



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DANIEL VIEIRA MARTINS

**ESTUDO DA COMPOSIÇÃO E DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS
MICROORGANISMOS ISOLADOS DO NINHO DE ESPUMA DO ANURO *Adenomera
hylaedactyla***

FORTALEZA

2020

DANIEL VIEIRA MARTINS

ESTUDO DA COMPOSIÇÃO E DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS
MICRORGANISMOS ISOLADOS DO NINHO DE ESPUMA DO ANURO *Adenomera*
hylaedactyla

Monografia apresentada ao curso de graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas. Área de concentração: Microbiologia Ambiental.

Orientadora: Profa. Dr. Denise Cavalcante Hissa.

Coorientadora: Profa. Dr. Vânia Maria Maciel Melo.

FORTALEZA

2020

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)

M342e Martins, Daniel Vieira.
Estudo da composição e das atividades biológicas dos microrganismos isolados do ninho de espuma do anuro *Adenomera hylaedactyla* / Daniel Vieira Martins. – 2020.
56 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2020.

Orientação: Profa. Dra. Denise Cavalcante Hissa.

Coorientação: Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo.

1. Anfíbios. 2. Antifúngico. 3. Enzimas. 4. Microbiota. I. Título.

CDD 570

DANIEL VIEIRA MARTINS

ESTUDO DA COMPOSIÇÃO E DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS
MICRORGANISMOS ISOLADOS DO NINHO DE ESPUMA DO ANURO *Adenomera*
hylaedactyla

Monografia apresentada ao curso de
graduação em Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Ceará, como requisito
parcial à obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas. Área de concentração:
Microbiologia Ambiental.

Aprovada em: 19 / 10 / 2020.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Robson Waldemar Ávila
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Francisca Andréa da Silva Oliveira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado saúde e força para superar às dificuldades

Agradeço a todos os professores que contribuíram com minha formação acadêmica, em especial a minha orientadora professora **Denise Cavalcante Hissa**, uma mulher forte, doce, determinada uma inspiração profissional e pessoal, que me acolheu como seu aluno e sempre esteve do meu lado para aconselhar, orientar e auxiliar na formação tanto profissional como pessoal. Sou grato também a minha coorientadora, professora **Vânia Maria Maciel Melo** que desde a monitoria de Microbiologia Geral tem sido uma grande mentora e todos os conselhos e puxões de orelha me tornaram um profissional mais capacitado e responsável. Tenho muito orgulho de ter sido orientado por mulheres tão incríveis.

Não posso deixar de agradecer a mulher mais importante da minha vida, minha mãe **Celiene Vieira**, que sempre apoiou minha carreira e abriu mão de muita coisa de casa para financiar o melhor que podia nos meus estudos e incentivar a ser o primeiro formado da família. Ela esteve do meu lado quando tomei a decisão de desistir de tentar o ingresso em Engenharia Química no terceiro ano por querer Biologia. Enfim, estou me formando e vou cumprir aquela minha promessa de criança que um dia eu seria o orgulho da senhora.

Eu não teria chegado até aqui sem meu pai **José Wilson Martins**, o homem mais batalhador que conheci. Ele nunca teve uma vida fácil, mas dedicou tudo a me dar o melhor futuro possível e me formar um homem responsável e de caráter. Eu te amo muito pai e o senhor é uma inspiração para mim.

Também agradeço a pessoa que mais me deu forças para continuar no curso, minha melhor amiga e namorada **Maria Victória Alves**, pois nos momentos mais difíceis onde pensei não ser capaz e desistir de tudo, ela acreditou em mim e incentivou a continuar. Além de casal, nós fomos parceiros científicos e sempre buscamos crescer profissionalmente juntos, nos apoiando. Ela é a alma mais carinhosa que já conheci e se conquistei muita coisa até aqui e estou concluindo o curso, é graças a ela, meu amor, minha dupla, minha inspiração.

Agradeço a meu irmão **Thiago Martins**, meu parceiro do qual tenho uma conexão incrível e apesar das broncas, sempre o incentivo a ser melhor porque acredito demais no potencial dele e sei que logo eu estarei orgulhoso ao ver ele se formar também.

Também agradeço a meu pequeno pocinho de amor, meu cachorro e fiel amigo **Dexter**, um pinscher que a 5 anos ilumina minha vida. Ele sempre está comigo para me dar carinhos, mordidinhas e tem o poder de me colocar para cima nos momentos mais difíceis.

Agradeço a meus familiares, em especial a meus padrinhos **Márcia e Paulo Sérgio** por sempre serem presentes em minha vida e por tanto me incentivarem, levo vocês no meu coração. Também agradeço a minha tia **Maria Luíza**, pois sempre teve um apreço enorme por mim e sempre incentivou meus estudos e meu futuro profissional. Também agradeço minhas avós sempre acolhedoras **Celina e Duquinha**, mas especialmente a meu avô **José Martins**, que não pode prestigiar esse momento em vida ao meu lado, mas está comigo de coração.

Agradeço aos meus colegas do Laboratório de Recursos Genéticos (LARGEN) e do Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia (LEMBIOTECH) por compor uma segunda família do qual tanto me orgulho de fazer parte. Em especial, agradeço a **Andréa Oliveira**, membro convidada da minha banca avaliadora, que me ensinou muito sobre biologia molecular durante a iniciação científica e foi uma pessoa atenciosa, prestativa, didática e extremamente gentil. Agradeço ao **Igor Duarte** por ser o amigo que sempre me faz rir, que me incentiva e por ter sido tão atencioso ao me ajudar com os gráficos e a me ensinar bioinformática, você é uma grande inspiração para mim. Agradeço ao meu Team Ninho de Espuma: **Saulo Gonçalves, Luzia Castro e Raissa Dias**, pois aprendi muito com o trabalho em equipe e fazer parte desse time me rendeu amizades importantíssimas e muito aprendizado, tenho sorte de ter feito parte dessa equipe. Não poderia deixar de agradecer a **Mirian Santos**, que conheci a pouco tempo, mas se mostrou uma amiga incrível e importantíssima para esse trabalho, pois antes de me matricular no TCC ela voluntariamente me disponibilizou sua biblioteca de artigos e se dispôs a conversar, tirar dúvidas, debater e me ajudar no que fosse preciso. Muito obrigado Mirian, você é uma pessoa incrível. Sou grato a técnica **Mirella Leite** e a **Cristiane Rabelo**, as quais eu tanto perturbei durante meus experimentos e foram muito pacientes ao me ensinarem e me salvarem, vocês são pessoas especiais e suas animações são contagiantes e dão muita vida aquele laboratório. E a Mirela até me converteu a virar fã de Beatles, então obrigado Mirela.

Quero agradecer a outro momento importante na minha graduação, a monitoria de Microbiologia Geral ministrada pela professora Vânia, onde tive contato com uma segunda mãe e grande amiga na universidade, a técnica **Niédila Alves** que é uma pessoa que desejo levar para toda a vida. A Niédila é uma pessoa doce, carismática, extremamente radiante e me ensinou muito a ser um profissional responsável e trabalhar em equipe. Toda a equipe do LADMI durante 2017.2 e 2018.1 marcou minha vida e apesar do trabalho ser duro, foi muito prazeroso trabalhar ao lado de uma equipe tão unida e divertida. Na monitoria também agradeço a professora **Cláudia Martins**, por todas as conversas, conselhos e aprendizado.

Mesmo não sendo seu aluno ou monitor nas turmas de microbiologia, eu tenho uma admiração enorme por ela como pessoa e como profissional.

Sou grato a todas as oportunidades profissionais e contatos que fiz durante minha graduação, desde o estágio no **Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS)**, onde conheci profissionais extremamente capacitados e uma equipe muito receptiva, até minhas experiências com uma equipe incrível e empreendedora da empresa **Mata Branca Jr. Soluções Ambientais**. As experiências de extensão ao ser selecionado para participar dos programas como **XIX Curso de Inverno em Bioquímica e Biologia Molecular – USP** e **IV Curso em Biologia Funcional e Molecular – UNICAMP** também foram de grande contribuição para meu desenvolvimento profissional e ter a chance de levar esse trabalho e ainda ser premiado por ele foi extremamente gratificante. Essas experiências foram indispensáveis para desenvolver meu caráter profissional fora dos muros da universidade.

Agradeço aos amigos tão especiais que fiz durante a graduação e levo cada um deles no meu coração. Meus primeiros amigos da graduação **João Gabriel, Elivânia Nojoza e Carol Alves**. Eu simplesmente não tenho palavras para descrever o quanto vocês foram importantes em minha vida e no caminho que trilhei. Foram muitas risadas, brincadeiras, conselhos, desabafos e com certeza muita parceria envolvida, então muito obrigado por existirem em minha vida e pela amizade que levo em meu coração. Não posso esquecer do meu irmão e parceiro de laboratório **Joel Vidal**, que apesar de nossa amizade ter se concretizado apenas no quarto semestre, nos tornamos verdadeiros amigos que pretendo cultivar para toda a vida. Tenho o Joel como um irmão no qual eu posso contar para o que precisar. Também agradeço a meus grandes parceiros da vida, **Arthur Vasconcelos, Artur Brito, Felipe Vasconcelos, Victor Martins, Davi Cesar, João Felipe e Toshyro**. Essa turma está comigo a tantos anos que já nos tornamos uma família e sempre nos reunimos para os momentos de descontração e também nos momentos que precisamos cuidamos um do outro. Destaco meu carinho também a meu amigo **Paulo Roberto**, que apesar da distância é uma pessoa que sempre está disponível quando estou precisando de apoio e eu sei que sempre vou poder contar com ele.

Por fim, gostaria de agradecer ao professor **Robson Waldemar Ávila** por ter aceito contribuir com seus conhecimentos para desenvolver ainda mais esse trabalho e agradeço as agências financiadoras dessa pesquisa: **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** e **Instituto Serrapilheira**.

“A história da vida na terra tem sido uma história de interação entre coisas vivas e seus ambientes.”

(Rachel Carson)

RESUMO

Muitos grupos de anfíbios depositam seus ovos em ninhos de espuma. Essas estruturas são formadas durante o amplexo e resistem a degradação devida sua composição rica em proteínas surfactantes, carboidratos e lectinas. Ninhos de espuma conferem abrigo aos ovos depositados e larvas jovens, proteção contra raios ultravioletas, efeitos de dessecação, predadores, além de fornecer oxigenação e reserva alimentar. Sabe-se, atualmente, que a defesa contra muitos patógenos no indivíduo adulto é proveniente de sua microbiota, entretanto pouco se conhece sobre a microbiota presente nos ninhos durante seu estágio juvenil. O presente trabalho buscou isolar e identificar bactérias cultiváveis do ninho de espuma do anuro *Adenomera hylaedactyla*, a fim de avaliar a importância ecológica desses microrganismos e suas atividades biológicas, bem como seu potencial biotecnológico. Os ninhos foram coletados em São Gonçalo do Amarante-CE durante a estação chuvosa, junto de amostras do solo adjacente. Em seguida, as amostras foram diluídas, plaqueadas em meio ATGE ou BDA e mantidas por 48/168 h a 30°C. Os morfotipos bacterianos e fúngicos foram isolados e estocados. Foram realizados testes enzimáticos em meios ATGE + amido (0,1% p/v) para amilases, ATGE + leite desnatado (1% p/v) e ATGE + gelatina (3% p/v) para pesquisa de proteases com diferentes sítios de clivagem. Foi adicionado lugol para detecção da atividade amilásica e uma solução de sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) 4,1M para a atividade da gelatinase. Para o ensaio antifúngico, foi inoculado o fungo *Fusarium* sp. em meio BDA e no quinto dia, as bactérias e controle negativo *E. coli* (ATCC 25922) foram transferidas em fase *log* para a placa. Os resultados foram observados pela inibição do crescimento do fungo na placa. Para o teste antibacteriano, foi realizado o antibiograma com amostras padronizadas do sobrenadante dos cultivos de bactérias do ninho, utilizando as bactérias *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) como cepas alvo. O DNA genômico dos isolados de ninho foi extraído por termolise ou CTAB 2X e o gene 16S rRNA amplificado utilizando os primers 27F e 1525R ou 63F e 1389R e enviados para sequenciamento. As sequências foram tratadas utilizando o software Geneious Prime e os gêneros identificados a partir do alinhamento com o banco de dados. Foram isolados 17 fungos e 21 bactérias do solo adjacente, além de 7 fungos e 30 bactérias nas amostras de ninho. Os isolados bacterianos do ninho de espuma foram predominantemente Gram negativos do filo *Proteobacteria*, e houve maior abundância dos gêneros *Enterobacter*, *Bacillus* e *Serratia*. 8 (27%) dos isolados do ninho de espuma foram positivos para amilases e 19 (63%) positivos para proteases com diferentes sítios de clivagem, em comparação com o solo adjacente que apresentou 5 (24%) para amilases e 8 (38%) para proteases. 9 (30%) dos

isolados do ninho apresentaram atividade antifúngica no crescimento do fungo *Fusarium* sp. Nenhuma atividade antibacteriana significativa foi relatada. O presente trabalho forneceu informações sobre os microrganismos cultiváveis do ninho de espuma da espécie *A. hylaedactyla*, destacando sua importância na defesa contra patógenos e potencial biotecnológico para produção de enzimas hidrolíticas.

Palavras-chave: anfíbios; antifúngico; enzimas; microbiota.

ABSTRACT

Many groups of amphibians lay their eggs in foam nests. These structures are formed during amplexing and resist degradation due to their composition rich in surfactant proteins, carbohydrates and lectins. Foam nests provide shelter for deposited eggs and young larvae, protection against ultraviolet rays, desiccation effects, predators, in addition to providing oxygen and food reserve. Currently is known that the defense against many pathogens in the adult individual comes from their microbiota. However, little is known about the microbiota present in the nests during their juvenile stage. This work search to isolate and identify cultivable bacteria from the foam nest of the anuran *Adenomera hylaedactyla*, in order to evaluate the ecological importance of these microorganisms and their biological activities, as well as their biotechnological potential. The nests were collected in São Gonçalo do Amarante-CE during the rainy season, in additional samples of the adjacent soil. Then, the samples were diluted and plated in ATGE and BDA medium and maintained for 48/168 h at 30°C. The bacterial and fungal morphotypes were isolated and stored. Enzymatic tests were carried out on ATGE + starch (0.1% w/v) for amylases, ATGE + skimmed milk (1% w/v) and ATGE + gelatin (3% w/v) to search for proteases with different cleavage sites. Lugol was added to detect amylase activity and a 4.1M ammonium sulfate ((NH₄)₂SO₄) solution for gelatinase activity. For the antifungal assay, the fungus *Fusarium* sp. was grown in BDA medium and on the fifth day the bacteria and negative control *E. coli* (ATCC 25922) were transferred in a log phase to the plate. The results were observed by inhibiting the growth of the fungus on the plate. For antibacterial tests, the antibiogram was performed with standardized samples of the supernatant from the bacterial cultures of the nest, using the bacteria *Escherichia coli* (ATCC 25922) and *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) as target. The genomic DNA of the nest isolates was extracted by thermolysis or CTAB 2X and the 16S rRNA gene was amplified using primers 27F and 1525R or 63F and 1389R and sent for sequencing. The sequences were treated using the Geneious Prime software and the genera identified from the alignment with the database. 17 fungi and 21 bacteria were isolated from the adjacent soil, in addition to 7 fungi and 30 bacteria in the nest samples. The bacterial isolates of the foam nest were predominantly Gram negative from the *Proteobacteria* phylum, and there was a greater abundance of the *Enterobacter*, *Bacillus* and *Serratia* genera. 8 (27%) of foam nest isolates were positive for amylases and 19 (63%) positive for proteases with different cleavage sites, compared to the adjacent soil that presented 5 (24%) for amylases and 8 (38%) for proteases. 9 (30%) of the nest isolates showed antifungal activity on the growth of the fungus *Fusarium* sp. No significant antibacterial activity has been reported. The present

work provided information on the cultivable microorganisms of the foam nest of the species *A. hylaedactyla*, highlighting its importance in the defense against pathogens and biotechnological potential for the production of hydrolytic enzymes.

