



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE RECURSOS**  
**NATURAIS**

**SAULO GONÇALVES DE SANTIAGO BEZERRA**

**AÇÃO DE NINHOS DE ESPUMA DE ANUROS E DA SUA MICROBIOTA**  
**ASSOCIADA NA QUITRIDOMICOSE**

**FORTALEZA**

**2021**

SAULO GONÇALVES DE SANTIAGO BEZERRA

AÇÃO DE NINHOS DE ESPUMA DE ANUROS E DA SUA MICROBIOTA ASSOCIADA  
NA QUITRIDIOMICOSE

Dissertação apresentada a Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais. Área de concentração: Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo.

Coorientadora: Profa. Dra. Denise Cavalcante Hissa.

FORTALEZA

2021

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)

---

- B469a Bezerra, Saulo Gonçalves de Santiago.  
Ação de Ninhos de Espuma de Anuros e da sua Microbiota Associada na Quitridiomiose / Saulo Gonçalves de Santiago Bezerra. – 2021.  
71 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2021.  
Orientação: Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo.  
Coorientação: Profa. Dra. Denise Cavalcante Hissa.
1. Anfíbio. 2. Leptodactylidae. 3. Modo Reprodutivo. 4. Doença Fúngica. 5. Microbioma. I. Título.  
CDD 660.6
-

SAULO GONÇALVES DE SANTIAGO BEZERRA

AÇÃO DE NINHOS DE ESPUMA DE ANUROS E DA SUA MICROBIOTA ASSOCIADA  
NA QUITRIDIDIOMICOSE

Dissertação apresentada a Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais. Área de concentração: Biotecnologia.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

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

---

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

---

Profa. Dra. Laís Feitosa Machado  
Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF)

---

Prof. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

## AGRADECIMENTOS

Inicialmente, gostaria de agradecer à minha mãe **Sônia** por todo o apoio ao longo dos anos e por sempre estar presente. Às Profas. **Denise Hissa** e **Vânia Melo** por terem dedicado tempo para me orientar e por acreditarem no meu potencial quando eu mesmo não acreditava.

Também gostaria de agradecer às doutoras **Cristiane Rabelo**, **Andrea Oliveira** e **Mirella Leite** pelo companheirismo no laboratório, pelas ajudas mútuas e pela troca de experiências.

Agradeço aos companheiros de laboratório **Gabrielly Oliveira**, **Luzia Castro (Zulia)**, **Raíssa Dias**, **Igor Duarte**, **Bella Giselly** e **Jonathan Santos** pelas ajudas mútuas em experimentos e pela amizade descontraída e enriquecedora.

Ao Prof. **Paulo Cascon**, **Mirian Mendes**, **Luan Castelo**, **John Andrade**, **Igor Joventino** e **Juliana Borges** pela disponibilidade e pelo auxílio durante a coleta dos ninhos de espuma.

Aos colegas do Bioprospec, principalmente **Luiz Filho**, **Thiago** e **Joaquim**, pelo auxílio na utilização do espectrofotômetro de microplaca e por outras ajudas emergenciais.

Ao Prof. **Diego Wilke** e ao Prof. **Emílio Miguel** pela participação e pelas sugestões no exame de qualificação. Em especial ao Prof. Diego Wilke pelas orientações, treinamento e disponibilidade para o uso do citômetro de fluxo, que, infelizmente, não foi possível colocar em prática durante este trabalho.

Às Profa **Láís Machado** e Profa **Rossana Cordeiro** pela disponibilidade em participar da banca da presente dissertação

Por fim, agradeço à **CAPES** pela oportunidade do apoio financeiro durante todo o período do mestrado.

Although amphibians are suffering declines and extinctions, we predict that at least some frogs, salamanders, and caecilians will survive the current extinction event on their own or with help, even as their ancestors survived the four preceding mass extinctions (WAKE; VREDENBURG, 2008).

## RESUMO

A quitridiomicose é responsável pelo declínio de centenas de espécies de anfíbios por todo o mundo e tem como principal agente patológico o fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*). Uma das estratégias para contenção dessa doença é o enriquecimento de bactérias isoladas da pele de anfíbios que são capazes de inibir o crescimento do fungo. Apesar dos diversos estudos que associam muitos fatores abióticos e bióticos à dinâmica da doença, a participação de componentes dos ninhos de espuma de anuros nessa complexa relação hospedeiro-parasita ainda é completamente desconhecida. Essas bioespumas são formadas por uma complexa mistura de carboidratos e proteínas, além de abrigarem uma vasta microbiota espécie-específica. Nesse sentido, objetiva-se determinar qual o efeito dos ninhos de espuma de anuros da família Leptodactylidae e da microbiota associada sobre o *Bd*, bem como identificar um inoculante com potencial contra esse fungo. Para este estudo, o fluido dos ninhos de espuma de seis espécies de anuros e bactérias isoladas das espumas foram avaliados contra o *Bd*. Os resultados inéditos mostram que as biomoléculas dos ninhos de espuma estimulam o crescimento do *Bd*, sendo possivelmente usadas como nutrientes pelo patógeno, e selecionam diferentes composições de bactérias. A microbiota cultivada é composta majoritariamente por representantes dos filos Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria e Firmicutes. Dentre os isolados obtidos, foram identificados oito com atividade anti-*Bd*. Dentre esses, os gêneros mais frequentes foram *Pseudomonas* e *Enterobacter*. A simulação de bioaumentação em fluidos de ninhos de espuma de *Leptodactylus vastus in natura*, não estéril, provou ( $p < 0,05$ ) que a inoculação de aproximadamente  $10^8$  células/mL da estirpe *Pseudomonas* sp. P54 inibe o crescimento do fungo. Esse resultado é promissor e estende o reconhecido potencial anti-*Bd* de *Pseudomonas* spp., também presente na microbiota da pele de anuros, para os ninhos de espuma.

**Palavras-chave:** anfíbio; Leptodactylidae; modo reprodutivo; doença fúngica; microbioma.

## ABSTRACT

Chytridiomycosis is responsible for the decline of hundreds of amphibian species worldwide and the main infectious agent is the fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*). One of the strategies to contain this disease is the enrichment of skin amphibian bacteria that are able to inhibit the growth of this fungus. Despite several studies regarding the influence of abiotic and biotic factors to the disease dynamics, the contribution of frog foam nest components in this complex host-parasite interaction is still unknown. These biofoams are composed of a complex mixture of carbohydrates and proteins, in addition to hosting a vast species-specific microbiota. In this sense, the goal of this study is to evaluate the effect of the foam nests produced by leptodactylid frogs and its associated microbiota on the *Bd*, as well as to identify a microbial inoculant with potential against this fungus. For this study, the fluid of foam nests from six frog species and bacteria isolated from the foam were tested against *Bd*. The unprecedented results show that foam nest biomolecules stimulate *Bd* growth, possibly being used as nutrients, and select different bacterial compositions. The culture-dependent microbiota is mostly composed of representatives of the phyla Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria and Firmicutes. Among these isolates, eight had anti-*Bd* activity, with the most frequent genera being *Pseudomonas* and *Enterobacter*. The simulation of bioaugmentation in *Leptodactylus vastus* foam nest fluid *in natura* (non-sterile) showed ( $p < 0,05$ ) that the inoculation of approximately  $10^8$  cells/mL of the *Pseudomonas* sp. P54 inhibits the fungus growth. This result is promising and extends the recognized anti-*Bd* potential of *Pseudomonas* spp., also present in frog skin microbiota, to foam nests.

**Keywords:** amphibian; Leptodactylidae; reproductive mode; fungal disease; microbiome.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Impacto da quitridiomiose em espécies de anfíbios no mundo ao longo do tempo.....	14
Figura 2	– Distribuição das linhagens de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> (Bd) pelo mundo e o número de espécies de anuros com declínio populacional maior que 90% por país.....	16
Figura 3	– Filogenia do gênero <i>Batrachochytrium</i> .....	17
Figura 4	– Estágios de vida do <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> .....	18
Figura 5	– Ultraestrutura do <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> .....	19
Figura 6	– Ciclo de vida assexuado de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> .....	20
Figura 7	– Despigmentação do aparelho bucal de girinos infectados pelo <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> .....	21
Figura 8	– Sintomas da quitridiomiose em anfíbios adultos.....	22
Figura 9	– Ciclo de vida epibiótico do <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> .....	23
Figura 10	– Ciclo de vida endobiótico do <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> .....	24
Figura 11	– Ninhos de espumas de anuros com ocorrência no Nordeste brasileiro.....	28
Figura 12	– Estrutura bidimensional dos metabólitos bacterianos conhecidos por apresentarem atividade anti-Bd.....	31
Figura 13	– Esquema do ensaio da atividade emulsificante.....	36
Figura 14	– Perfil proteico dos ninhos de espuma de <i>Leptodactylus vastus</i> , <i>L. macrosternum</i> , <i>L. podicipinus</i> , <i>Physalaemus cuvieri</i> , <i>P. albifrons</i> e <i>Adenomera hylaedactyla</i> elucidado por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes.....	45
Figura 15	– Ensaio de emulsificação dos ninhos de espuma de <i>Leptodactylus vastus</i> (Lv), <i>L. macrosternum</i> (Lm), <i>Physalaemus cuvieri</i> (Pc), <i>P. albifrons</i> (Pa) e <i>Adenomera hylaedactyla</i> (Ah) .....	46
Figura 16	– Efeito de cada diluição dos ninhos de espuma de (a) <i>Leptodactylus vastus</i> , (b) <i>L. macrosternum</i> , (c) <i>Physalaemus cuvieri</i> , (d) <i>P. albifrons</i> , (e) <i>L. podicipinus</i> e (f) <i>Adenomera hylaedactyla</i> sobre o crescimento do fungo <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> .....	47

Figura 17 – Curvas de crescimento que demonstram (A) inibição, (B) facilitação e (C) ausência de efeito dos sobrenadantes de co-cultivos entre o <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> e estirpes bacterianas sobre o crescimento do fungo.....	48
Figura 18 – Efeito do sobrenadante do co-cultivo sobre o crescimento do fungo <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> no décimo dia de ensaio (lote I).....	51
Figura 19 – Efeito do sobrenadante do co-cultivo sobre o crescimento do fungo <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> no sétimo dia de ensaio (lote II) .....	51
Figura 20 – Distribuição dos índices de inibição por gênero dos isolados dos ninhos de espuma de <i>Physalaemus cuvieri</i> e <i>Adenomera hylaedactyla</i> .....	52
Figura 21 – Efeito da <i>Pseudomonas</i> P54 no fluido do ninho de <i>Leptodactylus vastus</i> com a microbiota presente.....	53

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Descrição dos modos reprodutivos envolvendo ninhos de espuma.....	26
Tabela 2	– Proteínas isoladas e caracterizadas de ninhos de espuma de rãs.....	29
Tabela 3	– Metabólitos bacterianos com atividade anti- <i>Bd</i> reconhecida.....	31
Tabela 4	– Localização das coletas de ninhos de espuma utilizados neste estudo com as respectivas espécies produtoras.....	35
Tabela 5	– Estirpes de bactérias isoladas de ninhos de espuma de anuros que foram testadas contra o fungo <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> neste estudo.....	37
Tabela 6	– Estruturação do ensaio para avaliar o efeito do sobrenadante dos co-cultivos sobre o crescimento do fungo <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> .....	40
Tabela 7	– Estruturação do ensaio para avaliar o efeito do fluido dos ninhos de espuma sobre o crescimento do fungo <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> .....	41
Tabela 8	– Condições experimentais e controles para avaliar a ação da estirpe <i>Pseudomonas</i> sp. P54 sobre o crescimento do fungo <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> (Bd) no ninho de espuma liquefeito (N) de <i>Leptodactylus vastus</i> .....	42
Tabela 9	– Concentração de proteínas e de carboidratos totais dos ninhos de espuma.....	44
Tabela 10	– Efeito do sobrenadante do co-cultivo entre o <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> e as estirpes de bactérias dos ninhos de espuma sobre o crescimento do fungo...	49

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1	Panorama da quitridiomiose no mundo.....	14
2.2	Os agentes patológicos.....	16
2.3	Sintomas e patogênese.....	20
2.4	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> no Brasil com foco no semiárido nordestino..	25
2.5	Ninhos de espuma.....	26
2.6	Microbiota e moléculas antifúngicas contra o <i>Bd</i> .....	29
3	OBJETIVOS.....	34
3.1	Objetivo geral .....	34
3.2	Objetivos específicos.....	34
4	METODOLOGIA .....	35
4.1	Coleta de material biológico.....	35
4.2	Processamento e caracterização bioquímica das amostras de ninhos de espuma.....	35
4.3	Cultiváveis bacterianos dos ninhos de espuma.....	36
4.4	Co-cultivo entre as estirpes bacterianas e o fungo <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> .....	38
4.5	Análise da ação dos ninhos de espuma de anuros e dos sobrenadantes dos co-cultivos sobre o crescimento do fungo <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> .....	39
4.6	Avaliação da estirpe P54 para o controle do <i>Bd</i> no ninho de espuma de <i>Leptodactylus vastus</i> .....	41
4.7	Análises estatísticas.....	43
5	RESULTADOS.....	44
5.1	Composição bioquímica de ninhos de espuma de anuros.....	44
5.2	Atividade de ninhos de espuma de anuros sobre crescimento do fungo <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> .....	46
5.3	Efeito de estirpes de bactérias isoladas de ninhos de espuma de <i>Physalaemus cuvieri</i> e <i>Adenomera hylaedactyla</i> sobre o crescimento do fungo <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> .....	48

5.4	Avaliação da <i>Pseudomonas</i> sp. P54 como inoculante no ninho de <i>Leptodactylus vastus</i> .....	52
6	DISCUSSÃO.....	54
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	60
	REFERÊNCIAS.....	61

## 1 INTRODUÇÃO

A quitridiomycose é uma doença fúngica que acomete anfíbios por todo o planeta e está associada ao declínio de pelo menos 6,5% das espécies de anfíbios descritas (SCHEELE *et al.*, 2019). Embora esse fenômeno venha ocorrendo desde a década de 1970 (FISHER; GARNER, 2020), somente no final do século XX, o agente patológico foi identificado: o novo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (BERGER *et al.*, 1998; LONGCORE; PESSIER; NICHOLS, 1999). Mais tarde, uma nova espécie foi associada à quitridiomycose: *B. salamandrivorans* (MARTEL *et al.*, 2013).

A linhagem *B. dendrobatidis* *Bd*-GPL (*global panzootic lineage*) é amplamente distribuída por todo o planeta e está associada aos grandes declínios populacionais (O'HANLON *et al.*, 2018). Esse fungo apresenta duas fases de vida: o zoósporo, aquático e móvel, e o zoosporângio, sésil e capaz de gerar novos zoósporos (BERGER *et al.*, 2005). Um dos sintomas da doença é o excesso de descamação da pele do anfíbio acometido, que gera um desequilíbrio hídrico e iônico, resultando em uma atividade cardíaca irregular. Essa é uma das principais explicações para a morte dos anfíbios pela doença (CAMPBELL *et al.*, 2012; SALLA *et al.*, 2018; VOYLES *et al.*, 2009).

Uma das estratégias para a mitigação da quitridiomycose é o uso de bactérias com ação inibitória contra o *Bd* isoladas da pele de anfíbios. A técnica mais testada é a bioaugmentação, que consiste em aumentar a abundância de bactérias com ação anti-*Bd* já presentes na microbiota cutânea por meio da inoculação desses microrganismos na pele. Os resultados dessa técnica são mistos, sendo possível a mitigação da doença em algumas espécies, e, em outras, a adição do inoculante se mostra ineficaz (REBOLLAR; MARTÍNEZ-UGALDE; ORTA, 2020). Esses inoculantes podem ser aplicados diretamente sobre a pele do animal por meio de banhos (HARRIS *et al.*, 2009a) ou indiretamente por meio de aplicações no ambiente, a partir do qual colonizam a pele de uma determinada comunidade de anfíbios (MULETZ *et al.*, 2012). Além disso, ainda é possível que os compostos produzidos pelos inoculantes e os peptídeos antimicrobianos presentes na pele dos anfíbios possam ter uma ação anti-*Bd* sinérgica, melhorando a eficácia do tratamento (MYERS *et al.*, 2012).

Muitas espécies de anuros depositam seus ovos em ninhos de espuma construídos na água, no solo ou na superfície de plantas. Esses ninhos são compostos por uma mistura de carboidratos e de proteínas, incluindo proteínas surfactantes, que variam para cada espécie de anuro (COOPER *et al.*, 2017). Sabe-se que os ninhos abrigam uma microbiota (HISSA *et al.*, 2008), que é constituída possivelmente por espécies de bactérias provenientes da microbiota do

animal e também do ambiente. Entretanto, ainda não se sabe se essas bioespumas e sua microbiota apresentam alguma função na defesa contra o *Bd*.

Nesse sentido, os objetivos deste trabalho são (1) determinar a função desempenhada pelos ninhos de espumas de anuros, incluindo a sua microbiota associada, no combate à quitridiomycose e (2) identificar bactérias, que foram isoladas dos ninhos, com potencial para atuar na prevenção contra a quitridiomycose.

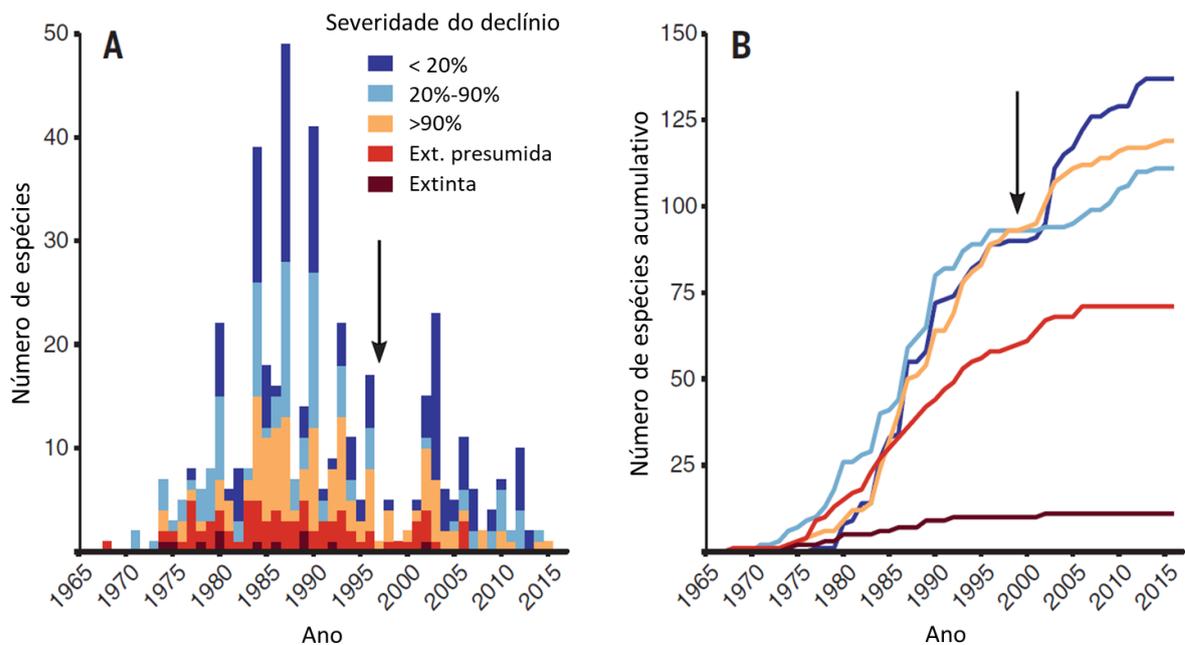
Para este trabalho, foram formuladas as seguintes hipóteses: (1) a composição bioquímica dos ninhos de espuma depende da espécie de anuro e é capaz de inibir o crescimento do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*; (2) membros da comunidade microbiana dos ninhos vão compor a microbiota do animal, tendo um papel prevalente na defesa do animal contra patógenos, incluindo o *Bd*, desde as fases iniciais do desenvolvimento do anuro no ninho.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Panorama da quitridiomicose no mundo

A quitridiomicose é uma doença fúngica que acomete anfíbios por todo o planeta e está associada ao declínio de pelo menos 501 espécies (6,5% das espécies de anfíbios descritas), sendo 90 com extinção confirmada ou presumida (Figura 1). Esse número pode ser ainda maior ao se levar em consideração as espécies nas quais a relação declínio-doença é incerta, as espécies ainda não conhecidas e as regiões com baixa amostragem (SCHEELE *et al.*, 2019).

Figura 1 – Impacto da quitridiomicose em espécies de anfíbios no mundo ao longo do tempo



Fonte: Scheele *et al.* (2019). Em A, as barras significam o número de espécies de anfíbios em declínio por ano com as intensidades representadas por cores. Em B, as linhas indicam o número acumulado de espécies em declínio por ano ao longo do tempo. A cor de cada curva representa uma intensidade de declínio. A seta indica o ano da descoberta da quitridiomicose (1998).

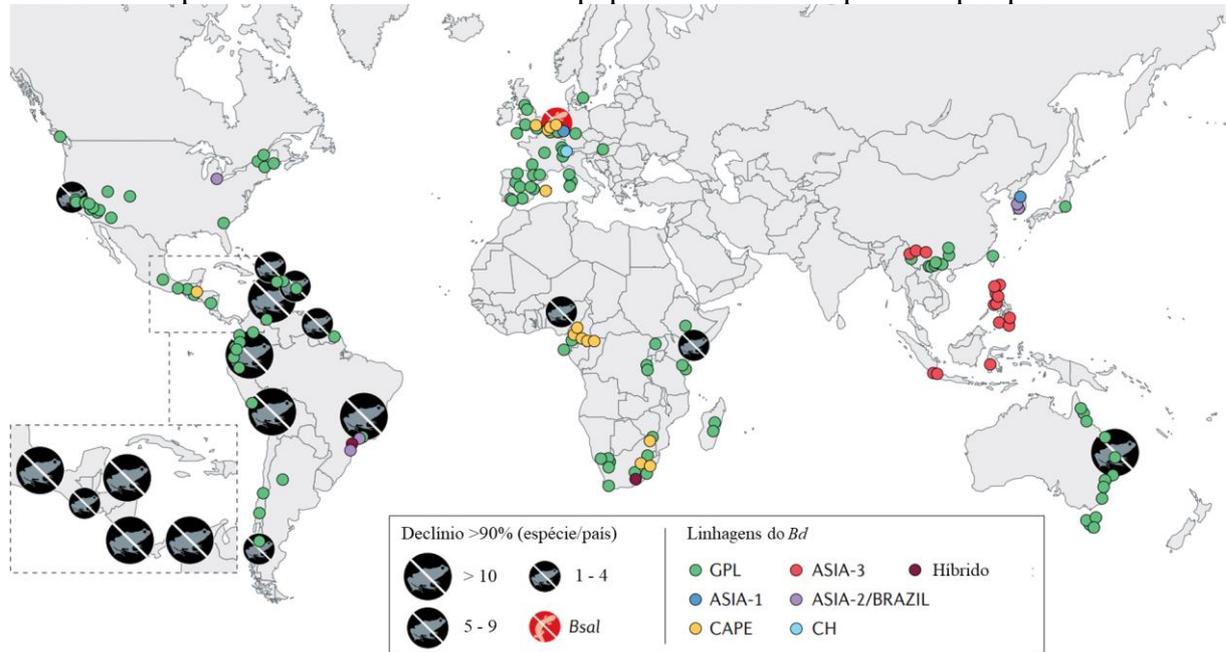
Como mostra a Figura 1, o ápice dos declínios populacionais de anfíbios no mundo ocorreu na década de 1980 e início da década de 1990, mas, na América do Sul (excluindo o Brasil), esse fato ocorreu na década de 2000, explicando um segundo pico da doença (LIPS, 2016; SCHEELE *et al.*, 2019). O peso e a dimensão global desses eventos foram reconhecidos somente no início da década de 1990, percebendo-se que afetavam tanto áreas conservadas quanto antropizadas (BLAUSTEIN; WAKE, 1990). Embora a maioria das hipóteses atribuisse o problema a causas ambientais, como a perda de habitat, algumas propostas sobre a existência

de um possível patógeno surgiram (BLAUSTEIN *et al.*, 1994; SCOTT, 1993). Essa ideia começou a ganhar força visto que mudanças ambientais não explicavam o fenômeno adequadamente. Foi proposta, então, a existência de um patógeno exótico intercontinental, provavelmente um vírus (LAURANCE; MCDONALD; SPEARE, 1996). Alguns anos depois, a quitridiomiose em anfíbios foi descoberta e associada com os declínios populacionais (BERGER *et al.*, 1998; PESSIER *et al.*, 1999).

