



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

LUZIA GABRIELLE ZEFERINO DE CASTRO

**PROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS ISOLADOS DE NINHO DE ESPUMA DE
Leptodactylus vastus E *Physalaemus cuvieri* COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO**

FORTALEZA

2019

LUZIA GABRIELLE ZEFERINO DE CASTRO

PROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS ISOLADOS DE NINHO DE ESPUMA DE
Leptodactylus vastus E *Physalaemus cuvieri* COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

Monografia apresentada ao curso de
Graduação em Biotecnologia da Universidade
Federal do Ceará, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.
Orientadora: Profa. Dra. Denise Cavalcante Hissa.
Coorientadora: Dra. Francisca Andrea da Silva
Oliveira.

FORTALEZA

2019

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

C351p Castro, Luzia Gabrielle Zeferino de.
Prospecção de microrganismos isolados de ninho de espuma de *Leptodactylus vastus* e *Physalaemus cuvieri* com potencial biotecnológico. / Luzia Gabrielle Zeferino de Castro. – 2019.
51 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2019.

Orientação: Profa. Dra. Denise Cavalcante Hissa.

Coorientação: Profa. Dra. Francisca Andréa da Silva Oliveira.

1. Anfíbios. 2. Biomoléculas. 3. Gene 16S. 4. Microbiota. I. Título.

CDD 661

LUZIA GABRIELLE ZEFERINO DE CASTRO

PROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS ISOLADOS DE NINHO DE ESPUMA DE
Leptodactylus vastus E *Physalaemus cuvieri* COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

Monografia apresentada ao curso de
Graduação em Biotecnologia da Universidade
Federal do Ceará, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Denise Cavalcante
Hissa.

Coorientadora: Dra. Francisca Andrea da Silva
Oliveira.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dra. Vânia Maria Maciel Melo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Nicholas Costa Barroso Lima
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à Deus por nunca me abandonar e permitir que a graça dele estender-se até mim. Em seguida, agradeço a minha família por me apoiar incondicionalmente. À minha mãe **Goreth** e avó **Luzia**, por sonhar pra mim planos mais ambiciosos que os meus, nunca duvidar do meu potencial e segurar minha mão durante todo o caminho. À minha irmã **Helen** por ser uma amiga tão fiel e me sequestrar dos estudos pra me divertir, não sei como agradecer por você. E a cada um dos meus familiares por serem uma parte de quem eu sou, eu amo demais vocês.

Um imenso obrigada à **Profa. Dra. Denise Cavalcante Hissa**, que além de ser um ser humano extremamente gentil é uma orientadora extraordinária. Muito obrigada pelas palavras sinceras, por sempre escutar o que eu tenho a dizer e incentivar a minha curiosidade científica. É uma honra ser orientada pela senhora.

Queria agradecer também à **Dra. Francisca Andréa Oliveira**, por acreditar no meu potencial mesmo quando eu não acreditava nele, e me co-orientar como uma amiga. A molecular é pequena demais para a mulher incrível que você é.

Agradeço também à **Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo**, por aceitar participar da banca examinadora deste trabalho, mas principalmente, por sempre dar ensinamentos valiosos e nos contaminar pela sua paixão pela ciência.

Ao **Prof. Dr. Nicholas Costa Barroso Lima**, por ser um professor atencioso e solícito a responder qualquer dúvida que surgia na minha cabeça. Agradeço também pelas aulas leves, mas cheias de ensinamentos e descobertas. E por fim, por aceitar participar da banca examinadora deste trabalho.

À **Dra. Mirella Leite**, que nunca ignorou qualquer um dos meus questionamentos impossíveis. Que me fez rir mais vezes do que eu consigo contar, mas que também me ensinou mais coisas do que consigo listar aqui. Mimi, obrigada por cantar o meu nome de várias formas possíveis, pelos abraços, por todas as ajudas. Eu tenho certeza que a Cecília está em ótimas mãos.

Não poderia deixar de agradecer à **Raissa Dias**, que dividiu comigo sonhos, medos e incontáveis horas de autoclave. Obrigada por tirar paranoias da minha cabeça, por acreditar em mim e me permitir crescer ao teu lado. Também não posso deixar de falar sobre a **Clara Nogueira** e a **Vanessa Rodrigues**, pelas risadas, pelas brigas, pelo apoio emocional e conselhos. Amigas, vocês possuem a minha eterna gratidão pelas pessoas extraordinárias que vocês são.

Às minhas tutoras, **Claudiane Carvalho** e **Sara Pires** que compartilharam resumos, conselhos e horas de conversas que me curaram por dentro. Obrigada por sempre acreditarem em mim e por segurarem na minha mão, amo vocês.

Não sei nem como agradecer à **Lara Isensee, Liandra Ellen e Melissa Rios**. Essa monografia não estaria aqui se vocês não tivessem dividido todos os fardos desses últimos meses comigo. Além de mão de obra, vocês me ofereceram um lugar seguro para desabafar. Obrigada por doar tantas horas do tempo de vocês, por confiar em mim e por encarar como um trabalho de equipe. Nem toda tutoria do mundo pagaria por tudo isso. Muito obrigada.

O meu muito obrigada a todos que fazem parte do **LARGEN** e **LEMBIOTECH**, vocês são uma família para mim e eu não sei dizer o quão sou grata sou por vocês me aceitarem como uma de vocês. Principalmente ao **Igor Oliveira Duarte**, que foi como um irmão mais velho, me ajudando com todos os gráficos desse trabalho e me fazendo rir com o jeito único dele.

Por fim, queria agradecer a coordenação do curso de bacharelado em Biotecnologia e a todos os professores que ajudaram nessa jornada. Também deixo aqui a minha gratidão a todos os órgãos de fomento, **Serrapilheira**, **CNPq** e **Funcap**, que contribuíram para a minha formação durante esses 4 anos.

“A ciência e a vida cotidiana não podem
e não devem ser separadas.”
(Rosalind Franklin)

RESUMO

Os ninhos de espuma são um dos modos de reprodução da classe dos anfíbios usados como estratégia para aumentar a possibilidade de fertilização dos ovos. Essas bioespumas atuam na proteção dos ovos e girinos, além de fornecer oxigênio; sendo sua estrutura e composição bioquímica essenciais para sua função. Os ninhos de espumas possuem como componentes principais proteínas surfactantes e carboidratos, além de possuir uma comunidade microbiana. Até o momento, não existem estudos sobre a microbiota associada aos ninhos de espuma e o seu papel no desenvolvimento dos girinos. O objetivo do atual estudo foi conhecer a microbiota cultivável dos ninhos de espuma de *Leptodactylus vastus* e *Physalaemus cuvieri* e prospectar enzimas com potencial biotecnológico. Para tanto, as bioespumas foram coletadas na Reserva Particular do Patrimônio Natural de Monte Alegre, na serra de Pacatuba/CE. Após a retirada dos resíduos sólidos presentes nos ninhos de espuma, as amostras foram diluídas seriadamente e plaqueadas usando a técnica de *spread plate*. Para fins comparativos, as amostras de água da poça de *P. cuvieri* e do solo da poça de *L. vastus* também foram plaqueadas. Após contagem de viáveis totais, os morfotipos encontrados nas placas da bioespuma foram isolados e armazenados em estoque glicerol 20% (v/v) nos freezers -80 °C. Os isolados tiveram seu DNA extraído por termólise e CTAB 2X, seguido da amplificação do gene rRNA 16S por PCR e sequenciamento pelo método de Sanger. Para os testes enzimáticos, os isolados foram cultivados em placas de ATGE suplementadas com tributirina (0,1% v/v), amido (0,1% p/v), gelatina (3% p/v) e leite desnatado (1% p/v), para verificar as atividades lipásicas, amilásicas e proteásicas, respectivamente. As colônias das placas de ninhos apresentaram uma média de contagem de viáveis de $2,82 \times 10^7$ UFC/ mL em *P. cuvieri* e $2,74 \times 10^7$ UFC/ mL em *L. vastus*, enquanto as culturas crescidas provenientes de amostras do ambiente tiveram $3,33 \times 10^4$ UFC/ mL para amostras de água de *P. cuvieri* e $1,41 \times 10^6$ UFC/ mL para amostras do solo da poça de *L. vastus*, apresentando uma diferença de unidades formadoras máxima de 1000 vezes maior do que as colônias de água e mínima de 10 vezes maior do que as de solo. Foram isolados 153 morfotipos e a identificação molecular mostrou a presença 32 gêneros de bactérias presentes nos dois ninhos, sendo 11 deles comuns nas duas espécies. Nas atividades enzimáticas, dos isolados de *P. cuvieri* 23 apresentaram resultados positivos para amilases, 66 para proteases e 56 para lipídios. Já os isolados de *L. vastus*, 14 apresentaram atividades amilásicas, 45 proteásicas e 41 para lipídios. Nossos resultados fornecem informações inéditas acerca da microbiota cultivável dos ninhos de espuma de *P. cuvieri* e *L. vastus*, demonstrando o seu potencial para descoberta de novas biomoléculas com potencial biotecnológico.

Palavras chaves: anfíbios, biomoléculas, gene 16S, microbiota.

ABSTRACT

Foam nests are one of the many reproductive mode found in amphibians, constituting a strategy to increase egg fertilization. They are known to protect eggs and tadpoles against UV radiation, predators and to provide oxygen supply. For these functions, its biochemical composition and structure are essential. Frog foam nests have as major components surfactant proteins and carbohydrates, besides a microbial community. So far, there are no studies concerning the associated microbiota in foam nests and their role in tadpole development nor they biotechnological potential. Hence, this study aimed to identify the cultivable foam nests bacterial community of *Leptodactylus vastus* and *Physalaemus cuvieri* and to prospect enzyme-producing microorganisms of biotechnological interest. Frog foams nests were collected at the na Reserva Particular do Patrimônio Natural de Monte Alegre, in Pacatuba/CE. Samples were serially diluted and plated using the spread plate technique. For comparative purposes, water and soil samples where the nests of were placed were also plated. After total viable counting, the morphotypes found in the foam nests plates were isolated and stored in glycerol 20% (v/v) stock in freezers at -80° C. The isolates had their DNA extracted by thermolysis and CTAB 2X, followed by the 16S rRNA gene amplification and sequencing by the Sanger method. For enzymatic tests, isolates were grown in ATGE plates supplemented with tributyrin (0.1% v/v), starch (0.1% w/v), gelatin (3% w/v) and skim milk (1 % w/v), to verify lipase, amylase and protease activities, respectively. The nests had a viable count average of 2.82×10^7 CFU/mL for *P. cuvieri* and 2.74×10^7 CFU/mL for *L. vastus*, while environmental samples had 3.33×10^4 CFU/mL in water where the foam nest of *P. cuvieri* was disposed and 1.41×10^6 CFU/mL for the soil where the foam nest of *L. vastus* was disposed. Compared with the water and soil samples, the foam nests presented approximately 1000 times greater than those of the water and 10 times larger than the soil. A total of 153 morphotypes were isolated and molecular identification showed the presence of 32 genera of bacteria, in which 11 were common for both species. In the enzymatic activities, 23 isolates of *P. cuvieri* showed positive results for amylase, 66 for proteases and 56 for lipases. On the other hand, *L. vastus* showed 14 amylase, 45 proteases, and 41 lipases. Our results show that foam nests provide a selection environment for microorganisms with biotechnological potential for the discovery of novel biomolecules.

Key Words: amphibian, biomolecules , gene 16S, microbiota.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – O impacto dos anfíbios em diversas áreas.....	15
Figura 2 - <i>Litoria caerulea infectada</i> por <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	17
Figura 3 – <i>Leptodactylus vastus</i> e o seu ninho de espuma em poça d'água	19
Figura 4 – <i>Adenomera hylaedactyla</i> e seu ninho de espuma terrestre	19
Figura 5 – <i>Rhacophorus omeimontis</i> durante amplexo e o seu ninho de espuma arbóreo.....	19
Figura 6 – Riqueza e diversidade dos morfotipos de ninhos de espuma, água e solo	30
Figura 7 – Gel de eletroforese agarose 1% com amplificação região rRNA 16S por PCR....	32
Figura 8 – Diagrama de Venn relacionando as OTUs presentes nos ninhos de espuma.....	33
Figura 9 - Abundância dos filos nos ninhos de espuma (%).....	34
Figura 10 - Abundância de gêneros encontrados nos ninhos de espumas (%)	35
Figura 11 - Produção de pigmento por <i>Rheinheimera sp.</i>	37
Figura 12 – Atividades enzimáticas dos isolados de <i>P. cuvieri</i>	38
Figura 13 - Atividades enzimáticas dos isolados de <i>L. vastus</i>	39
Figura 14 – Porcentagem de atividades positivas para cada um dos testes enzimáticos dos isolados de <i>Physaelamus cuvieri</i> e <i>Leptodactylus vastus</i> em relação ao total	40
Figura 15 - Isolados do ninho de <i>P. cuvieri</i> com pelo menos uma atividade nos substratos testados (tributirina, leite, gelatina e amido).....	41
Figura 16 - Isolados do ninho de <i>L. vastus</i> com pelo menos uma atividade nos substratos testados (tributirina, leite, gelatina e amido).....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Aplicações das hidrolases microbianas na indústria	21
Tabela 2 – Concentrações finais utilizadas na reação de PCR para 75 µL	28
Tabela 3 – Unidades Formadoras de Colônia (UFC/mL) nas diferentes amostras.....	31
Tabela 4 –Morfotipos de bactérias isoladas dos ninhos de espuma das espécies <i>P. cuvieri</i> e <i>L. vastus</i>	31
Tabela 5 – Relação entre morfotipos e quantidade de OTUs presentes nos ninhos de espuma	33
Tabela 6 – OTUs exclusivas presentes em apenas um dos ninhos de espuma	36

SUMÁRIO

1.	1. INTRODUÇÃO	13
2.	2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
	2.1 AMEAÇAS AOS ANFÍBIOS E A BUSCA POR PROBIÓTICOS MAIS EFICAZES	15
	2.2 AS ENZIMAS E AS SUAS APLICAÇÕES NA INDÚSTRIA	20
3.	3. OBJETIVOS	24
	3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
4.	4. METODOLOGIA	25
	4.1 ÁREA DE ESTUDO E COLETA DOS NINHOS DE ESPUMA	25
	4.2 DILUIÇÃO SERIADA E PLAQUEAMENTO	25
	4.3 ISOLAMENTO DOS MORFOTIPOS.....	26
	4.4 ESTOCAGEM DA COLEÇÃO BACTERIANA	26
	4.5 EXTRAÇÃO DE DNA	26
	4.6 AMPLIFICAÇÃO DO GENE RIBOSSOMAL 16S	27
	4.7 PURIFICAÇÃO E PRECIPITAÇÃO DO DNA.....	28
	4.8 ANÁLISE DAS SEQUENCIAS E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR	28
	4.9 TESTES ENZIMÁTICOS	29
5.	5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
	5.1 ISOLAMENTO DA COLEÇÃO BACTERIANA	30
	5.2 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS ESTIRPES BACTERIANAS	32
	5.3 ATIVIDADES ENZIMÁTICAS	37
6.	6. CONCLUSÃO	44
7.	7. REFERÊNCIAS	45

1. INTRODUÇÃO

Os ninhos de espuma possuem um papel importantíssimo no ciclo de vida dos anfíbios, uma vez que conferem abrigo aos ovos depositados. Além disso, o ninho de espuma protege os ovos contra os raios ultravioletas (HISSA et al., 2008), de predadores e efeitos de dessecação, inclusive, aumenta a possibilidade de fertilização e o fornecimento de oxigênio (ARZABE, 2009). Igualmente as suas funções, os ninhos também representam uma das formas de reprodução dos anfíbios, sendo esse conhecimento essencial para conservação dessas espécies diante do grande declínio populacional que esse grupo vem enfrentando. O principal responsável por essas ameaças emergentes é o fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd), um patógeno aquático que infectou a pele desses animais ao longo dos últimos anos, levando ao declínio de 501 espécies e 90 a extinção (SCHEELE et al., 2019).

