



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**  
**GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BACHARELADO)**

**MATHEUS HENRIQUE DE SOUSA MARIANO**

**BIOINFORMÁTICA APLICADA À CONSERVAÇÃO DE ANFÍBIOS:  
PROBIÓTICOS EM MICROBIOMAS DE NINHO DE ESPUMA.**

**FORTALEZA**

**2024**

MATHEUS HENRIQUE DE SOUSA MARIANO

BIOINFORMÁTICA APLICADA À CONSERVAÇÃO DE ANFÍBIOS: PROBIÓTICOS  
EM MICROBIOMAS DE NINHO DE ESPUMA

Monografia apresentada ao curso de Graduação em Ciências Biológicas (Bacharelado da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Denise Cavalcante Hissa.

FORTALEZA

2024

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

---

M286b Mariano, Matheus Henrique de Sousa.  
Bioinformática aplicada à conservação de anfíbios: probióticos em microbiomas de ninho de espuma /  
Matheus Henrique de Sousa Mariano. – 2024.  
45 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências,  
Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2024.  
Orientação: Profa. Dra. Denise Cavalcante Hissa.

1. Microbioma. 2. Bioaugmentação. 3. Batrachochytrium dendrobatidis. 4. Probióticos. I. Título.  
CDD 570

---

MATHEUS HENRIQUE DE SOUSA MARIANO

BIOINFORMÁTICA APLICADA À CONSERVAÇÃO DE ANFÍBIOS: PROBIÓTICOS  
EM MICROBIOMAS DE NINHO DE ESPUMA

Monografia apresentada ao curso de Graduação em Ciências Biológicas (Bacharelado da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

BANCA EXAMINADORA

---

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

---

Dr. Diogo Henrique Costa de Rezende  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Mestra Vanessa Ariane Silva da Costa  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

*“O sapo que vive no poço não conhece a vastidão do oceano”*

**Zhuang Zhou**

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família: Mãe, Pai e Irmã. Obrigado por me permitir escolher esta profissão, me apoiar até o fim da graduação e por suportar minhas maluquices do dia-a-dia.

Aos meus amigos, em especial os Power Rangers: Francisco Marques, Allan Fontenelle e Reginaldo Hissa Neto. E também às meninas: Francisca Elany, Thayná Vasconcelos, Viviane Otaviano e Samilly Mendes. Sem vocês a faculdade não teria sido tão divertida quanto foi.

À minha companheira, Lua Silva, por me incentivar nos estudos, não me deixar desanimar nas derrotas e ainda compartilhar bons momentos juntos.

À minha orientadora, Professora Dra. Denise Cavalcante Hissa, que me acolheu e acompanhou na graduação desde a monitoria até à iniciação científica e permitiu o meu desenvolvimento como cientista.

À toda equipe do Largen e Lembiotech, que estiveram presentes nesta trajetória e me fizeram companhia nos dias de trabalho e lazer.

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

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

## RESUMO

Os anfíbios são importantes bioindicadores ambientais, no entanto muitas espécies enfrentam declínio populacional devido à quitridiomycose causada pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd). Os ninhos de espuma são estruturas de reprodução de alguns anfíbios que além de protegerem ovos, abrigam bactérias benéficas como pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, que podem possuir ação anti-Bd. Diante disso, este projeto teve como objetivo avaliar as mudanças no bacterioma de ninhos de espuma de *Leptodactylus vastus* após a bioaugmentação – técnica de inoculação amplamente utilizada para aumentar a proporção de uma bactéria em uma comunidade - com uma cepa de *Pseudomonas putida*, analisando através de ferramentas de bioinformática a estrutura da comunidade bacteriana ao longo do tempo e seus impactos. Para isso, amostras de ninhos de espuma de *Leptodactylus vastus* foram submetidas à bioaugmentação com *Pseudomonas* e analisadas por sequenciamento da região V4 do *rRNA 16S*. As sequências foram processadas no software *Rstudio* via *DADA2* e classificadas com o banco *SILVA 138 SSU*. Análises de diversidade e diferenciais de abundância foram conduzidas com os pacotes *Phyloseq*, *Vegan* e *igraph*, permitindo a avaliação da estrutura do microbioma e das interações bacterianas. Foram obtidas 3675 ASVs após remoção de sequências de Eucariotos e Arqueias. As curvas de rarefação indicaram boa cobertura amostral. A diversidade alfa revelou diferenças significativas entre os tratamentos, com impacto da bioaugmentação na estrutura microbiana. A análise de abundância mostrou que *Proteobacteria* foi dominante, mas a inoculação com *Pseudomonas* alterou a composição microbiana, especialmente no Tempo 1. A análise beta demonstrou que o tempo teve maior influência na estrutura microbiana do que a bioaugmentação. As redes de interações indicaram que a adição de *Pseudomonas* afetou a conectividade e a modularidade da comunidade bacteriana ao longo do tempo. Desse modo, o estudo mostrou que a adição da cepa influenciou significativamente a diversidade microbiana nos ninhos de espuma, sendo o tempo de bioaugmentação o fator mais significativo. Ademais, a bactéria teve apresentada baixa adesão à comunidade, no entanto apontou influências no microbioma de forma indireta, alterando interações ecológicas. Entretanto, mais pesquisas sobre a relação da bactéria e do bacterioma e testes com o Bd são necessárias a fim de entender o papel do probiótico e sua viabilidade para aplicação futura.

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

## ABSTRACT

Amphibians are important environmental bioindicators; however, many species face population declines due to chytridiomycosis caused by the fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd). Foam nests are reproductive structures of some amphibians that, in addition to protecting eggs, harbor beneficial bacteria, such as those belonging to the genus *Pseudomonas*, which may have anti-Bd activity. Given this, this project aimed to assess changes in the bacteriome of *Leptodactylus vastus* foam nests after bioaugmentation — a widely used inoculation technique to increase the proportion of a bacterium in a community — using a strain of *Pseudomonas putida*. The bacterial community structure and its impacts over time were analyzed using bioinformatics tools. For this purpose, samples of *Leptodactylus vastus* foam nests were subjected to bioaugmentation with *Pseudomonas* and analyzed by sequencing the V4 region of 16S rRNA. The sequences were processed in RStudio using DADA2 and classified with the SILVA 138 SSU database. Diversity analyses and differential abundance assessments were conducted using the Phyloseq, Vegan, and igraph packages, allowing for the evaluation of microbiome structure and bacterial interactions. A total of 3,675 ASVs were obtained after the removal of eukaryotic and archaeal sequences. Rarefaction curves indicated good sample coverage. Alpha diversity analysis revealed significant differences between treatments, with bioaugmentation impacting microbial structure. Abundance analysis showed that *Proteobacteria* was dominant, but *Pseudomonas* inoculation altered microbial composition, especially at Time 1. Beta diversity analysis demonstrated that time had a greater influence on microbial structure than bioaugmentation. Interaction networks indicated that the addition of *Pseudomonas* affected bacterial community connectivity and modularity over time. Thus, the study showed that the addition of the strain significantly influenced microbial diversity in foam nests, with bioaugmentation duration being the most significant factor. Additionally, the bacterium exhibited low adhesion to the community but indirectly influenced the microbiome by altering ecological interactions. However, further research on the relationship between the bacterium and the bacteriome, as well as Bd testing, is necessary to understand the role of the probiotic and its viability for future applications.

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

## LISTA DE SIGLAS

Bd - *Batrachochytrium dendrobatidis*

P119 - Cepa bacteriana de *Pseudomonas* com atividade anti-Bd

OTU - Operational Taxonomic Unit

ASV - Amplicon Sequence Variant

rRNA 16S

CeGenBio - Central de Genômica e Bioinformática

NMDS - Non-metric Multidimensional Scaling

PCoA - Principal Coordinates Analysis

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>13</b>
2.1 O valor ecológico dos anuros nos ambientes naturais e desafios para conservação ....	13
2.2 Ninhos de espuma: estrutura bioquímica e microbiológica.....	14
2.3 Efeitos do microbioma contra a proliferação de patógenos .....	17
2.4 Amplicon rRNA 16S: uma abordagem baseada em DNA para estudos de microbioma .....	20
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>22</b>
3.1 Objetivos gerais .....	22
3.2 Objetivos específicos.....	22
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
4.1 Coleta, isolamento, bioaugmentação em placa e sequenciamento do DNA. ....	23
4.2 Estatísticas, análises de diversidade e análise diferencial. ....	24
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>24</b>
5.1 Estimativa de riqueza e diversidade bacteriana. ....	24
5.2 Análises de abundância relativa para diferentes hierarquias. ....	28
5.3 Abundância de Pseudomonas no testes de Bioaugmentação.....	30
5.4 Análises de Diversidade Beta .....	32
5.6 Rede de interações .....	36
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>38</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>40</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os anfíbios são um grupo de vertebrados que incluem sapos, rãs, pererecas, salamandras e cecílias. Reconhecidos como os primeiros vertebrados a conquistarem o ambiente terrestre, apresentam características únicas, como a pele permeável, que desempenha funções respiratórias e osmóticas, além de uma reprodução geralmente dependente da água. Com uma diversidade global, os anfíbios desempenham papéis ecológicos fundamentais, como o controle de populações de insetos e a integração em cadeias alimentares. No entanto, são extremamente sensíveis às alterações ambientais, o que os torna indicadores críticos da saúde dos ecossistemas. Relatórios da Avaliação Global de Anfíbios da IUCN indicam que até um terço das espécies de anfíbios, estimadas em mais de 5700, sofreram declínios severos ou extinções (Stuart et al., 2004).

Dentro desse grupo, os anuros são caracterizados por seu hábito de vida intermediário entre ambientes aquáticos e terrestres e pela reprodução geralmente bifásica, com uma ampla diversidade de modos reprodutivos (Gallardo et al., 1979). Os anuros possuem grande importância ecológica, atuam no controle de pragas e desempenham papéis fundamentais nas teias alimentares e no fluxo de energia nos ecossistemas. Devido às suas características fisiológicas, os anuros também são considerados bioindicadores sensíveis a fatores como aquecimento global e poluição (Méza-Ramos et al., 2006).

Dentre as principais causas de declínio populacional em anfíbios, existem as doenças emergentes como a quitridiomycose, causada pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd), que atua na pele desses animais, provocando hiperqueratinização e desequilíbrio hídrico, fatores associados à elevada mortalidade causada pela enfermidade (Voyles et al., 2009). Estima-se que o patógeno já ocasionou o declínio de pelo menos 6,5% das espécies descritas desse grupo. Particularmente, na região da América Central e do Sul o declínio é mais acentuado (Scheele et al., 2019)

Muitas espécies de anuros depositam seus ovos em espumas estáveis, conhecidas como ninhos de espuma (Downie e Smith, 2003). Tal estrutura está ligada à evolução desses animais à vida terrestre e oferece proteção aos ovos e girinos contra dessecação, radiação, predação e diversas outras condições (Gould, 2021). A partir de estudos sobre a microbiota destas estruturas, foi constatado o papel em diversas funções para os seus hospedeiros, dentre elas, a proteção contra patógenos mediante a síntese de substâncias capazes de inibir fungos como o Bd (Brucker et al., 2008). Ademais, é sabido que a microbiota dos ninhos influencia

a colonização e a estrutura da comunidade dos microrganismos na pele dos indivíduos adultos, dentre as bactérias presentes, as pertencentes ao gênero *Pseudomonas* exercem função anti-Bd já conhecida (Myers et al., 2012). Desta forma, evidente torna-se a relação entre a microbiota e a proteção dos indivíduos contra o fungo quitrídio.

Por esta razão, técnicas como a bioaugmentação - introdução de microrganismos no ambiente a fim de melhorar ou acelerar processos naturais - são potenciais ferramentas no combate a infecções contra o Bd (Bletz et al., 2013). Diversos trabalhos já foram realizados com este intento, demonstrando a eficácia do processo (Myers et al., 2012; Kueneman et al., 2016). Para se verificar como a introdução de uma cepa bacteriana pode influenciar a comunidade microbiana, são necessários estudos utilizando ferramentas de bioinformática. Através do sequenciamento *NGS* da região do gene correspondente à subunidade menor 16S do RNA ribossomal (*rRNA 16S*) é possível obter inferências a respeito da composição e estrutura de espécies presentes em um microbioma (Poretsky et al., 2014)

Em face disso, este projeto tem como objetivo avaliar os efeitos da inoculação de cepas bacterianas do gênero *Pseudomonas*, com relatada atividade anti-Bd, na composição e abundância taxonômica do microbioma de ninhos de espuma de *Leptodactylus vastus*, através da análise *Amplicon rRNA 16s*, a fim de verificar o comportamento da microbiota e constatar possíveis relações positivas e negativas desta interação. Tais informações serão necessárias para possibilitar uma futura introdução de probióticos *in situ* no combate à doença.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 O valor ecológico dos anuros nos ambientes naturais e desafios para conservação

Os anuros desempenham um papel crucial como bioindicadores ambientais devido a características únicas que os tornam sensíveis às mudanças no ambiente. De acordo com **Broomhall (2005)**, a pele permeável, os ovos sem casca e o ciclo de vida dividido em fases terrestre e aquática são características-chave que os tornam vulneráveis a alterações no meio ambiente. Essas mesmas características, entretanto, também os tornam valiosos para avaliar a qualidade ambiental. Além disso, os anuros têm uma função ecológica importante, seja controlando populações de insetos ou servindo como presas para predadores, destacando sua relevância nas comunidades ecológicas (**Broomhall, 2005**).