Keywords: amphibian; antifungal; enzymes; microbiota.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Ninhos de espuma com diferentes locais de deposição.....	26
Figura 2	– <i>Adenomera hylaedactyla</i> e seu ninho de espuma subterrâneo	26
Figura 3	– Desenho esquemático da placa de ensaio antifúngico no quinto dia	34
Figura 4	– Desenho esquemático da placa de ensaio antibacteriano	35
Figura 5	– Colônias isoladas dos morfotipos bacterianos em meio ATGE	36
Figura 6	– Morfotipos de fungos isolados em meio BDA	37
Figura 7	– Placas resultantes da técnica de <i>spread plate</i> dos fungos	37
Figura 8	– Géis de eletroforese destacando a amplificação do gene rRNA 16s do: isolados do ninho de espuma e marcadores moleculares.....	39
Figura 9	– Atividades enzimáticas em isolados do ninho de espuma do anuro <i>A.</i> <i>hylaedactyla</i>	43
Figura 10	– Atividades enzimáticas em isolados do solo adjacente	44
Figura 11	– Placas de atividades enzimáticas de isolados do ninho de espuma do <i>A.</i> <i>hylaedactyla</i> e solo adjacente	44
Figura 12	– Atividade antifúngica contra <i>Fusarium</i> sp. de isolados bacterianos do ninho de espuma da espécie <i>A. hylaedactyla</i>	45
Figura 13	– Placas resultantes do ensaio de inibição do fungo <i>Fusarium</i> sp. após 7 dias..	46

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** – Abundância de gêneros do ninho de espuma de *A. hylaedactyla*..... 40
- Gráfico 2** – Relação de filos dos isolados bacterianos do ninho de espuma de *A. hylaedactyla* (%) 41
- Gráfico 3** – Relação do número de isolados bacterianos do ninho de espuma da espécie *A. hylaedactyla* e solo adjacente com a produção de enzimas hidrolíticas ... 43
- Gráfico 4** – Relação de gêneros bacterianos do ninho de espuma com atividade antifúngica contra *Fusarium* sp. 46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentrações finais utilizadas na reação de PCR, utilizando par de primers 27F e 1525R ou 63F e 1389R	32
Tabela 2 – Número de morfotipos microbianos isolados do ninho de espuma do <i>A. hylaedactyla</i> e solo adjacente	36
Tabela 3 – Unidades Formadoras de Colônia (UFC/mL) nas amostras de ninho de espuma e solo adjacente.....	38
Tabela 4 – Número de halos enzimáticos formados em meio BDA de isolados fúngicos do ninho de espuma de <i>A. hylaedactyla</i> e solo adjacente	39
Tabela 5 – Identificação molecular dos isolados do ninho de espuma do <i>A. hylaedactyla</i>	40
Tabela 6 – Atividades enzimáticas e antimicrobianas avaliadas dos isolados do ninho de espuma do <i>A. hylaedactyla</i>	48

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	17
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	Anuros e ocorrência no semiárido brasileiro.....	19
2.2	A quitridiomycose e uso da microbiota da pele de anfíbios para sua proteção	21
2.3	Diversidade reprodutiva e ninhos de espuma.....	24
2.4	Prospecção de biomoléculas com origem microbiana	27
3.	OBJETIVOS	29
3.1	Objetivos gerais	29
3.2	Objetivos específicos	29
4.	METODOLOGIA	30
4.1	Coleta dos ninhos de espuma	30
4.2	Diluição, plaqueamento e isolamento.....	30
4.3	Extração e quantificação do DNA genômico	31
4.4	Amplificação do gene ribossomal 16S	31
4.5	Purificação e precipitação do gene RNAr 16S.....	32
4.6	Processamento das sequencias e identificação molecular.....	33
4.7	Ensaio enzimáticos para proteases e amilase	33
4.8	Ensaio de inibição do fungo filamentosso <i>Fusarium</i> sp.	33
4.9	Ensaio antibacteriano	34
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1	Isolamento e coleção	36
5.2	Identificação molecular dos isolados bacterianos do ninho de espuma	39
5.3	Ensaio enzimáticos para proteases e amilase	43
5.4	Ensaio de inibição do fungo filamentosso <i>Fusarium</i> sp.	45
5.5	Ensaio antibacteriano	47
6.	CONCLUSÃO	49
7.	REFERÊNCIAS	50

1. INTRODUÇÃO

Os ninhos de espuma são bioestruturas de grande importância para a reprodução de anuros e irradiação no ambiente terrestre, sendo uma notável adaptação e permitindo a proliferação em áreas abertas e secas (PEREIRA, 2017). Estes são formados durante o amplexo, e sua resistência a degradação é conferida por sua composição rica em proteínas surfactantes, carboidratos e lectinas (HISSA et al., 2008; DALGETTY & KENNEDY, 2010; VITT & CALDWELL, 2014).

Muitas espécies formadoras de ninhos de espuma, como o anuro *Adenomera hylaedactyla*, possuem larvas endotróficas que completam o desenvolvimento de girino para adulto no ninho (BORGES-LEITE, 2015). Essas emulsões conferem vantagens ao desenvolvimento da prole, como abrigo aos ovos depositados e larvas jovens, proteção contra raios ultravioletas, efeitos de dessecação, predadores, além de fornecer oxigenação e reserva alimentar (TANAKA & NISHIHARA, 1987; HISSA et al., 2008). Dessa forma, torna-se evidente a importância de conhecer essas bioestruturas para a conservação de espécies diante de problemáticas emergentes, que vem contribuindo com o declínio populacional do grupo.

Dentre as ameaças enfrentadas, podemos destacar a quitridiomiose, uma doença causada pelo fungo quitrídio *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) e responsável pelo declínio de 501 espécies (6,5% de todas as espécies de anfíbios), com previsão de mais 90 extinções e uma redução da abundância ultrapassando 90% em outras 124 espécies (SCHEELE, 2019; FISHER & GARNER, 2020).

Até o momento não há cura para a doença, contudo, muitos estudos como o de HOLDEN 2015, apresentam o potencial das comunidades bacterianas da pele de anuros pós-metamórficos na defesa contra o patógeno Bd. Conhecendo essas bactérias, é possível manipular a microbiota da pele, induzindo um bioaumento de bactérias potencialmente benéficas como uma viável estratégia de mitigação (MULETZ et al., 2012; BLETZ et al., 2013).

Além de possuir uma comunidade microbiana própria (HISSA et al., 2008), os ninhos de espuma compõem uma defesa inata contra patógenos devido a presença de peptídeos antimicrobianos (SHAHRUDIN, 2017) e sua composição de proteínas, lectinas e cistatinas (FLEMING, 2009). Apesar disso, o papel ecológico da microbiota dos ninhos de espuma ainda é pouco conhecido.

Além do mais, por ser o primeiro local de contato da pele do girino após eclosão dos ovos, acredita-se que o conhecimento dessa microbiota é essencial para conhecer a microbiota da pele dos girinos e adultos. Com isso, os ninhos de espuma apresentam um ambiente

potencialmente amplo para o desenvolvimento de probióticos mais eficazes para atuação na proteção contra o Bd, tendo grande impacto na conservação de espécies. Vale ressaltar que a microbiota de ninhos de espuma de anuros ainda é pouco conhecida.

Diante disso, o presente trabalho busca acessar a comunidade microbiana cultivável do ninho de espuma da rã *Adenomera hylaedactyla*, averiguando seu papel ecológico na manutenção dos ninhos de espuma, além da prospecção de cepas com capacidade de inibir o crescimento do fungo Bd e produtoras de enzimas de interesse biotecnológico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Anuros e ocorrência no semi-árido brasileiro

Os Anfíbios compõem um grupo bastante diverso, com 8.229 espécies atualmente conhecidas e mais espécies sendo descritas a cada ano (FROST, 2020). As três ordens que compreendem a classe amphibia são morfologicamente distintas. Sapos e rãs (ordem Anura) são especializados para pular, com pernas traseiras largas, corpos encurtados, sem cauda e com cabeça e grandes olhos. Salamandras e tritões (ordem Urodela) são muito mais alongados, com tamanho aproximadamente igual das patas anteriores e posteriores e uma cauda alongada. Cecílias (ordem Gymnophiona) são especializadas na vida em subsolo. Elas apresentam corpos alongados vermiformes, sem pernas e com olhos bastante reduzidos (WELLS, 2007).

Os anfíbios são considerados organismos modelo em diversas áreas de estudo. Além de seu fundamental papel em redes tróficas e controle de pragas, o grupo é apresentado como um potencial bioindicador de mudanças climáticas devido a sensibilidade da respiração cutânea em resposta a fatores ambientais (HOPKINS, 2007). Outros estudos, inclusive, destacam a importância de anuros na prospecção de biomoléculas aplicadas a saúde humana. Já é relatado ao menos 15 espécies da família *Bufo* a serem utilizadas na medicina tradicional. Compostos esteróides da pele e de secreções da glândula paratóide de espécies como *Bufo gargarizans*, *Duttaphrynus melanostictus* e *Rhinella marina* apresentaram atividade inibitória contra uma variedade de células cancerígenas, como as linhagens MDA-MB435 (melanoma), HCT-8 (côlon), HL60 (leucemia) e SF295 (glioblastoma) (CUNHA et al., 2010; RODRÍGUEZ et al., 2017).

Os anfíbios ocupam quase todos habitats disponíveis na terra, exceto os oceanos, ilhas oceânicas distantes e as regiões congeladas do Ártico e Antártico. Salamandras são mais abundantes em regiões temperadas, enquanto anuros e cecílias são mais abundantes em florestas tropicais, que fornecem uma combinação ideal de temperaturas quentes e pluviosidade (WELLS, 2007).

A disponibilidade de água tem grande importância para a composição e riqueza das comunidades de anfíbios em escala local, regional e global (PYRON AND WIENS, 2013). No entanto, savanas, regiões semi-áridas e áridas em todo mundo também abrigam uma diversidade de espécies de anfíbios (SILVA et al., 2017). Regiões semi-áridas são

consideradas desafiadoras para os anuros devido as dificuldades impostas por aspectos fisiológicos como a permeabilidade da pele e consequente risco de desidratação em ambientes secos (NAVAS, 2004). A Caatinga, um bioma exclusivo do nordeste brasileiro, é um exemplo de área semi-árida com uma vasta herpetofauna.

A Caatinga enfrenta problemas ecológicos como baixa umidade relativa, vegetação escassa, altas temperaturas diurnas e uma imprevisível sazonalidade das chuvas, que geralmente ocorrem a partir de janeiro, porém, com grande variação no comprimento do período de estiagem e na duração de lagoas temporárias, com algumas áreas podendo exceder períodos de 7 até 10 meses sem água (NAVAS, 2004; SILVA et al., 2017).

A estiagem direciona os anuros a ocuparem ambientes semi-áridos que ofereçam condições adequadas para o estabelecimento de períodos reprodutivos sazonais. Os anuros toleram a seca por meio de adaptações fisiológicas, como a economia de água derivada de ajustes no metabolismo do nitrogênio, a formação de casulos higroscópicos do estrato córneo, baixando a taxa metabólica e por mecanismos fisiológicos que evitam danos aos ossos e músculos devido a inatividade (NAVAS, 2004).

Devido às restrições fisiológicas impostas pela disponibilidade de água, ambientes semi-áridos e áridos em todo o mundo recebem menos atenção dos herpetologistas (GARDA et al., 2013) e dados sobre distribuição, taxonomia e história natural dos anfíbios da Caatinga ainda são iniciantes, com grande parte do domínio ainda pouco estudado (CAMARDELLI & NAPOLI, 2012; BORGES-LEITE et al., 2014). O trabalho de GARDA et al. (2013) relatou 98 espécies ocorrendo na Caatinga, pertencentes a 12 famílias. As famílias Hylidae e Leptodactylidae abrigaram 67% da diversidade da região (66 espécies). Também há indícios de 20 espécies endêmicas e 14 restritas (12 pertencentes a Chapada Diamantina na Bahia e 4 pertencentes aos brejos no Ceará).

Pertencente à família Leptodactylidae, a espécie *Adenomera hylaedactyla* é amplamente distribuída na América do Sul. Taxonomicamente, o gênero *Adenomera* possui dificuldades quanto a classificações sistemáticas, devido a fatores como grandes variações morfológicas intra e inter populacional e espécies crípticas. No Brasil, espécies do gênero *Adenomera* estão distribuídas na Amazônia, Mata Atlântica e em formações abertas de ambientes secos como Chaco, Cerrado e Caatinga. Dentre o gênero, a espécie *A. hylaedactyla* possui a maior distribuição entre as regiões. Há relatos da abundância de espécies não descritas relacionadas,

referidas como *Adenomera* aff. *hylaedactyla*, em regiões como Cerrado e Caatinga. Devido a sua abundância, a espécie indica ser um bom modelo ecológico para entender a influência de condições ambientais na reprodução de anuros em ambientes secos (FOUQUET, 2013; BORGES-LEITE, 2015; RAMALHO et al., 2018).

2.2 A quitridiomicose e uso da microbiota da pele de anfíbios para sua proteção

Anfíbios têm a maior proporção de espécies ameaçadas de extinção entre os vertebrados do mundo, com 41% das espécies vivas consideravelmente ameaçadas. (STUART et al., 2004; HAMER, 2008; PIMM et al., 2014). Acredita-se que isso ocorra devido a combinação de fatores importantes, como perda de habitat, contaminação ambiental, doenças, mudanças climáticas, introdução de espécies exóticas e extrativismo de recursos para uso humano. Por essa razão, os anfíbios se tornaram um foco de esforços para conservação da biodiversidade (HOPKINS, 2007; NORI, 2015).

Mortalidades em massa observados em algumas populações de anfíbios forneceram as primeiras evidências de que doenças poderiam desempenhar um papel significativo no declínio de suas populações. Os anfíbios são afetados por uma série de doenças com diferentes etiologias, como por exemplo, o trematoda *Ribeiroia ondatrae* que causa deficiências nas pernas dos sapos. O aumento da eutrofização, que pode ser proporcionada pela ação antrópica, favorece os caracóis (*Planorbella* sp.) que atuam como hospedeiro secundário para o parasita. Alguns tipos de ranavirus já são mais devastadores para os anuros, como o Frog virus 3 (FV-3) e o Tadpole edema virus (TEV). Esses patógenos são altamente virulentos e afetam principalmente sapos e rãs pré-metamórficos, apresentando elevadas taxas de mortalidade. Os estudos de casos de ranavirus no Brasil são recentes e sua prevalência está relacionada com cultivos em cativeiro de Rã-touro americana (*Lithobates catesbeianus*) para consumo humano. Porém o mais significativo, letal e melhor descrito patógeno dos anfíbios é o fungo quitrídio *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) (BEEBEE, 2005; DENSMORE & GREEN, 2007; RUGGERI et al., 2019).

Em maio de 2019, foi realizado um mapeamento global apontando que 54% das espécies de anuros estavam infectadas com o fungo Bd, distribuídos em 39% dos sítios monitorados. A Quitridiomicose contribuiu com o declínio de pelo menos 501 espécies (6,5% de todas as espécies de anfíbios), com previsão de mais 90 extinções e uma redução da abundância ultrapassando 90% em outras 124 espécies (SCHEELE, 2019; FISHER & GARNER, 2020).

Os quitrídios são queratinofílicos ou quitinofílicos, esporozóicos e habitam ambientes úmidos e aquáticos. São caracterizados por formarem zoósporos dotados de motilidade. Os *Batrachochytrium* são os únicos Chytridiomicota a parasitarem vertebrados, sendo o Bd responsável por infectar e desenvolver-se dentro de células epidérmicas queratinizadas da pele dos anfíbios. Anuros metamórficos infectados com o Bd normalmente apresentam letargia, desidratação, postura anormal, perda de reflexo e orientação, hiperplasia epidérmica e hiperkeratose, afetando principalmente a respiração cutânea, osmorregulação, balanço eletrolítico e tornando suscetível a infecções secundárias oportunistas. Em sua fase larval, anuros apresentam apenas deformidades em regiões queratinizadas do aparelho bucal (BERGER et al., 1998, PIOTROWSKI, 2004, CAREY et al., 2006, DENSMORE & GREEN, 2007; FISHER & GARNER, 2009).

