



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

CLAUDIANE CARVALHO BESSA

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

FORTALEZA

2018

CLAUDIANE CARVALHO BESSA

PROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS ISOLADOS DE NINHO DE ESPUMA DE
Leptodactylus vastus COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

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

Orientadora: Profa. Dra. Denise Cavalcante Hissa.

Co-orientadora: Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo.

FORTALEZA

2018

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)

B465p Bessa, Claudiane Carvalho.
Prospecção de microrganismos isolados de ninho de espuma de *Leptodactylus vastus* com potencial biotecnológico / Claudiane Carvalho Bessa. – 2018.
54 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2018.
Orientação: Profa. Dra. Denise Cavalcante Hissa.
Coorientação: Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo.

1. Bioespuma. 2. *Leptodactylus vastus*. 3. Enzimas. 4. Atividade antimicrobiana. 5. Biossurfactante. I. Título.

CDD 661

CLAUDIANE CARVALHO BESSA

PROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS ISOLADOS DE NINHO DE ESPUMA DE
Leptodactylus vastus COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

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

Orientadora: Profa. Dra. Denise Cavalcante Hissa.

Co-orientadora: Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

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

Dra. Mirella Leite Pereira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Marjory Lima Holanda Araújo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

Se eu pudesse colocar no papel todos aqueles que merecem meu obrigado, certamente não caberia. Espero que minha gratidão se estenda a todos aqueles que de alguma forma me ajudaram a chegar até aqui.

Primeiramente, agradeço à Deus e à minha família, em especial minha mãe **Cláudia Fernanda** e minha avó **Maria da Graça**, pela minha criação, por serem minha fortaleza, serem meu porto seguro e por me ensinarem que a educação pode nos levar muito longe. Obrigada por me amarem e cuidarem de mim de forma incansável.

Agradeço imensamente à minha orientadora, **Profa. Dra. Denise Cavalcante Hissa**, por todo incentivo e ensinamentos, por se preocupar comigo como uma amiga e por acreditar em mim quando eu mais precisava.

Agradeço com muito carinho à minha co-orientadora, **Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo**, pela oportunidade que me concedeu lá no início, por todo aprendizado ao longo desse percurso e por ser uma constante fonte de inspiração para todos nós, seus alunos.

Agradeço à **Profa. Dra. Márjory Lima** por ter aceitado participar da banca examinadora deste trabalho, por sempre ter sido muito atenciosa, e por nos conceder tantas oportunidades como visitas técnicas às empresas e os projetos de Bioprocessos.

Agradeço à **Dra. Mirella Leite**, por aceitar o convite de participar da banca examinadora deste trabalho e por ter me ajudado muito antes da minha entrada no laboratório. Minha gratidão por você ser sempre essa amiga tão solícita, ajudando e ensinando a todos e que tem uma paciência do tamanho do mundo.

Agradeço aos meus amigos do Lembitech, em especial **Gabrielly Oliveira, Jonathan Santos, Samuel Oliveira, João Alberto** e **Bella Giselle** pelo apoio em todos os momentos, pela amizade maravilhosa que nos une, por todas as conversas sobre a vida e sobre bobagens. Também gostaria de expressar meu obrigado à **Bárbara Farias**, pelas sugestões, dicas e por sempre ficar na torcida do meu sucesso.

Agradeço aos meus amigos do LaRGen, em especial **Raíssa Dias** e **Luzia Zenferino**, por abraçarem esse trabalho, vestirem a camisa do time e por todo apoio quando eu achei que não fosse conseguir. À minha amiga **Malu**, meu muito obrigado, por cuidar de mim, transformar a forma que eu via o mundo e ao **Saulo** por sempre me aconselhar nos experimentos e sempre cuidar dos registros fotográficos.

Ao **Sr. Valdenor**, meu muito obrigado, por ser gentil, alegre e por cuidar tão bem da manutenção e limpeza do nosso ambiente de trabalho.

À Universidade Federal do Ceará, por todos esses anos ter sido minha segunda casa, ter dado suporte para a minha formação, bem como a Coordenação do Bacharelado em Biotecnologia, sempre muito atenciosos com os discentes e fornecendo todo o apoio possível durante todo o curso.

Aos órgãos de fomento, CNPq, Funcap, Petrobrás e Serrapilheira, por contribuírem direta ou indiretamente com esse trabalho e com a minha formação.

“Na vida, não existe nada a se temer,
mas a ser compreendido”

Marie Curie

RESUMO

Os ninhos de espuma de anuros são bioestruturas estáveis utilizadas para a deposição e manutenção de ovos e de girinos fora da água. Essas bioespumas apresentam diversas funções para o desenvolvimento da prole, como fornecimento de oxigênio e de nutrientes, proteção contra raios ultravioletas e contra predadores e aumento da taxa de crescimento. Há poucos estudos voltados para a exploração da microbiota associada aos ninhos de espuma de anuros, tornando-as valiosas fontes de prospecção de novas biomoléculas com potencial biotecnológico. O presente trabalho teve como objetivo isolamento de bactérias da bioespuma de *Leptodactylus vastus*, sua identificação molecular através do sequenciamento do gene RNAr 16S, e prospecção dos morfotipos com atividades amilásicas, proteásicas, lipásica, antimicrobiana e emulsificante. Os ninhos de espuma de *L. vastus* foram coletados na reserva particular do patrimônio natural de Monte Alegre, na serra de Pacatuba-CE no período chuvoso. Foram feitas diluições seriadas com amostras de ninho e poça d'água para a contagem de viáveis em placa utilizando a técnica de espalhamento. As diluições 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , e 10^{-4} foram plaqueadas em meio ATGE (ágar 15 g/L; triptona 5 g/L; glicose 1 g/L; extrato de levedura 2,5 g/L), e incubadas à temperatura ambiente por 16 h. Os 35 morfotipos foram selecionados e armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ em caldo TGE (triptona 5 g/L; glicose 1 g/L; extrato de levedura 2,5 g/L) com glicerol 50% (v/v). Para o teste de atividades enzimáticas cada isolado foi reativado e cultivado em ATGE suplementado com amido (0,1% p/v) para amilases, leite desnatado (1% p/v) e gelatina (3%), para proteases, e tributirina (1% v/v) para lipases. Para as atividades emulsificante, antibacteriana e antifúngica foram utilizados os sobrenadantes crescidos em TGE com densidade óptica a 600 nm igual a 1,0. Para a extração de DNA foi utilizado o protocolo de termolise e a amplificação do gene RNAr 16S foi realizada através de PCR utilizando os iniciadores 27F e 1525R. Dos 14 morfotipos isolados de amostras de ninho de espuma, 4 (11,4%) apresentaram atividade amilásica, 2 (5,7%) apresentaram atividade lipásica, 5 (14,3%) apresentaram atividade proteásica para a caseína e 3 (8,7%) para a gelatina. Os sobrenadantes das Lvs 02, 15 e 16 apresentaram atividade emulsificante. Foram observadas atividade antifúngica contra o fungo *Fusarium* sp. na suspensão de células da Lv 05 e na suspensão de células e sobrenadante do morfotipo Lv 15. Esses resultados apontam o potencial da microbiota associada ao ninho de *L. vastus* como fonte de biomoléculas com aplicações biotecnológicas.

Palavras chave: bioespuma, *Leptodactylus vastus*, enzimas, atividade antimicrobiana, bio surfactante

ABSTRACT

Anuran foam nests are stable biostructures used for the deposition and maintenance of eggs and tadpoles out of the water. These biopumps have several functions for offspring development, such as oxygen and nutrient supply, protection against ultraviolet rays and against predators, and increased growth rate. There are few studies aimed at the exploration of the microbiota associated with the anuran foam nests, making them valuable sources of prospecting of new biomolecules with biotechnological potential. The aim of the present work was to isolate bacteria from *Leptodactylus vastus* foam nest, its molecular identification through the sequencing of the 16S RNAr gene, and to investigate morphotypes with amylase, protease, lipase, antimicrobial and emulsifying activities. The *L. vastus* foam nests were collected in the private reserve of natural heritage of Monte Alegre, in the Pacatuba-CE mountains in the rainy season. Serial dilutions were made with nest and puddle samples for plating viable counts using the scattering technique. The dilutions 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , and 10^{-4} were plated in ATGE medium (15 g / L agar, tryptone 5 g / L, glucose 1 g / L, yeast extract 2.5 g / L), and incubated at room temperature for 16 h. The 35 morphotypes were selected and stored at -80°C in TGE broth (tryptone 5 g / L, glucose 1 g / L, yeast extract 2.5 g / L) with glycerol 50% (v / v). For the enzyme activities test, each isolate was reactivated and cultured in ATGE supplemented with starch (0.1% w / v) for amylases, skim milk (1% w / v) and gelatin (3%) for proteases, and tributyrin (1% v / v) for lipases. For the emulsifying, antibacterial and antifungal activities supernatants grown in TGE with optical density at 600 nm equal to 1.0 were used. For the extraction of DNA the thermolysis protocol was used and the amplification of the 16S RNAr gene was performed through PCR using primers 27F and 1525R. Of the 14 morphotypes isolated from foam nest samples, 4 (11.4%) presented amylase activity, 2 (5.7%) presented lipase activity, 5 (14.3%) presented casease proteinase activity and 3 (8,7%) for gelatin. The supernatants of Lvs 02, 15 and 16 presented emulsifying activity. Antifungal activity against fungus *Fusarium* sp. was observed in the Lv 05 cell suspension and in the cell suspension and supernatant of the Lv 15 morphotype. These results point out the potential of the microbiota associated with the *L. vastus* nest as a source of biomolecules with biotechnological applications.

Key words: biofoam, *Leptodactylus vastus*, enzymes, antimicrobial activity, biosurfactant

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Ninho de espuma de <i>Leptodactylus vastus</i> coletado na RPPN Monte Alegre, Pacatuba, Ceará.....	15
FIGURA 2 – Diversidade de colônias bacterianas obtidas a partir da amostra N2_2 do ninho de espuma de <i>L. vastus</i> por técnica de espalhamento (diluição 10^{-4})	29
FIGURA 3 – Diagrama de Venn relacionando as quantidades de morfotipos de cada tipo de amostra.....	30
FIGURA 4 – Morfologia das colônias obtidas de ninho de espuma de <i>L. vastus</i>	30
FIGURA 5 – Morfologia das colônias obtidas de poça d'água associada ao ninho de espuma de <i>L. vastus</i>	31
FIGURA 6 – Eletroforese de gel de agarose 1% com amostras amplificadas do gene RNAr 16S dos morfotipos.....	32
FIGURA 7 – Distribuição dos gêneros bacterianos em amostras de ninhos de espuma de <i>L. vastus</i> , poça d'água e em ambos.....	36
FIGURA 8 – Atividade proteásica – caseína, halos presentes nos morfotipos de ninho de espuma Lv 01, 06, 07, 12, 13; Lv 20, 21 vistos em ambos os ambientes e Lv 22, 45, 47, 48, 49, 50 e 52 morfotipos de poça d'água.....	39
FIGURA 9 – Atividade proteásica – gelatina, halos presentes nos morfotipos de ninhos de espuma Lv 1, 6, 7; Lv 20, 21 vistos em ambos os ambientes e Lv 22, 45, 47, 48, 49, 50 morfotipos de poça d'água.....	40
FIGURA 10 – Atividade amilásica, presença de halos nos morfotipos de ninho de espuma Lv 1, 6, 7, 12; Lv 20, 21 de ambos os ambientes e Lv 22, 47, 49, 50 isolados de poça d'água.....	40
FIGURA 11 – Atividade lipásica, presença de halos nos morfotipos de ninho de espuma Lv 1, 12 e Lv 21 presente em ambos os ambientes.....	41
FIGURA 12 – Inibição do crescimento do fungo <i>Fusarium</i> sp. pelo morfotipo Lv 15. O controle negativo utilizado correspondeu a <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922. Sobrenadante livre de célula (A), contado com a colônia (B), suspensão da cultura em discos de papel filtro (C).....	43

FIGURA 13 – Inibição do crescimento do fungo *Fusarium sp* pelo morfotipo Lv 05. Sobrenadante livre de célula (A), contado com a colônia (B), suspensão da cultura em discos de papel filtro (C).....44

FIGURA 14 – Emulsões água/óleo com sobrenadantes de Lv 02 (A), Lv 15 (B), Lv 16 (C) obtidos de ninho de espuma de *L. vastus*.....44

LISTA DE TABELA

TABELA 1 – Enzimas utilizadas em diversos setores industriais e potencial valor de mercado	20
TABELA 2 – Aplicações comuns de biossurfactantes na indústria.....	22
TABELA 3 – Contagem de células viáveis totais em placa das amostras de ninhos de espuma de <i>L. vastus</i> (N) e das poças d'água (P) em que os ninhos estavam inseridos.....	29
TABELA 4 – Espécies mais relacionadas no GenBank das sequencias do gene RNAr 16S dos morfotipos de ninho de espuma de <i>L. vastus</i>	33
TABELA 5 – Espécies mais relacionadas no GenBank após alinhamento das sequencias do gene RNAr 16S dos morfotipos de poça d'água associada ao ninho de espuma de <i>L. vastus</i>	34
TABELA 6 – Atividades enzimáticas positivas para amilase, protease (caseína e gelatina) e lipase das amostras de ninhos de espuma de <i>L. vastus</i> , das poças d'água em que os ninhos estavam inseridos, e amostras encontrados em ambos.....	37
TABELA 7 – Atividades enzimáticas dos morfotipos de ninho de espuma de <i>L. vastus</i>	37
TABELA 8 – Atividades enzimáticas dos morfotipos de poça d'água associada ao ninho de espuma de <i>L. vastus</i>	38

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 Bioespumas de anuros	15
2.2 Prospecção Biotecnológica: Microrganismos, Enzimas e Biosurfactantes	18
3. OBJETIVOS.....	24
3.1. Objetivos específicos	24
4. METODOLOGIA.....	25
4.1. Coleta.....	25
4.2. Isolamento e preparação da coleção	25
4.3 Extração do DNA e amplificação do gene rRNA 16S.....	25
4.4 Purificação do DNA.....	26
4.5 Sequenciamento e identificação molecular.....	26
4.6 Atividades enzimáticas	26
4.7 Atividades antimicrobiana	27
4.7.1 <i>Antibacteriano</i>	27
4.7.2 <i>Antifúngica</i>	27
4.8 Atividade emulsificante	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1 Isolamento e contagem de viáveis dos morfotipos bacterianos do ninho de espuma de <i>L. vastus</i>	29
5.2 Extração e amplificação do RNAr 16S.....	31
5.3 Análise do sequenciamento	32
5.4 Atividades enzimáticas	36
5.5 Atividade antimicrobiana.....	42
5.6 Atividade emulsificante	44
6. CONCLUSÃO.....	48
7. REFERÊNCIAS	49

1. INTRODUÇÃO

Os ninhos de espuma são um dos modos reprodutivos utilizados pelos anfíbios para a deposição de seus ovos permitindo o desenvolvimento dos mesmos independente de um recurso hídrico (HADDAD; PRADO, 2005). Essas estruturas podem ser classificadas em aquáticas ou terrestres/arbóreas (HADDAD; PRADO, 2005), variando com relação à independência da água entre esses dois extremos. Os ninhos de espuma oferecem importantes funções para o desenvolvimento dos anuros, como fornecimento de oxigênio (SEYMOUR; LOVERIDGE, 1994); proteção contra raios ultravioletas (HISSA et al., 2008), predadores e dessecação (DOBKIN; GETTINGER, 1985; HEYER, 1969); aumento da taxa de crescimento (PRADO et al., 2005) e de fertilização (ARZABE, 1999); e estabilidade térmica (DOBKIN; GETTINGER, 1985). Ainda existem poucos estudos sobre sua composição bioquímica e a microbiota presente nessas estruturas.