Essa doença é provocada por dois agentes patológicos: *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) (LONGCORE; PESSIER; NICHOLS, 1999) e *Batrachochytrium salamandrivorans* (*Bsal*) (MARTEL *et al.*, 2013). Como descrito nesses trabalhos, o gênero *Batrachochytrium* significa quitrídio de sapos. O nome específico de *B. dendrobatidis* se refere ao gênero do anuro utilizado para isolar e descrever o patógeno (*Dendrobates*); e o de *B. salamandrivorans* significa “devorador de salamandras”.

O local de origem da quitridiomiose levantou muitas discussões desde a descoberta da doença. África (WELDON *et al.*, 2004), América do Norte (TALLEY *et al.*, 2015), Leste Asiático (BATAILLE *et al.*, 2013), Brasil (RODRIGUEZ *et al.*, 2014) e Japão (GOKA *et al.*, 2009) foram sugeridos como berço da linhagem pandêmica *Bd*-GPL (*global pandemic lineage*), a mais virulenta e que é responsável pela maioria dos declínios de anfíbios no mundo. Com o objetivo de resolver esse problema, foram analisadas as sequências genômicas de 234 estirpes de *Bd* de diversas regiões do planeta. Os resultados mostraram a existência de quatro grandes linhagens (Figura 2): *Bd*-GPL, *Bd*-CAPE (africana), *Bd*-ASIA1 (península coreana), *Bd*-ASIA2/*Bd*-Brazil e três híbridos (um entre *Bd*-Brazil e *Bd*-GPL e dois entre *Bd*-CAPE e *Bd*-GPL). A linhagem que compartilha maior diversidade genética com *Bd*-GPL em relação às demais é *Bd*-ASIA1, sugerindo uma ancestralidade em comum. Além disso, os autores também concluíram que os dois grupos se separaram em algum momento entre 1939 e 1989 na península coreana (O’HANLON *et al.*, 2018) Mais recentemente, uma quinta linhagem foi identificada: *Bd*-ASIA3 (BYRNE *et al.*, 2019).

Figura 2 – Distribuição das linhagens de *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) pelo mundo e o número de espécies de anuros com declínio populacional maior que 90% por país

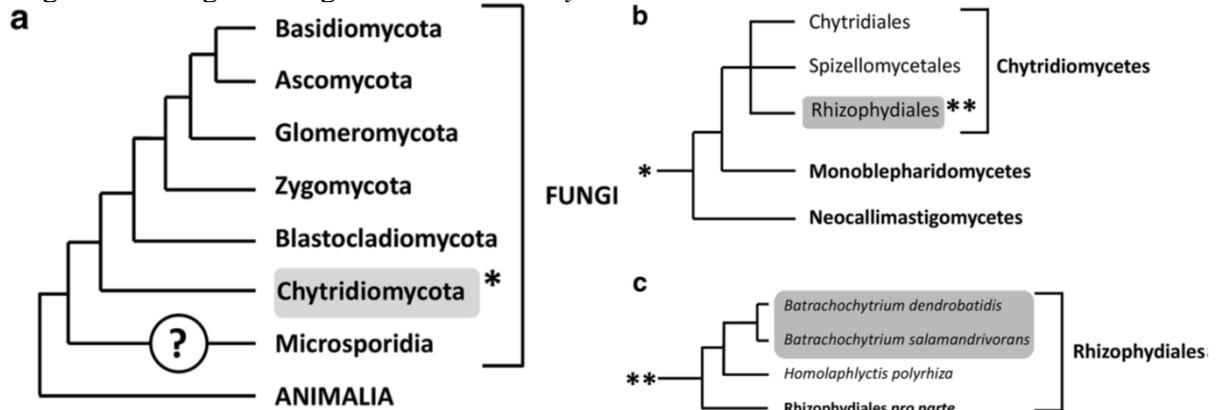


Fonte: Fisher e Garner (2020). Os círculos representam a localização dos isolados de *Bd* utilizados para determinar as linhagens.

## 2.2 Os agentes patológicos da quitridiomiose

*Batrachochytrium dendrobatidis* e *Batrachochytrium salamandrivorans* pertencem ao filo Chytridiomycota, classe Chytridiomycetes e ordem Rhizophydiales como mostra a Figura 3 (HIBBETT *et al.*, 2007). Os representantes desse filo podem ocupar ambientes aquáticos (dulcícola, marinho e estuarino), terrestres e anaeróbicos. Ecologicamente, eles são parasitas de inúmeros organismos, como algas, plantas vasculares e invertebrados (artrópodes e rotíferas, por exemplo); são saprófitos, principalmente em solo, auxiliando na decomposição de celulose, hemicelulose, queratina e quitina; e fazem parte da microbiota do sistema digestório de herbívoros, auxiliando na digestão de fibras vegetais (BARR, 2001). *Bd*, *Bsal* e *Ichthyochytrium vulgare* (peixe) são as únicas espécies de quitrídios conhecidas por infectar vertebrados (VAN ROOIJ *et al.*, 2015).

Figura 3 - Filogenia do gênero *Batrachochytrium*



Fonte: Van Rooij *et al.*, (2015). O cladograma mostra o posicionamento de *Bd* e *Bsal* no reino Fungi (a), no filo Chytridiomycota (b) e na ordem Rhizophydiales (c). A posição de Microsporidia é incerta. O comprimento das ramificações não representa as distâncias genéticas.

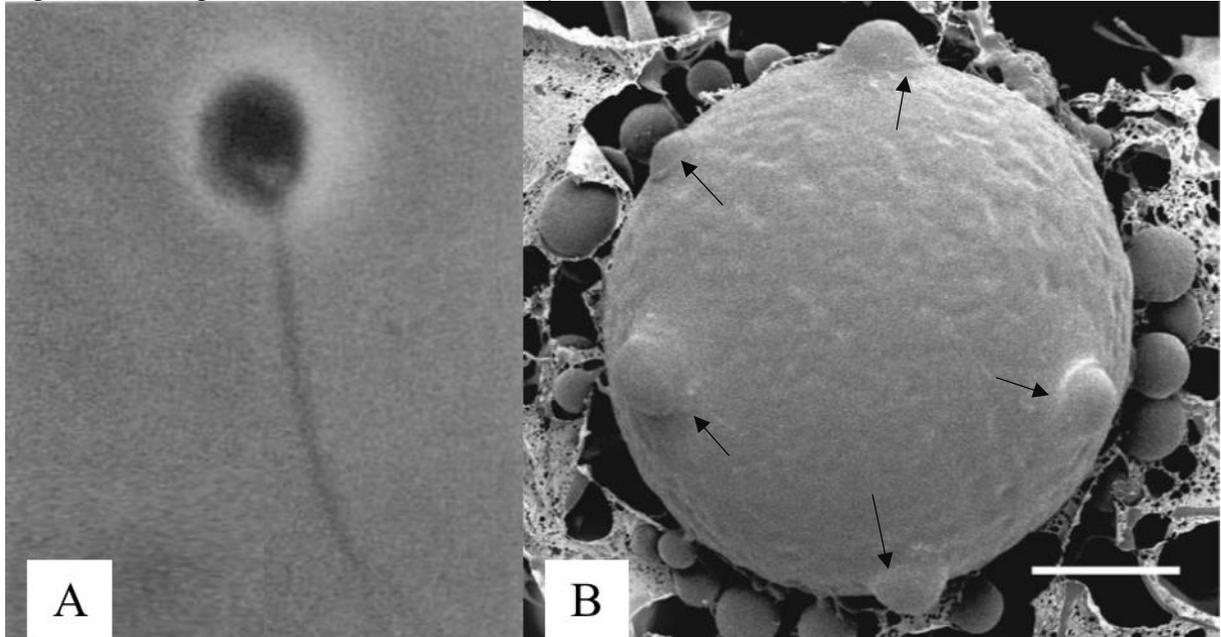
Existem diferenças bem definidas entre as duas espécies de *Batrachochytrium*. *Bd* apresenta uma maior amplitude de hospedeiros, sendo capaz de infectar os três grandes grupos de anfíbios (anuros, urodelos e cecilianos) em quase todos os continentes, exceto Antártica e algumas ilhas oceânicas (LIPS, 2016; VAN ROOIJ *et al.*, 2015). Por outro lado, *Bsal* provoca sinais clínicos apenas em urodelos, principalmente em salamandras, mas anuros também podem ser infectados e servir como reservatórios (MARTEL *et al.*, 2014; STEGEN *et al.*, 2017). Com relação à distribuição, *Bsal* está presente na Europa e na Ásia e continua se espalhando nesses territórios, provocando sérios declínios populacionais em salamandras europeias (GONZÁLEZ *et al.*, 2019; YAP *et al.*, 2017). Embora *Bsal* seja tão devastador quanto o *Bd* e seja capaz de reduzir em 96% uma população de salamandras em pouco tempo (SPITZEN-VAN DER SLUIJS *et al.*, 2013), o enfoque deste trabalho será no *B. dendrobatidis*.

Fisiologicamente, o *Bd* apresenta uma temperatura ótima de crescimento entre 17 e 25 °C. Abaixo desse intervalo, o crescimento ocorre mais lentamente, sendo capaz de sobreviver por pelo menos 6 meses a 4 °C. A partir de 28 °C, a viabilidade diminui, sendo mortal uma exposição a 37 °C por 4 horas (JOHNSON *et al.*, 2003; PIOTROWSKI; ANNIS; LONGCORE, 2004). O fungo ainda é capaz de crescer em pH entre 4 e 8, embora o crescimento seja significativamente maior em pH 6 e 7 (PIOTROWSKI; ANNIS; LONGCORE, 2004). Além disso, o *Bd* é suscetível à dessecação e a ação de diversos agentes químicos, como etanol, hipoclorito de sódio e quaternário de amônio (JOHNSON *et al.*, 2003).

O *Bd* apresenta dois estágios de vida (Figura 4): zoósporo e zoosporângio (talo) (LONGCORE; PESSIER; NICHOLS, 1999). Não há formação de micélio nessa espécie (VAN ROOIJ *et al.*, 2015). Também não há registros de esporos de resistência ou de reprodução

sexuada (SAMARASINGHE *et al.*, 2020). No entanto, alguns estudos cogitam a possibilidade de raros eventos sexuais (JENKINSON *et al.*, 2016; SCHLOEGEL *et al.*, 2012).

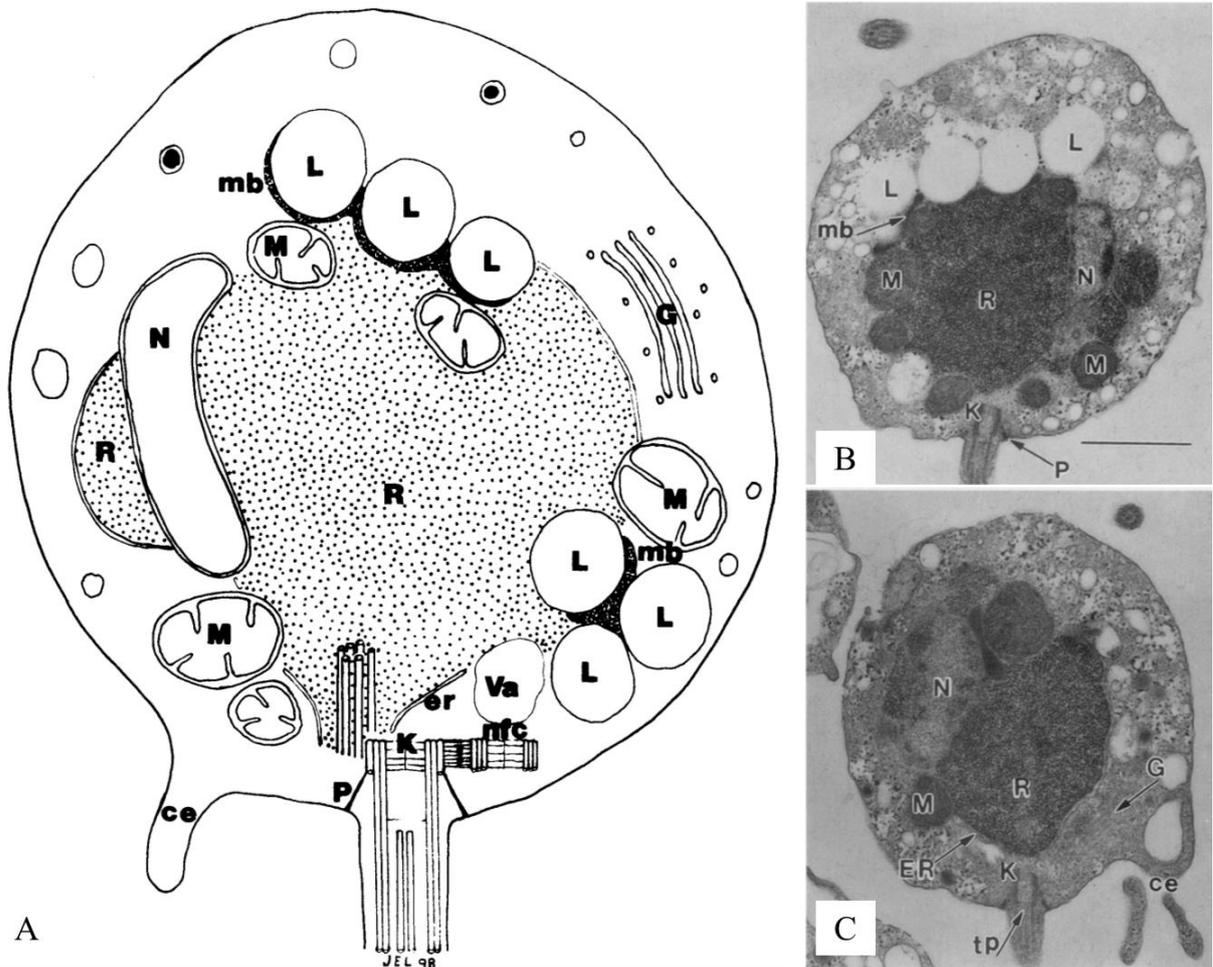
Figura 4 - Estágios de vida do *Batrachochytrium dendrobatidis*



Fonte: (A) Longcore, Pessier e Nichols (1999) e (B) Berger *et al.* (2005). Em A, fotomicrografia do zoósporo móvel do *Batrachochytrium dendrobatidis*. Barra de escala não disponível. Em B, eletromicrografia de varredura do zoosporângio do *Bd* com cinco papilas (setas pretas), que são responsáveis pela liberação dos zoósporos. Barra de escala: 10  $\mu$ m.

Os zoósporos, com cerca de 3-5  $\mu$ m, possuem motilidade devido à presença de um único flagelo. A ultraestrutura, como mostra a Figura 5, é caracterizada por um agregado ribossomal localizado no centro celular. O retículo endoplasmático circunda esses ribossomos ou se insere entre eles. Ao redor, encontram-se as mitocôndrias, o núcleo e os glóbulos de lipídios associados com microcorpos. Essas três estruturas podem estar alocadas parcialmente dentro da massa ribossomal. No restante do citoplasma periférico, encontram-se diversas vesículas, um único complexo de Golgi e dois centríolos. Um deles compõe o cinetossomo flagelar e apresenta suportes que o fixam na membrana da célula, e o outro, não-flagelar, é paralelo ao primeiro. Ambos estão conectados por um material fibroso. Por fim, o cinetossomo apresenta projeções de microtúbulos que se inserem no agregado ribossomal (LONGCORE; PESSIER; NICHOLS, 1999).

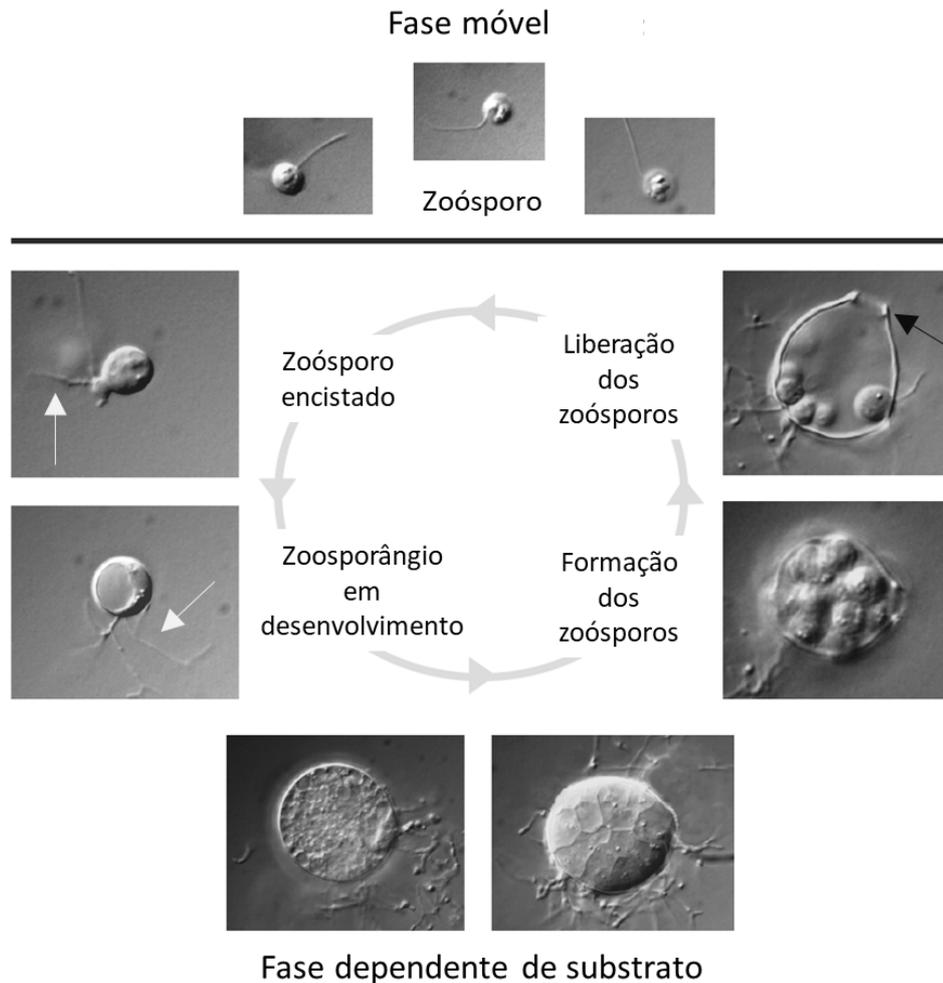
Figura 5 - Ultraestrutura do *Batrachochytrium dendrobatidis*



Fonte: Longcore, Pessier e Nichols (1999). Em A, uma representação esquemática da ultraestrutura de *B. dendrobatidis*. Em B e C, eletromicrografia de seção longitudinal de um zoósporo com um flagelo posterior atrelado ao cinetossomo. Abreviações: ce, extensão citoplasmática; er/ER, retículo endoplasmático; G, complexo de Golgi; K, cinetossomo; L, glóbulo de lipídeo; M, mitocôndria; mb, microcorpo; nfc, centríolo não-flagelar; N, núcleo; P, suporte; Va, vacúolos; R, massa ribossomal; tp, placa terminal. Barra de escala: 1 µm.

Com relação ao ciclo de vida assexuado em cultura pura, o zoósporo, ao se encistar, perde o flagelo e desenvolve uma espessa parede, formando um talo, onde novos zoósporos são formados por mitose. O talo pode ser monocêntrico, quando é formado por um único zoosporângio, ou, mais raramente, colonial, com mais de um zoosporângio. Rizoides filiformes (em forma de fios) surgem a partir de uma ou mais regiões do zoosporângio. A liberação dos zoósporos ocorre por meio das papilas, que são projeções da parede do zoosporângio que se rompem quando a umidade está favorável. É possível que zoósporos não liberados se encistem dentro do esporângio (BERGER *et al.*, 2005). A Figura 6 resume esse ciclo.

Figura 6 - Ciclo de vida assexuado de *Batrachochytrium dendrobatidis*

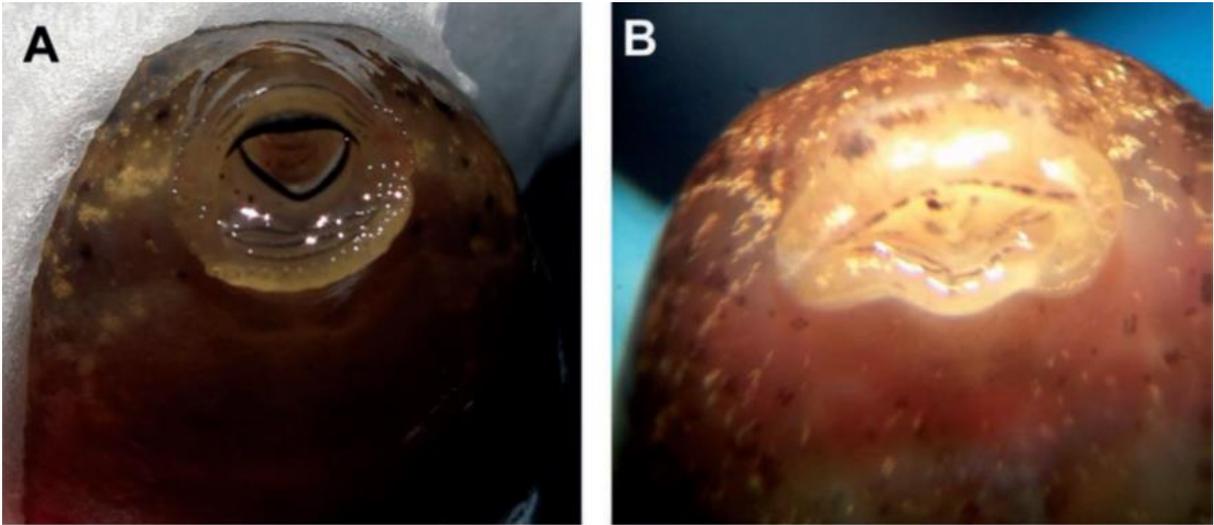


Fonte: Rosenblum *et al.* (2008). Esquema do ciclo de vida do *Bd*. A seta preta indica a papila, estrutura responsável pela liberação dos zoósporos no meio. As setas brancas indicam os rizoides filiformes. Barra de escala não disponível.

### 2.3 Sintomas da quitridiomicrose e patogênese

A colonização do *Bd* na pele dos anfíbios ocorre somente em regiões queratinizadas. Como esses locais variam de acordo com o estágio de desenvolvimento do animal, os sintomas da quitridiomicrose também mudam com o tempo. No caso dos girinos (Figura 7), o fungo não é letal, pois somente as peças bucais são queratinizadas, o que provoca apenas despigmentação dessa região (BERGER *et al.*, 1998). Efeitos comportamentais também podem ocorrer: letargia, baixo forrageamento e consequente redução do tamanho corporal (HANLON *et al.*, 2015). Além disso, é possível que metabólitos produzidos pelo *Bd* possam acelerar o desenvolvimento dos girinos (MCMAHON; LAGGAN; HILL, 2019).