Apesar dessa importância, os anuros recebem pouca atenção em programas de monitoramento ambiental. Embora sejam amplamente reconhecidos como bons indicadores da qualidade ambiental, poucos estudos foram conduzidos para compreender as implicações das mudanças ambientais em suas populações. Essa lacuna na pesquisa reflete um desafio na conservação e no uso efetivo de sua capacidade como bioindicadores.

Os girinos, por exemplo, representam uma etapa do ciclo de vida dos anuros que é diretamente impactada pelas alterações físico-químicas no ambiente. Essas alterações são particularmente prejudiciais durante os meses mais quentes e úmidos, quando os anuros tendem a utilizar corpos d'água, muitas vezes contaminados, para reprodução. Esse comportamento resulta em comunidades de girinos numerosas e diversificadas, que podem ser indicadores valiosos das condições ambientais e do impacto da poluição nos ecossistemas aquáticos. (**Degarady et al., 2006**).

Embora estes animais sejam reconhecidos por sua importância ecológica e por sua sensibilidade às alterações ambientais, diversas categorias de degradação ambiental ameaçam diretamente sua sobrevivência e, conseqüentemente, sua eficácia como bioindicadores. Entre os fatores de maior impacto, destaca-se a disseminação de patógenos como a quitridiomycose, que tem sido associada ao declínio e à extinção de várias populações e espécies (**Daszak et al., 2001**). Essa doença é particularmente devastadora devido à pele permeável dos anuros, que os torna vulneráveis a infecções e agentes externos.

Outro fator crítico é a mudança climática global, que traz implicações severas para a

fisiologia e o comportamento dos anuros. Alterações na temperatura média, na variação térmica e eventos climáticos extremos podem impactar tanto a sobrevivência quanto os padrões reprodutivos dessas espécies. Além disso, há efeitos sinérgicos a serem considerados, como a interação entre mudanças de temperatura e doenças, que podem amplificar os danos às populações de anuros (**Menéndez-guerrero et al., 2020**).

A poluição ambiental também exerce forte influência, especialmente nas fases iniciais do ciclo de vida dos anuros. Contaminantes presentes em corpos d'água podem comprometer a eclosão dos ovos e a sobrevivência dos girinos, agindo isoladamente ou em combinação com outros fatores estressores (**Karasov et al., 2005**). Como os anuros frequentemente utilizam ambientes aquáticos para reprodução, principalmente em períodos mais quentes e úmidos, a poluição hídrica representa um desafio significativo para a manutenção de comunidades diversificadas e saudáveis.

Além disso, a fragmentação de habitats ameaça a capacidade dos anuros de se dispersarem e manter populações viáveis. Em florestas fragmentadas, a sobrevivência dos indivíduos depende de sua habilidade de atravessar áreas desmatadas, o que é essencial para garantir a conectividade populacional (**Zimmerman e Bierregaard, 1986; Dale et al., 1994**). Contudo, esse aspecto crucial tem recebido pouca atenção em estudos de conservação.

Por fim, a introdução de espécies exóticas agrava ainda mais a situação, pois essas espécies frequentemente competem de forma eficiente com as espécies nativas, ameaçando as populações locais. Essa competição pode alterar drasticamente as dinâmicas ecológicas, reforçando a necessidade de integrar a biologia da conservação com estudos sobre fisiologia e comportamento. Investir em pesquisas que abordem essas ameaças de forma integrada é fundamental para proteger os anuros e garantir que eles permaneçam desempenhando seu papel nos ecossistemas.

## **2.2 Ninhos de espuma: estrutura bioquímica e microbiológica**

Vários sapos apresentam um modo peculiar de reprodução: a deposição de ovos fora da água em ninhos de espuma. Essa espuma é formada por biomoléculas liberadas pela fêmea, e o ninho é produzido durante o amplexo entre a fêmea e o macho (**Wells, 2007**). É sabido que, dentre as rãs, a família *Leptodactylidae* na Mata Atlântica brasileira apresenta o maior número de modos reprodutivos conhecidos, a maioria dos quais envolve a deposição de ovos em ninhos de espuma, construídos em corpos d'água ou no solo (**Haddad, 2005; Pombal, 2007**).

**Figura 1** - Ninho de espuma de rã da família Leptodactylidae durante amplexo.



(Wells, 2007)

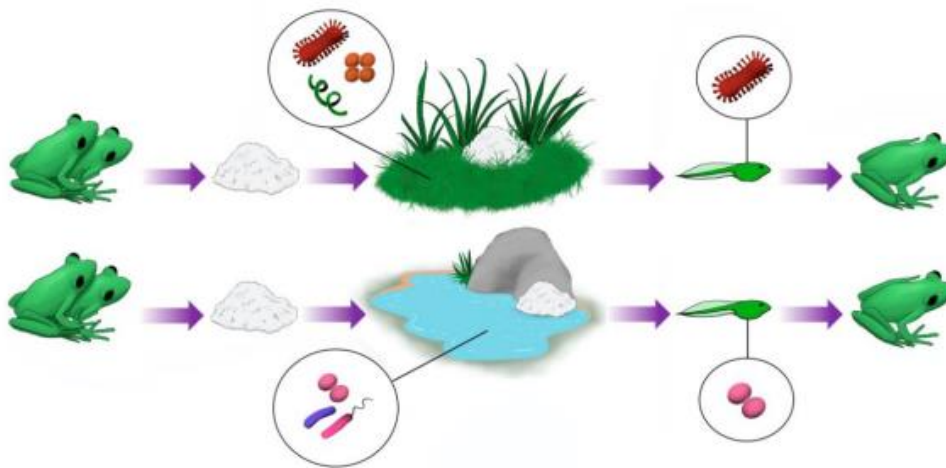
A respeito do seu papel, os ninhos de espuma desempenham diversas funções importantes: protegem ovos e embriões do contato direto com a água de poças pequenas, temporárias, quentes e com baixo nível de oxigênio (**Méndez-Narvaez, 2015**); fornecem proteção contra radiação ultravioleta, predadores e a dessecação; e funcionam como reserva alimentar para os girinos, que completam seu desenvolvimento no interior dos ninhos (**Hissa, 2008**)

Quanto à composição bioquímica, os ninhos são constituídos principalmente por proteínas chamadas ranaspuminas e carboidratos (**Cooper, 2004**). Entre as proteínas presentes, encontram-se surfactantes, lectinas incomuns que, junto aos carboidratos, contribuem para a estabilidade e arquitetura do ninho (**Hissa et al, 2008; Fleming et al, 2009**). Apesar de as funções específicas desses componentes químicos ainda serem hipotéticas, é sabido que muitas proteínas estudadas até agora apresentam estruturas conformacionais únicas e sequências primárias inéditas, constituindo um reservatório de novas moléculas biológicas.

Quanto à composição microbiana, o microbioma dos ninhos de espuma de rã ainda é pouco compreendido, está se começando a aprender sobre sua composição e papel na colonização inicial do hospedeiro (**McGrath-Blaster, 2021**). Cabe notar que, particularmente em anuros, há que se considerar as transformações que estes indivíduos sofrem durante estes estágios de vida, pois estas geram grandes mudanças fisiológicas, na dieta e no habitat, o que

acaba influenciando na composição das comunidades microbianas (Kohl et al., 2013). Segundo Monteiro (2023), que avaliou ninhos de espumas de rãs tropicais, a riqueza e a diversidade nos ninhos não parecem estar relacionadas à filogenia das rãs, mesmo entre espécies próximas da mesma família. No entanto, o tamanho do ninho e o ambiente em que é depositado é que devem influenciar a diversidade bacteriana. Ninhos menores, como os da rã *Adenomera hylaedactyla*, apresentam maior riqueza bacteriana do que ninhos maiores de espécies aquáticas e ripárias. Ademais, foi constatado que o microbioma da pele e da cloaca de da rã-pimenta-da-caatinga, *Leptodactylus vastus*, apresentaram maior abundância dos filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, enquanto os microbiomas de ninho e pele possuem uma maior predominância de *Proteobacteria*. O estudo sugere também que ninhos de ambientes terrestres tendem a ter maior riqueza bacteriana do que os de ambientes aquáticos.

**Figura 2** - Ninhos de espumas de anuros são influenciados pelo microbioma do ambiente no qual são depositados.



Monteiro (2023)

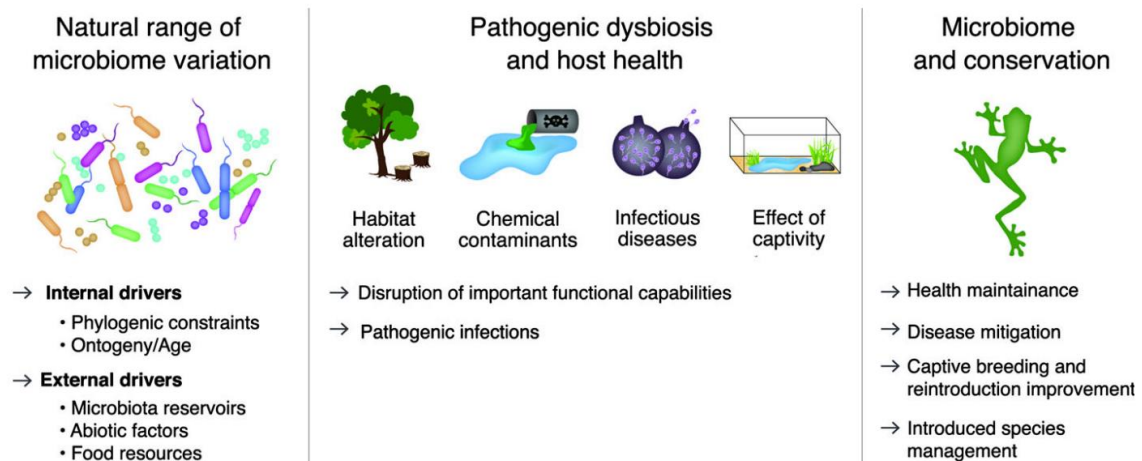
Por fim, o estudo mencionado identificou a presença *Pseudomonas* como um dos mais abundantes gêneros nos ninhos de espuma analisados. Sabe-se que, espécies deste grupo são reconhecidas por sua função tanto simbiótica com o meio ambiente quanto específicas do hospedeiro, sendo comumente encontradas no microbioma cutâneo de anfíbios, onde exercem um papel significativo (Abarca, 2001; Kueneman, 2019, Brunetti, 2022)

O gênero *Pseudomonas* é um grupo taxonômico amplamente distribuído em diversos ecossistemas, sendo reconhecido por sua alta diversidade e aplicações em diferentes áreas, como a biotecnologia (Peix et al., 2018). Essas bactérias pertencem à classe *Gamma Proteobacteria* (Woese et al., 1984) e possuem várias aplicações biotecnológicas, como a promoção do crescimento vegetal *in vitro* (Lin et al., 2013) e a solubilização de fosfato (Toro et al., 2013). Dada a sua diversidade e a contínua descoberta de novas espécies, espera-se que o número de espécies de *Pseudomonas* aumente significativamente nos próximos anos (Peix et al., 2018). Além disso, diversas espécies desse gênero demonstraram atividade antifúngica contra *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd), incluindo uma cepa de *Pseudomonas fluorescens* (Loper et al., 2007). Essas características destacam *Pseudomonas* como um gênero versátil e promissor para aplicações ecológicas e biotecnológicas.