Cooper et al. (2005) foram os primeiros a estudarem os ninhos de espuma com um viés bioquímico. Esses autores demonstraram a presença de proteínas com massas moleculares entre 10 e 40 kDa, denominando-as de ranaspuminas, e de carboidratos nos ninhos de espuma de *Physalaemus pustulosus*. Para *Leptodactylus vastus*, o nosso grupo de estudos já investigou essa estrutura, que apresentou uma concentração de 1 mg/mL de proteínas e de 0,3 mg/mL de carboidratos, além da presença de uma comunidade bacteriana com aproximadamente $3.0 - 4.0 \times 10^7$ UFC/g (HISSA et al., 2008). Entretanto, a composição, a diversidade, o papel ecológico e o potencial biotecnológico desses microorganismos não foram estudados.

Os micro-organismos são a principal fonte de novas biomoléculas, pois possuem uma grande diversidade metabólica e adaptabilidade genética para sobreviver nas diversas condições ambientais encontradas em seus habitats (WHITMAN; COLEMAN; WIEBE, 1998). Tradicionalmente, enzimas e outros compostos com atividade biológica têm sido acessados por isolamento e cultivo de microorganismos a partir das amostras ambientais.

A comercialização das hidrolases vem dominando o mercado mundial das enzimas industriais (UCHIYAMA; MIYAZAKI, 2009). Estas enzimas são aplicadas em vários setores industriais, tais como, têxtil (amilase, celulase), de detergentes (celulases, lipase, protease), de alimentos (celulases, lactases, proteases), de papel (lipases, xilanases), farmacêutico, além do tratamento de resíduos industriais (LAMMLE et al., 2007).

Alguns microorganismos produzem também biosurfactantes de diferentes naturezas químicas e tamanhos moleculares que diminuem a tensão superficial dos substratos hidrofóbicos insolúveis em água, aumentando assim sua biodisponibilidade e a taxa de biorremediação (PEKDEMIR et al., 1999). Os biosurfactantes são moléculas anfipáticas, compostos naturais não-tóxicos e

biodegradáveis, sendo adequados substitutos dos surfactantes à base de produtos químicos que apresentam desempenhos iguais ou melhores (VENCINO et al., 2016).

Os biosurfactantes possuem uma ampla gama de aplicações biotecnológicas, e poderiam substituir os surfactantes químicos nos mais diversos campos de atuação como na agricultura, limpeza industrial, biorremediação, nanotecnologia, lubrificantes, além de vários usos na indústria alimentícia e de bebidas, de metal e papel, cosméticos, têxteis, biomédica e petroquímica (ARAÚJO; FREIRE; NITSCHKE, 2013; DESAI; BANAT, 1997)

Dessa forma, o estudo dos microrganismos presentes nos ninhos de espuma pode proporcionar uma rica fonte para a exploração de novas moléculas com potencial de aplicação industrial, como enzimas e biosurfactantes.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Bioespumas de anuros

As bioespumas, misturas água-ar produzidas por seres vivos, são estruturas relativamente raras na natureza, pois precisam vencer a alta tensão superficial da água para serem formadas, o que as tornam susceptíveis ao colapso e energeticamente custosas (COOPER; KENNEDY, 2010). Quando essas bioespumas participam do processo reprodutivo em animais são denominadas de ninhos de espuma ou, em alguns casos, de ninho de bolhas (COOPER; KENNEDY, 2010; SCHOR et al., 2016).

Os ninhos de espuma em anuros são formados no momento do amplexo, onde o macho posiciona-se sobre a região dorsal da fêmea. Dessa forma, ambos participam do processo de produção dos ninhos de espuma. A fêmea libera os ovos juntamente com um fluido proteico produzido na região glandular do oviduto, e o macho mistura essa fluido com o esperma e com o ar por meio de rápidos movimentos das pernas traseira. Analogicamente, as pernas do macho funcionam como uma “batedeira de ovos”, fertilizando-os e gerando o ninho de espuma (COOPER et al., 2005; DALGETTY; KENNEDY, 2010; HISSA et al., 2008, 2016).

A família Leptodactylidae apresenta a maior diversidade de espécies produtoras de ninhos de espuma (FROST et al., 2006). Esse grupo é característico da zona tropical (HADDAD; PRADO, 2005; HEYER, 1969; HÖDL, 1990), onde há regiões sem chuvas periódicas e alta incidência de luz solar. Além disso, dentro do gênero *Leptodactylus*, é notável a evolução de ninhos de espuma aquáticos até os terrestres, com espécies apresentando características intermediárias (Figura 1) (HEYER, 1969).

FIGURA 1. Ninho de espuma de *Leptodactylus vastus* coletado na RPPN Monte Alegre, Pacatuba, Ceará.



Fonte: Elaborado pela autora

As vantagens reprodutivas oferecidas pelos ninhos de espuma estão relacionadas, dentre outros fatores, com a proteção da prole contra desidratação (HEYER, 1969). O mesmo autor também resalta a resistência mecânica das bioespumas e a importância dessa característica, pois permite uma maior proteção dos ovos e dos girinos (DOBKIN; GETTINGER, 1985; HEYER, 1969). Por conseguinte, os ninhos de espuma de anuros são ambientes únicos com condições ótimas de desenvolvimento para a prole. Eles proporcionam a manutenção de um ambiente oxigenado, o que permite a permanência dos girinos dentro do ninho mesmo após a eclosão dos ovos (SEYMOUR; LOVERIDGE, 1994).

Heyer (1969) discute que os ninhos de espuma protegem a prole contra predadores. O autor comenta que, os ninhos depositados em água estão protegidos contra insetos aquáticos, cobras e girinos carnívoros. Além disso, o mesmo ainda propõe que a migração do habitat aquático para o terrestre acontece impulsionada pela presença de predadores na água, o que é corroborado por Magnusson e Hero (1991). A bioespuma também pode evitar outro tipo de predação, a intraespecífica, o que é observado em *Pleurodema diplolistris* e em *Physalaemus ephippver* (HÖDL, 1990, 1992). Em *Chiromantis simus*, é observado uma camada adicional de espuma sobre o ninho arbóreo que protege os ovos contra a predação por formigas (BANERJEE, 2014). Os ninhos de espuma têm um papel fundamental na conservação da espécie.

Anfíbios são vulneráveis às mudanças no ambiente e, para estes, a ocorrência de epidemias tem sido mencionada como causa de declínio e extinção de populações (CAREY; COHEN; ROLLINS-SMITH, 1999; SCHUMACHER, 2006). Desde o ano de 1980 que se tem registado um dramático declínio das populações de anfíbios em todo o mundo, caracterizado por colapsos nas populações e extinções maciças localizadas. Algumas espécies patogênicas de *Aeromonas* sp. foram relatadas na mesma época por causarem mortalidade em massa em populações de salamandras e anuros (NYMAN, 1986). No ano de 1993, as populações de mais de 500 espécies de rãs e salamandras dos cinco continentes apresentavam um declínio na sua população (VIAL; SAYLOR, 1993). Um estudo conduzido no Brasil registrou 31 casos de declínio em populações de anfíbios, sendo 19 destes da família Leptodactylidae (ETEROVICK et al, 2005). Uma maior vulnerabilidade dos anfíbios às modificações ambientais provavelmente está relacionada às características de pele, pois sendo esse um substrato muito permeável, permite a livre passagem de elementos disponíveis no ambiente e está mais sujeito às infecções por microrganismos (WELLS, 2007).

As doenças infecciosas emergentes (EIDs) mais relacionadas aos declínios populacionais dos anfíbios são a quitridiomiose e ranavirose, causadas respectivamente por *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) e estirpes de *Ranavirus* (Rv) e o vírus do sapo 3 (FV3) (MILLER et al. 2011, FISHER et al. 2012, OLSON et al. 2013). Os mecanismos biológicos de proteção incluem a

microbiota residente na pele que é composta por espécies de fungos e bactérias produtoras de antibióticos. Ensaios *in vitro* demonstram que espécies bacterianas isoladas de comunidades cutâneas de anfíbios podem apresentar ação potente contra patógenos que afetam populações selvagens de anfíbios, inclusive o fungo Bd mencionado acima (HARRIS et al. 2006; WOODHAMS et al., 2007; LAUER et al., 2008; BRUCKER et al, 2008).

Os ovos de anfíbios fertilizados se desenvolvem fora da mãe na água, onde são expostos a micróbios durante o desenvolvimento. Assim, após a eclosão, o sistema imunológico dos embriões de anfíbios precisa se desenvolver rapidamente (COLOMBO et al, 2015). Podemos hipotetizar que o primeiro contato com a microbiota presente no ninho de espuma com os ovos e girinos pode contribuir com a construção da imunidade inata desses organismos.

Apesar de existirem diversos estudos no que diz respeito à ecologia e à evolução dos ninhos de espumas de anuros, pouco se sabe sobre a composição bioquímica dos mesmos e como essas moléculas podem influenciar a estabilidade e as funções que os ninhos exercem. A bioespuma aquática de *Engystomops pustulosus* (antes *Physalaemus pustulosus*) foi caracterizada por Cooper et al (2005) com essa abordagem. Os autores encontraram uma variedade de proteínas, denominando-as de ranaspuminas, com massas entre 10 e 40 kDa, cuja concentração total variou entre 1 e 2 mg/mL. Concentração semelhante de carboidratos totais foi encontrada. Com relação à atividade superficial, as proteínas da bioespuma de *Engystomops pustulosus* reduziram a tensão superficial da água de 74 para, aproximadamente, 50 mN/m, o que demonstra uma redução maior do que as proteínas-controle, lisozima e albumina, na mesma concentração de 1 mg/mL (COOPER et al., 2005). Com isso, esses autores sugeriram que proteínas desconhecidas com função biológica surfactante evoluíram em anuros.

Uma das poucas espécies a ter o ninho de espuma caracterizado bioquimicamente é *Leptodactylus vastus*. Essa estrutura apresentou uma concentração de 1 mg/mL de proteínas e de 0,3 mg/mL de carboidratos (HISSA et al., 2008). Com relação à atividade de superfície, Hissa et al. (2008) demonstraram que o fluido da bioespuma de *L. vastus* reduziu a tensão superficial da água de 74 para 52 mN/m. A primeira proteína a ser isolada a partir dos ninhos de espuma foi a ranasmurfina (PI-RSF-1), uma proteína de coloração azulada de 26 kDa e presente na bioespuma de *Polypedates leucomystax* (MCMAHON et al., 2006; OKE et al., 2008). A função biológica da PI-RSF-1 ainda é desconhecida, mas os autores propõem, com base na sua estrutura tridimensional, possíveis funções de proteção contra radiação solar e espécies reativas de oxigênio, camuflagem e atividade antimicrobiana.

Do ninho de espuma de *Engystomops pustulosus*, foram isoladas e caracterizadas 6 proteínas, sendo a Ep-RSN-2 uma proteína com função surfactante, cuja sequência não tem similaridade com outras conhecidas (hidrofobinas, caseína do leite, proteínas pulmonares de mamíferos), caracterizando uma nova classe de proteínas surfactantes (FLEMING et al., 2009; MACKENZIE et al., 2009). Outra proteína isolada do ninho de espuma foi a Lv-RSN-1, proveniente da espécie *L. vastus* e que possui uma massa molecular de 23,5 kDa. Lv-RSN-1 apresentou uma eficiente atividade surfactante ao diminuir a tensão superficial da água com apenas 15 µg/mL. Ademais, essa proteína na concentração de 0,1 mg/mL, obteve um índice de emulsão de 35% água/querosene, o qual permaneceu estável por mais de um mês (HISSA et al., 2014).

2.2 Prospecção Biotecnológica: Microrganismos, Enzimas e Biosurfactantes

Uma das maneiras de se extrair valor econômico da biodiversidade é a bioprospecção, termo que academicamente pode ser entendido como a busca sistemática por organismos, genes, enzimas, compostos, processos e partes provenientes de seres vivos, que tenham potencial econômico e, eventualmente, levam ao desenvolvimento de um produto (SACCARO JÚNIOR, 2011). A exploração bioquímica e de recursos genéticos tem sido essencial para a descoberta de novos compostos naturais voltados para a produção de processos alimentares, bens de consumo, saúde pública e usos ambientais e energéticos (FIRN, 2003). Em se tratando de microrganismos, engloba, principalmente, estratégias para exploração da fração cultivável e da fração não-cultivável da biodiversidade microbiana.

Na indústria, os microrganismos ou suas biomoléculas podem ser empregados na produção de compostos comerciais ou para transformação de substratos em produtos de maior valor agregado. Na indústria de alimentos, os microrganismos são utilizados para a produção de bebidas, panificação, produção de queijo e seus derivados, ácidos orgânicos, fermento biológico, enzimas dentre outras aplicações. Na agropecuária, destacam-se os microrganismos utilizados no controle biológico de pragas e vetores, que destroem hectares de plantações comerciais e dessa forma necessitam de um controle imediato, além disso, da utilização de microrganismos fixadores de nitrogênio. Já na área ambiental é crescente o número de trabalhos buscando a recuperação de áreas contaminadas ou degradadas pela ação do homem através da biorremediação. Essas técnicas são bastante promissoras e dependentes de novos isolados. Dessa forma, há o aumento de estudos visando a bioprospecção de novos microrganismos e novas biomoléculas pra atender a demanda de diferentes setores da indústria da biotecnologia (THATOI *et al.*, 2013).

Apesar de todo o sucesso no uso benéfico dos microrganismos para o homem, a diversidade e interdependências desses organismos ainda é um campo a ser explorado. Desta forma, tecnologias tradicionais e avançadas de bioprospecção têm sido desenvolvidas e empregadas para aumentar o

conhecimento da diversidade microbiológica dos processos funcionais em ecossistemas microbianos, como também para a identificação e uso de novos produtos biotecnológicos (PESSOA FILHO, 2015).

Quando falamos de bioprospecção de microrganismos não cultiváveis logo nos referimos à metagenômica que é uma ferramenta emergente, amplamente utilizada pela facilidade e rapidez. As análises metagenômicas consistem no isolamento de DNA proveniente de uma amostra ambiental, fragmentação com enzimas de restrição, inserção do DNA em um vetor adequado, transformação de um hospedeiro bacteriano e *screening* das células recombinantes com abordagens de análise funcional e sequenciamento. Apesar das diversas vantagens que essa metodologia traz, algumas limitações ainda não substituem a bioprospecção por isolamento. No caso de uma função biológica exigir a expressão de múltiplos genes, é necessário que estes estejam presentes no clone. Imaginando uma biblioteca metagenômica com centenas de clones a serem avaliados, essa estratégia exige que métodos eficientes e econômicos sejam aplicados para a avaliação em larga escala (YUN, RYU, 2005). Além disso, a quantidade de dados gerados pelo sequenciamento das bibliotecas metagenômicas, leva a análises laboriosas para as quais novos paradigmas de estudo empregando a bioinformática ainda estão sendo estabelecidos.

Tradicionalmente, compostos com atividade biológica têm sido acessados por métodos envolvendo isolamento e cultivo dos organismos a partir das amostras ambientais, principalmente solo. Morfotipos e/ou produtos de fermentação passam por um processo de triagem para as atividades desejadas. A maioria das enzimas utilizadas industrialmente tem sido descoberta desta maneira (OLIVEIRA; SETTE; FANTINATTI-GARBOGGINI, 2006). Biosurfactantes também costumam ser prospectados por isolamento de microrganismos de amostras ambientais (DECESARO et al, 2013; YADAV et al, 2016;).

As enzimas são potentes biocatalizadores na sua maioria de natureza proteica e conhecidos amplamente por aumentar a velocidade de reações biológicas e químicas. Sabe-se que as enzimas desempenham um papel crucial como catalisadores metabólicos, o que permite o seu uso em vários setores da indústria como de alimentos, farmacêuticos, detergentes, têxteis, celulose e papel, alimentos para animais, couro e cosméticos (ADRIO; DEMAÏN, 2014).

A demanda por enzimas industriais está sofrendo um aumento contínuo impulsionado pela necessidade de soluções sustentáveis para processos industriais e pelo crescimento da demanda de alimentos, resultado do aumento da população mundial. Estima-se que mais de 500 produtos industriais já estão sendo feitos utilizando enzimas proveniente de microrganismos (KUMAR; SINGH, 2013).