Apesar do impacto dessa doença nos anfíbios, existem poucos estudos sobre o monitoramento do fungo no Brasil. No país existem cerca de 800 espécies descritas, sendo que aproximadamente 500 são endêmicas e estão em constante risco de declínio (VERDADE; DIXO; CURCIO, 2010). Como exemplo podemos destacar 20 espécies da família *Leptodactylidae* que já foram vitimadas pelo fungo (OLSON, D. Y RONNENBERG, 2014). Sobretudo, a espécie *Physalaemus cuvieri* que já teve a morte de indivíduos causada pela infecção com o fungo Bd. Por outro lado, a espécie endêmica do nordeste brasileiro *Leptodactylus vastus* não possui registro de morte causada pela doença (MESQUITA et al., 2017).

Por isso, várias estratégias para a conservação dessas espécies estão sendo pesquisadas, dentre elas o conhecimento da microbiota da pele dos anfíbios (CIKANEK et al., 2015; FLECHAS et al., 2018; HOLDEN et al., 2015; REBOLLAR et al., 2019). Esses estudos levaram a descoberta de que alguns microrganismos presentes conseguem inibir o crescimento do fungo *in vitro* e *in vivo* (LAM et al., 2010). Entretanto, o insucesso do uso dessas bactérias como probiótico para tratamento em algumas espécies ameaçadas (WOODHAMS et al., 2019) levantou dúvidas sobre a dinâmica dessa comunidade bacteriana e dos fatores que podem influenciar a sua permanência na pele desses animais. Dessa forma, alguns pesquisadores destacaram que microrganismos presentes em estágios de desenvolvimento ou crescimento poderiam ser melhores alvos probióticos (REBOLLAR et al., 2016).

Por isso, os ninhos de espuma são ambientes propícios para a busca de microrganismos que sejam probióticos mais eficazes. Apesar de existirem vários estudos sobre a função ecológica dos ninhos de espumas, o conhecimento da comunidade bacteriana presente neles (HISSA et al., 2008) ainda representa uma lacuna. Diante disso, o presente estudo pretende

conhecer a comunidade bacteriana cultivável do ninho de espuma de duas espécies de anuros, além de prospectar microrganismos capazes de produzir moléculas com potencial biotecnológico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Ameaças aos anfíbios e a busca por probióticos mais eficazes

A classe *Amphibia* é composta por uma grande diversidade de sapos, rãs, pererecas e salamandras. Conhecidos pela habilidade de viverem em diferentes habitats durante o seu ciclo de vida, onde na fase adulta vivem na terra e a na fase larval em água. Essa dualidade possibilitou que estes animais desenvolvessem algumas estratégias de sobrevivência durante a sua evolução (HOPKINS, 2007).

Os anfíbios são considerados organismos modelos contribuindo em diversas áreas de estudos (FIGURA 1). Por muitos anos, pesquisadores utilizaram os anfíbios para entender como a competição entre presa e predador influenciava na dinâmica estrutural da comunidade (PECHMANN et al., 1991). Outros estudos foram realizados utilizando esses organismos como bioindicadores de mudanças climáticas, devido ao modo de respiração cutânea, servindo assim para detecção de uma determinada condição ambiental no ecossistema, como exemplo a influência de pesticidas (HOPKINS, 2007; RELYEA; SCHOEPPNER; HOVERMAN, 2005). A pele dos anfíbios também é alvo de estudos para a produção de produtos biotecnológico, onde a secreção da pele de *Phyllomedusa bicolor*, conhecido na cultura indígena como *Kombô* é usado como medicamento, sendo capaz de inibir o crescimento da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* e do protozoário *Trypanosoma cruzi* (SILVA; MONTEIRO; BERNARDE, 2019).

Figura 1 – O impacto dos anfíbios em diversas áreas



Fonte: Adaptado de Amphibians Org (<https://www.amphibians.org>).

Apesar dos anfíbios possuírem uma grande importância ecológica, agindo como bioindicadores da qualidade ambiental, essa característica também os torna sensível as mudanças climáticas e poluições ambientais, sendo esses uns dos fatores que levaram a extinção de alguns indivíduos dessa classe (ALFORD, 2011). Entretanto, esses fatores não podem ser comparados ao impacto causado pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd), que causou o declínio de 501 espécies e levou 90 delas a extinção, sendo vitimadas por infecções na pele queratinizada dos anfíbios ao longo dos últimos anos (SCHEELE et al., 2019). O principal mecanismo de virulência do Bd é a produção de uma mistura complexa de proteínas e a formação de biofilme, capazes de vencer o sistema imunológico do anfíbio e causar alterações osmóticas, resultantes das rupturas nas junções epidérmicas, seguidas de apoptose celular e degradação de proteínas da resposta imune (BRUTYN et al., 2012; ROLLINS-SMITH et al., 2019). Essa dermatomicose pode ser evidenciada por mudanças da epiderme, como a despigmentação (FIGURA 2), porém, o efeito da doença é diferenciado nos diferentes estágios do ciclo de vida desses animais. Em geral, indivíduos adultos e metamorfos são susceptíveis as infecções, enquanto a maioria dos girinos sobrevivem por possuírem queratina apenas no aparelho bucal, porém podem atuar como reservatórios dos zoósporos do fungo (VIEIRA et al., 2013).

Além do estágio de vida, outros fatores como temperatura, altitude e tamanho do corpo do anfíbio também influenciam no sucesso da infecção pelo patógeno (ROZNIK, 2019). A ocorrência do fungo Bd tem sido observada em todos os continentes, exceto na Antártica (SANTOS, 2018). Mediante o impacto causado por esse patógeno, várias estratégias para a conservação das espécies de anfíbios têm sido avaliadas, principalmente em relação ao monitoramento quanto à presença do fungo e o estudo da microbiota associada a pele desses organismos. A origem do Bd continua desconhecida, entretanto, é uma ameaça antiga a biodiversidade desses anuros. No Brasil, a sua presença foi relatada em exemplares de museus originados da Mata Atlântica brasileira, datados de 1894 (RODRIGUEZ et al., 2014).

Figura 2 - *Litoria caerulea* infectada por *Batrachochytrium dendrobatidis*



Fonte: (WRIGHT, 2013).

Apesar da abrangência e relato prévio dessa doença, existem poucos registros da presença desse fungo patógeno no Nordeste brasileiro. As espécies estudadas nesse trabalho são endêmicas do Nordeste brasileiro e pertencentes a família Leptodactylidae, da qual 20 das espécies desse grupo foram vitimadas pelo fungo (OLSON, D. Y RONNENBERG, 2014). Porém, a espécie *Leptodactylus vastus* não possui registro de morte causada pelo fungo, mas os anfíbios da espécie *Physalaemus cuvieri* já tiveram indivíduos relatados com a doença (MESQUITA et al., 2017).

Além do monitoramento, pesquisadores relataram que algumas bactérias presentes na microbiota da pele desses animais são capazes de inibir o crescimento do Bd *in vitro* e *in vivo*. As principais bactérias relatadas até o momento são dos gêneros *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Chromobacterium* e *Stenotrophomonas* sendo bastante abundantes nessa microbiota (KRUGER, 2019; MULETZ-WOLZ et al., 2017; REBOLLAR et al., 2019). Objetivando a criação de um levantamento desses isolados que inibem Bd, foi criado o “*Antifungal Isolates Database*” (<http://esapubs.org/archive/ecol/E096/059/metadata.php>), onde foi armazenado a sequência do gene RNAr 16S desses isolados, assim como informação sobre a origem e porcentagem de inibição do Bd (WOODHAMS et al., 2015). Apesar da importância do uso de metagenômica para conhecer esses microrganismos, também se faz necessário o cultivo em laboratório dessas comunidades, uma vez que Kruger (2019) observou que uma mesma Unidade Operacional Taxonômica (OTU) pode possuir diferentes níveis de inibição

contra o fungo. Dessa forma, entender a relação da microbiota dos anfíbios com o patógeno pode ser uma das formas de se conservar esses anfíbios (REBOLLAR; HARRIS, 2019).

Espécies diferentes de anfíbios ou até mesmo indivíduos da mesma espécie, que estejam expostos a elementos ambientais diferentes, podem possuir comunidades bacterianas diferentes na sua pele (HERNÁNDEZ-GÓMEZ et al., 2017). Apesar da evidência de vários isolados capazes de inibir o Bd, o sucesso no uso deles como probióticos não é constante. Algumas espécies foram capazes de sobreviver a infecção após o uso da técnica de bioaumento (BLETZ et al., 2013; HARRIS et al., 2006), entretanto esses probióticos não foram efetivos em outras espécies de hospedeiros (KÜNG et al., 2014). Por isso, pesquisadores acreditam que comunidades bacterianas que tenham contato com os diferentes estágios de desenvolvimento e crescimento dos anfíbios, podem ser probióticos mais eficazes (REBOLLAR et al., 2016).

Por isso, se faz necessário encontrar microrganismos residentes da microbiota dos anfíbios que preencham essas características, principalmente, em estágios iniciais de desenvolvimento. Por isso, sabendo que durante a sua fase larval alguns indivíduos dessa ordem são protegidos por emulsões estáveis chamadas de ninhos de espuma, onde permanecem durante toda a sua fase larval (POMBAL; HADDAD, 2005) e que existe uma microbiota associada a essas emulsões (HISSA et al., 2008), esses ninhos são ótimos locais de prospecção de probióticos que se adequem a essas características necessárias.

Dentre os anuros, apenas quatro famílias são capazes de produzir ninhos de espuma sendo elas: Hyperoliidae Laurent, 1943, Leptodactylidae Werner, 1896, Limnodynastidae Lynch, 1969 e Rhacophoridae Hoffmann, 1932. As espécies de anuros representantes dessas famílias possuem diferentes modos de formação e local de depósito do ninho de espuma que ajudam a vencer barreiras estabelecidas pelo ambiente, como regiões com pouca chuvas ou alta umidade (DUELLMAN, 1989; WILLIAM E. DUELLMAN, 1994).

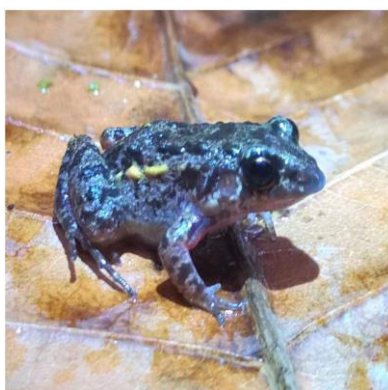
A construção da bioespuma é realizada no momento do amplexo, durante esse momento a fêmea produz um líquido cloacal rico em proteínas surfactantes e o macho e/ou a fêmea fazem movimentos repetitivos com as patas para incorporar o ar e criar a emulsão. O local de deposição desses ninhos pode variar de acordo com a dependência de água entre as famílias, sendo classificados em aquático (poças d'água ou correntezas) como o que acontece com as espécies da família Leptodactylidae (FIGURA 3), terrestre (construção de covas) (FIGURA 4) e arbóreos (FIGURA 5) (DALGETTY; KENNEDY, 2010).

Figura 3 – *Leptodactylus vastus* e o seu ninho de espuma em poça d'água



Fonte: (HISSA et al., 2008)

Figura 4 – *Adenomera hylaedactyla* e seu ninho de espuma terrestre



Fonte: Saulo Gonçalves (2017).

Figura 5 – *Rhacophorus omeimontis* durante amplexo e o seu ninho de espuma arbóreo



Fonte: (ZHANG et al., 2019)

A estratégia de produção de ninhos de espuma confere várias vantagens a esses animais, apesar de ser um processo dispendioso energeticamente para o organismo. Os ninhos fornecem proteção aos ovos contra raios ultravioletas, predadores e efeitos de dessecação (FLEMING et al., 2009; HISSA et al., 2008). Também aumentam a difusão do oxigênio, aumentam a possibilidade de fertilização (ARZABE, 2009) e, além disso, conferem estabilidade térmica para o desenvolvimento dos ovos (AMÉZQUITA, 2015) e reservas alimentares para os girinos (PEREIRA et al., 2017).

As funções dos ninhos de espuma estão diretamente relacionadas com a sua composição. Os ninhos são formados principalmente de proteína com atividade surfactante, carboidratos e lectinas. As proteínas surfactantes e lectinas ajudam a formar e manter a estrutura do ninho de espuma durante vários dias (ALCAIDE; LAVILLA; ALCAIDE, 2009; FLEMING et al., 2009; HISSA et al., 2016). Por outro lado, Zhang (2019) também evidenciou a presença de genes de proteínas relacionados a resposta imunológica, analisando o transcriptoma do oviduto da espécie de anuro *Rhacophorus omeimontis* durante e após a formação do ninho de espuma. Essa evidência sugere uma transferência de anticorpos da fêmea para o ninho de espuma, conferindo imunidade para os girinos durante a maturação do seu sistema imune.

