



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**

**CENTRO DE CIÊNCIAS**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

**BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

**MELISSA RIOS DE SOUSA**

**AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DO FUNGO *Batrachochytrium dendrobatidis* POR  
BACTÉRIAS ISOLADAS DE NINHOS DE ESPUMA DE ANUROS**

**FORTALEZA**

**2022**

MELISSA RIOS DE SOUSA

AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DO FUNGO *Batrachochytrium dendrobatidis* POR  
BACTÉRIAS ISOLADAS DE NINHOS DE ESPUMA DE ANUROS

Monografia apresentada ao Curso de Biotecnologia do  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da  
Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial  
para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Profa. Dra. Denise Cavalcante Hissa.

FORTALEZA

2022

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

---

S697a      Sousa, Melissa Rios de.  
Avaliação da inibição do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* por bactérias isoladas de ninhos de  
espuma de anuros / Melissa Rios de Sousa. – 2022.  
52 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências,  
Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2022.

Orientação: Profa. Dra. Denise Cavalcante Hissa.

1. Quitridiomicose. 2. Atividade hemolítica. 3. Probióticos. I. Título.

CDD 661

---

MELISSA RIOS DE SOUSA

AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DO FUNGO *Batrachochytrium dendrobatidis* POR  
BACTÉRIAS ISOLADAS DE NINHOS DE ESPUMA DE ANUROS

Monografia apresentada ao Curso de Biotecnologia do  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da  
Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial  
para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

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

BANCA EXAMINADORA:

---

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

---

Profa. Dra. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa  
Universidade Federal do Ceará

---

Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo  
Universidade Federal do Ceará

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus pais **Herlen e Gledson** por sempre me apoiarem e colocarem minha educação em primeiro lugar, nunca medindo esforços para fazer o melhor para mim, possibilitando minha chegada até aqui. Ainda, gostaria de agradecer minha irmã **Natália** pela companhia, por sempre estar presente e me ajudar sempre que necessário.

Gostaria de agradecer também à minha orientadora **Profa. Dra. Denise Cavalcante Hissa**, sempre sendo compreensiva e estando presente durante a pesquisa, além de disponibilizar toda a estrutura do LARGEN para que a pesquisa fosse possível. Lá aprendi muito e conheci pessoas maravilhosas. Ainda, à **Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo** por disponibilizar o espaço e a estrutura do LEMBIOTECH, imprescindível para a realização dos experimentos, assim como aceitar participar da banca examinadora deste trabalho.. À **Luzia Gabrielle** e ao **Paulo Ricardo**, por me guiarem durante minha jornada como IC e pela amizade.

Aos meus amigos **Isabela, Lara, Liandra, Nicole, Cléber, João, Daniel, Lucas e Pedro** por serem tão companheiros e estarem sempre presentes durante essa jornada. Espero levar a amizade de vocês por toda a vida.

Devo também aos meus animais **Mika, Bergson, Bergsa, Tikuna e Dolly**, assim como **Mafalda**, que mesmo estando presente por pouco tempo me marcou para sempre. Por sempre me fazerem companhia e estarem presentes dos piores aos melhores momentos, sendo essenciais para manter a normalidade nesse momento de pandemia.

À Profa. **Dra. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa** por ser uma pessoa tão alto astral e aceitar participar da banca examinadora deste trabalho. À Universidade Federal do Ceará e a todos os professores que participaram da minha jornada pelo ensino superior. Gostaria de agradecer também ao **CNPq** e à **UFC** pelo apoio financeiro na forma de bolsas de iniciação científica.

## RESUMO

O fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) é o patógeno causador da quitridiomicose, doença altamente virulenta que resultou, até o momento, no declínio de centenas de espécies de anfíbios, muitas ao ponto de extinção. Em frente a essa ameaça, estratégias para conservação das espécies afetadas são essenciais. Assim como a pele dos anfíbios, os ninhos de espuma de anuros, estratégia reprodutiva utilizada por algumas espécies para depositar seus ovos, contêm uma microbiota associada pouco conhecida em termos de função e composição. Observa-se, nessas estruturas, potencial para isolamento de bactérias capazes de inibir o Bd desde o momento da eclosão dos ovos. Desse modo, este trabalho objetiva a avaliação do potencial de inibição de isolados do ninho de espuma dos anuros *Adenomera hylaedactyla*, *Leptodactylus vastus* e *Physalaemus cuvieri* contra *Batrachochytrium dendrobatidis*, assim como da segurança ambiental dessas cepas, por meio do teste de atividade hemolítica. Foi realizado o ensaio anti-Bd de difusão em meio sólido, preparando-se as culturas dos isolados em placas ágar T1% contendo o Bd, na qual foram inoculados os isolados a serem avaliados. Em seguida, foi realizado o ensaio anti-Bd em meio líquido, para o qual foram preparados co-cultivos de zoósporos de Bd e culturas bacterianas, que foram em seguida filtrados para obtenção de sobrenadantes livres de células (CFS). Os CFS foram adicionados em culturas de Bd, em placas de 96 poços, para analisar se ocorreu inibição do fungo. Para avaliação da atividade hemolítica, as culturas de cada isolado foram inoculadas em meio ágar sangue. Em meio sólido, 54 cepas de 183 apresentaram atividade anti-Bd. No entanto, ao serem testadas 50 dessas cepas em placas de 96 poços, foram obtidos resultados que variaram desde facilitação à alta inibição do crescimento do Bd. Ainda, 111 cepas isolados apresentaram atividade hemolítica negativa, resultado promissor pois a atividade hemolítica é um potencial fator de virulência. Cinco isolados apresentaram atividade inibitória em ambos experimentos e apresentaram ausência de atividade hemolítica, sendo eles *Serratia* sp. A7, B8 (gênero não identificado), *Microbacterium* sp. L6, *Chryseobacterium* sp. L15 e *Pseudomonas* sp. P137. Dessa forma, os ninhos de espuma apresentam bactérias que podem ser utilizadas com sucesso como probióticos no tratamento contra a quitridiomicose, sendo necessários mais estudos para comprovar sua segurança e eficácia.

**Palavras chaves:** quitridiomicose, atividade hemolítica, probióticos.

## ABSTRACT

The *Batrachochytrium dendrobatidis* fungus is the pathogen that causes chytridiomycosis, a highly virulent disease that resulted, until now, in the decline of hundreds of amphibian species, many to extinction. Facing this threat, conservation strategies of the affected species are essential. Like the skin of amphibians, anuran foam nests, a reproductive strategy used by some species to place their eggs, contain an associated microbiome, little known in terms of function and composition. Thus, there is potential in these structures to isolate bacteria capable of inhibiting the Bd fungus from the moment the eggs hatch. Therefore, this work aims to evaluate the *Batrachochytrium dendrobatidis* inhibition potential of *Adenomera hylaedactyla*, *Leptodactylus vastus* and *Physalaemus cuvieri* foam nests isolates, as well as their environmental safety, through hemolytic activity tests. The anti-Bd diffusion assay was carried out in solid medium, by preparing the cultures of the isolates on T1% agar plates containing Bd, in which the isolates to be evaluated were inoculated. Then, the anti-Bd assay was carried out in liquid medium, for which co-cultures of Bd zoospores and bacterium cultures were prepared, which were then filtrated to obtain cell-free supernatant (CFS). The CFSs were added in 96-well plates containing Bd cultures, to analyze whether fungal inhibition has occurred. To evaluate the hemolytic activity, cultures of each isolate were inoculated in blood agar medium. On solid medium, 54 out of 183 strains showed anti-Bd activity. However, when testing 50 of these strains in liquid medium, results ranging from facilitation to high inhibition of Bd growth were obtained. Also, 111 strains (60.56%) showed no hemolytic activity, a promising result since the hemolytic activity is a potential virulence factor. Five isolates showed inhibitory activity in both experiments while showing no hemolytic activity, namely *Serratia* sp. A7, B8 (non-identified genus), *Microbacterium* sp. L6, *Chryseobacterium* sp. L15 e *Pseudomonas* sp. P137. Thus, foam nests contain bacteria that can be successfully used as probiotics in the treatment of chytridiomycosis, and further studies are needed to prove their safety and efficiency.

**Keywords:** chytridiomycosis, hemolytic activity, probiotics.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Distribuição espacial por país do número de espécies de anfíbios infectadas por <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> .....	11
<b>Figura 2</b> – Sapo-parteiro-comum ( <i>Alytes obstetricans</i> ) apresentando sinais da quitridiomicose.....	12
<b>Figura 3</b> – Ninhos de espuma de diferentes espécies de anuros.....	15
<b>Figure 4</b> –Inibição do fungo <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> por isolados bacterianos de ninhos de espuma de anuros.....	22
<b>Figura 5</b> – Crescimento dos isolados ao longo do tempo de cultivo (Conjunto 1).....	29
<b>Figura 6</b> – Crescimento dos isolados ao longo do tempo de cultivo (Conjunto 2).....	29
<b>Figura 7</b> – Crescimento dos isolados ao longo do tempo de cultivo (Conjunto 3).....	30
<b>Figura 8</b> – Crescimento dos isolados ao longo do tempo de cultivo (Conjunto 4).....	30
<b>Figura 9</b> – Crescimento dos isolados ao longo do tempo de cultivo (Conjunto 5).....	31
<b>Figura 10</b> – Crescimento dos isolados ao longo do tempo de cultivo (Conjunto 6).....	31
<b>Figura 11</b> – Crescimento dos isolados ao longo do tempo de cultivo (Conjunto 7).....	32
<b>Figura 12</b> – Crescimento dos isolados ao longo do tempo de cultivo (Conjunto 8).....	32
<b>Figura 13</b> – Crescimento dos isolados ao longo do tempo de cultivo (Conjunto 9).....	33
<b>Figura 14</b> – Crescimento dos isolados ao longo do tempo de cultivo (Conjunto 10).....	33
<b>Figura 15</b> – Atividade hemolítica produzida por isolados do ninho de espuma do anuro <i>Leptodactylus vastus</i> em meio ágar sangue.....	34



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Resultado dos ensaios de inibição em meio sólido do <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> e dos testes de atividade hemolítica das cepas do ninho de <i>Adenomera hylaedactyla</i> .....	23
<b>Tabela 2</b> – Resultado dos ensaios de inibição em meio sólido do <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> e dos testes de atividade hemolítica das cepas do ninho de <i>Leptodactylus vastus</i> .....	23
<b>Tabela 3</b> – Resultado dos ensaios de inibição em meio sólido do <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> e dos testes de atividade hemolítica das cepas do ninho de <i>Physalaemus cuvieri</i> .....	25
<b>Tabela 4</b> – Resultado dos ensaios de inibição em meio líquido do <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> .....	27

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>9</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>11</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
3.1 Objetivos específicos.....	17
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>18</b>
4.1 Reativação e caracterização das coleções microbianas.....	18
4.2 Ensaio anti-Bd.....	18
4.2.1 Ensaio anti-Bd de difusão em meio sólido.....	18
4.2.2 Ensaio anti-Bd em meio líquido.....	19
4.3 Atividade hemolítica.....	20
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>22</b>
5.1 Reativação e caracterização das coleções microbianas .....	22
5.2 Ensaio anti-Bd.....	22
5.2.1 Ensaio anti-Bd de difusão em meio sólido.....	22
5.2.2 Ensaio anti-Bd em meio líquido.....	27
5.3 Atividade hemolítica.....	34
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>35</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>41</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>42</b>
<b>ANEXO A – Gêneros bacterianos identificados nos ninhos de espuma que possuem atividade inibitória contra <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> reportada em literatura, assim como a metodologia empregada nos trabalhos.....</b>	<b>50</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, tem-se observado um aumento nas ocorrências de doenças fúngicas em animais selvagens, em especial aquelas causadas por fungos previamente desconhecidos (FISHER et al., 2012, 2020). No caso dos anfíbios, a quitridiomicose emergiu como uma doença de pele altamente virulenta, causada por duas espécies de fungos, *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) e *B. salamandrivorans* (Bsal). Tal doença levou ao declínio de pelo menos 501 espécies, com 90 destas estando confirmadas ou presumidamente extintas na natureza (SCHEELE et al., 2019).

Dentre os diversos mecanismos de defesa dos anfíbios contra as doenças fúngicas, estão a secreção de peptídeos microbianos e a microbiota associada à pele (REBOLLAR et al., 2019). Algumas dessas espécies de bactérias simbióticas possuem atividade contra o Bd, evidenciando o papel protetivo que elas representam para o animal em relação à presença do patógeno (HOLDEN et al., 2015; WOODHAMS et al., 2017).

Uma estratégia reprodutiva característica de algumas espécies de anuros é a produção de ninhos de espuma, nos quais depositam seus ovos. Essas estruturas são estáveis por muitos dias e têm função de proteção dos ovos e dos girinos contra desidratação, patógenos, predadores, radiação UV e/ou dano térmico (COOPER et al., 2005; MÉNDEZ-NARVÁEZ; FLECHAS; AMÉZQUITA, 2015; HISSA et al., 2016). Além do papel protetivo, os ninhos de espuma, assim como a pele dos anuros, possuem uma microbiota associada, pouco conhecida em termos de função e composição (HISSA et al., 2008).

Em frente à ameaça representada pela quitridiomicose, são exploradas estratégias para conservação das espécies afetadas, como o estudo da microbiota da pele e como ela inibe o crescimento do fungo (HOLDEN et al., 2015; REBOLLAR et al., 2019). Uma das estratégias é o uso dessas bactérias como probióticos (WALKE e BELDEN, 2016; HARRISON et al., 2020). Entretanto, o insucesso de tratamentos com microrganismos inibidores do Bd revelam a complexidade da dinâmica da comunidade bacteriana da pele desses animais, assim como levantam diversas questões sobre a permanência desses organismos inoculados na pele e como eles irão interagir com a comunidade microbiana do hospedeiro (WOODHAMS et al., 2019).

Nesse sentido, levando-se em consideração que os probióticos têm eficiência maior nos estágios de desenvolvimento iniciais (THOMAS et al., 2010; KIM et al., 2013), os ninhos

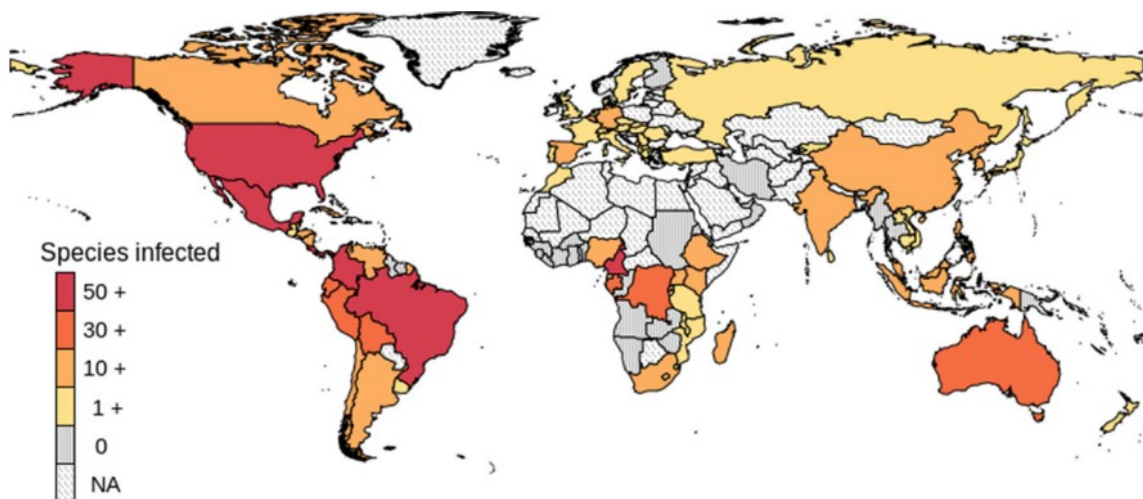
de espuma de anuros representam ambientes de interesse na busca por microrganismos eficiente como candidados a probióticos, assim como possível alvo desse tratamento. Ainda, a microbiota dessas estruturas pode apresentar potencial patogênico, que deve ser devidamente investigado para evitar danos aos animais que receberão o tratamento, bem como a quem o for aplicar. Nesse sentido, a avaliação da atividade hemolítica das bactérias, que é um potencial fator de virulência e permite aos patógenos degradar tecidos, invadir e se disseminar nas células do hospedeiro, além de conferir resistência ao seu sistema imune (LO et al., 2011), pode representar uma forma inicial de triagem sobre a segurança de uso desses microrganismos como inoculantes ambientais.