A transmissão ocorre quando o indivíduo entra em contato com o zoósporo móvel em águas contaminadas, estabelecendo-se em regiões queratinizadas da pele. Infecções agudas por Bd são limitadas ao extrato córneo da epiderme e consistem na formação de esporângio envolvidos na reprodução assexuada, ou em agregados no citoplasma das células hospedeiras. Apesar da baixa letalidade em sua fase larval, os girinos podem atuar como reservatório dos zoósporos do fungo (DENSMORE & GREEN, 2007; VIEIRA et al., 2013).

A doença pode ser diagnosticada por meio da histologia, imunohistoquímica, identificação molecular ou isolando o microrganismo diretamente da amostra. Por ser um método preciso, específico e não invasivo, diagnósticos moleculares baseados em PCR quantitativa de regiões específicas do genoma (18S, ITS-1 ou 5.8S) são amplamente utilizados. Essa metodologia consegue detectar a presença do fungo em média de 7 a 14 dias antes da infecção poder ser detectada por métodos histológicos. Uma detecção precoce do microrganismo torna possível melhores tratamentos para controlar a doença nas populações (BOYLE, 2004; DENSMORE & GREEN, 2007; KADEKARU & UNE, 2017).

O desenvolvimento de métodos robustos, rápidos, precisos e específicos de diagnóstico para o Bd, permitiu que várias regiões compartilhassem informações buscando estabelecer um banco de dados universal, o Global Bd Mapping Project. Esse projeto está sendo integrado no site Amphibian Web (<https://amphibiaweb.org/>) e em um futuro próximo será possível ter coberturas mais precisas dos casos em todo o mundo (FISHER & GARNER, 2020).

O fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* é encontrado em todos os continentes, com

exceção da Antártica. Há relatos que condições ambientais podem ser importantes para a distribuição do Bd, principalmente por depender da água para chegar a seus hospedeiros. Fatores como baixas temperaturas, alta precipitação, altas altitudes, baixa exposição a ultravioleta B (UV-B) e exposições dos girinos a ambientes contaminados com agrotóxicos podem favorecer a prevalência de infecções pelo Bd e conseqüentemente levando a maiores índices de mortalidade (POUNDS et al., 2006; FISHER & GARNER, 2009; ORTIZ-SANTALIESTRA, 2011; ROHR et al., 2013; FISHER & GARNER, 2020; STEVENSON et al., 2020).

No Brasil, os estudos sobre a quitridiomiose vem se concentrando na Mata Atlântica, onde possuem os maiores números de casos registrados devido ao favorecimento de fatores abióticos como temperatura, pluviosidade e elevação (LAMBERTINI et al., 2020). Porém, o mapeamento da ocorrência em outras regiões é importante para entender os limites de distribuição do patógeno. Na Caatinga, por exemplo, os dados de ocorrência do Bd ainda são escassos. Apesar das restrições ambientais para o ciclo do fungo, em 2019 foram confirmados os primeiros casos da ocorrência do Bd em indivíduos adultos na Caatinga, no município de Picos, no estado do Piauí. As espécies relatadas foram *Rhinella granulosa* e *Rhinella jimi*. Já é conhecido a prevalência do fungo em outros ambientes semi-áridos como relatado em regiões da Austrália, contudo, ainda pouco se conhece sobre os mecanismos que permitem o fungo ser capaz de completar seu ciclo em indivíduos expostos a essas condições (OCOCK et al., 2013; BENÍCIO et al., 2019).

Apesar da alta letalidade, algumas espécies de anuros apresentam baixa incidência do Bd e já é conhecido que fatores associados à pele, como a sua microbiota residente, podem promover uma resistência ao fungo. MADSON et al. (2017) estabeleceu uma coleção de bactérias isoladas da pele de anuros de 12 espécies na Costa Rica, submetendo os isolados a dois protocolos diferentes para quantificar a inibição do fungo. Foram apresentados mais de 30 isolados caracterizados com anti-Bd, distribuídos entre os gêneros *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Chryseobacterium*, *Enterobacteriaceae*, *Lysinibacillus*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Sphingobacterium*, *Staphylococcus* e *Stenotrophomonas*. Além disso, o gênero *Serratia* foi o mais comum entre os isolados a apresentarem anti-Bd, com a espécie *Serratia marcescens* sendo a mais abundante, encontrada em três espécies diferentes de anuros.

Outro estudo comparando a microbiota da pele de três espécies de anuros da região do Panamá, sugeriu diferenças no grau de inibição do Bd entre as classes bacterianas. A classe

Gamaproteobactéria apresentou taxas de inibição significativamente maiores que outras classes, como Alphaproteobacteria, Actinobacteria e Bacilli. Com a família Enterobacteriaceae apresentando os maiores valores de inibição registrados (REBOLLAR, 2019).

Conhecendo a importância da microbiota associada na defesa contra o Bd, estudos vêm propondo o desenvolvimento de probióticos que ofereçam uma proteção consistente nas mais diversas variações genômicas do patógeno que o hospedeiro possa encontrar em condições naturais. A prospecção de novas cepas com forte inibição do Bd em condições populacionais, como biofilmes, são os principais alvos para os estudos futuros no desenvolvimento de probióticos (HARRISON, 2020). Apesar de ser amplamente relatado a importância dos microrganismos na pele dos indivíduos adultos, ainda pouco se conhece sobre a importância da microbiota em sua fase larval.

2.3 Diversidade reprodutiva e ninhos de espuma

Anuros apresentam a maior variedade de modos reprodutivos entre os vertebrados, divididos entre aquáticos, parcialmente aquáticos e terrestres. Foram descritos pelo menos 41 diferentes modos reprodutivos, classificados por diversas características como: modos e local de deposição dos ovos, tipo de ovo e padrões de desenvolvimento de ovos e larvas (HADDAD & PRADO, 2005; WELLS, 2007; VITT & CALDWELL, 2014; ISKANDAR, 2014; SESHADRI, 2014).

A água é de grande importância para a reprodução dos anuros. Muitos anfíbios depositam seus ovos diretamente no corpo d'água, porém, o estabelecimento de locais para uma deposição concentrada de ovos em microhabitats como bromélias, buracos em árvores ou folhas, possibilitou aos anfíbios ocuparem uma maior diversidade de ambientes (VITT & CALDWELL, 2014).

A construção de ninhos de espuma para a deposição dos ovos é uma estratégia reprodutiva adotada por muitas espécies das famílias Hyperoliidae Laurent, 1943, Leptodactylidae Werner, 1896, Limnodynastidae Lynch, 1969 e Rhacophoridae Hoffmann, 1932. Contudo, essa estratégia não é restrita apenas a esses grupos. Em 2010, foi relatado a formação de ninhos de espuma na espécie *Scinax rizibilis*, a única espécie da família Hylidae Rafinesque, 1815, a realizar essa estratégia (DUELLMAN, 1989; WILLIAM E. DUELLMAN, 1994; BASTOS & HADDAD, 2010).

Na Caatinga, a família Leptodactylidae apresenta a maior variedade de modos reprodutivos adaptados aos padrões imprevisíveis de chuvas da região. Ninhos de espuma são comuns em ambientes com formações de vegetação abertas e restrita disponibilidade de água, demonstrando ser de grande importância na colonização de ambientes secos. A presença de ninhos de espuma em solos úmidos pode indicar instabilidade do clima local, que rapidamente pode alterar os sítios de deposição devido a plasticidade fenotípica em função das condições ambientais, que podem rapidamente alterar de pequenas poças para lama (WOGEL et al., 2002; VIEIRA, 2008).

Os ninhos são produzidos durante o amplexo, onde geralmente a fêmea produz um líquido cloacal proteico onde os ovos são despejados, enquanto o macho movimenta as pernas em um movimento circular repetitivo, batendo as secreções e formando uma espuma, além de fertilizar os ovos. Os girinos podem permanecer no ninho até completar seu desenvolvimento, alimentando-se dos ovos não fertilizados (HISSA et al., 2008; DALGETTY & KENNEDY, 2010; VITT & CALDWELL, 2014).

Essas bioestruturas oferecem proteção aos ovos contra dessecação, raios ultravioletas, predadores, degradação, patógenos, fornecem oxigenação, além de atuarem como incubadoras, promovendo estabilidade térmica e facilitando o desenvolvimento rápido dos girinos. Também é reconhecido que essas estruturas podem atuar como reservas alimentares durante o desenvolvimento da prole (COOPER et al., 2005; HISSA et al., 2008; MÉNDEZ-NARVÁEZ et al., 2015; PEREIRA et al., 2017; SHAHRUDIN, 2017).

Existe uma variedade de ambientes onde os ninhos de espuma costumam ser depositados. Muitos indivíduos da família Leptodactylidae constroem ninhos aquáticos, encontrados sobre a superfície de lagoas ou poças. Ninhos construídos sob a superfície da água podem ser dissolvidos após um período, dispersando os girinos no meio para que continuem seu desenvolvimento. Ninhos terrestres podem ser encontrados em depressões escavadas no solo ou suspensos na vegetação. Algumas espécies constroem seus ninhos em câmaras subterrâneas e a prole permanece no interior até completar seu desenvolvimento, como é o caso da espécie *Adenomera hylaedactyla*. Essa estratégia ajuda a manter o ninho por um período relativamente maior e permite que os girinos resistam à dessecação durante períodos de baixa precipitação, que ainda podem ocorrer durante a estação chuvosa (VIEIRA, 2008; DALGETTY & KENNEDY, 2010; VITT & CALDWELL, 2014; HISSA et al., 2016).

Figura 1: Ninhos de espuma com diferentes locais de deposição. Respectivamente, ninhos aquáticos; ninhos terrestres, em copas de árvores e no solo.



Fonte: (COOPER, 2017)

Figura 2: *Adenomera hylaedactyla* e seu ninho de espuma subterrâneo, com ovos em desenvolvimento.



Fonte: Saulo Gonçalves e Denise Hissa.

Essas bioespumas são estruturas resistentes a degradação, em virtude da sua composição rica em proteínas surfactantes, carboidratos e lectinas. (FLEMING, 2009; HISSA et al., 2016; COOPER et al., 2017). Além dessas moléculas, sabe-se que os ninhos de espuma possuem uma comunidade microbiana (HISSA et al., 2008), entretanto, pouco se conhece sobre a diversidade e função dessa microbiota nos ninhos de espuma. Com isso, faz-se necessário estudos que busquem acessar essas comunidades, empenhando-se em entender seu papel ecológico no desenvolvimento e proteção dos anfíbios durante a sua fase larval.

2.4 Prospecção de biomoléculas com origem microbiana

A prospecção de novas biomoléculas e estruturas potencialmente úteis para processos biotecnológicos industriais, estão diretamente relacionados a avaliação de recursos naturais e uso da biodiversidade (COX & KING, 2013). Os microrganismos participam dos ciclos biogeoquímicos da Terra, e sua diversidade metabólica e estrutural os tornam uma das mais prosperas fontes de biomoléculas e bioprocessos. É estimado que globalmente, os solos e os oceanos apresentem respectivamente $4\text{-}5 \times 10^{30}$ e $3,6 \times 10^{29}$ células microbianas, compreendendo o mais abundante grupo de organismos da Terra e constituindo 60% de toda biomassa (SINGH, 2010).

Dentre os produtos de origem microbiana, se destacam as enzimas, importantes para mais de 500 processos industriais (KUMAR & SINGH, 2013). Essas biomoléculas desempenham a importante função de catalisar reações fundamentais do metabolismo e sem sua atividade, seria improvável manter a homeostase em sistemas biológicos (NELSON & COX, 2017). Enzimas são vantajosas em bioprocessos industriais por funcionarem sob condições controladas (temperatura, pH, pressão), não precisarem de proteção dos grupos funcionais do substrato, possuírem longa meia-vida, uma alta estereoseletividade em suas reações com produtos definidos em uma velocidade de até $10^5\text{-}10^8$ vezes maior, além de funcionarem com substratos sintéticos. Como exemplos, enzimas podem ser aplicadas nas indústrias de celulose e papel, couro, detergentes e têxteis, produtos farmacêuticos, químicos, alimentos e bebidas, biocombustíveis, ração animal e cuidados pessoais, entre outros (ADRIO & DEMAIN, 2014).

Entre as enzimas industriais, 50% são produzidas por fungos e leveduras, 35% por bactérias e 15% por plantas (SARANRAJ & NAIDU, 2014; LIU & KOKARE, 2017). Enzimas microbianas apresentam algumas vantagens quando comparados a enzimas animais e de plantas. Muitas técnicas de engenharia genética e de bioprocessos podem ser aplicadas aos microrganismos, desde a purificação de cepas para fermentação com rendimento otimizado, até produção de enzimas recombinantes, *screening* de novas enzimas por metagenômica e exploração da diversidade de extremófilos. (LIU & KOKARE, 2017).

Organismos extremófilos são particularmente interessantes para a indústria, pois expressam enzimas com condições otimizadas únicas. A maioria das enzimas comerciais disponíveis são de microrganismos mesófilos, que crescem melhor a temperaturas moderadas, entre 20°C e 45°C. Contudo, enzimas de organismos termófilos que vivem em temperaturas

entre 50°C e 80°C (*Geobacillus*, *Alycyclobacillus*, *Anoxybacillus*) oferecem alternativas capazes de satisfazer novos processos industriais e superar limites de enzimas mesófilas (ATALAH et al., 2019). Como exemplo, podemos citar a reação da polimerase em cadeia (PCR) de Kary Mullis, que ocorre a uma faixa de temperatura de 70-74 °C e necessita da enzima Taq DNA polimerase, produzida pela bactéria termófila *Thermus aquaticus* (CHIEN et al., 1976; NELSON & COX, 2017).

O mercado de enzimas está em expansão com o passar dos anos. O valor estimado das vendas mundiais de enzimas industriais para os anos de 2013 e 2015 é de \$3 bilhões e \$3,7 bilhões respectivamente. Já em 2017 o valor estimado chega a \$7 bilhões e a expectativa é que em 2024 esse valor alcance os \$10,5 bilhões. Dentre esses valores, proteases representam as enzimas industriais vendidas no mundo, seguidos das amilases e lipases respectivamente (LIU & KOKARE, 2017; ATALAH et al., 2019).

Assim como em secreções da pele de anuros, os ninhos de espuma apresentam atividade antimicrobiana derivada da presença de peptídeos antimicrobianos, que compõe a diversidade de proteínas encontradas nos ninhos (SHAHRUDIN, 2017). Do mesmo modo, é observado uma defesa derivada de sua estrutura, com interações de proteínas, lectínas e cistatinas. Essas interações são conhecidas em outros grupos por desempenharem um importante papel na defesa contra colonização microbiana e ataque de insetos (FLEMING, 2009).

Os ninhos de espuma são ambientes potencialmente amplos a prospecção de biomoléculas com interesse biotecnológico devido a sua diversidade de proteínas e carboidratos (HISSA et al., 2016; COOPER et al., 2017; SHAHRUDIN, 2017), além da possuírem uma comunidade microbiana própria (HISSA et al., 2008), ainda pouco conhecida. A compreensão das comunidades microbianas pode levar ao conhecimento de novas cepas produtoras de biomoléculas, auxiliando o país a suprir as demandas existentes do próprio mercado.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Isolar e identificar bactérias cultiváveis do ninho de espuma da espécie *Adenomera hylaedactyla*, a fim de avaliar a importância desses microrganismos na manutenção do ninho de espuma e conservação da biodiversidade dos anuros, além do potencial biotecnológico para produção de enzimas de importância comercial.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Isolar bactérias e fungos cultiváveis dos ninhos de espuma de *A. hylaedactyla*;
- ✓ Identificar, por meio do gene 16s rRNA, as bactérias isoladas dos ninhos de espuma;
- ✓ Realizar testes enzimáticos (proteases e amilase) com isolados bacterianos do ninho de espuma de *A. hylaedactyla*;
- ✓ Avaliar o potencial antifúngico das bactérias isoladas do ninho de espuma contra *Fusarium* sp.;
- ✓ Avaliar o potencial antibacteriano das bactérias isoladas para *E. coli* e *B. subtilis*.