Diante disso, o estudo da microbiota presente no ninho de espuma faz-se importante por não se conhecerem a classificação e a diversidade desses microrganismos. Se eles possuem um papel no desenvolvimento ou na proteção desses anfíbios durante a sua fase larval, assim como, não se conhece o repertório enzimático ou outras biomoléculas produzidas por eles, sendo essa emulsão uma ótima fonte de prospecção para aplicações biotecnológicas.

2. 2 As enzimas e as suas aplicações na indústria

As enzimas são catalisadores biológicos extremamente poderosos, tendo em vista que os substratos em condições biológicas são estáveis, com reações lentas e quase impossíveis de serem transformados em produtos nessas condições. Sem a catálise enzimática, nenhum dos processos biológicos aconteceriam no tempo necessário para manter a homeostase do sistema biológico (NELSON; COX, 2014). Dessa forma, a rapidez, a especificidade e a substituição de processos químicos com resíduos poluentes favoreceram o crescimento exponencial das enzimas no mercado mundial (KAMBLE; SRINIVASAN; SINGH, 2019). As empresas que se destacam no mercado buscam por enzimas de fácil produção e purificação, além de novas enzimas com características que diminuam o custo do produto final nas indústrias (ZAVALETA, 2006). Por exemplo, uma enzima que revolucionou a área da biologia molecular

foi a DNA Polimerase produzida pela bactéria termófila *Thermus aquaticus* (SAIKI et al., 1988), que possui uma meia vida de 40 min a 94° C.

Essa constante busca por enzimas diversas levou as empresas como a Novozymes S/A (sede situada na Dinamarca) a suprirem 47% do mercado enzimático em 2009 (GOYTACAZES; AGOSTO, 2012). O valor econômico das enzimas se torna claro, uma vez que o mercado enzimático teve um crescimento estimado em US\$ 5 bilhões de dólares em 2016 e possui a previsão de crescimento em 2020 de US\$ 7 bilhões de dólares (SHARMA et al., 2019). Dentro desse mercado, merecem destaque as enzimas hidrolases tais como: proteases, amilases e lipases devido à sua diversidade de aplicações (TABELA 1). Sendo as hidrolases de origem microbiana as principais enzimas utilizadas na indústria biotecnológica (ADRIO; DEMAIN, 2014).

A grande diversidade enzimática, assim como a facilidade e o aumento da produção em larga escala despertam o interesse dos pesquisadores para prospectar enzimas microbianas que supram a necessidade das indústrias mais facilmente do que as oriundas de vegetais ou animais.

Tabela 1 – Aplicações das hidrolases microbianas na indústria

Hidrolases	Aplicações	Referência
Proteases	Produtos de limpeza	(MAURER, 2004)
	Tratamento de águas residuais	(N. JISHA et al., 2013)
	Recuperação da prata a partir de filmes de raio-X usados	(GUPTA; BEG; LORENZ, 2002)
	Síntese de Proteínas	(DE SOUZA et al., 2015)
	Amaciar carnes e coagulação de queijos	(SINGH; SINGH; PANDEY, 2019)
	Amaciamento de jeans	(NAJAFI; DEOBAGKAR; DEOBAGKAR, 2005a)
	Fortificação de sucos de Frutas	(SINGH; SINGH; PANDEY, 2019)
	Limpadores para lente de contato	(NAJAFI; DEOBAGKAR; DEOBAGKAR, 2005a)
	Tratamento de câncer, inflamações e tumores	(KUCEROVA; CERVINKOVA, 2016)
Amilases	Indústria de papel e celulose	(LI et al., 2012)
	Aditivo em detergentes	(NAJAFI; DEOBAGKAR; DEOBAGKAR, 2005b)
	Sacarificação do amido	(GOYTACAZES; AGOSTO-, 2012)
	Produção de cervejas	(PANDEY et al., 2000)

	Produção de ciclodextrinas	(GOYTACAZES; ABRIL, 2006)
	Aumentar a qualidade nutricional de alimentos	(CHAKRAVARTHI; KAPOOR, 2015)
	Produção de Álcool	(KNOB, 2019)
Lipases	Biorremediação de águas contaminadas com óleos	(ADRIO; DEMAIN, 2014)
	Produção de biodiesel	(JAEGER; EGGERT, 2002)
	Transesterificação de óleos	(HASAN; SHAH; HAMEED, 2006)
	Produção de tecidos a partir de PET	(NA; VO; INDUSTRIJA, 2011)
	Aditivos em detergentes	(ITO; KOBAYASHI; ARA, 1998)
	Biosensores	(POHANKA, 2019)

Fonte: elaborado pela autora

As proteases são amplamente produzidas por microrganismos, uma vez que fazem parte de processos essenciais para o seu desenvolvimento e crescimento celular, como esporulação, renovação proteica, maturação de enzimas e a absorção e utilização de produtos hidrolisados (GUPTA; BEG; LORENZ, 2002). Devido essas funções, as proteases microbianas possuem aplicações em diferentes setores industriais, representando aproximadamente 65% do mercado mundial (VISHWANATHA; RAO; SINGH, 2010). Dentre os microrganismos, os gêneros de bactérias mais utilizados para produção de proteases são: *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Microbacterium* e *Pseudomonas* (SINGH; SINGH; PANDEY, 2019).

Por ser um carboidrato de reserva, o amido é encontrado em diversos substratos, e os microrganismos usam as amilases para tornar essas reservas disponíveis como fonte de carbono (GOYTACAZES; ABRIL, 2006). As amilases microbianas substituíram o uso de hidrólise química nas indústrias de processamento de amido (NAJAFI; DEOBAGKAR; DEOBAGKAR, 2005b), sendo responsáveis por uma hidrólise mais específica e sem resíduos poluentes. Além disso, a hidrólise química tem a desvantagem de produzir uma coloração indesejada no produto (TAYLOR et al., 1995). Portanto, essas enzimas são bastante úteis para diversos processos industriais, representando 25% do mercado enzimático global. Os gêneros de bactérias *Bacillus*, *Caldimonas*, *Chromohalobacter*, *Pseudomonas*, *Geobacillus* e *Aeromonas* são preferidos pela indústria devido a facilidade e volume de produção (SINGH; SINGH; PANDEY, 2019).

Por fim, as lipases são o terceiro grupo de enzimas mais procurado para aplicações industriais (MESSIAS et al., 2011), possuindo propriedades enzimáticas bastante diversificadas sendo desejável sua atividade em solventes orgânicos (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

Além da sua importância industrial, as lipases apresentam mecanismos de defesa para os microrganismos pois, essas enzimas são capazes de causar danos na estrutura das células, permitindo que bactérias patogênicas usem essa vantagem durante o estabelecimento no organismo hospedeiro (STEHR et al., 2003). *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Chromobacterium*, *Serratia*, *Bacillus*, *Geobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptomyces*, *Acinetobacter* e *Enterococcus* são os gêneros mais comumente utilizados para a produção de lipases (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; JAEGER; EGGERT, 2002).

Ademais, enzimas podem ser modificadas e produzidas pela tecnologia do DNA recombinante em laboratório, melhorando o rendimento ou facilitando a produção de proteínas com extração e purificação complicada através da sua expressão heteróloga, sendo expressas em células hospedeiras que facilitem as etapas de purificação.

Apesar da imensa diversidade biológica do Brasil e disponibilidade de diversos habitats para prospecção, o país está longe de suprir as demandas internas. Isso pode ser observado pelos valores de importações de enzimas que chegaram a US\$ 36,39 milhões até setembro de 2019, enquanto os dados de exportações nesse mesmo período não foram nem apresentados (Ministério da Economia, 2019). Portanto, é justificado o isolamento de novas enzimas por pesquisadores brasileiros para que possa assim, suprir as demandas do mercado Brasileiro e aumentar a representatividade do país nesse setor, com enzimas que desenvolvam processos com mais eficiência e maior custo benefício que as importadas.

3. OBJETIVOS

Isolar e identificar bactérias cultiváveis dos ninhos de espuma das espécies *Physalaemus cuvieri* e *Leptodactylus vastus*, a fim de avaliar o potencial biotecnológico e a importância desses microrganismos na manutenção e conservação da biodiversidade dos anuros.

3.1 Objetivos específicos

1. Isolar bactérias dos ninhos de espuma das espécies de anuros *P. cuvieri* e *L. vastus*;
2. Produzir uma coleção de isolados bacterianos;
3. Identificar por meio do gene 16S rRNA as bactérias isoladas dos ninhos de espuma de *P. cuvieri* e *L. vastus*;
4. Realizar testes enzimáticos (proteásica, amilásica e lipásica) com os morfotipos bacterianos isolados dos ninhos de espuma de *P. cuvieri* e *L. vastus*.

4. METODOLOGIA

4.1 Área de Estudo e coleta dos ninhos de espuma

A coleta dos ninhos de espuma foi realizada na Reserva Particular do Patrimônio Natural de Monte Alegre (RPPN Monte Alegre – Latitude: 03° 95´S & Longitude: 38° 54´W), serra de Pacatuba-CE, Brasil, localizada a 30 Km de Fortaleza. A RPPN Monte Alegre é uma área privada que abriga uma grande diversidade e riqueza de organismos de diferentes táxons, dentre estes, os anuros. O período da coleta dos ninhos de espuma foi no início do período chuvoso no mês de janeiro de 2019. As amostras dos ninhos de espuma das espécies de anuros *Physaelamus cuvieri* e *Leptodactylus vastus* foram coletados em poça de água, e em cova com solo úmido, respectivamente. Em seguida, foram coletadas e armazenadas em tubos estéreis, bem como, amostras da água e do solo em que se encontravam depositados os ninhos. As amostras dos ninhos de espuma, água e solo coletadas foram mantidas em temperatura ambiente e levadas ao Laboratório de Recursos Genéticos (LaRGen) do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará (UFC). No Laboratório, as amostras foram armazenadas em freezer – 20 C para posteriores análises. As coletas realizadas seguiram as normas da legislação vigente por meio da autorização e licença SISBIO de número 58036-1, liberada pelo Ministério do Meio Ambiente.

4.2 Diluição seriada e plaqueamento

As amostras dos ninhos de espuma passaram por um tratamento preliminar utilizando pinças estéreis em condições assépticas para remoção dos resíduos sólidos (folhas e galhos). Em seguida, essas foram pesadas utilizando balança analítica, onde 3,97 g foram então diluídas em solução salina 0,9% NaCl estéril até a concentração de 10^{-5} . Posteriormente, 1 mL da amostra da poça d'água e 4,04 g de solo foram diluídas seriadamente e homogeneizadas utilizando salina 0,9% NaCl estéril até 10^{-4} . Foram escolhidas as três últimas diluições de cada amostra para serem plaqueadas pelo método de *spread plate* em meio ATGE (ágar 15 g/L, triptona 5 g/L, glicose 1 g/L e extrato de levedura 2,5 g/L) e incubadas em temperatura ambiente por 32 horas.

4.3 Isolamento dos morfotipos

Para o isolamento dos morfotipos foi realizada contagem de viáveis totais de cada uma das placas e calculado as unidades formadoras de colônias por mL para cada uma das amostras (bioespuma de *L. vastus*, bioespuma de *P. cuvieri*, água e solo). Cada um dos morfotipos diferentes foi isolado e descrito conforme as características morfológicas (coloração, forma, margem, elevação e aspecto da colônia) encontrados e estriados em novas placas, utilizando alças de inoculação estéreis, ficando em incubação na temperatura ambiente por 16 horas. Após o crescimento das bactérias, os morfotipos parecidos foram separados em grupos para facilitar a comparação entre eles. Cada grupo possuiu uma característica marcante (de acordo com a sua coloração) e, assim, foi possível diminuir o número de isolados morfológicamente semelhantes.

4.4 Estocagem da coleção bacteriana

Os morfotipos de cada estirpe foram nomeados usando a primeira letra do gênero da espécie de ninho que foi isolada e uma sequência numérica, como por exemplo: P10 – décimo isolado da espécie de anuro *P. cuvieri*. Portanto, para estocar os morfotipos diferentes, eles foram crescidos em caldo TGE (triptona 5 g/L, glicose 1 g/L e extrato de levedura 2,5 g/L) por 16 horas à temperatura de 30°C e 150 rpm. Então, 900 µL de culturas foram adicionados em 600 µL de glicerol 50% (v/v), sendo conservadas na concentração final de glicerol 20% (v/v) e armazenadas em tubos criogênicos estéreis no *freezer* a – 20°C e a – 80°C, para a construção das coleções de isolados dos ninhos de espuma das espécies de anuro *P. cuvieri* e *L. vastus*.

4.5 Extração de DNA

Os morfotipos isolados foram reativados dos estoques em placas de ATGE e submetidos à extração do DNA. Para extração do DNA total foram utilizados dois protocolos diferentes. Um protocolo baseado em termólise (SÁ et al., 2013), com modificações. A partir das culturas crescidas, células de colônias de bacterianas foram diluídas em 400 µL água ultrapura estéril em microtubos de 1,5 mL e homogeneizadas com auxílio do *vortex*. Em seguida, foram colocadas no banho seco a 99 °C por 11 min e posteriormente em freezer a – 80 °C por 4 minutos. Após o resfriamento, os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm por 5 min e 300 µL do sobrenadante foi transferido para um novo microtubo. O outro protocolo de extração

do DNA utilizado foi baseado no método Brometo de cetiltrimetil amônio CTAB 2X (WARNER, 1996). A concentração do DNA genômico obtido pelo protocolo Termólise ou CTAB foi verificada por meio da medida da absorbância em 260 nm (A260) em espectrofotômetro *Nanodrop* ND100 (*Nanodrop*, Wilmington, DE, EUA). Já as razões das medidas 260/280 e 260/230 forneceram a qualidade do DNA obtido. Após a leitura do DNA em espectrofotômetro as amostras foram então diluídas em água ultrapura para a concentração de 10 ng/ μ L e em seguida armazenadas em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.6 Amplificação do gene ribossomal 16S

Para a amplificação do gene RNAr 16S utilizamos os iniciadores 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG – 3') (WAWRIK et al., 2005) e 1525R (5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC – 3') (SYUKUR et al., 2014) ou os iniciadores 63F (5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3') e 1389R (5'-ACGGGCGGTGTGTGTACAAG-3') (COCARTA et al., 2019). A PCR foi realizada em uma reação com volume total de 75 μ L seguindo dois parâmetros representados na tabela 2. As reações de PCR foram incubadas em termociclador Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) usando a seguinte programação: 95 $^{\circ}\text{C}$ por 2 min, seguido de 30 ciclos de 95 $^{\circ}\text{C}$ por 1 min, 55 $^{\circ}\text{C}$ por 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ por 1 min e 72 $^{\circ}\text{C}$ por 10 min. Em alguns casos para melhorar a amplificação da reação foram utilizadas uma menor concentração de DNA e de *primers*, assim como uma redução do tempo de anelamento de 1 min para 30 seg.