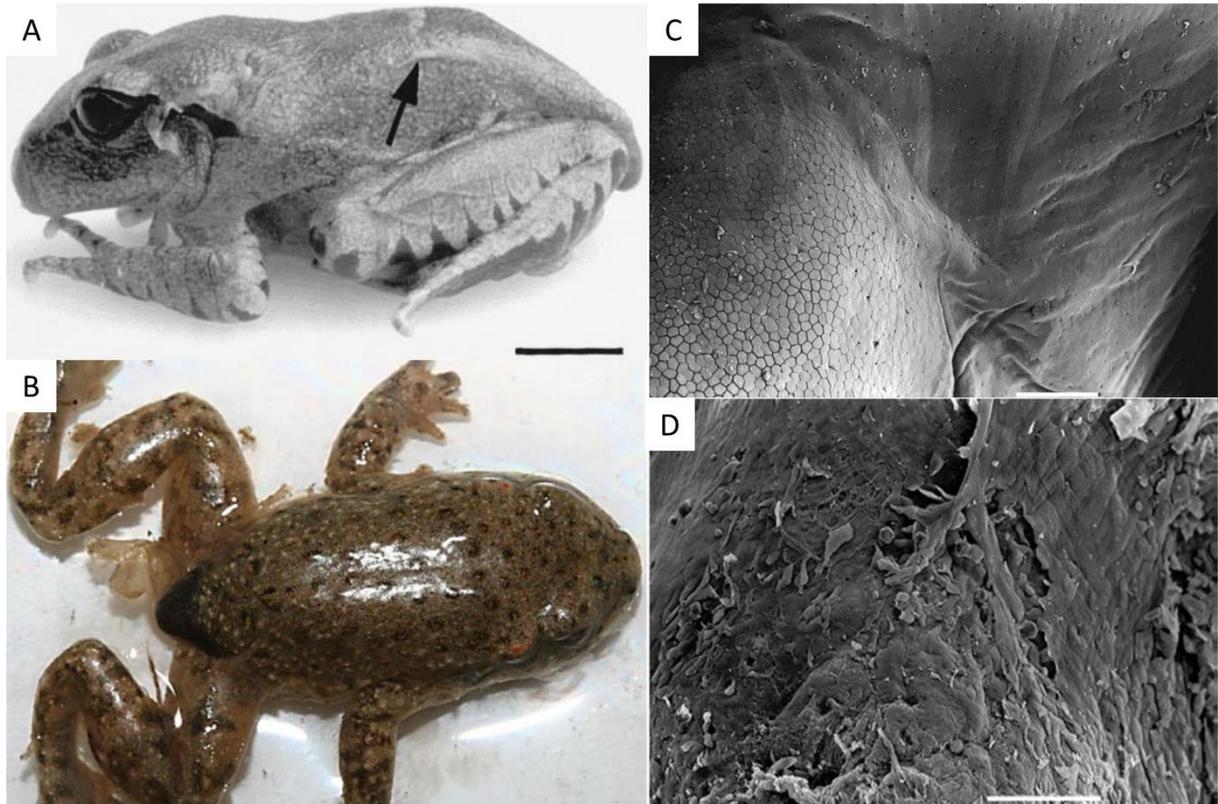
Figura 7 - Despigmentação do aparelho bucal de girinos infectados pelo *Batrachochytrium dendrobatidis*



Fonte: Lambertini *et al.* (2013). Em A, estrutura bucal não infectada do girino de *Lithobates catesbeianus*. Em B, estrutura bucal infectada do girino de *Hylodes sp.*. É possível notar o padrão descontínuo de despigmentação ocasionado pelo *Bd*.

Com relação aos adultos (Figura 8), há uma variedade de sintomas que normalmente são encontrados na região ventral e posterior. Os mais comuns são eritema e lesões corporais, como despigmentação, granulação e excessiva descamação da pele. Em casos mais raros, sangramentos e erosões nessa região também podem ocorrer. Sintomas comportamentais também são recorrentes e incluem anorexia, letargia, rigidez dos membros e postura anormal. Também é possível que haja mortes repentinas sem sinais de doença aparente (BERGER; SPEARE; HYATT, 1999; VAN ROOIJ *et al.*, 2015).

Figura 8 - Sintomas da quitridiomicrose em anfíbios adultos



Fonte: (A) Berger, Speare e Hyatt (1999); (B) Van Rooij *et al.* (2015); e (C e D) Berger *et al.* (2005). Em A, *Mixophyes fasciolatus* em estágio avançado da doença com descamação da pele indicada pela seta preta. Barra de escala: 0,5 cm. Em B, *Alytes obstetricans* infectado pelo *Bd*, sendo possível notar uma postura anormal (abdução dos membros posteriores) e uma excessiva descamação. Em C, eletromicrografia de varredura da pele saudável de *Litoria caerulea*. Barra de escala: 100  $\mu$ m. Em D, uma eletromicrografia de varredura da pele infectada de *Litoria lesueuri* na qual é possível notar a erosão da epiderme. Barra de escala: 100  $\mu$ m.

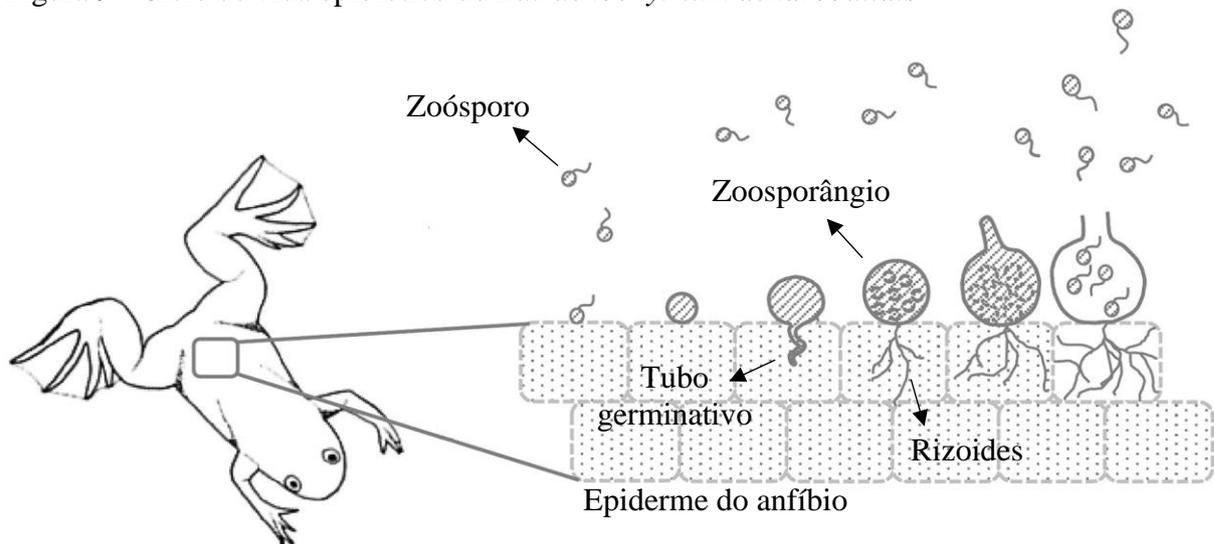
Organismos flagelados como o *Bd* são capazes de se deslocarem em direção a determinados estímulos químicos (quimiotaxia). Então, é possível que certos componentes da pele dos anfíbios funcionem como agentes quimiotáticos para o patógeno. De fato, este fenômeno foi observado para o muco que recobre a pele do anuro *Xenopus laevis*, que contém carboidratos simples capazes de atrair o fungo (VAN ROOIJ *et al.*, 2015). Esses achados são importantes para compreender os mecanismos de interação entre patógeno-hospedeiro. O muco tegumentar é a primeira camada protetora dos anfíbios contra o *Bd* e apresenta peptídeos antimicrobianos e metabólitos antifúngicos produzidos pela microbiota associada (DEMORI *et al.*, 2019; WOODHAMS *et al.*, 2014).

Para investigar o mecanismo de infecção do *Bd*, alguns trabalhos utilizaram tanto modelos em cultura de tecido quanto animais vivos (BERGER *et al.*, 2005; GREENSPAN; LONGCORE; CALHOUN, 2012; VAN ROOIJ *et al.*, 2012). Os processos observados são semelhantes ao que ocorre em cultura pura, mas com um maior nível de complexidade. A partir

desses três trabalhos, descobriu-se que o patógeno pode ter um ciclo de vida epibiótico ou endobiótico, que serão discutidos a seguir.

Em epibiose, o zoósporo se estabelece na superfície da pele do anfíbio e se encista (Figura 9). Nesse momento, o flagelo é perdido e há a formação de um tubo germinativo em direção à célula adjacente, adentrando-a. No momento, ainda não há muitas informações de como ocorre a adesão ao hospedeiro, mas sabe-se que o patógeno produz fungaliasinas, serino-proteases e proteínas de adesão celular (ROSENBLUM *et al.*, 2012). O cisto é fixado por meio de rizoides que crescem a partir do tubo germinativo. A célula infectada perde o citoplasma por mecanismos ainda não esclarecidos. Por fim, o esporângio amadurece e libera os zoósporos sem se tornar intracelular (VAN ROOIJ *et al.*, 2012).

Figura 9 - Ciclo de vida epibiótico do *Batrachochytrium dendrobatidis*

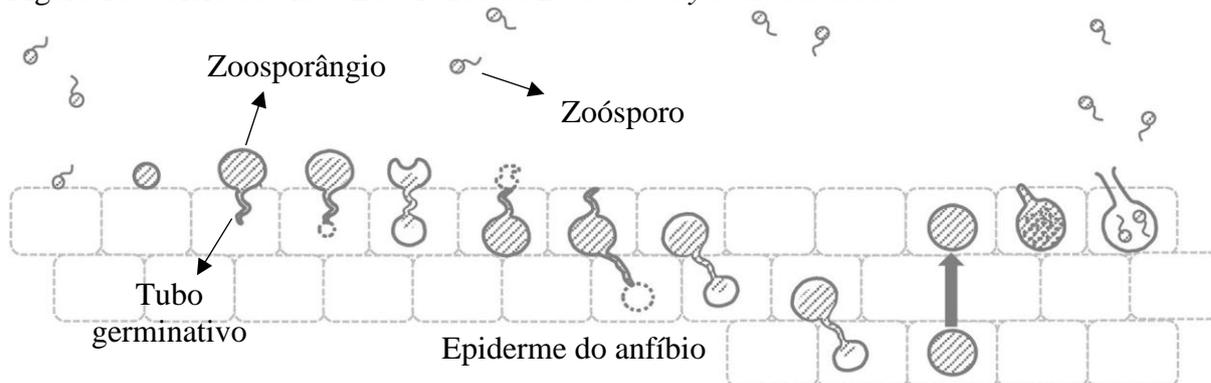


Fonte: Van Rooij *et al.* (2015). O ciclo de vida epibiótico só foi observado em explantes da pele de *Xenopus laevis* (VAN ROOIJ *et al.*, 2012). Basicamente, o zoósporo se encista e invade a célula epitelial do estrato córneo por meio de um tubo germinativo. A partir dessa estrutura, há a formação de uma rede de rizoides, que capta o citoplasma da célula do hospedeiro como nutriente. Dessa forma, o zoosporângio se desenvolve sobre a superfície cutânea e, quando maduro, libera os zoósporos.

O ciclo endobiótico é o mais comumente observado desde as primeiras análises histológicas da quitridiomiose (BERGER *et al.*, 1998). Como mostrado na Figura 10, a formação do cisto e do tubo germinativo é semelhante ao do ciclo epibiótico. No entanto, o tubo pode adentrar de uma a duas camadas epidérmicas e sofrer uma dilatação na extremidade que está dentro da célula do hospedeiro. O conteúdo citoplasmático do cisto é transferido para essa dilatação, onde se forma um zoosporângio imaturo intracelular. À medida que as células epidérmicas migram para as camadas mais externas e são queratinizadas, o esporângio também amadurece, demonstrando uma sincronia hospedeiro-parasita. A perda do citoplasma das

células infectadas também é visível ao redor do esporângio. Portanto, há uma polarização da infecção: o parasita mais imaturo se encontra em camadas mais internas, e a forma madura, na camada mais externa, onde libera os zoósporos (BERGER *et al.*, 2005; GREENSPAN; LONGCORE; CALHOUN, 2012; VAN ROOIJ *et al.*, 2012).

Figura 10 - Ciclo de vida endobiótico do *Batrachochytrium dendrobatidis*



Fonte: Van Rooij *et al.* (2015). O ciclo de vida endobiótico é o mais conhecido (BERGER *et al.*, 2005; GREENSPAN; LONGCORE; CALHOUN, 2012; VAN ROOIJ *et al.*, 2012). Resumidamente, ao se encistar, o patógeno forma um zoosporângio intracelular por meio de um tubo germinativo. É possível a migração para as camadas celulares mais internas mediante estruturas semelhantes à rizoides. Durante o processo de amadurecimento do fungo e de diferenciação celular do epitélio, o zoosporângio se desloca para as camadas mais externas juntamente com as células epiteliais. A liberação dos zoósporos ocorre nas células mais externas.

A fisiopatologia da quitridiomicose ainda é pouco explorada. Os poucos estudos existentes corroboram no fato de que animais infectados apresentam declínio na concentração de diversos eletrólitos, como sódio, potássio e cloro (MARCUM *et al.*, 2010; VOYLES *et al.*, 2007, 2009, 2012). O pH sanguíneo também parece ser afetado, mas as evidências ainda são escassas (VOYLES *et al.*, 2007, 2012). A pele dos anfíbios, além de conferir proteção, é responsável por importantes processos fisiológicos, como as trocas gasosas e os equilíbrios hídrico e eletrolítico. O excesso de descamação da pele e de toxinas produzidas pelo *Bd* podem estar relacionados com esses desequilíbrios observados, que podem ser a causa de paradas cardíacas e consequente morte dos animais (VOYLES *et al.*, 2009). Alterações das funções cardíacas também foram observadas tanto em animais tolerantes, auxiliando a mitigar a doença, como em animais sensíveis ao patógeno, debilitando a fisiologia cardíaca (SALLA *et al.*, 2018).

Além dos anfíbios, o *Bd* ou o DNA dele foi encontrado em outros grupos de seres vivos, como algas e pequenos artrópodes aquáticos (JOHNSON; SPEARE, 2003), patos (HANLON; HENSON; KERBY, 2017), gansos (GARMYN *et al.*, 2012), cobras e lagartos (KILBURN; IBÁÑEZ; GREEN, 2011), mosquitos (GOULD *et al.*, 2019), lagostins (BRANNELLY *et al.*, 2015; MCMAHON *et al.*, 2013), nematódeos (SHAPARD; MOSS; SAN FRANCISCO, 2012) e peixes-zebra (LIEW *et al.*, 2017). Sinais de patogenicidade foram

detectados nesses três últimos animais, inclusive com diminuição da taxa de sobrevivência. Entretanto, ainda não há evidências o suficiente para afirmar que esses organismos são reservatórios ou vetores do *Bd* na natureza.

#### **2.4 *Batrachochytrium dendrobatidis* no Brasil com foco no semiárido nordestino**

Os primeiros estudos sobre a distribuição do patógeno no Brasil mostraram a presença do fungo em 6 dos 96 espécimes (CARNAVAL *et al.*, 2006) e em 20 dos 41 girinos pesquisados (TOLEDO *et al.*, 2006). Entretanto, o uso de metodologias histológicas é propenso a falsos negativos (DAVIDSON *et al.*, 2003), e as amostragens se concentraram nas regiões Sul e Sudeste.

Oito anos depois, em um estudo mais amplo envolvendo técnicas moleculares, 2.799 anuros foram examinados (RODRIGUEZ *et al.*, 2014). A análise dos espécimes adultos coletados entre 1890 e 2010 em todos os sete estados do Sul e Sudeste mostrou que as linhagens *Bd*-Brazil e *Bd*-GPL já estavam no Brasil há mais de um século, sendo a amostra positiva mais antiga de 1894. Além disso, ambas as linhagens se mostraram espaço-temporalmente amplamente distribuídas, com prevalência relativamente constante e sem padrão de propagação. Por esses sinais de endemismo, o Brasil se tornou uma das possíveis origens do patógeno.

Essa hipótese foi contestada alguns anos depois com novas evidências e novos marcadores moleculares. De fato, a linhagem *Bd*-Brazil é endêmica por apresentar um equilíbrio genotípico por meio de raras recombinações genéticas e uma estruturação geográfica bem definida, sem um padrão de dispersão. Ao contrário, a linhagem *Bd*-GPL não apresenta uma estruturação geográfica, ou seja, populações geograficamente distantes são geneticamente mais semelhantes do que as mais próximas geograficamente, o que sugere uma recente introdução e um padrão de dispersão (JENKINSON *et al.*, 2016). Além disso, ao analisar mais de 30 mil girinos coletados entre 1930 e 2015 em todas as regiões brasileiras, foi demonstrado que houve um aumento da prevalência do fungo durante as décadas de 1970 e 1980, que coincide com o aumento de eventos de declínios populacionais registrados nesse mesmo período (CARVALHO; BECKER; TOLEDO, 2017). Até o momento, o *Bd* foi detectado em mais de 200 espécies no Brasil (artigo submetido).

O impacto e a distribuição do *Bd* no semiárido ainda são relativamente desconhecidos, pois a maioria dos estudos sobre a quitridiomicose no Brasil se concentra nas regiões Sul e Sudeste e/ou na Mata Atlântica. O primeiro estudo a descrever espécies de anuros

infectadas nessa região identificou duas espécies na Bahia e uma no Piauí (CARVALHO; BECKER; TOLEDO, 2017). Recentemente, foram identificadas mais cinco espécies na Bahia (AMORIM *et al.*, 2019). Estes autores ainda destacam a plasticidade do patógeno frente à adversidade climática: é capaz de infectar espécies de ambientes mais secos do semiárido, como *Rhinella rubescens*, até de ambientes mais amenos, como *Physalaemus albifrons* em regiões litorâneas. Além disso, foram adicionadas nessa lista mais duas espécies no Piauí (BENÍCIO *et al.*, 2019), totalizando 10 espécies com registro de infecção com o *Bd* no semiárido brasileiro. A prevalência do patógeno nesse último estudo foi de 25% embora não haja relatos de declínio populacional nessas espécies. Para justificar esse fato, os autores discutem o longo período para renovação epidérmica da família Bufonidea, mesmo que o processo seja acelerado em temperaturas mais elevadas. Dessa forma, quanto maior o tempo, maior a chance de o fungo concluir o ciclo de vida.

## 2.5 Ninhos de espuma

Os ninhos de espuma compreendem 10 dos 41 modos reprodutivos utilizados pelos anuros (GURURAJA, 2010; HADDAD; PRADO, 2005; ISKANDAR; EVANS; MCGUIRE, 2014), sendo Leptodactylidae a família com a maior diversidade de espécies com esses modos, como as dos gêneros *Leptodactylus*, *Adenomera* e *Physalaemus* (HADDAD; PRADO, 2005). Conforme a Tabela 1, os ninhos podem ser classificados em aquáticos ou terrestres/arbóreos, mas apresentam variações em relação à dependência da água entre esses dois extremos (HADDAD; PRADO, 2005).

Tabela 1 - Descrição dos modos reprodutivos envolvendo ninhos de espuma

Número do modo reprodutivo	Descrição	Tipo
11	Ninho de espuma flutuando sobre lagoas; girinos exotróficos em lagoas.	Aquático
12	Ninho de espuma flutuando sobre lagoas; girinos exotróficos em riachos.	Aquático
13	Ninho de espuma flutuando sobre a água acumulada em cavidades construídas; girinos exotróficos em lagoas.	Aquático
14	Ninho de espuma flutuando sobre a água acumulada em axilas de bromélias terrestres; girinos exotróficos em lagoas.	Aquático

28	Ninho de espuma sobre o chão úmido de floresta; após inundação, girinos exotróficos em lagoas.	Terrestre
29	Ninho de espuma com ovos e estágios larvais iniciais em cavidades; após inundação, girinos exotróficos em lagoas ou riachos.	Terrestre
30	Ninho de espuma com ovos e estágios larvais iniciais em ninhos construídos no subterrâneo; após inundação, girinos exotróficos em lagoas.	Terrestre
31	Ninho de espuma com ovos e estágios larvais iniciais em ninhos construídos no subterrâneo; após inundação, girinos exotróficos em riachos.	Terrestre
32	Ninho de espuma em câmaras subterrâneas construídas; girinos endotróficos completam o desenvolvimento dentro do ninho.	Terrestre
33	Ninho de espuma arbóreo; girinos recém-nascidos caem em lagoas ou riachos.	Arbóreo

Fonte: Haddad e Prado (2005).

Os ninhos de espuma (Figura 11) oferecem importantes funções para o desenvolvimento dos anuros, como fornecimento de oxigênio (SEYMOUR; LOVERIDGE, 1994); proteção contra raios ultravioletas (HISSA *et al.*, 2008), contra predadores e contra dessecação (DOBKIN; GETTINGER, 1985; HEYER, 1969); aumento da taxa de crescimento (PRADO *et al.*, 2005; TANAKA; NISHIHIRA, 1987) e de fertilização (ARZABE, 1999); e estabilidade térmica (MÉNDEZ-NARVÁEZ; FLECHAS; AMÉZQUITA, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2020).

Figura 11 – Ninhos de espumas de anuros com ocorrência no Nordeste brasileiro



Fonte: elaborado pelo autor. (A) Ninho de espuma de *Leptodactylus vastus* com modo reprodutivo 13. (B) Ninho de espuma de *Physalaemus cuvieri* com modo reprodutivo 11. (C) Ninho de espuma de *Adenomera hylaedactyla* com modo reprodutivo 32.

Sabe-se que essas estruturas são ricas em proteínas e em carboidratos (COOPER *et al.*, 2005; HISSA *et al.*, 2008). A composição proteica vem sendo desvendada, isolada e caracterizada desde o trabalho de Cooper *et al.* (2005) (Tabela 2), mostrando proteínas surfactantes, lectinas, cistatinas e metaloproteínas (FLEMING *et al.*, 2009; HISSA *et al.*, 2014; MCMAHON *et al.*, 2006; OKE *et al.*, 2008). Estudos mais robustos, com a utilização das técnicas de transcriptômica e proteômica, começaram a surgir nos últimos anos, indicando uma grande diversidade de proteínas envolvidas em diversas funções, principalmente sinalizadoras e imunológicas (HISSA *et al.*, 2016; SHAHRUDIN *et al.*, 2017; SHIGERI *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2019). Entretanto, pouco se sabe sobre os carboidratos que constituem essas bioespumas.

Tabela 2 - Proteínas isoladas e caracterizadas de ninhos de espuma de rãs

Proteína	Espécie de rã	Classificação	Massa molecular (kDa)	Publicação
Ranasmurfina (PI-RSF-1)	<i>Polypedates leucomystax</i>	Desconhecida	2 x 13	Oke <i>et al.</i> (2008)
Ep-RSN-1	<i>Engystomops pustulosus</i>	Cistatina	14,2	Fleming <i>et al.</i> (2009)
Ep-RSN-2	<i>E. pustulosus</i>	Surfactante	11,0	Fleming <i>et al.</i> (2009)
Ep-RSN-3	<i>E. pustulosus</i>	Lectina	18,9	Fleming <i>et al.</i> (2009)
Ep-RSN-4	<i>E. pustulosus</i>	Lectina	21,3	Fleming <i>et al.</i> (2009)
Ep-RSN-5	<i>E. pustulosus</i>	Lectina	18,8	Fleming <i>et al.</i> (2009)
Ep-RSN-6	<i>E. pustulosus</i>	Lectina tipo-C	27,2	Fleming <i>et al.</i> (2009)
Lv-RSN-1	<i>Leptodactylus vastus</i>	Surfactante	23,5	Hissa <i>et al.</i> (2014)

Fonte: elaborado pelo autor.