### 2.3 Efeitos do microbioma contra a proliferação de patógenos

Sabe-se que o microbioma tem um papel essencial no desenvolvimento saudável do anfíbio; sendo importante a realização de estudos não apenas voltados para o conhecimento da sua composição, mas também da sua dinâmica com o ambiente e o papel de defesa contra patógenos. Estudos demonstram que a variação do microbioma é influenciada por fatores internos, como idade e características filogenéticas, e externos, como disponibilidade de recursos, fatores ambientais e interação com o hospedeiro (Jiménez et al., 2017). Ademais, os microorganismos simbiotes desempenham um papel ativo na manutenção da imunidade dos anfíbios, geralmente constituem a primeira linha de defesa contra organismos invasores, atuando em conjunto com a pele, que em anuros é capaz de secretar peptídeos antimicrobianos cutâneos (AMP) (Woodhams et al., 2007; Burkart et al., 2017; Rollins-Smith, 2023). Nesse sentido, alterações ambientais, contaminantes químicos, doenças infecciosas e condições de cativeiro podem causar disbiose, prejudicando funções essenciais do microbioma e aumentando a suscetibilidade a infecções.

### Figura 3 - Fatores que influenciam a variação natural do microbioma de anfíbios



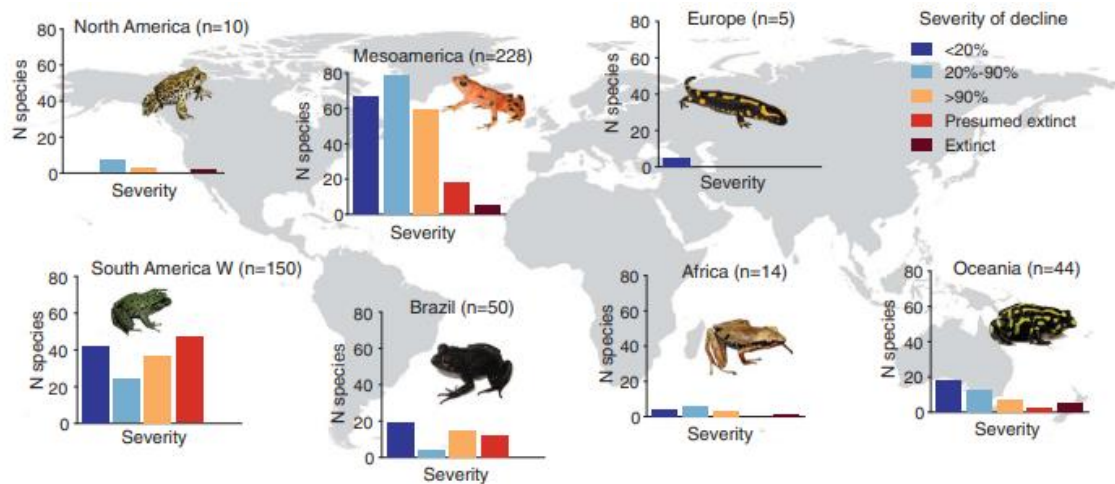
Jiménez (2017)

Um aspecto importante a ser exposto é que os microorganismos podem ser transmitidos de forma vertical, horizontal e ambiental, e as bactérias probióticas podem ser disseminadas por esses mecanismos. A transmissão vertical provavelmente ocorre em anfíbios com cuidado parental (Bletz, 2013). Por exemplo, a rã *Hyalinobatrachium colymbiphylum* parece transferir uma microbiota defensiva para os embriões, a qual provavelmente protege as larvas de contra o fungo patogênico *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) (Walke et al., 2011). Alguns pesquisadores apontam uma forte interação entre os microbiomas dos pais, da prole e dos ninhos (de diversas espécies animais), cunhando o conceito de "nidobioma" (Campos-Cerda; Bohannan, 2020). Nos modos reprodutivos que envolvem ninhos, esses locais funcionam como o primeiro ponto de contato da prole com os microrganismos presentes no ambiente externo, iniciando o processo de colonização da pele. Entre esses microrganismos, podem estar aqueles com a capacidade de inibir o crescimento do *Bd*.

Em anfíbios, particularmente anuros, a quitridiomycose já é reconhecida há algum tempo como uma ameaça (Lips et al. 2006; Scheele et al. 2019). São duas as espécies responsáveis pela doença: *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) e *B. salamandrivorans* (*Bsal*). A respeito do *Bd*, através de estudos genômicos do fungo foi possível identificar pelo menos seis linhagens distintas da espécie: panzootica (*Bd-GPL*), suíça (*Bd-CH*), do Cabo (*Bd-Cape*), asiáticas (*Bd ASIA-1*, considerada ancestral às demais linhagens, e *Bd ASIA-3*), e a linhagem brasileira (*Bd-Brazil*) (Fisher e Garner, 2020). Ademais, análises filogenéticas sugerem que a linhagem *Bd-Brazil* foi uma das primeiras a se separar das demais linhagens (Rosenblum et al., 2013). Cabe ressaltar que, no Nordeste, estado do Ceará, estudos recentes demonstraram que 20 espécies de

anuros testaram positivo para infecção pelo *Bd* (Dos Santos Mendes, 2024). Todas estas informações levantam preocupações acerca do estado de conservação da biodiversidade no Brasil. Nesse contexto, bactérias simbióticas presentes na pele dos anfíbios que desempenham papel na proteção do hospedeiro contra a quitridiomiose tornam-se fundamentais para conservação destes animais (Harris et al. 2009; Kueneman et al. 2016).

**Figura 4 - Distribuição global do declínio de espécies de anfíbios associados a quitridiomiose.**



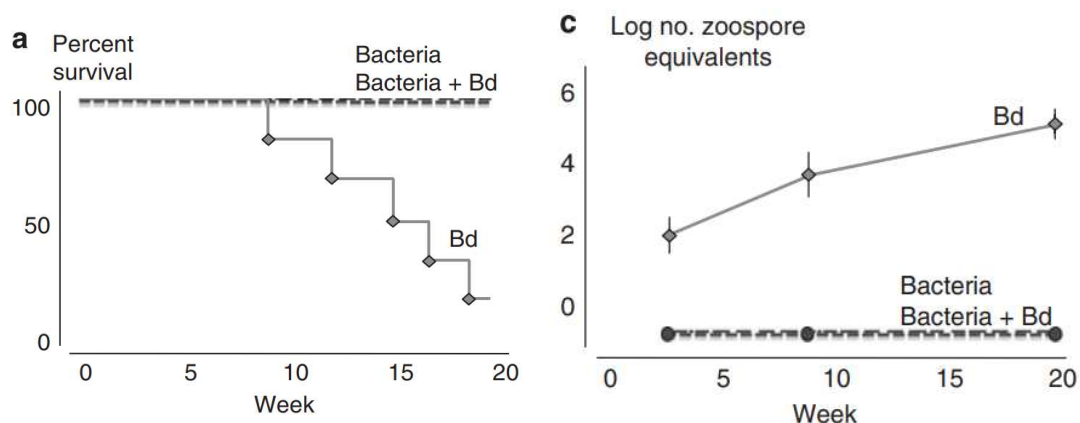
Scheele et al (2019)

A respeito da interação entre *Bd* e o microbioma da pele de anfíbios, objeto de muitos estudos nos últimos anos, observou-se que, ao interagir com os microrganismos simbiotes presentes na pele desses animais, o *Bd* pode agir de três maneiras principais: estimulando a produção de metabólitos antifúngicos pelos microrganismos da comunidade simbiótica, alterando a composição microbiana da pele desses indivíduos (Walke; Belden, 2016) e ainda, permitindo que o hospedeiro conviva com o fungo quitrídio sem manifestar sintomas clínicos

(Woodhams et al., 2007).

Um dos métodos mais eficazes para manipulação do microbioma a fim de melhorar a saúde do indivíduo e prevenir infecções é a utilização de probióticos por meios de técnicas de bioaugmentação (Bletz et al., 2017). A bioaugmentação é uma técnica que envolve a introdução de microrganismos benéficos no ambiente de um organismo com o objetivo de melhorar sua saúde ou resistência a doenças, é uma técnica usada em probióticos, microrganismos benéficos que competem com patógenos, promovem o equilíbrio microbiano e estimulam a defesa natural do organismo. A exemplo disto, Harris et al. (2009) demonstrou que bactéria *Janthinobacterium lividum* apresenta eficácia na bioaugmentação da microbiota da pele da rã-de-pernas-amarelas-da-montanha (*Rana muscosa*), resultando na redução da morbidade e mortalidade causada pelo fungo quitrídio *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd). Em sua pesquisa, a adição de *J. lividum* levou à produção de violaceína, um metabólito antifúngico que foi encontrado em concentrações significativamente maiores nas peles das rãs tratadas, indicando seu papel na resistência à doença. Além disso, as rãs tratadas não apresentaram equivalentes detectáveis de zoósporos de Bd, enquanto as rãs não tratadas exibiram um aumento exponencial na abundância de Bd.

**Figura 5** - Percentual de sobrevivência em *Rana muscosa* a partir do tratamento com a bactéria *Janthinobacterium lividum* (a) e Número de zósporos equivalentes de *B. dendrobatidis* (c)



Harris (2009)

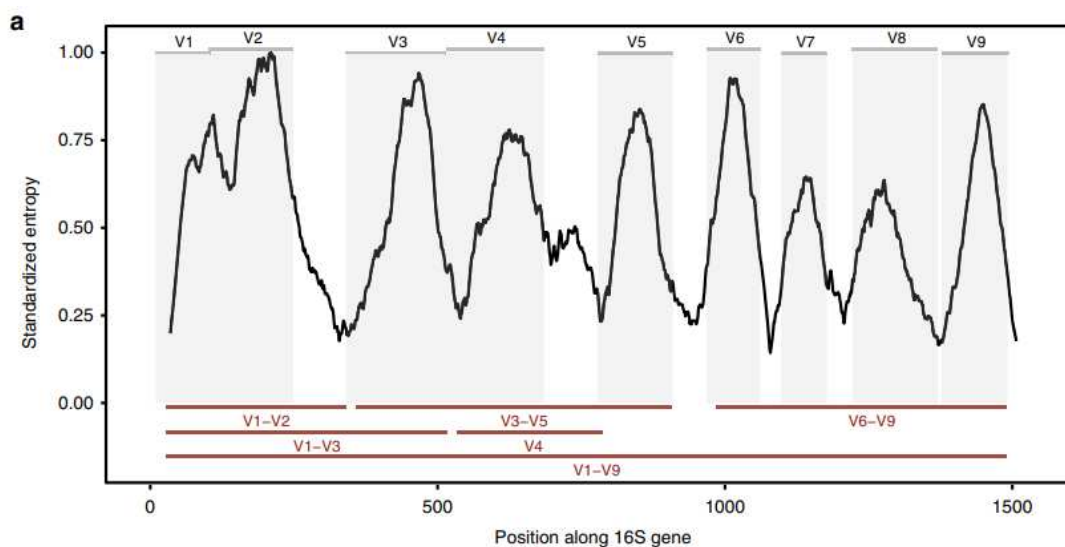
Estudos como esse sugerem a eficácia da utilização de probióticos endógenos através

na da bioaumentação como uma possível ferramenta para manutenção saúde de anfíbios.

#### **2.4 *Amplicon rRNA 16S*: uma abordagem baseada em DNA para estudos de microbioma**

Para estudos de microbiomas a utilização de ferramentas bioinformáticas e de análise estatística representa um passo fundamental. O gene rRNA 16S, composto por cerca de 1500 pares de bases, é amplamente utilizado para a identificação e classificação de bactérias, contendo regiões conservadas e variáveis. Seu sequenciamento permite determinar relações filogenéticas e estudar a diversidade bacteriana. Embora o gene completo ofereça uma resolução taxonômica superior, geralmente sequenciam-se apenas partes dele, como as regiões variáveis V4, V6, ou combinações como V1-V3 e V3-V5, devido às limitações de plataformas de sequenciamento como a Illumina, que geram sequências curtas,  $\leq 300$  bases (**Johnson, 2019**).

**Figura 6** - Entropia associada a diferentes posições ao longo do gene do rRNA 16S.



**Johnson (2019)**

A partir da sequência gênica obtida, diferentes metodologias podem ser utilizadas para identificação taxonômica, sendo as principais os OTUs e ASVs. Unidades Taxonômicas Operacionais são agrupamentos de sequências de DNA que compartilham uma similaridade superior a um determinado limiar de dissimilaridade, geralmente 3%, e são usadas para classificar bactérias em grupos taxonômicos (**Kopylova et al., 2016**). Já os Variantes de Sequência de Amplicon resolvem variantes de sequência com maior precisão, identificando diferenças de até um único nucleotídeo, sem os limites arbitrários das OTUs. Ainda, ASVs são considerados superiores porque oferecem maior resolução taxonômica, permitindo uma distinção mais precisa entre as espécies, e são reutilizáveis em diferentes estudos, além de não dependerem de bancos de dados de referência incompletos (**Callahan et al., 2016**).