Os microrganismos tornaram-se valiosas fontes de enzimas devido suas vantagens como o fácil cultivo, o seu amplo recurso bioquímico e a diversidade genética. Alguns fatores motivam o uso de enzimas microbianas em aplicações industriais, como o aumento da demanda por produtos de consumo, a necessidade de redução de custos nos processos industriais, a segurança ambiental e a possibilidade de reações mais específicas quando comparados com catalisadores químicos (CHOI; HAN; KIM, 2015).

O mercado das enzimas atingiu um montante de US \$ 5 bilhões de dólares em 2016 e espera-se que ultrapasse US \$ 9,5 bilhões até 2024. A aplicação de hidrolases na indústria do petróleo e gás arrecadou cerca de 330 bilhões de dólares em 2015 (Tabela 1).

TABELA 1. Enzimas utilizadas em diversos setores industriais e potencial valor de mercado.

Enzimas	Setor/Indústria	Potencial Valor de Mercado
Lipase, Protease, Celulase, Amilase	Detergente (Novozymes)	\$2.767 M em 2019 (http://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/protein-hydrolysis-enzymes.asp)
Amilase, Glucoamilase, Glucose Isomerase	Processamento de amido (Novozymes/Dinamarca, DuPont/EUA, Rouquette Freres/França etc.)	\$2.238 M em 2018 (http://www.prnewswire.com/news-releases/alcohol-and-starchsugar-enzyme-market-by-type-carbohydrase-protease-and-lipase-by-application-industrial-specialty--geography---global-trends--forecasts-to-2018-256229371.html)
Protease, Fitase, Xilanase	Para ração animal (Royal DSM NV)	\$1.371 M em 2020 (http://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/feed-enzyme.asp)
Xilanase	Celulose e Papel	200 M (www.novozymes.com)
Arbinanase, Amilase, Poligalacturonase	Processamento de frutas ou Vegetais (Novozymes, DSM)	Enzimas em alimentos: \$ 2.3 B em 2018 (http://www.iisc.ernet.in/currsci/jul10/articles22.htm)
Hidrolase	Óleo e Gás (Novozymes)	\$330 B em 2015 (Petrochina, China)
Quimosina	Laticínios (Pfizer, Chr. Hansen)	Enzimas em alimentos: \$ 2.3 B em 2018 (http://www.iisc.ernet.in/currsci/jul10/articles22.htm)
Urease, Pectinase	Vinho (Carlsberg)	Enzimas na alimentação: \$ 1.37 M em 2020 (http://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/feed-enzyme.asp)
Protease	Carne (Novozymes)	Enzimas na alimentação: \$ 1.37 M em 2020 (http://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/feed-enzyme.asp)
Amilase	Têxtil (Novozymes)	\$2.7 M em 2019 (www.marketsandmarkets.com)
Amilase	Panificação	\$695.1 M em 2019 (www.marketsandmarkets.com)
β -Glucanase	Produção de cervejas	Enzimas na alimentação: \$ 1.37 M em 2020 (http://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/feed-enzyme.asp)
Protease	Curtume	Enzimas na alimentação: \$ 1.37 M em 2020 (http://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/feed-enzyme.asp)

Fonte: Adaptado de SINGH et al. (2016).

A comercialização das hidrolases vem dominando o mercado mundial das enzimas industriais (UCHIYAMA; MIYAZAKI, 2009). O mercado mundial das hidrolases atualmente gera um montante de 4 bilhões de dólares ao ano (ABIAM, 2015). Estas enzimas são aplicadas em vários setores industriais, tais como, têxtil (amilase, celulase), de detergentes (celulases, lipase, protease), de alimentos (celulases, lactases, proteases), de papel (lipases, xilanases), farmacêutico, além do tratamento de resíduos industriais (LAMMLE et al., 2007).

Assim como as hidrolases, biossurfactantes também movimentam o mercado da indústria do petróleo. O papel mais comum dos biossurfactantes é aumentar a dispersão de contaminantes na fase aquosa e aumentar a biodisponibilidade do substrato hidrofóbico para microorganismos, com subsequente remoção de tais poluentes através da biodegradação (APARNA; SRINIKETHAN; HEDGE, 2011). Os biossurfactantes são produzidos principalmente por microorganismos aeróbicos em meio aquoso com um matéria-prima de origem, como carboidratos, hidrocarbonetos, gorduras e óleos. Acredita-se que os biossurfactantes são secretados para o meio de cultura para auxiliar no crescimento do microorganismo, facilitando a translocação de substratos insolúveis através das membranas celulares (CAMPOS et al, 2013). Estes compostos possuem moléculas anfipáticas com porções hidrofóbicas e hidrofílicas que atuam entre fluidos de diferentes polaridades (óleo / água e água / óleo), permitindo o acesso a substratos hidrofóbicos e provocando uma redução na tensão superficial, aumentando a área de contato de compostos insolúveis (como os hidrocarbonetos) e o aumento da mobilidade, biodisponibilidade e biodegradação de tais compostos (APARNA; SRINIKETHAN; HEDGE, 2011).

Os biossurfactantes oferecem uma série de vantagens sobre os surfactantes sintéticos, como a biodegradabilidade devido à sua estrutura química simples, compatibilidade ambiental, baixa toxicidade, atividades emulsificante, antitumoral, antimicrobiana, dispersante (BANAT et al, 2010), que permite uso na indústria cosmética, farmacêutica, alimentícia, petroquímica (Tabela 2), alta seletividade devido à presença de grupos funcionais específicos, permitindo especificidade na desintoxicação de poluentes específicos e atividade sob condições de temperaturas extremas, pH e salinidade (KAPADIA; YAGNIK , 2013; SANTOS et al, 2013). Os biossurfactantes também são utilizados em metodologias de recuperação avançada de óleos, na limpeza de navios contaminados e para facilitar o transporte de óleo pesado por oleoduto (ASSADI; TABATABAEE, 2010).

TABELA 2. Aplicações comuns de biossurfactantes na indústria.

Indústria	Aplicação	Papel dos biossurfactantes
Meio ambiente	Biorremediação; Limpeza de derramamento de óleo; Remediação e lavagem do solo	Emulsificação de óleos, redução da tensão interfacial, dispersão de óleos, solubilização de óleos, molhar, espalhar, detergência, formação de espuma, inibição da corrosão em óleos combustíveis e equipamento, lavagem do solo.
Petróleo	Recuperação de óleo aprimorada; De-emulsificação	Emulsificação de óleos, redução da tensão interfacial, De-emulsificação de emulsões de óleo, solubilização de óleos, redução de viscosidade, dispersão de óleos, umectação de superfícies sólidas, espalhamento, detergência, formação de espuma, inibição da corrosão em óleos combustíveis e equipamento.
Mineração	Operações de limpeza de metais pesados; Remediação do solo; Flutuação	Molhabilidade de formação de espuma, agentes de espuma e coletores, remoção de metais ions de soluções aquosas, solo e sedimentos, sequestrantes de metais pesados, espalhamento, inibição de corrosão em óleos.
Alimentos	Emulsificação e de-emulsificação; Ingrediente funcional	Solubilização de óleos aromatizados, controle da consistência, emulsificação, agente umectante, espalhamento, detergência, espuma, espessante.
Farmacêutica	Microbiológico; Farmacêutica e terapêutica	Agentes antiadesivos, antifúngicos, agentes antibacterianos, agentes antivirais, vacinas, terapia gênica, moléculas imunomoduladoras.
Agricultura	Biocontrole; Fertilizantes	Umectante, dispersão, suspensão de pesticidas em pó e fertilizantes, emulsificação de soluções de pesticidas, facilitação de mecanismos de biocontrole de micróbios, patógenos de plantas eliminação e aumento da biodisponibilidade de nutrientes para micróbios benéficos associados às plantas
Cosméticos	Produtos de saúde e beleza	Emulsificação, agentes espumantes, solubilização, agentes molhantes, limpadores, agentes antimicrobianos, mediadores da ação enzimática.
Limpeza	Detergentes para lavagem	Detergentes e desinfetantes para roupa, molhabilidade, espalhamento, inibição da corrosão.
Têxteis	Preparação de fibras; Tingimento e impressão; Acabamento de têxteis	Molhar, penetração, solubilização, emulsificação, detergência e dispersão, umectação e emulsificação no acabamento formulações, amaciamento.
Nanotecnologia	Síntese de nanopartículas	Emulsificação de estabilização

Fonte: SANTOS et al., 2016.

A economia da produção de biossurfactantes merece atenção especial. A produção total de surfactantes em 2012 foi de aproximadamente 12 milhões de toneladas, sendo que apenas 3,5 milhões de toneladas foram biossurfactantes, que tiveram receita de US \$ 6,588 milhões (CAMPOS et al,

2013). No entanto, o foco na sustentabilidade e na nova legislação ambiental levou à busca de surfactantes naturais como alternativas aos produtos existentes. Assim, as indústrias estão atualmente buscando substituir alguns ou todos os surfactantes químicos por biosurfactantes sustentáveis (MARCHANT; BANAT, 2012).

A surpreendente atividade bioquímica dos microrganismos está relacionada a sua grande diversidade metabólica e adaptação genética adquirida ao longo da sua existência, o que os torna uma importante fonte para a prospecção de recursos genéticos e biomoléculas para o avanço biotecnológico e para o desenvolvimento sustentável (ARAÚJO, 2017). O aproveitamento de moléculas naturais demanda, ainda, uma exploração racional, porém eficaz, da biodiversidade, buscando inovar quanto aos espaços explorados, sejam estes ambientais, taxonômicos, químicos, genômicos ou de alvos de ação. Vale ressaltar que este processo abrange, ainda, o desenvolvimento de métodos para a produção destes componentes, garantindo o uso e o suprimento sustentável dos produtos identificados.

3. OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivo isolar e identificar bactérias associadas aos ninhos de espuma da espécie *Leptodactylus vastus* coletados no município de Pacatuba – CE, Brasil, e prospectar seus potenciais biotecnológicos através de atividades biológicas e físico-químicas.

3.1. Objetivos específicos

1. Isolar bactérias através da técnica de espalhamento;
2. Obter uma coleção de bactérias isoladas de ninhos de espuma;
3. Triagem de atividade biológicas com potencial biotecnológico e papel ecológico (proteásica, amilásica, lipásica, antibacteriana, antifúngica e emulsificante);
4. Extrair DNA genômico dos morfotipos da coleção;
5. Amplificar o gene RNAr 16S, purificação e sequenciamento;
6. Identificar os morfotipos por ferramentas de bioinformática.

4. METODOLOGIA

4.1. Coleta

Os ninhos de espuma de *L. vastus* foram coletados na Reserva Particular do Patrimônio Natural de Monte Alegre, localizado na serra de Pacatuba-CE no período chuvoso (janeiro a março de 2018). Os ninhos foram coletados em tubos estéreis de modo asséptico, retirando-se galhos, folhas e outras partículas maiores. Foram coletados em dois pontos do ninho e de poça d'água, denominadas N1, N2, P1 e P2, cada amostra em duplicata. Foram seguidas as normas da legislação vigente no período da coleta com licença SISBIO de número 58036-1 liberada pelo Ministério do Meio Ambiente.

4.2. Isolamento e preparação da coleção

Das amostras de ninho foram retirados excesso de sujeira e os ovos de *L. vastus*. Foram feitas diluições seriadas com amostras de ninhos de espuma e poça d'água para a contagem de viáveis em placa utilizando a técnica de espalhamento. Para as amostras de ninhos, foram pesados 5 g de das amostras de ninho e misturadas com 45 mL de salina (NaCl 0,9%). Para as amostras das poças d'água foram aliqüotados 10 mL em 90 mL de salina. As diluições 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , e 10^{-4} foram plaqueadas em placas de ATGE (ágar 15 g/L; triptona 5 g/L; glicose 1 g/L; extrato de levedura 2,5 g/L) em duplicata, e incubadas a temperatura ambiente por 16 h. Na contagem das viáveis foi feito a média e desvio padrão do número de colônias de cada amostra utilizando ferramentas do Excel. Os morfotipos foram isolados em novas placas de ATGE e incubadas a 37 °C por 16 h. Para construção da coleção dos morfotipos, os mesmos foram cultivados em caldo TGE (triptona 5 g/L; glicose 1 g/L; extrato de levedura 2,5 g/L) à 37 °C, 150 rpm por 16 h. Em seguida, as culturas foram suplementadas com glicerol para uma concentração final de 20 % (v/v) em tubos crioprotetores, e armazenadas no freezer à -80 °C.

4.3 Extração do DNA e amplificação do gene rRNA 16S

A extração de DNA foi conduzida segundo Miyata et al. (2011) com modificações. Os morfotipos foram reativados do estoque em placas de ATGE e incubados a 37 °C por 16 h. Com uma alça de inoculação, um arrastado de células foi transferido para 400 µL de água deionizada estéril em um microtubo de 1,5 mL. Os tubos foram incubados em banho seco a 99 °C por 11 min. Logo em seguida, os tubos foram deixados no freezer -80 °C por 4 min e centrifugados a 12000 rpm por 5 min. O pellet foi descartado e o sobrenadante colocado em um novo tubo. O DNA foi quantificado no nanodrop e usado como molde para amplificação do gene rRNA 16S usando os iniciadores universais 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) e 1525R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC) (LANE, 1991). A reação de PCR foi preparada para um volume de 25 µL contendo 50 ng de DNA genômico como *template*, MgCl₂ 25 mM, 10 mM de dNTP, 5 µM de cada iniciador e 5 unidade de Taq DNA

Polimerase (GoTaq, Promega, USA). A reação de PCR foi conduzida em um termociclador programado para uma desnaturação inicial a 95 °C por 2 min, seguido de 30 ciclos de 95 °C por 1 min, 55 °C por 1 min, 72 °C por 1 min 30 seg. Todos os produtos de PCR foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) corado com o marcador de DNA SYBR™ safe.

4.4 Purificação do DNA

Aos produtos de PCR foram adicionados 2,5 µL acetato de potássio 3M pH 5,5, para uma concentração final de 0,3 M. Em seguida, dois volumes de etanol 100% foram adicionados aos tubos e os mesmos foram homogeneizados por inversão. Os tubos foram incubados no freezer à -80 °C por 30 min. Logo após, foram centrifugados a 7.500 x g, a 4 °C por 15 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol 70% gelado. Novamente as amostras foram centrifugadas a 7.500 x g, a 4 °C por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi deixado por 30 min a 37 °C para evaporação do etanol residual. O produto de PCR purificado foi ressuspensionado em água ultrapura estéril e quantificado em nanodrop, como estabelecido por Sambrook & Russel (2001).

4.5 Sequenciamento e identificação molecular

O DNA purificado foi sequenciado pela empresa MacroGen (www.macrogen.com). As sequências obtidas foram processadas retirando-se as bases com qualidade phred inferior a 20. As sequências com boa qualidade (phred >20) foram usadas para montar a sequência contig do gene RNAr 16S usando no programa CodonCode Aligner. As sequências obtidas foram comparadas com sequências depositadas no GenBank usando o BLAST (ALTSCHUL et al., 1990) para análise de similaridade e identificação dos morfotipos. As espécies mais relacionadas foram escolhidas de acordo com a porcentagem da cobertura e identidade (> 97%).

4.6 Atividades enzimáticas

Atividades enzimáticas foram realizados com os isolados obtidos de ambos os tipos de amostras a fim de comparar entre esses dois ambientes. A coleção de morfotipos foi reativada do estoque em caldo TGE, incubadas a 37 °C, 150 rpm por 16 h. Para as atividades enzimáticas, cada microorganismo foi transferido para placas de ATGE com amido (0,1% p/v) para amilases, com tributirina (1% v/v) para lipases, e leite desnatado (1% p/v) e gelatina (3% p/v), para pesquisa de diferentes proteases. Em geral, as atividades foram detectadas pelo aparecimento de zonas claras ao redor das colônias (RODON et al., 2000). Para a detecção da atividade amilásica foi acrescentado ao meio uma solução de lugol (I2 1%/KI 2%) e para gelatinase foi adicionada uma solução de sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) 4,1M.