Apesar de já haver uma maior compreensão do universo dos ninhos de espuma de anuros entre os cientistas, a função ecológica desempenhada por essas estruturas na relação hospedeiro-parasita da quitridiomiose ainda é desconhecida. Entretanto, acredita-se que a presença dessas lectinas, cistatinas e imunoproteínas estejam relacionadas a potenciais estratégias de combate a patógenos (COOPER *et al.*, 2005; FLEMING *et al.*, 2009).

Além de todas as funções mencionadas, os ninhos de espuma, assim como qualquer outro ninho do reino animal, intermedeiam o primeiro contato da prole com o ambiente. Nesse sentido, os ninhos apresentam condições particulares que selecionam a primeira fonte de microrganismos dos filhotes (CAMPOS-CERDA; BOHANNAN, 2020). Parte dessa microbiota colonizará a pele dos anfíbios e pode desempenhar um papel importante contra patógenos, incluindo o *Bd*.

## 2.6 Microbiota e moléculas antifúngicas contra o *Bd*

O mucossoma é um conjunto de moléculas do hospedeiro (anticorpos, peptídeos antimicrobianos, lisozima e alcaloides) e de fatores microbiológicos (microbiota e metabólicos

associados) encontrados no muco. No caso dos anfíbios, o mucossoma recobre a pele e pode agir como um protetor contra patógenos e predadores (WOODHAMS *et al.*, 2014).

A pele dos anfíbios sintetiza uma ampla variedade de peptídeos com diversas funções, como analgésica, imunológica e antioxidante. Dentre os mais de 2000 tipos de peptídeos conhecidos, aproximadamente 1900 apresentam função antimicrobiana e são essenciais na defesa inata dos anfíbios (XU; LAI, 2015). Os mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos (AMPs) são diversos e incluem a ruptura da membrana plasmática e interferência no metabolismo microbiano (LEE; N. HALL; AGUILAR, 2015; YEAMAN; YOUNT, 2003). No caso do *Bd*, discute-se que a ausência de uma parede celular na fase de zoósporo pode facilitar a ação dos AMPs por ruptura celular (ROLLINS-SMITH *et al.*, 2002). Entretanto, esse fungo é capaz de expressar genes das famílias peptidase M36 (fungalisina) e peptidase S41 (serino-peptidase), que podem ter um papel importante na degradação da queratina cutânea e dos AMPs (ROSENBLUM *et al.*, 2008, 2012).

Apesar da potência desses peptídeos *in vitro*, pouco se sabe acerca do real papel deles na complexa interação hospedeiro-parasita. Por exemplo, o anuro *Rana muscosa* produz peptídeos eficientes contra o *Bd*, mas é uma das espécies vulneráveis ao fungo, estando em declínio (ROLLINS-SMITH *et al.*, 2006). Em outro estudo, a diferença de susceptibilidade entre duas espécies de anuros foi explicada por diferenças na composição de sua comunidade bacteriana da pele, e não pelos peptídeos (BURKART *et al.*, 2017).

O papel da microbiota da pele de anfíbios está sendo melhor compreendido com o surgimento de sequenciadores de nucleotídeos mais robustos. Sabe-se que além de ser espécie-específica, a diversidade bacteriana da pele dos anfíbios também é explicada, secundariamente, por fatores ambientais (KUENEMAN *et al.*, 2014). Além disso, tem-se tornado claro que o processo de metamorfose dos anfíbios gera uma reestruturação da comunidade microbiana da pele (BATES *et al.*, 2018; KUENEMAN *et al.*, 2014) e que distúrbios nesse processo provocam uma maior susceptibilidade a patógenos na fase adulta (KNUTIE *et al.*, 2017).

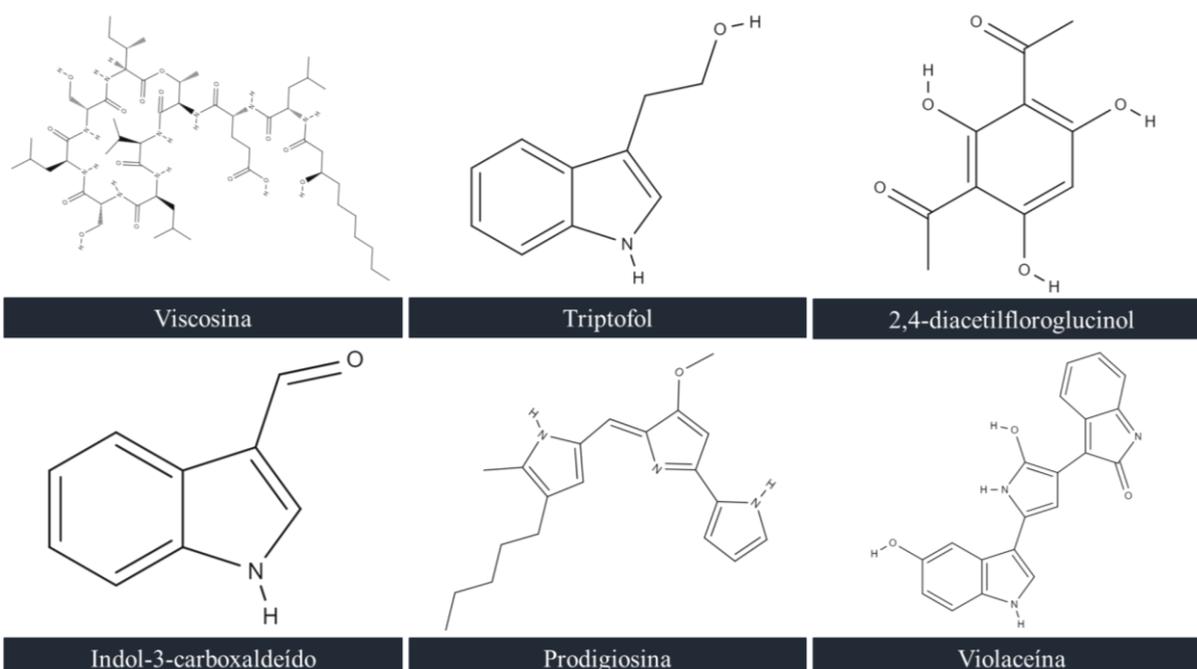
Desde a descoberta da quitridiomiose, milhares de bactérias isoladas da pele de anfíbios foram testadas quanto à atividade anti-*Bd*. Como resultado, mais de 50% deles apresentou algum grau de inibição do fungo (WOODHAMS *et al.*, 2015). No entanto, somente seis compostos bacterianos estão, até agora, associados a essa atividade, como resume a Tabela 3 e ilustra a Figura 12.

Tabela 3 - Metabólitos bacterianos com atividade anti-*Bd* reconhecida

Metabólito	Bactérias isoladas da pele de anfíbios	Espécie do anfíbio	Referência
2,4-diacetilfloroglucinol	<i>Lysobacter gummosus</i>	<i>Plethodon cinereus</i>	Brucker <i>et al.</i> (2008a)
Indol-3-carboxaldeído	<i>Janthinobacterium lividum</i>	<i>Plethodon cinereus</i>	Brucker <i>et al.</i> (2008b)
Violaceína	<i>Janthinobacterium lividum</i>	<i>Plethodon cinereus</i>	Brucker <i>et al.</i> (2008b)
Triptofol	<i>Bacillus</i> sp. e <i>Chitinophaga arvensicola</i> (co-cultivo)	<i>Plethodon cinereus</i>	Loudon <i>et al.</i> (2014)
Prodigosina	<i>Serratia marcescens</i> <i>Serratia plymuthica</i>	<i>Alytes obstetricans</i> <i>Mantella aurantiaca</i> <i>Atelopus zeteki</i>	Woodhams <i>et al.</i> (2018)
Viscosina	<i>Pseudomonas cichorii</i>	<i>Craugastor crassidigitus</i>	Martin H. <i>et al.</i> (2019)

Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 12 - Estrutura bidimensional dos metabólitos bacterianos conhecidos por apresentarem atividade anti-*Bd*



Fonte: (MOLVIEW, 2021).

Com base no potencial anti-*Bd* dessas moléculas, ensaios *in vivo* de bioaugmentação foram conduzidos. Após banhos dos anfíbios com os microrganismos inoculantes, os resultados mostraram que os grupos tratados com a bactéria *Janthinobacterium lividum* aumentaram a sobrevivência do anuro *Rana muscosa* e da salamandra *Plethodon cinereus* quando infectados com o fungo (BECKER *et al.*, 2009; HARRIS *et al.*, 2009b). Além disso, os isolados *J. lividum* e *Serratia plymuthica* de outros anuros produziram compostos orgânicos voláteis capazes de inibir o crescimento do fungo (WOODHAMS *et al.*, 2018).

Outra possibilidade para o uso da bactéria *J. lividum* é a técnica de bioaugmentação em solos (MULETZ *et al.*, 2012). Nesse trabalho, o microrganismo foi inoculado em solo sob condições naturais simuladas em laboratório. Posteriormente, um grupo de salamandras *Plethodon cinereus* foi exposto a esse solo e, depois de sete dias, ao patógeno. A bactéria foi capaz de colonizar o solo e, a partir dele, foi transmitida para a salamandra. Esse experimento mostrou uma diminuição do número de organismos infectados com o *Bd* de 83% em salamandras sem tratamento para 40% em salamandras tratadas com o inoculante. Os autores ainda discutem que o amplo e aceitável uso da bioaugmentação na agricultura encoraja a aplicação dessa técnica contra a quitridiomiose.

Um dos aspectos importantes do estudo do mucossoma é compreender como a interação entre AMPs e a microbiota pode contribuir para reduzir o efeito da quitridiomiose. Nesse sentido, foi demonstrado o efeito sinérgico entre os AMPs do anuro *Rana muscosa* e o composto 2,4-diacetilfloroglucinol da bactéria *Pseudomonas fluorescens* (MYERS *et al.*, 2012). Os autores discutem o benefício mútuo dessa interação. O anfíbio necessitaria de uma concentração menor de AMP para inibir o crescimento do *Bd*, o que diminui os custos energéticos para produzi-lo. Ao mesmo tempo, esse peptídeo tornaria a pele um ambiente mais seletivo, resultando em uma menor competição entre a bactéria e os outros microrganismos.

Ao avaliar o efeito probiótico de um consórcio de quatro bactérias (*Pseudomonas fluorescens*, *Pedobacter cryoconitis*, *Chryseobacterium* sp. e *Iodobacter* sp.) na defesa contra o *Bd*, um novo AMP foi descoberto (WOODHAMS *et al.*, 2020). Este peptídeo foi *downregulated* pelo consórcio e foi capaz de inibir o crescimento das duas espécies de *Batrachochytrium in vitro*. Além disso, o peptídeo estimulou o crescimento de algumas bactérias conhecidas pela ação anti-*Bd*. Embora tenha identificado a ineficácia do consórcio, esse estudo demonstra a complexidade de estabelecer uma metodologia ampla e eficaz contra o fungo.

Além disso, ainda é possível utilizar as interações interespecíficas dos simbiosomas do mucossoma como estratégia contra o *Bd*. O co-cultivo entre as bactérias *Bacillus* sp. e

*Chitinophaga arvensicola*, isoladas da pele da salamandra *Plethodon cinereus*, permitiu a síntese de sete compostos com ação anti-*Bd* que estavam ausentes quando os isolados cresceram separadamente. Entre eles, o triptofol foi mais eficiente contra o fungo (LOUDON *et al.*, 2014). Entretanto, o crescimento conjunto dos isolados *Pseudomonas* sp. e *Janthinobacterium* sp. facilitou sinergicamente o crescimento do *Bd*. O perfil cromatográfico mostrou a ausência de três compostos de *Janthinobacterium* sp. no co-cultivo e que estavam presentes em monocultivo (LOUDON *et al.*, 2014). Esses fatos reforçam ainda mais a importância de estudos que levem em consideração diversas variáveis do mucossoma e do ambiente, como a interação entre simbiontes, probióticos (e entre eles), AMPs, respostas imunológicas, dinâmica da doença, solo e água.

A alta complexidade da relação hospedeiro-parasita no caso da quitridiomiose tem sido desvendada desde 1998, o que permitiu a identificação de moléculas contra o *Bd* e de possíveis estratégias para mitigar a quitridiomiose dos anfíbios. Entretanto, 23 anos depois da descoberta da doença, o papel dos ninhos de espuma de anuros ainda permanece desconhecido. Objetiva-se, portanto, compreender essa função a fim de se estabelecer possíveis estratégias para conter a quitridiomiose.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Identificar o efeito das macromoléculas e da microbiota dos ninhos de espuma de *Leptodactylus vastus*, *L. macrosternum*, *L. podicipinus*, *Physalaemus cuvieri*, *P. albifrons* e *Adenomera hylaedactyla* sobre o crescimento do fungo panzoótico *Batrachochytrium dendrobatidis*. Além disso, objetiva-se indicar uma estirpe bacteriana capaz de inibir o fungo e de atuar como um inoculante para a contenção da quitridiomiose.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Acessar o perfil proteico dos ninhos de espuma de *Leptodactylus vastus*, *L. macrosternum*, *L. podicipinus*, *Physalaemus cuvieri*, *P. albifrons* e *Adenomera hylaedactyla*;
- Verificar a presença de moléculas surfactantes nos ninhos de espuma de *L. macrosternum*, *L. podicipinus*, *Physalaemus cuvieri*, *P. albifrons* e *Adenomera hylaedactyla*;
- Avaliar o potencial antifúngico dos ninhos de espuma estéreis das espécies de *L. vastus*, *L. macrosternum*, *L. podicipinus*, *P. cuvieri*, *P. albifrons* e *Adenomera hylaedactyla*;
- Identificar o potencial anti-*Bd* da microbiota associada aos ninhos de espuma de *P. cuvieri* e *A. hylaedactyla*;
- Apontar um inoculante capaz de reduzir o crescimento do *Bd* no ninho de *L. vastus*.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Coleta de material biológico

Os ninhos de espuma dos anuros *Leptodactylus vastus*, *L. macrosternum*, *L. podicipinus*, *Physalaemus cuvieri*, *P. albifrons* e *Adenomera hylaedactyla* foram coletados de janeiro a abril entre 2016 e 2019 nos estados do Amazonas e do Ceará (Tabela 4). Os ninhos foram depositados em tubos Falcons de 50 mL ou em sacos plásticos, retirando-se galhos, folhas e outras partículas maiores. As luvas utilizadas na manipulação das amostras foram previamente higienizadas com álcool 70% a cada ninho coletado. As amostras foram transportadas ao laboratório em temperatura ambiente e, em seguida, congeladas a -20 °C para ensaios posteriores. As coletas foram realizadas de acordo com a legislação brasileira sob autorização do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (SISBio #58036-2) e do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (SisGen #AD025FF).

Tabela 4 - Localização das coletas de ninhos de espuma utilizados neste estudo com as respectivas espécies produtoras

Ninho de espuma (espécie)	Local de coleta (Cidade, Estado)
<i>Leptodactylus vastus</i>	Fortaleza/Pacatuba, Ceará
<i>Leptodactylus macrosternum</i>	Fortaleza, Ceará
<i>Physalaemus cuvieri</i>	Pacatuba, Ceará
<i>Physalaemus albifrons</i>	Aquiraz, Ceará
<i>Leptodactylus podicipinus</i>	Manaus, Amazonas
<i>Adenomera hylaedactyla</i>	São Gonçalo do Amarante, Ceará

Fonte: elaborado pelo autor.

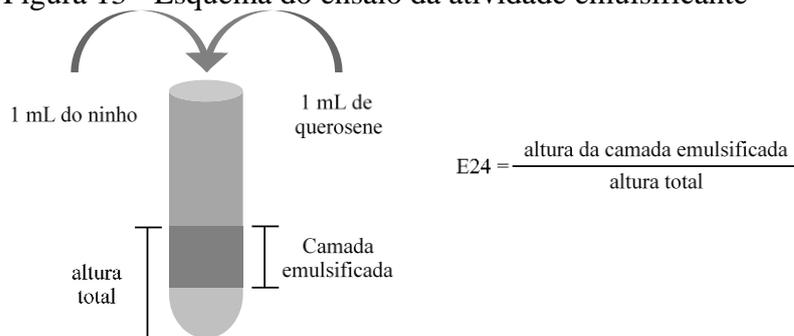
### 4.2 Processamento e caracterização bioquímica das amostras de ninhos de espuma

Os ninhos de espuma foram descongelados a 4 °C e ficaram sob essas condições até voltarem ao estado líquido. Eles foram esterilizados em filtros de seringa de 0,45 µm (PES - KASVI). O teor de proteína total foi determinado de acordo com Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina como padrão. A concentração de carboidratos foi determinada pelo método ácido sulfúrico-UV (ALBALASMEH; BERHE; GHEZZEHEI, 2013), sendo a glicose o padrão.

O perfil proteico dos ninhos de espuma foi revelado por SDS-PAGE-Tricina com o gel separador de 16,5% T, 3% C acrilamida/bis-acrilamida (SCHÄGGER; VON JAGOW, 1987). Foram aplicados 40 µg de proteína total dos ninhos de *Leptodactylus vastus*, *L. macrosternum* e *Physalaemus albifrons*; 10 µg do ninho de *P. cuvieri*; e 5 µg do ninho de *Adenomera hylaedactyla*. O marcador molecular apresenta proteínas de 10 a 225 kDa (Broad Range Protein Marker, Promega). Após a corrida, o gel foi fixado em uma solução aquosa contendo 50% de etanol e 10% de ácido acético por uma hora e, posteriormente, foi lavado duas vezes por 10 minutos com água destilada. A revelação do gel se deu pelo método Colloidal Coomassie Brilliant Blue G-250 (NEUHOFF *et al.*, 1988). Para retirar o excesso de corante, foi utilizado uma solução aquosa de ácido acético 1%

Para verificar a presença de moléculas surfactantes nos ninhos de espuma, foi utilizada a atividade emulsificante descrita por Iqbal, Khalid e Malik (1995). Misturou-se 1 mL do ninho com 1 mL de querosene em um tubo de ensaio. A mistura foi homogeneizada por meio de um *vortex* durante dois minutos. Os tubos de ensaio ficaram em repouso por 24 horas em temperatura ambiente. Ao término desse período, foi calculado o índice E24, que é a razão entre altura da camada emulsificada e a altura da camada total, dado em porcentagem. O ensaio foi realizado em triplicata, tendo a água destilada como controle negativo. Esquema demonstrado na Figura 13.

Figura 13 - Esquema do ensaio da atividade emulsificante



Fonte: elaborado pelo autor.

### 4.3 Cultiváveis bacterianos dos ninhos de espuma

As estirpes de bactérias dos ninhos de espumas de anuros utilizadas neste estudo fazem parte da bacterioteca do Laboratório de Recursos Genéticos (LaRGen) da Universidade Federal do Ceará. Essas bactérias foram obtidas de ninhos coletados em março de 2018 no município de São Gonçalo do Amarante e em janeiro de 2019 no município de Pacatuba, ambos

no estado do Ceará. O isolamento e a identificação pelo sequenciamento do gene do rRNA 16S foram realizados por Castro (2019) e Martins (2020). As 45 estirpes testadas contra o fungo *Bd* foram isoladas dos ninhos de *P. cuvieri* (33 estirpes) e dos ninhos de *A. hylaedactyla* (12 estirpes). A Tabela 5 sumariza as características taxonômicas dessas estirpes.

Tabela 5 - Estirpes de bactérias isoladas de ninhos de espuma de anuros que foram testadas contra o fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* neste estudo

<b>Ninho de espuma (espécie)</b>	<b>Estirpe</b>	<b>Gênero</b>	<b>Filo</b>
<i>Physalaemus cuvieri</i>	P1	<i>Rheinheimera</i>	Proteobacteria
	P10	<i>Rheinheimera</i>	Proteobacteria
	P2	<i>Serratia</i>	Proteobacteria
	P5	<i>Vogesella</i>	Proteobacteria
	P40	<i>Vogesella</i>	Proteobacteria
	P6	<i>Aeromonas</i>	Proteobacteria
	P12	<i>Shewanella</i>	Proteobacteria
	P14	<i>Comamonas</i>	Proteobacteria
	P76	<i>Comamonas</i>	Proteobacteria
	P23	<i>Pseudomonas</i>	Proteobacteria
	P24	<i>Pseudomonas</i>	Proteobacteria
	P25	<i>Pseudomonas</i>	Proteobacteria
	P31	<i>Pseudomonas</i>	Proteobacteria
	P32	<i>Pseudomonas</i>	Proteobacteria
	P35	<i>Pseudomonas</i>	Proteobacteria
	P36	<i>Pseudomonas</i>	Proteobacteria
	P42	<i>Pseudomonas</i>	Proteobacteria
	P46	<i>Pseudomonas</i>	Proteobacteria
	P49	<i>Pseudomonas</i>	Proteobacteria
	P54	<i>Pseudomonas</i>	Proteobacteria
	P63	<i>Pseudomonas</i>	Proteobacteria
	P48	<i>Enterobacter</i>	Proteobacteria
	P75	<i>Acinetobacter</i>	Proteobacteria
	P77	N/D	Proteobacteria
	P3	<i>Chryseobacterium</i>	Bacteroidetes
	P18	<i>Chryseobacterium</i>	Bacteroidetes

	P20	<i>Empedobacter</i>	Bacteroidetes
	P27	<i>Flavobacterium</i>	Bacteroidetes
	P37	<i>Sphingobacterium</i>	Bacteroidetes
	P4	<i>Bacillus</i>	Firmicutes
	P57	<i>Bacillus</i>	Firmicutes
	P8	<i>Kurthia</i>	Firmicutes
	P13	N/D	N/D
<i>Adenomera hylaedactyla</i>	B1	<i>Enterobacter</i>	Proteobacteria
	B9	<i>Enterobacter</i>	Proteobacteria
	B10	<i>Enterobacter</i>	Proteobacteria
	B11	<i>Enterobacter</i>	Proteobacteria
	B12	<i>Enterobacter</i>	Proteobacteria
	C1	<i>Enterobacter</i>	Proteobacteria
	C2	<i>Enterobacter</i>	Proteobacteria
	C3	<i>Enterobacter</i>	Proteobacteria
	A2	<i>Stenotrophomonas</i>	Proteobacteria
	A7	<i>Serratia</i>	Proteobacteria
	A1	<i>Chryseobacterium</i>	Bacteroidetes
	B2	<i>Lysinibacillus</i>	Firmicutes

Fonte: elaborado pelo autor com base nas identificações realizadas por Castro (2019) e Martins (2020). N/D: não identificado.

#### 4.4 Co-cultivo entre as estirpes bacterianas e o fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*

O isolado CLFT131 da linhagem panzoótica global (GPL) do *Bd* foi adquirido a partir do Laboratório de Quitridiomicose da Unicamp e foi utilizado em todos os experimentos envolvendo esse fungo.

As estirpes bacterianas apresentadas na Tabela 5 foram inoculadas em caldo T1% (1g de triptona em 100 mL de água) e incubadas *overnight* a 35 °C sob agitação de 150 rpm. Após o crescimento, a densidade óptica das culturas foi ajustada para uma unidade de absorvância a 600 nm. Uma alíquota de 2 mL de uma cultura foi misturada com 2 mL de uma suspensão de  $2 \times 10^6$  zoósporos/mL do *Bd* em caldo T1%. Os co-cultivos foram, então, incubados a 21 °C por 72 h sob agitação de 150 rpm. Decorrido o tempo, as co-culturas foram centrifugadas a 7.500 g por 20 minutos, e os sobrenadantes foram filtrados em filtros de seringa

de 0,22  $\mu\text{m}$  (PVDF - GE Whatman). Alíquotas dos sobrenadantes livres de células (SLC) foram congeladas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até a análise contra o fungo *Bd*.