4. METODOLOGIA

4.1 Coleta dos ninhos de espuma

A coleta das amostras foi realizada durante a estação chuvosa na Taíba no ano de 2018, localizada no município de São Gonçalo do Amarante na região norte do estado do Ceará, cerca de 55 Km da capital Fortaleza. Foram coletadas 4 amostras de ninhos de espuma de anuros da espécie *Adenomera hylaedactyla* em câmaras subterrâneas e 4 amostras de solo adjacente ao ninho. O material foi coletado com o auxílio de pás de mão e armazenados de maneira asséptica em frascos estéreis. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente e transportadas até o 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. O atual estudo possui licença do SISBIO do Ministério do Meio Ambiente de número 58036-6.

4.2 Diluição, plaqueamento e isolamento

Inicialmente, removeu-se os resíduos sólidos das amostras de ninho com o auxílio de pinças estéreis em condições assépticas. Em seguida as amostras do ninho de espuma e do solo adjacente foram diluídas em solução salina 0,9 % NaCl estéril até a concentração de 10^{-4} . As duas últimas diluições (10^{-3} e 10^{-4}) foram 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) para as bactérias e BDA (infusão de batata 200 g/L, glicose 20 g/L e ágar 17 g/L) suplementado com ampicilina e cloranfenicol para os fungos. As placas foram incubadas a temperatura ambiente (30 °C) por 48 horas para as bactérias e 168 horas para os fungos.

Os diferentes morfotipos presentes nas amostras de ninhos de espuma e solos adjacentes foram subcultivados em uma nova placa para obtenção de culturas puras. Para estocagem das bactérias, utilizou-se palitos previamente esterilizados, onde encostou-se a ponta do palito no centro de cada colônia transferindo-a para uma placa de 96 poços contendo 600 µL de caldo TGE (Triptona 5 g/L; Glicose 1 g/L; Extrato de levedura 2,5 g/L), e as colônias foram então incubadas em estufa para crescimento a 37 °C. Após o crescimento, que durou entre 24-48h, foi adicionado as culturas em caldo 400 µL de glicerol 50%, de modo que a concentração final de glicerol fosse de 20%. Assim, as amostras foram guardadas em freezer a – 80°C e foram identificadas de acordo com o poço em que se encontravam. As bactérias foram novamente crescidas em placas de ATGE e isoladas pela técnica de semeadura em quadrantes. As colônias puras foram transferidas para caldo TGE e incubadas a 37 °C por 48 horas. O estoque foi individualizado em tubos criogênicos estéreis seguindo as mesmas

concentrações de caldo e glicerol utilizadas na placa de 96 poços. As novas coleções foram armazenadas em um *freezer* a -20°C e -80°C .

Para os fungos utilizou-se palitos estéreis, transferindo os morfotipos para uma nova placa de BDA estéril e incubadas a temperatura ambiente por 7 dias. Os fungos isolados foram divididos em *pellets* utilizando o diâmetro do fundo de uma pipeta pasteur de vidro. Esses pellets foram transferidos para tubos *Falcon* de 50 mL contendo 10 mL de água destilada estéril. O estoque foi armazenado em um *freezer* a 4°C .

4.3 Extração e quantificação do DNA genômico

A extração do DNA genômico foi realizada seguindo o protocolo adaptado de termolise (SÁ et al., 2013). As culturas dos isolados do ninho de espuma foram crescidas em 3mL de meio líquido TGE durante 24 horas a 37°C . Após o crescimento as culturas foram centrifugadas a 5.000 rpm e o sobrenadante foi descartado. Os *pellets* celulares foram suspensos em 400 μL de água MilliQ estéril e aquecidos a 100°C por 10 minutos em banho seco utilizando uma *termomixer*. Após o aquecimento as amostras foram rapidamente transferidas para o freezer a -80°C por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 5 minutos. Foi retirado uma alíquota de 300 μL do sobrenadante e transferido para um novo *eppendorf*. Para os isolados em que o protocolo de termolise não resultou em DNA de boa qualidade, optou-se por realizar a extração de DNA baseado no método Brometo de cetiltrimetil amônio CTAB 2X (WARNER, 1996).

As amostras de DNA obtidas foram quantificadas em um espectrofotômetro *Nanodrop* ND100 a 3 valores de absorbância: 230 nm, 260 nm e 280nm. As razões 260/280 e 260/230 forneceram a qualidade do DNA obtido. Após quantificação as amostras foram armazenadas em freezer a -20°C .

4.4 Amplificação do gene ribossomal 16S

Foram utilizados para a amplificação do gene RNAr 16S, os pares de 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). As amostras foram padronizadas para concentração de 10 ng/ μL (**Tabela 1**). As reações de PCR foram incubadas no termociclador utilizando dois protocolos diferentes. Para os *primers* 27F e 1525R, as amostras foram submetidas a 95°C por 2 min, seguido de 30 ciclos de 95°C por 1 min, 55°C por 1 min, 72°C por 1 min e 30 segundos e 72

°C por 10 min. Já para os *primers* 63F e 1389R, as amostras foram submetidas a 95 °C por 2 min, seguido de 30 ciclos de 95 °C por 1 min, 55 °C por 30 segundos, 72 °C por 1 min e 72 °C por 10 min. Para verificar a especificidade da amplificação foi realizado uma eletroforese em gel de agarose 1% (m/v), corados por SYBR™ safe e corridos em tampão Tris Acetato EDTA (TAE) 0,5 X. Após a exposição do gel a luz UV, pode-se observar a amplificação pela presença da banda na região aproximada de 1.500 pb, quando comparada ao marcador molecular (1kb) utilizado.

Tabela 1: Concentrações finais utilizadas na reação de PCR, utilizando par de primers 27F e 1525R ou 63F e 1389R. Na reação, foi utilizada uma concentração de DNA de 10 ng/μL.

	<i>Concentração inicial</i>	<i>Volume da reação</i>	<i>Concentração final</i>
<i>Primer F</i>	5 μM	2,5 μL	0,5 μM
<i>Primer R</i>	5 μM	2,5 μL	0,5 μM
mgCl ₂	25 mM	3,0 μL	3 mM
dNTP's	10 mM	0,5 μL	0,2 mM
Taq DNA Polimerase	5 U/mL	0,2 μL	1 U/reação
Go taq	5x	5 μL	1x
Água*	-	-	-

Fonte: Elaborado pelo autor.

*Quantidade suficiente para completar o volume da reação (25 μL).

4.5 Purificação e precipitação do gene RNAr 16S

Os produtos de PCR amplificados foram purificados com acetato de potássio (C₂H₃KO₂) e álcool. Foram adicionadas 72 μL das soluções 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 levada ao *freezer* -80 por 30 min. Em seguida, foram centrifugados a 14.000 g, 4°C, por 15 min e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi suspenso em 158,4 μL de etanol 70% e centrifugado a 14.000 rpm, 4°C, por 5 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi novamente descartado e o *pellet* foi secado em banho seco a 36°C por aproximadamente 20 min. Após a evaporação do álcool, o DNA purificado e precipitado foi resuspenso em 30 μL de água ultrapura MilliQ livre de nucleases. Por fim, foi observada a concentração final (ng/μL) superior a 50 ng/μL, e as relações a 260/230 nm e

260/280 nm quantificadas pelo *Nanodrop* ND100 acima de 1,8, confirmando a pureza das amostras.

4.6 Processamento das sequencias e identificação molecular

O DNA foi sequenciado pelo método de sequenciamento de SANGER, utilizando os *primers* 518F (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3') e 800R (5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3') (Macrogen Inc, 2019) para a amplificar a região do gene RNAr 16S, realizado pela empresa Macrogen (www.macrogen.com). As sequencias foram tratadas usando o software Geneious Prime 2019 (www.geneious.com), onde foram retiradas as bases das extremidades com qualidade *Phred* inferior a 30 e realizado a montagem *de novo* para a formação da sequência *contig*. As sequências *contigs* obtidas foram utilizadas para identificação molecular por meio da ferramenta de alinhamento local BLAST (ALTSCHUL, 1990), utilizando o banco de dados *nucleotide collection* do NCBI. Os isolados que obtiveram *hit* com apenas um gênero de bactérias e apresentaram identidade maior que 97% foram considerados pertencentes ao gênero.

4.7 Ensaio enzimáticos para amilases e proteases

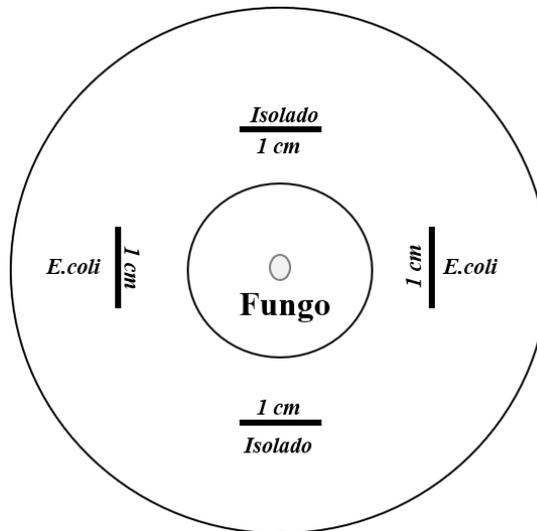
Os isolados bacterianos dos ninhos de espuma foram reativadas em meio ATGE e incubadas a temperatura ambiente por 24 horas. Cada microrganismo foi cultivado em placas de ATGE + amido (0,1% p/v) para amilases, ATGE + leite desnatado (1% p/v) e ATGE + gelatina (3% p/v) para pesquisa de proteases com diferentes sítios de clivagem. Após 24 horas, adicionou-se uma solução de lugol (I2 1%/KI 2%) para detecção da atividade amilásica e uma solução de sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) 4,1M para detecção da atividade da gelatinase. Os resultados foram observados pela formação de halos enzimáticos ao redor das colônias.

4.8 Ensaio de inibição do fungo filamentosso *Fusarium sp.*

Para o ensaio de produção de antifúngicos, foi utilizado uma cepa de *Fusarium sp.* pertencente a coleção de fungos filamentosos Laboratório de Recursos Genéticos (LARGEN). O fungo foi reativado em uma placa contendo meio BDA e incubado em temperatura ambiente por 7 dias. As bactérias do ninho de espuma foram reativadas do estoque em meio ATGE e incubadas a temperatura ambiente por 24 horas. No quinto dia de crescimento do fungo, as colônias bacterianas em fase *log* foram transferidas para a placa de *Fusarium sp.* e o inóculo ocorreu com auxílio de uma alça estéril realizando movimentos retilíneos para formar um traço com 1 cm de comprimento, em duplicata, conforme mostrado na **Figura 3**. Para o

controle negativo, foi utilizada uma cepa de *Escherichia coli* (ATCC 25922). Os resultados foram observados após o fungo crescer por toda a área da placa, por volta do sétimo dia e sendo considerado positivo se houvesse inibição do crescimento do fungo.

Figura 3: Desenho esquemático da placa de ensaio antifúngico.

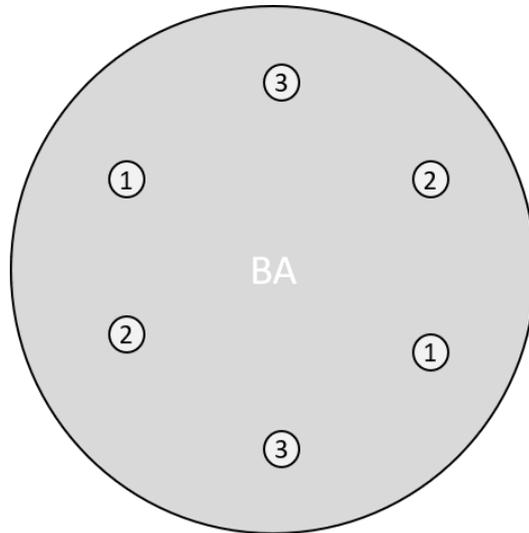


Fonte: Elaborado pelo autor.

4.9 Ensaio antibacteriano

As bactérias pertencentes aos ninhos de espuma foram reativadas do estoque em meio ATGE por 24 horas a temperatura ambiente. As colônias puras foram transferidas para frascos de meio líquido TGE (triptona 5 g/L, glicose 1 g/L e extrato de levedura 2,5 g/L) e incubados a 37 °C, sob agitação a 150 rpm por 24 horas. Foram escolhidas duas cepas alvo para o antibiograma: *Escherichia coli* (ATCC 25922) como Gram negativa e *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) como Gram positiva. A densidade óptica (DO) das culturas a 600nm foram ajustadas em 1,0 para os cultivos de bactérias do ninho e 0,1 para o cultivo de bactérias alvo. Após a padronização, os cultivos bacterianos do ninho foram centrifugados a 7.500g durante 5 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi transferido para um novo frasco estéril. Para realizar o antibiograma, os cultivos alvo foram espalhados, com o auxílio de um *swab*, por toda a área de uma placa contendo Ágar Mueller-Hinton. Em seguida, foram feitos poços no meio com o uso de ponteiros 200 µL estéreis. Foram aplicados 70 µL de sobrenadante para cada poço, em duplicata, como mostrado na **Figura 4**. As placas foram incubadas a 37 °C por 24-48 horas. Os resultados foram considerados positivos pela formação de halos ao redor dos poços.

Figura 4: Desenho esquemático da placa de ensaio antibacteriano. **BA** refere-se a bactéria alvo e os números **1**, **2** e **3** representam os poços, em duplicata.



Fonte: Elaborado pelo autor.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento e coleção

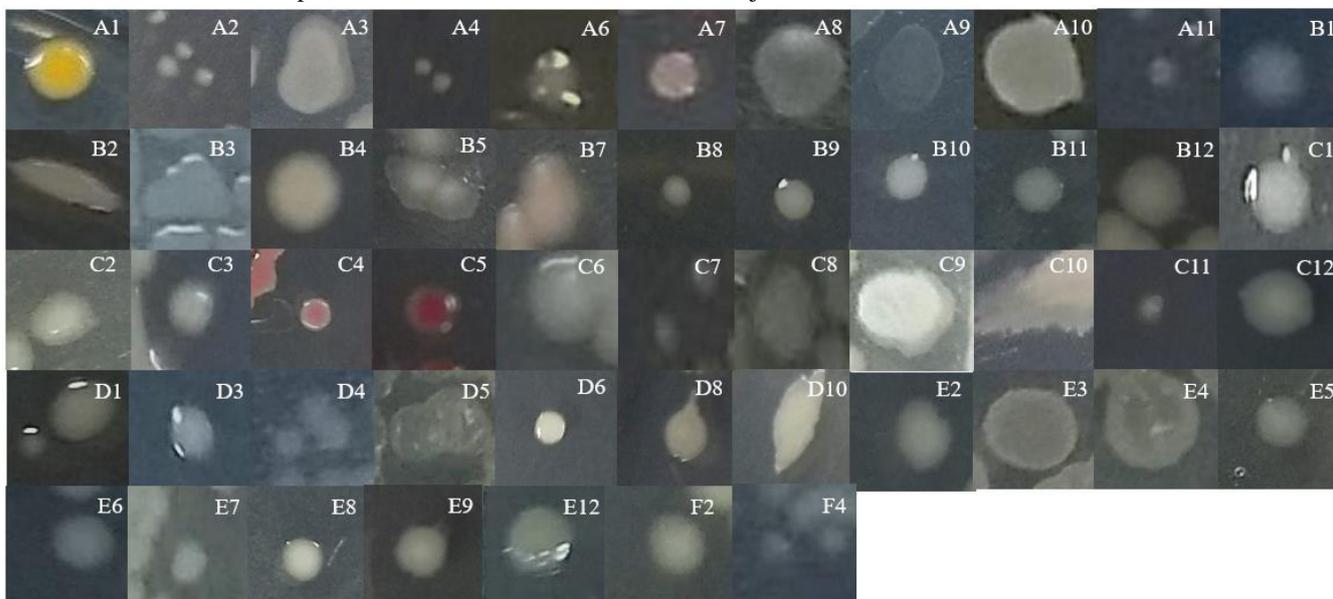
O crescimento de colônias foi evidenciado em todas as diluições e a contagem de viáveis foi realizada levando em consideração apenas as diluições que apresentavam entre 30 e 300 colônias. Placas com contagem superior a 300 não foram incluídas no cálculo da média de Unidades Formadoras de Colônia (UFC/mL). O total de morfotipos isolados distribuídos entre ninho de espuma e solo adjacente foram representados na **Tabela 2** e os isolados representados nas **Figura 5** e **Figura 6**.