4.7 Atividades antimicrobiana

4.7.1 Antibacteriano

Os morfotipos de ninho de espuma de *L. vastus* foram reativados do estoque sendo inoculados em placa ATGE e incubados a 37 °C por 16 h. Logo depois de crescidos em placa, os morfotipos foram inoculados em 10 mL de caldo TGE, a 37 °C, 150 rpm por 16 h. A densidade óptica (DO) a 600 nm das culturas foi ajustada para 1 e centrifugadas a 7.500 x g, 5 min e 4 °C para obtenção do sobrenadante livre de células. Os microorganismos alvos *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Bacillus subtilis* ATCC 6633, também foram crescidos em TGE e a DO 600 nm ajustada para 0,1. Os microorganismos alvos foram transferidos com o auxílio de *swab* para Ágar Muller Hinton (3 g/L de peptona, 17,5 g/L de peptona de caseína, 15 g/L de ágar, 20-25 mg/L de Ca²⁺ e 10-12,5 mg/L de Mg²⁺) e 70 µl dos sobrenadantes dos morfotipos de ninhos de espuma foram adicionados em poços para avaliação da inibição do crescimento dos microorganismos alvos (LIHAN et al, 2014). O ensaio foi repetido utilizando discos embebidos com a suspensão de bactérias, com a DO a 600 nm previamente ajustada para 1, a fim de verificar se as mesmas inibiam o crescimento do microorganismo alvo *E. coli* de forma antagônica (LIHAN et al, 2014; YASIR, 2018).

4.7.2 Antifúngica

Novamente os morfotipos de ninho de espuma de *L. vastus* foram reativados do estoque sendo inoculados em placa ATGE e incubados a 37 °C por 16 h. Logo depois de crescidos em placa, os morfotipos foram inoculados em 10 mL de caldo TGE, a 37 °C, 150 rpm por 16 h. A DO a 600 nm das culturas foi ajustada para 1 e centrifugadas a 7500 g, 5 min e 4 °C para obtenção do sobrenadante livre de células. O fungo alvo *Fusarium* sp. foi crescido previamente durante 72 h em placa àgar batata e 70 µl dos sobrenadantes dos morfotipos de ninhos de espuma foram adicionados em poços para avaliação da inibição do crescimento do fungo. O teste da atividade foi repetido em dois ensaios antagônicos, com o inóculo de uma colônia na placa com *Fusarium* sp crescido à 4 dias e também utilizando discos embebidos com a suspensão de bactérias, com a DO a 600 nm previamente ajustada para 1, a fim de verificar se as mesmas inibiam o crescimento do fungo.

4.8 Atividade emulsificante

Logo após serem reativados em placa ATGE, os morfotipos de ninho de espuma foram inoculados em 10 mL de caldo TGE, a 37 °C, 150 rpm por 16 h. A densidade óptica (DO) a 600 nm das culturas foi ajustada para 1 e centrifugadas a 7.500 x g, 5 min e 4 °C para obtenção do sobrenadante livre de células. A atividade emulsificante foi avaliada de acordo com a metodologia de Iqbal et al., (1995). O ensaio consistiu em adicionar 2,0 mL de querosene (Esso®, BR) e 2,0 mL do sobrenadante bruto, em um tubo de ensaio rosqueado e agitar vigorosamente em vortex por 2 min,

seguido de repouso por 24 h a temperatura ambiente. O índice de emulsificação (IE24) foi a razão entre a altura da fase emulsionada e altura total do sistema, multiplicado por 100.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento e contagem de viáveis dos morfotipos bacterianos do ninho de espuma de *L. vastus*

Foi possível realizar a contagem de células (UFC) viáveis cultiváveis em meio ATGE nas diluições 10^{-4} nas amostras de ninho de espuma e 10^{-3} nas amostras das poças adjacentes onde os ninhos se encontravam (Tabela 3), sendo possível observar a diversidade de culturas entre elas (Figuras 2). Desse modo, por haver uma quantidade maior de unidades formadoras de colônias nos ninhos, acredita-se que estes fornecem um ambiente propício para o desenvolvimento de uma comunidade microbiana. Esse resultado corrobora com os dados encontrados por Hissa et al (2008), mostrando que a bioestrutura dos ninhos de espuma possui uma comunidade bacteriana.

TABELA 3. Contagem de células viáveis totais em placa das amostras de ninhos de espuma de *L. vastus* (N) e das poças d'água (P) em que os ninhos estavam inseridos.

Amostra	UFC/mL
P1	$2,25 \pm 0,5 \cdot 10^5$
P2	$3,75 \pm 0,17 \cdot 10^4$
	UFC/g
N1	$2,22 \pm 0,46 \cdot 10^7$
N2	$1,47 \pm 0,85 \cdot 10^7$

Fonte: Elaborada pela autora

FIGURA 2. Diversidade de colônias bacterianas obtidas a partir da amostra N2_2 do ninho de espuma de *L. vastus* pela técnica de espalhamento (diluição 10^{-4}).



Fonte: Elaborada pela autora

Com relação à diversidade de morfotipos, os ninhos de espuma apresentaram 16 morfotipos e as poças d'água apresentaram 21, sendo dois desses comuns em ambos como demonstrado no Diagrama de Venn abaixo (Figura 3).

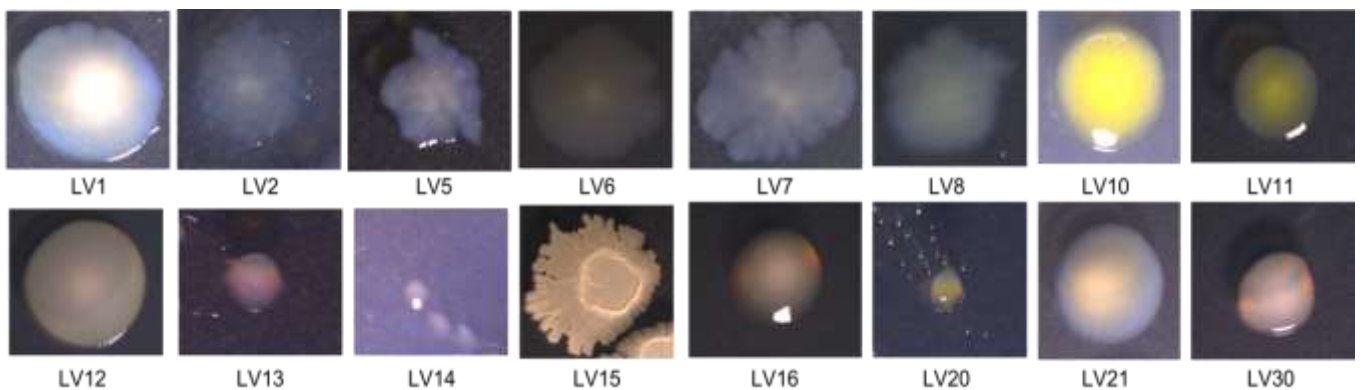
FIGURA 3. Diagrama de Venn relacionando as quantidades de morfotipos de cada tipo de amostra.



Fonte: Elaborada pela autora

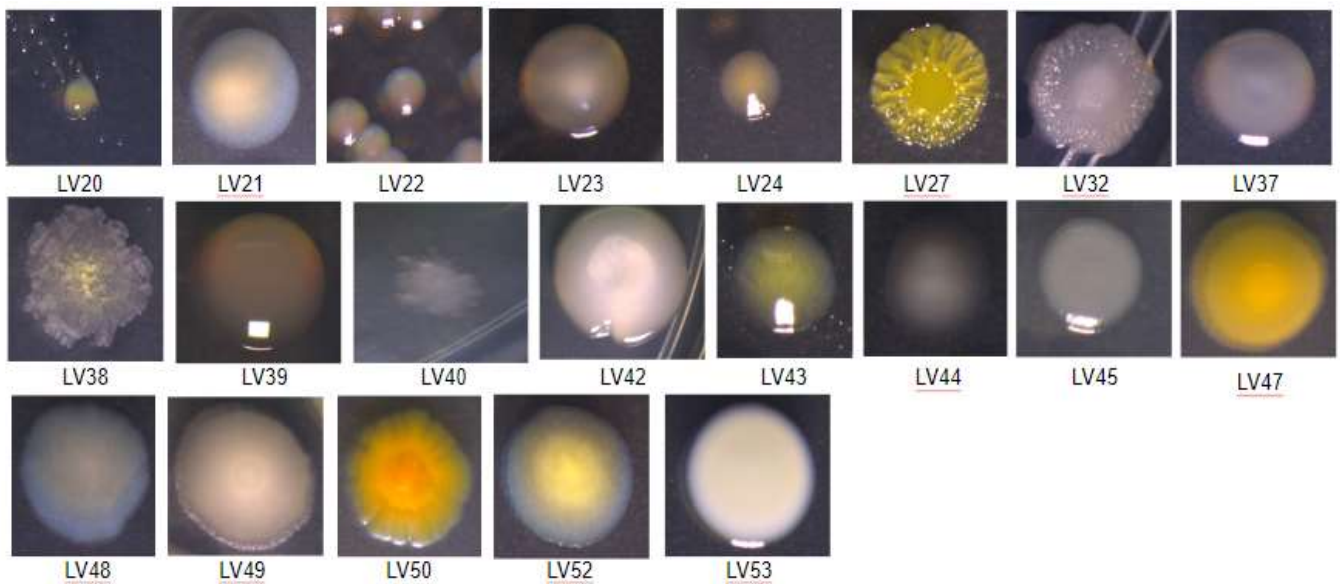
Devido ao fato de os ninhos de espuma terem apresentado poucos morfotipos em comum com o ambiente adjacente, somado ao fato de apresentarem uma alta quantidade de viáveis, acredita-se que os ninhos de espuma possuem uma comunidade única, podendo ter uma maior contribuição parental, quando comparado com a contribuição do ambiente em que se encontra.

FIGURA 4. Morfologia das colônias obtidas de ninho de espuma de *L. vastus*.



Fonte: Elaborada pela autora

FIGURA 5. Morfologia das colônias obtidas de poça d'água associada ao ninho de espuma de *L. vastus*.



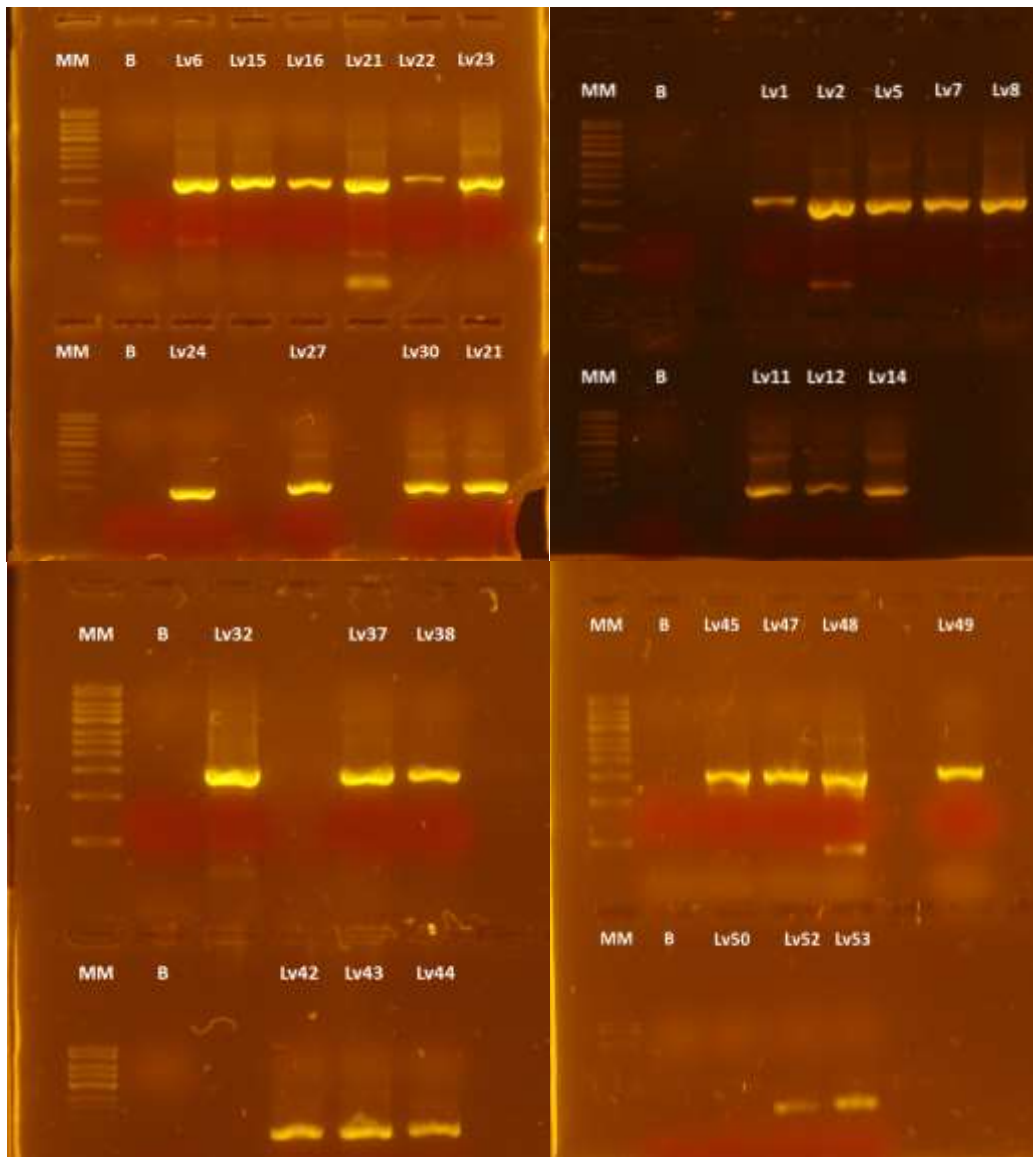
Fonte: Elaborada pela autora

Nas figuras 4 e 5, nos mostra a diversidade na morfologia das colônias dos isolados de ninho de espuma de *L. vastus* e poça d'água associada. Elas foram diferenciadas com base nas suas características macroscópicas como cores, tamanho, relevo, opacidade, bordas, entre outras.

5.2 Extração e amplificação do RNAr 16S

O DNA genômico de todos os morfotipos dos ninhos de espuma e das poças d'água associadas aos ninhos foram extraídos. Das 35 bactérias, 32 tiveram o gene RNAr 16S amplificado, detectados através da presença de bandas em gel de agarose (Figura 6). Não foi possível realizar a amplificação do gene RNAr 16S das Lv 20, 40 e 50.

FIGURA 6. Eletroforese de gel de agarose 1% com amostras amplificadas do gene RNAr 16S dos morfotipos.



Fonte: Elaborada pela autora

5.3 Análise do sequenciamento

As espécies mais relacionadas no GenBank após alinhamento local através do BLAST das sequências do gene RNAr 16S dos morfotipos de ninho de espuma de *L. vastus* como montado nas Tabelas 4 e 5

TABELA 4. Espécies mais relacionadas no GenBank das sequências do gene rNAr 16S dos morfotipos de ninho de espuma de *L. vastus*.