#### **4.5 Análise da ação dos ninhos de espuma de anuros e dos sobrenadantes dos co-cultivos sobre o crescimento do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis***

Os ensaios para avaliar o efeito dos ninhos liquefeitos e dos metabólitos presentes no sobrenadante das co-culturas sobre o crescimento do *Bd* foram realizados de acordo com Bell *et al.* (2013), Bletz *et al.* (2017) e Rebollar *et al.* (2019).

O *Bd* foi repicado em ágar triptona 1% a partir de um estoque e incubado por três dias a  $21\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Após esse período, com o auxílio de uma alça estéril, algumas colônias foram coletadas e inoculadas em 15 mL de caldo triptona 1% (para realizar o ensaio com o sobrenadante) ou em 15 mL de caldo triptona 2% (para realizar o ensaio com ninho de espuma liquefeito). As culturas de *Bd* descansaram por 20 minutos para total liberação dos zoósporos. Uma alíquota de 500  $\mu\text{L}$  da suspensão de zoósporos foi misturada em *vortex* com 500  $\mu\text{L}$  de glicerol 100% para contagem de zoósporos em câmara de Neubauer. Uma média da contagem em 5 quadrantes de 0,04  $\text{mm}^2$  foi obtida. A suspensão de zoósporos foi diluída para aproximadamente  $2 \times 10^6$  zoósporos/mL.

Para o ensaio com o sobrenadante das co-culturas, como mostra Tabela 6, 50  $\mu\text{L}$  da suspensão de zoósporos em T1% foram adicionados a 50  $\mu\text{L}$  do sobrenadante do co-cultivo em uma placa de 96 poços de fundo chato (KASVI), utilizando três poços para o sobrenadante oriundo de cada cocultivo. Com relação aos controles: 50  $\mu\text{L}$  de T1% foram adicionados a 50  $\mu\text{L}$  da suspensão de zoósporos (controle positivo); 50  $\mu\text{L}$  de água destilada estéril foram misturados a 50  $\mu\text{L}$  da suspensão de zoósporos (controle pobre em nutrientes); 50  $\mu\text{L}$  de T1% foram acrescentados a 50  $\mu\text{L}$  da suspensão de zoósporos mortos por aquecimento por 1h a  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  (controle negativo); e 100  $\mu\text{L}$  de T1% (controle do meio). Os controles foram realizados em quintuplicata. O uso do controle pobre em nutrientes tem por objetivo simular o consumo da T1% durante o co-cultivo.

Tabela 6 - Estruturação do ensaio para avaliar o efeito do sobrenadante dos co-cultivos sobre o crescimento do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*

<b>Condições</b>	<b>Sobrenadante do co-cultivo</b>	<b>Suspensão de zoósporos</b>	<b>Água destilada estéril</b>	<b>T1%</b>
Sobrenadante + <i>Bd</i>	50 µL	50 µL	–	-
<b>Controle</b>	<b>Sobrenadante do co-cultivo</b>	<b>Suspensão de zoósporos</b>	<b>Água destilada estéril</b>	<b>T1%</b>
Controle positivo	–	50 µL	–	50 µL
Controle pobre em nutrientes	–	50 µL	50 µL	–
Controle negativo	–	50 µL (mortos por calor)	–	50 µL
Meio	–	–	–	100 µL

Fonte: elaborado pelo autor. A suspensão de zoósporos foi realizada em água triptonada 1% (T1%).

Para quantificar o índice de inibição do sobrenadante dos co-cultivos com relação ao crescimento do *Bd*, Rebollar *et al.* (2019) propuseram usar a inclinação de uma curva de regressão das leituras de absorbância ao longo do tempo. Nesse sentido, divide-se a inclinação das médias das absorbâncias de cada sobrenadante pela inclinação das médias das absorbâncias do controle pobre em nutrientes. O resultado se refere à proporção de crescimento, que é subtraído de 1 para se obter o índice de inibição. Esse valor pode indicar: facilitação (índice < -0,25), sem efeito ( $-0,25 \leq \text{índice} < 0,25$ ) e inibição (índice  $\geq 0,25$ ) do crescimento do fungo.

No ensaio com o fluido dos ninhos de espuma em uma placa de 96 poços de fundo chato (Tabela 7), 50 µL da suspensão de zoósporos em T2% foram adicionados a 50 µL de ninho bruto e das diluições 1:2, 1:4 e 1:8, utilizando três poços para cada diluição de cada ninho. Com relação aos controles realizados em quintuplicata: 50 µL de água destilada estéril foram adicionados a 50 µL da suspensão de zoósporos (controle positivo); 50 µL de água destilada estéril foram acrescentados a 50 µL da suspensão de zoósporos mortos por aquecimento por 1h a 80 °C (controle negativo); e 50 µL de água destilada estéril foram misturados a 50 µL de T2%. As diluições finais dos ninhos foram de 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16 em triptonona 1%.

Tabela 7 - Estruturação do ensaio para avaliar o efeito do fluido dos ninhos de espuma sobre o crescimento do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*

Condições	Fluido dos ninhos de espuma	Suspensão de zoósporos	Água destilada estéril	T2%
Fluido dos ninhos de espuma + <i>Bd</i>	50 µL	50 µL	–	-
Controle	Fluido dos ninhos de espuma	Suspensão de zoósporos	Água destilada estéril	T2%
Controle positivo	–	50 µL	50 µL	–
Controle negativo	–	50 µL (mortos por calor)	50 µL	–
Meio	–	–	50 µL	50 µL

Fonte: elaborado pelo autor. A suspensão de zoósporos foi feita em água triptonada 2% (T2%).

Uma segunda placa com o fluido dos ninhos foi preparada nas mesmas condições da primeira, exceto pela substituição da suspensão de zoósporos por apenas 50 µL de T2%. Os controles permaneceram os mesmos. Essa escolha é justificada pelo fato de alguns fluidos das bioespumas mudarem de cor ao longo do tempo. Para a correção, a média das absorvâncias do controle T1% de cada dia de leitura foi descontada dos valores de absorvância dos ninhos do respectivo dia. O resultado foi descontado dos valores correspondentes do ensaio na primeira placa.

As placas foram vedadas com filme respirável e incubadas a 21 °C durante 10 dias. As leituras de absorvância em 492 nm foram realizadas nos dias 0, 3, 7 e 10 em um espectrofotômetro de microplaca Epoch (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA). Para cada leitura, o filme selador respirável foi substituído por uma tampa transparente de microplaca e, após a leitura, outro filme respirável foi utilizado.

#### 4.6 Avaliação da estirpe *Pseudomonas* sp. P54 para o controle do *Bd* no ninho de espuma de *Leptodactylus vastus*

A capacidade da estirpe P54 em inibir o *Bd* foi testada no fluido do ninho de espuma de *L. vastus* com a microbiota residente. Após mensuração do pH do ninho, o meio do ensaio foi ajustado para 6,0 com ácido fosfórico 7,3 M a fim de manter o pH do ninho utilizado no ensaio.

Para o preparo da suspensão de zoósporos, o *Bd* foi repicado em ágar T1% e incubado por três dias a 21 °C. Com o auxílio de uma alça estéril, algumas colônias foram

coletadas e inoculadas em 15 mL de caldo T2%, e o número de células foi mensurado em câmara de Neubauer. O número de zoósporos foi ajustado para  $3 \times 10^6$  zoósporos/mL.

A bactéria P54 foi incubada *overnight* em T1% a 35 °C sob agitação de 150 rpm. Em seguida, as células foram centrifugadas a 8000 g por 10 minutos e lavadas duas vezes com salina 0,15 M sob centrifugação. A cultura foi ressuspensa em T2% e a densidade ótica ajustada para 1,5 em 600 nm.

Em uma placa de 96 poços de fundo chato (KASVI), foram testadas duas condições e os controles, como mostra a Tabela 8. Na primeira condição, 20 µL da cultura P54 e 30 µL da suspensão de zoósporos foram adicionados a 50 µL do fluido do ninho de *L. vastus*. Na segunda, foram misturados 20 µL de T2% mais 30 µL da suspensão de zoósporos e, em seguida, foram adicionados 50 µL do fluido do ninho. Com relação aos controles: 20 µL de T2% e 30 µL da suspensão de zoósporos foram misturados com 50 µL de água destilada estéril; 20 µL da P54 e 30 µL de T2% foram adicionados a 50 µL de água destilada estéril; e 50 µL de T2% foram acrescentados a 50 µL de água destilada estéril.

Tabela 8 - Condições experimentais e controles para avaliar a ação da estirpe *Pseudomonas* sp. P54 sobre o crescimento do fungo *Batrachomyces dendrobatidis* (Bd) no ninho de espuma liquefeito (N) de *Leptodactylus vastus*

Condições	P54	Suspensão de zoósporos	Ninho <i>L. vastus</i>	Água destilada estéril	T2%
N+Bd+P54	20 µL	30 µL	50 µL	–	-
N+Bd	–	30 µL	50 µL	–	20 µL
Controle	P54	Suspensão de zoósporos	Ninho <i>L. vastus</i>	Água destilada estéril	T2%
Controle positivo – Bd	–	30 µL	–	50 µL	20 µL
Controle positivo – P54	20 µL	–	–	50 µL	30 µL
Meio	–	–	–	50 µL	50 µL

Fonte: elaborado pelo autor. As culturas do fungo *Bd* e da bactéria P54 estavam em água triptonada 2%.

A placa foi vedada com filme selador respirável e incubada a 21 °C durante 10 dias. As leituras de absorvância em 492 nm foram realizadas nos dias 0, 3, 7 e 10 em um espectrofotômetro de placa Epoch (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA). Antes de cada leitura, o filme selador era trocado por uma tampa transparente de microplaca e, posteriormente, foi utilizado outro filme respirável.

#### 4.7 Análises estatísticas

Os gráficos foram realizados no RStudio versão 1.3.1056 (RSTUDIO TEAM, 2020) com versão 4.0.2 do R (R CORE TEAM, 2020) por meio do pacote ggplot2 versão 3.3.2 (WICKHAM, 2016). As análises estatísticas dos ensaios de inibição dos sobrenadantes dos co-cultivos foram realizadas no GraphPad Prism versão 8.0.1 (GraphPad Software, Califórnia, Estados Unidos) pelo método *one-way* ANOVA com pós-teste de Dunnett. O intervalo de confiança foi de 95% e  $p < 0,05$ . Para avaliar as diferenças observadas na simulação de bioaugmentação no ninho de *Leptodactylus vastus*, foi utilizado o teste *t* com correção de Welch com o intervalo de confiança de 95% e  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Composição bioquímica de ninhos de espuma de anuros

A concentração de proteínas dos ninhos de espuma de *Leptodactylus vastus*, *L. macrosternum*, *L. podicipinus*, *Physalaemus cuvieri*, *P. albifrons* e *Adenomera hylaedactyla* variou de 0,25 a 2,10 mg/mL. Os ninhos de *L. vastus* e *P. albifrons* apresentaram os maiores teores e os ninhos de *L. macrosternum* e *L. podicipinus* os menores (Tabela 9). No que diz respeito à determinação da concentração de carboidratos das referidas espécies, os valores variaram entre 0,20 e 1,40 mg/mL. O ninho de *L. vastus* apresentou o menor valor quando comparado aos demais, com concentração de 0,23 mg/mL. Não foi possível determinar a concentração de carboidratos para os ninhos de *L. podicipinus* e *A. hylaedactyla* devido à quantidade insuficiente das amostras.

Tabela 9 - Concentração de proteínas e de carboidratos totais dos ninhos de espuma

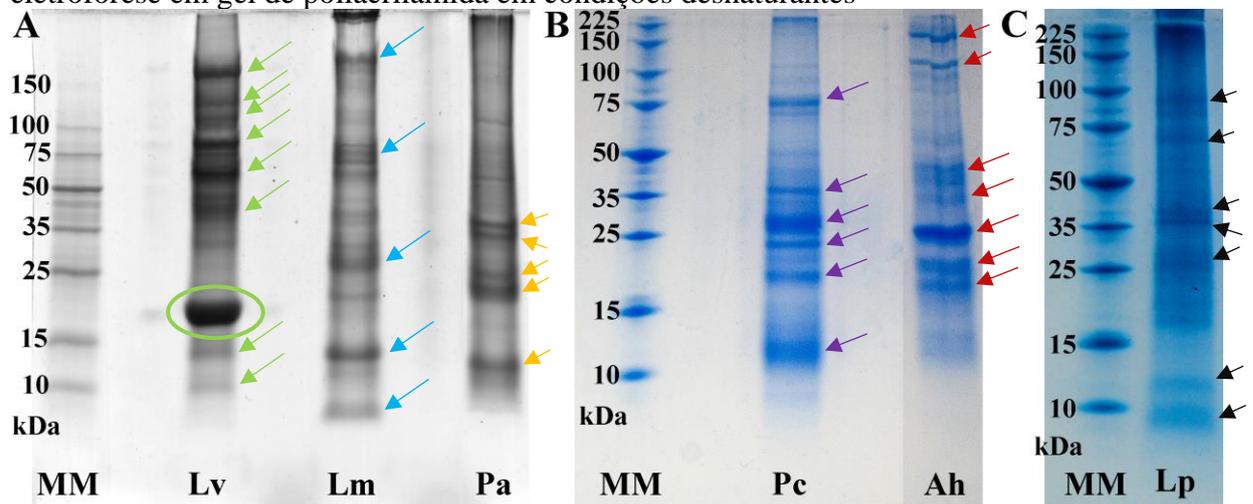
Ninho de espuma (espécie)	Concentração de proteínas totais (mg/mL)	Concentração de carboidratos totais (mg/mL)
<i>Leptodactylus vastus</i>	1,43 ± 0,37	0,23 ± 0,01
<i>L. macrosternum</i>	0,68 ± 0,31	1,37 ± 0,07
<i>L. podicipinus</i>	0,25 ± 0,08	N/D
<i>Physalaemus cuvieri</i>	1,33 ± 0,68	1,16 ± 0,06
<i>P. albifrons</i>	2,07 ± 1,24	1,30 ± 0,07
<i>Adenomera hylaedactyla</i>	0,75 ± 0,15	N/D

Fonte: elaborado pelo autor. N/D: não determinado.

Como revelado por SDS-PAGE-Tricina (Figura 14), os ninhos de espuma apresentam perfis proteicos distintos. Com relação ao ninho de *L. vastus*, as bandas mais intensas variam de 10 a 150 kDa (setas verdes) com dois destaques: um conjunto de seis bandas acima de 35 kDa e a Lv-RSN-1 (círculo verde), uma proteína surfactante de 23,5 kDa (HISSA *et al.*, 2008, 2014, 2016) e a única proteína conhecida dentre os ninhos deste trabalho. As bandas mais intensas do ninho de *L. macrosternum* (setas azuis) variam entre menos de 10 até mais de 150 kDa com três bandas características: uma com aproximadamente 25 kDa, uma entre 10 e

15 kDa e outra com menos de 10 kDa. No ninho de *P. albifrons*, há cinco bandas evidentes (setas amarelas): duas por volta de 35 kDa, mais duas entre 25 e 10 kDa e uma entre 10 e 15 kDa. O ninho de *P. cuvieri* apresenta bandas mais evidentes entre 10 e 75 kDa (setas roxas), com destaque para uma entre 10 e 15 kDa e uma logo acima de 25 kDa. Com relação ao ninho de *A. hylaedactyla*, as bandas mais evidentes (setas vermelhas) variam entre 15 e 225 kDa com três bandas características: uma em torno de 25 kDa e duas entre 15 e 25 kDa. Já o ninho de *L. podicipinus* possui bandas evidentes por volta de 10 kDa até 100 kDa (setas pretas), ressaltando uma em torno de 25 kDa e outra com menos de 10 kDa.

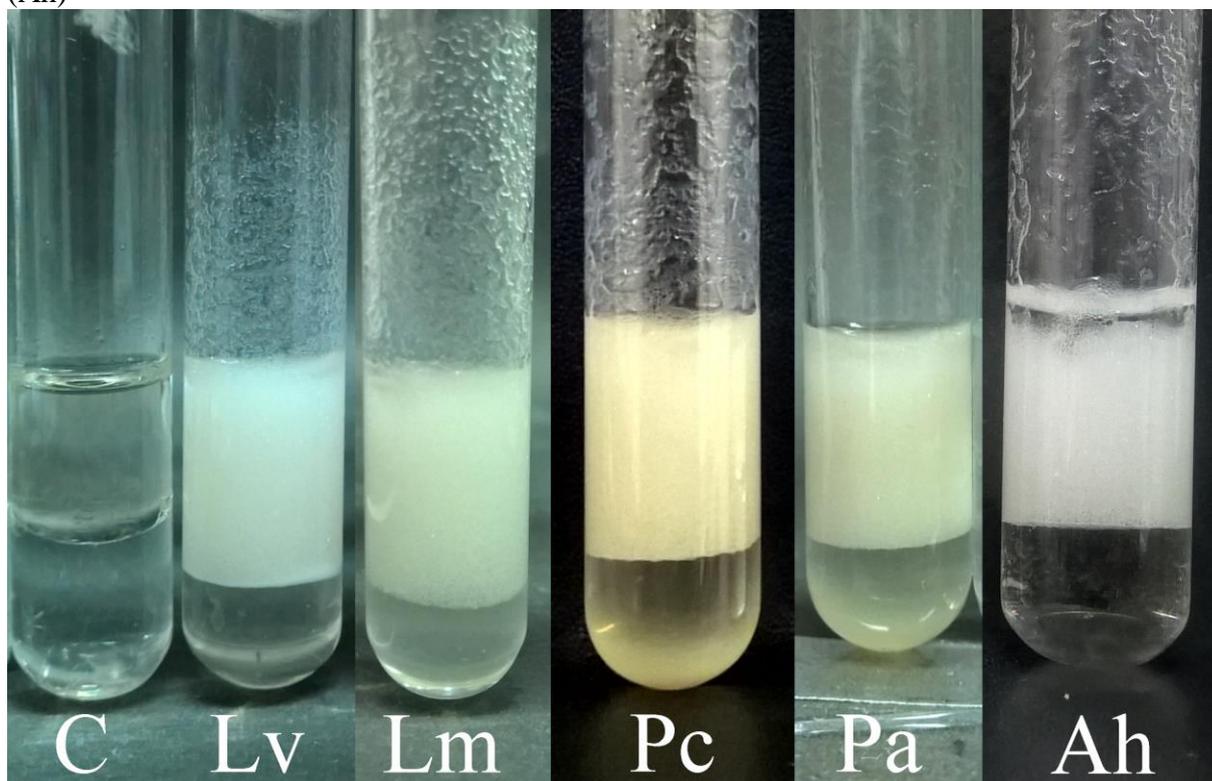
Figura 14 - Perfil proteico dos ninhos de espuma de *Leptodactylus vastus*, *L. macrosternum*, *L. podicipinus*, *Physalaemus cuvieri*, *P. albifrons* e *Adenomera hylaedactyla* elucidado por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes



Fonte: elaborado pelo autor. (A) Marcador molecular (MM) e ninhos de espuma de *L. vastus* (Lv), *L. macrosternum* (Lm) e *P. albifrons* (Pa). Foram aplicados 40 µg de proteína em cada poço. (B) Marcador molecular (MM) e ninhos de espuma de *P. cuvieri* (Pc) com 10 µg de proteína e *A. hylaedactyla* (Ah) com 5 µg de proteína. (C) Marcador molecular (MM) e ninho de espuma de *L. podicipinus* com teor de proteína indeterminado (Lp). As setas coloridas indicam as bandas mais espessas ou mais intensas, sendo uma cor para cada ninho. O círculo verde indica a Lv-RSN-1, uma proteína surfactante de 23,5 kDa e a única proteína conhecida deste trabalho.

O ensaio de emulsificação utilizando querosene como fase apolar mostrou a presença de molécula(s) surfactante(s) nos ninhos de *L. macrosternum*, *P. cuvieri*, *P. albifrons* e *A. hylaedactyla* (Figura 15). Todos os índices de emulsão foram acima de 55%, considerados bons (WILLUMSEN; KARLSON, 1997), e as emulsões permaneceram estáveis por mais de uma semana, quando o ensaio foi desfeito.

Figura 15 - Ensaio de emulsificação dos ninhos de espuma de *Leptodactylus vastus* (Lv), *L. macrosternum* (Lm), *Physalaemus cuvieri* (Pc), *P. albifrons* (Pa) e *Adenomera hylaedactyla* (Ah)



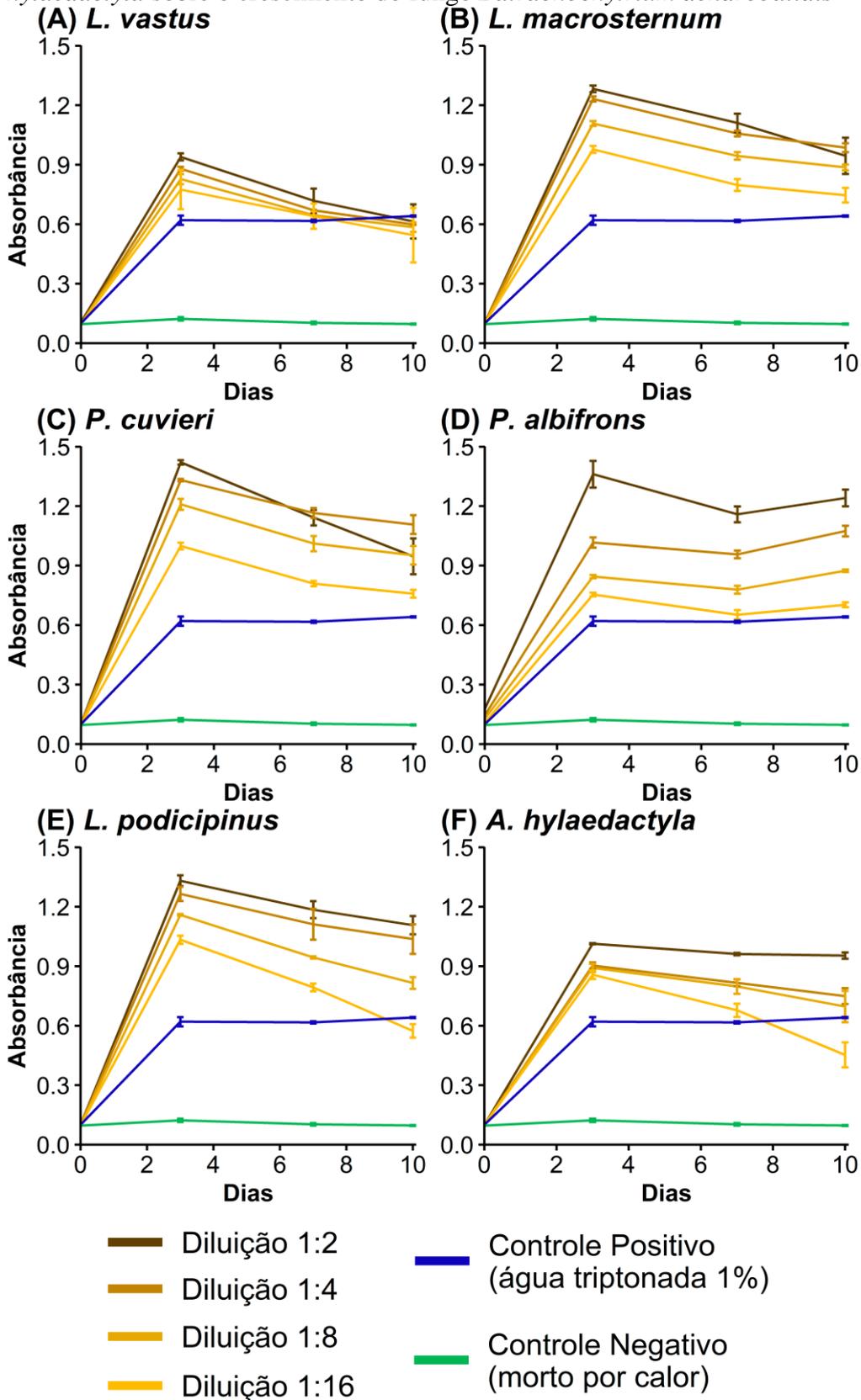
Fonte: elaborado pelo autor. C: controle, água com querosene. A atividade surfactante do ninho de espuma de *Leptodactylus vastus* é devido, principalmente, à presença da proteína surfactante Lv-RSN-1 (HISSA *et al.*, 2008, 2014).