Tabela 2: Número de morfotipos microbianos isolados do ninho de espuma do *A. hylaedactyla* e solo adjacente.

	Bactérias	Fungos
Ninho de espuma	30	7
Solo adjacente	21	17
Total	51	24

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 5: Colônias isoladas dos morfotipos de bactérias em meio ATGE. Da esquerda para a direita: de A1 até C9 bactérias do ninho de espuma e de C10 até F4 bactérias do solo adjacente.



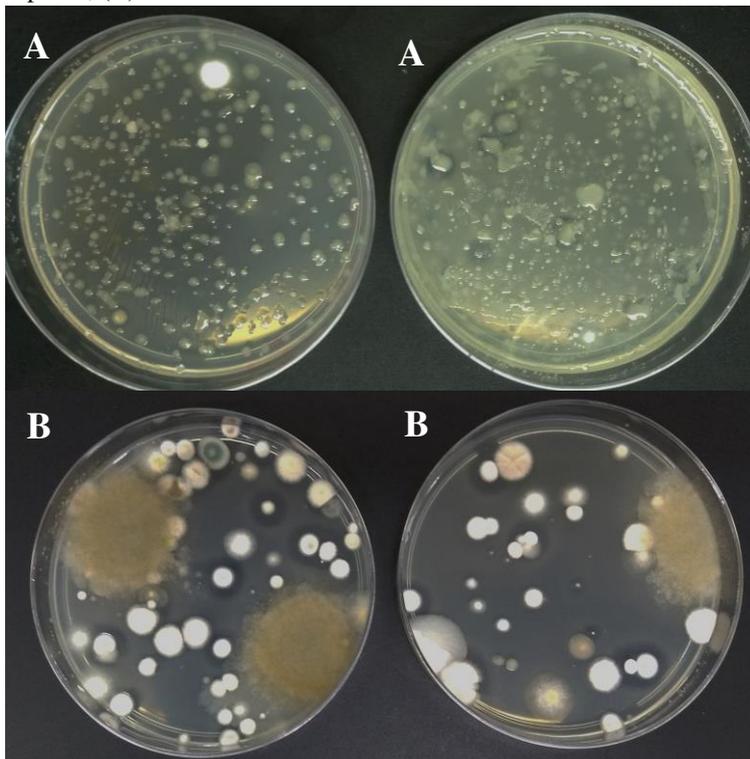
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 6: Morfotipos de fungos isolados em meio BDA. Em ordem, da esquerda para direita: morfotipos de solo (ADS) e morfotipos de ninho (ADN).



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 7: Placas resultantes da técnica de *spread plate* dos fungos em meio BDA. (A) amostra do ninho de espuma; (B) amostra do solo



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os ninhos apresentaram $8,1 \times 10^6$ UFC/mL e o solo adjacente $2,53 \times 10^6$ UFC/mL, indicando uma comunidade específica dos ninhos de espuma (**Tabela 3**). Os morfotipos isolados dos ninhos também foram morfologicamente diferentes dos isolados do solo, confirmando a presença de isolados específicos dos ninhos de espuma

Tabela 3: Unidades Formadoras de Colônia (UFC/mL) nas amostras de ninho de espuma e solo adjacente.

Amostra	Unidades Formadoras de Colônia
Ninho de espuma	$8,10 \pm 0,76 \times 10^6$ UFC/mL
Solo adjacente	$2,53 \pm 0,61 \times 10^6$ UFC/mL

Fonte: Elaborado pelo autor.

Associações entre animais e sua comunidade microbiana residente promove diversas contribuições para a saúde e podem desempenhar funções essenciais para o organismo. É atestado que essa microbiota está presente desde o nascimento, onde são selecionadas por transferência parental e pelo ambiente (LYNCH, 2016; REBOLLAR, 2020).

O trabalho de McGrath, 2018, explorou a diversidade das comunidades microbianas em diferentes estágios da vida de três anuros formadores de ninhos de espuma, *Polypedates leucomystax*, *Polypedates macrotis* e *Polypedates otitophus*. Assim como os resultados apresentados neste trabalho, McGrath encontrou uma maior diversidade bacteriana no interior do ninho do que em seu exterior. O trabalho também aponta diferenças entre as comunidades do interior do ninho com as da pele dos girinos, evidenciando uma comunidade específica para os ninhos de espuma.

Na pele de anuros, uma série de fatores bióticos e abióticos contribuem com a seleção da microbiota, que vão desde a temperatura e precipitação do habitat, até relações com patógenos, sistema imune e variação genética (REBOLLAR, 2020).

Apesar da confirmação de uma comunidade microbiana própria no ninho de espuma de *A. hylaedactyla*, as funções ecológicas e contribuições dos isolados do ninho de espuma ainda são pouco conhecidas na literatura.

Nos isolados fúngicos, foi possível observar a formação de halos ao redor de alguns morfotipos no meio BDA (**Tabela 4**). Esses halos ocorrem devido a enzimas extracelulares produzidas para clivar diferentes produtos disponíveis no meio, que no caso, tem sua composição rica em carboidratos e amido. Contudo, todos os isolados que apresentaram halos foram em amostras de solo. Essas diferenças podem decorrer da composição do ninho ser predominantemente proteica e possuir uma ocupação fúngica própria.

Tabela 4: Número de halos enzimáticos formados em meio BDA de isolados fúngicos do ninho de espuma de *A. hylaedactyla* e solo adjacente.

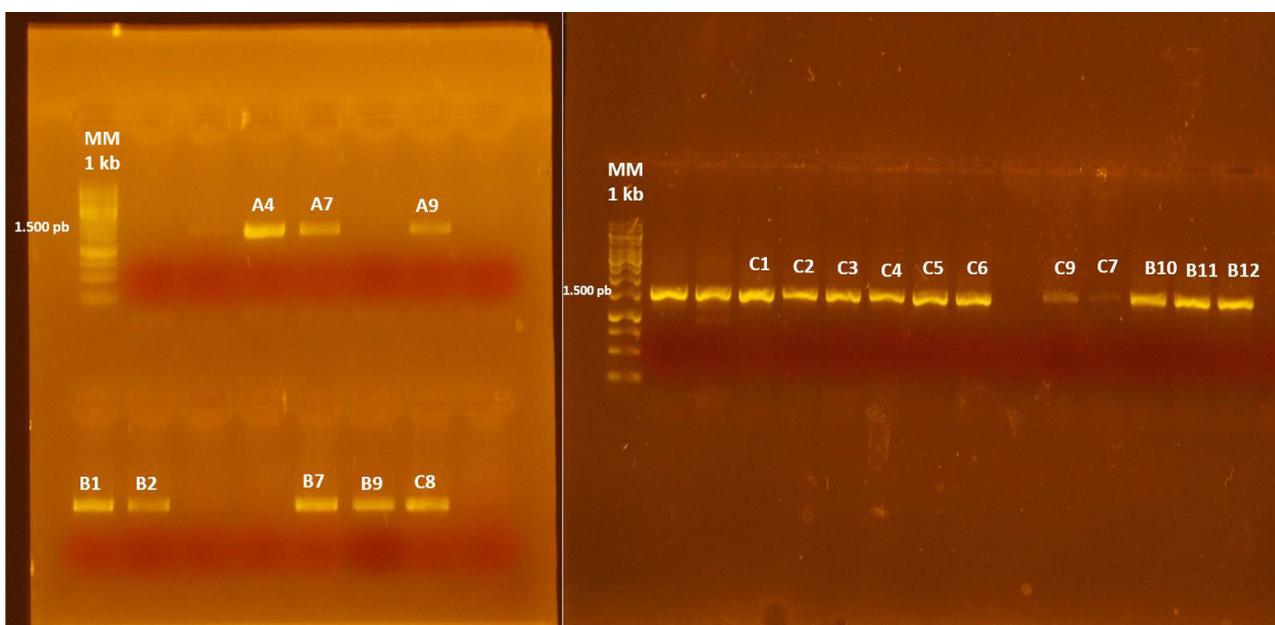
Amostra	Nº de halos enzimáticos
Ninho de espuma	0
Solo adjacente	7

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2 Identificação molecular dos isolados bacterianos do ninho de espuma

O protocolo de termólise possibilitou a extração do DNA genômico de 89% dos isolados, onde foi possível obter um DNA de boa qualidade para amplificação do gene ribossomal 16S pela reação da PCR (**Figura 8**). Porém, o DNA dos isolados A3, A8, A10, B3, B4 não amplificou pelos métodos de termólise, necessitando recorrer a metodologia de CTAB 2X para a amplificação.

Figura 8: Géis de eletroforese destacando a amplificação do gene rRNA 16S dos isolados do ninho de espuma do *A. hylaedactyla* e marcadores moleculares.



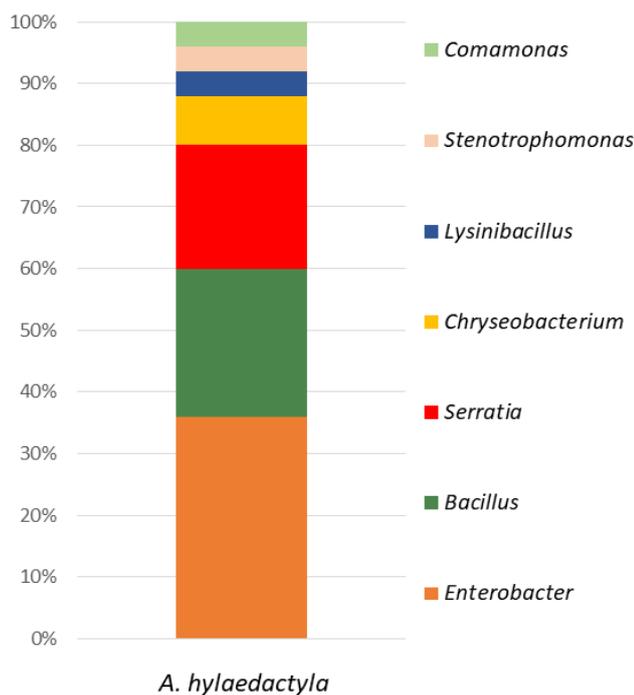
Fonte: Elaborado pelo autor.

A partir dos resultados obtidos do alinhamento com o banco de dados, os isolados foram identificados a nível de gênero (**Tabela 5**). Foram identificados 7 diferentes gêneros no ninho de espuma (**Gráfico 1**), distribuídos em 3 filos (**Gráfico 2**).

Tabela 5: Identificação molecular dos isolados do ninho de espuma do *A. hylaedactyla*

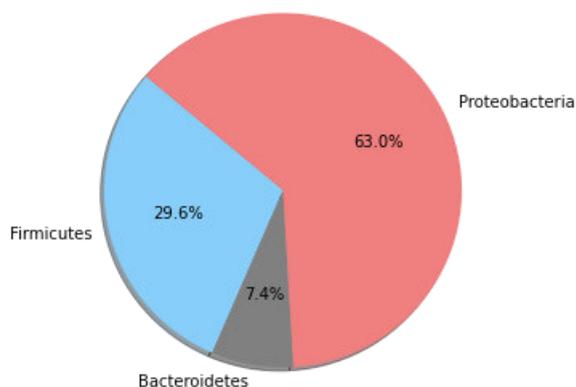
Isolado	pb	Gênero	Identidade	Número de Acesso
A1	1248	<i>Chryseobacterium</i>	98,80%	KM598246.2
A2	1050	<i>Stenotrophomonas</i>	99,71%	MK537385.1
A3	1504	<i>Bacillus</i>	100%	MK675644.1
A4	1075	<i>Comamonas</i>	99,91%	KT779283.1
A6	1333	<i>Stenotrophomonas</i>	99,92%	CP011010.1
A7	1276	<i>Serratia</i>	99,84%	MN176468.1
A8	907	<i>Bacillus</i>	99,89%	MK034186.1
A9	847	<i>Bacillus</i>	100%	MN596018.1
A10	787	<i>Bacillus</i>	99,87%	MN515009.1
B1	1051	<i>Enterobacter</i>	99,91%	LT992502.1
B2	1062	<i>Lysinibacillus</i>	100%	MN493879.1
B3	346	<i>Bacillus</i>	100%	MN516529.1
B4	1118	<i>Bacillus</i>	99,82%	MN602293.1
B7	1032	<i>Serratia</i>	99,81%	MN524128.1
B9	1035	<i>Enterobacter</i>	100,00%	MH729806.1
B10	516	<i>Enterobacter</i>	100,00%	MK835659.1
B11	524	<i>Enterobacter</i>	100,00%	MN603980.1
B12	1082	<i>Enterobacter</i>	99,91%	CP042551.1
C1	1127	<i>Enterobacter</i>	100,00%	CP014280.1
C2	1093	<i>Enterobacter</i>	99,10%	LT992502.1
C3	1053	<i>Enterobacter</i>	99,10%	MG836066.1
C4	1035	<i>Serratia</i>	100,00%	CP042512.1
C5	996	<i>Serratia</i>	100,00%	CP042512.1
C6	995	<i>Serratia</i>	100,00%	MN420867.1
C7	1115	<i>Chryseobacterium</i>	99,37%	FR871430.1
C8	775	<i>Enterobacter</i>	99,87%	MK534038.1
C9	812	<i>Bacillus</i>	99,88%	MK780813.1

Fonte: Elaborado pelo autor.

Gráfico 1: Abundância de gêneros do ninho de espuma de *A. hylaedactyla*

Fonte: Elaborado pelo autor

Gráfico 2: Relação de filos dos isolados bacterianos do ninho de espuma de *A. hylaedactyla*.



Fonte: Elaborado pelo autor

Houve uma predominância de bactérias do filo *Proteobacteria* (**Gráfico 2**), com uma composição de 94% da classe *Gammaproteobacteria* e 6% da classe *Betaproteobacteria*. Esses resultados compactuam com outros trabalhos (McGRATH, 2018), que apesar de variações entre as comunidades no interior do ninho, a classe *Gammaproteobacteria* se destaca representativamente.

Foi relatado alta abundância do gênero *Enterobacter*, que compõe a microbiota intestinal, principalmente de fêmeas, e tem um importante papel na hidrólise da quitina, o componente mais abundante da carapaça de insetos. Um aumento na abundância desse gênero no intestino pode ser relacionado a infecção por nematoides (SHU, 2018). O aumento na abundância relativa do gênero no ninho de espuma do *A. hylaedactyla* pode ter decorrido de transferência pela cloaca durante sua formação.

Outro grupo bastante representativo foi o gênero *Serratia*. Indivíduos desse grupo são frequentemente encontrados na pele de anuros e se destacam pela produção de prodigiosina, um pigmento vermelho com atividade antifúngica (BERG, 2000; WOODHAMS, 2017), imunossupressora (MAGAE, 1996) e antibacteriana (LAPENDA, 2015). A presença desse gênero no ninho fornece evidências de seu papel na defesa contra patógenos.