Cepas	Espécies mais relacionadas no GenBank	16S rDNA		Nº de acesso
		ID (%)	Tamanho (pb)	
Lv 01	<i>Aeromonas hydrophila</i>	100	1389	CP016380.1
	<i>Aeromonas encheleia</i>	99		MG428961.1
	<i>Bacteroides paurosaccharolyticus</i>	99		MG428881.1
	<i>Aeromonas aquatica</i>	99		CP018201.1
Lv 02	<i>Delftia sp strain</i>	99	1426	MH698885.1
	<i>Delftia tsuruhatensis</i>			MH478206.2
	<i>Delftia lacustris</i>			MH333093.1
Lv 05	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	99	1324	NR_042435.1
Lv 06	<i>Aeromonas caviae</i>	99	1348	CP025705.1
	<i>Aeromonas dhakensis</i>			CP023141.1
	<i>Aeromonas punctata</i>			FJ940803.1
Lv 07	<i>Aeromonas caviae</i>	99	1484	CP025705.1
	<i>Aeromonas dhakensis</i>			CP023141.1
Lv 08	<i>Enterobacter cloacae</i>	99	1379	MH100700.1
	<i>Cronobacter sakazakii</i>			KT933253.3
	<i>Salmonella sp</i>			KU641450.1
Lv 10	<i>Stenotrophomonas sp</i>	99	1419	MH703460.1
	<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i>			LT223687.1
	<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i>			99
Lv 11	<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i>	98	1502	CP016756.1
	<i>Stenotrophomonas nitritireducens</i>	98		AB294556.1
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	98		MG576051.1
	<i>Stenotrophomonas pictorum</i>	98		
Lv 12	<i>Aeromonas hydrophila</i>	100	1495	CP016990.1
	<i>Aeromonas aquatica</i>	100		CP018201.1
	<i>Aeromonas rivipollensis</i>	99		CP027856.1
	<i>Aeromonas veronii</i>	99		AY987746.1
Lv 13	<i>Klebsiella oxytoca</i>	99	1314	LS483483.1
Lv 14	<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	99	1356	KX980434.1
	<i>Pseudomonas peli</i>	98		HQ202835.1
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	98		HQ874650.1
Lv 15	<i>Bacillus subtilis</i>	100	1425	MG706013.1
	<i>Bacillus sonorensis</i>			MH371778.1
	<i>Bacillus tequilensis</i>			MH100904.1
Lv 16	<i>Gemmobacter caeni</i>	99	1409	NR_108321.1
Lv 21	<i>Aeromonas hydrophila</i>	99	1502	CP016989.1
	<i>Aeromonas aquática</i>			CP018201.1
	<i>Aeromonas veronii</i>			AY987746.1
	<i>Aeromonas encheleia</i>			MG428961.1
Lv 30	<i>Pseudomonas putida</i>	99	1382	LT799039.1
	<i>Pseudomonas monteilii</i>			KT881478.1
	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>			KU597529.1

Fonte: Elaborada pela autora

Os morfotipos com sequências de melhor qualidade foram identificados a nível de gênero. Para uma melhor distinção das espécies relacionadas é necessário a utilização de outras sequências, como *gyrB* (subunidade B da DNA girase) e *rpoD* (fator $\delta 70$) (BORREL et al, 1997; YÁÑEZ et al., 2003; SAAVEDRA et al., 2006). Alguns gêneros encontrados no ninho de espuma de *L. vastus* já

foram relatados por Flechas et al (2018) como *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*. Os autores estudaram a microbiota associada e os peptídeos antimicrobianos da pele de duas espécies simpátricas de anfíbios, *Dendropsophus labialis* e *Rheobates palmatus*, presente nos Andes colombianos.

Ao estudar os microrganismos morfotipos da pele do anfíbio *Rana sphenoccephala* e o potencial destes em inibir ou estimular o crescimento do fungo patogênico Bd, Holden et al. (2015) reportaram *Pseudomonas geniculata*, *P. hibiscicola* e *Stenotrophomonas maltophilia* como inibidores de 90 % do crescimento do fungo Bd. Nesse mesmo estudo, encontramos a 3 representantes do gênero *Pseudomonas* e 2 representantes do gênero *Stenotrophomonas* que podem atuar como microrganismos protetores contra infecções por fungos patogênicos. Isso indica a relação da microbiota cutânea desses animais com a microbiota ninho de espuma e que esta pode ter uma contribuição na imunidade inata dos ovos e girinos.

TABELA 5. Espécies mais relacionadas no GenBank após alinhamento das sequências do gene RNAr 16S dos morfotipos de poça d'água associada ao ninho de espuma de *L. vastus*.

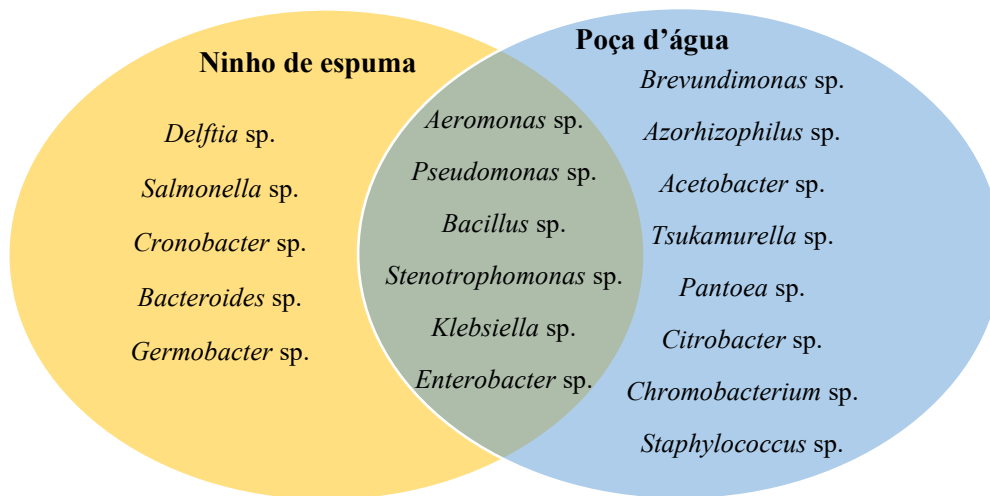
Cepas	Espécies mais relacionadas no GenBank	16S rDNA		Nº de acesso
		ID (%)	Tamanho (pb)	
Lv 24	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	99	1412	KF975414.1
	<i>Brevundimonas nasdae</i>			KC178596.1
	<i>Brevundimonas sp.</i>			JX661060.1
Lv 27	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>	99	1475	LN651270.1
	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>			NR_117269.1
	<i>Pseudomonas oleovorans</i>			AY623816.1
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			MG892781.1
Lv 32	<i>Bacillus cucumis</i>	99	1440	NR_148626.1
	<i>Bacillus drentensis</i>			DQ275176.1
	<i>Bacillus niacini</i>			JN993716.1
	<i>Bacillus pocheonensis</i>			GU329910.1
	<i>Azorhizophilus paspali</i>			LN874287.1
	<i>Bacillus bataviensis</i>			EU334358.1
Lv 37	<i>Bacillus circulans</i>	99	1417	EF100968.1
	<i>Bacillus nealsonii</i>			LT223630.1
	<i>Bacillus subtilis</i>			KT901826.1
Lv 38	<i>Tsukamurella tyrosinosolvans</i>	99	1426	MG763891.1
	<i>Tsukamurella sp.</i>			HQ622532.2
	<i>Tsukamurella hominis</i>			KY787186.1
	<i>Tsukamurella pulmonis</i>			AB478948.1
	<i>Tsukamurella strandjordii</i>			NR_025113.1
	<i>Tsukamurella inchonensis</i>			AB478960.1
	<i>Tsukamurella pseudospumae</i>			AY333425.1
	<i>Tsukamurella paurometabola</i>			NR_074458.1
	<i>Tsukamurella spumae</i>			AY238512.1
<i>Tsukamurella spongiae</i>	NR_043137.1			
Lv 40	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	99	1447	KP644236.1
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99		GU384228.1
	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	99		HQ454993.1
	<i>Pseudomonas otitidis</i>	98		KU551193.1
Lv 42	<i>Klebsiella quasipneumoniae</i>	99	1408	CP029597.1
	<i>Enterobacteriaceae bacterium</i>			CP024784.1
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>			MH036335.1
	<i>Klebsiella variicola</i>			CP013985.1
Lv 43	<i>Stenotrophomonas sp.</i>	99	1417	AB180662.1
	<i>Stenotrophomonas terrae</i>			KT380555.1
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>			FJ194517.1
	<i>Stenotrophomonas nitritireducens</i>			GU945537.1

	<i>Xanthomonas sp.</i>			AF385546.1
	<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i>			KX611377.1
	<i>Klebsiella oxytoca</i>			LS483483.1
	<i>Klebsiella sp.</i>			AB118219.1
Lv 44	<i>Pantoea dispersa</i>	98	1477	JF772060.1
	<i>Klebsiella michiganensis</i>			CP029141.1
	<i>Citrobacter werkmanii</i>			CP024675.1
		98		
	<i>Chromobacterium aquaticum</i>	97		LN995680.1
Lv 45	<i>Chromobacterium rhizoryzae</i>	97	1488	CP031968.0
	<i>Chromobacterium haemolyticum</i>			NR_043957.1
	<i>Chromobacterium violaceum</i>	97		HM449690.1
		99		
	<i>Bacillus sp.</i>	99		KR108383.1
	<i>Bacillus mangrovi</i>	98		NR_157636.1
Lv 47	<i>Bacillus indicus</i>	98	1491	MG651110.1
	<i>Brevundimonas bullata</i>	97		KR085792.1
		99		
	<i>Pseudomonas entomophila</i>	99	1531	NR_102854.1
	<i>Pseudomonas putida</i>			CP011789.1
Lv 48	<i>Pseudomonas mosselii</i>	99	1531	NR_024924.1
	<i>Pseudomonas montelii</i>			CP022562.1
	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>			CP031146.1
	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>			CP031729.1
		99		
	<i>Bacillus sp.</i>	99		CP020437.2
	<i>Bacillus cereus</i>			CP017060.1
	<i>Bacillus thuringiensis</i>			CP015350.1
Lv 49	<i>Bacillus toyonensis</i>	99	1532	CP006863.1
	<i>Bacillus mobilis</i>			CP031443.1
	<i>Bacillus wiedmannii</i>			NR_152692.1
	<i>Acetobacter pasteurianus</i>			FM179768.1
		99		
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99	1588	CP028358.1
Lv 52	<i>Stenotrophomonas sp.</i>	99	1588	AB200253.1
	<i>Pseudomonas geniculata</i>			KJ147059.1
	<i>Pseudomonas hibiscicola</i>			KC172017.1
		99		
	<i>Staphylococcus kloosii</i>	99		CP027846.1
	<i>Staphylococcus sp.</i>	99		HQ154574.1
Lv 53	<i>Staphylococcus cohnii</i>	98	1510	CP027422.1
	<i>Staphylococcus succinus</i>	98		CP018199.1
	<i>Staphylococcus gallinarum</i>	98		MH450100.1
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	98		CP022093.2

Fonte: Elaborada pela autora

Pela Tabela 4 e 5, foi possível observar alguns gêneros presentes apenas nos ninhos de espuma, outros apenas nas poças d'água e outros presentes em ambos os ambientes (FIGURA 7), confirmando que o ninho tem uma microbiota própria e única, independente do ambiente em que se encontra.

FIGURA 7. Distribuição dos gêneros bacterianos em amostras de ninhos de espuma de *L. vastus*, poça d'água e em ambos.



Fonte: Elaborada pela autora

O gênero *Aeromonas*, que foi relacionado com 5 dos 16 morfotipos de ninho de espuma, já foi descrito por causar mortes em massa da espécie *Rana muscosa* nos anos 80 (BRADFORD, 1991). Na Califórnia houve dois anos de surtos de ranavirose esporádicos e menores em girinos de populações de *Rana muscosa* que foram previamente dizimadas por quitridiomicose (SMITH et al. 2017), enquanto uma pequena população de anuros cativos incluiu indivíduos infectados por Bd, Rv e também bactérias *Aeromonas* sp (MILLER et al, 2008). Entretanto, ainda não foi relatado a susceptibilidade de *L. vastus* à infecção por espécies de *Aeromonas* sp., sendo *A. hydrophila* já descrita por fazer parte da microbiota normal de anfíbios (COLOMBO et al, 2015). A comunidade simbiótica bacteriana contribui para a imunidade inata dos anfíbios por interações competitivas entre espécies e produção de moléculas antimicrobianas, inibindo o crescimento de potenciais patógenos (PASSOS, 2018). Mais estudos sobre a comunidade microbiana cultivável e não cultivável dos ninhos de espuma de *L. vastus* precisam ser investidos para melhor elucidar a contribuição ecológica de proteção dessa microbiota.

5.4 Atividades enzimáticas

Dentre os 35 morfotipos, 11 apresentaram atividade amilásica, sendo 4 morfotipos de ninho, 5 de poça d'água e 2 morfotipos presentes em ambas as amostras. Para a atividade proteásica com leite desnatado, em 15 morfotipos foi observado a presença de halos, sendo 5 morfotipos de ninho, 8 de poça d'água e 2 morfotipos presentes em ambas as amostras. Para a atividade proteásica com gelatina, 11 morfotipos formaram o halo, sendo 3 de amostras de ninho, 6 de amostras de poça e 2 presentes em ambas as amostras. Na atividade lipásica, 3 morfotipos apresentaram uma discreta atividade, 2 morfotipos de ninho e 1 morfotipo presente em ambas as amostras, como é mostrado na Tabela 6. Dessa forma, a atividade proteásica foi a mais encontrada. Levando-se em consideração

que os ninhos de espuma de *L. vastus* apresentam em sua composição majoritária proteínas e carboidratos (HISSA et al., 2008), pode explicar o fato de a microbiota associada apresentar maior atividade proteásica.

TABELA 6. Atividades enzimáticas positivas para amilase, protease (caseína e gelatina) e lipase das amostras de ninhos de espuma de *L. vastus*, das poças d'água em que os ninhos estavam inseridos, e amostras encontrados em ambos.

Atividade enzimática	Morfotipos de Ninho	Morfotipos de Poça	Morfotipos visto em Ambos
Amilase	4 (11,4%)	5 (14,3%)	2
Protease – Caseína	5 (14,3%)	8 (22,8%)	2
Protease - Gelatina	3 (8,7%)	6 (17,1%)	2
Lipase	2 (5,7%)	1	1

Fonte: Elaborada pela autora

Como foi mostrado na Tabela 6, o maior número de morfotipos com atividade proteásica e amilásica são os de poças d'água próximas aos ninhos.

TABELA 7. Atividades enzimáticas dos morfotipos de ninho de espuma de *L. vastus*.

Morfotipo	Atividade amilásica	Atividade proteásica - caseína	Atividade proteásica - gelatina	Atividade Lipásica
Lv 01	+	+	+	+
Lv 02	-	-	-	-
Lv 05	-	-	-	-
Lv 06	+	+	+	-
Lv 07	+	+	+	-
Lv 08	-	-	-	-
Lv 10	-	-	-	-
Lv 11	-	-	-	-
Lv 12	+	+	-	+
Lv 13	-	+	-	-
Lv 14	-	-	-	-
Lv 15	-	-	-	-
Lv 16	-	-	-	-
Lv 20	+	+	+	-
Lv 21	+	+	+	+
Lv 30	-	-	-	-

Fonte: Elaborada pela autora

Foram observados pequenos halos na atividade lipásica, apenas em morfotipos de ninho de espuma, Lv 01, 12 e 21. Essa baixa taxa de atividade lipásica, é um resultado já esperado devido a composição bioquímica do ninho de espuma conter predominantemente proteínas e carboidratos como relatado por Hissa et al (2008). Por outro lado, os ninhos de espuma apresentaram mais morfotipos com atividade lipásica quando comparado com os morfotipos das poças d'água.

Os morfotipos de ninho de espuma com atividades enzimáticas em todos os ensaios realizados, Lv 1 e 21 foram relacionados principalmente com espécies do gênero *Aeromonas* sp. Espécies como *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas caviae* já foram relatadas por produzirem hidrolases, como proteases, lipases e amilase (NAM; JOH, 2007). Essas proteínas já foram descritas por serem fatores de virulência e causarem a patogeneidade de espécie do gênero *Aeromonas* (ALBERT et al., 2000; KONEMAN et al., 2001; WATANABE et al., 2004; FADANELLI, 2005). Se estudos posteriores confirmarem um potencial de interesse industrial para aplicações dessas enzimas, demonstrando o valor agregado a elas, faz-se-á necessário a expressão das mesmas em sistema heterólogo por métodos de clonagem molecular utilizando microrganismos não patogênicos.