## 5.2 Atividade de ninhos de espuma de anuros sobre crescimento do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*

A pesquisa da atividade anti-*Bd* dos ninhos de espuma foi realizada utilizando o ninho liquefeito, esterilizado por filtração e diluído em água triptonada 1%, nas diluições finais de 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16. A viabilidade do *Bd* no ensaio foi confirmada pelo crescimento apenas em água triptonada 1% e pela inativação do fungo após tratamento térmico (80 °C por 1 hora).

Como ilustra a Figura 16, os ninhos não apresentaram atividade inibitória sobre o crescimento do *Bd*. Em todos os casos, durante a fase exponencial, as curvas mostram que todas as diluições dos ninhos estimulam significativamente o crescimento do fungo quando são comparadas com a cultura controle em água triptonada 1%. Após esse período, que ocorre até o terceiro dia de ensaio, há uma estabilização ou declínio da densidade ótica, o que indica que a cultura do *Bd* chegou na fase estacionária ou na fase de morte. Além disso, observa-se um padrão de que quanto maior for o fator de diluição dos ninhos, menor é o crescimento do *Bd*.

Figura 16 – Efeito de cada diluição dos ninhos de espuma de (a) *Leptodactylus vastus*, (b) *L. macrosternum*, (c) *Physalaemus. cuvieri*, (d) *P. albifrons*, (e) *L. podicipinus* e (f) *Adenomera hylaedactyla* sobre o crescimento do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*

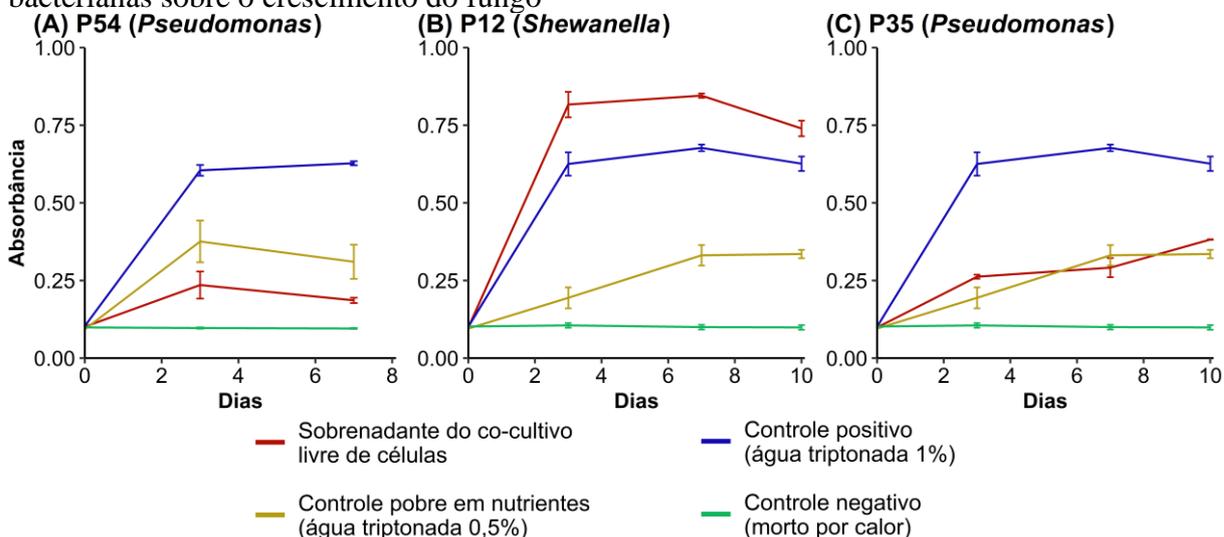


Fonte: elaborado pelo autor. Os tons amarelos representam o crescimento do *Bd* nas diluições dos ninhos de espuma em água triptonada 1%. No controle positivo, o fungo cresce em água triptonada 1%, condição ideal de crescimento do *Bd*. O controle negativo inviabiliza o *Bd* por aquecimento a 80 °C por uma hora.

### 5.3 Efeito de estirpes de bactérias isoladas de ninhos de espuma de *Physalaemus cuvieri* e *Adenomera hylaedactyla* sobre o crescimento do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*

Nesse ensaio, foram avaliados 45 sobrenadantes de co-cultivo entre o *Bd* e estirpes de bactérias isoladas dos ninhos de espuma. Ao todo foram testadas 33 estirpes isoladas do ninho de *P. cuvieri* e 12 de *A. hylaedactyla*. A Figura 17 ilustra a inibição, a facilitação e a ausência de efeito provocados por bactérias dos ninhos sobre o crescimento do *Bd*. Na Figura 17A, ao se analisar a curva de crescimento do fungo na presença do sobrenadante do co-cultivo, percebe-se uma inibição significativa na fase exponencial e que se prolonga na fase estacionária. Por outro lado, na Figura 17B, o sobrenadante estimula o crescimento do fungo durante todo o experimento, inclusive com uma densidade ótica maior do que o controle positivo, que é a condição ideal de crescimento do *Bd*. Por último, na Figura 17C, o sobrenadante não apresenta efeito consistente sobre o crescimento do fungo em relação ao controle pobre em nutrientes.

Figura 17 – Curvas de crescimento que demonstram (A) inibição, (B) facilitação e (C) ausência de efeito dos sobrenadantes de co-cultivos entre o *Batrachochytrium dendrobatidis* e estirpes bacterianas sobre o crescimento do fungo



Fonte: elaborado pelo autor. Após o co-cultivo entre o *Bd* e a estirpe bacteriana isolada do ninho, o sobrenadante foi filtrado e testado contra o *Bd* (vermelho). No controle positivo (azul), o *Bd* cresceu em água triptonada 1%, que é a condição ideal para o fungo. No controle pobre em nutrientes (amarelo), o fungo cresceu em água triptonada 0,5%, o que simula a triptona que foi consumida durante o co-cultivo no sobrenadante. No controle negativo (verde), o fungo foi inviabilizado por aquecimento a 80 °C por uma hora.

Para quantificar a inibição do sobrenadante do co-cultivo sobre o crescimento do *Bd*, utilizou-se o índice de inibição proposto por Rebollar *et al.* (2019), onde: índice  $\geq 0,25$  (inibição do crescimento),  $-0,25 \leq \text{índice} < 0,25$  (sem efeito no crescimento) e índice  $< -0,25$

(facilitação do crescimento). Como resultado, oito estirpes (18%) inibiram o crescimento do fungo, 16 (36%) não tiveram efeito sobre o crescimento e 21 (46%) facilitaram o crescimento do *Bd*, como mostra a Tabela 10.

Dentre as oito estirpes com atividade anti-*Bd*, cinco foram identificadas como *Pseudomonas*, duas como *Enterobacter* e a estirpe P13, cuja identificação não foi conclusiva. O índice mais alto pertence a *Enterobacter* P48 (0,67) que é seguida pela *Pseudomonas* P54 (0,62) e pela *Enterobacter* B1 (0,61). Além disso, sete dessas estirpes foram isoladas dos ninhos de *P. cuvieri* e apenas uma de *A. hylaedactyla*. Por outro lado, há uma maior diversidade de gêneros que facilitam o crescimento do *Bd*, totalizando nove no ninho de *P. cuvieri*, como exemplo: *Rheinheimera*, *Bacillus*, *Vogesella* e *Pseudomonas*. Já no ninho de *A. hylaedactyla*, há cinco gêneros facilitadores, com destaque para *Enterobacter* com três representantes. Com relação às estirpes que não afetam o crescimento do fungo, as *Pseudomonas* são predominantes no ninho de *P. cuvieri*, com cinco representantes, e as *Enterobacter* compõem integralmente essa categoria no ninho de *A. hylaedactyla*.

Tabela 10 – Efeito do sobrenadante do co-cultivo entre o *Batrachochytrium dendrobatidis* e as estirpes de bactérias dos ninhos de espuma sobre o crescimento do fungo

Ninho de espuma	Estirpe	Gênero	Inibição ( $I \geq 0,25$ )
<i>Physalaemus cuvieri</i>	P13	N/D	0,42
	P32	<i>Pseudomonas</i> sp.	0,53
	P42	<i>Pseudomonas</i> sp.	0,34
	P48	<i>Enterobacter</i> sp.	0,67
	P49	<i>Pseudomonas</i> sp.	0,45
	P54	<i>Pseudomonas</i> sp.	0,62
	P63	<i>Pseudomonas</i> sp.	0,32
<i>Adenomera hylaedactyla</i>	B1	<i>Enterobacter</i> sp.	0,61
Ninho de espuma	Estirpe	Gênero	Sem efeito ( $-0,25 \leq I < 0,25$ )
<i>Physalaemus cuvieri</i>	P2	<i>Serratia</i> sp.	0,05
	P3	<i>Chryseobacterium</i> sp.	-0,21
	P6	<i>Aeromonas</i> sp.	0,24
	P8	<i>Kurthia</i> sp.	0,04
	P14	<i>Comamonas</i> sp.	-0,08
	P18	<i>Chryseobacterium</i> sp.	0,09
	P23	<i>Pseudomonas</i> sp.	0,20

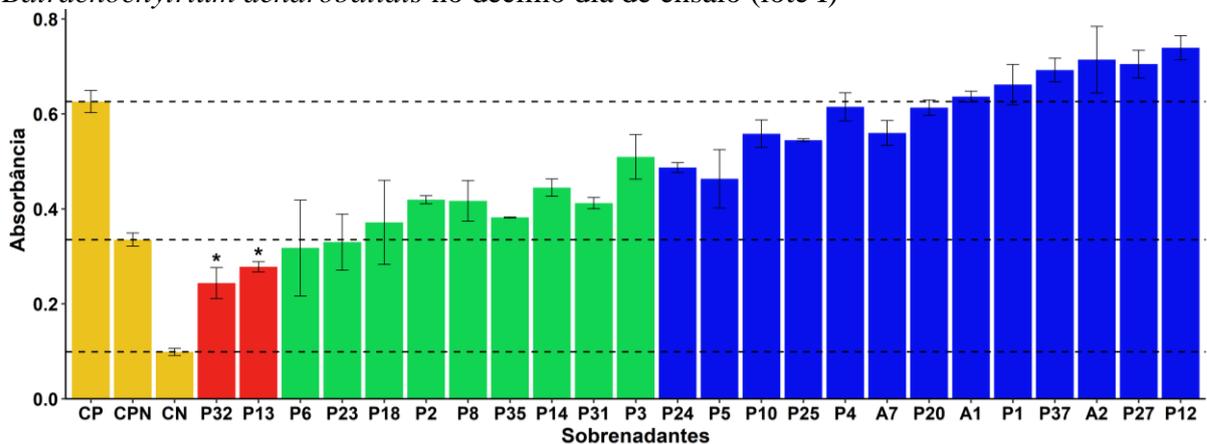
	P31	<i>Pseudomonas</i> sp.	-0,17
	P35	<i>Pseudomonas</i> sp.	0,00
	P36	<i>Pseudomonas</i> sp.	-0,07
	P46	<i>Pseudomonas</i> sp.	0,06
	P76	<i>Comamonas</i> sp.	0,14
<i>Adenomera hylaedactyla</i>	B9	<i>Enterobacter</i> sp.	-0,17
	B11	<i>Enterobacter</i> sp.	0,13
	C1	<i>Enterobacter</i> sp.	0,06
	C3	<i>Enterobacter</i> sp.	0,09
<b>Ninho de espuma</b>	<b>Estirpe</b>	<b>Gênero</b>	<b>Facilitação (I &lt; -0,25)</b>
<i>Physalaemus cuvieri</i>	P1	<i>Rheinheimera</i> sp.	-0,84
	P4	<i>Bacillus</i> sp.	-0,55
	P5	<i>Vogesella</i> sp.	-0,33
	P10	<i>Rheinheimera</i> sp.	-0,43
	P12	<i>Shewanella</i> sp.	-1,21
	P20	<i>Empedobacter</i> sp.	-0,62
	P24	<i>Pseudomonas</i> sp.	-0,28
	P25	<i>Pseudomonas</i> sp.	-0,49
	P27	<i>Flavobacterium</i> sp.	-1,05
	P37	<i>Sphingobacterium</i> sp.	-0,98
	P40	<i>Vogesella</i> sp.	-0,59
	P57	<i>Bacillus</i> sp.	-1,04
	P75	<i>Acinetobacter</i> sp.	-0,36
	P77	N/D	-0,50
<i>Adenomera hylaedactyla</i>	A1	<i>Chryseobacterium</i> sp.	-0,80
	A2	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	-1,04
	A7	<i>Serratia</i> sp.	-0,58
	B2	<i>Lysinibacillus</i> sp.	-0,63
	B10	<i>Enterobacter</i> sp.	-0,56
	B12	<i>Enterobacter</i> sp.	-0,39
	C2	<i>Enterobacter</i> sp.	-0,26

Fonte: elaborado pelo autor. ND: não identificado.

Além do índice, uma segunda forma de assegurar estirpes com boa atividade inibitória é realizar uma análise de variância no último dia de ensaio, comparando o crescimento

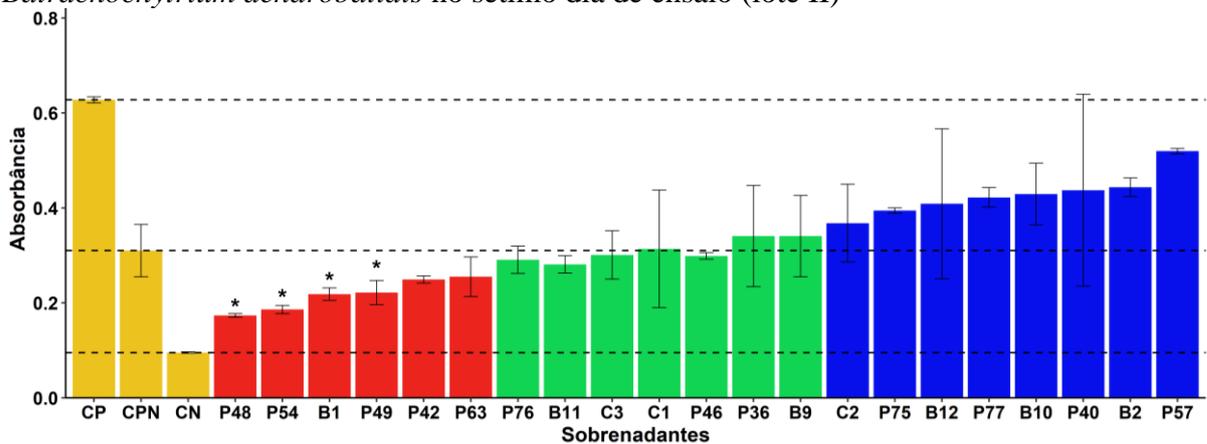
do *Bd* na presença do sobrenadante do co-cultivo com o controle pobre em nutrientes. Dessa forma, o crescimento do fungo foi significativamente menor ( $p < 0,05$ ) na presença do sobrenadante das estirpes P13, P32, P48, P49, P54 e B1 do que no controle pobre em nutrientes no último dia de ensaio (Figura 18 e Figura 19). No segundo lote de estirpes testadas (Figura 19), houve uma rápida dessecação da placa após o sétimo dia de experimento, o que levou ao descarte dos valores do décimo (último) dia de ensaio.

Figura 18 – Efeito do sobrenadante do co-cultivo sobre o crescimento do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* no décimo dia de ensaio (lote I)



Fonte: elaborado pelo autor. Controle positivo (CP): suspensão de zoósporos em caldo triptona 1%, que é a condição ideal de crescimento do *Bd*. Controle pobre em nutrientes (CPN): suspensão de zoósporos em água triptonada 0,5%, o que simula a triptona que foi consumida durante o co-cultivo. Controle negativo (CN): os zoósporos foram inviabilizados por aquecimento a 80 °C por uma hora. As cores indicam as classificações de acordo com o índice: inibição (vermelho), facilitação (azul) e sem efeito (verde). Os asteriscos indicam diferença significativa com relação ao controle pobre em nutrientes (CPN). As análises de variância apresentaram  $p < 0,05$ .

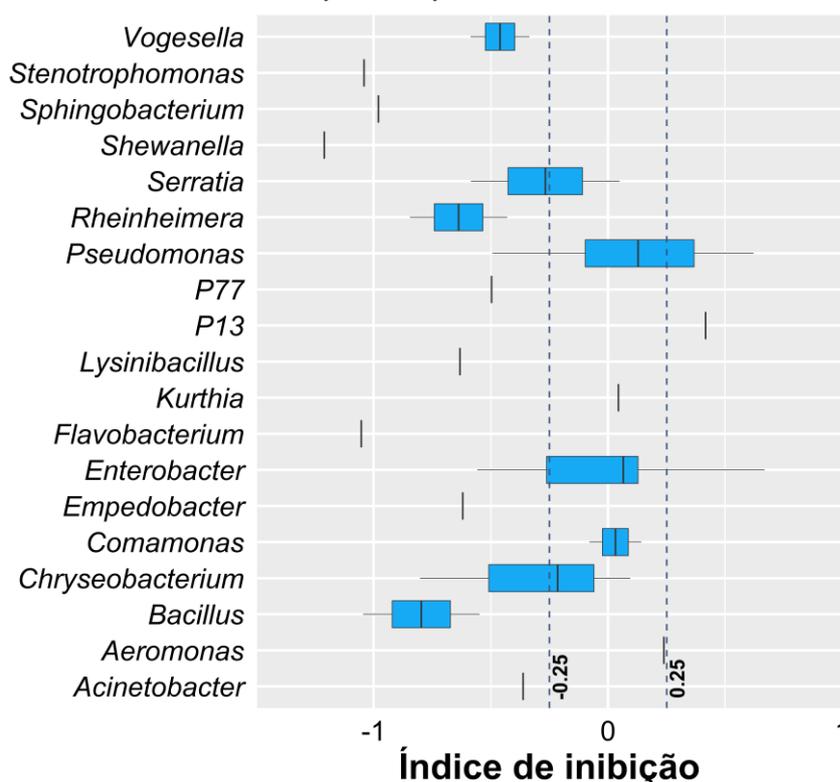
Figura 19 – Efeito do sobrenadante do co-cultivo sobre o crescimento do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* no sétimo dia de ensaio (lote II)



Fonte: elaborado pelo autor. Controle positivo (CP): suspensão de zoósporos em caldo triptona 1%, que é a condição ideal de crescimento do *Bd*. Controle pobre em nutrientes (CPN): suspensão de zoósporos em água triptonada 0,5%, o que simula a triptona que foi consumida durante o co-cultivo. Controle negativo (CN): os zoósporos foram inviabilizados por aquecimento a 80 °C por uma hora. As cores indicam as classificações de acordo com o índice: inibição (vermelho), facilitação (azul) e sem efeito (verde). Os asteriscos indicam diferença significativa com relação ao controle pobre em nutrientes (CPN). As análises de variância apresentaram  $p < 0,05$ .

Ao realizar uma análise de variância (ANOVA *one-way*) entre as médias dos índices de inibição por gênero, os pós-testes de Turkey ( $F_{18,26} = 2,916$ ,  $p < 0,05$ ) indicaram que as diferenças observadas não são significativas, como é ilustrado na Figura 20. Esse resultado indica que não há um gênero específico associado à inibição, à facilitação ou à ausência de efeito sobre o crescimento do *Bd*.

Figura 20 – Distribuição dos índices de inibição por gênero dos isolados dos ninhos de espuma de *Physalaemus cuvieri* e *Adenomera hylaedactyla*



Fonte: elaborado pelo autor. Os isolados P13 e P77 estão representados individualmente, pois a identificação molecular do gênero não foi possível. As linhas pontilhadas indicam as classificações dos índices: índice  $\geq 0,25$  (inibição do crescimento do *Bd*),  $-0,25 \leq$  índice  $< 0,25$  (sem efeito) e índice  $< -0,25$  (facilitação).

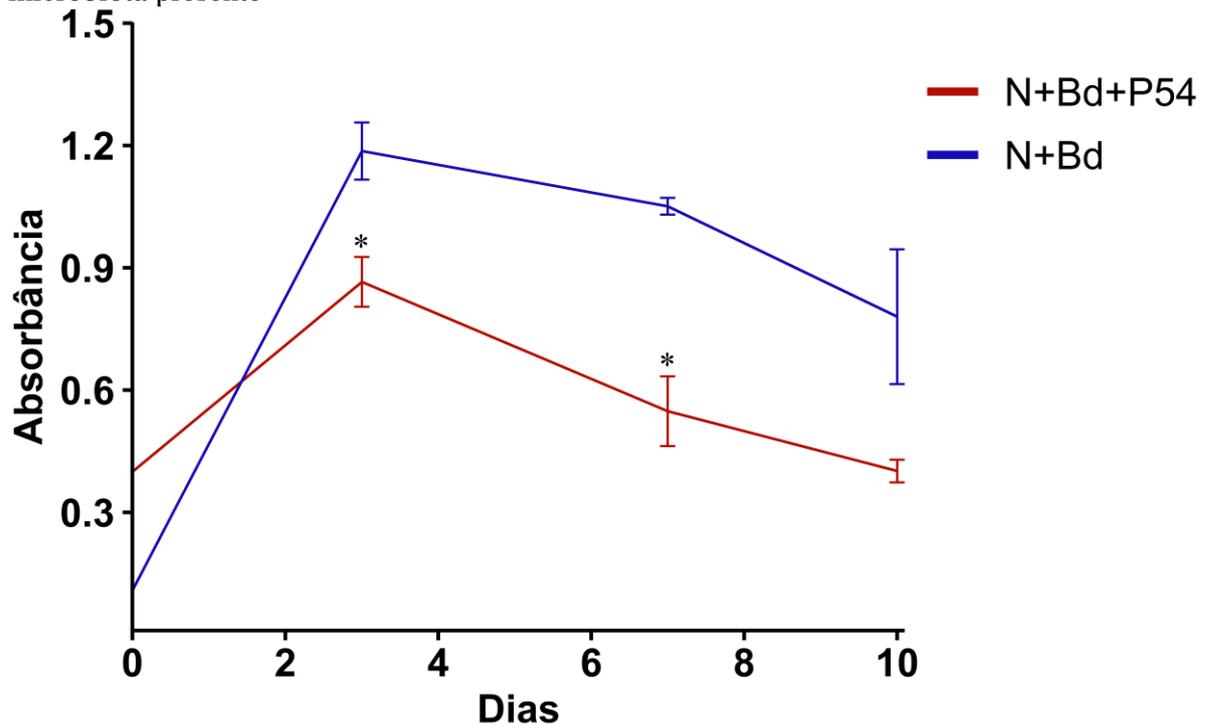
#### 5.4 Avaliação da *Pseudomonas* sp. P54 como inoculante no ninho de *Leptodactylus vastus*

As estirpes P13, P32, P48, P49 e P54 são as mais promissoras como estratégia de contenção da quitridiomiose por apresentarem os mais altos índices de inibição. Dentre elas, a P54 obteve o maior índice do gênero *Pseudomonas*, grupo mais abundante nos ninhos de *P. cuvieri* e *L. vastus* (CASTRO, 2019). Dessa forma, ela foi escolhida para atuar como um inoculante do fluido do ninho de *L. vastus*.