Diante disso, este estudo investiga a capacidade inibitória contra *Batrachochytrium dendrobatidis*, além da presença de atividade hemolítica, de isolados bacterianos do ninho de espuma de três espécies de anuros, *Adenomera hylaedactyla*, *Leptodactylus vastus* e *Physalaemus cuvieri*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

O fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd), da classe quitridiomicetos, foi primeiramente descrito por Longcore, Pessier e Nichols (1999), atualmente sendo considerada a doença com maior impacto na biodiversidade de vertebrados, afetando o grupo dos anuros. Amplamente disperso (Figura 1), infecções por Bd foram confirmadas em 86 países, com 1062 espécies de anfíbios infectadas (MONZON et al., 2020). É causador, juntamente com o *B. salamandrivorans* (Bsal), da quitridiomíose, doença relacionada ao declínio de pelo menos 501 espécies de anfíbios, 90 destas estando extintas na natureza. Esse fungo tem alta patogenicidade, alta taxa de transmissão e persistência no hospedeiro e no ambiente, o que favorece sua disseminação (SCHEELE et al., 2019). Enquanto ambos Bd e Bsal causam a quitridiomíose, o Bd possui uma maior diversidade de hospedeiros, podendo infectar anuros e urodelos, enquanto o Bsal afeta somente urodelos (VAN ROOIJ et al., 2015).

Figura 1 – Distribuição espacial por país do número de espécies de anfíbios infectadas por *Batrachochytrium dendrobatidis*.



Fonte: MONZON et al. (2020).

Ao entrar em contato com a pele do hospedeiro, os zoósporos do Bd se modificam em cistos, que, após germinarem, desenvolvem tubos germinativos que irão invadir a pele do animal. Com isso, o fungo irá se desenvolver intracelularmente, e os esporângios são carregados até a superfície da pele, onde os zoósporos serão liberados por tubos de descarga, pelos quais estarão novamente em contato com o ambiente (BERGER et al., 2006; VAN

ROOIJ et al., 2015). Os zoósporos flagelados sofrem quimiotaxia em direção à queratina presente na pele dos anfíbios (BLAUSTEIN et al., 2018).

Nos anuros adultos, hiperqueratose, hiperplasia e erosão das camadas epidérmicas podem ser observadas, além de eritema e descoloração da pele (Figura 2). Letargia, postura anormal e sinais neurológicos também são observados na quitridiomicose. Já em girinos, a infecção é limitada às partes queratinizadas da boca (VAN ROOIJ et al., 2015; BLAUSTEIN et al., 2018). Apesar de não apresentar sintomas letais, a infecção de Bd em girinos pode causar redução na eficiência de forrageamento e no desenvolvimento, causando maior chance de predação e menor vantagem competitiva (HANLON et al., 2015). A pele dos anfíbios é essencial para sua sobrevivência, tendo função sensorial, osmorregulatória e na troca gasosa. Assim, formas graves da quitridiomicose interferem nas funções vitais da pele, prejudicando a habilidade de osmorregulação e reidratação da pele, por afetar o transporte de eletrólitos na pele (VAN ROOIJ et al., 2015).

Figura 2 – Sapo-parteiro-comum (*Alytes obstetricans*) apresentando sinais da quitridiomicose.



Fonte: VAN ROOIJ et al. (2015). O anfíbio apresenta sinais clínicos associados com a infecção por Bd, como descamação da pele e abdução das patas traseiras.

Até o momento, tentativas de imunização com injeções de formalina subcutânea e peritoneal, ou com o Bd morto pelo calor, de anfíbios contra Bd não obtiveram sucesso (VAN ROOIJ et al., 2015), portanto abordagens para diminuição do impacto da doença são centradas no tratamento de espécies em cativeiro (SCHEELE et al., 2014). Tratamentos com compostos antifúngicos, como itraconazol, apesar de bem-sucedidos em alguns estudos (WOODWARD et al., 2014; BOSCH et al., 2015), podem causar efeitos adversos para o animal e para o ambiente, por conta da toxicidade do composto. Ainda, podem necessitar de repetidas exposições para sucesso do procedimento (BRANNELLY et al., 2012; DIRENZO et al., 2020). Outra abordagem é a exposição do animal a altas temperaturas (WOODHAMS et

al., 2003; CHATFIELD e ZAWACKI, 2011). Ainda que aplicável em populações cativas, seu uso em populações livres é limitado, com o retorno dos animais para a natureza permitindo reinfecção. Ademais, a temperatura elevada pode causar choque térmico em algumas espécies, e a temperatura a ser utilizada deve ser também baseada na linhagem do Bd presente no animal (MARTEL et al., 2018).

Mesmo com a manutenção de populações não infectadas com Bd em cativeiro, são necessárias soluções para a persistência dos animais livres frente ao patógeno (FLECHAS et al., 2021). Nesse sentido, é possível a manipulação do microbioma do hospedeiro de forma a auxiliar no combate às doenças infecciosas, seja diretamente no animal ou no ambiente em que ele está presente (MCKENZIE et al., 2018). Assim, o tratamento probiótico, com uso de microrganismos benéficos ao hospedeiro, na vida selvagem, pode ser uma estratégia promissora, apesar de pouco explorada (MCKENZIE et al., 2018).

Os probióticos devem ser seguros, não patogênicos e sem fatores de toxicidade (PLAZA-DIAZ et al., 2019). O tratamento com probióticos pode ser através da bioaumentação, de forma a alterar a estrutura da comunidade microbiana por meio do aumento de bactérias locais, que sejam benéficas ao indivíduo ou ao ambiente, assim combatendo uma doença (BLETZ et al., 2013). Um probiótico efetivo deve, antes de tudo, ser capaz de colonizar a pele do hospedeiro, assim como ser capaz de se manter e persistir, ainda com funções benéficas (MCKENZIE et al., 2018; REBOLLAR et al., 2020).

Estão envolvidos, no entanto, diversos fatores na dinâmica de uma comunidade microbiana. A diversidade e a composição microbiana variam de acordo com a espécie do hospedeiro, assim como do seu estágio de desenvolvimento (REBOLLAR et al., 2020). Indivíduos no estágio de metamorfose, por exemplo, estão particularmente vulneráveis a infecções por Bd, por conta da troca de pele, que acarreta também à perda e à formação de uma nova comunidade bacteriana. Assim, a aplicação de um tratamento probiótico nessa fase pode se mostrar benéfica (MCKENZIE et al., 2018). Ainda, a capacidade inibitória de cada bactéria depende do genótipo do patógeno, assim como das condições ambientais, dos fatores climáticos e do micro-habitat do animal (ANTWIS et al., 2015; REBOLLAR et al., 2020). As bactérias que inibem o Bd o fazem por meio da produção de metabólitos inibitórios, como violaceína, pela competição por nutrientes ou pela regulação da produção de defesas do hospedeiro, como AMPs e lisozima (WOODHAMS et al., 2017; HOLDEN et al., 2015; REID et al., 2011).

Diversos estudos evidenciam o papel protetivo da microbiota da pele contra o Bd, além de estar relacionada com a resistência à infecção (REBOLLAR et al., 2016; FLECHAS et al., 2019). Harris et al. (2009) demonstraram que *Janthinobacterium lividum*, presente na pele de anfíbios, previne morbidade e mortalidade causadas pelo Bd. Ainda, uma maior presença de espécies de bactérias anti-Bd pode estar relacionada com maior persistência de espécies de *Rana muscosa* na natureza (WOODHAMS et al., 2007).

Ademais, misturas de probióticos, formadas por consórcios de bactérias inibidoras de Bd, podem ser efetivas no tratamento de diferentes espécies, em diferentes estágios de vida ou que estejam infectadas por diferentes linhagens do patógeno (BLETZ et al., 2013). Uma comunidade bacteriana diversa pode atuar sobre o Bd por meio do efeito de dominância, no qual uma comunidade diversa tem uma maior chance de possuir espécies de alta inibição, que irão assim dominá-la, ou por meio do efeito da complementaridade de função de vários indivíduos, associada ao sinergismo (PIOVIA-SCOTT et al., 2017).

Os ninhos de espuma de anuros (Figura 3) são estruturas construídas durante o período de reprodução, durante o qual eles são produzidos a partir de secreções dos parentais (SHAHRUDIN et al., 2017). Eles protegem os ovos contra predadores, patógenos, danos térmicos e desidratação, além de ser fonte de nutrientes e facilitar o acesso a oxigênio (COOPER et al., 2005; HISSA et al., 2008; MÉNDEZ-NARVÁEZ et al., 2015; PEREIRA et al., 2017). A composição dos ninhos de espuma engloba, principalmente, proteínas surfactantes, carboidratos e lectinas. Por conta da composição, essas estruturas são altamente estáveis, podendo durar vários dias, e, em alguns casos, mais de 1 mês (FLEMING et al., 2009; HISSA et al., 2016). Ainda, esses ninhos possuem uma microbiota própria, da qual pouco se conhece tanto em relação à composição e à função, quanto na influência que tem sobre a saúde dos animais (HISSA et al., 2008).



Figura 3 – Ninhos de espuma de diferentes espécies de anuros.



(A) Ninho de espuma de *Adenomera Hylaedactyla*. Foto: Denise C. Hissa. (B) Ninho de espuma de *Leptodactylus vastus* (HISSA et al., 2008). (C) Ninho de espuma de *Physalaemus cuvieri*. Foto: Denise C. Hissa.

Davis et al., 2017 sugerem que a aplicação do tratamento em estágios iniciais do anfíbio é vantajosa para prevenção da quitridiomicose, já que o resultado é fortemente dependente da comunidade microbiana inicial. Ainda, a comunidade microbiana do hospedeiro está interligada com o sistema imune inato, em específico peptídeos antimicrobianos, e pode influenciar também no sistema imune adaptativo (DAVIS et al., 2017; MCKENZIE et al., 2018). Considerando a possibilidade da transmissão do probiótico a partir de fontes ambientais (MULETZ et al., 2012), os ninhos de espuma, estruturas produzidas por alguns anuros para deposição de ovos, destacam-se como locais de interesse para aplicação do tratamento pelo método de bioaugmentação por meio de inoculantes.

A utilização de bactérias no tratamento da quitridiomicose em indivíduos livres pode afetar outras espécies, assim como o ambiente (SIMBERLOFF e STILING, 1996). Assim, precauções devem ser tomadas para minimizar possíveis efeitos não desejados (BLETZ et al., 2013). A atividade hemolítica é um fator de virulência de inúmeros microrganismos

patogênicos, sendo possível por conta das hemolisinas, moléculas responsáveis pelos danos nas membranas do hospedeiro e consequente lise de eritrócitos (LO et al., 2011; MOGROVEJO et al., 2020). As hemolisinas podem ser classificadas em diferentes tipos e liberam o ferro complexado em heme intracelular e hemoglobina, assim diversas bactérias patogênicas adquirem ferro a partir de compostos que contém essas moléculas (GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ et al., 2007). O ferro é um elemento essencial para organismos vivos, e uma quantidade elevada de ferro livre é capaz de aumentar a virulência bacteriana (BULLEN et al., 2005).

### 3. OBJETIVOS

Avaliar a capacidade de isolados bacterianos de ninhos de espuma de três espécies de anuros, *Adenomera hylaedactyla*, *Leptodactylus vastus* e *Physalaemus cuvieri*, de inibir o fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*, assim como avaliar a atividade hemolítica dos isolados como um dos critérios de segurança ambiental dessas estirpes, a fim de analisar a capacidade de tais bactérias no uso como probióticos de forma a auxiliar na conservação da biodiversidade dos anuros.

#### 3.1 Objetivos específicos

1. Reativar a coleção de isolados bacterianos dos ninhos de espuma de *Adenomera hylaedactyla*, *Leptodactylus vastus* e *Physalaemus cuvieri*;
2. Realizar ensaios de inibição dos isolados bacterianos contra o Bd;
3. Realizar o teste de atividade hemolítica dos isolados.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Reativação e caracterização das coleções microbianas

Foram analisadas duas coleções microbianas oriundas de amostras de ninhos de espuma de rãs coletadas no estado do Ceará. A primeira foi coletada em 2018, em São Gonçalo do Amarante, sob a licença SISBIO 58036-6, de *Adenomera hylaedactyla*, por Martins (2020), e a outra coletada em 2019, em Pacatuba, sob a licença SISBIO 58036-1, de *Leptodactylus vastus* e *Physalaemus cuvieri*, por Castro (2019), totalizando 183 morfotipos. Os isolados bacterianos foram identificados pelos autores por meio de sequenciamento do gene ribossomal 16S a nível de gênero, com exceção de 12 morfotipos. As coleções foram armazenadas no Laboratório de Recursos Genéticos (LARGEN) da Universidade Federal do Ceará (UFC). Para reativação dos microrganismos, estes foram repicados. Inicialmente, foram aliqüotados 200 µL da cultura criogênica em 5 mL de caldo TGE (triptona 5 g/L, glicose 1 g/L; extrato de levedura 2,5 g/L) e incubados em shaker com agitação de 150 rpm a 35 °C por 24 horas. Após incubação, as culturas foram repicadas em meio ATGE (composição do TGE com adição de ágar 15 g/L) em placa. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35 °C por 24 horas até a observação de crescimento e obtenção de culturas isoladas. Em caso de não crescimento das bactérias em TGE, foi utilizado um meio de enriquecimento mais rico, como o caldo BHI. Caso ainda não observado crescimento, foi utilizado um meio seletivo específico para o gênero do microrganismo. A morfologia das colônias isoladas foram comparadas com a descrição previamente realizada. Após repiques e renovação das culturas, foram montadas coleções criogênicas para armazenamento a -20 °C. As bactérias foram armazenadas em microtubos de 1,5 ml estéreis, contendo 600 µl de cultura bacteriana crescida por 24 horas e 400 µl de glicerol a 50%, constituindo uma concentração final de 20% de glicerol. As coleções foram armazenadas no LARGEN a -20° C (coleção de uso) e -80° C (coleção de estoque).