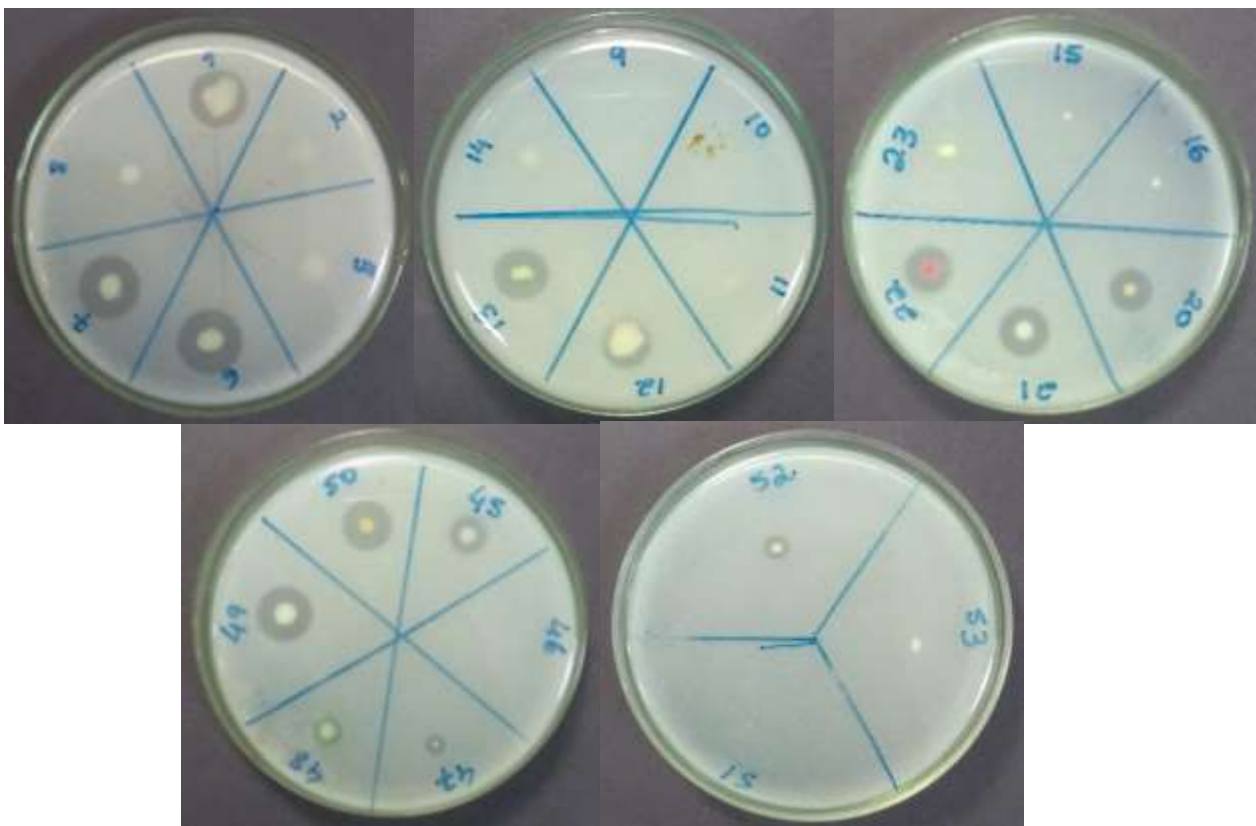
TABELA 8. Atividades enzimáticas dos morfotipos de poça d'água associada ao ninho de espuma de *L. vastus*.

Morfotipos	Atividade amilásica	Atividade proteásica - caseína	Atividade proteásica - gelatina	Atividade lipásica
Lv 22	-	+	+	-
Lv 23	-	-	-	-
Lv 24	-	-	-	-
Lv 27	-	-	-	-
Lv 32	+	-	-	-
Lv 37	+	-	-	-
Lv 38	-	-	-	-
Lv 39	-	-	-	-
Lv 40	-	-	-	-
Lv 42	-	-	-	-
Lv 43	-	-	-	-
Lv 44	-	-	-	-
Lv 45	-	+	+	-
Lv 47	+	+	+	-

Lv 48	-	+	+	-
Lv 49	+	+	+	-
Lv 50	+	+	+	-
Lv 52	-	+	-	-
Lv 53	-	-	-	-

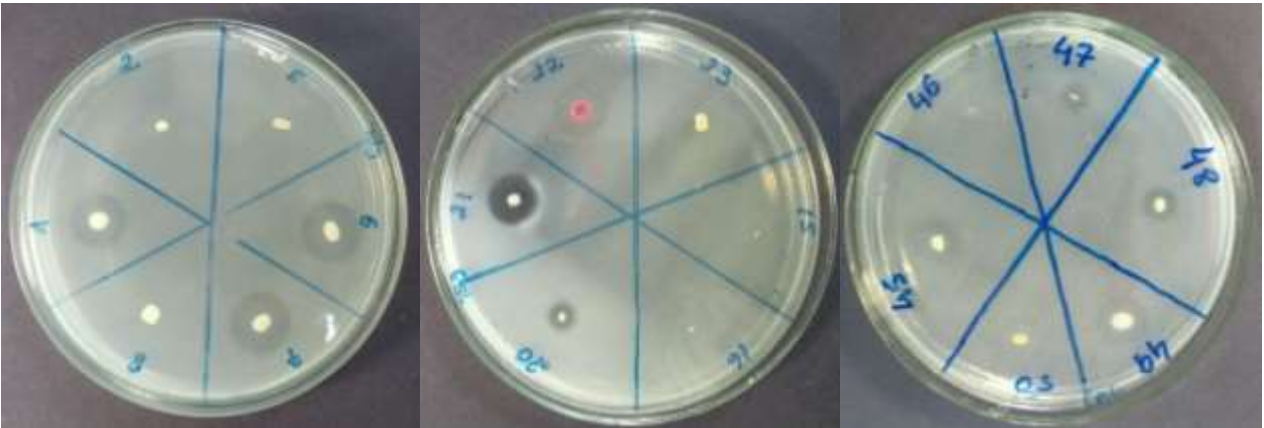
Fonte: Elaborada pela autora

FIGURA 8. Atividade proteásica – caseína, halos presentes nos morfotipos de ninho de espuma Lv 01, 06, 07, 12, 13; Lv 20, 21 vistos em ambos os ambientes e Lv 22, 45, 47, 48, 49, 50 e 52 morfotipos de poça d'água.



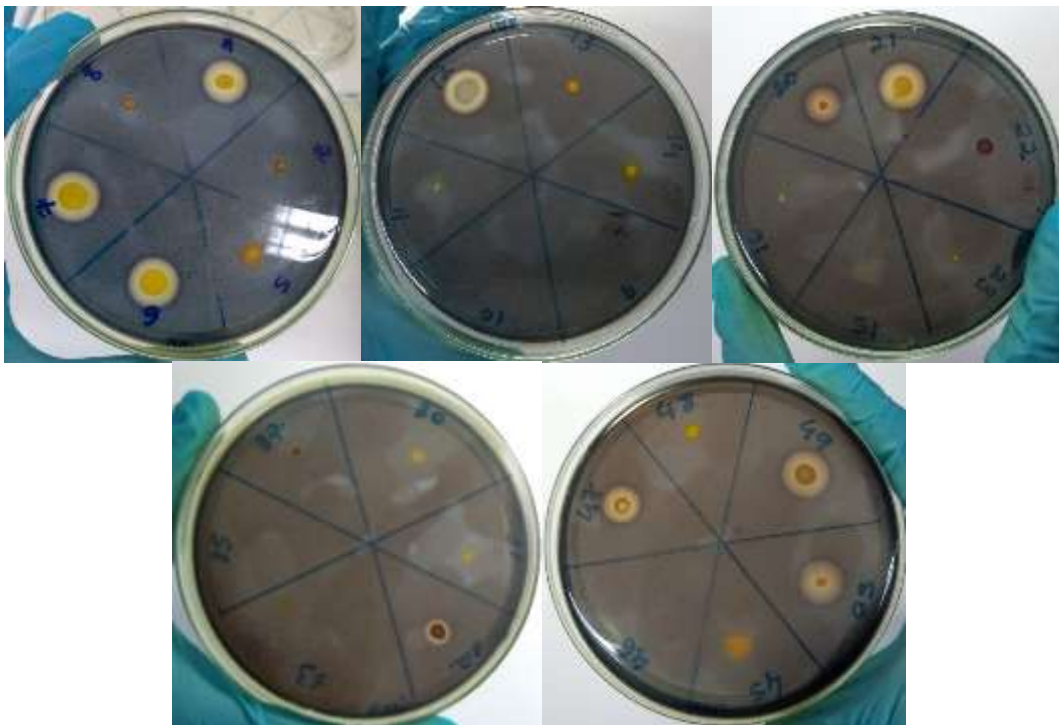
Fonte: Elaborada pela autora

FIGURA 9. Atividade proteásica – gelatina, halos presentes nos morfotipos de ninhos de espuma Lv 1, 6, 7; Lv 20, 21 vistos em ambos os ambientes e Lv 22, 45, 47, 48, 49, 50 morfotipos de poça d'água.



Fonte: Elaborada pela autora

FIGURA 10. Atividade amilásica, presença de halos nos morfotipos de ninho de espuma Lv 1, 6, 7, 12; Lv 20, 21 de ambos os ambientes e Lv 22, 47, 49, 50 isolados de poça d'água.



Fonte: Elaborada pela autora

FIGURA 11. Atividade lipásica, presença de halos nos morfotipos de ninho de espuma Lv 1, 12 e Lv 21 presente em ambos os ambientes.



Fonte: Elaborada pela autora

Atualmente, mais de 500 produtos são produzidos usando enzimas e cerca de 150 processos industriais se beneficiam do uso de enzimas ou catalisadores de microrganismos. Além disso, mais de 3000 enzimas são conhecidas e aproximadamente 65% são hidrolases usadas nas indústrias de detergentes, têxteis, papel, celulose e amido e quase 25% delas são usadas para processamento de alimentos (ADRIO; DEMAIN, 2014).

Peptidases ou proteases são enzimas proteolíticas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas em proteínas ou peptídeos. As peptidases também são um potencial alvo de drogas para doenças microbianas, participando da patogênese, inativando os mediadores de defesa imunológica do hospedeiro, no processamento de proteínas hospedeiras ou parasitárias e na digestão de proteínas hospedeiras. Estas características tornam as peptidases muito valiosas para as indústrias farmacêuticas (VERMELHO, 2013). Outras inúmeras aplicações de peptidases estão nas indústrias de detergentes, cosmética, química e alimentícia (ADRIO; DEMAIN, 2014).

As enzimas amilolíticas são uma das enzimas mais interessantes para processos industriais. A α -amilase de diferentes espécies do gênero *Bacillus* são as amilases mais aplicadas em processos biotecnológicos, devido às suas propriedades termofílicas e altas taxas de conversão (PRAKASH et al., 2010). As amilases são também utilizadas na indústria alimentar para a produção de xaropes de glucose, frutose e maltose, redução da viscosidade dos xaropes, redução da turbidez dos sumos e também da fermentação do álcool. Eles também estão envolvidos nas indústrias têxtil, papelaria, detergente, química, farmacêutica e de petróleo (VERMELHO, 2013; KYAW et al., 2010). Quase todas as atividades amilásicas em isolados de poça d'água são do gênero *Bacillus*, demonstrando o potencial desses isolados para produção desse tipo de enzima.

As aplicações biotecnológicas de lipases têm um amplo espectro de uso, incluindo nas indústrias alimentícia, láctea, farmacêutica, cosmética, agroquímica, biossurfactante, detergente e

papel (GUPTA et al, 2004; HASAN et al, 2006; SANGEETHA et al, 2011). A produção de biodiesel tem sido um dos principais setores que estimulam a busca de lipases (CHARPE; RATHOD, 2011). O biodiesel é composto de ácidos graxos metil-esterificados derivados da transesterificação de triglicérides por ação enzimática, proporcionando uma série de vantagens, como a redução do processo operacional na fabricação e separação dos subprodutos do glicerol. Para o meio ambiente, as vantagens são inúmeras, como a redução de emissões de partículas, baixa toxicidade e alta biodegradabilidade (VERMELHO, 2013).

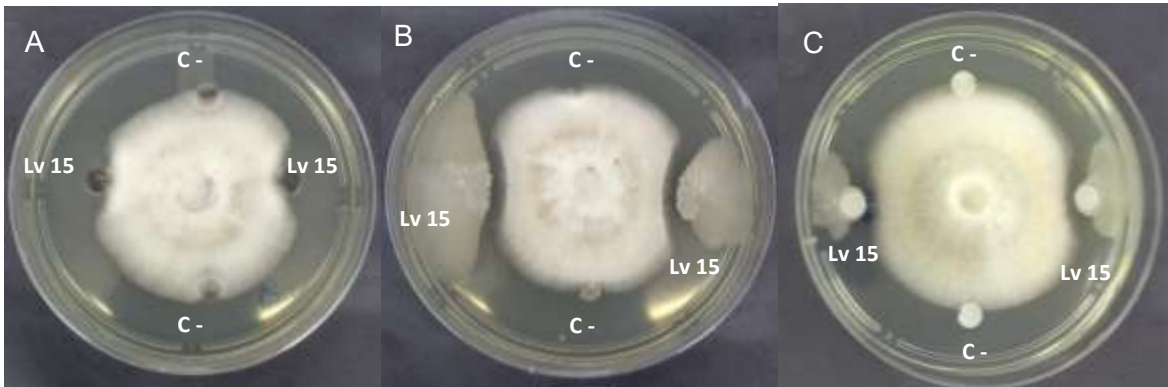
5.5 Atividade antimicrobiana

Nos ensaios feitos com sobrenadante e célula não foram observados atividade antibacteriana contra os microrganismos testados *E. coli* e *Bacillus subtilis*. Os microrganismos alvos escolhidos são compatíveis com o nível I de biossegurança do laboratório. Isso não significa dizer que os morfotipos não possuem tal atividade, pois testes com outros microrganismos alvo precisam ser realizados.

Vale ressaltar que espécies de *Aeromonas*, encontradas nos ninhos de espuma, possuem a capacidade de inibir compostos antibacterianos de outras espécies. O recente seqüenciamento completo do genoma de *A. hydrophila* ATCC7966, (Seshadri et al, 2006), permitiu a identificação de uma protease extracelular (EprA), previamente descrita por Chang et al (1997) e Yu et al (2005), e de uma metaloprotease similar a uma protease de *Vibrio cholerae*, a qual, pode estar envolvida na degradação de proteínas antimicrobianas.

No ensaio antifúngico, observamos atividade contra o fungo *Fusarium* sp. no sobrenadante e no ensaio antagônico da Lv 15, e no ensaio antagônico da Lv 05 (Figura 12 e 13). Esses morfotipos foram relacionados com espécies do gênero *Bacillus* e *Pseudomonas*, respectivamente, o que corrobora com relatos já descritos que várias espécies desses gêneros produzem moléculas com atividade antifúngica (YASIR, 2018; FLECHAS et al, 2018; HOLDEN et al, 2015). Holden et al (2015) e Flechas et al (2018) discutem especificamente sobre a proteção da microbiota da pele de anfíbios contra o fungo patogênico Bd, onde encontraram espécies dos gêneros citados com atividade antifúngica. Em ninho de espuma de *L. vastus* é primeira vez que esses gêneros estão associados a essas atividades.

FIGURA 12. Inibição do crescimento do fungo *Fusarium* sp. pelo morfotipo Lv 15. O controle negativo utilizado correspondeu a *Escherichia coli* ATCC 25922. Sobrenadante livre de célula (A), contato com a colônia (B), suspensão da cultura em discos de papel filtro (C).