Para avaliar o efeito da *Pseudomonas* P54 como um inoculante, foi utilizado o ninho de espuma com a microbiota nativa presente. Ao fluido do ninho, foram adicionadas uma

suspensão de zoósporos do *Bd* e uma cultura da estirpe P54. Como resultado, a Figura 21 mostra que a adição da P54 diminuiu significativamente ( $p < 0,05$ ) a curva de crescimento da condição ninho com *Bd* no terceiro dia (fase exponencial) e no sétimo dia de ensaio. Já no décimo dia, não há diferença estatística entre as duas condições.

Figura 21 - Efeito da *Pseudomonas* P54 no fluido do ninho de *Leptodactylus vastus* com a microbiota presente



Fonte: elaborado pelo autor. N+Bd+P54: cultura da P54 e suspensão de zoósporos adicionadas ao ninho de *L. vastus*; N+Bd: água triptonada 2% e suspensão de zoósporos adicionados ao ninho de *L. vastus*. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre as médias de absorbância dentro de um mesmo dia.

## 6 DISCUSSÃO

Embora o Brasil apresente a maior diversidade de anfíbios do mundo, a extensão da quitridiomiose, doença causada pelo fungo aquático queratinófilo *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), é subestimada, devido ao fato da maioria dos estudos se concentrarem na Floresta Atlântica (CARVALHO; BECKER; TOLEDO, 2017). Além disso, a ocorrência do *Bd* em ninhos de espumas de anuros só foi registrada recentemente no estado do Ceará (MENDES, 2021). Essa descoberta é preocupante, pois acredita-se que a contaminação e uma possível proliferação do *Bd* em ninhos de anuros represente um grande risco, pois além de contribuir para o aumento da carga fúngica no ambiente, pode colocar sob ameaça espécies produtoras e não produtoras de bioespumas.

As bioespumas de anuros são formadas por uma mistura complexa de carboidratos e proteínas (COOPER *et al.*, 2017), cuja composição é distinta para cada espécie estudada, como confirmado no presente estudo. Os ninhos de espumas das seis espécies de anuros avaliados apresentam diferentes composições de proteínas (Figura 14) e carboidratos. Dentre as proteínas, a única já caracterizada e com a estrutura tridimensional resolvida é a proteína surfactante Lv-RSN-1, presente no ninho de *L. vastus* (HISSA *et al.*, 2008, 2014). Além disso, existem evidências da presença de lectina (s) no ninho de *Physalaemus albifrons* (BEZERRA, 2017) e de outras proteínas surfactantes, como confirmado por ensaios de emulsificação de misturas água-óleo (Figura 15).

Estudos reportaram a presença de proteínas surfactantes, lectinas, imunoglobulinas, proteínas antimicrobianas, inibidores de proteases e peptídeos antimicrobianos (AMP) em ninhos de espumas de rãs (FLEMING *et al.*, 2009; SHAHRUDIN *et al.*, 2017; SHIGERI *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2019), mas até o momento não há relatos sobre os efeitos de componentes dos ninhos de espuma frente ao *Bd*.

Dentre o arsenal proteico das bioespumas, as lectinas podem ser fundamentais em restringir a proliferação de microrganismos, uma vez que elas se ligam a transportadores de nutrientes e receptores de membrana de agentes invasores (FLEMING *et al.*, 2009). Além das lectinas, os inibidores de proteases podem desempenhar uma função anti-*Bd* importante, visto que algumas peptidases, como serino, metalo e aspartil-proteases são consideradas fatores de virulência do *Bd* (JONESON *et al.*, 2011; MCDONALD *et al.*, 2020; ROSENBLUM *et al.*, 2012). Quanto às proteínas surfactantes dos ninhos, é improvável que elas sejam capazes de causar danos à membrana celular de microrganismos, pois assim poderiam causar danos aos espermatozoides e óvulos depositados nos ninhos (COOPER; KENNEDY, 2010; FLEMING *et*

*al.*, 2009). Além da proteína surfactante Lv-RSN-1 de *L. vastus* (HISSA *et al.*, 2008, 2014), existe apenas mais uma proteína surfactante caracterizada, Ep-RSN-2, isolada do ninho de espuma da rã *Engystomops pustulosus*, encontrada na América Central e no norte da América do Sul (FLEMING *ET AL.*, 2009).

Os peptídeos antimicrobianos são um dos principais mecanismos de defesa dos anfíbios (XU; LAI, 2015), mas apenas um desses compostos foi detectado em ninhos de espuma até o momento (SHAHRUDIN *et al.*, 2017). Esse AMP pertence à família brevinina-2, cuja atividade anti-*Bd* foi demonstrada *in vitro* (ROLLINS-SMITH *et al.*, 2002). Dessa forma, os ninhos de espumas possuem um arsenal bioquímico com potencial de conter o *Bd* e/ou outros patógenos.

Os resultados do presente estudo revelaram pela primeira vez que o *Bd* consegue se desenvolver de forma livre no ninho de espuma liquefeito, esterilizado por filtração, indicando que as biomoléculas presentes no ninho não são tóxicas contra o *Bd*. Esse resultado foi confirmado verificando-se que a diluição da bioespuma reduzia a proliferação do fungo, indicando que o *Bd* utiliza os componentes da bioespuma como nutrientes (Figura 16). Nesse sentido, é proposto que os carboidratos podem ser essa fonte nutritiva por duas razões: (1) o ninho de *L. vastus* que possui a menor concentração de carboidratos foi o que menos favoreceu o crescimento do *Bd* e (2) embora a composição glicídica dos ninhos não seja conhecida, já foi demonstrado que o *Bd* possui quimiotaxia para açúcares livres que compõem o muco de *Xenopus laevis* (VAN ROOIJ *et al.*, 2015).

Hissa *et al.* (2008) haviam reportado a ausência de atividade antifúngica e antibacteriana do ninho de *L. vastus* contra várias espécies de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos. De fato, foi demonstrado que os ninhos de *L. vastus*, *P. cuvieri* e *A. hylaedactyla* abrigam uma diversa microbiota, da ordem de  $10^6$  -  $10^7$  unidades formadoras de colônias por mililitro (CASTRO, 2019; HISSA *et al.*, 2008; MARTINS, 2020).

O ninho de espuma é um ecossistema efêmero, com duração compatível com o desenvolvimento do girino. Além das biomoléculas, o ninho de espuma abriga uma microbiota oriunda do ambiente e dos parentais e essa microbiota deve ser a fonte de microrganismos colonizadores dos neonatos (CAMPOS-CERDA; BOHANNAN, 2020). No caso das bioespumas de anuros, a mistura peculiar de proteínas e carboidratos pode levar à seleção de microbiotas espécie-específica. Essa hipótese é corroborada por três evidências: (1) os ninhos possuem até três ordens de grandeza a mais de unidades formadoras de colônias quando são comparados com o ambiente adjacente; (2) espécies que coabitam uma mesa região apresentam ninhos com distintos grupos taxonômicos de bactérias (CASTRO, 2019; MARTINS, 2020); e

(3) a microbiota da pele dos anfíbios é espécie-específica, e é influenciada por fatores do hospedeiro e do ambiente (KUENEMAN *et al.*, 2014; MCKENZIE *et al.*, 2012; WALKE *et al.*, 2014).

A microbiota cultivável dos ninhos de espuma de *L. vastus*, *P. cuvieri* e *A. hylaedactyla* no meio de cultura e condições adotadas nesse estudo, se caracteriza pelos filos Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes e Actinobacteria (CASTRO, 2019; MARTINS, 2020). Representantes desses filos são comumente encontrados na pele de diversas espécies de anfíbios e estão sempre entre os mais abundantes (BELDEN *et al.*, 2015; JANI; BRIGGS, 2014; KUENEMAN *et al.*, 2014; LONGO *et al.*, 2015; REBOLLAR *et al.*, 2016), inclusive com casos nos quais todos os cultiváveis também pertencem a esses grupos (BECKER *et al.*, 2015; REBOLLAR *et al.*, 2019). As ordens Pseudomonadales, Burkholderiales e Enterobacterales do filo Proteobacteria são as mais abundantes nesses ninhos e são usualmente encontrada na pele de anfíbios (MCKENZIE *et al.*, 2012; REBOLLAR *et al.*, 2019; WOODHAMS *et al.*, 2015), sendo parte do *core* da microbiota cutânea em alguns casos (DOUGLAS; HUG; KATZENBACK, 2021; WALKE *et al.*, 2014). Além disso, Pseudomonadales e Burkholderiales apresentam um alto potencial inibitório do *Bd* ao longo dos estágios de desenvolvimento do sapo *Anaxyrus boreas* (KUENEMAN *et al.*, 2016), o que sugere que os ninhos podem ser fundamentais no fornecimento de bactérias anti-*Bd* que perduram por toda vida do animal.

Os ninhos das espécies estudadas abrigam algumas estirpes capazes de inibir significativamente o crescimento do *Bd*, destacando-se os gêneros *Pseudomonas* e *Enterobacter*. A capacidade inibitória das *Pseudomonas* já foi demonstrada em um banco de dados com 1945 estirpes isoladas da pele de anfíbios e testadas contra o *Bd*, das quais 1127 apresentaram atividade inibitória, sendo 445 pertencentes a esse gênero (WOODHAMS *et al.*, 2015). Além disso, *Pseudomonas* spp. apresentam uma relação complexa na quitridiomiose. Representantes desse gênero são mais abundantes em espécies de anfíbios tolerantes e resistentes ao *Bd*, assim como em espécies que habitam locais em fase endozoótica da doença (REBOLLAR *et al.*, 2016) e em população de *Alytes obstetricans* (anuro) em fase epizoótica (BATES *et al.*, 2018). Essa capacidade inibitória, ampla distribuição nos anfíbios e a grande abundância nos ninhos de espuma de *L. vastus* e *P. cuvieri* (CASTRO, 2019) tornam as *Pseudomonas* spp. as mais indicadas para estratégias de contenção da quitridiomiose por bioaugmentação nas bioespumas e, talvez, na pele.

Ensaio de simulação de bioaugmentação em fluidos de ninhos de espumas de *L. vastus in natura*, não estéril, e com a microbiota indígena conservada, provou que a inoculação

de aproximadamente  $10^8$  células/mL da estirpe de *Pseudomonas* P54, isolada do ninho de *P. cuvieri*, inibe o crescimento do fungo. Esse resultado é promissor e estende o reconhecido potencial anti-*Bd* de espécies de *Pseudomonas* também presente na microbiota da pele de anuros, para os ninhos de espuma. A inibição do fungo pode estar relacionada com a produção de metabólitos antifúngicos pela P54, já tendo sido relatado na literatura os compostos 2,4-diacetilfloroglucinol e a viscosina com atividade anti-*Bd* produzidos por *Pseudomonas* spp. (MARTIN H. *et al.*, 2019; MYERS *et al.*, 2012).

*Enterobacter* foi outro gênero anti-*Bd* promissor revelado neste estudo, com duas estirpes, sendo uma delas apresentando índice de inibição do *Bd* maior do que a *Pseudomonas*. No banco de dados de Woodhams *et al.* (2015), somente duas estirpes de *Enterobacter* spp. tiveram ação anti-*Bd*. Entretanto, assim como as *Pseudomonas*, as *Enterobacter* também podem apresentar altos índices de inibição (BECKER *et al.*, 2015; HOLDEN *et al.*, 2015).

Um isolado do filo Bacteroidetes, identificado como P13, também inibiu o *Bd*. A análise do gene rRNA 16S sugere tratar-se de uma espécie de *Chryseobacterium*, gênero presente na microbiota da pele e também reconhecido por sua atividade anti-*Bd* (BECKER *et al.*, 2015; HOLDEN *et al.*, 2015; WOODHAMS *et al.*, 2015).

A microbiota presente nos ninhos de espuma pode abrigar e fornecer microrganismos capazes de inibir o desenvolvimento de patógenos no próprio ninho ou na prole (ovos e girinos). Sabe-se que, no estágio de girino, a presença de bactérias capazes de inibir o *Bd* é variável (BRESCIANO *et al.*, 2015; KUENEMAN *et al.*, 2016; WOODHAMS *et al.*, 2015) e que a quitridiomiose não é usualmente letal devido à restrição do fungo às peças bucais queratinizadas (BLAUSTEIN *et al.*, 2005; RACHOWICZ; VREDENBURG, 2004). Entretanto, no processo de metamorfose, a queratina oral desaparece ao mesmo tempo em que a pele se torna queratinizada, permitindo a transferência do *Bd* para o indivíduo adulto (MCMAHON; ROHR, 2015). Portanto, a passagem de microrganismos anti-*Bd* dos ninhos para os girinos se torna um fator essencial para a sobrevivência no estágio adulto. A metamorfose também é capaz de reestruturar a comunidade microbiana da pele (BATES *et al.*, 2018; KUENEMAN *et al.*, 2014, 2016), mas as semelhanças da microbiota cutânea de anfíbios adultos e dos ninhos podem indicar a permanência de microrganismos anti-*Bd* ao longo dos estágios de desenvolvimento.

Além de bactérias que inibem o fungo, a microbiota dos ninhos de espuma também apresenta estirpes capazes de estimular o crescimento do *Bd*. Vinte e um isolados, sendo 14 do ninho de *P. cuvieri* e sete do ninho de *A. hylaedactyla* mostraram atividade estimulatória do crescimento do fungo. Esses isolados pertencem aos filos Proteobacteria, Firmicutes e

Bacteroidetes. Ressalta-se que entre os gêneros identificados, estão representantes dos gêneros *Pseudomonas*, *Enterobacter* e *Chryseobacterium*, que são conhecidos como inibidores do fungo. Esse fenômeno de estimulação do crescimento do fungo também foi observado na microbiota da pele de anfíbios, e a proporção desses microrganismos varia de espécie para espécie (ANTWIS; HARRISON, 2018; BELL *et al.*, 2013; REBOLLAR *et al.*, 2019). Como a maioria dos estudos *in vivo* são focados em estirpes que inibem o patógeno, ainda não se sabe quais as influências das bactérias facilitadoras na dinâmica da quitridiomicose. Com base em outros sistemas biológicos, é proposto que certos metabólitos bacterianos podem estimular o crescimento do fungo ou podem mudar fatores abióticos que alteram as taxas de crescimento do patógeno (ANTWIS; HARRISON, 2018). Outra hipótese é a ocorrência de hormese, ou seja, a baixa concentração de um metabólito estimula o crescimento do fungo, mas altas concentrações o inibem (BELL *et al.*, 2013). Essas moléculas estimulantes produzidas pela microbiota podem estar presentes nos ninhos e, conseqüentemente, podem contribuir para a facilitação do crescimento do *Bd* pelo fluido das bioespumas.

Além de bactérias que inibem e facilitam o crescimento do *Bd*, foram identificadas bactérias que não inibem e nem estimulam o crescimento do fungo. O papel dessa microbiota do ninho ainda precisa ser elucidado.

Os resultados do presente estudo mostram, de modo inédito, a ação dos ninhos de espuma de anuros no crescimento do *Bd* e a importância da microbiota associada na sua contenção. Foi demonstrada a viabilidade da bioaumentação como estratégia de combate ao *Bd* *in vitro*. Por fim, a transmissão do inoculante do ninho para o hospedeiro pode ser fundamental para conter a doença nos estágios pré- e pós-metamorfose. Por mais que essa verificação demande recursos e tempo, a transmissão vertical e/ou horizontal é um dos fatores essenciais para o sucesso do tratamento com bioaumentação (BLETZ *et al.*, 2013).

Embora as seis espécies de anuros deste estudo não estejam ameaçadas (IUCN, 2021), o fato do *Bd* ter sido detectado em adultos de *L. macrosternum* (BECKER *et al.*, 2016), *L. podicipinus* (RODRIGUEZ *et al.*, 2014), *P. cuvieri* e *P. albifrons* (AMORIM *et al.*, 2019) é preocupante. A proliferação e a dispersão do *Bd* facilitadas por ninhos de espuma dessas espécies já pode estar acontecendo na natureza, fato esse que associado à rápida evolução do *Bd* (FARRER *et al.*, 2013) pode desencadear novos surtos de quitridiomicose.

A contaminação dos ninhos de espuma e a conseqüente passagem do *Bd* para ovos e girinos poderia ocorrer de duas formas não exclusivas. Na primeira, durante a formação das bioespumas, o contato entre os progenitores no amplexo e os movimentos *foam-beating* (HÖDL, 1990) com os membros posteriores poderiam transmitir zoósporos da pele para os ovos

e ninhos. Alternativamente, o fungo poderia chegar aos ninhos por meio de água contaminada com zoósporos do *Bd* ou por meio de outros fatores ambientais ainda não comprovados, como hospedeiros não-anfíbios (BRANNELLY *et al.*, 2015; GARMYN *et al.*, 2012; GOULD *et al.*, 2019). A investigação dessas hipóteses é fundamental para esclarecer a dinâmica da quitridiomicose e para elaborar estratégias de controle da doença.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A hipótese inicial de que as biomoléculas dos ninhos de espuma inibem o crescimento do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* foi refutada pelos resultados deste trabalho. Foi mostrado que as biomoléculas presentes nos ninhos estimulam o crescimento do fungo *Bd*, o que pode agravar a sua disseminação no ambiente. Possivelmente carboidratos são usados como nutrientes. Além disso, os resultados corroboram com a hipótese de que cada ninho de espuma apresenta um perfil proteico que é dependente da espécie de anuro.

Com relação à microbiota dos ninhos, o presente estudo reforça a hipótese de que essas bactérias são essenciais na defesa contra o *Bd*. Nesse sentido, cinco estipes de *Pseudomonas* e duas de *Enterobacter* foram capazes de inibir o crescimento do patógeno. Dentre as *Pseudomonas*, a estirpe P54 se mostrou um inoculante eficaz *in vitro*. O potencial dessa microbiota é uma peça fundamental para entender a dinâmica do *Bd* nos ninhos e para proteger os anuros nos estágios iniciais do desenvolvimento, hipótese que ainda carece de estudos posteriores.

## REFERÊNCIAS

- ALBALASMEH, A. A.; BERHE, A. A.; GHEZZEHEI, T. A. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. **Carbohydrate polymers**, v. 97, n. 2, p. 253–61, 12 set. 2013.
- AMORIM, F. *et al.* New records of *Batrachochytrium dendrobatidis* in the state of Bahia, Brazil: histological analysis in anuran amphibian collections. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 136, n. 2, p. 147–155, 17 out. 2019.
- ANTWIS, R. E.; HARRISON, X. A. Probiotic consortia are not uniformly effective against different amphibian chytrid pathogen isolates. **Molecular Ecology**, v. 27, n. 2, p. 577–589, jan. 2018.
- ARZABE, C. Reproductive activity patterns of anurans in two different altitudinal sites within the Brazilian Caatinga. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 16, n. 3, p. 851–864, 1999.
- BARR, D. J. S. Chytridiomycota. In: **Systematics and Evolution**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2001. p. 93–112.
- BATAILLE, A. *et al.* Genetic evidence for a high diversity and wide distribution of endemic strains of the pathogenic chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in wild Asian amphibians. **Molecular Ecology**, v. 22, n. 16, p. 4196–4209, ago. 2013.
- BATES, K. A. *et al.* Amphibian chytridiomycosis outbreak dynamics are linked with host skin bacterial community structure. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 693, 15 dez. 2018.
- BECKER, C. G. *et al.* Historical dynamics of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Amazonia. **Ecography**, v. 39, n. 10, p. 954–960, out. 2016.
- BECKER, M. H. *et al.* The Bacterially Produced Metabolite Violacein Is Associated with Survival of Amphibians Infected with a Lethal Fungus. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 21, p. 6635–6638, 1 nov. 2009.
- BECKER, M. H. *et al.* Phylogenetic distribution of symbiotic bacteria from Panamanian amphibians that inhibit growth of the lethal fungal pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Molecular Ecology**, v. 24, n. 7, p. 1628–1641, abr. 2015.
- BELDEN, L. K. *et al.* Panamanian frog species host unique skin bacterial communities. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 27 out. 2015.
- BELL, S. *et al.* Screening bacterial metabolites for inhibitory effects against *Batrachochytrium dendrobatidis* using a spectrophotometric assay. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 103, n. 1, p. 77–85, 13 mar. 2013.
- BENÍCIO, R. A. *et al.* Worrying News for Brazilian Caatinga: Prevalence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Amphibians. **Tropical Conservation Science**, v. 12, p. 1–6, 3 jan. 2019.
- BERGER, L. *et al.* Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population

declines in the rain forests of Australia and Central America. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 15, p. 9031–9036, 21 jul. 1998.

BERGER, L. *et al.* Life cycle stages of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 68, p. 51–63, 2005.

BERGER, L.; SPEARE, R.; HYATT, A. D. Chytrid fungi and amphibian declines: overview, implications and future directions. In: CAMPBELL, A. (Ed.). **Declines and Disappearances of Australian Frogs**. Canberra: Environment Australia, 1999. p. 23–33.

BEZERRA, S. G. S. **Análise proteômica de bioespumas de *Leptodactylus spp.* e *Physalaemus spp.*** Fortaleza, Ceará: Universidade Federal do Ceará, 2017.

BLAUSTEIN, A. R. *et al.* Pathogenic fungus contributes to amphibian losses in the pacific northwest. **Biological Conservation**, v. 67, n. 3, p. 251–254, 1994.

BLAUSTEIN, A. R. *et al.* Interspecific Variation in Susceptibility of Frog Tadpoles to the Pathogenic Fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Conservation Biology**, v. 19, n. 5, p. 1460–1468, out. 2005.

BLAUSTEIN, A. R.; WAKE, D. B. Declining amphibian populations: A global phenomenon? **Trends in Ecology & Evolution**, v. 5, n. 7, p. 203–204, jul. 1990.

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, jun. 2013.

BLETZ, M. C. *et al.* Estimating Herd Immunity to Amphibian Chytridiomycosis in Madagascar Based on the Defensive Function of Amphibian Skin Bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 13 set. 2017.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248–54, 7 maio 1976.

BRANNELLY, L. *et al.* *Batrachochytrium dendrobatidis* in natural and farmed Louisiana crayfish populations: prevalence and implications. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 112, n. 3, p. 229–235, 15 jan. 2015.

BRESCIANO, J. C. *et al.* Variation in the Presence of Anti-*Batrachochytrium dendrobatidis* Bacteria of Amphibians Across Life Stages and Elevations in Ecuador. **EcoHealth**, v. 12, n. 2, p. 310–319, 11 jun. 2015.

BRUCKER, R. M. *et al.* The Identification of 2,4-diacetylphloroglucinol as an Antifungal Metabolite Produced by Cutaneous Bacteria of the Salamander *Plethodon cinereus*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 34, n. 1, p. 39–43, 6 jan. 2008a.

BRUCKER, R. M. *et al.* Amphibian Chemical Defense: Antifungal Metabolites of the Microsymbiont *Janthinobacterium lividum* on the Salamander *Plethodon cinereus*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 34, n. 11, p. 1422–1429, 24 nov. 2008b.

BURKART, D. *et al.* Cutaneous bacteria, but not peptides, are associated with chytridiomycosis resistance in Peruvian marsupial frogs. **Animal Conservation**, v. 20, n. 6, p. 483–491, dez. 2017.

