecimento atual e perspectivas Introdução. **Biota Neotropica**, v. 11, supl. 1, p. 47-66, 2011.

SANTI, E. L. L. M.; CORRÊA, A. C. Mata Atlântica : A Sobrevivência dos Anfíbios, **FESPPR Publica**, v. 2, n. 3, p. 1–12, 2018.

SANTOS, E. M.; AMORIM, F. O. Modo reprodutivo de *Leptodactylus natalensis* Lutz, 1930 (Amphibia, Anura, Leptodactylidade). **Revista Brasileira de Zoociências**, Juiz de Fora, v. 7, n. 1, p. 39-45, 2005.

SCHEELE, B. C. *et al.* Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity. **Science**, v. 1463, n. March, p. 1459–1463, 2020.

SEARLE, C. L. *et al.* Differential Host Susceptibility to *Batrachochytrium dendrobatidis*, an Emerging Amphibian Pathogen. **Conservation Biology**, v. 25, n. 5, p. 965-974, 2011.

SEGALLA, M. V. *et al.* Lista de espécies brasileiras. **Herpetologia Brasileira**, v. 8, n. 1, p. 65-96, 2019.

SEGALLA, M. V. *et al.* Lista de espécies brasileiras. **Herpetologia Brasileira**, v. 10, n. 1, p. 121-216, 2021.

SHARMA, S. C. D. *et al.* Antibacterial and cytotoxic activity of *Bacillus methylotrophicus*-SCS2012 Isolated from Soil. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 2, n. 4, p. 2293-2307, 2013.

SILVA, A. F. D. *et al.* Taxonomic bias in amphibian research: Are researchers responding to conservation need? **Journal for Nature Conservation**, v. 56, p. 1-7, 2020.

SOARES, J. B.; CASIMIRO, A. R. S.; AGUIAR, L. M. **Microbiologia básica**. Fortaleza: UFC, 1987. 175 p.

SPITZEN - VAN DER SLUIJS, A. S., & ZOLLINGER, R. Literature review on *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Reptielen Amfibieën Vissen Onderzoek Nederland, RAVON**, v. 30, p. 1–37, 2010.

STUART, S. N. *et al.* Status and Trends of Amphibian Declines and Extinctions Worldwide. **Science**, v. 306, p. 1783-1786, 2004.

TALLEY, B. L. *et al.* A century of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Illinois amphibians (1888–1989). **Biological Conservation**, v. 182, p. 254-261, 2015.

TOGNA, G. D. *et al.* Evaluating amphibian biobanking and reproduction for captive breeding programs according to the Amphibian Conservation Action Plan objectives. **Theriogenology**, v. 150, p. 412–431, 2020.

TOLEDO, L. F. *et al.* The occurrence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazil and the inclusion of 17 new cases of infection. **South American Journal of Herpetology**, v. 1, p. 185-191, 2006.

TOLEDO *et al.* A retrospective overview of amphibian declines in Brazil's Atlantic Forest. **Biological Conservation**, v. 277, n. 109845, p. 1-17, 2023.

VASABHAI, R. D. **Isolation of antimicrobial Actinomycetes from the soil surrounding diferente medicinal plants of Saurashtra and characterization of antimicrobial compounds therefrom.** 2019. 306 p. Tese (Doutorado em Farmácia) – Faculty of Pharmacy – RK University, Rajkot, 2019.

VASCONCELOS, T. S. *et al.* South American Anurans: Species Diversity and Description Trends Through Time and Space. *In: _____*. **Biogeographic Patterns of South American Anurans.** Ebook. Cham: Springer, 2019. Ch. 2, p. 9-84.

VIEIRA, C. A.; TOLEDO, L. F. Isolamento, cultivo e armazenamento do fungo quitrídio: *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Herpetologia Brasileira**, v. 1, n. 1, p. 18-19, 2012.

VIEIRA, W. L. S.; SANTANA, G. G.; ARZABE, C. Diversity of reproductive modes in anurans communities in the Caatinga (dryland) of northeastern Brazil. **Biodiversity and Conservation**, v. 18, p. 55-66, 2009.

VOOLSTRA, C. R. *et al.* Extending the natural adaptive capacity of coral holobionts. **Nature Reviews – Earth & Environment**, v. 2, p. 747-762, 2021.

VOYLES, J.; ROSENBLUM, E. B.; BERGER, L. Interactions between *Batrachochytrium dendrobatidis* and its amphibian hosts: a review of pathogenesis and immunity. **Microbes and Infections**, v. 13, p. 25-32, 2011.

WAKE, D. B. Declining Amphibian Populations. **Science**, v. 253, p. 860, 1991.

WALKE, J. B.; BELDEN, L. K. Harnessing the microbiome to prevent fungal infections: Lessons from Amphibians. **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 9, p. 1-6, 2016.

WEBB, R. J. *et al.* Note: A rapid and inexpensive viability assay for zoospores and zoosporangia of *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 165, p. 1-4, 2019.

WELDON, C. *et al.* Origin of the Amphibian Chytrid Fungus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 12, p. 2100-2105, 2004.

WOODHAMS, D. C. *et al.* Interacting symbionts and immunity in the Amphibian skin mucosome predict disease risk and probiotic effectiveness. **PLOS ONE**, v. 9, n. 4, p. 1-13, 2014.

WOODHAMS, D. C. *et al.* Managing Amphibian disease with skin microbiota. **Trends in Microbiology**, v. 24, n. 3, p. 161-164, 2016.

WOODHAMS, D. C. *et al.* Mitigating amphibian disease: strategies to maintain wild populations and control chytridiomycosis. **Frontiers in Zoology**, v. 8, n. 8, p. 1-23, 2011.

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, p. 192-202, 2019.

YÁNEZ-MUÑOZ, M., & MEZA-RAMOS, P. Anfibios y Reptiles de la Reserva los Encinos. **Technical Report**, v. 13, n. January, 2006.

ZHANG, W. *et al.* Transcriptomic analysis of differentially expressed genes in the oviduct of *Rhacophorus omeimontis* provides insights into foam nest construction. **BMC Genomics**, v. 20, n1, p. 11–13, 2019.