Nesse sentido, a pipeline DADA2 é uma ferramenta bioinformática avançada projetada para analisar dados de sequenciamento de amplicons, especialmente em estudos de microbioma. Ela foca na correção de erros nos dados brutos de sequenciamento para gerar Variantes de Sequência de Amplicon (ASVs), oferecendo maior resolução do que as Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs). Isso melhora a precisão do perfilamento de comunidades microbianas, sendo uma escolha preferencial para os pesquisadores da área (**Liu et al., 2023**). Entre seus recursos-chave, destaca-se a correção de erros a nível de nucleotídeo, o que aumenta a confiabilidade das classificações taxonômicas, e a geração de ASVs (**Ansorge et al., 2021**).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivos gerais

Avaliar, através de análise do *amplicon rRNA 16S*, as alterações no bacterioma de ninhos de espuma da rã *Leptodactylus vastus* após a introdução por bioaugmentação de uma cepa de *Pseudomonas putida* P119.

#### 3.2 Objetivos específicos

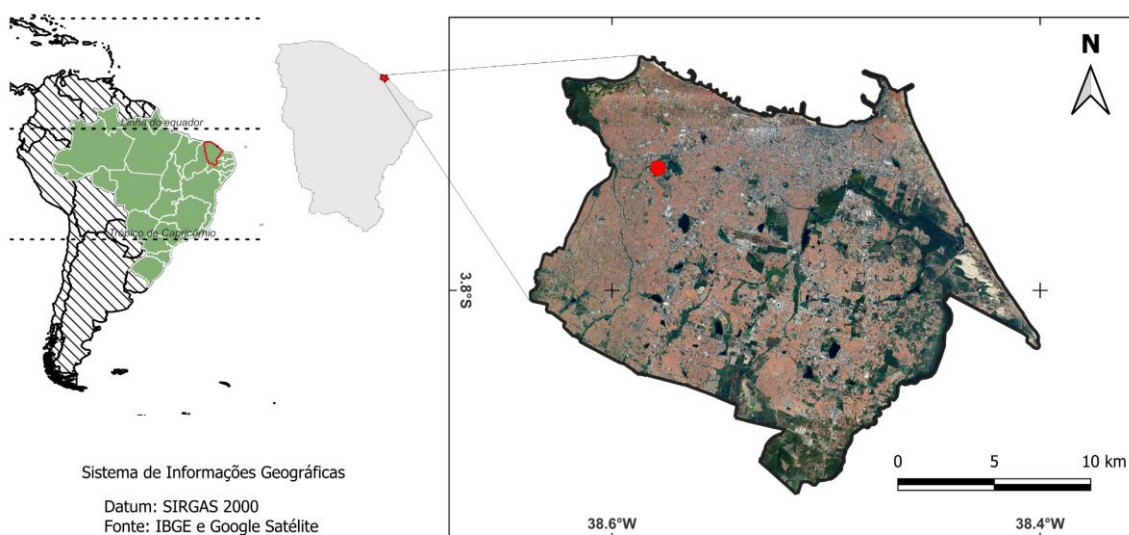
- Analisar as sequências de *amplicon rRNA 16S* de ninhos de espuma com e sem a adição da cepa *Pseudomonas putida* P119
- Analisar a estrutura da comunidade bacteriana das amostras com e sem a adição da cepa de *Pseudomonas putida* P119, em diferentes tempos de bioaugmentação.
- Avaliar os impactos da inoculação no bacterioma.
- Discutir as possíveis causas das alterações observadas.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Coleta, isolamento, bioaumentação em placa e sequenciamento do DNA.

A espécie escolhida para o estudo foi *Leptodactylus vastus*, a coleta do ninho foi realizada por **Costa (2024)** no período chuvoso do primeiro semestre de 2023, no Campus do Pici (Fortaleza - CE), conforme o mapa abaixo:

**Figura 7** - Mapa do município de Fortaleza, Ceará. O ponto vermelho representa o local de coleta, Campus do Pici.



(Elaborado pelo autor)

Foram realizadas, ensaios de bioaumentação *in vitro* em ninhos de espuma e em placa de 12 poços seguida da extração e sequenciamento do DNA de cada poço (**Costa, 2024**). Dois tipos de tratamento em dois diferentes tempos foram realizados nos testes de bioaumentação em placa: ninho de espuma com um dia (Ninho T1) e dez dias de bioaumentação (Ninho T10) e ninho de espuma com a cepa bacteriana de *Pseudomonas* (P119) em um dia (Ninho + P119 T1) e dez dias (Ninho + P119 T10) de bioaumentação. Foram realizadas triplicatas para cada tipo de tratamento e tempo, no entanto uma das amostras de Ninho T1 tornou-se inviável para análise de DNA, sendo descartada. Por fim, restaram então 11 amostras no total.

A a partir do sequenciamento da região V4 (~254 pb) do gene *rRNA 16S* realizado na Central de Genômica e Bioinformática (CeGenBio) na plataforma Illumina Miseq (Illumina,

EUA) foram obtidos 11 datasets os quais foram submetidos a análises de bioinformática através do programa *RStudio* (*R v4.4.2*). Os arquivos “.fastq” foram demultiplexados e as sequências dos primers, 515 F-Y e 806R, e dos adaptadores foram retiradas através do programa *Cutadapt v3.5*. Através da pipeline *DADA 2 v1.18* foram realizadas uma série de etapas: avaliação da qualidade das sequências, as leituras *Forward* e *Reverse* foram cortadas nos tamanhos de 128 e 126pb, respectivamente, houve remoção de possíveis sequências contaminantes típicas do sequenciamento Illumina (*rm.phix = T*), o número máximo de erros esperados para as leituras foi de 2 (*maxEE = 2*). Foram também realizados o denoising, junção das sequências, construção das Variantes de Sequência de Amplicon (ASVs) - sequências únicas diferenciadas por um único nucleotídeo - e, retirada das sequências quiméricas. O banco de dados *SILVA 138 SSU* foi utilizado como referência para construção da tabela de ASVs. Por fim foram eliminadas sequências de arqueas e eucariotos (incluindo mitocôndrias e cloroplastos).

#### **4.2 Estatísticas, análises de diversidade e análise diferencial.**

Através do pacote *Phyloseq* (*v3.20*) foram criados dados e gráficos de abundância relativa de gênero e filo, com diferentes limiares (>5% e >1%). Utilizando o pacote *iNEXT* foram construídas as curvas de rarefação (curva do coletor).

Com o pacote *Vegan* (*v2.6.4*) e *Ggplot2* (*v3.5.0*) foram realizadas as estatísticas e confecção de gráficos. A fim de realizar as análises de diversidade foram utilizados os índices de diversidade alfa (*Chao1*, *Shannon* e *Simpson Inverso*) e a matriz de dissimilaridade *Bray-Curtis* através da análise de NMDS para visualização da diversidade beta. O diagrama de *Venn* foi realizado para verificar as relações de interseção, similaridade e exclusividade entre os diferentes tratamentos, permitindo a identificação das “bacterias centrais” presentes em todos os microbiomas por serem essenciais à dinâmica com o meio ambiente. Por fim foram realizadas análises diferencial de abundância a fim de observar o impacto da adição do inoculante em determinados gêneros. Por fim, através do pacote *igraph* (*v1.6*), foram construídas redes de interação e avaliados os parâmetros obtidos.

## **5 RESULTADOS**

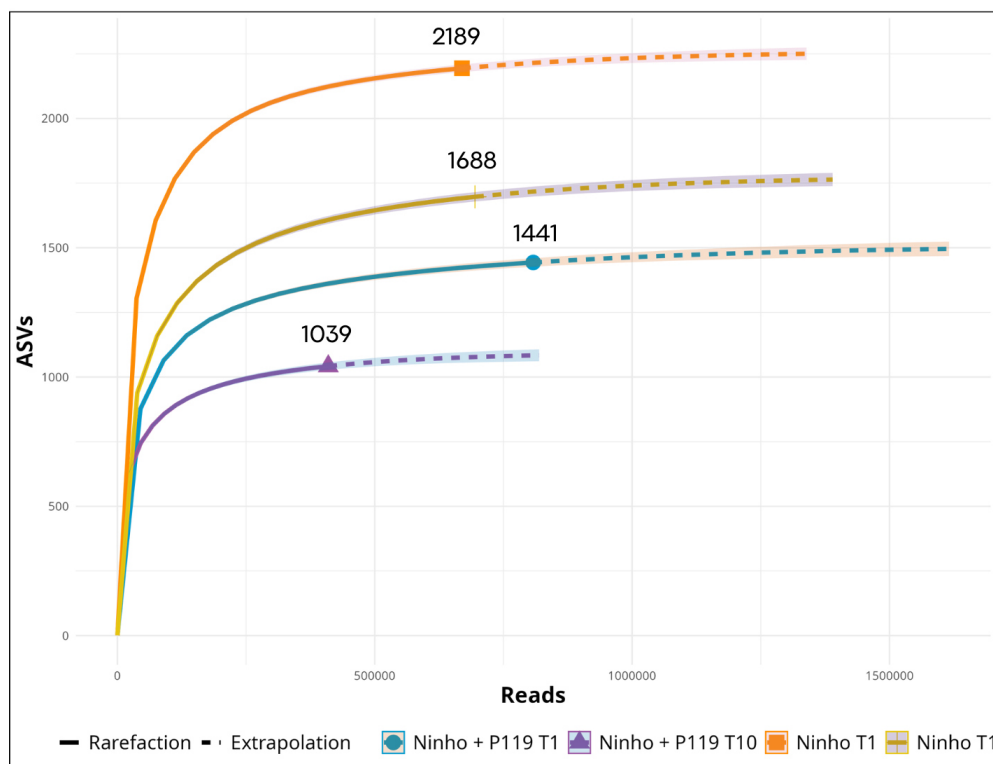
### **5.1 Estimativa de riqueza e diversidade bacteriana.**

A partir do sequenciamento das 11 amostras foram obtidas 6907276 sequências brutas.

Após aplicação dos filtros, denoising, merging e remoção de sequências quimera restaram 2753088 sequências, das quais se obteve 4175 ASVs (*Amplicon Sequence Variant*), 3675 ASVs após remoção de sequências de Eucariotos (Mitocôndria e Cloroplastos) e Arqueias.

A partir da curva de rarefação (Figura 8) obtida foi possível notar que, embora nenhuma curva tenha atingido a estabilização completa (assíntota) os valores se encontram relativamente próximos a estabilização, sugerindo uma boa cobertura amostral. Ademais, o número de ASVs obtidos foi bastante divergente entre as amostras, aquelas relativas ao Tempo 1 sem o tratamento obtiveram maior número de ASVs (2189), enquanto as tratadas com inoculante no Tempo 1 e 10 tiveram os menores números (1441 e 1039).

**Figura 8** - Curva de rarefação demonstrando a relação entre a riqueza bacteriana em relação ao esforço amostral (número de leituras obtidas)



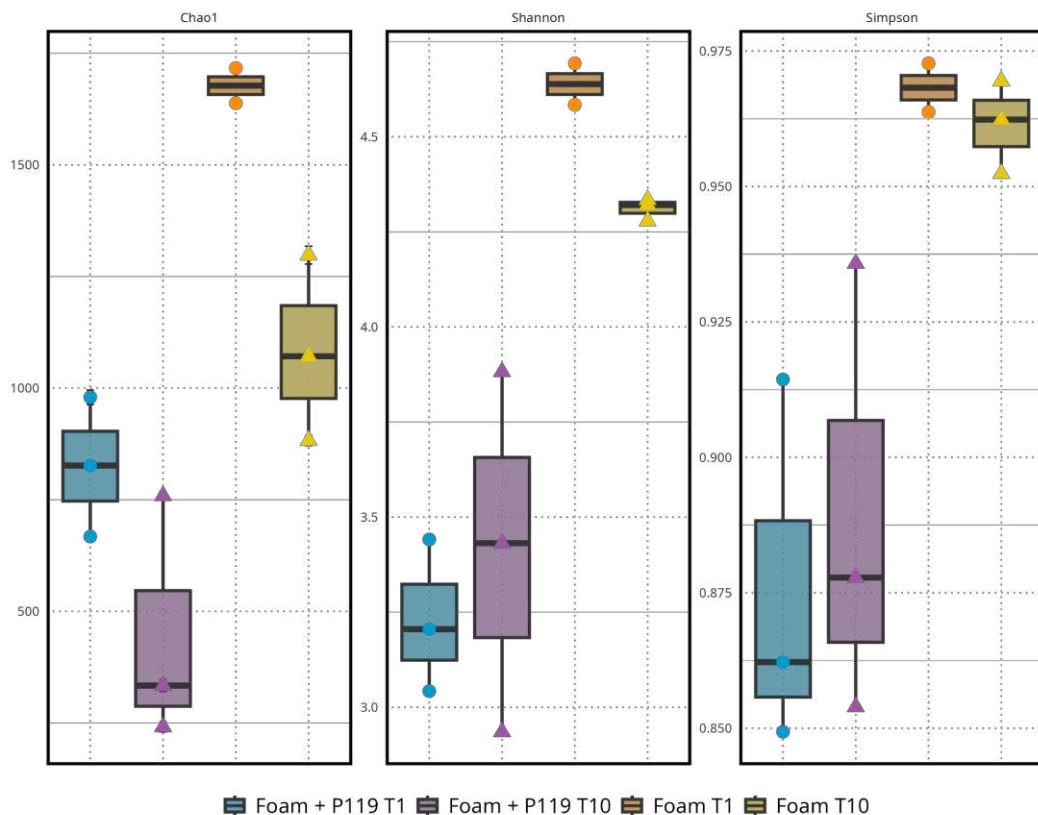
(Elaborado pelo autor)

A partir dos dados foram gerados análises de diversidade alfa e beta. Os índices de diversidade alfa (Tabela 1) revelaram diferenças significativas de diversidade entre as amostras. Para o índice *Chao1*, foi observada uma diferença significativa entre os tratamentos "Ninho" e

"Ninho + P119" no tempo T1 ( $p = 0.005159$ ) e no tempo T10 ( $p = 0.03637$ ). Além disso, houve uma diferença significativa entre os tempos T1 e T10 no tratamento "Ninho" ( $p = 0.02955$ ), mas não no tratamento "Ninho + P119" ( $p = 0.1249$ ).