### 4.2 Ensaio anti-Bd

#### 4.2.1 Ensaio anti-Bd de difusão em meio sólido

A avaliação do potencial inibidor do patógeno Bd foi realizada in vitro, por metodologia de crescimento em placa, baseado no trabalho de Harris et al. (2006). Para os

testes de inibição foi utilizada a cepa de Bd GPL CLFT131. Para obtenção de uma suspensão de zoósporos de Bd com densidade aproximada de  $10^6$  zoósporos/mL, uma cultura pura do patógeno Bd foi repicada para meio líquido triptona 1% (triptona 10 g/L), seguido de incubação a 21 °C por 72 a 96 horas, sob agitação de 150 rpm. A suspensão foi ajustada para OD de  $0,015 \pm 0,001$  sob leitura de 490 nm (aprox.  $10^6$  zoósporos/mL) e depois diluída 10 vezes, até a obtenção de uma suspensão com  $10^5$  zoósporos/mL. As culturas dos isolados bacterianos a serem avaliadas, assim como o controle negativo, uma cepa *Escherichia coli* ATCC, foram inoculadas em caldo Triptona 1% e incubadas a 35 °C por 18 a 24 horas sob agitação de 150 rpm. O inóculo foi ajustado para densidade óptica (OD) igual a  $1,0 \pm 0,05$  sob leitura de absorbância de 600 nm.

O teste foi realizado em placas de Petri 120 mm x 20 mm contendo 25 ml de meio de cultura Ágar-Triptona 1% (ágar 10 g/L; Triptona 10 g/L). Primeiramente, foram inoculados 2 ml da suspensão de zoósporos sobre o meio em placa e homogeneizado com uma alça de Drigalsky, possibilitando a cobertura de toda a superfície do ágar. Em seguida, a placa foi deixada aberta no interior da capela de fluxo laminar até que o líquido estivesse seco. Foram adicionados 10 µL das culturas dos isolados bacterianos na placa, com distância marcada de aproximadamente 30° entre elas, a um centímetro da borda da placa. Após a inoculação das bactérias, as placas foram incubadas a 21° C por 72 a 96 horas. O experimento foi realizado em duplicatas. Os morfotipos que apresentaram inibição, evidente pela observação de halo ao redor das culturas bacterianas, foram selecionados para continuidade dos estudos.

#### **4.2.2 Ensaio anti-Bd em meio líquido**

A metodologia de quantificação da atividade inibitória para Bd foi realizada conforme o método de Bell et al. (2013), com as modificações de Becker et al. (2015), Bletz et al. (2017), Rebollar et al. (2019) e Bezerra (2021).

Para os testes de inibição foi utilizada a cepa de Bd GPL CFLT131. Os inóculos de Bd foram preparados a partir da cultura pura do fungo crescida em caldo triptona 1% por 3-5 dias, a 21 °C e sob agitação de 150 rpm. A suspensão foi ajustada para OD de  $0,015 \pm 0,001$  sob leitura de 490 nm (aprox.  $10^6$  zoósporos/mL). As bactérias-teste foram inoculadas em caldo triptona 1% e incubadas por 18-24 horas a 35 °C sob agitação de 150 rpm. Após o crescimento, a OD das culturas foi ajustada para  $1,0 \pm 0,05$  sob a absorbância de 600 nm. O co-cultivo foi feito com 2 mL de cada suspensão, do Bd e da bactéria teste, após ajuste de OD, e

incubado a 21° C por 72-96 horas sob agitação de 150 rpm. Após incubação, os tubos de co-cultura foram centrifugados a 7500 rpm por 20 minutos e os sobrenadantes foram filtrados em membrana de poro 0,22 µm para obtenção de um sobrenadante livre de células (CFS). O sobrenadante foi congelado a -20° C até o momento da análise em microplaca.

O teste de inibição em meio líquido do Bd foi realizado em placas de 96 poços com fundo chato estéreis. Todas as amostras foram analisados em triplicata, e os controles em quadruplicata. Para os poços-testes foram adicionados 50 µL de CFS e 50 µL de suspensão do Bd, contendo aproximadamente  $2 \times 10^6$  zoósporos de Bd/mL. Foram considerados 4 controles: 1) 100 µL de suspensão contendo aproximadamente  $2 \times 10^6$  zoósporos de Bd/mL em caldo triptona 1% (controle positivo); 2) 50 µL de suspensão contendo aproximadamente  $2 \times 10^6$  zoósporos de Bd/mL adicionado de 50 µL água destilada estéril (controle depletado de nutrientes); 3) 50 µL de suspensão contendo aproximadamente  $2 \times 10^6$  zoósporos de Bd/mL em caldo triptona 1% mortos pelo calor (controle morto pelo calor) adicionados de 50 µL de caldo triptona 1% estéril e 4) 100 µL de caldo triptona 1% estéril (controle negativo). O controle morto pelo calor foi preparado pela exposição do tubo contendo suspensão de  $2 \times 10^6$  zoósporos/mL em caldo triptona 1% a calor de 80 °C por 1 hora em banho-maria. Os controles foram analisados em quadruplicata. As placas de ensaio foram incubadas a 21 °C com crescimento microbiano medido através da análise de densidade óptica (OD) em leitor de microplacas ELISA, no comprimento de onda 492 nm, nos dias 0, 3, 7 e 10.

As leituras foram então plotadas em reta de regressão linear das leituras de OD ao longo dos dias através da média dos valores das triplicatas, para as amostras, e quadruplicatas, para os controles. A inclinação média de cada isolado foi dividida pela inclinação média do controle depletado de nutrientes, para determinação da proporção de crescimento. Esse valor foi subtraído de 1 para determinar a pontuação de inibição para o fungo, assim, valores positivos indicam inibição e eventuais valores negativos indicam facilitação de crescimento do Bd. Foram avaliadas cinco categorias: (1) inibição forte quando o valor obtido for  $\geq 0,75$ ; (2) inibição moderada quando o valor for  $< 0,75$  e  $\geq 0,50$ ; (3) inibição fraca quando o valor for  $< 0,50$  e  $\geq 0,25$ ; (4) sem inibição quando o valor for  $< 0,25$  e  $\geq -0,25$  e (5) facilitação quando o valor for  $< -0,25$ .

### 4.3 Atividade hemolítica

Para determinar o potencial patogênico dos isolados, foi analisada a produção de hemolisinas, por meio da avaliação da atividade hemolítica. Para tal, cada estirpe foi cultivada

em meio TGE (triptona 5 g/L, glicose 1 g/L e extrato de levedura 2,5 g/L) e incubada a 35°C por 24h. Em seguida, 10 µL de cultura foram inoculados em meio ágar sangue (peptona especial 23 g/L, amido 1 g/L, cloreto de sódio 5 g/L, sangue de carneiro desfibrinal 50 mL/L, ágar 14 g/L), e incubados a 35°C por 48h. Foi utilizado como controle positivo uma cepa de *Bacillus cereus* LAMI13. Caso observada presença de halo ao redor da colônia, o isolado foi considerado positivo para atividade hemolítica, caso ausência, negativo.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Reativação e caracterização das coleções microbianas

Foram reativados todos os 183 isolados pertencentes às coleções microbianas dos ninhos de espumas. Além disso, foi elaborada uma ficha com os isolados, imagens de suas colônias isoladas, suas identificações moleculares e a descrição da morfologia de cada isolado bacteriano.

### 5.2 Ensaio anti-Bd

#### 5.2.1 Ensaio anti-Bd de difusão em meio sólido

O ninho de espuma de *Adenomera hylaedactyla* apresentou 14 cepas inibitórias do Bd (Tabela 1), representando 46,67% da microbiota isolada do ninho. Das cepas do ninho de *Leptodactylus vastus*, também 14 apresentaram atividade inibitória (Tabela 2), representando 25,45% das cepas. Já o ninho de *Physalaemus cuvieri* apresentou 26 cepas inibitórias (Tabela 3), representando 26,53%. A figura 4 exemplifica os resultados obtidos nos ensaios.

Figura 4 – Inibição do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* por isolados bacterianos de ninhos de espuma de anuros.



Fonte: Elaborado pelo autor. Os isolados que formarem halo no meio, como o isolado *Serratia* sp. C4, apresentam atividade inibitória contra Bd.



Tabela 1 - Resultado dos ensaios de inibição em meio sólido do *Batrachochytrium dendrobatidis* e dos testes de atividade hemolítica das cepas do ninho de *Adenomera hylaedactyla*.

Cepa	Atividade anti-Bd	Atividade hemolítica	Cepa	Atividade anti-Bd	Atividade hemolítica
<i>Chryseobacterium sp. A1</i>			<i>Serratia sp. B7</i>		
<i>Stenotrophomonas sp. A2</i>			<b>B8</b>		
<i>Bacillus sp. A3</i>			<i>Enterobacter sp. B9</i>		
<i>Comamonas sp. A4</i>			<i>Enterobacter sp. B10</i>		
<i>Stenotrophomonas sp. A6</i>			<i>Enterobacter sp. B11</i>		
<i>Serratia sp. A7</i>			<i>Enterobacter sp. B12</i>		
<i>Bacillus sp. A8</i>			<i>Enterobacter sp. C1</i>		
<i>Bacillus sp. A9</i>			<i>Enterobacter sp. C2</i>		
<i>Bacillus sp. A10</i>			<i>Enterobacter sp. C3</i>		
<b>A11</b>			<i>Serratia sp. C4</i>		
<i>Enterobacter sp. B1</i>			<i>Serratia sp. C5</i>		
<i>Lysinibacillus sp. B2</i>			<i>Serratia sp. C6</i>		
<i>Bacillus sp. B3</i>			<i>Chryseobacterium sp. C7</i>		
<i>Bacillus sp. B4</i>			<i>Enterobacter sp. C8</i>		
<b>B5</b>			<i>Bacillus sp. C9</i>		

Fonte: Elaborado pelo autor. As células escuras representam atividade positiva. Os isolados sem identificação de gênero são aquelas cuja identificação molecular a nível de gênero não foi possível.

Tabela 2 - Resultado dos ensaios de inibição em meio sólido do *Batrachochytrium dendrobatidis* e dos testes de atividade hemolítica das cepas do ninho de *Leptodactylus vastus*.

Cepa	Atividade anti-Bd	Atividade hemolítica	Cepa	Atividade anti-Bd	Atividade hemolítica
<i>Pedobacter sp. L1</i>			<i>Pseudomonas sp. L50</i>		
<i>Brevundimonas sp. L3</i>			<i>Pseudomonas sp. L51</i>		
<i>Niabella sp. L4</i>			<i>Pseudomonas sp. L52</i>		
<i>Burkholderia sp. L5</i>			<b>L58</b>		
<i>Burkholderia sp. L6</i>			<i>Herbaspirillum sp. L59</i>		

<i>Dyella</i> sp. L7			<i>Comamonas</i> sp. L61		
L9			<i>Pandoraea</i> sp. L62		
<i>Kurthia</i> sp. L10			<i>Comamonas</i> sp. L66		
<i>Burkholderia</i> sp. L12			<i>Enterobacter</i> sp. L74		
<i>Burkholderia</i> sp. L13			<i>Aeromonas</i> sp. L83		
<i>Chryseobacterium</i> sp. L14			<i>Aeromonas</i> sp. L91		
<i>Chryseobacterium</i> sp. L15			L95		
<i>Microbacterium</i> sp. L17			<i>Aeromonas</i> sp. L98		
L19			L104		
<i>Pseudomonas</i> sp. L21			<i>Acidovorax</i> sp. L105		
<i>Pseudomonas</i> sp. L22			L107		
L23			L108		
<i>Pseudomonas</i> sp. L24			<i>Pseudomonas</i> sp. L109		
<i>Pseudomonas</i> sp. L28			<i>Herbaspirillum</i> sp. L113		
<i>Pseudomonas</i> sp. L31			<i>Comamonas</i> sp. L114		
<i>Streptomyces</i> sp. L32			<i>Aeromonas</i> sp. L115		
<i>Herbaspirillum</i> sp. L35			<i>Pseudomonas</i> sp. L118		
L36			<i>Aeromonas</i> sp. L119		
<i>Aeromonas</i> sp. L39			<i>Kurthia</i> sp. L120		
L43			L121		
<i>Citrobacter</i> sp. L44			<i>Chryseobacterium</i> sp. L121 A		
L47			<i>Serratia</i> sp. L122		
<i>Pseudomonas</i> sp. L49					

Fonte: Elaborado pelo autor. As células escuras representam atividade positiva. Os isolados sem identificação de gênero são aquelas cuja identificação molecular a nível de gênero não foi possível.

Tabela 3 - Resultado dos ensaios de inibição em meio sólido do *Batrachochytrium dendrobatidis* e dos testes de atividade hemolítica das cepas do ninho de *Physalaemus cuvieri*.

Cepa	Atividade anti-Bd	Atividade hemolítica	Cepa	Atividade anti-Bd	Atividade hemolítica
<i>Rheinheimera</i> sp. P1			<i>Enterobacter</i> sp. P82		
<i>Serratia</i> sp. P2			<i>Sphingobacterium</i> sp. P83		
<i>Chryseobacterium</i> sp. P3			<i>Comamonas</i> sp. P86		
<i>Bacillus</i> sp. P4			P87		
<i>Vogesella</i> sp. P5			<i>Acidovorax</i> sp. P89		
<i>Aeromonas</i> sp. P6			<i>Pseudomonas</i> sp. P90		
<i>Kurthia</i> sp. P8			<i>Pseudomonas</i> sp. P91		
<i>Rheinheimera</i> sp. P10			<i>Ochrobactrum</i> sp. P92		
P11			<i>Acinetobacter</i> sp. P94		
<i>Shewanella</i> sp. P12			P95		
P13			<i>Sphingobacterium</i> sp. P96		
<i>Comamonas</i> sp. P14			P97		
<i>Pseudomonas</i> sp. P15			<i>Pseudomonas</i> sp. P98		
<i>Stenotrophomonas</i> sp. P16			<i>Comamonas</i> sp. P100		
P17			P101		
<i>Chryseobacterium</i> sp. P18			<i>Bacillus</i> sp. P104		
<i>Flavobacterium</i> sp. P19			<i>Comamonas</i> sp. P105		
<i>Empedobacter</i> sp. P20			<i>Pseudomonas</i> sp. P107		
P21			<i>Klebsiella</i> sp. P108		
<i>Pseudomonas</i> sp. P23			<i>Pseudomonas</i> sp. P109		
<i>Pseudomonas</i> sp. P24			<i>Pseudomonas</i> sp. P111		
<i>Pseudomonas</i> sp. P25			<i>Pseudomonas</i> sp. P112		
<i>Flavobacterium</i> sp. P27			<i>Citrobacter</i> sp. P115		
<i>Pseudomonas</i> sp. P31			<i>Comamonas</i> sp. P117		
<i>Pseudomonas</i> sp. P32			<i>Pseudomonas</i> sp. P119		

<i>Pseudomonas</i> sp. P35			<i>Aeromonas</i> sp. P120		
<i>Pseudomonas</i> sp. P36			P121		
<i>Sphingobacterium</i> sp. P37			<i>Enterobacter</i> sp. P124		
<i>Vogesella</i> sp. P38			<i>Aeromonas</i> sp. P124B		
<i>Vogesella</i> sp. P40			<i>Pseudomonas</i> sp. P127		
<i>Pseudomonas</i> sp. P42			<i>Pseudomonas</i> sp. P128		
P43			<i>Pseudomonas</i> sp. P129		
<i>Pseudomonas</i> sp. P46			<i>Klebsiella</i> sp. P130		
<i>Acinetobacter</i> sp. P47			<i>Pseudomonas</i> sp. P131		
<i>Enterobacter</i> sp. P48			<i>Pseudomonas</i> sp. P132		
<i>Pseudomonas</i> sp. P49			<i>Pseudomonas</i> sp. P137		
<i>Pseudomonas</i> sp. P54			<i>Pseudomonas</i> sp. P138		
<i>Aeromonas</i> sp. P55			<i>Ochrobactrum</i> sp. P139		
<i>Bacillus</i> sp. P57			<i>Pseudomonas</i> sp. P143		
<i>Curtobacterium</i> sp. P59			P144		
<i>Pseudomonas</i> sp. P63			<i>Acinetobacter</i> sp. P145		
P67			<i>Pseudomonas</i> sp. P147		
<i>Rhizobium</i> sp. P71			<i>Pseudomonas</i> sp. P153		
<i>Acinetobacter</i> sp. P75			<i>Aeromonas</i> sp. P154		
<i>Comamonas</i> sp. P76			<i>Pseudomonas</i> sp. P158		
P77			<i>Pseudomonas</i> sp. P159		
<i>Aeromonas</i> sp. P79			<i>Pseudomonas</i> sp. P160		
<i>Pseudomonas</i> sp. P80			<i>Pseudomonas</i> sp. P162		
<i>Pseudomonas</i> sp. P81			<i>Pseudomonas</i> sp. P167		

Fonte: Elaborado pelo autor. As células escuras representam atividade positiva. Os isolados sem identificação de gênero são aquelas cuja identificação molecular a nível de gênero não foi possível.