O grupo *Chryseobacterium*, pertencente a ordem *Flavobacteriales*, está presente no ninho de espuma de *A. hylaedactyla* e possui diversas características notáveis. Algumas espécies de *Chryseobacterium* estão relacionadas a doenças em peixes (LOCH & FAISAL, 2015) e humanos (MUKERJI, 2016). O grupo também atua como promotores de crescimento em plantas (SANG, 2018) e a espécie *Chryseobacterium piperi* possui uma família de toxinas com sequências similares a neurotoxinas botulínicas (MANSFIELD et al., 2019). Também é relatado a presença de uma atividade antifúngica (YANG et al., 2018) e antimicrobiana (DAHAL et al., 2020), além de ser um potencial probiótico no tratamento da quitridiomiose

(WOODHAMS, 2019).

Alguns gêneros característicos da pele de anfíbios e que são promissores na inibição do crescimento do fungo Bd, também foram encontrados no ninho de espuma do *A. hylaedactyla*. Dentre os gêneros mais relatados na literatura como potenciais probióticos no controle da doença, encontram-se os gêneros testados *Chryseobacterium*, *Serratia*, *Stenotrophomonas* e *Enterobacter*

O gênero *Serratia* é um forte candidato a probiótico devido ao rápido crescimento *in vitro*, propriedades anti-BD e comum distribuição entre as espécies de anfíbios. Muitos trabalhos relatam cepas do gênero classificadas com forte inibição (MADISON et al., 2017; WOODHAMS, 2019; HARRISON, 2020). O pigmento prodigiosina, que dá cor avermelhada as colônias do gênero, é capaz de inibir o crescimento do Bd *in vitro* em concentrações mínimas (WOODHAMS, 2017), contudo, sua via de síntese não é otimizada a temperaturas na faixa de 21°C (MADISON et al., 2017).

Outros estudos reforçam o potencial da classe *Gammaproteobacteria* na inibição do Bd, com destaque para a família *Enterobacteriaceae* com altos valores no score de inibição (REBOLLAR, 2019), sendo essa correspondente com a maior composição encontrada no ninho de espuma da espécie *A. hylaedactyla* neste trabalho. Dentre a classe *Gammaproteobacteria*, a espécie *Stenotrophomonas maltophilia* caracterizada com forte inibição do fungo é comumente encontrada na pele de diversos anfíbios em diferentes locais do mundo, como também são encontrados nos ovos em desenvolvimento, apontando para uma transferência vertical de comunidades da pele (HOLDEN, 2015) e que podem se relacionar com as comunidades do ninho de espuma.

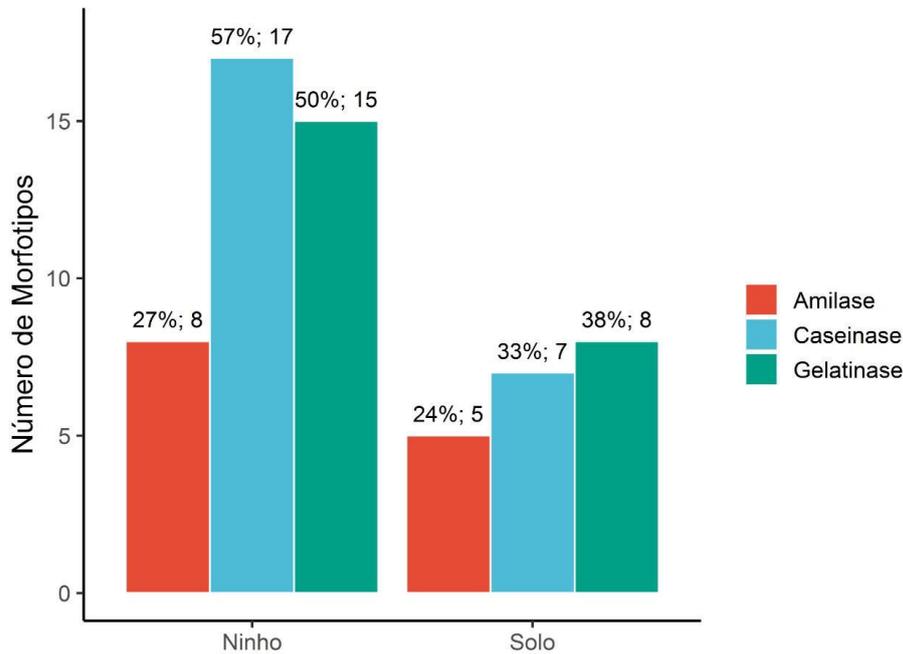
A presença desses gêneros no ninho de espuma demonstra o potencial desses isolados no desenvolvimento de probióticos eficazes que, em caso de cepas com forte inibição, podem contribuir para o desenvolvimento de estratégias para o controle da doença em estágios juvenis e sendo de grande importância na conservação de espécies. Outros gêneros encontrados no ninho de espuma da espécie *A. hylaedactyla* foram *Bacillus*, *Lysinibacillus* e *Comamonas*. É importante ressaltar que as comunidades microbianas residentes estão relacionadas a fatores ambientais e a alteração de habitats podem levar a mudanças na microbiota, sendo capaz de tornar o animal mais susceptível ou resistente a patógenos (BIE, 2019). Os ninhos da espécie estudada foram coletados em região semi-árida durante o período chuvoso, entretanto, indivíduos da espécie *A. hylaedactyla* estão distribuídos em diferentes biomas no Brasil e na América do Sul. A descrição de uma comunidade exclusiva do ninho de espuma com uma diversidade de gêneros característicos, fornece indícios do potencial desses

organismos na defesa contra patógenos e predadores, além manutenção do micro-habitat pela produção de metabolitos secundários e disponibilidade de nutrientes.

5.3 Ensaio enzimáticos para proteases e amilase

Os resultados apresentaram uma composição de 27% de isolados positivos para produção de amilases e 63% positivos para proteases com diferentes sítios de clivagem no ninho de espuma, em comparação com o solo adjacente que apresentou 24% para amilases e 38% para proteases (**Gráfico 3**).

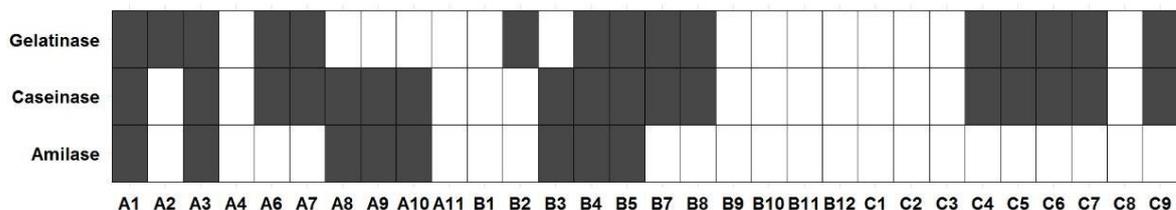
Gráfico 3: Relação do número de isolados bacterianos do ninho de espuma da espécie *A. hylaedactyla* e solo adjacente com a produção de enzimas hidrolíticas.



Fonte: Elaborado pelo autor

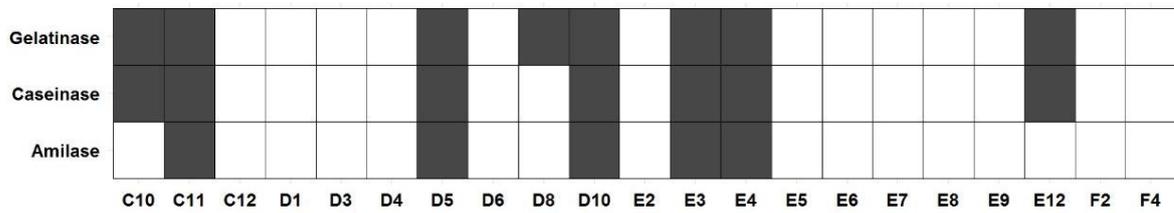
Dentre os isolados positivos, as bactérias A1, A3, B4 e B5 no ninho de espuma (**Figura 9**) foram positivas para todas as atividades, assim como as bactérias C11, D5, E3 e E4 do solo adjacente (**Figura 10**). Os gêneros que mais se destacaram na produção de proteases no ninho foram respectivamente *Bacillus*, *Serratia*, *Chryseobacterium* e *Stenotrophomonas*. Já na produção de amilases foram *Bacillus* e *Chryseobacterium*.

Figura 9: Atividades enzimáticas em isolados do ninho de espuma do anuro *A. hylaedactyla*. Em preto representa com atividade e branco a ausência de atividade



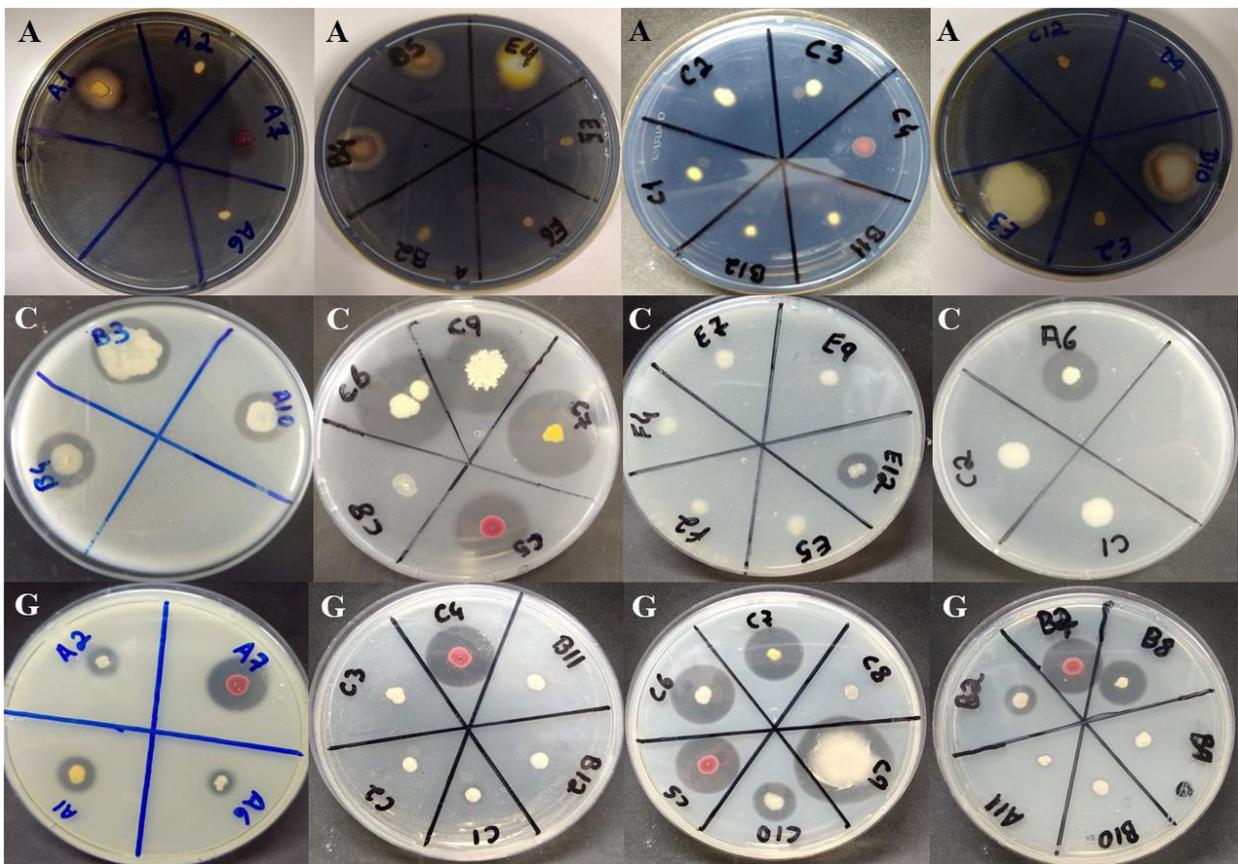
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 10: Atividades enzimáticas em isolados do solo adjacente. Em preto representa com atividade e branco a ausência de atividade



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 11: Placas de atividades enzimáticas de isolados do ninho de espuma do *A. hylaedactyla* e solo adjacente. Respectivamente, (A) Amilase, (C) Caseinase e (G) Gelatinase.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O grupo *Bacillus* é um dos mais representativos gêneros bacterianos na produção de enzimas industriais e tem um relevante interesse biotecnológico. *Bacillus* se destacam pela produção de uma diversidade de proteases extracelulares predominantemente alcalinas, comportando principalmente serina-proteases, cisteína-proteases e metaloproteases. (CONTESINI, 2017). Enzimas proteolíticas de *Bacillus* podem ser aplicadas em diversas áreas comerciais, tais como a indústria de detergente para remoção de manchas proteicas; indústria de alimentos na produção de peptídeos bioativos e amadurecimento do queijo; Indústria farmacêutica na síntese de compostos e redução da contaminação com solventes

orgânicos; E na indústria de têxtil ao prevenir o encolhimento e removendo fibras de lã (CONTESINI, 2017). *Bacillus* também se destacam na produção de alfa-amilases, capazes de hidrolisar o amido presente na dextrina, maltose e glucose. Essas amilases também são importantes nas indústrias de detergentes, de alimentos, farmacêutica e têxtil (SIMAIR et al., 2017) e além disso, são necessárias para a hidrólise enzimática de biomassas utilizadas na produção de bioetanol (WOOD et al., 2016). O grupo também é um promissor hospedeiro para produção de biomoléculas de interesse industrial (SCHUALLMEY, 2004).

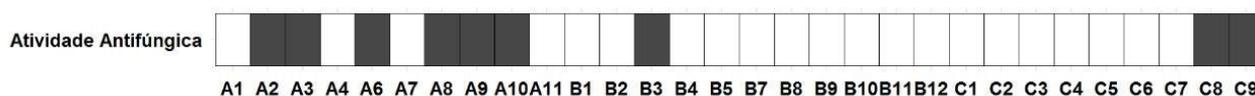
Em *Chryseobacterium*, representantes do grupo também são potenciais produtores de proteases. A alta atividade proteásica pode estar envolvida como fatores de virulência em cepas patogênicas de humanos (PAN et al., 2000) e até na hidrólise na melanina e queratina em penas de aves (GURAV, 2016). Recentemente, também foi reportado a capacidade desses organismos de produzirem amilases extracelulares utilizando resíduos orgânicos de cozinha e demonstrando ser de grande interesse para a indústria (HASAN et al., 2017).

Nossos resultados apontam para um potencial desses isolados do ninho de espuma na produção de amilases e principalmente proteases, sendo de grande valor biotecnológico. Contudo, o papel dessas enzimas nos ninhos de espuma ainda é desconhecido, sendo necessários mais estudos que foquem em investigar essas vias e suas relações com o desenvolvimento da larva.

5.4 Ensaio de inibição do fungo filamentoso *Fusarium* sp.

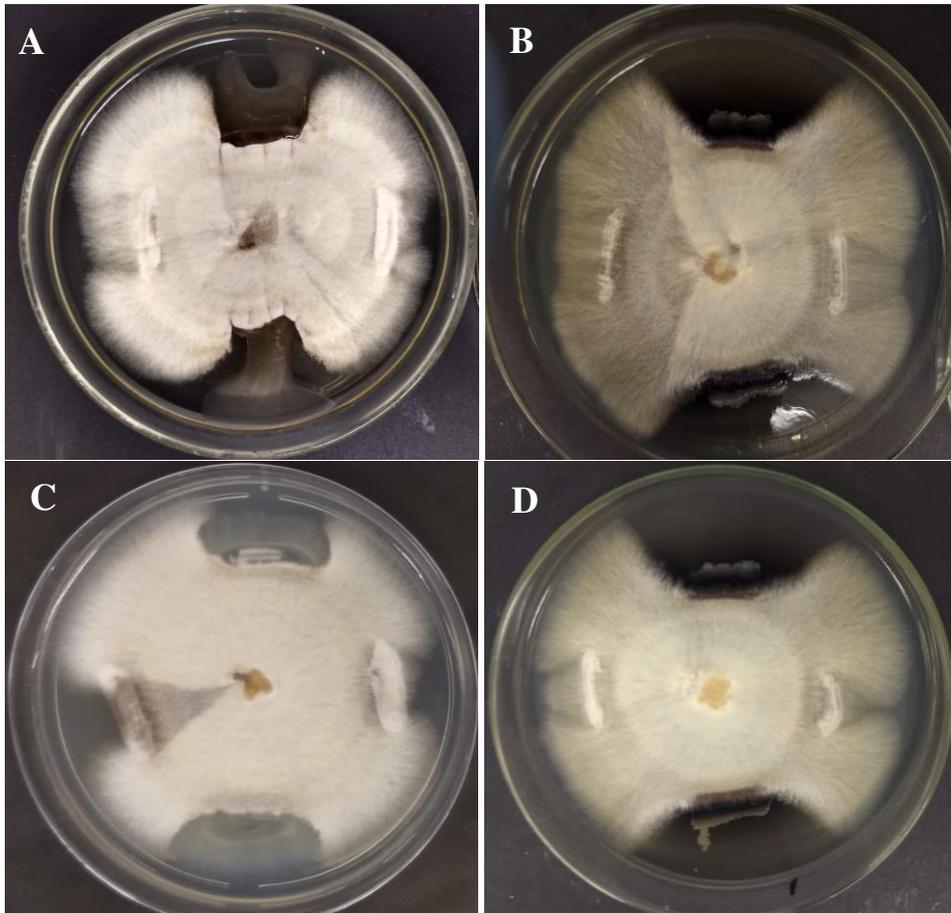
Foram avaliadas todos os 30 isolados bacterianos pertencentes ao ninho de espuma da espécie *A. hylaedactyla*. 9 (30%) dos isolados apresentaram atividade antifúngica no crescimento da espécie de referência, o fungo filamentoso *Fusarium* sp. (**Figura 12**).