Fonte: Elaborada pela autora

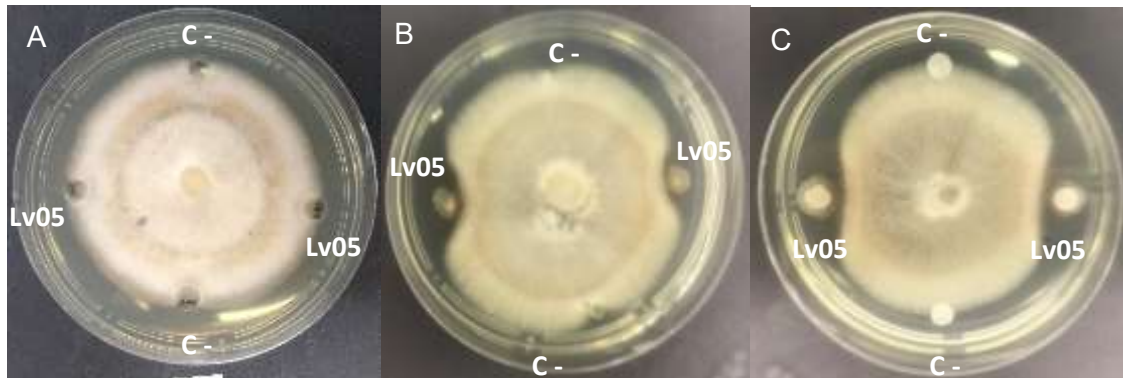
Ambos os tipos de ensaio são essenciais para se entender como se dá a produção desses antimicrobianos. Atividades encontradas no sobrenadante, indicam moléculas que são produzidas constitutivamente com o crescimento e são secretadas. O ensaio antagônico mostra se aquele microrganismo é capaz de produzir moléculas com a atividade na presença de outros microrganismos, sendo esta produção induzida pela ameaça.

O morfotipo Lv 15 produz uma molécula com atividade antifúngica para *Fusarium* sp e secreta para o meio extracelular e essa produção parece estar associada ao crescimento dessa bactéria. Quando fazemos o ensaio antagônico essa atividade se mostra ainda mais notável.

No caso do morfotipo Lv 05 ela não produz nenhuma molécula antifúngica associada ao seu crescimento visto que não foi possível observar essa atividade no sobrenadante. Entretanto quando realizado os testes antagônicos a bactéria foi induzida a produzir algum composto para inibir o crescimento do fungo.

Esses resultados reforçam ainda mais a hipótese da contribuição da microbiota associado aos ninhos de espuma de *L. vastus* na imunidade inata dos ovos e girinos, e que a comunidade que protege a pele desses animais pode ser construída desde a eclosão no primeiro contato com este ambiente.

FIGURA 13. Inibição do crescimento do fungo *Fusarium sp* pelo morfotipo Lv 05. Sobrenadante livre de célula (A), contado com a colônia (B), suspensão da cultura em discos de papel filtro (C).



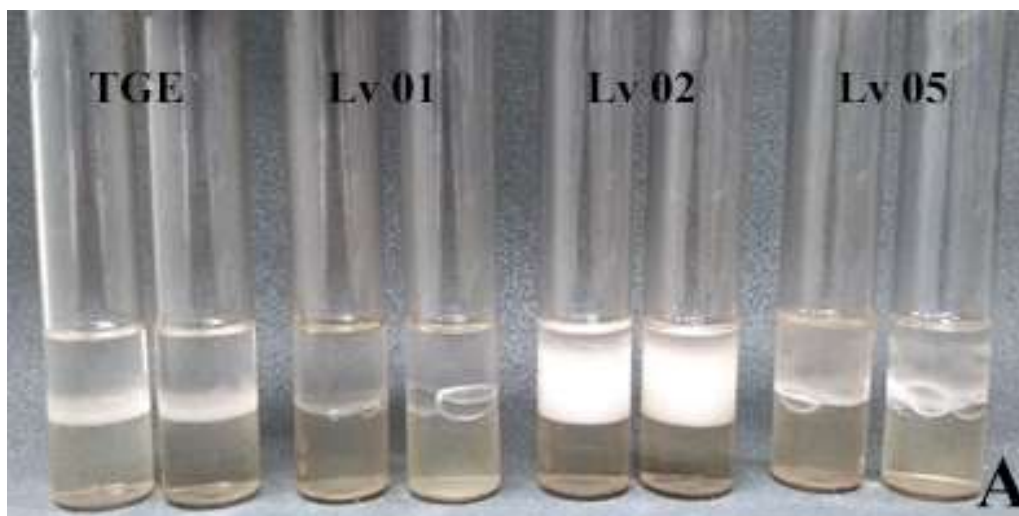
Fonte: Elaborada pela autora

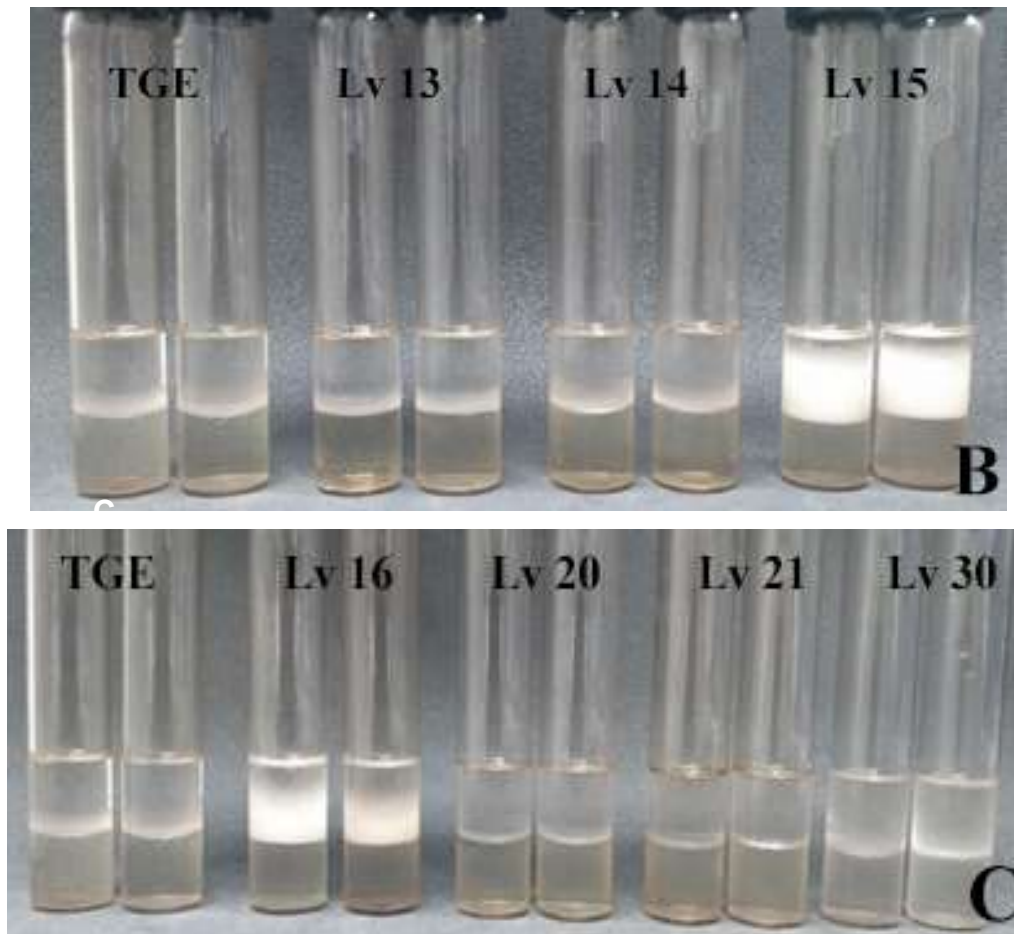
Ensaio com outros fungos devem ser conduzidos, inclusive contra o fungo Bd, para confirmar se a microbiota presente no ninho é capaz de atuar contra este e outros patógenos, indicando que a comunidade simbiótica presente na pele de anfíbios adultos é construída desde a concepção e deposição dos ovos em ninhos de espuma.

5.6 Atividade emulsificante

Foi investigado a presença de moléculas biosurfactantes nos sobrenadantes dos morfotipos a fim de conhecer se a microbiota associada contribui com as atividades surfactantes presentes nos ninhos de espuma de *L. vastus*. Foi possível observar atividade emulsificante em 3 sobrenadantes de morfotipos de ninhos de espuma, Lv 02, 15 e 16, como mostra a Figura 14 abaixo.

FIGURA 14. Emulsões água/óleo com sobrenadantes de Lv 02 (A), Lv 15 (B), Lv 16 (C) obtidos de ninho de espuma de *L. vastus*.





Fonte: Elaborada pela autora

O sobrenadante da Lv 02, que foi relacionada com o gênero *Delftia* no sequenciamento, apresentou 50,9% de emulsão. Ainda pouco se conhece sobre atividades biosurfactantes produzidas por esse gênero, mas já se sabe que algumas espécies foram capazes de degradar compostos derivados do petróleo e outros xenobióticos (KOUTNY et al., 2009; PATIL et al., 2006). O sobrenadante da Lv 15, que foi relacionada com o gênero *Bacillus* no sequenciamento, apresentou 45,5% de emulsão. Já foi comumente descrito sobre a produção de biosurfactantes por diversas espécies do gênero *Bacillus* (DECESARO et al., 2013; SÁENZ-MARTA et al., 2015; MNIF et al., 2012; YADAV et al., 2016). Esse mesmo biosurfactante pode estar relacionado com a atividade antifúngica, já que muitos biosurfactantes produzidos pelo gênero *Bacillus* possuem atividade antifúngica (STUMBRIENE et al., 2018). O sobrenadante da Lv 16, que foi relacionada com o gênero *Germobacter*, apresentou 25,9% de emulsão. Ainda não há relatos na literatura sobre espécies desse gênero que produza biosurfactantes, mas já foi descrito por SHEU et al. (2013) uma espécie desse gênero capaz de acumular polihidroxibutirato, polímero muito estudado na indústria do plástico.

Cerca de mais de 200 espécies diferentes tem sido descritas com capacidade de utilização de hidrocarbonetos (KATAOKA, 2001). Leahy e Colwell (1990) citam os seguintes gêneros de bactérias como os mais importantes: *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthobacter*, *Bacillus*,

Flavobacterium, *Nocardia* e *Pseudomonas*. Originalmente, biossurfactantes chamaram a atenção como agentes de dissolução de hidrocarbonetos no final dos anos 60 como substitutos potenciais para surfactantes sintéticos (carboxilatos, sulfonatos e ésteres de ácido sulfato), especialmente nas indústrias alimentícia, farmacêutica e de petróleo. Os gêneros bacterianos *Pseudomonas* e *Bacillus* produzem múltiplos lipopeptídeos altamente ativos (RAAIJMAKERS et al, 2010).

Na biorremediação de área contaminadas o papel mais comum dos biossurfactantes é aumentar a dispersão de contaminantes na fase aquosa e aumentar a biodisponibilidade do substrato hidrofóbico para microorganismos, com subsequente remoção desses poluentes através da biodegradação (APARNA; SRINIKETHAN; HEDGE, 2011; OLLOSKA; POLKOWSKA; NAMIÉSNIK, 2012).

Diversos processos avançados de recuperação de petróleo são atualmente empregados em todo o mundo: térmicos, químicos, físicos, etc. (AL-SULAIMANI et al., 2011). No entanto, esses processos são muito caros e prejudiciais ao meio ambiente. Assim, é necessária a busca de alternativas, econômicas e ecologicamente corretas para os métodos de recuperação de petróleo aprimorados químicos e térmicos. Foram propostos vários processos baseados na biotecnologia para aumentar a produção de petróleo na actual escassez de energia (SUN et al. 2011). Os biossurfactantes têm aplicações neste domínio, uma vez que estes compostos naturais melhoram a mobilização de hidrocarbonetos, aumentando assim a recuperação de petróleo bruto de reservatórios em um processo denominado recuperação de óleo aprimorada por microorganismos (MEOR) (PERFUMO; RANCICH; BANAT, 2010).

Os biossurfactantes apresentam diversas propriedades úteis para indústria alimentícia. A emulsificação é importante para a formação de consistência e textura em alimentos, bem como a dispersão de fases e a solubilização de aromas (CAMPOS et al., 2013, 2014). A função geral dos emulsificantes em produtos alimentícios é estabilizar a emulsão controlando a aglomeração de glóbulos de gordura e estabilizando os sistemas aerados.

Os biossurfactantes também têm sido utilizados em diferentes aplicações biológicas (terapêuticas) devido às suas propriedades fungicidas, bactericidas, inseticidas e anti-virais, bem como agentes de adesão e inibidor enzimático (RANGARAJAN; SEM, 2013; AUSTAD; TAUGBØL, 1995). A atividade antiaderente, que é a capacidade de inibir a aderência de microorganismos patogênicos a superfícies sólidas ou locais infecciosos, também tem sido relatada para biossurfactantes, levando a uma redução nas infecções hospitalares, sem necessidade de drogas ou agentes químicos sintéticos (RODRIGUES et al., 2006)

Mais estudos e outros ensaios são necessários para avaliação de outras atividades biológicas da microbiota associada aos ninhos de espuma de *L. vastus*, a fim de prospectar cada vez mais biomoléculas com aplicações biotecnológica e para o maior entendimento do papel ecológico da comunidade simbiótica.

6. CONCLUSÃO

O estudo obteve êxito em seus objetivos, com a construção de uma biblioteca com 35 morfotipos de amostras de ninho de espuma de *Leptodactylus vastus* e poça d'água associada. Foram obtidas 11 bactérias com atividade amilásica, 14 apresentaram atividade proteásica e 3 apresentaram atividade lipásica; destacando-se Lv 1, 6, 7, 12, 20, 21, 45, 47, 48, 49 e 50 com atividades positivas em mais de um teste enzimático realizado. Foi observado atividade antifúngica contra *Fusarium* sp. dos morfotipos Lv 05 e 15 e atividade emulsificante nos sobrenadantes da Lv 02, 15 e 16. Demonstrando o potencial biotecnológico dos microrganismos dos ninhos de espuma em diferentes aplicações biotecnológicas. Em adição, o estudo dessa comunidade pode elucidar o papel ecológico dos ninhos de espuma e auxiliar na conservação de espécies de anuros.

7. REFERÊNCIAS

- ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. **Biomolecules**, v. 4, n. 1, p. 117–139, 2014.
- ALBERT, M. J. et al. Prevalence of enterotoxin genes in *Aeromonas* spp. isolated from children with diarrhea, healthy controls, and the environment. **J. Clin. Microbiol.** v. 38, p. 3785-3790, 2000.
- AL-SULAIMANI, H. et al. Microbial biotechnology for enhancing oil recovery: Current developments and future prospects. **Biotechnol. Bioinf. Bioeng. J.**, 1, 147–158, 2011.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, v. 215, p. 403-410, 1990.
- APARNA, A.; SRINIKETHAN, G.; HEDGE, S. Effect of addition of biosurfactant produced by *Pseudomonas* ssp. on biodegradation of crude oil. **In International Proceedings of Chemical, Biological & Environmental Engineering**. Proceedings of the 2nd International Proceedings of Chemical, Singapore, Singapore, 26–28 February 2011; v. 6, p. 71–75.
- ARAÚJO, L. V.; FREIRE, D. M. G.; NITSCHKE, M. Biosurfactantes: propriedades anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas. **Química Nova**, v. 36, n. 6, p. 848-858, 2013.
- ARAÚJO, F. J. S. Expressão e purificação de uma esterase (lipg7) isolada a partir de uma biblioteca metagenômica de sedimentos de manguezal. 47 f. **Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação)** – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.
- 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.
- ASSADI, M.; TABATABAEE, M.S. Biosurfactants and their use in upgrading petroleum vacuum distillation residue: A review. **Int. J. Environ. Res**, v. 4, p. 549–572, 2010.
- AUSTAD, T.; TAUGBØL, K. Chemical flooding of oil reservoirs 1. Low tension polymer flood using a polymer gradient in the three-phase region. **Coll. Surf. A Phys. Eng. Asp.**, v. 101, p. 87–97, 1995.
- BANAT, I. M. et al. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 87, p. 427–444, 2010.
- BANERJEE, A. Jelly secretion by a foam-nesting tree frog *Chiromantis simus* (Anura: Rhacophoridae): An unreported behaviour. **Alytes**, v. 31, n. 3–4, p. 77–82, 2014.
- BORREL, N. et al. Identification of *Aeromonas* Clinical Isolates by Restriction Fragment Length Polymorphism of PCR Amplified 16S rRNA Genes. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, p. 1671-1674, 1997.
- BRADFORD, D. F. et al. Mass mortality and extinction in a high-elevation population of *Rana muscosa*. **Journal of Herpetology**, p. 174-177, 1991.
- 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, p. 1422-1429, 2008.
- CAMPOS, J. M. et al. Microbial biosurfactants as additives for food industries. **Biotechnol. Prog.**, v. 29, p. 1097–1108, 2013.
- CAMPOS, J. M. et al. Production of a Bioemulsifier with Potential Application in the Food Industry. **Appl. Biochem. Biotechnol.** v. 172, p. 3234–3252, 2014.