### 5.2.2 Ensaio anti-Bd em meio líquido

Não foi possível realizar o experimento com todas os isolados obtidos, sendo testados apenas 51, de um total de 183, todas tendo apresentado anteriormente resultado positivo no experimento em meio sólido, com exceção de 1. Nas condições experimentais estabelecidas, foram obtidas 6 cepas que apresentaram alta inibição do Bd, sendo 3 do ninho de *Leptodactylus vastus* e 3 do ninho de *Physalaemus cuvieri*; 8 cepas de inibição moderada, sendo 1 de *Adenomera hylaedactyla*, 3 de *L. vastus* e 4 de *P. cuvieri* e 4 cepas de inibição baixa, sendo 1 de *A. hylaedactyla*, 1 de *L. vastus* e 2 de *P. cuvieri*. Foram, no entanto, obtidas 4 cepas que não tiveram efeito de inibição e 28 cepas que causaram facilitação do crescimento do fungo (Tabela 4). As figuras 6 a 15 demonstram o crescimento dos isolados ao longo do tempo de cultivo, assim como o crescimento dos controles.

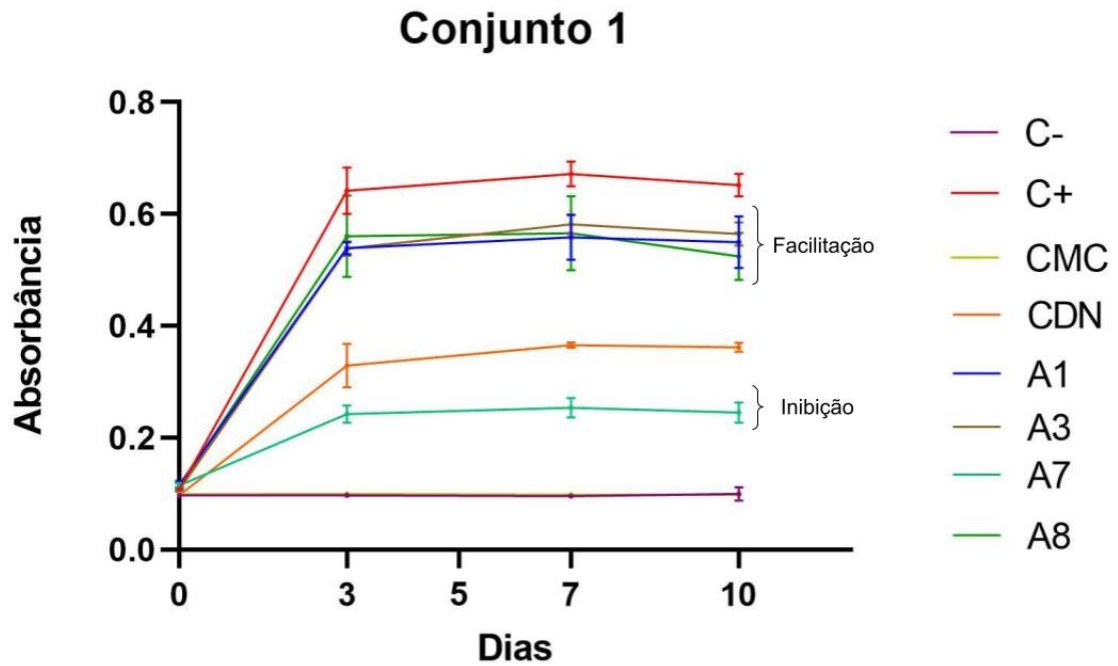
Tabela 4 - Resultado dos ensaios de inibição em meio líquido do *Batrachochytrium dendrobatidis*.

Cepa	Taxa de inibição	Classificação	Cepa	Taxa de inibição	Classificação
<i>Chryseobacterium</i> sp. A1	-0.77	Facilitação	<i>Pseudomonas</i> sp. P138	-0.93	Facilitação
<i>Bacillus</i> sp. A3	-0.78	Facilitação	P144	-0.98	Facilitação
<i>Bacillus</i> sp. A8	-0.55	Facilitação	B5	-0.11	Sem efeito
<i>Bacillus</i> sp. A9	-0.88	Facilitação	L19	0.11	Sem efeito
<i>Bacillus</i> sp. A10	-0.92	Facilitação	<i>Pseudomonas</i> sp. L24	-0.19	Sem efeito
<i>Lysinibacillus</i> sp. B2	-1.07	Facilitação	P11	-0.2	Sem efeito
<i>Bacillus</i> sp. B3	-0.78	Facilitação	<i>Pseudomonas</i> sp. P153	-0.08	Sem efeito
<i>Serratia</i> sp. B7	-0.54	Facilitação	<i>Serratia</i> sp. A7	0.49	Baixa inibição
<i>Serratia</i> sp. C4	-0.47	Facilitação	<i>Chryseobacterium</i> sp. L121A	0.46	Baixa inibição
<i>Serratia</i> sp. C5	-0.51	Facilitação	<i>Acinetobacter</i> sp. P94	0.31	Baixa inibição
<i>Bacillus</i> sp. C9	-1.07	Facilitação	<i>Pseudomonas</i> sp. P137	0.27	Baixa inibição
<i>Burkholderia</i> sp. L13	-0.73	Facilitação	B8	0.68	Moderada inibição
L23	-0.37	Facilitação	<i>Microbacterium</i> sp. L6	0.59	Moderada inibição
<i>Pseudomonas</i> sp. L28	-0.48	Facilitação	<i>Chryseobacterium</i> sp. L15	0.55	Moderada

					inibição
<i>Pseudomonas</i> sp. L109	-0.74	Facilitação	<i>Aeromonas</i> sp. L83	0.68	Moderada inibição
<i>Pseudomonas</i> sp. L118	-0.35	Facilitação	<i>Aeromonas</i> sp. P6	0.72	Moderada inibição
<i>Serratia</i> sp. L122	-0.63	Facilitação	<i>Pseudomonas</i> sp. P31	0.71	Moderada inibição
<i>Serratia</i> sp. P2	-0.49	Facilitação	<i>Pseudomonas</i> sp. P112	0.54	Moderada inibição
<i>Chryseobacterium</i> sp. P3	-0.93	Facilitação	<i>Pseudomonas</i> sp. P127	0.61	Moderada inibição
<i>Kurthia</i> sp. P8	-0.6	Facilitação	<i>Pseudomonas</i> sp. L22	0.83	Alta inibição
P13	-0.61	Facilitação	<i>Aeromonas</i> sp. L91	0.94	Alta inibição
<i>Stenotrophomonas</i> sp. P16	-0.28	Facilitação	<i>Aeromonas</i> sp. L39	0.94	Alta inibição
P17	-1.09	Facilitação	<i>Pseudomonas</i> sp. P119	1	Alta inibição
P21	-0.63	Facilitação	<i>Aeromonas</i> sp. P120	0.82	Alta inibição
<i>Pseudomonas</i> sp. P24	-0.64	Facilitação	<i>Pseudomonas</i> sp. P128	0.9	Alta inibição
<i>Pseudomonas</i> sp. P111	-0.34	Facilitação			

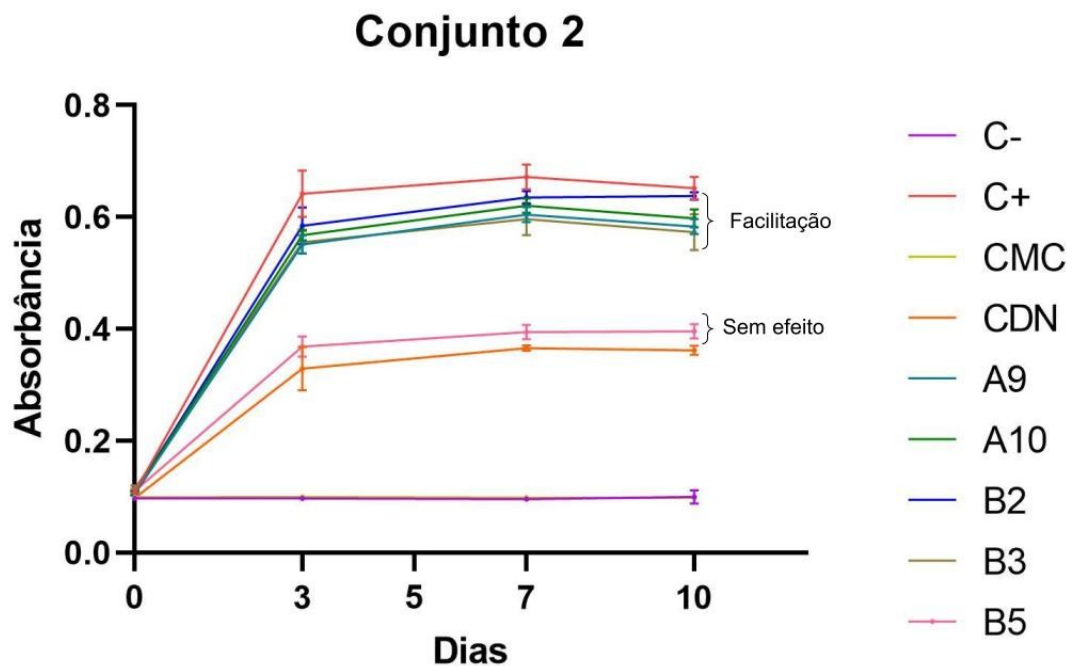
Fonte: Elaborado pelo autor. Os isolados sem identificação de gênero são aquelas cuja identificação molecular a nível de gênero não foi possível.

Figura 5 – Crescimento dos isolados de ninhos de espuma de anuros ao longo do tempo de cultivo (Conjunto 1).



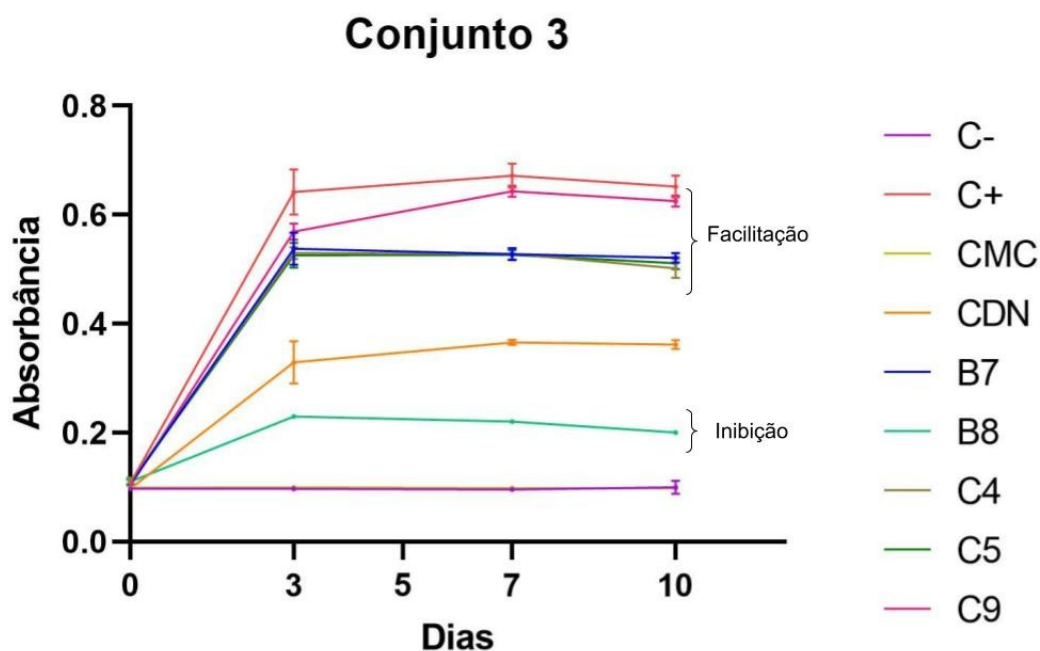
Fonte: Elaborado pelo autor. C- refere-se ao controle negativo, C+ ao controle positivo, CMC ao controle morto pelo calor, CDN ao controle depletado de nutrientes e os demais aos isolados obtidos.

Figura 6 – Crescimento dos isolados de ninhos de espuma de anuros ao longo do tempo de cultivo (Conjunto 2).