Figura 12: Atividade antifúngica contra *Fusarium* sp. de isolados bacterianos do ninho de espuma da espécie *A. hylaedactyla*. Em preto representa com atividade e branco a ausência de atividade



Fonte: Elaborado pelo autor.

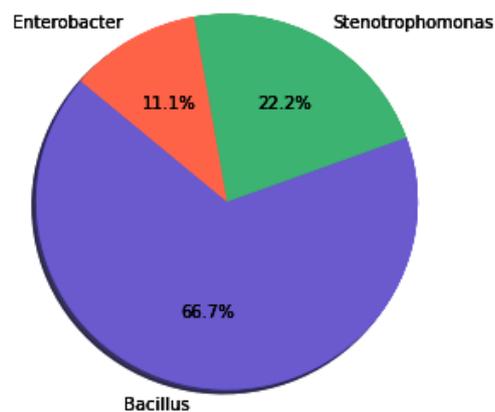
Figura 13: Placas resultantes do ensaio de inibição do fungo *Fusarium* sp. após 7 dias. Em ordem: (A) C8, (B) A9, (C) A6 e (D) A8.



Fonte: Elaborado pelo autor

Dentre os isolados que apresentaram atividade antifúngica, 66,7% são do gênero *Bacillus*, seguidos de 22,2% do gênero *Stenotrophomonas* e 11,1% do gênero *Enterobacter* (**Gráfico 4**).

Gráfico 4: Relação de gêneros bacterianos do ninho de espuma com atividade antifúngica contra *Fusarium* sp.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Representantes do gênero *Bacillus* são amplamente distribuídos no ambiente e são particularmente interessantes por serem potenciais produtores de compostos naturais antimicrobianos (SUMI, 2015). Há uma diversidade de compostos produzidos por isolados do gênero relatados na literatura; como por exemplo, compostos voláteis produzidos por a espécie *Bacillus amyloliquefaciens* que apresentam atividade antifúngica contra o fungo filamentosso *Fusarium oxysporum* (YUAN, 2012). A espécie *Bacillus vallismortis* apresenta atividades antifúngicas in vitro contra uma diversidade de fungos fitopatógenos (ZHAO, 2010), destacando o potencial do grupo como bactérias endofíticas promotoras de crescimento e defesa em plantas (RIBEIRO et al., 2018). Muitos *Bacillus* estão presentes no intestino de animais são utilizados como probióticos, formando esporos resistentes as condições do trato gastrointestinal e podem construir uma barreira que protege o epitélio do intestino de agentes patogênicos (BARBOSA, 2005). Em todos os representantes do gênero *Bacillus* que apresentaram atividade antifúngica, foi possível observar a produção de um pigmento escuro ao redor da colônia, possivelmente relacionado a atividade. O potencial antimicrobiano do grupo pode ser fundamental na proteção contra patógenos no ninho de espuma e mais estudos são necessários para explorar a produção e metabolitos secundários e suas relações com o ninho.

Outro potencial grupo produtor de compostos antifúngicos é o gênero *Stenotrophomonas*, onde dois representantes apresentaram atividade contra o fungo *Fusarium* sp. Muitos representantes do grupo também estão associados na defesa contra fitopatógenos, como o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, mostrando ser mais efetivo que fungicidas sintéticos (REYES-PEREZ et al., 2019). A presença do grupo na composição do ninho de espuma pode indicar contribuições na regulação do equilíbrio de nutrientes do ninho terrestre da espécie *A. hylaedactyla* enquanto dentro da cova subterrânea.

5.5 Ensaio antibacteriano

Não foi possível observar a formação de halos significativos ao redor dos inóculos em todos os isolados testados. Contudo, até o presente momento, os isolados A3, A8, A9, A10, B3 e B4 do gênero *Bacillus* não foram testados devido a dificuldades em padronizar a densidade ótica, rompimento do biofilme formado e contaminação do sobrenadante. Uma alternativa possível para a confirmação dos resultados seriam alterações no protocolo, aumentando a agitação e substituindo os poços por discos embebidos no sobrenadante filtrado.

Na literatura, isolados do gênero *Bacillus*, como as espécies *B. subtilis*, *B. licheniformis* e *B. clausii*, possuem uma considerável atividade antibacteriana e são capazes

de inibir o crescimento de bactérias em amplo espectro, incluindo bactérias patogênicas como *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* e *Listeria monocytogenes* (BARBOSA, 2005). É possível que os isolados desse gênero apresentem atividade antibacteriana contra *E. coli* ou *B. subtilis*, entretanto, novos estudos são necessários para avaliar o potencial antibacteriano desses isolados do ninho de espuma.

Por fim, a **Tabela 6** sumariza as atividades testadas para todos os isolados obtidos no atual estudo.

Tabela 6: Atividades enzimáticas e antimicrobianas avaliadas dos isolados do ninho de espuma do *A. hylaedactyla*. (NA) Não-avaliado.

Isolado	Gênero	Amilase	Caseinase	Gelatinase	Antifúngico	Antibacteriano
A1	<i>Chryseobacterium</i>	+	+	+	-	-
A2	<i>Stenotrophomonas</i>	-	-	+	+	-
A3	<i>Bacillus</i>	+	+	+	+	NA
A4	<i>Comamonas</i>	-	-	-	-	-
A6	<i>Stenotrophomonas</i>	-	+	+	+	-
A7	<i>Serratia</i>	-	+	+	-	-
A8	<i>Bacillus</i>	+	+	-	+	NA
A9	<i>Bacillus</i>	+	+	-	+	NA
A10	<i>Bacillus</i>	+	+	-	+	NA
A11	NA	-	-	-	-	-
B1	<i>Enterobacter</i>	-	-	-	-	-
B2	<i>Lysinibacillus</i>	-	-	+	-	-
B3	<i>Bacillus</i>	+	+	-	+	NA
B4	<i>Bacillus</i>	+	+	+	-	NA
B5	NA	+	+	+	-	-
B7	<i>Serratia</i>	-	+	+	-	-
B8	NA	-	+	+	-	-
B9	<i>Enterobacter</i>	-	-	-	-	-
B10	<i>Enterobacter</i>	-	-	-	-	-
B11	<i>Enterobacter</i>	-	-	-	-	-
B12	<i>Enterobacter</i>	-	-	-	-	-
C1	<i>Enterobacter</i>	-	-	-	-	-
C2	<i>Enterobacter</i>	-	-	-	-	-
C3	<i>Enterobacter</i>	-	-	-	-	-
C4	<i>Serratia</i>	-	+	+	-	-
C5	<i>Serratia</i>	-	+	+	-	-
C6	<i>Serratia</i>	-	+	+	-	-
C7	<i>Chryseobacterium</i>	-	+	+	-	-
C8	<i>Enterobacter</i>	-	-	-	+	-
C9	<i>Bacillus</i>	-	+	+	+	-

Fonte: Elaborado pelo autor.

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho forneceu informações sobre os microrganismos cultiváveis do ninho de espuma terrestre da espécie *Adenomera hylaedactyla*. O conhecimento da diversidade de gêneros característicos do ninho de espuma fornece evidências acerca de suas importâncias no desenvolvimento da fase juvenil. A defesa contra patógenos notabiliza-se a partir das atividades antimicrobianas, destacando as cepas pertencentes aos gêneros *Bacillus* e *Stenotrophomonas* com atividade antifúngica e outros gêneros como *Chryseobacterium* e *Serratia*, já relatados como promissores na inibição do fungo Bd. Além da importância ecológica, o potencial biotecnológico dessa comunidade foi destacado a partir das atividades enzimáticas, onde o ninho de espuma apresentou uma grande produção principalmente de proteases e destacando o potencial biotecnológico das cepas do gênero *Bacillus* e *Chryseobacterium*. Essas cepas podem ser exploradas para produção de enzimas e outros produtos. Contudo, mais análises precisam ser feitas para identificar as relações da produção de enzimas e outros subprodutos microbianos no ninho de espuma, bem como sua importância para manutenção do ninho, disponibilidade de nutrientes e desenvolvimento das larvas.

7. REFERÊNCIAS

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

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

ATALAH, J., CÁCERES-MORENO, P., ESPINA, G., & BLAMEY, J. M. (2019). Thermophiles and the applications of their enzymes as new biocatalysts. **Bioresource Technology**, 280(January), 478–488. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.008>

BARBOSA, T. M. et al. (2005). Screening for Bacillus isolates in the broiler gastrointestinal tract. **Applied and Environmental Microbiology**, 71(2), 968–978. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.2.968-978.2005>

BASTAZINI, C. V. et al. (2007). Which Environmental Variables Better Explain Changes in Anuran Community Composition? a Case Study in the Restinga of Mata De São João, Bahia, Brazil. **Herpetologica**, 63(4), 459–471. [https://doi.org/10.1655/00180831\(2007\)63\[459:wevbec\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1655/00180831(2007)63[459:wevbec]2.0.co;2)

BASTOS, R. P., HADDAD, C. F. B., & POMBAL, J. P. (2010). Foam nest in Scinax rizibilis (Amphibia: Anura: Hylidae). **Zoologia**, 27(6), 881–886. <https://doi.org/10.1590/S1984-46702010000600007>

BEEBEE, T. J. C., & GRIFFITHS, R. A. (2005). The amphibian decline crisis: A watershed for conservation biology? **Biological Conservation**, 125(3), 271–285. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.04.009>

BERG, G. (2000). Diversity of antifungal and plant-associated Serratia plymuthica strains. **Journal of Applied Microbiology**, 88(6), 952–960. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01064.x>

BERGER L. et al. 1998. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:9031–36

BIE, J., LIU, X., ZHANG, X., & WANG, H. (2019). Detection and comparative analysis of cutaneous bacterial communities of farmed and wild Rana dybowskii (Amphibia: Anura). **European Zoological Journal**, 86(1), 413–423. <https://doi.org/10.1080/24750263.2019.1683627>

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.

BORGES-LEITE, M. J., RODRIGUES, J. F. M., GONDIM, P. M. & BORGES-NOJOSA, D. M. (2015). Reproductive activity of Adenomera aff. Hylaedactyla (Anura: Leptodactylidae) in a coastal area of Brazil. **Animal Biology**, 65(2), 101–111. <https://doi.org/10.1163/15707563-00002464>

- BORGES-LEITE, M. J., MOTA RODRIGUES, J. F., & BORGES-NOJOSA, D. M. (2014). Herpetofauna of a coastal region of northeastern Brazil. **Herpetology Notes**, 7(July), 405–413.
- BOYLE, D. G., BOYLE, D. B., OLSEN, V., MORGAN, J. A. T., & HYATT, A. D. (2004). Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. **Diseases of Aquatic Organisms**, 60(2), 141–148. <https://doi.org/10.3354/dao060141>
- CAMARDELLI, M. & NAPOLI, M. F., (2012). Amphibian conservation in the Caatinga biome and semiarid region of Brazil. *Herpetologists' League*. **Herpetologica**, Vol. 68, No. 1 (March 2012), pp. 31-47
- CAREY C. et al. 2006. Experimental exposures of boreal toads (*Bufo boreas*) to a pathogenic chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*). **EcoHealth** 3:5–21
- CHIEN, A.; EDGAR, D. B.; TRELA, J. M. (September 1976). Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *Journal of Bacteriology*. 127 (3): 1550–1557. ISSN 0021-9193. PMID 8432
- 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. (2018). An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. **Critical Reviews in Biotechnology**, 38(3), 321–334. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1354354>
- COOPER, A. et al. (2005). Adsorption of frog foam nest proteins at the air-water interface. **Biophysical Journal**, 88(3), 2114–2125. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.046268>
- COOPER, A., VANCE, S. J., SMITH, B. O., & KENNEDY, M. W. (2017). Frog foams and natural protein surfactants. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 534, 120–129. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.01.049>
- COX, P. A., & KING, S. (2013). Bioprospecting. *Encyclopedia of Biodiversity: Second Edition*, 1, 588–599. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384719-5.00350-6>
- CUNHA, G.A. et al., 2010. Cytotoxic profile of natural and some modified bufadienolides from toad *Rhinella schneideri* parotoid gland secretion. **Toxicon** 56, 339–48. DOI: 10.1016/j.toxicon.2010.03.021
- DAHAL, R.H., CHAUDHARY, D.K., KIM, D. et al. *Chryseobacterium antibioticum* sp. nov. with antimicrobial activity against Gram-negative bacteria, isolated from Arctic soil. **J Antibiot** (2020). <https://doi.org/10.1038/s41429-020-00367-1>
- DALGETTY, L., & KENNEDY, M. W. (2010). Building a home from foam—túngara frog foam nest architecture and three-phase construction process. **Biology Letters**, 6(3), 293–296. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2009.0934>

DENSMORE, C. L., & GREEN, D. E. (2007). Diseases of amphibians. **ILAR Journal**, 48(3), 235–254. <https://doi.org/10.1093/ilar.48.3.235>

DUELLEMAN, W. E. (1989). Alternative life-history styles in anuran amphibians: evolutionary and ecological implications. **Alternative Life-History Styles of Animals**, 101–126. https://doi.org/10.1007/978-94-009-2605-9_6

FISHER, M. C., GARNER, T. W. J., & WALKER, S. F. (2009). Global Emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and Amphibian Chytridiomycosis in Space, Time, and Host. **Annual Review of Microbiology**, 63(1), 291–310. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073435>

FISHER, M. C., & GARNER, T. W. J. (2020). Chytrid fungi and global amphibian declines. **Nature Reviews Microbiology**. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0335-x>

FLEMING, R. I., MACKENZIE, C. D., COOPER, A., & KENNEDY, M. W. (2009). Foam nest components of the túngara frog: A cocktail of proteins conferring physical and biological resilience. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, 276(1663), 1787–1795. <https://doi.org/10.1098/rspb.2008.1939>

FOUQUET, A. et al. (2014). Species delimitation, patterns of diversification and historical biogeography of the neotropical frog genus *Adenomera* (Anura, Leptodactylidae). **Journal of Biogeography**, 41(5), 855–870. <https://doi.org/10.1111/jbi.12250>

FROST, D. (2020). Amphibian Species of the World 6.0, an Online Reference. **American Museum of Natural History**. Herpetology Site. Disponível em: <<https://amphibiansoftheworld.amnh.org/>> Acesso em: 24 de jun. de 2020.