A especificidade da amplificação e o tamanho das sequências de interesse foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose 1% (m/v), corados por SYBRTM safe e corridos em tampão Tris Acetato EDTA (TAE) 0,5 X. Após a exposição do gel a luz UV, confirmou-se a amplificação pela presença da banda na região aproximada de 1500 pb, quando comparada pelo marcador molecular de 1kb que foi utilizado.

Tabela 2– Concentrações finais utilizadas na reação de PCR para 75 µL

Reagentes	Concentração final	
	(<i>Thermo Scientific</i>)	(<i>Promega</i>)
DNA	60ng	30ng
Tampão	1X (Adicionado de (NH ₄) ₂ SO ₄)	1X (<i>Gotaq buffer</i>)
MgCl ₂	3mM	3mM
dNTPs	0,2 mM	0,2 mM
Primer 27F	0,5 mM	0,25mM – 0,5mM
Primer 1525R	0,5 mM	0,25mM – 0,5mM
DNA polimerase	1 U	1 U

Fonte: elaborado pela autora

4.7 Purificação e precipitação do DNA

Os produtos de PCR com a amplificação confirmada, foram purificados com acetato de potássio e álcool. Para isso, 72 µL das soluções foram adicionadas a 7,2 µL de uma solução 3 M de acetato de potássio (pH 5,5) e 2 vezes o volume total da solução de etanol 100%. Após a homogeneização por inversão, a solução foi refrigerada no *freezer* -80 por 30 min. Em seguida, foram centrifugados a 14.000 rcf, 4°C, por 15 min e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi ressuspenso com 158,4 µL de etanol 70% gelado e centrifugado a 14.000 rpm, 4°C, por 5 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi secado em banho seco a 36°C por aproximadamente 20 min. Quando foi possível observar toda a evaporação do álcool, o DNA purificado e precipitado foi ressuspenso em 30 µL de água ultrapura livre de DNAses e RNAses. E a confirmação da retirada de impurezas das amostras foi observada pela concentração final (ng/µL), sendo superior a 50 ng/µL, e pelas relações a 260/230 nm e 260/280 nm quantificadas pelo *Nanodrop* ND100 (*Nanodrop*, Wilmington, DE, EUA), que estavam acima de 1.8.

4.8 Análise das sequencias e identificação molecular

O DNA foi sequenciado pelo método de sequenciamento de SANGER, utilizando os iniciadores 518F (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3') e 800R (5'-

TACCAGGGTATCTAATCC -3') (Macrogen Inc, 2019) para a amplificação da região do gene RNAr 16S, pela empresa Macrogen (www.macrogen.com). Cada uma dessas sequências foram tratadas usando software Geneious Prime 2019 (www.geneious.com/), onde foram retiradas as bases das extremidades com qualidade *Phred* inferior a 30, e em seguida foi realizado a montagem *de novo* para a formação da sequência *contig*. Posteriormente, a sequência *contig* foi submetida a identificação molecular na ferramenta de alinhamento local BLAST (ALTSCHUL, 1990), utilizando o banco de dados *nucleotide collection*. Os isolados que obtiveram *hit* com apenas um gênero de bactérias, com identidade maior que 97% foram considerados pertencentes a esse gênero.

4.9 Testes Enzimáticos

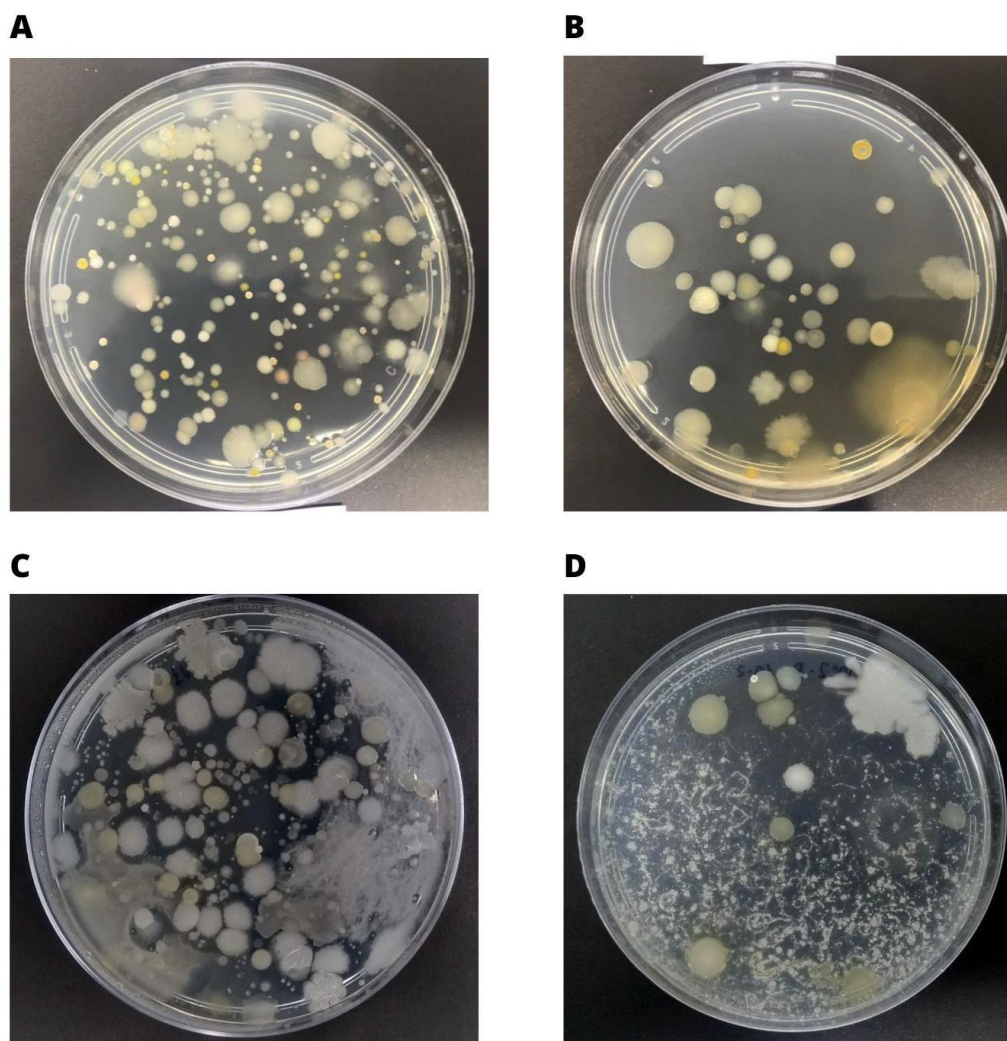
Cada isolado foi retirado do estoque a - 20°C, reativado em placa de ATGE (ágar 15 g/L, triptona 5 g/L, glicose 1 g/L e extrato de levedura 2,5 g/L) e incubado a temperatura ambiente por 32 h. Para confirmar a pureza do estoque, as características dos morfotipos foram, então, comparadas com as descrições feitas durante o isolamento. Os microrganismos foram colocados em placas com ATGE + tributirina (0,1% v/v), para observar as atividades lipásicas, ATGE + amido (0,1% p/v), para verificar as atividades amilásicas, e ATGE + gelatina (3% p/v) e ATGE + leite desnatado (1% p/v), para detectar atividades de diferentes proteases. Após 16 horas, a observação das atividades foi realizada através da presença halos de degradação ao redor da colônia, com a adição de lugol (I2 1%/KI 2%) para a revelação da atividade amilásica e adição de sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) 4,1 M para a atividade proteásica, no meio contendo gelatina.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento da coleção bacteriana

O crescimento de colônias de bactérias foi evidenciado em todas as diluições das placas de ninho de espuma e solo, entretanto as placas na diluição de 10^{-4} da água de poça de *P. cuvieri* não mostrou crescimento de colônias (FIGURA 6). Diante disso, a contagem de viáveis foi realizada levando em consideração apenas as diluições que apresentavam de 30 a 300 colônias, as placas com contagem superior a 300 não foram incluídas no cálculo da média de Unidades Formadoras de Colônia (UFC/mL).

Figura 6– Riqueza e diversidade dos morfotipos de ninhos de espuma, água e solo



Diluição de 10^{-4} das amostras do ninho de *L. vastus* (A) e *P. cuvieri* (B). E as Diluição de 10^{-2} de solo da poça de *L. vastus* (C) e água da poça de *P. cuvieri* (D).

Fonte: elaborada pela autora

A partir da média das unidades formadoras de colônia (UFC) das amostras foi possível observar que os ninhos de espuma de *P. cuvieri* apresentou 1000 vezes mais unidades formadoras de colônias do que a amostra de água onde estava depositado. Já o ninho de *L. vastus* obteve apenas 10 vezes mais UFC/g do que o solo úmido em que foi encontrado depositado (TABELA 3). Quando comparando os valores encontrados entre as amostras de ninhos de espuma, as duas espécies apresentaram valores similares de contagem de viáveis, aproximadamente 3×10^7 . Dessa forma, esses dados fortalecem a hipótese de que o ninho fornece um ambiente propício para o desenvolvimento dos microrganismos, resultados que também foram encontrados em outros trabalhos do grupo (HISSA et al., 2008).

Tabela 3– Unidades Formadoras de Colônia (UFC/mL) nas diferentes amostras

Amostra	Unidades Formadoras de Colônia
Ninho de espuma de <i>P. cuvieri</i>	$2,82 \pm 0,93 \times 10^7$ UFC/mL
Ninho de espuma de <i>L. vastus</i>	$2,74 \pm 0,57 \times 10^7$ UFC/mL
Água da poça onde o ninho de <i>P. cuvieri</i> estava inserido	$3,33 \pm 0,57 \times 10^4$ UFC/mL
Solo onde o ninho de <i>L. vastus</i> estava inserido	$1,41 \pm 0,73 \times 10^6$ UFC/g

Fonte: elaborada pela autora

Por outro lado, o número de morfotipos encontrados foi diferente nas bioespumas, o ninho de *P. cuvieri* apresentou uma quantidade semelhante do que os de *L.vastus* quando comparado a relação de ninhos de espuma coletados (TABELA 4). Dentre os morfotipos encontrados, observou-se que existiam morfotipos únicos para cada ninho, mostrando que o ninho de espuma de cada espécie de rã possui sua própria microbiota.

Tabela 4–Morfotipos de bactérias isoladas dos ninhos de espuma das espécies *P. cuvieri* e *L. vastus*

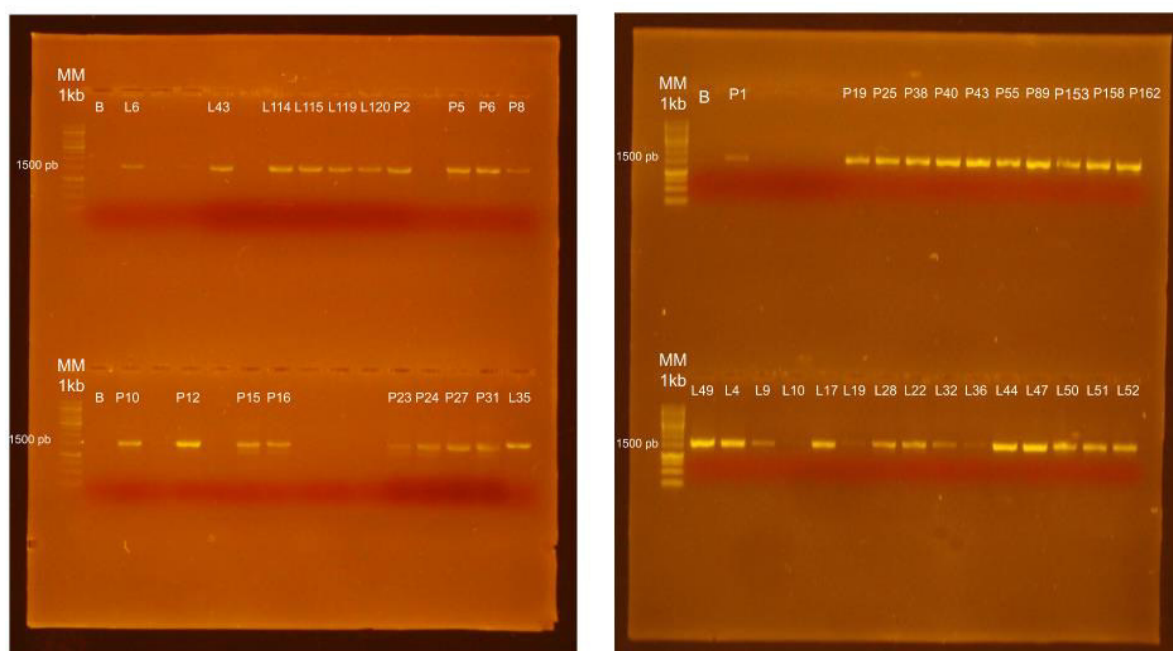
Espécie do ninho de espuma	Ninhos coletados	Morfotipos isolados
<i>Physaelamus cuvieri</i>	02	98
<i>Leptodactylus vastus</i>	01	55
Total	03	153

Fonte: elaborada pela autora

5.2 Identificação molecular das estirpes bacterianas

O método de termólise possibilitou a extração do DNA genômico de 95% dos isolados, onde foi possível realizar a amplificação do gene ribossomal 16S por reação em cadeia da polimerase (PCR) (FIGURA 7). Entretanto, os isolados P4, P14, P104, P159, P160, L10 e L113 tiveram seu DNA extraído pela metodologia de CTAB 2X, uma vez que o DNA extraído por termólise não foi amplificado.