No caso do índice *Shannon*, também foi observada uma diferença significativa entre os tratamentos "Ninho" e "Ninho + P119" no tempo T1 ( $p = 0.002475$ ), mas não no tempo T10 ( $p = 0.08149$ ). Não houve diferença significativa entre os tempos T1 e T10 no tratamento "Ninho" ( $p = 0.0812$ ) nem no tratamento "Ninho + P119" ( $p = 0.5788$ ). Para *Simpson Inverso* foi observada uma diferença significativa somente na comparação entre Tratamentos no Tempo 10 ( $p = 0,02$ )

**Figura 9** - Índices de diversidade alfa em box-plot referentes aos tratamentos e tempos dos testes de bioaumentação *in vitro* em ninho de espuma.



(Elaborado pelo autor)

**Tabela 1** - Valores dos índices de diversidade alfa médio para cada tipo de amostra.

Tratamento	Tempo	Shannon	Simpson	Chao1
Ninho	T1	4,64	0,968	1678
	T10	4,31	0,961	1084
Ninho	+ T1	3,23	0,875	825
P119	T10	3,42	0,889	445

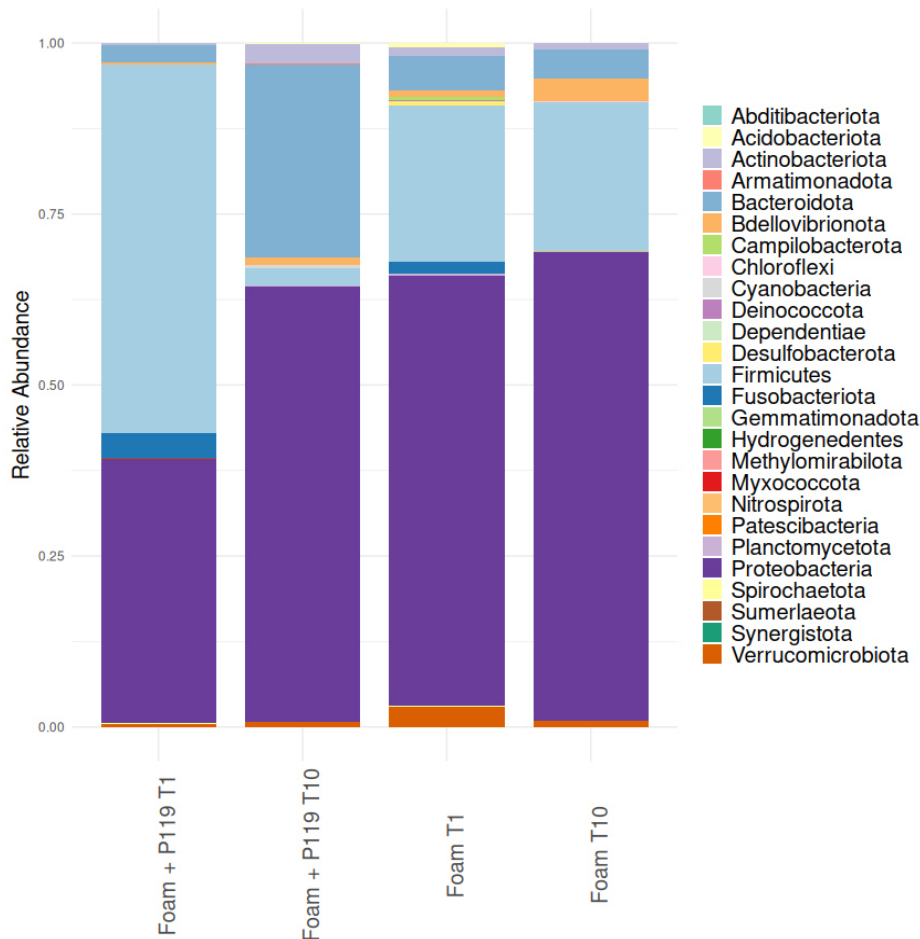
**Tabela 2** - Valores dos testes estatísticos *T de Student* para cada um dos índices de diversidades.

	Teste T Student		
	Chao1	Shannon	InvSimpson
Tratamento em T1	<b>p &lt; 0.05</b>	<b>p &lt; 0.05</b>	p > 0.05
Tratamento em T10	<b>p &lt; 0.05</b>	p > 0.05	<b>p &lt; 0.05</b>
Tempo em Ninho	<b>p &lt; 0.05</b>	p > 0.05	p > 0.05
Tempo em Ninho + P119	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05

## 5.2 Análises de abundância relativa para diferentes hierarquias.

Após análises de diversidade alfa, foram obtidos os gráficos de abundância relativa para Filos e Gêneros. Para os Filos, no Ninho Tempo 1 o Filo predominante foi *Proteobactéria* (62,9%), seguida de *Firmicutes* (22,8%) e *Bacteroidota* (5,07%). De forma semelhante, no Tempo T10, o grupo mais abundante também foi *Proteobactéria* (68,5%), seguida de *Firmicutes* (21,6%) e *Bacteroidota* (4,21%). Já para Ninho com o inoculante de *Pseudomonas* os resultados diferiram um pouco. No Tempo 1 houve o maior predomínio de *Firmicutes* (53,8%), seguido de *Proteobacteria* (38,4%) e *Fusobacteria* (3,83%) enquanto no Tempo 10, *Proteobacteria* (63,7%), *Bacterioidota* (28,2%) e *Actinobacteriota* (2,9%). Verifica-se que a bioaugmentação por si só não modifica a estrutura dos filios dominantes, enquanto a inoculação da cepa no primeiro dia afeta consideravelmente a distribuição e, no décimo dia, volta a se estabilizar e adquirir outra conformação, já diferente dos controles.

**Figura 10** - Gráfico de barras empilhadas para abundância relativa aos filios

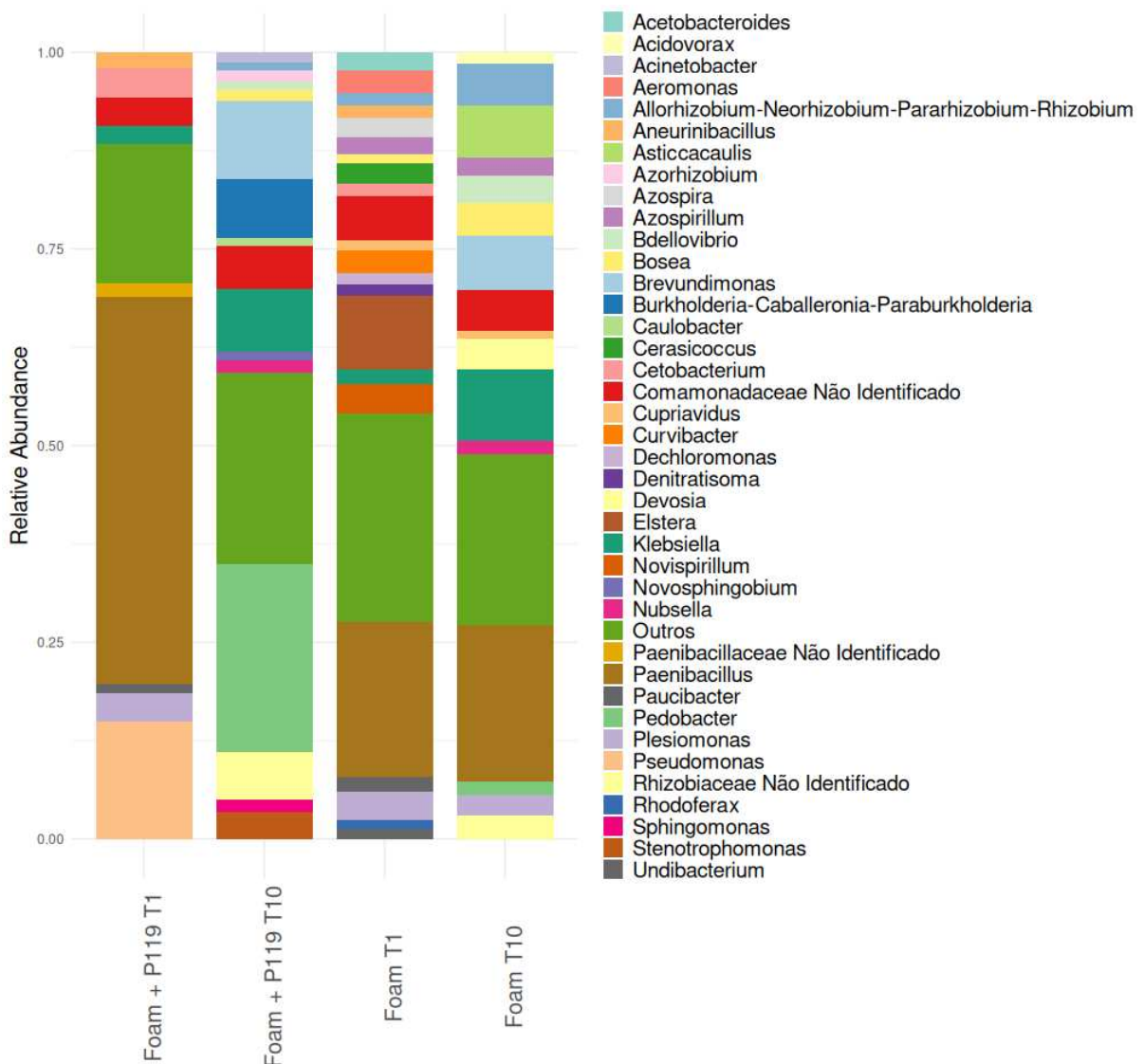


(Elaborado pelo autor)

Já analisando as abundâncias para os gêneros que apresentaram abundância maior que 1% observou-se alta dissimilaridade. Para os ninhos no Tempo 1 houve predomínio do gênero *Paenibacillus* (19,7%), *Elstera* (9,35%) e *Comamonadaceae Não Identificado* (5%).

Para o Ninho no Tempo T10 houve predomínio do gênero *Paenibacillus* (19,7%), *Klebsiella* (9%) e *Brevundimonas* (6%). Quanto aos ensaios com inoculante, no Tempo 1 houve predomínio de *Paenibacillus* (49,2%), *Pedobacter* (23,9%) e *Pseudomonas* (14,9%). Já para o Tempo 10, *Pedobacter* (23,9%), *Brevundimonas* (9%) e *Klebsiella* (7%).