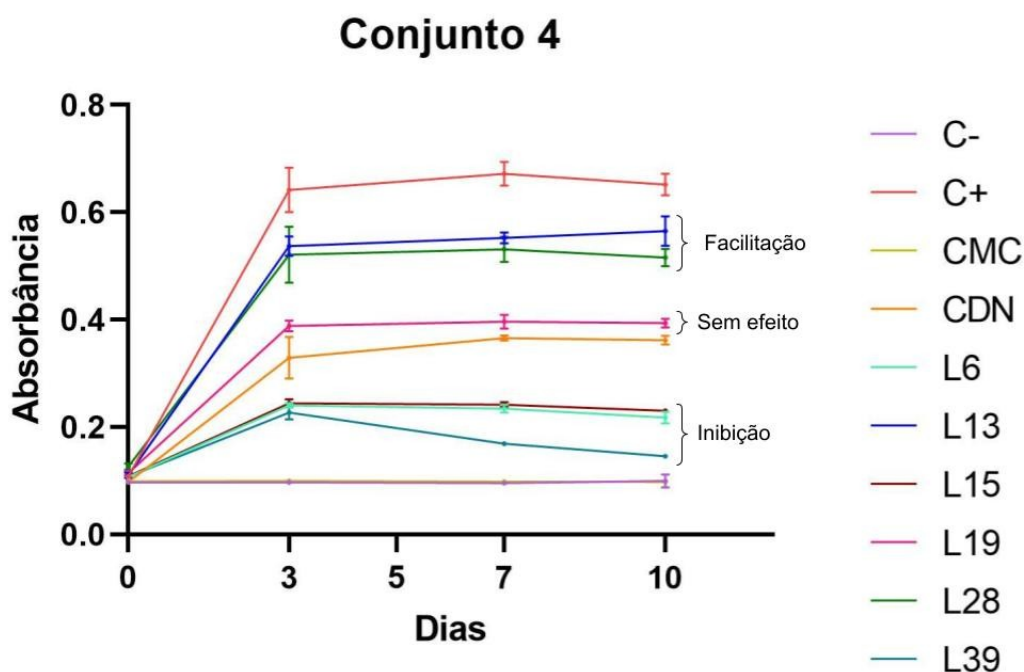
Fonte: Elaborado pelo autor. C- refere-se ao controle negativo, C+ ao controle positivo, CMC ao controle morto pelo calor, CDN ao controle depletado de nutrientes e os demais aos isolados obtidos.

Figura 7 – Crescimento dos isolados de ninhos de espuma de anuros ao longo do tempo de cultivo (Conjunto 3).



Fonte: Elaborado pelo autor. C- refere-se ao controle negativo, C+ ao controle positivo, CMC ao controle morto pelo calor, CDN ao controle depletado de nutrientes e os demais aos isolados obtidos.

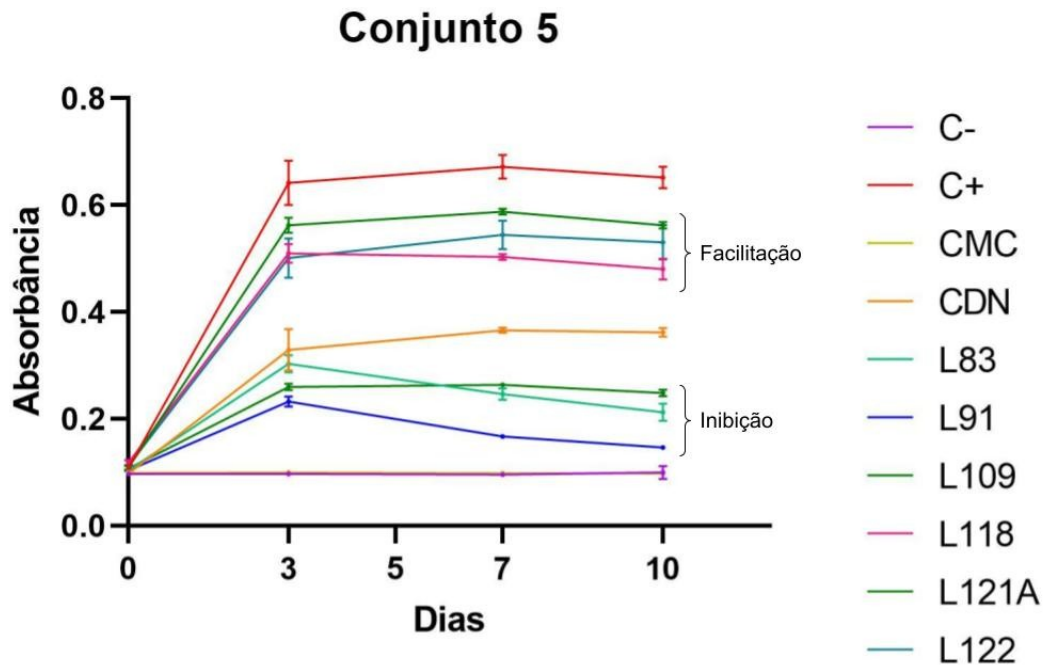
Figura 8 – Crescimento dos isolados de ninhos de espuma de anuros ao longo do tempo de cultivo (Conjunto 4).



Fonte: Elaborado pelo autor. C- refere-se ao controle negativo, C+ ao controle positivo, CMC ao controle morto pelo calor, CDN ao controle depletado de nutrientes e os demais aos isolados obtidos.

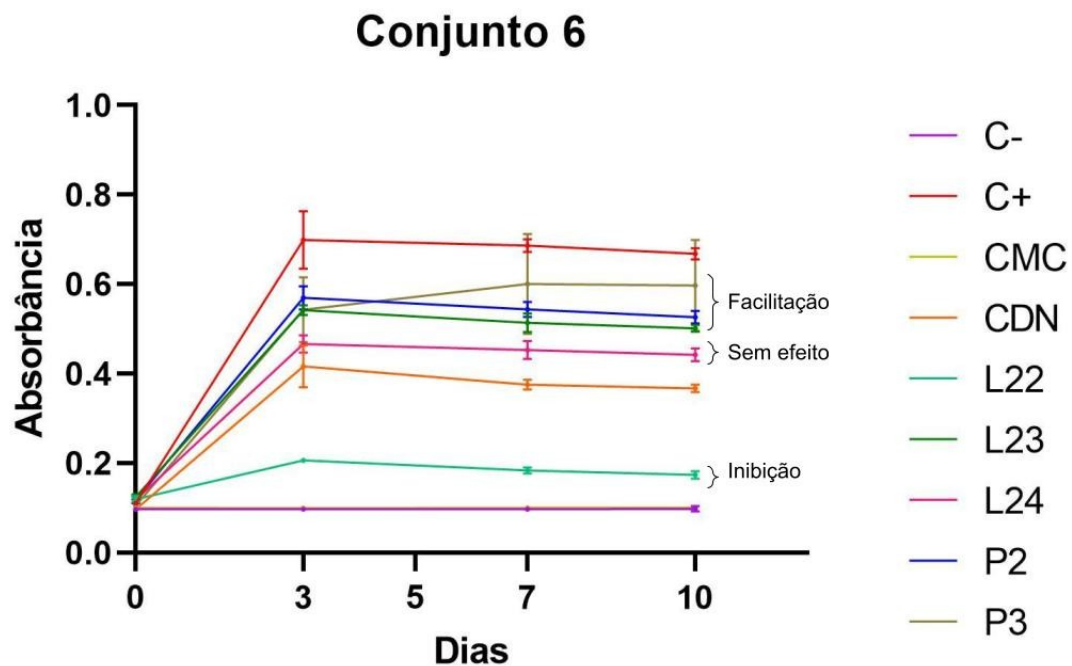


Figura 9 – Crescimento dos isolados de ninhos de espuma de anuros ao longo do tempo de cultivo (Conjunto 5).



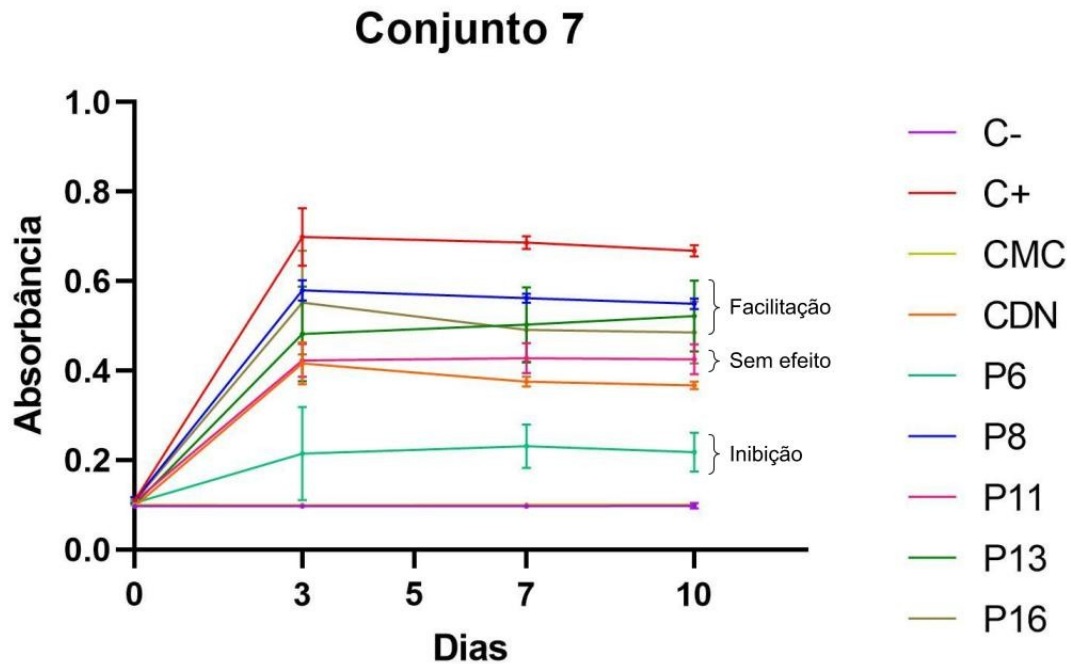
Fonte: Elaborado pelo autor. C- refere-se ao controle negativo, C+ ao controle positivo, CMC ao controle morto pelo calor, CDN ao controle depletado de nutrientes e os demais aos isolados obtidos.

Figura 10 – Crescimento dos isolados de ninhos de espuma de anuros ao longo do tempo de cultivo (Conjunto 6).



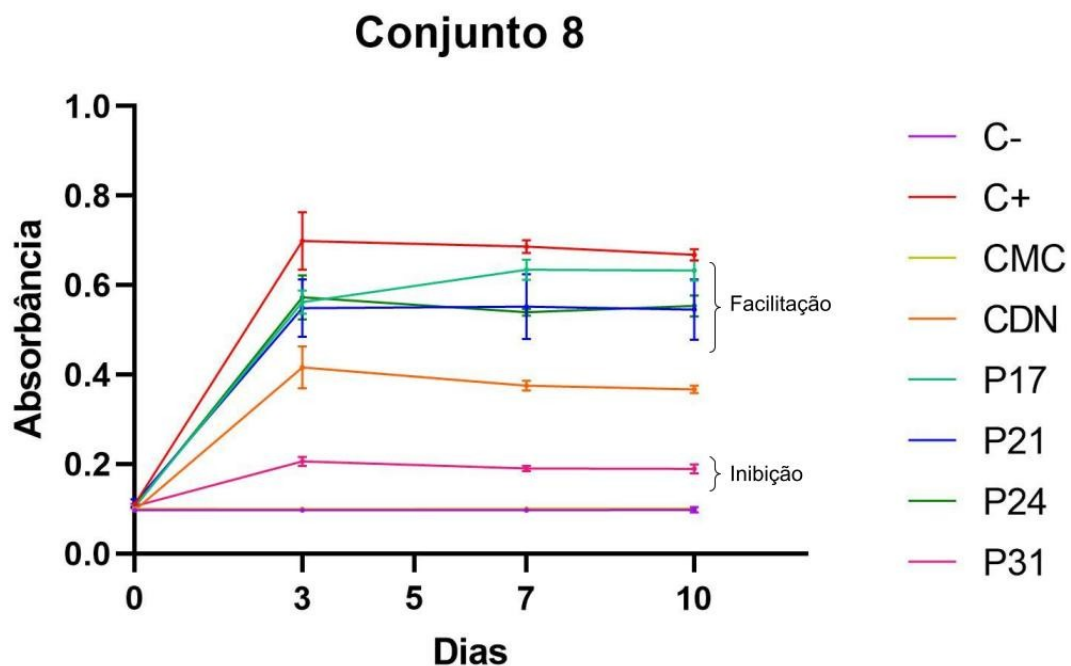
Fonte: Elaborado pelo autor. C- refere-se ao controle negativo, C+ ao controle positivo, CMC ao controle morto pelo calor, CDN ao controle depletado de nutrientes e os demais aos isolados obtidos.

Figura 11 – Crescimento dos isolados de ninhos de espuma de anuros ao longo do tempo de cultivo (Conjunto 7).



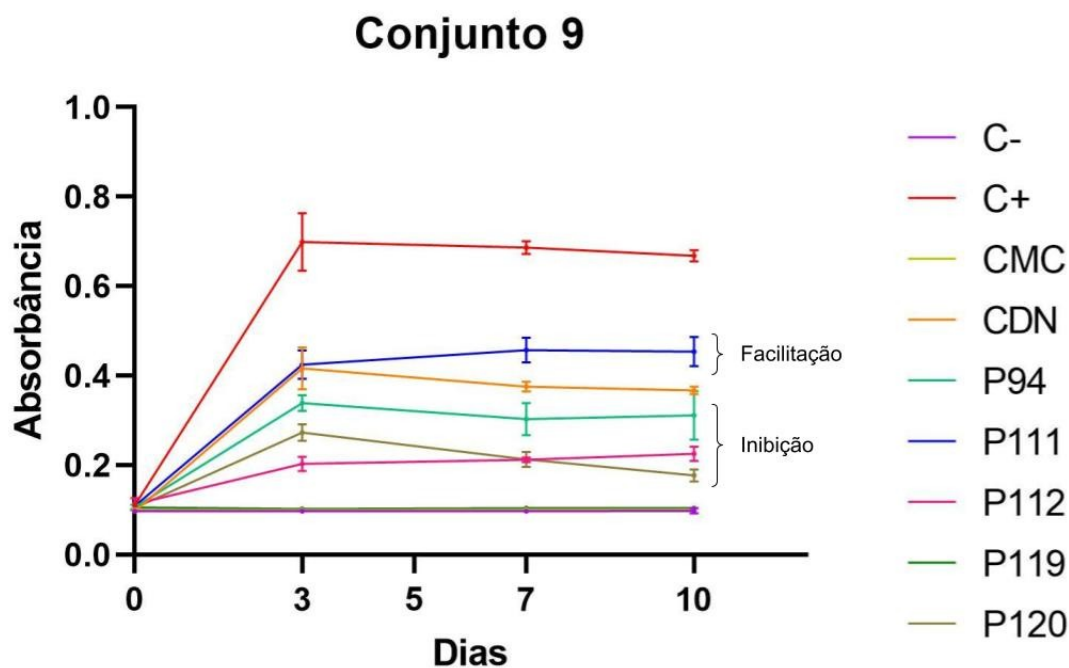
Fonte: Elaborado pelo autor. C- refere-se ao controle negativo, C+ ao controle positivo, CMC ao controle morto pelo calor, CDN ao controle depletado de nutrientes e os demais aos isolados obtidos.

Figura 12 – Crescimento dos isolados de ninhos de espuma de anuros ao longo do tempo de cultivo (Conjunto 8).