GARDA, A.A., et al. (2013) Herpetofauna of protected areas in the Caatinga I: Raso da Catarina Ecological Station. *Check List* 9:405–414

GRÜNDLER, M. C. ET AL. (2012). Interaction between breeding habitat and elevation affects prevalence but not infection intensity of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazilian anuran assemblages. **Diseases of Aquatic Organisms**, 97(3), 173–184. <https://doi.org/10.3354/dao02413>

GURAV, R. G., TANG, J., & JADHAV, J. P. (2016). Sulfitolytic and keratinolytic potential of *Chryseobacterium* sp. RBT revealed hydrolysis of melanin containing feathers. *3 Biotech*, 6(2), 1–7. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0464-0>

HADDAD, C. F. B., & PRADO, C. P. A. (2005). Reproductive modes in frogs and their unexpected diversity in the Atlantic forest of Brazil. **BioScience**, 55(3), 207–217. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2005\)055\[0207:RMIFAT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2005)055[0207:RMIFAT]2.0.CO;2)

HAMER, A. J., & MCDONNELL, M. J. (2008). Amphibian ecology and conservation in the urbanising world: A review. **Biological Conservation**, 141(10), 2432–2449. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2008.07.020>

HARRISON, X. A., SEWELL, T., FISHER, M., & ANTWIS, R. E. (2020). Designing Probiotic Therapies With Broad-Spectrum Activity Against a Wildlife Pathogen. **Frontiers in Microbiology**, 10(January), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03134>

HASAN, M., WAL, L., HOSNA, A., & HAKIM, A. (2017). Optimization of some fermentation conditions for the production of extracellular amylases by using *Chryseobacterium* and *Bacillus* isolates from organic kitchen wastes. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, 15(1), 59–68. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.02.009>

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

HOPKINS, W. A. (2007). Amphibians as models for studying environmental change. *ILAR Journal*, 48(3), 270–277. <https://doi.org/10.1093/ilar.48.3.270>KUMAR, A., SINGH, S., 2013. Directed evolution: tailoring biocatalysts for industrial applications. **Crit. Rev. Biotechnol.** 33, 365–378

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.

ISKANDAR, D. T., EVANS, B. J., & MCGUIRE, J. A. (2014). A novel reproductive mode in frogs: A new species of fanged frog with internal fertilization and birth of tadpoles. **PLoS ONE**, 9(12), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115884>

KADEKARU, S., & UNE, Y. (2018). Comparison of methods for detection of chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in bullfrog tadpole mouthparts. **Journal of Veterinary Medical Science**, 80(2), 260–262. <https://doi.org/10.1292/jvms.17-0071>

KOKUBUM, M. N. D. C., & GIARETTA, A. A. (2005). Reproductive ecology and behaviour of a species of *Adenomera* (Anura, Leptodactylinae) with endotrophic tadpoles: Systematic implications. **Journal of Natural History**, 39(20), 1745–1758. <https://doi.org/10.1080/00222930400021515>

KUMAR, A., SINGH, S., 2013. Directed evolution: tailoring biocatalysts for industrial applications. **Crit. Rev. Biotechnol.** 33, 365–378

LAMBERTINI, C. et al. (2020). Biotic and abiotic determinants of *Batrachochytrium dendrobatidis* infections in amphibians of the Brazilian Atlantic Forest. **Fungal Ecology**, 49. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2020.100995>

LAPENDA, J. C. et al. (2015). Antimicrobial activity of prodigiosin isolated from *Serratia marcescens* UFPEDA 398. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 31(2), 399–406. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1793-y>

LIU, X., & KOKARE, C. (2017). Microbial Enzymes of Use in Industry. **In Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications**. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00011-X>

LOCH, T. P., & FAISAL, M. (2015). Emerging flavobacterial infections in fish: A review. **Journal of Advanced Research**, 6(3), 283–300. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2014.10.009>

LYNCH, S. V., & PEDERSEN, O. (2016). The human intestinal microbiome in health and disease. **New England Journal of Medicine**, 375(24), 2369–2379. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1600266>

MADISON, J. D. et al. (2017). Characterization of *Batrachochytrium dendrobatidis* inhibiting bacteria from amphibian populations in Costa Rica. **Frontiers in Microbiology**, 8(FEB), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00290>

MAGAE, J., MILLER, M. W., NAGAI, K., & SHEARER, G. M. (1996). Effect of metacycloprodigiosin, an inhibitor of killer T cells, on murine skin and heart transplants. **Journal of Antibiotics**, 49(1), 86–90. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.49.86>

MANSFIELD, M. J. et al. (2019). Bioinformatic discovery of a toxin family in *Chryseobacterium piperi* with sequence similarity to botulinum neurotoxins. **Scientific Reports**, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37647-8>

MCGRATH, S. (2018). *Exploring the microbiome: diversity of the microbial community of three foam nesting frogs, Genus: Polypedates, across a developmental gradient*. **Masters Theses**. 575. <https://commons.lib.jmu.edu/master201019/575>

MÉNDEZ-NARVÁEZ, J., FLECHAS, S. V., & AMÉZQUITA, A. (2015). Foam nests provide context-dependent thermal insulation to embryos of three leptodactylid frogs. **Physiological and Biochemical Zoology**, 88(3), 246–253. <https://doi.org/10.1086/680383>

MUKERJI, R., KAKARALA, R., SMITH, S. J., & KUSZ, H. G. (2016). *Chryseobacterium indologenes*: An emerging infection in the USA. **BMJ Case Reports**, 2016, 1–4. <https://doi.org/10.1136/bcr-2016-214486>

MULETZ, C.R., MYERS, J.M., DOMANGUE, R.J., HERRICK, J.B., HARRIS, R.N., 2012. Soil augmentation with cutaneous bacteria protects amphibian hosts from infection by *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Biol. Conserv.** 152, 119–126.

NAVAS, C. A., ANTONIAZZI, M. M., & JARED, C. (2004). A preliminary assessment of anuran physiological and morphological adaptation to the Caatinga, a Brazilian semi-arid environment. **International Congress Series**, 1275, 298–305. <https://doi.org/10.1016/j.ics.2004.08.061>

NAVAS, C. A., & OTANI, L. (2007). Physiology, environmental change, and anuran conservation. *Phyllomedusa*, 6(2), 83–103. <https://doi.org/10.11606/issn.2316-9079.v6i2p83-103>

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 7. ed. artmed, 2017.

NORI, J., LEMES, P., URBINA-CARDONA, N., BALDO, D., LESCANO, J., & LOYOLA, R. (2015). Amphibian conservation, land-use changes and protected areas: A global overview. **Biological Conservation**, 191, 367–374. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2015.07.028>

OCOCK, J. F., ROWLEY, J. J. L., PENMAN, T. D., RAYNER, T. S., & KINGSFORD, R. T. (2013). Amphibian chytrid prevalence in an amphibian community in arid Australia. *EcoHealth*, 10(1), 77–81. <https://doi.org/10.1007/s10393-013-0824-8>

ORTIZ-SANTALIESTRA, M. E. et al. (2011). Ambient Ultraviolet B Radiation and Prevalence of Infection by *Batrachochytrium dendrobatidis* in Two Amphibian Species. *Conservation Biology*, 25(5), 975–982. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2011.01700.x>

PAN, H. J. et al. (2000). High protease activity of *Chryseobacterium indologenes* isolates associated with invasive infection. *J Microbiol Immunol Infect*. 2000 Dec;33(4):223-6. PMID: 11269365.

PEREIRA, E. B. et al. (2017). Evolution of the anuran foam nest: Trait conservatism and lineage diversification. *Biological Journal of the Linnean Society*, 122(4), 814–823. <https://doi.org/10.1093/BIOLINNEAN/BLX110>

PIOTROWSKI, J.S., ANNIS, S.L., LONGCORE, J.E. 2004. Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia* 96:9–15

PIMM, S. L. et al. (2014). The biodiversity of species and their rates of extinction, distribution, and protection. *Science*, 344(6187). <https://doi.org/10.1126/science.1246752>

POUNDS, J. A. et al. (2006). Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature*, 439(7073), 161–167. <https://doi.org/10.1038/nature04246>

PYRON RA, WIENS JJ (2013) Large-scale phylogenetic analyses reveal the causes of high tropical amphibian diversity. *Proc Biol Sci/R Soc* 280:20131622. <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.1622>

RAMALHO, W. P. et al. (2018). Herpetofauna of parque estadual altamiro de moura pacheco: One of the last remnants of seasonal forest in the core region of the Brazilian cerrado. *Papeis Avulsos de Zoologia*, 58, 0–4. <https://doi.org/10.11606/1807-0205/2018.58.51>

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., MARTÍNEZ-UGALDE, E., & ORTA, A. H. (2020). The amphibian skin microbiome and its protective role against chytridiomycosis. *Herpetologica*, 76(2), 167–177. <https://doi.org/10.1655/0018-0831-76.2.167>

REYES-PEREZ, J.J., HERNANDEZ-MONTIEL, L.G., VERO, S. et al. Postharvest biocontrol of *Colletotrichum gloeosporioides* on mango using the marine bacterium *Stenotrophomonas rhizophila* and its possible mechanisms of action. *J Food Sci Technol* 56, 4992–4999 (2019). <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03971-8>

RIBEIRO, V. P. et al. (2018). Endophytic *Bacillus* strains enhance pearl millet growth and nutrient uptake under low-P. **Brazilian Journal of Microbiology**, *49*, 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.06.005>

RODRÍGUEZ, C., ROLLINS-SMITH, L., IBÁÑEZ, R., DURANT-ARCHIBOLD, A. A., & GUTIÉRREZ, M. (2017). Toxins and pharmacologically active compounds from species of the family Bufonidae (Amphibia, Anura). **Journal of Ethnopharmacology**, *198*, 235–254. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.12.021>

ROHR, J. R. et al. (2013). Early-life exposure to a herbicide has enduring effects on pathogen-induced mortality. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, *280*(1772), 1–7. <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.1502>

RUGGERI, J. et al. (2019). Discovery of wild amphibians infected with ranavirus in Brazil. **Journal of Wildlife Diseases**, *55*(4), 897–902. <https://doi.org/10.7589/2018-09-224>

SANG, M. K., JEONG, J. J., KIM, J., & KIM, K. D. (2018). Growth promotion and root colonisation in pepper plants by phosphate-solubilising *Chryseobacterium* sp. strain ISE14 that suppresses *Phytophthora* blight. **Annals of Applied Biology**, *172*(2), 208–223. <https://doi.org/10.1111/aab.12413>

SARANRAJ, P., NAIDU, M.A., 2014. Microbial pectinases: a review. *Global J. Trad. Med. Sys.* *3*, 1–9

SCHEELE, B. C. et al. Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity. **Science**, v. 363, n. March, p. 1459–1463, 2019
STUART, S.N. et al. (2004). Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. **Science** *306*, 1783–1786.

SCHALLMEY, M., SINGH, A., & WARD, O. P. (2004). *Developments in the use of Bacillus species for industrial production*. *17*(January), 1–17. <https://doi.org/10.1139/W03-076>

SESHADRI, K. S., GURURAJA, K. V., & BICKFORD, D. P. (2015). Breeding in bamboo: A novel anuran reproductive strategy discovered in Rhacophorid frogs of the Western Ghats, India. **Biological Journal of the Linnean Society**, *114*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1111/bij.12388>

SHAHRUDIN, S., ISMAIL, M. N., KWAN, S. H., & NAJIMUDIN, N. (2017). Ecology and protein composition of polypedes leucomystax (Gravenhorst, 1829) (Anura: Rhacophoridae) foam nests from Peninsular Malaysia. **Annual Research and Review in Biology**, *14*(6), 1–10. <https://doi.org/10.9734/ARRB/2017/34211>

SHU, Y. et al. (2019). Comparison of intestinal microbes in female and male Chinese concave-eared frogs (*Odorrana tormota*) and effect of nematode infection on gut bacterial communities. **MicrobiologyOpen**, *8*(6), 1–11. <https://doi.org/10.1002/mbo3.749>

SILVA, J.M.C., LEAL, I.R., TABARELLI, M. (2017). **Caatinga The Largest Tropical Dry Forest Region in South America**. ISBN 978-3-319-68338-6. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-68339-3>

SIMAIR, A. A. et al. (2017). Production and Partial Characterization of α -Amylase Enzyme from *Bacillus* sp. BCC 01-50 and Potential Applications. 2017.

SINGH, B. K. (2010). Exploring microbial diversity for biotechnology: The way forward. **Trends in Biotechnology**, 28(3), 111–116.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.11.006>

SINGH, R.P and JHA, P.N (2017) The PGPR *Stenotrophomonas maltophilia* SBP-9 Augments Resistance against Biotic and Abiotic Stress in Wheat Plants. **Front. Microbiol.** 8:1945. doi: 10.3389/fmicb.2017.01945

STEVENSON, L. A., ROZNIK, E. A., GREENSPAN, S. E., ALFORD, R. A., & PIKE, D. A. (2020). Host thermoregulatory constraints predict growth of an amphibian chytrid pathogen (*Batrachochytrium dendrobatidis*). **Journal of Thermal Biology**, 87(November 2019), 102472. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2019.102472>

SUMI, C. D., YANG, B. W., YEO, I. C., & HAHM, Y. T. (2015). Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: A new era for antibiotics. **Canadian Journal of Microbiology**, 61(2), 93–103. <https://doi.org/10.1139/cjm-2014-0613>

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.

TANAKA, S., & NISHIHARA, M. (1987). Foam nest as a potential food source for anuran larvae: a preliminary experiment. **Journal of Ethology**, 5(1), 86–88.
<https://doi.org/10.1007/BF02347899>

VIEIRA, W. L. S., SANTANA, G. G., & ARZABE, C. (2008). Diversity of reproductive modes in anurans communities in the Caatinga (dryland) of northeastern Brazil. **Biodiversity and Conservation**, 18(1), 55–66. <https://doi.org/10.1007/s10531-008-9434-0>

VIEIRA, C. A., TOLEDO, L. F., LONGCORE, J. E. & LONGCORE, J. R. (2013). tadpoles, depigmentation of mouthparts, and presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* are related. **Brazilian Journal of Biology**, 73(1), 195–199.

VITT, L. J., & J. P. CALDWELL. 2014. Herpetology. An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles. Fourth Edition. Amsterdam: Elsevier.

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

WELLS, K. (2007). **The Ecology & Behavior of Amphibians**. Bibliovault OAI Repository, the University of Chicago Press. 10.7208/chicago/9780226893334.001.0001.

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

WOGEL H., ABRUNHOSA P.A. & POMBAL, J.P. (2002) Atividade reprodutiva de *Physalaemus signifer* (Anura, Leptodactylidae) em ambiente temporário. *Iheringia Ser Zool* 92(2):57–70

WOOD, I. P. et al. (2016). Ethanol from a biorefinery waste stream: Saccharification of amylase, protease and xylanase treated wheat bran. **Food Chemistry**, 198, 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.108>

WOODHAMS, D. C. et al. (2017). Prodigiosin, Violacein, and Volatile Organic Compounds Produced by Widespread Cutaneous Bacteria of Amphibians Can Inhibit Two Batrachochytrium Fungal Pathogens. **Microbial Ecology**, 75(4), 1049–1062. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-1095-7>

WOODHAMS, D. C. et al. (2020). Probiotics Modulate a Novel Amphibian Skin Defense Peptide That Is Antifungal and Facilitates Growth of Antifungal Bacteria. *Microbial Ecology*, 79(1), 192–202. <https://doi.org/10.1007/s00248-019-01385-9>

YANG, N. et al. (2018). Screen of *Chryseobacterium* CHANGBAI-2 strain and Identification of the Antifungal Antibiotic from Its Fermentation Broth. 10.2991/bst-17.2018.9.

YUAN, J., RAZA, W., SHEN, Q., & HUANG, Q. (2012). Antifungal activity of bacillus amyloliquefaciens NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. **Applied and Environmental Microbiology**, 78(16), 5942–5944. <https://doi.org/10.1128/AEM.01357-12>

ZHAO, Z., WANG, Q., WANG, K., BRIAN, K., LIU, C., & GU, Y. (2010). Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 in vitro and identification of its antifungal components. **Bioresource Technology**, 101(1), 292–297. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.07.071>