**Figura 11** - Gráfico de barras empilhadas para abundância relativa dos gêneros com abundância maior do que 1%.



(Elaborado pelo autor)

### 5.3 Abundância de *Pseudomonas* no testes de Bioaumentação

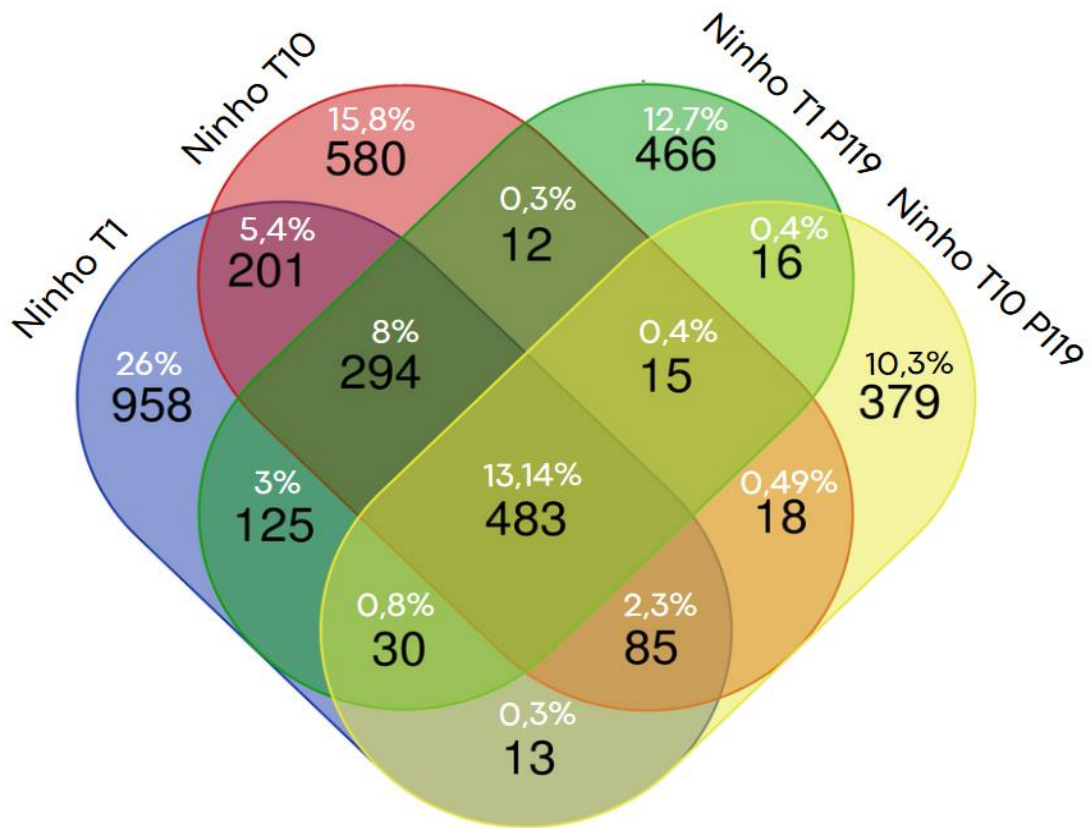
O grupo *Pseudomonas*, gênero utilizado como inoculante com atividade anti-Bd, apresentou diferentes abundâncias para cada amostra (Tabela 3). Nos grupos controle do Tempo 1 e 10 e no tratamento com o inoculante no Tempo 10 os resultados foram semelhantes, a abundância relativa sequer alcançou 1%. No entanto, para Ninho + P119 T1 obteve-se um número significativo de ASVs (n = 121101) o que representou 14% da composição relativa na comunidade.

**Tabela 3** - Número de ASVs e abundância relativa de *Pseudomonas* para cada amostra

	Ninho T1	Ninho T10	Ninho + P119 T1	Ninho + P119 T10
Nº ASVs	2160	1087	121101	2887
<b>Abundância Relativa de <i>Pseudomonas</i></b>	0,3%	0,15%	14%	0,7%

De acordo com o Diagrama de Venn, o número de ASVs únicas foi maior no Ninho T1 (n = 958) em comparação ao T10 (n = 580). Nos tratamentos com P119, o Tempo 1 apresentou um número maior de ASVs únicas (n = 466) em relação ao Tempo 10 (n = 379). Além disso, foram identificadas 483 sequências compartilhadas entre todos os tratamentos, representando o chamado *bacterioma core*. A estrutura dessa comunidade, em nível de filo, foi dominada por *Proteobacteria* (77,7%), seguida por *Bacteroidota* (8,9%) e *Actinobacteriota* (4,34%).

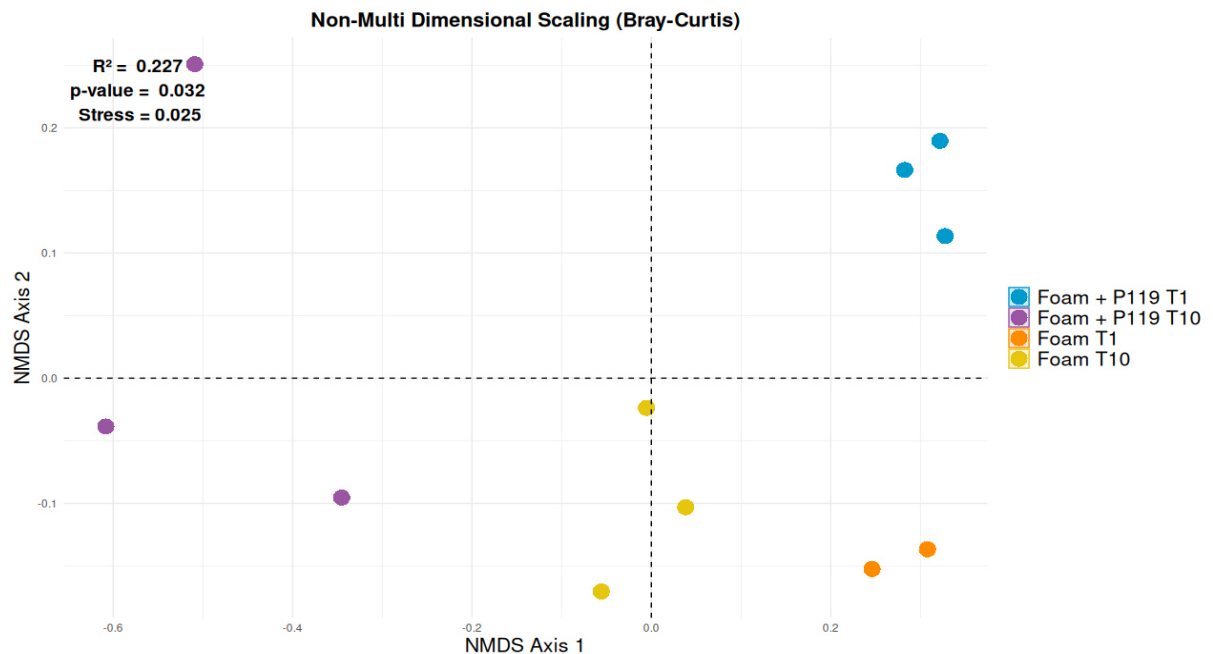
**Figura 12** - Diagrama de Venn de ASVs associadas aos tratamentos do teste de bioaumentação *in vitro* em ninho de espuma.



(Elaborado pelo autor)

## 5.4 Análises de Diversidade Beta

**Figura 13** - Análise de Escalonamento Multidimensional Não-Métrico (NMDS) referentes a ASVs, ilustrando a relação entre as 11 amostras analisadas.



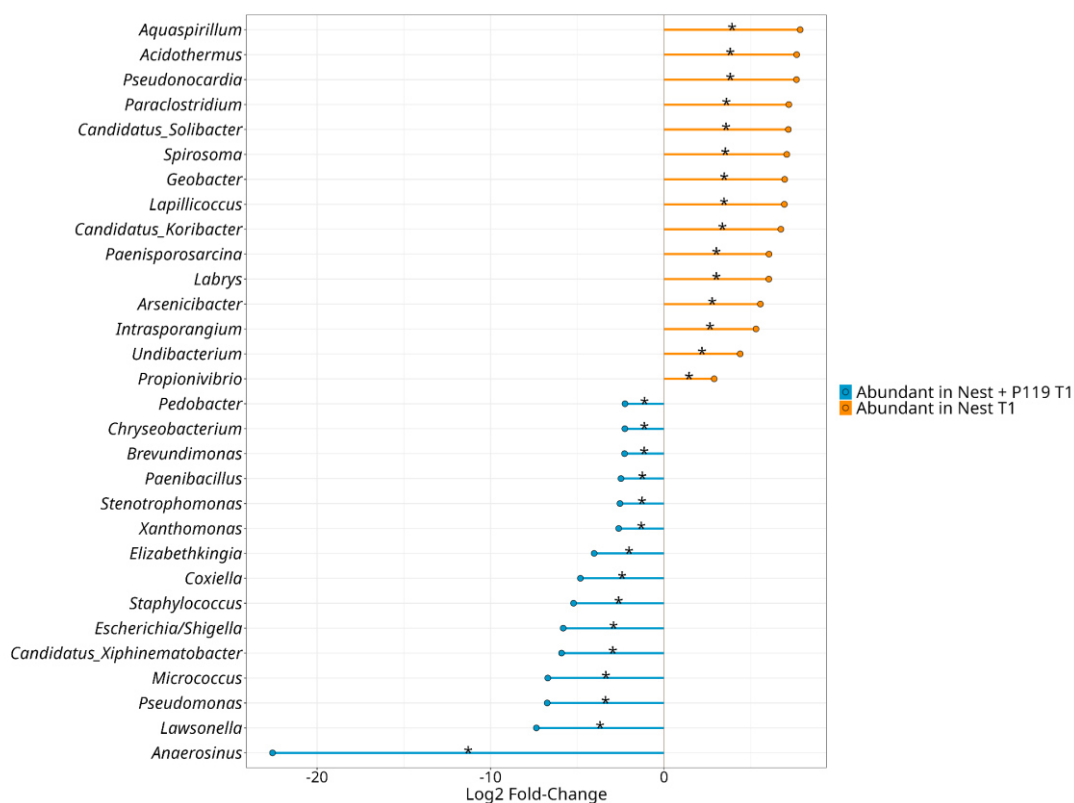
(Elaborado pelo autor)

A fim de verificar a diversidade Beta entre as comunidades, a análise Escalonamento Multidimensional Não Métrico (NMDS) baseado na distância de Bray-Curtis demonstrou diferença significativa entre a composição das comunidades ( $p < 0,05$ ) e uma ótima representação do modelo para as distâncias de dissimilaridade ( $\text{stress} = 0.025$ ). Observa-se que houve agrupamento das amostras principalmente em relação ao Tempo, sugerindo uma maior relação da composição da comunidade com o tempo de bioaugmentação do que com a inoculação de *Pseudomonas*.

### 5.5 Análise diferencial de abundância a nível de gênero.

A análise de abundância diferencial (Figura 14) demonstrou os gêneros que tiveram sua abundância influenciada pela adição da cepa de *Pseudomonas*. No Tempo 1 observa-se gêneros que tiveram abundância diminuída significativamente pela adição da cepa (*Pedobacter*, *Chryseobacterium*, *Brevundimonas*, *Paenibacillus*, *Stenotrophomonas*, *Xanthomonas*, *Elizabethkingia*, *Coxiella*, *Staphylococcus*, *Escherichia/Shigella*, *Candidatus Xiphinematobacter*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Lawsonella* e *Anaerosinus*) e que tiveram a abundância aumentada (*Aquaspirillum*, *Acidothermus*, *Pseudonocardia*, *Paraclostridium*, *Candidatus Solibacter*, *Spirosoma*, *Geobacter*, *Lapillicoccus*, *Candidatus Koribacter*, *Paenisporosarcina*, *Labrys*, *Arsenicibacter*, *Intrasporangium*, *Undibacterium* e *Propionivibrio*).