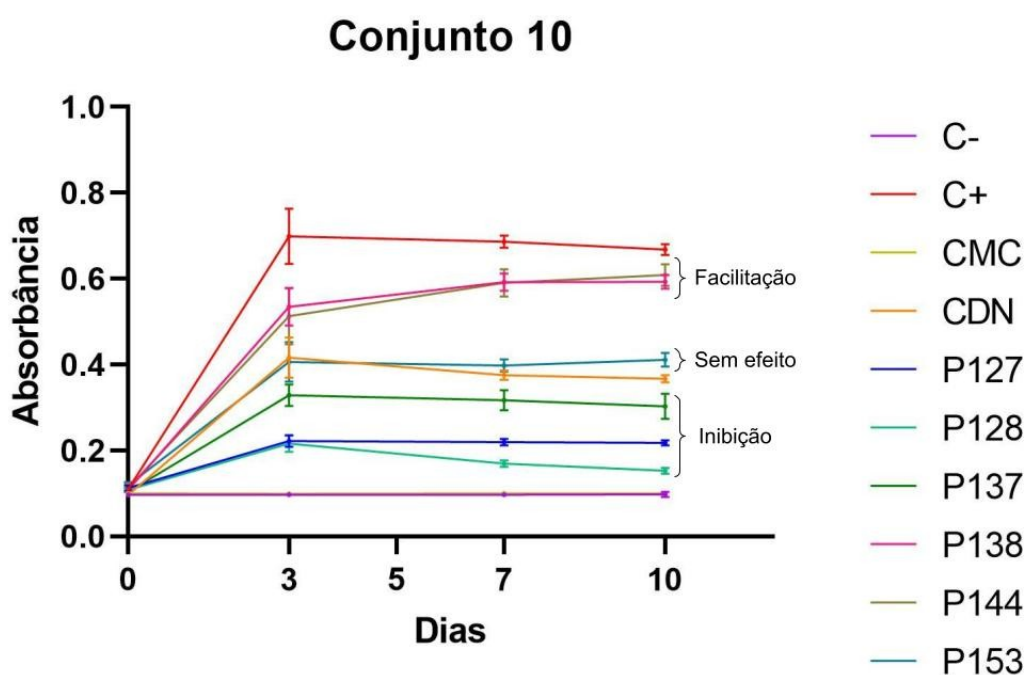
Fonte: Elaborado pelo autor. C- refere-se ao controle negativo, C+ ao controle positivo, CMC ao controle morto pelo calor, CDN ao controle depletado de nutrientes e os demais aos isolados obtidos.

Figura 13 – Crescimento dos isolados de ninhos de espuma de anuros ao longo do tempo de cultivo (Conjunto 9).



Fonte: Elaborado pelo autor. C- refere-se ao controle negativo, C+ ao controle positivo, CMC ao controle morto pelo calor, CDN ao controle depletado de nutrientes e os demais aos isolados obtidos.

Figura 14 – Crescimento dos isolados de ninhos de espuma de anuros ao longo do tempo de cultivo (Conjunto 10).

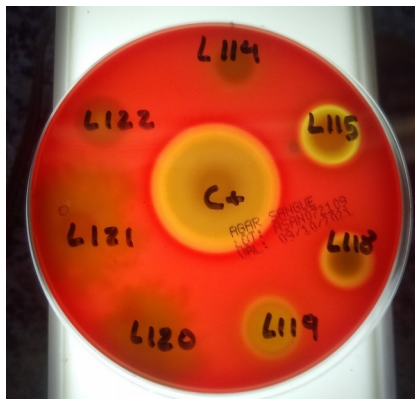


Fonte: Elaborado pelo autor. C- refere-se ao controle negativo, C+ ao controle positivo, CMC ao controle morto pelo calor, CDN ao controle depletado de nutrientes e os demais aos isolados obtidos.

### 5.3 Atividade hemolítica

Do ninho de espuma de *Adenomera hylaedactyla*, 9 cepas (30%) das cepas apresentaram atividade hemolítica (Tabela 1), todas do tipo  $\beta$ -hemólise (BUXTON, 2016), ou seja, hemólise completa das hemácias do meio. Já do ninho de *Leptodactylus vastus*, 24 cepas (43,64%) apresentaram atividade (Tabela 2), também do tipo  $\beta$ -hemólise. Do ninho de *Physalaemus cuvieri*, 39 cepas (39,79%) apresentaram atividade positiva do tipo  $\beta$ -hemólise (Tabela 3). A figura 4 exemplifica os resultados obtidos nos ensaios.

Figura 15 – Atividade hemolítica produzida por isolados do ninho de espuma do anuro *Leptodactylus vastus* em meio ágar sangue.



Fonte: Elaborado pelo autor. Os isolados que formaram halo no meio, como *Aeromonas* sp. L115, apresentam atividade hemolítica. C+ representa o controle positivo.

## 6. DISCUSSÃO

No ensaio anti-Bd de difusão em meio sólido, 29,35% das cepas dos ninhos de espuma apresentaram atividade inibitória. Essas estirpes estão distribuídas em 15 gêneros, que são *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Chryseobacterium*, *Kurthia*, *Lysinibacillus*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia* e *Stenotrophomonas*, sendo 9 cepas de gênero não identificado. Com exceção do gênero *Kurthia*, todos já foram descritos com essa atividade anteriormente (e.g. BECKER et al., 2015; MADISON et al., 2017; BELL et al., 2018; FLECHAS et al., 2019), sendo, no entanto, os isolados provindos da microbiota da pele de anuros. O anexo A apresenta uma relação entre todos os gêneros identificados nos ninhos e a descrição prévia de suas atividades anti-Bd na literatura, assim como qual metodologia foi utilizada para a averiguar. Foram obtidas 20 cepas promissoras, não apresentando atividade hemolítica enquanto apresentaram atividade anti-Bd, sendo 3 do gênero *Chryseobacterium*, 1 *Kurthia*, 1 *Microbacterium*, 6 *Serratia*, 1 *Stenotrophomonas* e 3 *Pseudomonas*, além de 5 cepas cujo gênero não foi identificado.

Os resultados do ensaio anti-Bd em meio líquido, no entanto, foram diferentes daqueles vistos no ensaio em meio sólido. Apesar de serem testadas 50 cepas inibitórias e 1 não inibitória de acordo com o experimento anterior, foram obtidas categorias desde facilitação do crescimento do Bd a inibição alta (Tabela 4). A cepa L22, apesar de ser categorizada como não-inibitória no ensaio de difusão em meio sólido, apresentou alta inibição em microplaca, o que demonstra que, apesar de ambas as metodologias serem utilizadas na literatura, os resultados podem ser contrastantes. Por outro lado, apesar das condições de temperatura serem as mesmas, o tempo de incubação entre as placas e as microplacas foram diferentes, sendo 3 e 10 dias, respectivamente. Assim, para que possa ser realizada a comparação entre resultados, seria ideal que fossem testadas o mesmo período de incubação. Ainda, seria proveitoso realizar novamente o teste em meio sólido, mas com o sobrenadante livre de células, pois podem ter sido produzidos compostos durante o co-cultivo em meio líquido que não foram no meio sólido. Por outro lado, várias cepas inicialmente inibitórias foram posteriormente facilitadoras do crescimento do fungo, fenômeno que alerta para a necessidade de testes em condições ambientais semelhantes às aquelas que serão encontradas no ambiente no qual será aplicado o tratamento. O atual estudo foi o primeiro a comparar as duas metodologias aqui presentes.

Diversos fatores afetam a dinâmica da microbiota da pele dos anuros. Primeiramente, a diversidade e composição das comunidades microbianas variam de acordo com a espécie, inclusive variando entre espécies que coexistem no mesmo ambiente, assim como de acordo com o estágio de desenvolvimento do animal (KUENEMAN et al., 2014). Outro fator que influencia a estrutura da microbiota da pele dos anuros são os micro-habitats nos quais eles residem, podendo eles serem ripários, terrestres ou arbóreos (REBOLLAR et al., 2016). Esse efeito pode ser ligado a diversos fatores, como diferenças de reservatórios ambientais bacterianos, variação em condições ambientais e presença de patógenos, além de variações no pH, na salinidade, na temperatura e na umidade (MULETZ et al., 2012; KUENEMAN et al., 2014; REBOLLAR et al., 2016; REBOLLAR; MARTÍNEZ-UGALDE; ORTA, 2020). Por exemplo, no trabalho de Woodhams et al. (2014), foi observado que a produção de metabólitos secundários por bactérias anti-Bd é determinada pela temperatura de incubação. Fatores climáticos e geográficos também influenciam a microbiota de anfíbios, que varia em relação à diversidade quando ocorrem mudanças na temperatura e precipitação do ambiente (KUENEMAN et al., 2019; REBOLLAR et al., 2019).

É importante que para o uso como probióticos, sejam eliminadas espécies bacterianas que inibem o Bd em certas condições mas facilitam o crescimento em outras, sendo ideal que mantenham sua função protetiva em uma margem de temperatura que seja ecologicamente relevante (BLETZ et al., 2013). Com essas considerações, obtemos no estudo 5 cepas que foram positivas em ambos os ensaios de inibição, assim como não apresentaram atividade hemolítica, sendo elas *Serratia* sp. A7, B8 (gênero não identificado), *Microbacterium* sp. L6, *Chryseobacterium* sp. L15 e *Pseudomonas* sp. P137. Ainda, foi obtida uma cepa que não apresentou atividade anti-Bd em meio líquido, mas apresentou atividade em meio sólido, assim como não apresentou atividade hemolítica, sendo ela o isolado P11 (Gênero não identificado).

No total, 111 isolados (60,66%) testados não apresentaram hemólise, cenário positivo para a pesquisa, já que a atividade hemolítica pode representar um fator de virulência. Levando-se em consideração que as cepas escolhidas como probióticos serão aplicadas em ninhos de espuma, elas devem ser ambientalmente seguras, para evitar malefícios ao ambiente, além de evitar reações negativas do sistema imunológico do hospedeiro (BLETZ et al., 2013).

Apesar de não estudado até o momento se as bactérias hemolíticas dos ninhos poderiam afetar negativamente os anuros, é ideal evitar o seu uso, pois algumas espécies hemolíticas atuam no desenvolvimento de doenças, como ocorre na “doença da perna vermelha” (*Red Leg Syndrome*), na qual o animal desenvolve sintomas clínicos quando ocorre a atuação de uma enterotoxina e hemolisinas (GLIME e BOELEMA, 2017; SILVA, et al., 2020). O patógeno causador da doença, *Aeromonas hydrophila*, no entanto, deve estar presente na corrente sanguínea, assim atingindo órgãos, para que a doença se desenvolva, afetando, em especial, animais com a saúde comprometida (GLIME e BOELEMA, 2017).

O gênero *Serratia* é caracterizado pela produção de prodigiosina, composto que confere forte coloração vermelha à bactéria. É conhecido que esse pigmento causa inibição do crescimento do Bd (WOODHAMS et al., 2017), podendo tal fato ter contribuído na capacidade inibitória das cepas aqui testadas. Por outro lado, o gênero é conhecido por possuir diversas espécies patogênicas, como *Serratia marcescens* e *Serratia liquefaciens*, além de possuírem diversos fatores de virulência, sendo a atividade hemolítica apenas um deles (HORINOCHI et al., 2010). Apesar disso, são cepas ambientais, presentes na água, solo e ar, além de estarem presentes tanto na microbiota da pele de anfíbios quanto nos ninhos de espuma coletados (HARRISON et al., 2020; MADISON et al., 2017).

O gênero *Microbacterium* é comum em diversos ambientes, como solos, plantas e mares (MOUNIER et al., 2017). Diversos casos clínicos estão relacionados com espécies desse gênero (PANACKAL et al., 2013; LAM, NAIMARK e LEIS, 2018). Esse gênero, apesar de relatado na literatura com potencial inibitório contra o Bd (BECKER et al., 2015; ABARCA et al., 2021), foi relatado como o gênero com a maior proporção de isolados que facilitam o crescimento do fungo no trabalho de Becker et al. (2015).

O gênero *Chryseobacterium* é comumente encontrado em solos e água, assim como alimentos (STEINBERG e BURD, 2015). São indivíduos de baixa virulência, raramente relacionados com doenças humanas (BOOTH, 2014). Apesar disso, infecções causadas por *Chryseobacterium indologenes* em anuros e caudados são relatadas na literatura, os animais infectados estando geralmente imunossuprimidos ou em condições de estresse (GREEN e DENSMORE, 2007; ROURKE e ROSENBAUM, 2015). Alguns isolados de *Chryseobacterium* são relatados pelo seu papel de proteção na pele de anfíbios, sendo capaz de inibir até 3 genótipos diferentes do Bd (MULETZ-WOLZ et al., 2017; ANTWIS e HARRISON, 2018).

O gênero *Pseudomonas* pode ser encontrado em diversos ambientes, como solo, água, plantas e animais (COUSIN, 1999). Contêm múltiplas espécies patogênicas, como *P. syringae* e *P. aeruginosa* (DODD, 2014). É comumente encontrado na pele de anfíbios, assim como existem diversos relatos de isolados inibidores do Bd (FLECHAS et al., 2012; WOODHAMS et al., 2014). *P. aeruginosa* atua em infecções em anuros sob alto estresse, resultando em mortalidade moderada a alta (BRODKIN et al., 1992). Como os isolados promissores foram identificados somente a nível de gênero, ou não identificados, é importante que sejam classificados a nível de espécie, de forma a melhor avaliar a segurança no uso do tratamento probiótico.

Existem diferentes modos de ação com os quais a microbiota do hospedeiro pode auxiliar na sua proteção contra o Bd. Primeiramente, a disponibilidade de nutrientes e de espaço para o crescimento do fungo é limitada caso a densidade de bactérias residentes seja alta, assim sendo necessário que o tratamento probiótico seja composto por cepas que colonizam e persistam com eficiência na pele do anuro (BLETZ et al., 2013; HOLDEN et al., 2015). Ainda, bactérias simbióticas podem produzir compostos antifúngicos capazes de inibir o crescimento do Bd, como violeceína, prodigiosina e 2,4-Diacetylphloroglucinol (WOODHAMS et al., 2017). Algumas bactérias podem também induzir a produção de peptídeos antimicrobianos (AMPs) Bd-inibitórios pelo hospedeiro, assim como podem reduzir a necessidade de produção de AMPs, ou ainda terem crescimento promovido pelos AMPs (WOODHAMS et al., 2012; WOODHAMS et al., 2019).

Adicionalmente, um probiótico com múltiplas cepas poderia estabelecer uma comunidade com potencial anti-Bd que agiria sinergicamente ou que englobaria diferentes modos de ação contra o fungo, podendo essa mistura ser utilizada em diferentes espécies de anfíbios, assim como nos diferentes estágios de vida desses anfíbios (BLETZ et al., 2013).

Ainda, as bactérias probióticas não irão exibir a mesma capacidade de inibição para todas as cepas do fungo, a linhagem *Batrachochytrium dendrobatidis* GPL, por exemplo, apresenta ampla variação genotípica e de virulência (ANTWIS et al., 2015), assim um consórcio de bactérias seria mais adequado para combater a quitridiomicose. No trabalho de Loudon et al. (2014), diferentes culturas com múltiplos isolados apresentaram tanto efeito de sinergia como efeito de adição da capacidade inibitória das cepas, sendo identificados compostos inibitórios que não foram produzidos pelas culturas com somente 1 isolado. Piovia-Scott et al. (2017) demonstraram que comunidades bacterianas com mais de uma espécie reduziram a proliferação do Bd mais do que aquelas que eram formadas por uma só



espécie, sendo observado que naquelas com múltiplas cepas, ocorreu dominância de uma ou duas espécies, assim como interações entre a comunidade que auxiliam no efeito anti-Bd. Por outro lado, Harrison et al. (2020) observaram que, enquanto os tratamentos compostos por múltiplos isolados aumentaram a inibição média, o aumento da diversidade genética do consórcio não resultou em maiores níveis de inibição, resultado descrito anteriormente (ANTWIS e HARRISON, 2018). Portanto, é interessante que seja estudada a combinação de diferentes cepas aqui analisadas, para a obtenção de um probiótico com múltiplas cepas que tenha maior capacidade inibitória.