- CAREY, C.; COHEN, N.; ROLLINS-SMITH, L. Amphibian declines: an immunological perspective. **Developmental e Comparative Immunology**, v. 23, p. 459-472, 1999.
- CHANG, T. M. et al. Cloning and sequence analysis of the gene (eprA1) encoding an extracellular protease from *Aeromonas hydrophila*. **Gene**, v. 199, p. 225-229, 1997.
- CHARPE, T. W.; RATHOD, V. K. Biodiesel production using waste frying oil. **Waste management**, v. 31, n. 1, p. 85-90, 2011.
- CHOI, J. M.; HAN, S. S.; KIM, H. S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 7, p. 1443–1454, 2015.
- COLOMBO, B. M. et al. Microbiota and mucosal immunity in amphibians. **Front. Immunol.**, v. 6:111, 2015.
- 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.; KENNEDY, M. W. Biofoams and natural protein surfactants. **Biophysical Chemistry**, v. 151, n. 3, p. 96–104, 2010.
- DALGETTY, L.; KENNEDY, M. W. Building a home from foam--tungara frog foam nest architecture and three-phase construction process. **Biology Letters**, v. 6, n. 3, p. 293–296, 23 jun. 2010.
- DECESARO, A. et al. Produção de biossurfactantes por microrganismos isolados de solo contaminado com óleo diesel. **Quim. Nova**, v. 36, n. 7, p. 947-954, 2013.
- DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactante and their comercial potencial. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, p.47-64, 1997.
- 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.
- ETEROVICK, P. C. et al. Amphibian Declines in Brazil: An Overview. **Biotropica** v. 37, n. 2, p. 166–179, 2005.
- FADANELLI, R. Prevalência de genes relacionados com a patogenicidade e produção de enzimas extracelulares em *Aeromonas* sp. **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Biotecnologia. Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, Brasil, 2005.
- FIRN, R. D. Bioprospecting - why is it so unrewarding?. **Biodiversity and Conservation**. v. 12, p. 207-216, 2003.
- FISHER, M. C. et al. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. **Nature**, v. 484, p. 186–194, 2012.
- FLECHAS, S. V. et al. Microbiota and skin defense peptides may facilitate coexistence of two sympatric Andean frog species with a lethal pathogen. **The ISME journal**, p. 1, 2018.
- 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.
- FROST, D. R. et al. The Amphibian Tree of Life. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 297, n. 297, p. 1–291, 2006.

- GUPTA, R. et al. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 64, n. 6, p. 763-781, 2004.
- 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.
- HARRIS, R. N. et al. Amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* is inhibited by the cutaneous bacteria of amphibian species. **EcoHealth**, v. 3, p. 53-56, 2006.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.
- 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.
- 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**, v. 15, n. 3, p. 393–398, 10 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.
- HÖDL, W. Reproductive behaviour in the neotropical foam-nesting frog *Pleurodema diplolistris* (Leptodactylidae). **Amphibia-Reptilia**, v. 13, n. 3, p. 263–274, 1 jan. 1992.
- HOLDEN, W. M. et al. Skin bacteria provide early protection for newly metamorphosed southern leopard frogs (*Rana sphenoccephala*) against the frog-killing fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Biological Conservation**, v. 187, p. 91-102, 2015.
- IQBAL, S.; KHALID, Z.M.; MALIK, K.A. Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyperproduction of biosurfactants by a gamma rayinduced mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. **Lett. Appl. Microbiol** 21, 176–179, 1995.
- KAPADIA, S.G.; YAGNIK, B.N. Current trend and potential for microbial biosurfactants. **Asian J. Exp. Biol. Sci**, v. 4, p. 1–8, 2013.
- KATAOKA, A. P. A. G. Biodegradação de resíduo oleoso de refinaria de petróleo por microorganismos isolados de “landfarming”. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Unesp – Rio Claro, 2001.
- KONEMAN, E. W. et al. Diagnóstico Microbiológico, **Editora Médica e Científica Ltda.**, RJ. 1465p., 2001.
- KOUTNY, M. et al. Soil bacterial strains able to grow on the surface of oxidized polyethylene film containing prooxidant additives. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n. 3, p. 354-357, 2009.
- KYAW, N. et al. Characterization of commercial amylases for the removal of filter cake on petroleum wells. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 161, n. 1-8, p. 171-180, 2010.

- KUMAR, A.; SINGH, S. Directed evolution: tailoring biocatalysts for industrial applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 33, n. 4, p. 365–378, 18 dez. 2013.
- LAMMLE, K. et al. Identification of novel enzymes with different hydrolytic activities by metagenome expression cloning. **J. Biotechnol.**, v. 127, p. 575-592, 2007.
- LAUER, A. et al. Diversity of cutaneous bacteria with antifungal activity isolated from female four-toed salamanders. **The ISME Journal. Multidisciplinary Journal of Microbial ecology**, v. 2, p. 145-157, 2008.
- LEAHY, J. L.; COLWELL, R. R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. **Microbiol. Rev.**, v. 54(3), p.305-315, 1990.
- LIHAN, S. et al. Antimicrobial producing microbes isolated from soil samples collected from Nanga Merit Forest in Sarawak, Malaysian Borneo. **European Journal of Experimental Biology**, v. 4, n. 1, p. 494-501, 2014.
- MACKENZIE, C. D. et al. Ranaspumin-2: Structure and Function of a Surfactant Protein from the Foam Nests of a Tropical Frog. **Biophysical Journal**, v. 96, n. 12, p. 4984–4992, jun. 2009.
- MAGNUSSON, W. E.; HERO, J.-M. Predation and the evolution of complex oviposition behaviour in Amazon rainforest frogs. **Oecologia**, v. 86, n. 3, p. 310–318, 1991
- MARCHANT, R., BANAT, I.M. Microbial biosurfactants: Challenges and opportunities for future exploitation. **Trends Biotechnol**, v. 11, p. 558–565, 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, nov. 2006.
- MILLER, D. L. et al. Concurrent infection with ranavirus, *Batrachochytrium dendrobatidis*, and *Aeromonas* in a captive anuran colony. **J. Zoo. Wildl. Med.**, v. 39, p. 445–449, 2008.
- MILLER, D. et al. Ecopathology of rana viruses infecting amphibians. **Viruses**, v. 3, p. 2351–2373, 2011.
- MIYATA, M. et al. Assessment of the quality of DNA extracted by two techniques from *Mycobacterium tuberculosis* for fast molecular identification and genotyping. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 774-777, 2011.
- MNIF I. et al. Improvement of bread quality and bread shelf-life by *Bacillus subtilis* biosurfactant addition. **Food Sci. Biotechnol.**, v. 21, n.4, p. 1105-12, 2012.
- NAM, I.Y.; JOH, K. Rapid detection of virulence of *Aeromonas* isolated from a trout by hexaplex-PCR. **Journal of Microbiology**, v.45, n.4, p.297-304, 2007.
- NYMAN, S. Mass Mortality in Larval *Rana sylvatica* Attributable to the Bacterium, *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Herpetology*, v. 20, n. 2, p. 196-20, jun. 1986.
- 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.

- OLIVEIRA, V. M.; SETTE, L. D.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F. Preservação e prospecção de recursos microbianos. **Multiciência**, n. 7, 2006.
- OLKOWSKA, E.; POLKOWSKA, Z.; NAMIŚNIK, J. Analytical procedures for the determination of surfactants in environmental samples. **Talanta**, v. 88, p. 1–13, 2012.
- OLSON, D. H., et al. Mapping the global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the amphibian chytrid fungus. **Plos one** 8: e56802, 2013.
- PASSOS, L. F. et al. Comparing the bacterial communities of wild and captive golden mantella frogs: Implications for amphibian conservation. **PloS one**, v. 13, n. 10, p. e0205652, 2018.
- PATIL, N. K. et al. Degradation of a Plasticizer, di-n-Butylphthalate by *Delftia* sp. TBKNP-05. **Current microbiology**, v. 52, n. 3, p. 225-230, 2006.
- PEKDEMIR, T.; ISHIGAMI, Y.; AND UCHIYAMA, H. Characterization of aescin as a biosurfactant for environmental remediation. **J. Surfactants Deterg.**, vol. 2, pp. 337–341, 1999.
- PERFUMO, A.; RANCICH, I.; BANAT, I. M. Possibilities and challenges for biosurfactants use in petroleum industry. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 672, p. 135–145, 2010.
- PESSOA FILHO, M. A. C. P. Metagenômica e sua aplicação no estudo de diversidade e função de microrganismos de solos de cerrado. Documentos/ Embrapa Cerrado, 29 p., ISSN 1517-5111, ISSN online 2176-5081, mar. 2010.
- 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.
- PRAKASH, O.; JAISWAL, N. α -Amylase: an ideal representative of thermostable enzymes. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 160, n. 8, p. 2401-2414, 2010.
- RAAIJMAKERS, J. M. et al. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 34, p. 1037–62, 2010.
- RANGARAJAN, V.; SEM, R. An inexpensive strategy for facilitated recovery of metals and fermentation products by foam fractionation process. **Coll. Surf. B Biointerfaces**, v. 104, p. 99–106, 2013.
- RODRIGUES, L. R. et al. Biosurfactants: Potential applications in medicine. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 57, p. 609–618, 2006.
- RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. **Environ. Microbiol.** v. 3, p. 229–36, 2001.
- RONDON, M. R. et al. Cloning the soil metagenome, a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, p. 2541-2547, 2000.
- SAAVEDRA, M. J.; FIGUERAS, M. J.; MARTÍNEZ-MURCIA, A. J. Updated phylogeny of the genus *Aeromonas*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v. 56, p. 2481-2487, 2006.

SACCARO JUNIOR, N. L. A. regulamentação de acesso a recursos genéticos e repartição de benefícios: disputas dentro e fora do Brasil. **Ambient. soc.**, v.14, n.1, 2011.

SÁENZ-MARTA, C. I. et al. Biosurfactants as useful tools in bioremediation. **Advances in bioremediation of wastewater and polluted soil**. InTech, 2015.

SAMBROOK J.; RUSSELL D.W. Molecular cloning - a laboratory manual. 3. ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANGEETHA, R.; ARULPANDI, I.; GEETHA, A. Bacterial lipase as potential industrial biocatalysts: An Overview. **Res. J. Microbiol.**, v. 6, n. 1, p. 1-24, 2011.

SANTOS, D.K.F. et al. Synthesis and evaluation of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using animal fat and corn steep liquor. **J. Pet. Sci. Eng.**, v. 105, p. 43–5, 2013.

SANTOS, D. et al. Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 3, p. 401, 2016.

SCHOR, M. et al. The Diverse Structures and Functions of Surfactant Proteins. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 41, n. 7, p. 610–620, jul. 2016.

SCHUMACHER, J. Selected infectious diseases of wild reptiles e amphibians. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 15, p. 18-24, 2006.

SESHADRI, R. et al. Genome Sequence of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966T: Jack of All Trades. **J. Bacteriol.**, v. 188, p. 8272-8282, 2006.

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, 1994.

SILVA, R. et al. Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 7, p. 12523-12542, 2014.

SINGH, R. et al. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 1–15, 2016.

SHEU, Shih-Yi et al. *Gemmobacter tilapiae* sp. nov., a poly- β -hydroxybutyrate-accumulating bacterium isolated from a freshwater pond. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 63, n. 4, p. 1550-1556, 2013.

SMITH, T. C. et al. Ranaviruses infect Mountain yellow-legged frogs (*Rana muscosa* and *Rana sierrae*) threatened by *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Herpetol. Conserv. Biol.**, v. 12, p. 149–159, 2017.

STUMBRIENE, K. et al. Screening of new bacterial isolates with antifungal activity and application of selected *Bacillus* sp. cultures for biocontrol of *Fusarium graminearum* under field conditions. **Crop Protection**, v. 113, p. 22-28, 2018.

SUN, H. et al. Recent advances in microbial raw starch degrading enzymes. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 160, n. 4, p. 988-1003, 2010.

- SUN, S. et al. Exopolysaccharide production by a genetically engineered *Enterobacter cloacae* strain for microbial enhanced oil recovery. **Bioresour. Technol.**, 102, 6153–6158, 2011.
- THATOI, H. et al. Biodiversity and biotechnological potential of microorganisms from mangrove ecosystems: a review. **Ann. Microbiol**, v. 63, p. 1–19, 2013.
- UCHIYAMA, T.; MIYAZAKI, K. Functional metagenomics for enzyme discovery: Challenges to efficient screening. **Curr Opin Biotechnol**, v. 20, p. 616–622, 2009.
- VECINO, X. et al. Essential oil-water emulsions containing a biosurfactant from *Lactobacillus paracasei*. **FORMULA VIII - Formulate your innovation. Innovate your formulation**. No. P 48, Barcelona, Spain, July 4-7, 188, 2016.
- VIAL, J.L.; SAYLOR L. The Status of Amphibian Populations: a Compilation and Analysis. **IUCN/SSC Declining Amphibian Taskforce**. Work. Doc. n. 1, 1993.
- VERMELHO, Alane Beatriz et al. Diversity and Biotechnological Applications of Prokaryotic Enzymes. In: *The Prokaryotes*. **Springer, Berlin, Heidelberg**, p. 213-240, 2013.
- WATANABE, N. et al. Sequence and Analysis of Amplified DNA Fragments Containing the Region Encoding the Putative Lipase Substrate-Binding Domain and Genotyping of *Aeromonas hydrophila*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70, p. 145-151, 2004.
- WELLS, K.D. The ecology and behavior of amphibians. The Chicago University Press, 2007.
- WHITMAN, W. B.; COLEMAN, D. C.; WIEBE, W. J. Prokaryotes: the unseen majority. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 95, p. 6578–6583, 1998.
- WOODHAMS, D. C. et al. Symbiotic bacteria contribute to innate immune defenses of the threatened mountain yellow-legged frog, *Rana mucosa*. **Biological Conservation**, v. 138, p. 390-398, 2007.
- YADAV, A. K. et al. Isolation and Characterization of Biosurfactant Producing *Bacillus* sp. from Diesel Fuel-Contaminated Site. **Microbiology**, v. 85, n. 1, p. 56–62, 2016.
- YÁÑEZ, M.A. et al. Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyB* gene sequences. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol**, v. 538, p. 75-883, 2003.
- YASIR, M. Analysis of bacterial communities and characterization of antimicrobial strains from cave microbiota. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 248-257, 2018.
- YU, H. B. et al. Identification and characterization of putative virulence genes and gene clusters in *Aeromonas hydrophila* PPD134/91. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, p. 4469-4477, 2005.
- YUN, J.; RYU, S. Screening for novel enzymes from metagenome and SIGEX, as a way to improve it. **Microbial Cell Factories**, v. 4, n. 1, p. 8, 2005.