**Figura 14** - Análise diferencial de abundância a nível de gênero para as amostras em T1

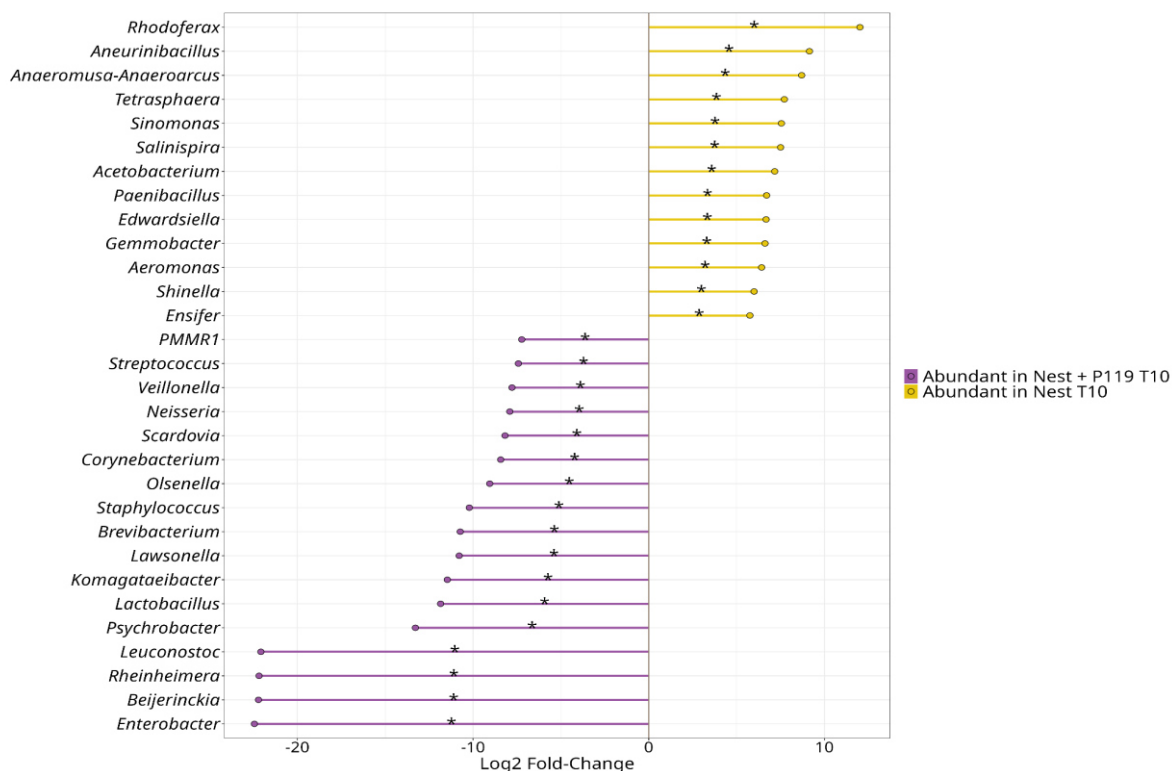


(Elaborado pelo autor)

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

Já para o Tempo 10 (Figura 15) obteve-se o aumento dos seguintes gêneros com adição da cepa: *Rhodoferrax*, *Aneurinibacillus*, *Anaeromuso-Angeroarcus*, *Tetrasphaera*, *Sinomonas*, *Salinispira*, *Acetobacterium*, *Paenibacillus*, *Edwardsiella*, *Gemmobacter*, *Aeromonas*, *Shinella* e *Ensifer*. Enquanto os seguintes diminuíram: *Caulobacter sp.* PMMR 1, *Streptococcus*, *Veillonella*, *Neisseria*, *Scardovia*, *Corynebacterium*, *Olsenella*, *Staphylococcus*, *Brevibacterium*, *Lawsonella*, *Komagataeibacter*, *Lactobacillus*, *Psychrobacter*, *Leuconostoc*, *Rheinheimera*, *Beijerinckia* e *Enterobacter*.

**Figura 15** - Análise diferencial de abundância a nível de gênero para as amostras em T10



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

(Elaborado pelo autor)

## 5.6 Rede de interações

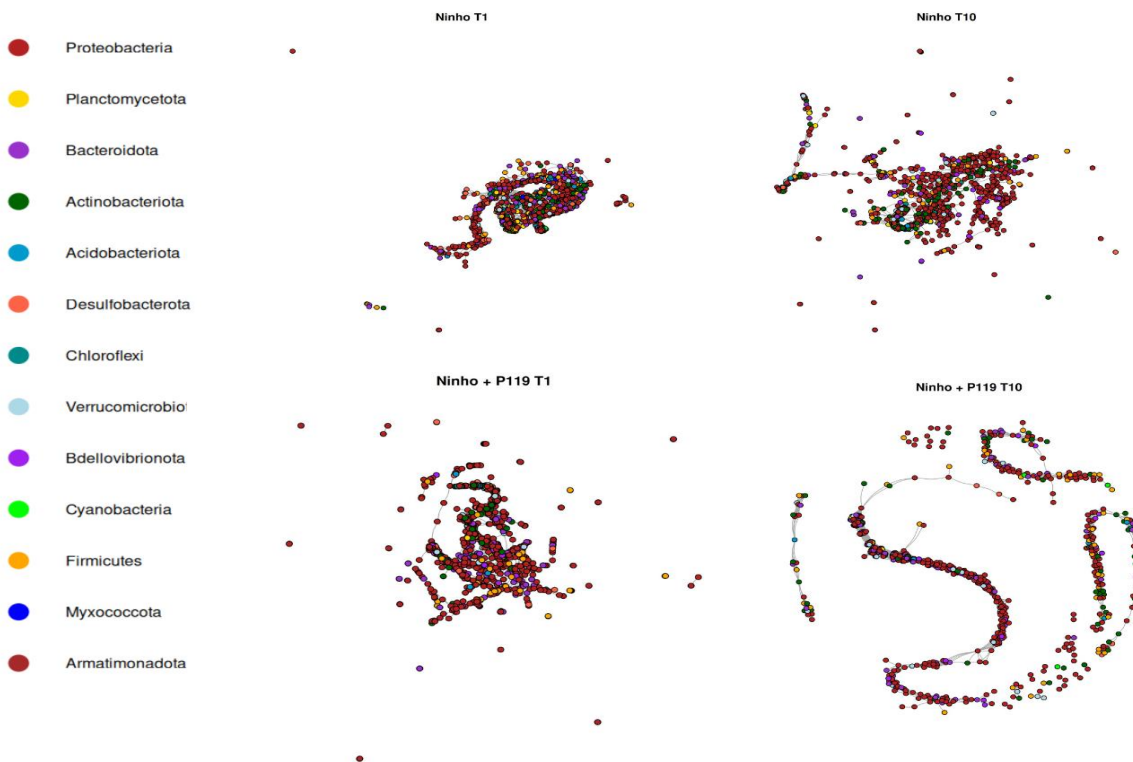
As redes de interações (Figura 16) demonstraram que a bioaumentação com P119 afetou significativamente a estrutura e a conectividade das redes. Observou-se que o número de interações (arestas) aumentou consideravelmente ao longo do tempo no ambiente não tratado (Ninho T10), sugerindo um desenvolvimento natural da complexidade das interações. A adição de P119 no tempo T1, ao comparar com as amostras sem o inoculante também em T1, resultou em um aumento no número de arestas e vértices e numa diminuição no diâmetro da rede, sugerindo um microbioma bem interligado. Entretanto, ao comparar o tempo de 10 dias com P119 e sem P119, observou-se um ambiente com uma menor quantidade de vértices e arestas e maior diâmetro de rede.

Os valores de transitividade gráfica mostraram uma alta tendência de formação de grupos de bactérias que desempenham funções semelhantes em todos os tratamentos, indicando

que a estrutura modular é uma característica comum nessas redes. A densidade da rede, que representa a proporção de interações existentes, foi maior no ambiente não tratado em T10, corroborando o aumento no número de interações. A adição de P119, especialmente em T10, resultou em um aumento na densidade da rede, sugerindo que a bioaugmentação pode ter afetado a conectividade global da comunidade.

O diâmetro da rede, revelou que o ambiente não tratado em T1 apresentava a maior distância entre as bactérias, enquanto a adição de P119 em T1 resultou em uma rede mais compacta. A modularidade foi alta em todos os tratamentos, indicando que a formação de módulos distintos é uma característica comum nessas redes. Por fim, cabe destacar que parece haver uma manutenção da complexidade rede ao longo do tempo com a adição da bactéria.

**Figura 16** - Redes de interações bacterianas para os diferentes tratamentos do ensaio de bioaugmentação *in vitro* em ninhos de espuma.



(Elaborado pelo autor)

**Tabela 4 - Parâmetros das redes de interação bacteriana para cada tipo de tratamento.**

	<b>Arestas</b>	<b>Vértices</b>	<b>Transitividad e</b>	<b>Densidade gráfica</b>	<b>Diâmetro da rede</b>	<b>Modularidade</b>
<b>Ninho T1</b>	11192	738	0,789794	0,041154	38	0,76
<b>Ninho T10</b>	39441	1251	0,728731	0,050444	22	0,62
<b>Ninho + P119 T1</b>	28137	1148	0,712959	0,042737	18	0,78
<b>Ninho + P119 T10</b>	21149	771	0,7627	0,071248	28	0,70

## 6 DISCUSSÃO

As análises de diversidade mostraram que o Ninho no Tempo 1 obteve os maiores valores para todos os índices de diversidade, enquanto o Ninho + P119 no Tempo 10 os menores. Isto sugere que a adição de *Pseudomonas* e o maior tempo de bioaumentação influenciam consideravelmente na diversidade da comunidade microbiana dos ninhos de espuma.

A composição de filós nas amostras é muito semelhante ao que já se obteve em outros estudos com *Leptodactylus vastus* (Monteiro et al. 2023), sendo os filós dominantes na maioria das amostras *Proteobacteria*, em primeiro lugar, seguida de *Firmicutes* e *Bacteroidota*. No entanto nota-se mudanças no padrão de filós com adição de *Pseudomonas*. No Tempo 1 há domínio de *Firmicutes* (21,6%) e a presença de *Fusobacteria* em alta abundância (3,83%). Já no Tempo 10 há a presença de *Actionobacterias* (2,9%). É interessante ressaltar que, ao se analisar a estrutura dos filós do bacterioma core das ASVs, existe grande semelhança com os filós em alta proporção em Ninho + P119 T10, o que sugere que os tratamentos não influenciaram na composição da comunidade core.

Cabe notar que o domínio de *Firmicutes* no Tempo 1 com inoculante foi preponderante devido a presença do grupo *Paenibacillus*, gênero de bactérias conhecidas pela produção de moléculas antifúngicas (Monteiro et al. 2023). Ademais, a presença de *Bacteroidota* foi caracterizada pela abundância do gênero *Pedobacter*, bactéria típica de solos, encontradas também na rizosfera de plantas.

A abundância de *Pseudomonas*, gênero do inoculante, nas amostras indica uma baixa manutenção da cepa à dinâmica da comunidade. Isso é evidenciado pelo fato de que um valor significativo de abundância do grupo (n = 14%) foi observado apenas no grupo controle no Tempo 1 da bioaumentação, enquanto no Tempo 10 e nos tratamentos com o inoculante, o número de ASVs apresentou uma queda considerável (n < 1%)

É importante ressaltar a dificuldade de prever os resultados da interação entre probióticos e o microbioma de anuros. Além de ser um tema pouco estudado, somente alguns estudos conseguiram obter sucesso manipulando microbiomas para uma função específica (Becker et al., 2022). As tentativas de introduzir probióticos em anuros, levaram a resultados diversos: segundo estudos realizados por Kueneman et al. (2016), a inoculação de *J. lividum* em adultos de *R. muscosa* infectados por *Bd* aumentou a taxa de sobrevivência em até 40% em comparação com indivíduos infectados que não receberam o probiótico através do aumento da abundância da cepa, em contraste, a aplicação da mesma bactéria em sapos-dourados do

Panamá (*Atelopus zeteki*) não proporcionou proteção contra *Bd*, e os níveis de *J. lividum* reduziram progressivamente ao longo do experimento (Becker et al. 2012). Ademais, é necessário cautela ao se avaliar os resultados do probiótico na comunidade bacteriana: é sabido que os táxons microbianos podem alternar entre inibir ou promover o crescimento de patógenos, dependendo da composição da comunidade (Antwis et al., 2018). Em casos mais extremos, podem mudar de benéficos para parasíticos (ou vice-versa), em processos possivelmente mediados por fatores do hospedeiro (Bates et al., 2021).

As análises de diversidade beta indicam que as amostras se agrupam mais em função do tempo do que do tratamento, sugerindo que o tempo de bioaugmentação tem um impacto maior na similaridade dos microbiomas. Isso pode estar relacionado a processos dinâmicos de competição e estabilização da comunidade bacteriana ao longo do tempo. Além disso, observa-se uma diferença abrupta entre as amostras com inoculante nos Tempos 1 e 10. Considerando a baixa abundância da cepa no décimo dia, isso sugere que a inoculação provoca mudanças significativas na diversidade do Ninho, mesmo sem conseguir persistir ao longo do tempo. É notório que diversos estudos têm como principal problema fazer com que as bactérias probióticas alcancem uma densidade limiar necessária para se produzir metabólitos anti-Bd em concentrações mínimas para proteção contra patógenos (Becker et al., 2022)

Vale ressaltar, que embora a adição de *Pseudomonas* não tenha persistido, tal fator, por si só, não indica o fracasso da mesma como futuro probiótico. De acordo com a hipótese do probiótico-chave é possível que um probiótico possa proteger anfíbios mesmo estando em baixa abundância por estabelecer mudanças significativas na comunidade: um controle indireto, em que não necessariamente os metabólitos produzidos pela cepa seriam responsáveis pela inibição do patógeno (modelo do probiótico abundante), mas sim as interações ecológicas com a comunidade.