Figura 7– Gel de eletroforese agarose 1% com amplificação região rRNA 16S por PCR



MM: Marcador Molecular 1 kb, B: Branco.

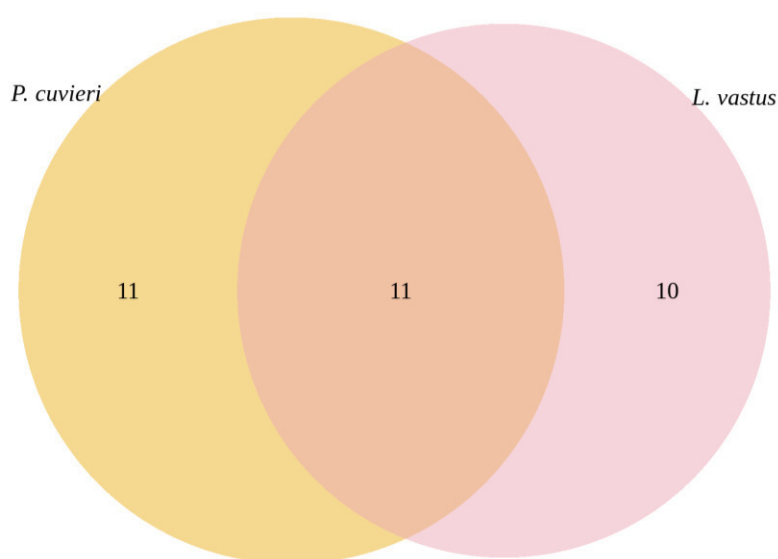
Fonte: elaborado pela autora

No sequenciamento, 85% dos isolados foram identificados a nível de gênero, sendo essa a Unidade Taxonômica Operacional (OTU) utilizada nesse trabalho. A microbiota dos ninhos originados de espécies diferentes apresentou um número total de OTUs semelhantes (TABELA 5), onde existem OTUs comuns e exclusivas em cada um deles (FIGURA 8). Ademais, microbiotas em comuns apresentam OTUs que possuem funções importante para o hospedeiro (JIMÉNEZ; SOMMER, 2017). Entretanto, as OTUs exclusivas podem ser responsáveis pela resistência ou susceptibilidade de alguns indivíduos ao patógeno Bd ou outros patógenos, tendo em vista que existem espécies de anuro imunes a infecção (OLIVEIRA, 2014).

Tabela 5 – Relação entre morfotipos e quantidade de OTUs presentes nos ninhos de espuma

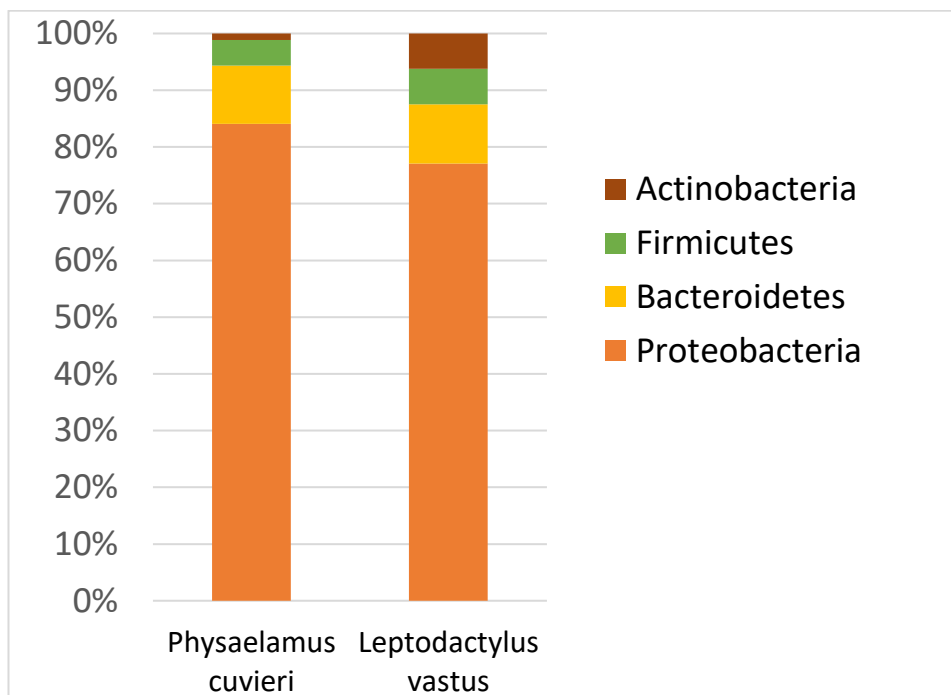
<i>Espécie do ninho de espuma</i>	<i>Morfotipos isolados</i>	<i>OTUs</i>
<i>Physaelamus cuvieri</i>	98	22
<i>Leptodactylus vastus</i>	55	21

Fonte: elaborado pela autora

Figura 8– Diagrama de Venn relacionando as OTUs presentes nos ninhos de espuma

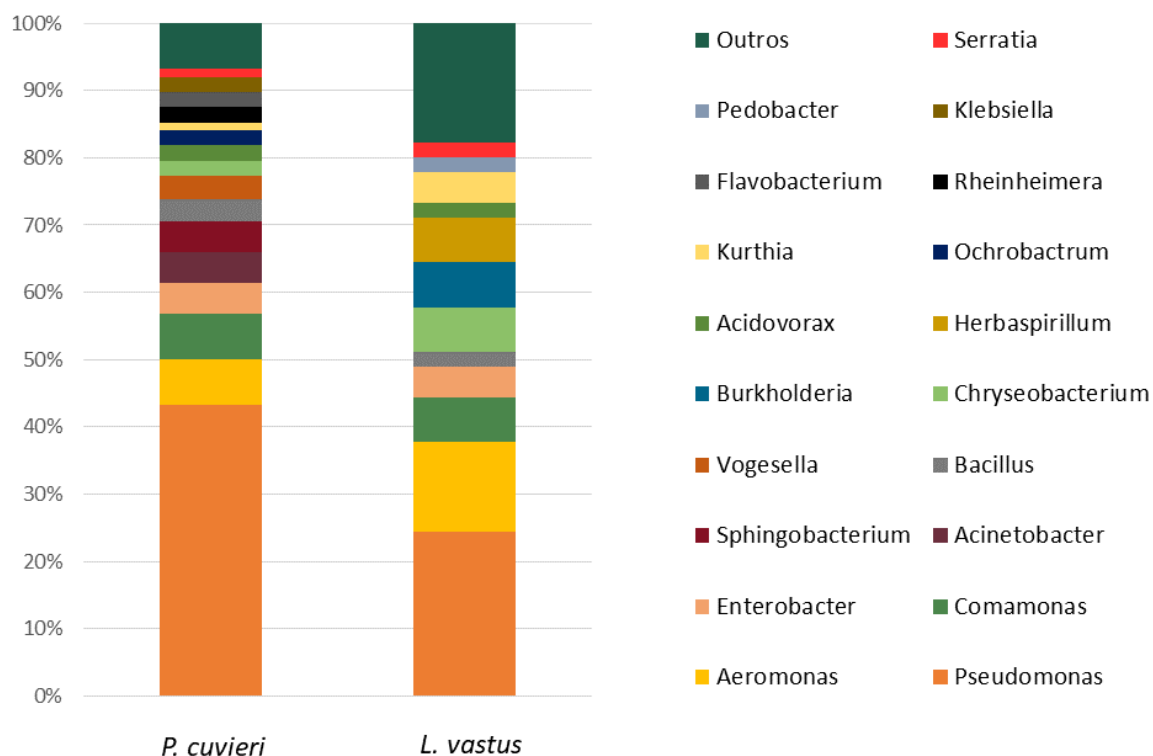
Fonte: elaborado pela autora

O filo Proteobacteria se mostrou ser o mais abundante na pele de várias espécies de anfíbios, mesmo com variações de habitats, espécies e estágios de desenvolvimento (VENCES et al., 2016). Neste estudo os microrganismos pertencentes ao filo Proteobacteria apresentaram valores de abundância de 84,09% a 77,08% nas espécies *P. cuvieri* e *L. vastus*, sendo também o filo mais abundante nos ninhos de espuma (FIGURA 9). Em seguida, o segundo filo mais abundante foi o Bacteroidetes, com abundância de 10% nas duas espécies estudadas, seguido de outros filios com abundâncias próximas a 5% (Firmicutes 4,54 % e Actinobacteria 1,4% em *P. cuvieri*; Firmicutes 6,25 % e Actinobacteria 6,25% em *L. vastus*).

Figura 9 - Abundância dos filos nos ninhos de espuma (%)

Fonte: elaborado pela autora

Nesse trabalho encontramos 32 OTUs diferentes nas duas espécies de ninho de espuma (FIGURA 10), onde o gênero *Pseudomonas* foi o mais abundante com 38 representantes para *P. cuvieri* e 11 representantes para *L. vastus*. As bactérias pertencentes a esse gênero são bastante frequentes na natureza, podendo ser utilizadas como bioindicadores de contaminação por metais nos solos (BRANDT et al., 2006), produtoras de biossurfactantes (KUIPER et al., 2004) e de enzimas com aplicações industriais (FURINI et al., 2018; HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). Apesar de comumente não estarem presentes em animais, algumas espécies são conhecidas por serem patógenos oportunistas de humanos (ASSIS, 2011), principalmente *Pseudomonas aeruginosa*. Entretanto esse gênero se comprovou parte da microbiota residente da pele de anfíbios (JIMÉNEZ; SOMMER, 2017), assim como no ninho de espuma. Além disso, vários isolados da pele de anfíbios pertencentes a esse gênero foram capazes de inibir o fungo Bd (LAM et al., 2010), concluindo que essa OTU presente no ninho pode obter um papel de proteção semelhante no ninho.

Figura 10 - Abundância de gêneros encontrados nos ninhos de espumas (%)

Outros: OTUs presentes em apenas um dos ninhos e com apenas um representante.

Fonte: elaborado pela autora

Podemos destacar também a presença do gênero *Chryseobacterium*, representada por 2 morfotipos no ninho de *P. cuvieri* e 3 no ninhos de *L. vastus*, que apesar de algumas espécies serem patogênicas em algumas espécies de peixes (LOCH; FAISAL, 2019), outras são conhecidas pelo seu papel de proteção na pele de anfíbios, sendo capaz de inibir até 3 genótipos diferentes do Bd (MULETZ-WOLZ et al., 2017). Outros autores também reportaram a sua capacidade de inibir outros fungos patogênicos de plantas, como *Fusarium oxysporum* (PARK et al., 2006), e o controle de nematoides *in vitro*, resultantes da produção de quitinases, colagenases e metaloproteases (PAGE et al., 2019). Além disso, representantes desse gênero também foram relatados por sua capacidade de degradar inseticidas, herbicidas e fenóis clorados (HUGO et al., 2019). Portanto, a presença dessa OTU é bastante promissora no uso como probiótico em espécies ameaçadas do patógeno Bd e para a aplicação no mercado biotecnológico.

As bactérias dos gêneros *Aeromonas* também estão presentes nas duas microbiotas associadas ao ninho de forma abundante, 6 para *P. cuvieri* e 6 para *L. vastus*. As *Aeromonas* são conhecidas pela sua produção de diversas enzimas secretadas (PEIXOTO et al., 2012) e algumas estirpes foram capazes de crescer em petróleo bruto e produzir biosurfactantes

(ILORI; AMOBI; ODOCHA, 2005). Por outro lado, esse gênero também é relatado por causar doenças e alguns surtos de ranavirose esporádicos em algumas espécies de anfíbios (HIRD et al., 1981), em alguns casos os peptídeos antimicrobianos presentes na pele desses animais foram capazes de inibir fungo Bd, mas não a bactéria *Aeromonas hydrophil* (TENNESSEN et al., 2009).

Outros gêneros comuns para os dois ninhos de espuma foram: *Acidovorax*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Comamonas*, *Enterobacter*, *Rhizobium*, *Serratia* e *Kurthia*.

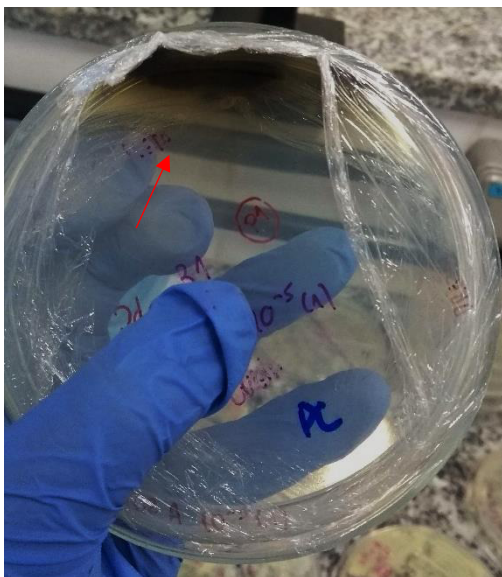
Igualmente, as OTUs exclusivas presentes nos ninhos de espuma (TABELA 6) também apresentam potencial para aplicação biotecnológica, sendo dois isolados pertencentes ao gênero *Rheinheimera*, exclusivo do ninho de *P. cuvieri*. Esse gênero já foi relatado como pertencente a microbiota residente da pele de anfíbios (HERNÁNDEZ-GÓMEZ; WUERTHNER; HUA, 2019), mas não foi relatado inibindo o patógeno Bd. Entretanto, ele apresenta a produção de proteínas antimicrobianas capazes de inibir o crescimento de bactérias gram-negativas e gram-positivas, leveduras e algas (CHEN; LIN; SHEU, 2010), além disso, também foi relatado produzindo pigmentos extracelulares em meios suplementados com arginina (GROSSART et al., 2009). Nesse trabalho conseguimos observar a produção desse pigmento em meio ATGE (ágar 15 g/L, tripton 5 g/L, glicose 1 g/L e extrato de levedura 2,5 g/L) (FIGURA 11).