Os ninhos são estruturas fundamentais para a colonização microbiana de recém-nascidos. Eles constituem o ambiente habitado pelos neonatos antes deles serem expostos à influência direta das condições externas, funcionam como fonte de microrganismos e filtram aqueles que conseguirão se estabelecer no ambiente do ninho (CAMPOS-CERDA e BOHANNAN, 2020). Os anfíbios podem obter sua microbiota da pele por contato direto com o ambiente, transmissão horizontal e por transmissão vertical, na qual os microrganismos são transferidos dos parentais para a prole (WALKE et al., 2011). Muletz et al. (2012) demonstraram que a inoculação de bactérias *Janthinobacterium lividum* no solo resultou em sua transmissão para a pele de salamandras, assim como a presença dessas bactérias foi relacionada com a redução da prevalência do Bd em metade na pele desses anfíbios. No entanto, no final do estudo, após 42 dias, *J. lividum* não era mais detectada nos animais.

Ademais, diferentes estudos mostraram que a microbiota do ninho (BANNING et al., 2008; MCGRATH, 2018) ou da pele de anfíbios (AUSTIN, 2000) é diferente das amostras ambientais. Os embriões e a pele do indivíduo adulto possuem microbiotas semelhantes, o que sugere que a transmissão vertical é um modo dos anuros adquirirem sua microbiota, além disso, muitos microrganismos que inibem fungos patógenos nos embriões também inibem patógenos, como o Bd, no indivíduo adulto (WALKE et al., 2011).

Davis, Bigler, Woodhams (2017) sugere que estágios iniciais de desenvolvimento são ideais para aplicação de probióticos, pois a microbiota originalmente estabelecida pode influenciar na resposta ao tratamento, além de ser o período no qual o sistema imunológico se ajusta à microbiota adquirida (BLETZ et al., 2013). Além disso, Lam et al. (2010) e Woodhams et al. (2007) sugerem que uma população com alta proporção de indivíduos com bactérias anti-Bd pode limitar a sobrevivência e reprodução do fungo, de modo análogo à imunidade de rebanho, prevenindo graves declínios. Assim, a aplicação de bactérias probióticas provindas dos ninhos de espuma nesse mesmo ambiente pode aumentar o

percentual do microbioma que apresentará papel protetivo contra o Bd. Deve-se, no entanto, estudar mais profundamente se essas cepas são seguras para serem liberadas na natureza. Um dos testes a ser realizado é o antibiograma, de forma a evitar que genes de resistência a antibióticos sejam espalhados no ambiente (IMPERIAL e IBANA, 2016).

## 7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho contribuem para o conhecimento sobre a microbiota presente nos ninhos de espumas de *Adenomera hylaedactyla*, *Leptodactylus vastus* e *Physalaemus cuvieri*, assim como seu possível papel protetivo contra *Batrachochytrium dendrobatidis* para anuros. Foram obtidos 54 isolados com capacidade inibitória, com 5 desses apresentando atividade anti-Bd em ambos os ensaios realizados além de não possuírem atividade hemolítica. Essas cepas, portanto, são promissoras como candidatas a probióticos a serem aplicados em ninhos de espuma na natureza, com objetivo de fornecer uma microbiota protetora aos neonatos e possibilitar uma maior sobrevivência das populações caso sejam acometidas pela quitridiomicose.

## REFERÊNCIAS

- ABARCA, J. G.; WHITFIELD, S. M.; ZUNIGA-CHAVES, I.; et al. Genotyping and differential bacterial inhibition of batrachochytrium dendrobatidis in threatened amphibians in costa rica. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 167, n. 3, 2021.
- AKINKUOTU, R. T. INTERACTION OF CHROMOBACTERIUM SPECIES WITH BATRACHOCHYTRIUM DENDROBATIDIS AT DIFFERENT TEMPERATURES. **Thesis (Degree of Master of Science) - Graduate Faculty of Auburn University, Alabama**, 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, 2018.
- ANTWIS, R. E.; PREZIOSI, R. F.; HARRISON, X. A.; GARNER, T. W. J. Amphibian symbiotic bacteria do not show a universal ability to inhibit growth of the global panzootic lineage of Batrachochytrium dendrobatidis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 11, p. 3706–3711, 2015.
- AUSTIN, R. M. CUTANEOUS MICROBIAL FLORA AND ANTIBIOSIS IN PLETHODON VENTRALIS: Inferences for Parental Care in the Plethodontidae. **The Biology of Plethodontid Salamanders**. p.451–462, 2000.
- BANNING, J. L.; WEDDLE, A. L.; III, G. W. W.; et al. Antifungal skin bacteria, embryonic survival, and communal nesting in four-toed salamanders, Hemidactylum scutatum. **Oecologia**, v. 156, p. 423–429, 2008.
- BECKER, M. H.; WALKE, J. B.; MURRILL, L.; et al. Phylogenetic distribution of symbiotic bacteria from Panamanian amphibians that inhibit growth of the lethal fungal pathogen Batrachochytrium dendrobatidis. **Molecular Ecology**, v. 24, n. 7, p. 1628–1641, 2015.
- BELL, S. C.; ALFORD, R. A.; GARLAND, S.; PADILLA, G.; THOMAS, A. D. Screening bacterial metabolites for inhibitory effects against Batrachochytrium dendrobatidis using a spectrophotometric assay. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 103, p. 77–85, 2013.
- BELL, S. C.; GARLAND, S.; ALFORD, R. A. Increased numbers of culturable inhibitory bacterial taxa may mitigate the effects of Batrachochytrium dendrobatidis in Australian wet tropics frogs. **Frontiers in Microbiology**, 2018.
- BERGER, L.; HYATT, A. D.; SPEARE, R.; LONGCORE, J. E. Life cycle stages of the amphibian chytrid Batrachochytrium dendrobatidis. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 68, n. 1, p. 51–63, 2006.
- BEZERRA, S. G. D. S. **AÇÃO DE NINHOS DE ESPUMA DE ANUROS E DA SUA MICROBIOTA ASSOCIADA NA QUITRIDOMICOSE**, 2021.

BLAUSTEIN, A. R.; URBINA, J.; SNYDER, P. W.; et al. Effects of Emerging Infectious Diseases on Amphibians: A Review of Experimental Studies. **Diversity**, v. 10, 2018.

Disponível em: <[www.mdpi.com/journal/diversity](http://www.mdpi.com/journal/diversity)>.

BLETZ, M. C.; LOUDON, A. H.; BECKER, M. H.; et al. Mitigating amphibian chytridiomycosis with bioaugmentation: Characteristics of effective probiotics and strategies for their selection and use. **Ecology Letters**, v. 16, n. 6, p. 807–820, 2013.

BLETZ, M. C.; MYERS, J.; WOODHAMS, D. C.; et al. Estimating herd immunity to amphibian chytridiomycosis in Madagascar based on the defensive function of amphibian skin bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. SEP, 2017.

BOOTH, S. J. **Chryseobacterium Related Genera Infections**☆. Elsevier Inc., 2014.

BOSCH, J.; SANCHEZ-TOMÉ, E.; FERNÁNDEZ-LORAS, A.; OLIVER, J. A.; GARNER, M. C. F. AND T. W. J. Successful elimination of a lethal wildlife infectious disease in nature. **Biology Letters**, 2015.

BRANNELLY, L. A.; RICHARDS-ZAWACKI, C. L.; PESSIER, A. P. Clinical trials with itraconazole as a treatment for chytrid fungal infections in amphibians. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 101, n. 2, p. 95–104, 2012.

BULLEN, J. J.; ROGERS, H. J.; SPALDING, P. B.; WARD, C. G. Iron and infection: The heart of the matter. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, 2005.

BUXTON R. Blood Agar Plates and Hemolysis Protocols. **American Society for Microbiology**, , n. September 2005, p. 1–9, 2005.

CAMPOS-CERDA, F.; BOHANNAN, B. J. M. The Nidobiome: A Framework for Understanding Microbiome Assembly in Neonates. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 35, n. 7, p. 573–582, 2020. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tree.2020.03.007>>.

CASTRO, L. G. Z. DE. PROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS ISOLADOS DE NINHO DE ESPUMA DE *Leptodactylus vastus* E *Physalaemus cuvieri* COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO, **Monografia (Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal do Ceará, Ceará**, 2019.

CHATFIELD, M. W. H.; RICHARDS ZAWACKI, C. L. Elevated temperature as a treatment for *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in captive frogs. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 94, n. 3, p. 235–238, 2011.

COOPER, A.; KENNEDY, M. W.; FLEMING, R. I.; et al. Adsorption of frog foam nest proteins at the air-water interface. **Biophysical Journal**, v. 88, n. 3, p. 2114–2125, 2005. Biophysical Society.

DAVIS, L. R.; BIGLER, L.; WOODHAMS, D. C. Developmental trajectories of amphibian microbiota: response to bacterial therapy depends on initial community structure. **Environmental Microbiology**, p. 1–40, 2017.

DENSMORE, C. L.; GREEN, D. E. Diseases of Amphibians. **ILAR Journal**, v. 48, n. 3, p. 235–254, 2007. Disponível em:

<<https://academic.oup.com/ilarjournal/article/48/3/235/663549>>. .

DIRENZO, G. V.; CHEN, R.; IBSEN, K.; et al. Investigating the potential use of an ionic liquid (1-Butyl-1-methylpyrrolidinium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide) as an antifungal treatment against the amphibian chytrid fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*. **PLoS ONE**, v. 15, n. 4, p. 1–18, 2020. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0231811>>. .

FISHER, M. C.; HENK, D. A.; BRIGGS, C. J.; et al. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. **Nature**, v. 484, n. 7393, p. 186–194, 2012.

FISHER, M. C.; GURR, S. J.; CUOMO, C. A.; et al. Threats Posed by the Fungal Kingdom to Humans, Wildlife, and Agriculture. **mBIO**, v. 11, n. 3, 2020.

FLECHAS, S. V.; ACOSTA-GONZÁLEZ, A.; ESCOBAR, L. A.; et al. Microbiota and skin defense peptides may facilitate coexistence of two sympatric Andean frog species with a lethal pathogen. **ISME Journal**, v. 13, n. 2, p. 361–373, 2019. Springer US. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1038/s41396-018-0284-9>>. .

FLECHAS, S. V.; SARMIENTO, C.; CÁRDENAS, M. E.; et al. Surviving chytridiomycosis: Differential anti-*Batrachochytrium dendrobatidis* activity in bacterial isolates from three lowland species of *Atelopus*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, 2012.

FLEMING, R. I.; MACKENZIE, C. D.; COOPER, A.; KENNEDY, M. W. Foam nest components of the túngara frog: A cocktail of proteins conferring physical and biological resilience. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 276, n. 1663, p. 1787–1795, 2009. Royal Society.

GLIME, J. M.; BOELEMA, W. J. Chapter 14-2 Anuran Conservation Issues Chapter 14-2 Anuran Conservation Issues. **Bryophyte Ecology, Volume 2: Bryological Interaction**. v. 2, p.1–16, 2017.

GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, N.; SANTOS, J. A.; OTERO, A.; GARCÍA-LÓPEZ, M. L. Cell-associated hemolytic activity in environmental strains of *Plesiomonas shigelloides* expressing cell-free, iron-influenced extracellular hemolysin. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 4, p. 885–890, 2007.

HANLON, S. M.; LYNCH, K. J.; KERBY, J.; PARRIS, M. J. *Batrachochytrium dendrobatidis* exposure effects on foraging efficiencies and body size in anuran tadpoles. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 112, n. 3, p. 237–242, 2015.

HARRIS, R. N.; BRUCKER, R. M.; WALKE, J. B.; et al. Skin microbes on frogs prevent morbidity and mortality caused by a lethal skin fungus. **ISME Journal**, 2009.

- HARRIS, R. N.; JAMES, T. Y.; LAUER, A.; SIMON, M. A.; PATEL, A. Amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* is inhibited by the cutaneous bacteria of amphibian species. **EcoHealth**, v. 3, n. 1, p. 53–56, 2006.
- HARRISON, X.; SEWELL, T.; FISHER, M.; ANTWIS, R. Designing Probiotic Therapies With Broad-Spectrum Activity Against a Wildlife Pathogen. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2020. Disponível em: <www.frontiersin.org>. .
- HISSA, D. C.; BEZERRA, W. M.; FREITAS, C. D. T. DE; et al. Frog Foam Nest Protein Diversity and Synthesis. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology**, v. 325, n. 7, p. 425–433, 2016. John Wiley and Sons Inc.
- HISSA, D. C.; VASCONCELOS, I. M.; CARVALHO, A. F. U.; et al. Novel surfactant proteins are involved in the structure and stability of foam nests from the frog *Leptodactylus vastus*. **Journal of Experimental Biology**, v. 211, n. 16, p. 2707–2711, 2008.
- HOLDEN, W. M.; HANLON, S. M.; WOODHAMS, D. C.; et al. Skin bacteria provide early protection for newly metamorphosed southern leopard frogs (*Rana sphenoccephala*) against the frog-killing fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Biological Conservation**, v. 187, p. 91–102, 2015. Elsevier Ltd.
- HORINOUCI, S.; UEDA, K.; NAKAYAMA, J.; IKEDA, T. Cell-to-cell communications among microorganisms. **Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology**, v. 4, p. 283–337, 2010.
- IMPERIAL, I. C. V. J.; IBANA, J. A. Addressing the antibiotic resistance problem with probiotics: Reducing the risk of its double-edged sword effect. **Frontiers in Microbiology**, 2016.
- KIM, J. W.; CHO, D. W.; PARK, G.; KIM, S. H.; RA, C. S. Clinical efficacy and mechanism of probiotics in allergic diseases. **Korean Journal of Pediatrics**, v. 34, n. 8, p. 7–9, 2013.
- KUENEMAN, J. G.; BLETZ, M. C.; MCKENZIE, V. J.; et al. Community richness of amphibian skin bacteria correlates with bioclimate at the global scale. **Nature Ecology and Evolution**, v. 3, n. 3, p. 381–389, 2019.
- KUENEMAN, J. G.; PARFREY, L. W.; WOODHAMS, D. C.; et al. The amphibian skin-associated microbiome across species, space and life history stages. **Molecular Ecology**, v. 23, n. 6, p. 1238–1250, 2014.
- LAM, B. A.; WALKE, J. B.; VREDENBURG, V. T.; HARRIS, R. N. Proportion of individuals with anti-*Batrachochytrium dendrobatidis* skin bacteria is associated with population persistence in the frog *Rana muscosa*. **Biological Conservation**, v. 143, n. 2, p. 529–531, 2010.
- LAM, P. W.; NAIMARK, D. M.; LEIS, J. A. Microbacterium peritonitis in peritoneal dialysis: A case report and review. **Peritoneal Dialysis International**, 2018.