Ademais, cabe ressaltar que as ferramentas de bioinformática foram essenciais para este estudo, permitindo uma análise detalhada da estrutura da comunidade bacteriana ao longo do tempo e dos impactos da bioaugmentação com *Pseudomonas putida*. O uso de pipelines robustos, como *DADA2* para o processamento das sequências e bancos de dados como *SILVA 138 SSU* para classificação taxonômica, garantiu alta precisão na identificação das ASVs. Além disso, a aplicação dos pacotes *Phyloseq*, *Vegan* e *igraph* possibilitou avaliar a diversidade microbiana, identificar diferenças na composição bacteriana entre os tratamentos e explorar as redes de interação entre os microrganismos.

Por fim, nota-se que o presente estudo atingiu com sucesso seus objetivos ao analisar as sequências de *amplicon rRNA 16S* de ninhos de espuma, permitindo a caracterização da

estrutura da comunidade bacteriana em diferentes tempos de bioaugmentação. As análises revelaram os impactos da inoculação no bacterioma, evidenciando alterações na composição microbiana e nas interações ecológicas.

Embora este estudo tenha fornecido insights importantes sobre os impactos da bioaugmentação com *Pseudomonas putida* P119 na estrutura da comunidade microbiana dos ninhos de espuma, mais pesquisas são necessárias para aprofundar a compreensão desses efeitos. Estudos adicionais que investiguem a funcionalidade das bactérias envolvidas, por meio de abordagens metagenômicas e metabolômicas, poderiam esclarecer os mecanismos responsáveis pelas alterações observadas. Além disso, testes *in vitro* com *Batrachochytrium dendrobatidis* são fundamentais para avaliar a real eficácia da bioaugmentação como estratégia probiótica contra a quitridiomíose. Também seria relevante explorar a persistência da cepa inoculada ao longo do tempo e seu impacto ecológico a longo prazo. Dessa forma, investigações futuras poderão contribuir para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes e sustentáveis na conservação de anfíbios ameaçados.

## 7 CONCLUSÃO

Conclui-se, portanto, que os resultados deste estudo revelam que a adição de *Pseudomonas* e o tempo de bioaugmentação influenciam a diversidade microbiana nas amostras de ninhos de espuma, com um impacto significativo na diversidade microbiana em tratamentos com *Pseudomonas* ao longo do tempo. Embora a composição de filos tenha seguido padrões já observados em outros estudos com *Leptodactylus vastus*, algumas alterações foram notadas com a introdução do inoculante, como o domínio de *Firmicutes* no Tempo 1 e a presença de *Fusobacteria* e *Actinobacteria* em diferentes momentos. A baixa persistência da *Pseudomonas* na comunidade sugere dificuldades na adesão e manutenção de probióticos no microbioma de ninhos de espuma. No entanto, a análise das interações ecológicas entre as bactérias e a comunidade microbiana sugere que, mesmo em baixa abundância, um probiótico pode gerar efeitos benéficos indiretos, como a modulação da comunidade, sem necessariamente exigir altas concentrações para a produção de metabólitos protetores. Esses achados destacam a complexidade da manipulação do microbioma de anuros e a necessidade de mais estudos para entender melhor as interações entre probióticos e comunidades microbianas em diferentes contextos ambientais. Futuros estudos devem investigar estratégias para aumentar a persistência de *Pseudomonas* no microbioma dos ninhos, além de avaliar os impactos funcionais dessas modificações na proteção contra *Batrachochytrium dendrobatidis*.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABARCA, J.G. et al. **Assessment of bacterial communities associated with the skin of Costa Rican amphibians at La Selva Biological Station.** *Frontiers in Microbiology*, v. 9, p. 2001, 2018.
- ANSORGE, Rebecca; HILDEBRAND, Falk; TELATIN, Andrea. **7. Microbiome Informatics.**
- ANTWIS, Rachael E.; HARRISON, Xavier A. **Probiotic consortia are not uniformly effective against different amphibian chytrid pathogen isolates.** *Molecular Ecology*, v. 27, n. 2, p. 577-589, 2018.
- BECKER, Matthew H. et al. **Genetically modifying skin microbe to produce violacein and augmenting microbiome did not defend Panamanian golden frogs from disease.** *ISME communications*, v. 1, n. 1, p. 57, 2021.
- BECKER MH, Harris RN, Minbiole KPC, Schwantes CR, Rollins-Smith LA, Reinert LK, Brucker RM, Domangue RJ, Gratwicke B. 2012 **Towards a better understanding of the use of probiotics for preventing chytridiomycosis in Panamanian golden frogs.** *Ecohealth* 8, 501– 506. (doi:10.1007/s10393- 012-0743-0)
- BLETZ, Molly 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, p. 1751, 2017.
- BROOMHALL, S.D. **Measuring chemical impacts on amphibians: ecotoxicity and behavioural data in governmental regulation.** *Applied Herpetology*, v. 2, p. 259-285, 2005.
- BRUCKER, Robert M. et al. **Amphibian chemical defense: antifungal metabolites of the microsymbiont *Janthinobacterium lividum* on the salamander *Plethodon cinereus*.** *Journal of Chemical Ecology*, v. 34, p. 1422-1429, 2008.
- CALLAHAN, B.J. et al. **DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data.** *Nature Methods*, v. 13, p. 581–583, 2016.
- CAMPOS-CERDA, Felipe; BOHANNAN, Brendan JM. **The nidobiome: a framework for**

**understanding microbiome assembly in neonates.** Trends in Ecology & Evolution, v. 35, n. 7, p. 573-582, 2020.

CASTRO, L. G. Z. DE. **Prospecção de microrganismos isolados de ninho de espuma de Leptodactylus vastus e Physalaemus cuvieri com potencial biotecnológico.** 2019.

COSTA, Vanessa Ariane Silva da. **Influência da adição de Pseudomonas putida no bacterioma do ninho de espuma de Leptodactylus vastus: uma nova abordagem com potencial para a conservação de anuros.** 2024. 93 f. Dissertação (Mestrado em Sistemática, Uso e Conservação da Biodiversidade) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2024.

DALE, Virginia H. et al. **Relating patterns of land-use change to faunal biodiversity in the Central Amazon.** Conservation biology, v. 8, n. 4, p. 1027-1036, 1994.

DASZAK, Peter; CUNNINGHAM, Andrew A.; HYATT, Alex D. **Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife.** Acta tropica, v. 78, n. 2, p. 103-116, 2001.

DOS SANTOS MENDES, Mirian et al. **Detection of the Fungus Batrachochytrium dendrobatidis in Anurans from the Semiarid Region of Brazil: new Infection Records for Endemic Species.** South American Journal of Herpetology, v. 33, n. 3, p. 24-32, 2024.

DOWNIE, J. R.; SMITH, Joanna. **Survival of larval Leptodactylus fuscus (Anura: Leptodactylidae) out of water: developmental differences and interspecific comparisons.** Journal of Herpetology, v. 37, n. 1, p. 107-115, 2003.

FISHER, M.C.; GARNER, T.W.J. **Chytrid fungi and global amphibian declines.** Nature Reviews Microbiology, v. 18, p. 332–343, 2020.

FLEMING, Rachel I. et al. **Foam nest components of the tungara 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.

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

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

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, p. 207–217, 2005.

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

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, p. 2707–2711, 2008.

JIMÉNEZ, Randall R.; SOMMER, Simone. **The amphibian microbiome: natural range of variation, pathogenic dysbiosis, and role in conservation.** *Biodiversity and Conservation*, v. 26, p. 763-786, 2017.

JUNCÁ, FLORA ACUÑA et al. **Girinos como bioindicadores da qualidade da água do Rio Doce.** DADOS, 2017.

KARASOV, W. H. et al. **Field exposure of frog embryos and tadpoles along a pollution gradient in the Fox River and Green Bay ecosystem in Wisconsin, USA.** *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 24, p. 942–953, 2005.

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

LIPS, Karen R. et al. **Emerging infectious disease and the loss of biodiversity in a Neotropical amphibian community.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 103, n. 9, p. 3165-3170, 2006.

MCGRATH-BLASER, S. et al. **Early life skin microbial trajectory as a function of vertical and environmental transmission in Bornean foam-nesting frogs.** *Animal Microbiome*, v. 3, p. 83, 2021.

MENDEZ-NARVAEZ, J. et al. **Foam nests provide context-dependent thermal insulation to embryos of three leptodactylid frogs.** *Physiology and Biochemical Zoology*, v. 88, p. 246–253, 2015.

MONTEIRO, Felipe Augusto Correia et al. **Neotropical frog foam nest's microbiomes.** *Microorganisms*, v. 11, n. 4, p. 900, 2023.

- MYERS, J. M. et al. **Synergistic inhibition of the lethal fungal pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*: the combined effect of symbiotic bacterial metabolites and antimicrobial peptides of the frog *Rana muscosa***. *Journal of Chemical Ecology*, v. 38, n. 8, p. 958–965, ago. 2012.
- POMBAL, J.P., Jr.; HADDAD, C.F.B. **Estratégias e modos reprodutivos em anuros**. In *Herpetologia no Brasil II*; Sociedade Brasileira de Herpetologia: Belo Horizonte, Brazil, 2007; p. 101–116.
- PORETSKY, Rachel et al. **Strengths and limitations of 16S rRNA gene amplicon sequencing in revealing temporal microbial community dynamics**. *PLoS One*, v. 9, n. 4, p. e93827, 2014.
- ROSENBLUM, Erica Bree et al. **Complex history of the amphibian-killing chytrid fungus revealed with genome resequencing data**. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 110, n. 23, p. 9385-9390, 2013.
- STUART, S. N. et al. **Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide**. *Science*, v. 306, p. 1783–1786, 2004.
- VOYLES, Jamie et al. **Pathogenesis of chytridiomycosis, a cause of catastrophic amphibian declines**. *Science*, v. 326, n. 5952, p. 582-585, 2009.
- WALKE, Jenifer B.; BELDEN, Lisa K. **Harnessing the microbiome to prevent fungal infections: lessons from amphibians**. *PLoS Pathogens*, v. 12, n. 9, p. e1005796, 2016.
- WELLS, K.D. **Chapter 10: The natural history of amphibian reproduction**. In *The Ecology and Behavior of Amphibians*; University of Chicago Press: Chicago, IL, USA, 2007; p. 451–515.
- WOODHAMS, Douglas C. et al. **Resistance to chytridiomycosis varies among amphibian species and is correlated with skin peptide defenses**. *Animal Conservation*, v. 10, n. 4, p. 409-417, 2007.
- YÁNEZ-MUÑOZ, M., & MEZA-RAMOS, P. **Anfibios y Reptiles de la Reserva los Encinos**. Technical Report, v. 13, n. January, 2006.

ZIMMERMAN, Barbara L.; BIERREGAARD, Richard O. **Relevance of the equilibrium theory of island biogeography and species-area relations to conservation with a case from Amazonia.** Journal of biogeography, p. 133-143, 1986

PEIX, Alvaro; RAMÍREZ-BAHENA, Martha-Helena; VELÁZQUEZ, Encarna. **The current status on the taxonomy of Pseudomonas revisited: an update.** Infection, Genetics and Evolution, v. 57, p. 106-116, 2018.

LIN, S.Y., Hameed, A., Liu, Y.C., Hsu, Y.H., Lai, W.A., Chen, W.M., Shen, F.T., Young, C.C., 2013a. **Pseudomonas sagittaria sp. nov., a siderophore-producing bacterium isolated from oil-contaminated soil.** Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 63, 2410–2417.

WOESE, C.R., Stackebrandt, E., Weisburg, W.G., Paster, B.J., Madigan, M.T., Fowler, V.J., Hahn, C.M., Blanz, P., Gupta, R., Nealson, K.H., Fox, G.E., 1984. **The phylogeny of purple bacteria: the alpha subdivision.** Syst. Appl. Microbiol. 5, 315–326.

LOPER, Joyce E.; GROSS, Harald. Genomic analysis of antifungal metabolite production by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. **New perspectives and approaches in plant growth-promoting rhizobacteria research**, p. 265-278, 2007.

DEGARADY, C. J. & HOLBROOK, R. S. 2006. **Using Anurans as Bioindicators of PCB Contaminated Streams.** Journal of Herpetology, 40: 127-130.

MENÉNDEZ-GUERRERO, Pablo A.; GREEN, David M.; DAVIES, T. Jonathan. **Climate change and the future restructuring of Neotropical anuran biodiversity.** Ecography, v. 43, n. 2, p. 222-235, 2020.