Tabela 6– OTUs exclusivas presentes em apenas um dos ninhos de espuma

	<i>Physaelamus cuvieri</i>	<i>Leptodactylus vastus</i>
OTUs exclusivas	<i>Acinetobacter</i>	<i>Brevundimonas</i>
	<i>Curtobacterium</i>	<i>Burkholderia</i>
	<i>Empedobacter</i>	<i>Chromobacterium</i>
	<i>Flavobacterium</i>	<i>Dyella</i>
	<i>Klebsiella</i>	<i>Herbaspirillum</i>
	<i>Ochrobactrum</i>	<i>Microbacterium</i>
	<i>Rheinheimera</i>	<i>Niabella</i>
	<i>Shewanella</i>	<i>Pandoraea</i>
	<i>Sphingobacterium</i>	<i>Pedobacter</i>
	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>Streptomyces</i>
	<i>Vogesella</i>	

Fonte: elaborado pela autora

Figura 11 - Produção de pigmento por *Rheinheimera* sp.



A presença do pigmento está sendo indicada pela seta vermelha
 Fonte: elaborado pela autora

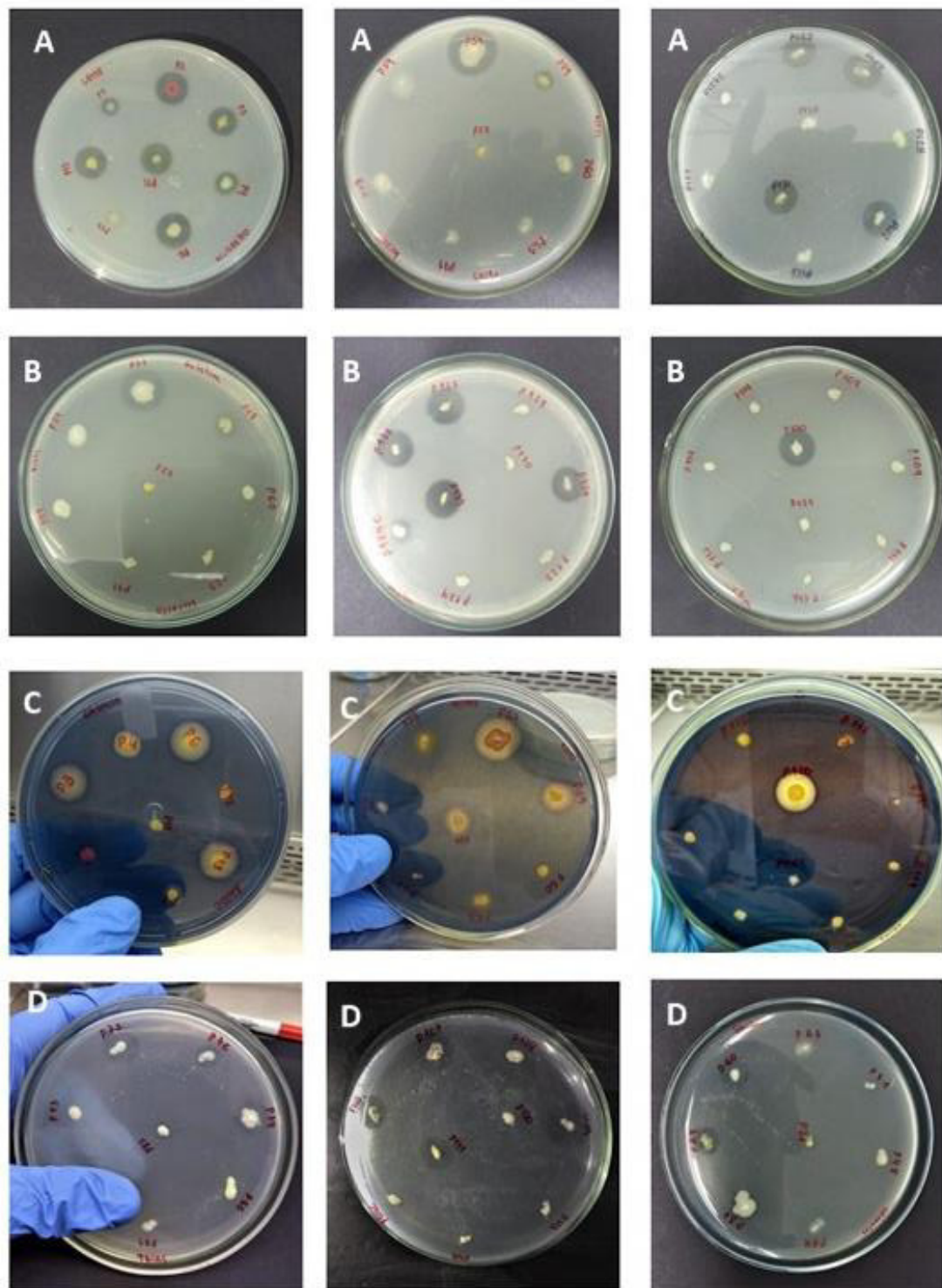
Outros gêneros reportados nesse trabalho como exclusivos de uma das espécies de ninho de espuma, também são comumente encontrados na pele de anfíbios. Dentre eles, os gêneros *Acinetobacter* e *Pedobacter*, exclusivos de *P. cuvieri* e *L. vastus*, respectivamente, foram relatados por inibir o crescimento de *Bd in vitro* (FLECHA et al., 2017; WOODHAMS et al., 2007). Diante disso, o ambiente do ninho de espuma pode apresentar uma proteção dos ovos também associada a presença desses microrganismos, os isolados serão então ótimos alvos para a colonização da pele de espécies de anfíbios susceptíveis a infecção, se for comprovada a inibição do *Bd*. Eles podem agir como probióticos, uma vez que possuem mais chances de se estabelecerem na pele desses animais (REBOLLAR et al., 2016). Outros estudos como ensaios de inibição com o *Bd* ainda devem ser realizados para comprovar o papel de defesa dos microrganismos associados ao ninho de espuma.

5.3 Atividades enzimáticas

O potencial de produção de enzimas de interesse biotecnológico oriundas do ninho de espuma pode ser evidenciado pelo pioneirismo de pesquisas referente a microbiota da bioespuma. Dos 99 isolados de *P. cuvieri*, 23 apresentaram atividades amilásicas, 66 proteásicas e 56 lipídicas (FIGURA 12). Já os 55 isolados de *L. vastus* 14 apresentaram atividades amilásicas, 45 proteásicas e 41 lipídicas (FIGURA 13). Podemos hipotetizar que a presença dessas hidrolases pode ser justificada devido ao ambiente nutritivo do ninho, rico em proteínas

e carboidratos (FLEMING et al., 2009; HISSA et al., 2016), tendo em vista que apenas 33 dos 153 isolados testados não obtiveram nenhuma das atividades testadas.

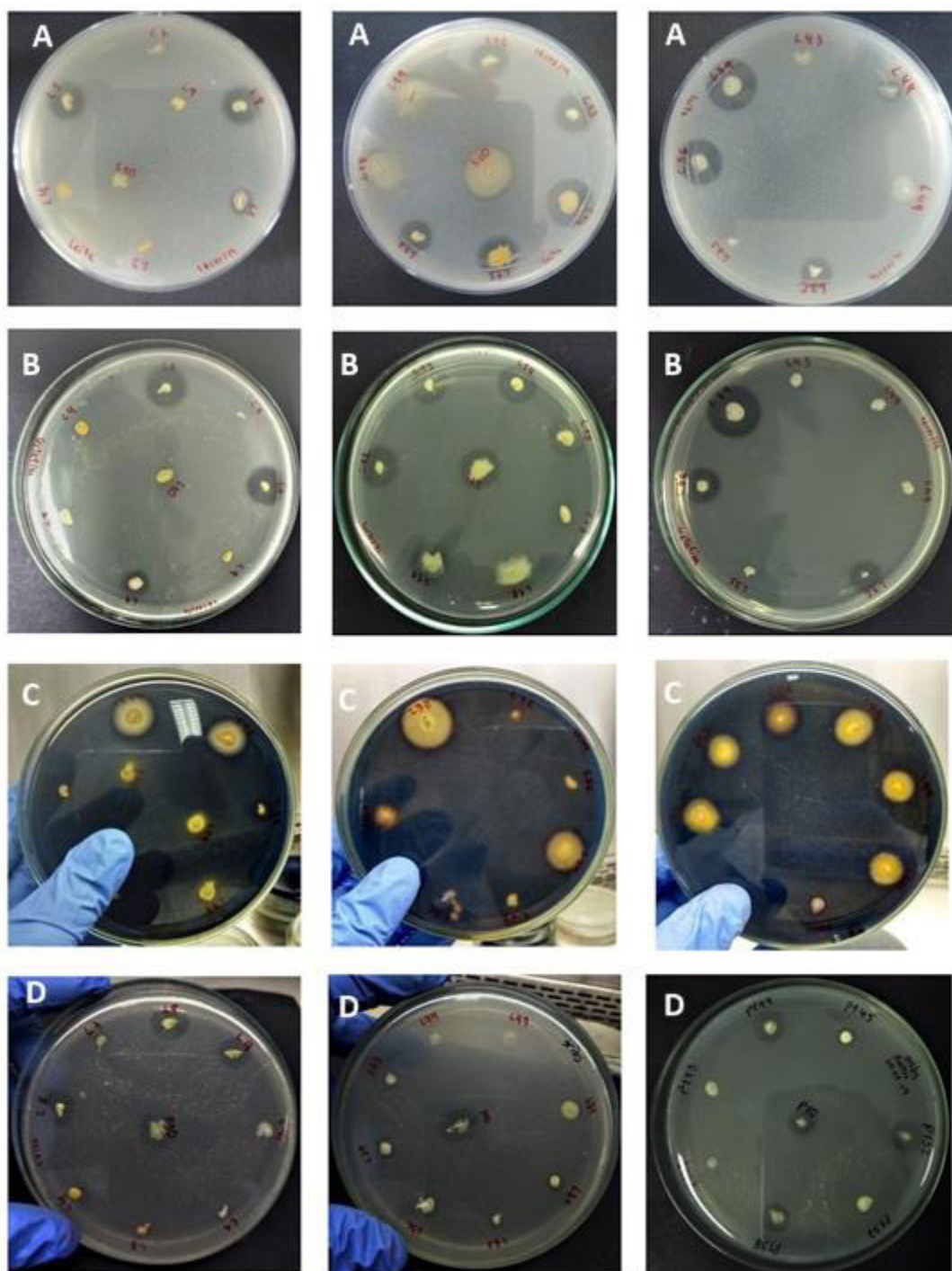
Figura 12– Atividades enzimáticas dos isolados de *P. cuvieri*



Proteases (A) e (B), amilases (C) e lipases (D)

Fonte: elaborado pela autora

Figura 13- Atividades enzimáticas dos isolados de *L. vastus*



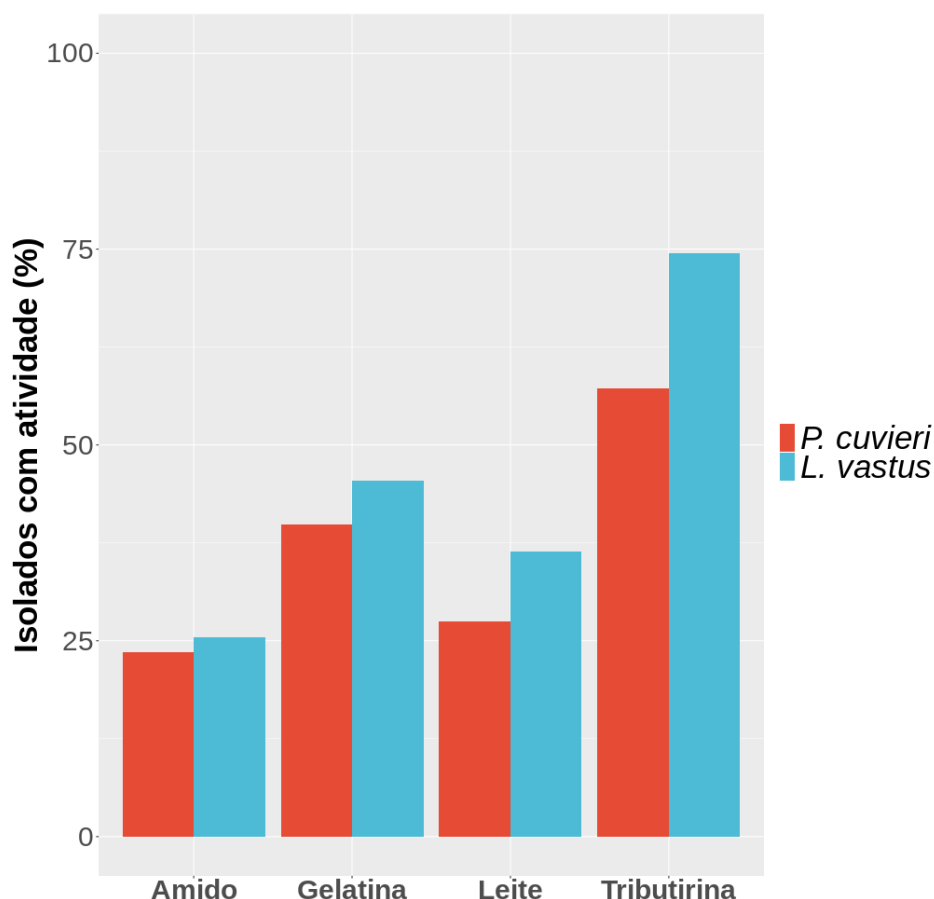
Proteases (A) e (B), amilases (C) e lipases (D)

Fonte: elaborado pela autora

Os microrganismos isolados das bioespumas apresentaram um maior número de proteases (gelatinásica + caseinásica) do que amilases e lipases (FIGURA 14). A presença expressiva de isolados com atividades lipásica é justificada pela presença de gêneros conhecidos por produzirem lipases, como *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Rhizobium* e *Aeromonas* (LIU; KOKARE, 2017; PEMBERTON; KIDD; SCHMIDT, 1997;

SANCHEZ; DEMAIN, 2017). Além disso, esses microrganismos apresentam um enorme potencial para a aplicação em processos biotecnológicos, uma vez que as lipases mais comercializada pela indústria são de origem microbiana (MUTHUMARI; THILAGAVATHI; HARIRAM, 2016).