BYRNE, A. Q. *et al.* Cryptic diversity of a widespread global pathogen reveals expanded threats to amphibian conservation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 41, p. 20382–20387, 8 out. 2019.

CAMPBELL, C. R. *et al.* Frog skin epithelium: Electrolyte transport and chytridiomycosis. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 44, n. 3, p. 431–434, mar. 2012.

CAMPOS-CERDA, F.; BOHANNAN, B. J. M. The Nidobiome: A Framework for Understanding Microbiome Assembly in Neonates. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 35, n. 7, p. 573–582, jul. 2020.

CARNAVAL, A. C. O. Q. *et al.* Amphibian Chytrid Fungus Broadly Distributed in the Brazilian Atlantic Rain Forest. **EcoHealth**, v. 3, n. 1, p. 41–48, 3 mar. 2006.

CARVALHO, T.; BECKER, C. G.; TOLEDO, L. F. Historical amphibian declines and extinctions in Brazil linked to chytridiomycosis. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 284, n. 1848, p. 20162254, 8 fev. 2017.

CASTRO, L. G. Z. **Prospecção de microrganismos isolados de ninho de espuma de Leptodactylus vastus e Physalaemus cuvieri com potencial biotecnológico**. Fortaleza, Ceará: Universidade Federal do Ceará, 2019.

COOPER, A. *et al.* Adsorption of Frog Foam Nest Proteins at the Air-Water Interface. **Biophysical Journal**, v. 88, n. 3, p. 2114–2125, mar. 2005.

COOPER, A. *et al.* Frog foams and natural protein surfactants. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 534, p. 120–129, dez. 2017.

COOPER, A.; KENNEDY, M. W. Biofoams and natural protein surfactants. **Biophysical Chemistry**, v. 151, n. 3, p. 96–104, 2010.

DAVIDSON, E. W. *et al.* Pathogenicity and Transmission of Chytridiomycosis in Tiger Salamanders (*Ambystoma tigrinum*). **Copeia**, v. 2003, n. 3, p. 601–607, set. 2003.

DEMORI, I. *et al.* Peptides for Skin Protection and Healing in Amphibians. **Molecules**, v. 24, n. 2, p. 347, 18 jan. 2019.

DOBKIN, D. S.; GETTINGER, R. D. Thermal Aspects of Anuran Foam Nests Thermal Aspects of Anuran Foam Nests. **Journal of Herpetology**, v. 19, n. 2, p. 271–275, 1985.

DOUGLAS, A. J.; HUG, L. A.; KATZENBACK, B. A. Composition of the North American Wood Frog (*Rana sylvatica*) Bacterial Skin Microbiome and Seasonal Variation in Community Structure. **Microbial Ecology**, v. 81, n. 1, p. 78–92, 1 jan. 2021.

FARRER, R. A. *et al.* Chromosomal Copy Number Variation, Selection and Uneven Rates of Recombination Reveal Cryptic Genome Diversity Linked to Pathogenicity. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 8, p. e1003703, 15 ago. 2013.

FISHER, M. C.; GARNER, T. W. J. Chytrid fungi and global amphibian declines. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 6, p. 332–343, 25 jun. 2020.

FLEMING, R. I. *et al.* Foam nest components of the tungara frog: a cocktail of proteins conferring physical and biological resilience. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 276, n. 1663, p. 1787–1795, 22 maio 2009.

GARMYN, A. *et al.* Waterfowl: Potential Environmental Reservoirs of the Chytrid Fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e35038, 13 abr. 2012.

GOKA, K. *et al.* Amphibian chytridiomycosis in Japan: distribution, haplotypes and possible route of entry into Japan. **Molecular Ecology**, v. 18, n. 23, p. 4757–4774, dez. 2009.

GONZÁLEZ, D. L. *et al.* Recent Findings of Potentially Lethal Salamander Fungus *Batrachochytrium salamandrivorans*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 25, n. 7, p. 1416–1418, jul. 2019.

GOULD, J. *et al.* Mosquitoes as a potential vector for the transmission of the amphibian chytrid fungus. **Zoology and Ecology**, v. 29, n. 1, p. 39–44, 13 jul. 2019.

GREENSPAN, S.; LONGCORE, J.; CALHOUN, A. Host invasion by *Batrachochytrium dendrobatidis*: fungal and epidermal ultrastructure in model anurans. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 100, n. 3, p. 201–210, 12 set. 2012.

GURURAJA, K. V. Novel reproductive mode in a torrent frog *Micrixalus saxicola* (Jerdon) from the Western Ghats, India. **Zootaxa**, v. 2642, n. 1, p. 45, 12 out. 2010.

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

HANLON, S. *et al.* *Batrachochytrium dendrobatidis* exposure effects on foraging efficiencies and body size in anuran tadpoles. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 112, n. 3, p. 237–242, 15 jan. 2015.

HANLON, S.; HENSON, J.; KERBY, J. Detection of amphibian chytrid fungus on waterfowl integument in natural settings. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 126, n. 1, p. 71–74, 20 set. 2017.

HARRIS, R. *et al.* Addition of antifungal skin bacteria to salamanders ameliorates the effects of chytridiomycosis. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 83, p. 11–16, 28 jan. 2009a.

HARRIS, R. N. *et al.* Skin microbes on frogs prevent morbidity and mortality caused by a lethal skin fungus. **The ISME Journal**, v. 3, n. 7, p. 818–824, 26 jul. 2009b.

HEYER, W. R. The Adaptive Ecology of the Species Groups of the Genus *Leptodactylus* (Amphibia, Leptodactylidae). **Evolution**, v. 23, n. 3, p. 421, set. 1969.

- HIBBETT, D. S. *et al.* A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research**, v. 111, n. 5, p. 509–547, maio 2007.
- HISSA, D. C. *et al.* Novel surfactant proteins are involved in the structure and stability of foam nests from the frog *Leptodactylus vastus*. **Journal of Experimental Biology**, v. 211, n. 16, p. 2707–2711, 15 ago. 2008.
- HISSA, D. C. *et al.* Unique crystal structure of a novel surfactant protein from the foam nest of the frog *Leptodactylus vastus*. **Chembiochem : a European journal of chemical biology**, v. 15, n. 3, p. 393–8, fev. 2014.
- HISSA, D. C. *et al.* Frog Foam Nest Protein Diversity and Synthesis. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology**, v. 325, n. 7, p. 425–433, ago. 2016.
- HÖDL, W. An Analysis of Foam Nest Construction in the Neotropical Frog *Physalaemus ephippifer* (Leptodactylidae). **Copeia**, v. 1990, n. 2, p. 547–554, 27 jun. 1990.
- 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, jul. 2015.
- IQBAL, S.; KHALID, Z. M.; MALIK, K. A. Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyperproduction of biosurfactants by a gamma ray-induced mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. **Letters in applied microbiology**, v. 21, n. 3, p. 176–9, set. 1995.
- ISKANDAR, D. T.; EVANS, B. J.; MCGUIRE, J. A. A Novel Reproductive Mode in Frogs: A New Species of Fanged Frog with Internal Fertilization and Birth of Tadpoles. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. e115884, 31 dez. 2014.
- IUCN. **The IUCN Red List of Threatened Species**. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org>. Acesso em: 11 maio. 2021.
- JANI, A. J.; BRIGGS, C. J. The pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* disturbs the frog skin microbiome during a natural epidemic and experimental infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 47, p. E5049–E5058, 25 nov. 2014.
- JENKINSON, T. S. *et al.* Amphibian-killing chytrid in Brazil comprises both locally endemic and globally expanding populations. **Molecular Ecology**, v. 25, n. 13, p. 2978–2996, jul. 2016.
- JOHNSON, M. *et al.* Fungicidal effects of chemical disinfectants, UV light, desiccation and heat on the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 57, p. 255–260, 2003.
- JOHNSON, M. L.; SPEARE, R. Survival of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Water: Quarantine and Disease Control Implications. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 8, p. 915–921, ago. 2003.

JONESON, S. *et al.* Genomic Transition to Pathogenicity in Chytrid Fungi. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 11, p. e1002338, 3 nov. 2011.

KILBURN, V.; IBÁÑEZ, R.; GREEN, D. Reptiles as potential vectors and hosts of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in Panama. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 97, n. 2, p. 127–134, 6 dez. 2011.

KNUTIE, S. A. *et al.* Early-life disruption of amphibian microbiota decreases later-life resistance to parasites. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 86, 2017.

KUENEMAN, J. G. *et al.* The amphibian skin-associated microbiome across species, space and life history stages. **Molecular Ecology**, v. 23, n. 6, p. 1238–1250, 2014.

KUENEMAN, J. G. *et al.* Inhibitory bacteria reduce fungi on early life stages of endangered Colorado boreal toads (*Anaxyrus boreas*). **The ISME Journal**, v. 10, n. 4, p. 934–944, 13 abr. 2016.

LAMBERTINI, C. *et al.* Diagnóstico do fungo Quitrídio: *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Herpetologia Brasileira**, v. 2, n. 1, p. 12–17, 2013.

LAURANCE, W. F.; MCDONALD, K. R.; SPEARE, R. Epidemic Disease and the Catastrophic Decline of Australian Rain Forest Frogs. **Conservation Biology**, v. 10, n. 2, p. 406–413, abr. 1996.

LEE, T.-H.; HALL, K.; AGUILAR, M.-I. Antimicrobial Peptide Structure and Mechanism of Action: A Focus on the Role of Membrane Structure. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 25–39, 16 set. 2015.

LIEW, N. *et al.* Chytrid fungus infection in zebrafish demonstrates that the pathogen can parasitize non-amphibian vertebrate hosts. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 15048, 20 abr. 2017.

LIPS, K. R. Overview of chytrid emergence and impacts on amphibians. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 371, n. 1709, p. 20150465, 5 dez. 2016.

LONGCORE, J. E.; PESSIER, A. P.; NICHOLS, D. K. *Batrachochytrium Dendrobatidis* gen. et sp. nov., a Chytrid Pathogenic to Amphibians. **Mycologia**, v. 91, n. 2, p. 219, mar. 1999.

LONGO, A. V. *et al.* Seasonal and ontogenetic variation of skin microbial communities and relationships to natural disease dynamics in declining amphibians. **Royal Society Open Science**, v. 2, n. 7, p. 140377, jul. 2015.

LOUDON, A. H. *et al.* Interactions between amphibians' symbiotic bacteria cause the production of emergent anti-fungal metabolites. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, 21 ago. 2014.

MARCUM, R. *et al.* Effects of *Batrachochytrium dendrobatidis* infection on ion concentrations in the boreal toad *Anaxyrus (Bufo) boreas boreas*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 91, n. 1, p. 17–21, 26 jul. 2010.

- MARTEL, A. *et al.* Batrachochytrium salamandrivorans sp. nov. causes lethal chytridiomycosis in amphibians. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 38, p. 15325–15329, 17 set. 2013.
- MARTEL, A. *et al.* Recent introduction of a chytrid fungus endangers Western Palearctic salamanders. **Science**, v. 346, n. 6209, p. 630–631, 31 out. 2014.
- MARTIN H., C. *et al.* Viscosin-like lipopeptides from frog skin bacteria inhibit *Aspergillus fumigatus* and *Batrachochytrium dendrobatidis* detected by imaging mass spectrometry and molecular networking. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 3019, 28 dez. 2019.
- MARTINS, D. V. **Estudo da composição e das atividades biológicas dos microrganismos isolados do ninho de espuma do anuro *Adenomera hylaedactyla***. Fortaleza, Ceará: Universidade Federal do Ceará, 2020.
- MCDONALD, C. A. *et al.* Gene expression varies within and between enzootic and epizootic lineages of *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) in the Americas. **Fungal Biology**, v. 124, n. 1, p. 34–43, jan. 2020.
- MCKENZIE, V. J. *et al.* Co-habiting amphibian species harbor unique skin bacterial communities in wild populations. **The ISME Journal**, v. 6, n. 3, p. 588–596, 29 mar. 2012.
- MCMAHON, S. A. *et al.* Crystallization of Ranasmurfin, a blue-coloured protein from *Polypedates leucomystax*. **Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 62, n. 11, p. 1124–1126, 1 nov. 2006.
- MCMAHON, T. A. *et al.* Chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* has nonamphibian hosts and releases chemicals that cause pathology in the absence of infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 1, p. 210–215, 2 jan. 2013.
- MCMAHON, T. A.; ROHR, J. R. Transition of Chytrid Fungus Infection from Mouthparts to Hind Limbs During Amphibian Metamorphosis. **EcoHealth**, v. 12, n. 1, p. 188–193, 11 mar. 2015.
- MCMAHON, T.; LAGGAN, N.; HILL, M. Metabolites produced by *Batrachochytrium dendrobatidis* alter development in tadpoles, but not growth or mortality. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 135, n. 3, p. 251–255, 19 set. 2019.
- MENDES, M. DOS S. **Detecção do Fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* em Anuros no Estado do Ceará, Brasil**. [s.l.] Univerisdade Federal do Ceará, 2021.
- MÉNDEZ-NARVÁEZ, J.; FLECHAS, S. V.; AMÉZQUITA, A. Foam Nests Provide Context-Dependent Thermal Insulation to Embryos of Three Leptodactylid Frogs. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 88, n. 3, p. 246–253, maio 2015.
- MOLVIEW. **MolView**. Disponível em: <https://molview.org>. Acesso em: 18 mar. 2021.
- MULETZ, C. R. *et al.* Soil bioaugmentation with amphibian cutaneous bacteria protects amphibian hosts from infection by *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Biological**

**Conservation**, v. 152, p. 119–126, ago. 2012.

MYERS, J. M. *et al.* Synergistic Inhibition of the Lethal Fungal Pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*: The Combined Effect of Symbiotic Bacterial Metabolites and Antimicrobial Peptides of the Frog *Rana muscosa*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 38, n. 8, p. 958–965, 23 ago. 2012.

NEUHOFF, V. *et al.* Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, v. 9, n. 6, p. 255–262, 1988.

O'HANLON, S. J. *et al.* Recent Asian origin of chytrid fungi causing global amphibian declines. **Science**, v. 360, n. 6389, p. 621–627, 11 maio 2018.

OKE, M. *et al.* Unusual Chromophore and Cross-Links in Ranasmurfin: A Blue Protein from the Foam Nests of a Tropical Frog. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 47, n. 41, p. 7853–7856, 29 set. 2008.

PESSIER, A. P. *et al.* Cutaneous Chytridiomycosis in Poison Dart Frogs (*Dendrobates* spp.) and White's Tree Frogs (*Litoria Caerulea*). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 11, n. 2, p. 194–199, 25 mar. 1999.

PIOTROWSKI, J. S.; ANNIS, S. L.; LONGCORE, J. E. Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. **Mycologia**, v. 96, n. 1, p. 9–15, 30 jan. 2004.

PRADO, C. P. A. *et al.* Trophic eggs in the foam nests of *Leptodactylus labyrinthicus* (Anura, Leptodactylidae): An experimental approach. **Herpetological Journal**, v. 15, n. 4, p. 279–284, 2005.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing** Vienna, Austria R Foundation for Statistical Computing, , 2020. Disponível em: <https://www.r-project.org>. Acesso em: 18 mar. 2021.

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

REBOLLAR, E. A. *et al.* Skin bacterial diversity of Panamanian frogs is associated with host susceptibility and presence of *Batrachochytrium dendrobatidis*. **The ISME Journal**, v. 10, n. 7, p. 1682–1695, 8 jul. 2016.

REBOLLAR, E. A. *et al.* Integrating the role of antifungal bacteria into skin symbiotic communities of three Neotropical frog species. **The ISME Journal**, v. 13, n. 7, p. 1763–1775, 13 jul. 2019.

REBOLLAR, E. A.; MARTÍNEZ-UGALDE, E.; ORTA, A. H. The Amphibian Skin Microbiome and Its Protective Role Against Chytridiomycosis. **Herpetologica**, v. 76, n. 2, p. 167, 23 jun. 2020.

- RODRIGUES, C. L. *et al.* Analysis of abiotic factors associated with foam nests of Cuvier's foam froglet (*Physalaemus cuvieri*) in southeastern Brazil. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 15, n. 4, p. 675–688, 30 dez. 2020.
- RODRIGUEZ, D. *et al.* Long-term endemism of two highly divergent lineages of the amphibian-killing fungus in the Atlantic Forest of Brazil. **Molecular Ecology**, v. 23, n. 4, p. 774–787, fev. 2014.
- ROLLINS-SMITH, L. A. *et al.* Activity of antimicrobial skin peptides from ranid frogs against *Batrachochytrium dendrobatidis*, the chytrid fungus associated with global amphibian declines. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 26, n. 5, p. 471–479, jun. 2002.
- ROLLINS-SMITH, L. A. *et al.* Antimicrobial peptide defenses of the mountain yellow-legged frog (*Rana muscosa*). **Developmental & Comparative Immunology**, v. 30, n. 9, p. 831–842, jan. 2006.
- ROSENBLUM, E. B. *et al.* Global gene expression profiles for life stages of the deadly amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 44, p. 17034–17039, 4 nov. 2008.
- ROSENBLUM, E. B. *et al.* Substrate-Specific Gene Expression in *Batrachochytrium dendrobatidis*, the Chytrid Pathogen of Amphibians. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. e49924, 20 nov. 2012.
- RSTUDIO TEAM. **RStudio: Integrated Development for R**. RStudioBoston, MAPBC, , 2020. Disponível em: <http://www.rstudio.com>. Acesso em: 18 mar. 2021.
- SALLA, R. F. *et al.* Novel findings on the impact of chytridiomycosis on the cardiac function of anurans: sensitive vs. tolerant species. **PeerJ**, v. 6, p. e5891, 7 nov. 2018.
- SAMARASINGHE, H. *et al.* Hybridization Facilitates Adaptive Evolution in Two Major Fungal Pathogens. **Genes**, v. 11, n. 1, p. 101, 16 jan. 2020.
- SCHÄGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical biochemistry**, v. 166, n. 2, p. 368–79, 1 nov. 1987.
- SCHEELE, B. C. *et al.* Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity. **Science**, v. 363, n. 6434, p. 1459–1463, 29 mar. 2019.
- SCHLOEGEL, L. M. *et al.* Novel, panzootic and hybrid genotypes of amphibian chytridiomycosis associated with the bullfrog trade. **Molecular Ecology**, v. 21, n. 21, p. 5162–5177, nov. 2012.
- SCOTT, N. J. **Postmetamorphic death syndrome**. Disponível em: <https://www.iucn-amphibians.org/resources/froglog/froglog/archives/froglog-7>. Acesso em: 18 mar. 2021.
- SEYMOUR, R. S.; LOVERIDGE, J. P. Embryonic and larval respiration in the arboreal foam nests of the African frog *Chiromantis xerampelina*. **The Journal of experimental biology**, v. 197, p. 31–46, dez. 1994.

- SHAHRUDIN, S. *et al.* Ecology and Protein Composition of Polypedates leucomystax (Gravenhorst, 1829) (Anura: Rhacophoridae) Foam Nests from Peninsular Malaysia. **Annual Research & Review in Biology**, v. 14, n. 6, p. 1–10, 10 jan. 2017.
- SHAPARD, E. J.; MOSS, A. S.; SAN FRANCISCO, M. J. Batrachochytrium dendrobatidis Can Infect and Cause Mortality in the Nematode Caenorhabditis elegans. **Mycopathologia**, v. 173, n. 2–3, p. 121–126, 16 mar. 2012.
- SHIGERI, Y. *et al.* Identification of Novel Proteins in Foam Nests of the Japanese Forest Green Tree Frog, Rhacophorus arboreus. **Zoological Science**, v. 38, n. 1, 7 dez. 2020.
- SPITZEN-VAN DER SLUIJS, A. *et al.* Rapid enigmatic decline drives the fire salamander (Salamandra salamandra) to the edge of extinction in the Netherlands. **Amphibia-Reptilia**, v. 34, n. 2, p. 233–239, 2013.
- STEGEN, G. *et al.* Drivers of salamander extirpation mediated by Batrachochytrium salamandrivorans. **Nature**, v. 544, n. 7650, p. 353–356, 20 abr. 2017.
- TALLEY, B. L. *et al.* A century of Batrachochytrium dendrobatidis in Illinois amphibians (1888–1989). **Biological Conservation**, v. 182, p. 254–261, fev. 2015.
- TANAKA, S.; NISHIHARA, M. Foam nest as a potential food source for anuran larvae: a preliminary experiment. **Journal of Ethology**, v. 5, n. 1, p. 86–88, jun. 1987.
- TOLEDO, L. F. *et al.* The Occurrence of Batrachochytrium Dendrobatidis in Brazil and the Inclusion of 17 New Cases of Infection. **South American Journal of Herpetology**, v. 1, n. 3, p. 185–191, 2006.
- VAN ROOIJ, P. *et al.* Germ Tube Mediated Invasion of Batrachochytrium dendrobatidis in Amphibian Skin Is Host Dependent. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, p. e41481, 20 jul. 2012.
- VAN ROOIJ, P. *et al.* Amphibian chytridiomycosis: a review with focus on fungus-host interactions. **Veterinary Research**, v. 46, n. 1, p. 137, 25 dez. 2015.
- VOYLES, J. *et al.* Electrolyte depletion and osmotic imbalance in amphibians with chytridiomycosis. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 77, p. 113–118, 14 set. 2007.
- VOYLES, J. *et al.* Pathogenesis of Chytridiomycosis, a Cause of Catastrophic Amphibian Declines. **Science**, v. 326, n. 5952, p. 582–585, 23 out. 2009.
- VOYLES, J. *et al.* Pathophysiology in Mountain Yellow-Legged Frogs (Rana muscosa) during a Chytridiomycosis Outbreak. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e35374, 25 abr. 2012.
- WAKE, D. B.; VREDENBURG, V. T. Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. Supplement 1, p. 11466–11473, 12 ago. 2008.
- WALKE, J. B. *et al.* Amphibian skin may select for rare environmental microbes. **The ISME Journal**, v. 8, n. 11, p. 2207–2217, 23 nov. 2014.

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

WICKHAM, H. **ggplot2**. Cham: Springer International Publishing, 2016.

WILLUMSEN, P. A.; KARLSON, U. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. **Biodegradation**, v. 7, n. 5, p. 415–423, 1997.

WOODHAMS, D. C. *et al.* Interacting Symbionts and Immunity in the Amphibian Skin Mucosome Predict Disease Risk and Probiotic Effectiveness. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e96375, 30 abr. 2014.

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

WOODHAMS, D. C. *et al.* Prodigiosin, Violacein, and Volatile Organic Compounds Produced by Widespread Cutaneous Bacteria of Amphibians Can Inhibit Two Batrachochytrium Fungal Pathogens. **Microbial Ecology**, v. 75, n. 4, p. 1049–1062, 9 maio 2018.

WOODHAMS, D. C. *et al.* Probiotics Modulate a Novel Amphibian Skin Defense Peptide That Is Antifungal and Facilitates Growth of Antifungal Bacteria. **Microbial Ecology**, v. 79, n. 1, p. 192–202, 16 jan. 2020.

XU, X.; LAI, R. The Chemistry and Biological Activities of Peptides from Amphibian Skin Secretions. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 4, p. 1760–1846, 25 fev. 2015.

YAP, T. A. *et al.* Batrachochytrium salamandrivorans and the Risk of a Second Amphibian Pandemic. **EcoHealth**, v. 14, n. 4, p. 851–864, 16 dez. 2017.

YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n. 1, p. 27–55, 1 mar. 2003.

ZHANG, W. *et al.* Transcriptomic analysis of differentially expressed genes in the oviduct of *Rhacophorus omeimontis* provides insights into foam nest construction. **BMC Genomics**, v. 20, n. 1, p. 562, 8 dez. 2019.