- DE LEÓN, M. E. Comparison of in vitro methods to inhibit growth of a virulent strain of *Batrachochytrium dendrobatidis* (Longcore, Pessier, and Nichols 1999). **Amphibian and Reptile Conservation**, v. 14, n. 2, p. 12–23, 2020.
- LO, C. W.; LAI, Y. K.; LIU, Y. T.; GALLO, R. L.; HUANG, C. M. *Staphylococcus aureus* Hijacks a skin commensal to intensify its virulence: Immunization targeting B-hemolysin and CAMP factor. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 131, n. 2, p. 401–409, 2011. Elsevier Masson SAS. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/jid.2010.319>>. .
- LONGCORE, J. E.; PESSIER, A. P.; NICHOLS, D. K. *Batrachochytrium Dendrobatidis* gen. et sp. nov., a Chytrid Pathogenic to Amphibians. **Mycologia**, v. 91, n. 2, p. 219–227, 1999.
- LOUDON, A. H.; HOLLAND, J. A.; UMILE, T. P.; et al. Interactions between amphibians' symbiotic bacteria cause the production of emergent anti-fungal metabolites. **Frontiers in Microbiology**, 2014.
- MADISON, J. D.; BERG, E. A.; ABARCA, J. G.; et al. Characterization of *Batrachochytrium dendrobatidis* Inhibiting Bacteria from Amphibian Populations in Costa Rica. **Front. Microbiol.**, v. 8, p. 290, 2017.
- MARTEL, A.; PASMANS, F.; FISHER, M. C.; et al. An Martel, Frank Pasmans, Matthew C. Fisher, Laura F. Grogan, Lee F. Skerratt, and Lee Berger 14. **Emerging and Epizootic Fungal Infections in Animals**. p.309–335, 2018.
- MARTINS, D. V. ESTUDO DA COMPOSIÇÃO E DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS DO NINHO DE ESPUMA DO ANURO *Adenomera hylaedactyla*, **Monografia (Graduação em Biologia) – Universidade Federal do Ceará, Ceará**, 2020.
- MCGRATH, S. Exploring the microbiome: diversity of the microbial community of three foam nesting frogs, Genus: Polypedates, across a developmental gradient, 2018.
- MCKENZIE, V. J.; KUENEMAN, J. G.; HARRIS, R. N. Probiotics as a tool for disease mitigation in wildlife: Insights from food production and medicine. **Annals of the New York Academy of Sciences**, p. 1–13, 2018.
- 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, 2015.
- MOGROVEJO, DIANA C; PERINI, L.; GOSTINČAR, C.; et al. Prevalence of Antimicrobial Resistance and Hemolytic Phenotypes in Culturable Arctic Bacteria, 2020.
- MOGROVEJO, DIANA C.; PERINI, L.; GOSTINČAR, C.; et al. Prevalence of Antimicrobial Resistance and Hemolytic Phenotypes in Culturable Arctic Bacteria. **Frontiers in Microbiology**, 2020.
- MONZON, F. C.; RÖDEL, M.-O.; JESCHKE, J. M. Tracking *Batrachochytrium dendrobatidis* Infection Across the Globe. **EcoHealth**, p. 270–279, 2020.



MOUNIER, J.; COTON, M.; IRLINGER, F.; LANDAUD, S.; BONNARME, P. **Smear-Ripened Cheeses**. Fourth Edi ed. Elsevier Ltd, 2017.

MULETZ-WOLZ, C. R.; ALMARIO, J. G.; BARNETT, S. E.; et al. Inhibition of Fungal Pathogens across Genotypes and Temperatures by Amphibian Skin Bacteria. **Frontiers in microbiology**, v. 8, 2017. Disponível em: <[www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)>. .

MULETZ, C. R.; MYERS, J. M.; DOMANGUE, R. J.; HERRICK, J. B.; HARRIS, R. N. Soil bioaugmentation with amphibian cutaneous bacteria protects amphibian hosts from infection by *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Biological Conservation**, v. 152, n. August, p. 119–126, 2012. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2012.03.022>>. .

O'ROURKE, D. P.; ROSENBAUM, M. D. **Chapter 18 - Biology and Diseases of Amphibians**. Third Edit ed. Elsevier Inc., 2015.

PANACKAL, A. A. Microbacterium resists prosthetic joint infection: A case report due to a vancomycin-resistant coryneform and brief literature review of infections due to the genus. **Infectious Diseases in Clinical Practice**, v. 21, n. 6, p. 349–354, 2013.

PEREIRA, E. B.; PINTO-LEDEZMA, J. N.; DE FREITAS, C. G.; et al. Evolution of the anuran foam nest: Trait conservatism and lineage diversification. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 122, n. 4, p. 814–823, 2017.

PIOVIA-SCOTT, J.; REJMANEK, D.; WOODHAMS, D. C.; et al. Greater Species Richness of Bacterial Skin Symbionts Better Suppresses the Amphibian Fungal Pathogen *Batrachochytrium Dendrobatidis*. **Microb Ecol.**, 2017.

PLAZA-DIAZ, J.; RUIZ-OJEDA, F. J.; GIL-CAMPOS, M.; GIL, A. Mechanisms of Action of Probiotics. **Advances in Nutrition**, v. 10, p. S49–S66, 2019.

REBOLLAR, E. A.; BRIDGES, T.; HUGHEY, M. C.; et al. Integrating the role of antifungal bacteria into skin symbiotic communities of three Neotropical frog species. **The ISME Journal**, v. 13, p. 1763–1775, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41396-019-0388-x>>. .

REBOLLAR, E. A.; HUGHEY, M. C.; MEDINA, D.; et al. Skin bacterial diversity of Panamanian frogs is associated with host susceptibility and presence of *Batrachochytrium dendrobatidis*. **ISME Journal**, v. 10, n. 7, p. 1682–1695, 2016.

REBOLLAR, E. A.; MARTÍNEZ-UGALDE, E.; ORTA, A. H. The amphibian skin microbiome and its protective role against chytridiomycosis. **Herpetologica**, v. 76, n. 2, p. 167–177, 2020.

REID, G.; YOUNES, J. A.; VAN DER MEI, H. C.; et al. Microbiota restoration: Natural and supplemented recovery of human microbial communities. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 27–38, 2011. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2473>>. .

- VAN ROOIJ, P.; MARTEL, A.; HAESSEBROUCK, F.; PASMANS, F. Amphibian chytridiomycosis: A review with focus on fungus-host interactions. **Veterinary Research**, v. 46, n. 1, p. 1–22, 2015. BioMed Central.
- ROTH, T.; FOLEY, J.; WORTH, J.; et al. Bacterial flora on Cascades frogs in the Klamath mountains of California. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 36, n. 6, p. 591–598, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2013.07.002>>. .
- SCHEELE, B. C.; HUNTER, D. A.; GROGAN, L. F.; et al. Interventions for Reducing Extinction Risk in Chytridiomycosis-Threatened Amphibians. **Conservation Biology**, v. 28, n. 5, p. 1195–1205, 2014.
- SCHEELE, B. C.; PASMANS, F.; SKERRATT, L. F.; et al. Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity. **Science**, v. 363, n. 6434, p. 1459–1463, 2019.
- SHAHNURDIN, S.; ISMAIL, M. N.; KWAN, S. H.; NAJIMUDIN, N. Ecology and protein composition of polypedates leucomystax (Gravenhorst, 1829) (Anura: Rhacophoridae) foam nests from Peninsular Malaysia. **Annual Research and Review in Biology**, v. 14, n. 6, 2017.
- SILVA, G. R.; FERREIRA, A. L. M.; SILVA, M. R.; PAIVA, V. V. CONSIDERAÇÕES SOBRE AS PRINCIPAIS DOENÇAS EMERGENTES EM RÃS TOURO AMERICANA (LITHOBATES CATESBEIANUS) EM SISTEMAS DE CRIAÇÃO INTENSIVO. **Enciclopédia Biosfera**, v. 17, n. 34, p. 125, 2020.
- SIMBERLOFF, D.; STILING, P. Risks of species introduced for biological control. **Biological Conservation**, v. 78, n. 1–2, p. 185–192, 1996.
- STEINBERG, J. P.; BURD, E. M. **Other Gram-Negative and Gram-Variable Bacilli**. Eighth Edi ed. Elsevier Inc., 2014.
- THOMAS, D. W., ET AL. Clinical Report-Probiotics and Prebiotics in Pediatrics abstract. **Pediatrics**, 2010. Disponível em: <[www.pediatrics.org/cgi/doi/10.1542/peds.2010-2548](http://www.pediatrics.org/cgi/doi/10.1542/peds.2010-2548)>. .
- WALKE, J. B.; BELDEN, L. K. Harnessing the Microbiome to Prevent Fungal Infections: Lessons from Amphibians. **PLoS Pathogens**, 1. set. 2016. Public Library of Science.
- WALKE, J. B.; HARRIS, R. N.; REINERT, L. K.; ROLLINS-SMITH, L. A.; WOODHAMS, D. C. Social immunity in amphibians: Evidence for vertical transmission of innate defenses. **Biotropica**, v. 43, n. 4, p. 396–400, 2011.
- WOODHAMS, D. C.; ALFORD, R. A.; MARANTELLI, G. Emerging disease of amphibians cured by elevated body temperature. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 55, n. 1, p. 65–67, 2003.
- WOODHAMS, D. C.; BIGLER, L.; MARSCHANG, R. Tolerance of fungal infection in European water frogs exposed to *Batrachochytrium dendrobatidis* after experimental reduction of innate immune defenses. **BMC Veterinary Research**, 2012.

WOODHAMS, D. C.; BRANDT, H.; BAUMGARTNER, S.; et al. Interacting symbionts and immunity in the amphibian skin mucosome predict disease risk and probiotic effectiveness. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 2014.

WOODHAMS, D. C.; LABUMBARD, B. C.; BARNHART, K. L.; 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, 2017. Springer New York LLC.

WOODHAMS, D. C.; ROLLINS-SMITH, L. A.; REINERT, L. K.; 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, 2019. Springer.

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

WOODWARD, A.; BERGER, L.; SKERRATT, L. F. In vitro sensitivity of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* to antifungal therapeutics. **Research in Veterinary Science**, v. 97, n. 2, p. 365–367, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.06.013>>. .

**ANEXO A** – Gêneros bacterianos identificados nos ninhos de espuma que possuem atividade inibitória contra *Batrachochytrium dendrobatidis* reportada em literatura, assim como a metodologia empregada nos trabalhos.

<b>Gênero</b>	<b>Literatura na qual a inibição foi reportada</b>	<b>Metodologia utilizada no estudo</b>
<i>Acidovorax</i>	DE LEÓN et al., 2020.	Ensaio de difusão em meio sólido
	ROTH et al., 2013.	Ensaio de difusão em meio sólido
<i>Acinetobacter</i>	BECKER et al., 2015.	Ensaio em meio líquido
	FLECHAS et al., 2012	Ensaio de difusão em meio sólido
	FLECHAS et al., 2019.	Ensaio em meio líquido
<i>Aeromonas</i>	BECKER et al., 2015.	Ensaio em meio líquido
	FLECHAS et al., 2019.	Ensaio em meio líquido
<i>Agrobacterium*</i>	BECKER et al., 2015.	Ensaio em meio líquido
<i>Alcaligenes</i>	MADISON et al., 2017.	Ensaio de difusão em meio sólido
<i>Bacillus</i>	BECKER et al., 2015.	Ensaio em meio líquido
	FLECHAS et al., 2019.	Ensaio em meio líquido
<i>Brevundimonas</i>	FLECHAS et al., 2019.	Ensaio em meio líquido
<i>Burkholderia</i>	BELL et al., 2018	Ensaio em meio líquido
<i>Chromobacterium*</i>	AKINKUOTU, 2019.	Ensaio em meio líquido
<i>Chryseobacterium</i>	BECKER et al., 2015.	Ensaio em meio líquido
	FLECHAS et al., 2012.	Ensaio de difusão em meio sólido
	FLECHAS et al., 2019.	Ensaio em meio líquido
<i>Citrobacter</i>	FLECHAS et al., 2019.	Ensaio em meio líquido

<i>Comamonas</i>	BECKER et al., 2015.	Ensaio em meio líquido
	FLECHAS et al., 2012.	Ensaio de difusão em meio sólido
	FLECHAS et al., 2019.	Ensaio em meio líquido
<i>Curtobacterium</i>	BECKER et al., 2015.	Ensaio em meio líquido
	FLECHAS et al., 2019.	Ensaio em meio líquido
<i>Enterobacter</i>	ABARCA et al., 2021.	Ensaio em meio líquido
	BECKER et al., 2015.	Ensaio em meio líquido
	FLECHAS et al., 2019.	Ensaio em meio líquido
<i>Flavobacterium</i>	BECKER et al., 2015.	Ensaio em meio líquido
<i>Herbaspirillum</i>	FLECHAS et al., 2019.	Ensaio em meio líquido
<i>Klebsiella</i>	ABARCA et al., 2021.	Ensaio em meio líquido
	DE LEÓN et al., 2020.	Ensaio de difusão em meio sólido
	FLECHAS et al., 2019.	Ensaio em meio líquido
<i>Kurthia</i>	Atual estudo, primeiro relato.	Ensaio de difusão em meio sólido
<i>Lysinibacillus</i>	MADISON et al., 2017.	Ensaio de difusão em meio sólido
<i>Microbacterium</i>	ABARCA et al., 2021.	Ensaio em meio líquido
	BECKER et al., 2015.	Ensaio em meio líquido
<i>Ochrobactrum</i>	REBOLLAR et al., 2019	Ensaio em meio líquido
<i>Pedobacter</i>	BLETZ et al., 2017.	Ensaio em meio líquido
	HARRIS et al., 2006	Ensaio de difusão em meio sólido
<i>Pseudomonas</i>	BECKER et al., 2015.	Ensaio em meio líquido
	FLECHAS et al., 2012.	Ensaio de difusão em meio sólido

	WOODHAMS et al., 2014.	Ensaio em meio líquido
<i>Rhizobium</i>	ABARCA et al., 2021.	Ensaio em meio líquido
<i>Serratia</i>	BECKER et al., 2015.	Ensaio em meio líquido
	FLECHAS et al., 2019.	Ensaio em meio líquido
	WOODHAMS et al., 2014.	Ensaio em meio líquido
<i>Sphingobacterium</i>	ABARCA et al., 2021.	Ensaio em meio líquido
	MADISON et al., 2017.	Ensaio de difusão em meio sólido
<i>Staphylococcus</i>	ABARCA et al., 2021.	Ensaio em meio líquido
	BECKER et al., 2015.	Ensaio em meio líquido
	FLECHAS et al., 2019.	Ensaio em meio líquido
<i>Stenotrophomonas</i>	BECKER et al., 2015.	Ensaio em meio líquido
	FLECHAS et al., 2012.	Ensaio de difusão em meio sólido
	FLECHAS et al., 2019.	Ensaio em meio líquido
<i>Streptomyces</i>	ABARCA et al., 2021.	Ensaio em meio líquido
	HARRIS et al., 2006.	Ensaio de difusão em meio sólido

Fonte: Elaborado pelo autor. Os gêneros seguidos de (\*) apresentaram alta identidade com mais de um gênero, assim não sendo possível a identificação a nível molecular.