Figura 14– Porcentagem de atividades positivas para cada um dos testes enzimáticos dos isolados de *Physaelamus cuvieri* e *Leptodactylus vastus* em relação ao total



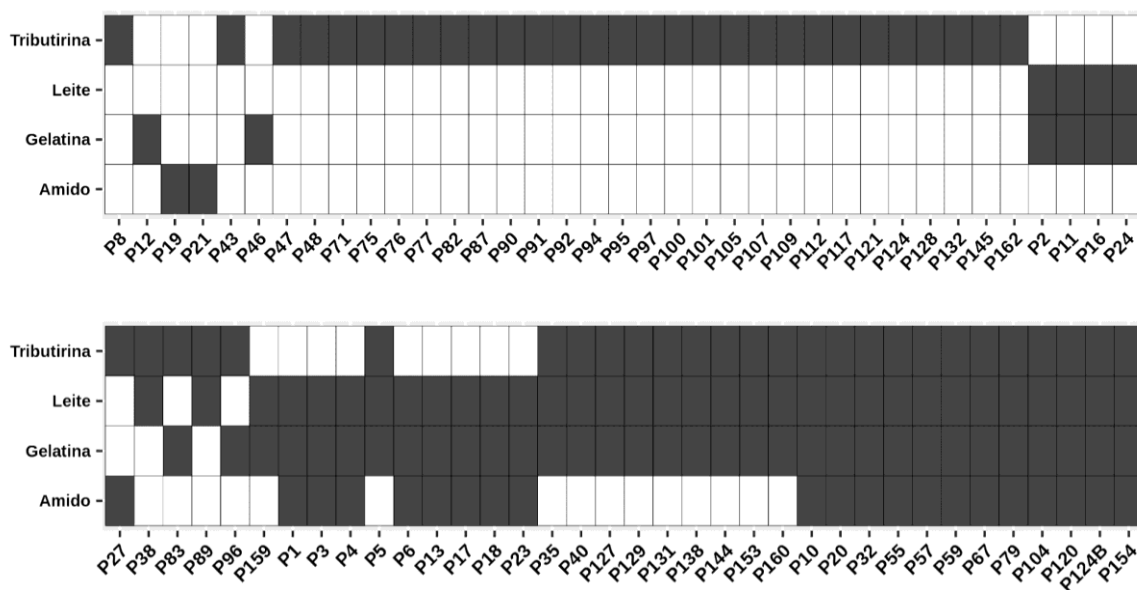
Fonte: elaborada pela autora

Dentre os isolados dos dois ninhos de espuma, apenas 21 apresentaram todas as enzimas para os substratos testados (FIGURA 15 e 16), sendo 42% desses isolados pertencentes ao gênero *Aeromonas*. As bactérias desse gênero utilizam-se da maquinaria enzimática como fatores de virulência para o estabelecimento em hospedeiros e absorção de substratos (PEIXOTO et al., 2012). Entretanto, essas enzimas também possuem aplicações biotecnológicas, como o uso de lipases produzidas por *Aeromonas* no tratamento de águas residuais de laticínios (MAHDI; BHATTACHARYA; GUPTA, 2012).

Em seguida, 14% são do gênero *Chryseobacterium*, 9,5% são *Bacillus* e os outros 34,5% são representantes dos gêneros *Rheinheimera*, *Empedobacter*, *Pseudomonas*, *Curtobacterium*, *Microbacterium* e *Serratia*, com apenas um isolado para cada um dos gêneros.

Os outros gêneros mais abundantes entre os isolados produtores de todas as enzimas testadas também possuem aplicações conhecidas. As proteases produzidas pelo gênero *Chryseobacterium* foram capazes de serem produzidas utilizando apenas penas de aves como substrato (RIFFEL, 2006). Enquanto as proteases produzidas pelo gênero *Bacillus*, são as principais fontes dessas enzimas devido ao seu baixo custo de produção e faixas de pH e temperatura em que estão ativas (CONTESINI; MELO; SATO, 2018). Por isso, proteases produzidas por *Bacillus* são utilizadas como aditivos em detergentes (HMIDET et al., 2009), em processamento de tecidos (INFANTE et al., 2010) e na produção de queijos (AHMED et al., 2016).

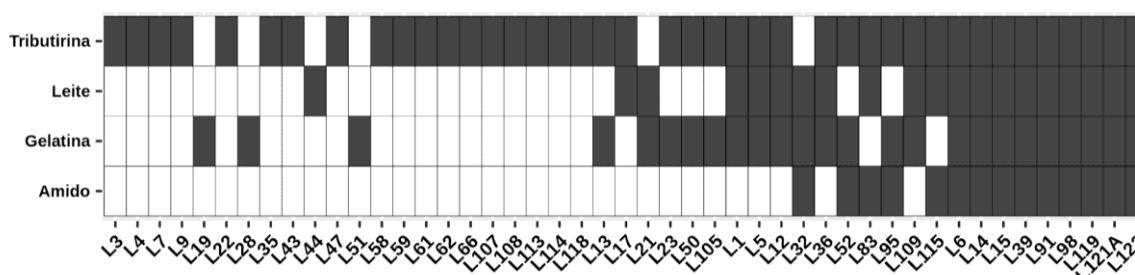
Figura 15 - Isolados do ninho de *P. cuvieri* com pelo menos uma atividade nos substratos testados (tributirina, leite, gelatina e amido)



Preto: com atividade. Branco: sem atividade

Fonte: elaborada pela autora

Figura 16 - Isolados do ninho de *L. vastus* com pelo menos uma atividade nos substratos testados (tributirina, leite, gelatina e amido)



Preto: com atividade. Branco: sem atividade

Fonte: elaborada pela autora

Dos isolados testados nesse estudo, há três representantes do gênero *Acidovorax* (2 de *P. cuvieri* e 1 de *L. vastus*). Esse gênero foi relatado produzindo lipases capazes de degradar polibutileno succinato co-adipato (PBSA), um plástico sintético biodegradável, inclusive, degradando mais efetivamente do que quando testado com tributirina (UCHIDA et al., 2000). Dessa maneira, os isolados dos ninhos de espuma podem ser ótimos candidatos para a degradação desse polímero, tendo em vista que foi possível observar a atividade lipásica desses isolados nesse estudo. Ademais, microrganismos capazes de degradar esses polímeros são essenciais para indústria, uma vez que plásticos biodegradáveis são comercializados em associação com outros tipos de plásticos biodegradáveis (TEERAPHATPORNCHAI et al., 2003).

Vale relatar que algumas das OTUs mais encontradas já foram relatadas por sua produção de biossurfactantes, o que poderia contribuir para a estabilidade dessas bioespumas. Bactérias do gênero *Pseudomonas* são conhecidas por sua produção do biossurfactante ramnolipídeo, utilizados na formulações de detergentes líquidos (JADHAV et al., 2019), para melhorar a degradação de hidrocarbonetos co-contaminados com metais tóxicos (MAIER; SOBERÓN-CHÁVEZ, 2000) e em produtos para tratamento de pele (RANDHAWA; RAHMAN, 2014). Já as bactérias do gênero *Bacillus* são produtoras do biossurfactante lipopeptídeos, cuja aplicações vão desde controle biológico em plantas (GEISSLER et al., 2019), redução de formação de biofilme de patógenos em equipamentos na indústria alimentar (GEISSLER et al., 2019) a aditivo antimicrobianos em pasta de dentes (BOUASSIDA et al., 2017). Os Biossurfactantes são moléculas de interesse biotecnológico por possuírem diversas aplicações desde a indústria do petróleo, de limpeza e cosméticos, alimentícia, agrícola, farmacêutica, cerâmica, celulose e papel, processamento de carvão e biorremediação (FAKRUDDIN, 2012).

Por fim, esse estudo fez um levantamento dos isolados do ninho de espuma que apresentaram hidrolases, utilizadas em diversos processos biotecnológicos. Entretanto outros testes ainda devem ser realizados para avaliar a capacidade desse microrganismo de produzir outras biomoléculas, como biossurfactantes, emulsificantes, antimicrobianos e/ou pigmentos.

6. CONCLUSÃO

Esse trabalho contribuiu para o conhecimento da microbiota cultivável associada ao ninho de espuma das espécies de *P. cuvieri* e *L. vastus*. Através dos resultados apresentados observamos a presença de OTUs que já haviam sido relatadas em trabalhos da microbiota da pele de anfíbios e capazes de inibir o patógeno Bd *in vitro*, como *Pseudomonas*, *Chryseobacterium*, *Acinetobacter* e *Pedobacter*. Esses isolados poderão servir como probióticos para espécies susceptíveis a infecção. Além disso, esse estudo também observou o potencial de prospecção biotecnológica para outras biomoléculas, como microrganismos produtores de hidrolases, uma vez que dos 153 isolados, 37 tiveram atividades positivas para amilases, 111 atividades proteases e 97 para lipídios. Podemos destacar os 21 isolados (P10, P20, P32, P55, P57, P59, P67, P79, P104, P120, P124B, P154, L6, L14, L15, L39, L91, L98, L119, L121A e L122) que obtiveram resultados positivos para todas as atividades testadas nesse trabalho.

7. REFERÊNCIAS

ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. **Biomolecules**, v. 4, n. 1, p. 117–139, 2014.

AHMED, S. A. et al. Novel milk-clotting enzyme from *Bacillus stearothermophilus* as a coagulant in UF-white soft cheese. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7, p. 241–249, 2016.

ALCAIDE, M. F.; LAVILLA, E. O.; ALCAIDE, A. P. Histology and Histochemistry of the Albumin Glands in Some Foam-Nesting Anurans. **South American Journal of Herpetology**, v. 4, n. 2, p. 151–163, 2009.

ALFORD, R. A. **Bleak future for amphibians**. Nature NEWS & VIEWS. v 480. p 461-462, 2011.

ALTSCHUL, S. F. ET AL. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, v. v. 215, p. 403–410, 1990.

AMÉZQUITA, J. M.-N. S. V. F. A. Foam Nests Provide Context-Dependent Thermal Insulation to Embryos of Three Leptodactylid Frogs. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 88, p. 246–253, 2015.

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. 851–864, 2009.

ASSIS, A. B. DE. **Análise sobre a microbiota cutânea de anfíbios em fragmentos de Floresta Atlântica e sua eficácia contra agentes patogênicos**, 2011.

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, n. 6, p. 807–820, 2013.

BOUASSIDA, M. et al. Potential application of *Bacillus subtilis* SPB1 lipopeptides in toothpaste formulation Application of biosurfactant in toothpaste. **Journal of Advanced Research**, v. 8, n. 4, p. 425–433, 2017.

BRANDT, K. K. et al. Decreased abundance and diversity of culturable *Pseudomonas* spp. populations with increasing copper exposure in the sugar beet rhizosphere. 2006.

BRUTYN, M. et al. *Batrachochytrium dendrobatidis* zoospore secretions rapidly disturb intercellular junctions in frog skin. **Fungal Genetics and Biology**, v. 49, n. 10, p. 830–837, 2012.

CHAKRAVARTHI, S.; KAPOOR, R. Development of a nutritious low viscosity

weaning mix using natural ingredients and microbial amylases. v. 7486, n. November, 2015.

CHEN, W. M.; LIN, C. Y.; SHEU, S. Y. Investigating antimicrobial activity in *Rheinheimera* sp. due to hydrogen peroxide generated by l-lysine oxidase activity. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 6, p. 487–493, 2010.

CIKANEK, S. et al. Composition of symbiotic bacteria predicts survival in Panamanian golden frogs infected with a lethal fungus. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 282, n. 1805, p. 20142881–20142881, 2015.

COCARTA, D. M. et al. Cultivable Hydrocarbonoclastic Microbial Community from Historically Polluted Soil: Tests for Consortium Development. **Soil and Sediment Contamination**, v. 28, n. 3, p. 334–345, 2019.

CONTESINI, F. J.; MELO, R. R. DE; SATO, H. H. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 38, n. 3, p. 321–334, 2018.

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**, n. January, p. 293–296, 2010.

DE SOUZA, P. M. et al. A biotechnology perspective of fungal proteases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 337–346, 2015.

DUELLMAN, W. E. **Alternative life-history styles in anuran amphibians : evolutionary and ecological implications**. Kluwer Academic Publishers. p 101-126, 1989.

FAKRUDDIN. Biosurfactant : Production and Application. **Journal of Petroleum & Environmental Biotechnologr**, v. 3, n. 4, 2012.

FLECHA, S. V. et al. The effect of captivity on the skin microbial symbionts in three *Atelopus* species from the lowlands of Colombia. **PeerJ**, p. 1–21, 2017.

FLECHAS, S. V. et al. Microbiota and skin defense peptides may facilitate coexistence of two sympatric Andean frog species with a lethal pathogen. **ISME Journal**, 2018.

FLEMING, R. I. et al. Tangara frog : Foam nest components of the tu a cocktail of proteins conferring physical and biological resilience. n. February, p. 1787–1795, 2009.

FURINI, G. et al. Production of lipolytic enzymes by bacteria isolated from biological effluent treatment systems. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 90, n. 3, p. 2955–2965, 2018.

GEISSLER, M. et al. **Lipopeptide Biosurfactants From Bacillus Species**. Second Edi ed.Elsevier Inc., 2019.

GOYTACAZES, C. D. O. S.; ABRIL, R. J. **UTILIZAÇÃO DE SORO DE LEITE PARA A PRODUÇÃO DE AMILASES POR *Bacillus sp.* SMIA-2**, 2006.

GOYTACAZES, C. D. O. S.; AGOSTO-, R. J. **APLICAÇÃO DE PROTEASES E AMILASES PRODUZIDAS POR *Bacillus sp.* SMIA-2 NA REMOÇÃO DE MANCHAS DE TECIDO**. 2012.

GROSSART, H. et al. Production of a Blue Pigment (Glaukothalin) by Marine *Rheinheimera spp* Production of a Blue Pigment (Glaukothalin) by Marine *Rheinheimera spp* . **International Journal of Microbiology**, p. 7, 2009.

GUPTA, R.; BEG, Q.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: Molecular approaches and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, n. 1, p. 15–32, 2002.

HARRIS, R. N. et al. Amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* is inhibited by the cutaneous bacteria of amphibian species. **EcoHealth**, v. 3, n. 1, p. 53–56, 2006.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. April 2005, p. 235–251, 2006.

HERNÁNDEZ-GÓMEZ et al. Cutaneous microbial community variation across populations of eastern hellbenders (*Cryptobranchus alleganiensis alleganiensis*). **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JUL, p. 1–16, 2017.

HERNÁNDEZ-GÓMEZ, O.; WUERTHNER, V.; HUA, J. Amphibian Host and Skin Microbiota Response to a Common Agricultural Antimicrobial and Internal Parasite. **Microbial Ecology**, 2019.

HIRD, D. W. et al. *Aeromonas hydrophila* in Wild-Caught Frogs and Tadpoles (*Rana pipiens*) in Minnesota. **Laboratory Animal Science**, p. 166–169, 1981.

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. Frog Foam Nest Protein Diversity and Synthesis. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology**, v. 325, n. 7, p. 425–433, 2016.

HMIDET, N. et al. Alkaline proteases and thermostable α -amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: Characterization and potential application as detergent additive. **Biochemical Engineering Journal**, v. 47, n. 1–3, p. 71–79, 2009.

HOLDEN, W. M. et al. Skin bacteria provide early protection for newly metamorphosed southern leopard frogs (*Rana sphenoccephala*) against the frog-killing fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Biological Conservation**, v. 187, p. 91–102, 2015.

HOPKINS, W. A. Amphibians as models for studying environmental change. **ILAR Journal**, v. 48, n. 3, p. 270–277, 2007.

HUGO, C. et al. **Chryseobacterium**. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria, 2019.

ILORI, M. O.; AMOBI, C. J.; ODOCHA, A. C. Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* spp . isolated from a tropical environment. **Chemosphere**, v. 61, p. 985–992, 2005.

INFANTE, I. et al. Wool-degrading *Bacillus* isolates: Extracellular protease production for microbial processing of fabrics. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 6, p. 1047–1052, 2010.

ITO, S.; KOBAYASHI, T.; ARA, K. Alkaline detergent enzymes from alkaliphiles : enzymatic properties , genetics , and structures. 1998.

JADHAV, J. V. et al. Sunflower Acid Oil-Based Production of Rhamnolipid Using *Pseudomonas aeruginosa* and Its Application in Liquid Detergents. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 22, n. 3, p. 463–476, 2019.

JAEGER, K.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Protein technologies and commercial enzymes**, p. 17–19, 2002.

JIMÉNEZ, R. R.; SOMMER, S. The amphibian microbiome: natural range of variation, pathogenic dysbiosis, and role in conservation. **Biodiversity and Conservation**, v. 26, n. 4, p. 763–786, 2017.

KAMBLE, A.; SRINIVASAN, S.; SINGH, H. In-Silico Bioprospecting: Finding Better Enzymes. **Molecular Biotechnology**, v. 61, n. 1, p. 53–59, 2019.

KNOB, A. Evaluation of Sweet Potato Cultivars to the Formation of Sugars with Potential for the Production of Ethanol. **Rev. Virtual Quimica**, n. January, 2019.

KRUGER, A. Functional Redundancy of *Batrachochytrium dendrobatidis* Inhibition in Bacterial Communities Isolated from *Lithobates clamitans* Skin. **Microbial Ecology**, 2019.

KUCEROVA, P.; CERVINKOVA, M. Spontaneous regression of tumour and the role of microbial infection - possibilities for cancer treatment. **Anti-Cancer Drugs**, v. 27, n. 4, p. 269–277, 2016.

KUIPER, I. et al. Characterization of two *Pseudomonas putida* lipopeptide biosurfactants , putisolvin I and II , which inhibit biofilm formation and break down existing biofilms. v. 51, p. 97–113, 2004.

KÜNG, D. et al. Stability of microbiota facilitated by host immune regulation: Informing probiotic strategies to manage amphibian disease. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.

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

LI, S. et al. Technology prospecting on enzymes: Application, marketing and engineering. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 2, n. 3, p. e201209017, 2012.

LIU, X.; KOKARE, C. **Microbial Enzymes of Use in Industry**. [s.l.] Elsevier Inc., 2017.

LOCH, T. P.; FAISAL, M. Emerging flavobacterial infections in fish : A review. **Journal of Advanced Research**, v. 6, n. 3, p. 283–300, 2019.

MAHDI, B. A.; BHATTACHARYA, A.; GUPTA, A. Enhanced lipase production from *Aeromonas* sp. S1 using Sal deoiled seed cake as novel natural substrate for potential application in dairy wastewater treatment. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 418–426, 2012.

MAIER, R. M.; SOBERÓN-CHÁVEZ, G. Pseudomonas aeruginosa rhamnolipids: Biosynthesis and potential applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, n. 5, p. 625–633, 2000.

MAURER, K. H. Detergent proteases. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 15, n. 4, p. 330–334, 2004.

MESQUITA, A. F. C. et al. Low resistance to chytridiomycosis in direct-developing amphibians. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–7, 2017.

MESSIAS, J. M. et al. Microbial lipases : Production , properties and biotechnological applications. p. 213–234, 2011.

MULETZ-WOLZ, C. et al. Antifungal Bacteria on Woodland Salamander Skin Exhibit High Taxonomic Diversity and Geographic Variability. **Appl Environ Microbiol**, v. 83, n. 9, p. 1–13, 2017.

MUTHUMARI, M.; THILAGAVATHI, S.; HARIRAM, N. Industrial Enzymes: Lipase Producing Microbes From Waste Volatile Substances. **International journal of pharmaceutical sciences and research**, v. 7, n. 5, p. 2201–08, 2016.

N. JISHA, V. et al. Versatility of microbial proteases. **Advances in Enzyme Research**, v. 01, n. 03, p. 39–51, 2013.

NA, P.; VO, E.; INDUSTRIJA, T. APPLICATION OF ENZYMES IN THE TEXTILE INDUSTRY : A REVIEW. **Jahorina**, 2011.

NAJAFI, M. F.; DEOBAGKAR, D.; DEOBAGKAR, D. Potential application of protease isolated from *Pseudomonas aeruginosa* PD100. **Electronic Journal of Biotechnology**,

v. 8, n. 2, p. 197–203, 2005a.

NAJAFI, M. F.; DEOBAGKAR, D.; DEOBAGKAR, D. Purification and characterization of an extracellular α -amylase from *Bacillus subtilis* AX20. **Protein Expression and Purification**, v. 41, n. 2, p. 349–354, 2005b.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. artmed, 2014.

NIGAM, P. S. Microbial Enzymes with Special Characteristics for Biotechnological Applications. p. 597–611, 2013.

OLIVEIRA, C. L. **Análise in vitro da atividade de secreções cutâneas de anfíbios do Cerrado brasileiro à proliferação do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (LONGCORE; PESSIER; NICHOLS, 1999)**, 2014.

OLSON, D. Y RONNENBERG, K. Mapping Project: 2014 Update. v. 22, n. 111, p. 17–21, 2014.

PAGE, A. P. et al. The golden death bacillus *Chryseobacterium nematophagum* is a novel matrix digesting pathogen of nematodes. **BMC Biology**, v. 17, p. 1–13, 2019.

PANDEY, A. et al. Advances in microbial amylases. v. 152, p. 135–152, 2000.

PARK, M. S. et al. *Chryseobacterium soldanellicola* sp. nov. and *Chryseobacterium taeanense* sp. nov., isolated from roots of sand-dune plants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 10.1099/ijs.0.63825–0, p. 433–438, 2006.

PECHMANN, J. H. K. et al. Declining amphibian populations: The problem of separating human impacts from natural fluctuations. **Science**, v. 253, n. 5022, p. 892–895, 1991.

PEIXOTO, L. J. S. et al. AEROMONAS SPP.: FATORES DE VIRULÊNCIA E PERFIS DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E METAIS PESADOS. **Arq. Inst. Biol**, v. 79, p. 453–461, 2012.

PEMBERTON, J. M.; KIDD, S. P.; SCHMIDT, R. Secreted enzymes of *Aeromonas*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 152, p. 10, 1997.

PEREIRA, E. B. et al. Evolution of the anuran foam nest: Trait conservatism and lineage diversification. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 122, n. 4, p. 814–823, 2017.

POHANKA, M. Biosensors and Bioassays Based on Lipases, Principles and Applications, a Review. 2019.

POMBAL, J. P.; HADDAD, C. F. B. Strategies and reproductive modes of anurans (Amphibia) in a permanent pond in serra de paranapiacaba, southeastern Brazil. **Papeis Avulsos de Zoologia**, v. 45, n. 15, p. 201–213, 2005.

RANDHAWA, K. K. S.; RAHMAN, P. K. S. M. Rhamnolipid biosurfactants-past, present, and future scenario of global market. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. SEP, p. 1–7, 2014.

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. et al. Integrating the role of antifungal bacteria into skin symbiotic communities of three Neotropical frog species. **ISME Journal**, 2019.

REBOLLAR, E. A.; HARRIS, R. N. Editorial: Ecology of Amphibian-Microbial Symbioses. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. April, p. 1–3, 2019.

RELYEA, R. A.; SCHOEPPNER, N. M.; HOVERMAN, J. T. Pesticides and amphibians: The importance of community context. **Ecological Applications**, v. 15, n. 4, p. 1125–1134, 2005.

RIFFEL, A. **Avaliação de proteases extracelulares da linhagem Chryseobacterium sp . Kr6 e purificação e caracterização de uma metaloprotease queratinolítica**, 2006.

RODRIGUEZ, D. et al. Long-term endemism of two highly divergent lineages of the amphibian-killing fungus in the Atlantic Forest of Brazil. **Molecular Ecology**, v. 23, p. 774–787, 2014.

ROLLINS-SMITH, L. A. et al. Metabolites Involved in Immune Evasion by *Batrachochytrium dendrobatidis* Include the Polyamine Spermidine. **Infection and Immunity ASM**, v. 87, n. 5, p. 1–13, 2019.

ROZNIK, E. A. Impacts of thermal mismatches on chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* prevalence are moderated by life stage , body size , elevation and latitude. **Ecology Letters**, 2019.

SÁ, M. DA C. A. DE et al. Distribution of PLD and FagA, B, C and D genes in *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats with caseus lymphadenitis. **Genetics and Molecular Biology**, v. 36, n. 2, p. 265–268, 2013.

SAIKI, R. et al. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. **Journal of Infectious Diseases**, v. 158, 1154-, n. 9, 1988.

SANCHEZ, S.; DEMAIN, A. L. **Useful Microbial Enzymes — An Introduction**. Elsevier Inc., 2017. v. 2017

SANTOS, R. C. DOS. **VARIAÇÃO NA INTENSIDADE DE INFECÇÃO POR *Batrachochytrium dendrobatidis* EM POPULAÇÕES DE RÃ- TOURO NA REGIÃO SUL DO BRASIL**, 2018.

SCHEELE, B. C. et al. Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity. **Science**, v. 363, n. March, p. 1459–1463, 2019.

SHARMA, S. et al. **Thermostable Enzymes for Industrial Biotechnology**. Elsevier B.V., 2019.

SILVA, F. V. A. DA; MONTEIRO, W. M.; BERNARDE, P. S. “Kambô” frog (*Phyllomedusa bicolor*): use in folk medicine and potential health risks. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, p. e20180467, 2019.

SINGH, R. S.; SINGH, T.; PANDEY, A. **Microbial Enzymes—An Overview**. Elsevier B.V., 2019.

STEHR, F. et al. Microbial lipases as virulence factors. v. 22, p. 347–355, 2003.

SYUKUR, S. et al. Isolation and molecular characterization of lactic acid bacteria by using 16s rRNA from fermented buffalo milk (Dadih) in Sijunjung, West Sumatera. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 5, n. 6, p. 871–876, 2014.

TAYLOR, P. et al. Amylolytic enzymes and products derived from starch: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 35, p. 373–403, 1995.

TEERAPHATPORNCHAI, T. et al. Isolation and characterization of a bacterium that degrades various polyester-based biodegradable plastics. **Biotechnology Letters**, v. 25, n. 1, p. 23–28, 2003.

TENNESSEN, J. A. et al. Variations in the expressed antimicrobial peptide repertoire of northern leopard frog (*Rana pipiens*) populations suggest intraspecies differences in resistance to pathogens. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 33, p. 1247–1257, 2009.

UCHIDA, H. et al. Properties of a bacterium which degrades solid poly(tetramethylene succinate)-co-adipate, a biodegradable plastic. **FEMS Microbiology Letters**, v. 189, n. 1, p. 25–29, 2000.

VENCES, M. et al. Gut bacterial communities across tadpole ecomorphs in two diverse tropical anuran faunas. **Science of Nature**, v. 103, n. 3, 2016.

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

VIEIRA, C. A. et al. Body length of *Hylodes* cf. *ornatus* and *Lithobates catesbeianus* tadpoles, depigmentation of mouthparts, and presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* are related. **Braz. J. Biol.**, v. 73, p. 195–200, 2013.

VISHWANATHA, K. S.; RAO, A. G. A.; SINGH, S. A. Acid protease production

by solid-state fermentation using *Aspergillus oryzae* MTCC 5341: Optimization of process parameters. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 129–138, 2010.

WARNER, S. A. J. **Genomic DNA Isolation and Lambda Library Construction. In Plant Gene Isolation: Principles and Practice**, 1996.

WAWRIK, B. et al. Identification of unique type II polyketide synthase genes in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 5, p. 2232–2238, 2005.

WILLIAM E. DUELLMAN, L. T. **Biology of Amphibians**, 1994.

WOODHAMS, D. C. et al. Symbiotic bacteria contribute to innate immune defenses of the threatened mountain yellow-legged frog, *Rana muscosa*. **Biological Conservation**, v. 138, n. 3–4, p. 390–398, 2007.

WOODHAMS, D. C. et al. Antifungal isolates database of amphibian skin-associated bacteria and function against emerging fungal pathogens. **Ecology**, v. 96, n. 2, p. 595–595, 2015.

WOODHAMS, D. C. et al. Probiotics Modulate a Novel Amphibian Skin Defense Peptide That Is Antifungal and Facilitates Growth of Antifungal Bacteria. **Microbial Ecology**, 2019.

WRIGHT, K. **Amphibian Therapy**. Elsevier Inc., 2013.

ZAVALETA, A. POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LOS MICROORGANISMOS EXTREMÓFILOS. **Ciencia e Investigación**, v. 9, n. 2, p. 2006, 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**, p. 11–13, 2019.