



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

LUCAS FARIAS DA SILVA

***Batrachochytrium dendrobatidis* NO CEARÁ: DETECÇÃO E PROSPECÇÃO POR
PROBIÓTICOS EM NINHOS DE ESPUMA DE ANUROS**

FORTALEZA

2026

LUCAS FARIAS DA SILVA

Batrachochytrium dendrobatidis NO CEARÁ: DETECÇÃO E PROSPECÇÃO POR
PROBIÓTICOS EM NINHOS DE ESPUMA DE ANUROS

Monografia apresentada ao curso de
Graduação em Ciências Biológicas
(Bacharelado) da Universidade Federal do
Ceará, como requisito parcial à obtenção do
título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Denise Cavalcante
Hissa.

FORTALEZA

2026

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)

S581b Silva, Lucas Farias da.
Batrachochytrium dendrobatidis no Ceará : detecção e prospecção por probióticos em ninhos de espuma de anuros / Lucas Farias da Silva. – 2026.
59 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências,
Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2026.
Orientação: Profa. Dra. Denise Cavalcante Hissa.

1. Anfíbios. 2. Bd. 3. Patógeno. I. Título.

CDD 570

LUCAS FARIAS DA SILVA

Batrachochytrium dendrobatidis NO CEARÁ: DETECÇÃO E PROSPECÇÃO POR
PROBIÓTICOS EM NINHOS DE ESPUMA DE ANUROS

Monografia apresentada ao curso de
Graduação em Ciências Biológicas
(Bacharelado) da Universidade Federal do
Ceará, como requisito parcial à obtenção do
título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 21/01/2026.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Diogo Henrique Costa de Rezende
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Talita Camila Evaristo de Silva Nascimento
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Àqueles com quem compartilho boas risadas.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer as instituições **CNPq** e **FUNCAP** pelas bolsas de Iniciação Científica por meio do programa PIBIC que tive ao longo da graduação. Também gostaria de agradecer à **UFC** pelos auxílios financeiros com o programa BIA e pela bolsa PIBIC.

Gostaria de agradecer imensamente à minha orientadora **Profa. Dra. Denise Cavalcante Hissa** por ser um farol em minha vida e me estimular a nunca desistir. Muito obrigado pelas orientações, conversas e ensinamentos; jamais irei esquecê-los. Espero algum dia poder ser um profissional tão bom quanto você, professora.

Aos membros da banca, **prof. Dr. Diogo Rezende** e **Dra. Talita Camila**, pelas valiosas contribuições ao trabalho.

À **profa. Dra. Vânia Melo**, pelo brilho nos olhos ao falar de microbiologia e ciência. Foi nas suas aulas que eu senti a faísca pela ciência crescer. Muito obrigado pelas conversas, dicas e principalmente por ser um farol em minha vida.

Ainda à **Dra. Talita Camila**, gostaria de agradecer, também, por ser farol em minha vida. Obrigado pelas dicas, conversas e incentivos. Sem você, a jornada seria mais difícil.

À **Dra. Andréa Oliveira**, por me orientar por muitas vezes no meu grande amor pela Biologia Molecular. Professora Andréa, eu sou muito grato por poder aprender com você lições que irei levar para a vida.

À **Dra. Cristiane Rabelo**, por toda a ajuda e a gentileza presentes no laboratório. Sem você, a nossa caminhada seria mais difícil.

Aos membros dos Laboratórios Lembiotech e LarGen, pelas conversas, risadas, experiências, convivência e toda ajuda. Especialmente, gostaria de agradecer a **Matheus Henrique, Vinícius Mendes, Lucas Ciompi, Ana Teresa e Joana Sales** pela ajuda nos ensaios de inibição, e ao **Ms. Saulo Gonçalves** pelos ensinamentos em biologia molecular, especialmente em qPCR.

À **Ms. Diana Jacinto**, pelas ajudas nos ensaios de inibição e detecção de *Bd*, além dos ensinamentos sobre qPCR, e ainda mais pela convivência, conversas e risadas. O tempo em que passou no Brasil foi curto, mas foi o suficiente para criarmos uma relação de amizade. Muito obrigado por tudo.

Ao **Ms. Bruno Guilhon**, pela parceria e, principalmente, pela amizade. Obrigado por me permitir acompanhá-lo em seu trabalho de doutorado, ajudando no meu crescimento profissional. Gostaria de agradecer ainda pelas orientações na escrita do presente trabalho.

Ao **Dr. Luiz Filho**, do Bioprospec, por todos os conselhos e ajuda nos ensaios de inibição ao longo dos últimos anos.

Aos amigos que fiz durante a graduação, especialmente a **Alyson Ripardo, Paulo Roberto, Marcus Levy, Beatriz Rodrigues, Fátima Isabel e Leticia Kida**. Vocês fizeram a caminhada ser leve e divertida. Agradeço do fundo do coração por ter os encontrado, e espero que daqui a vários anos, quando eu estiver relendo estes agradecimentos, ainda possa mandar mensagem emocionado a vocês.

Aos amigos de vida, e que estiveram presentes em momentos antigos e novos, especialmente **Marlon Venicius, Rafael Yuri, João Emanuel, Vitor Tarcísio, Erimar Castro e Lucas Rodrigues**. Sem vocês, a vida não seria tão divertida. Obrigado por existirem.

Aos meus primos, com quem tenho uma relação mais forte que a de irmãos, **João Victor Farias e Tulio Farias**. Eu não consigo lembrar da minha vida sem vocês, e sou imensamente grato por ter os tido nela. A vida com certeza seria sem graça se não fosse assim.

À minha companheira de vida **Maiara Maia**, por tudo. Por ser farol em minha vida e me inspirar todos os dias. Por ser o ser humano mais lindo que já conheci. Por ser tão companheira e estar sempre comigo. Eu sou a pessoa mais feliz do planeta por poder compartilhar a vida e formar uma família com você. Eu te amo, meu bem.

Aos amigos do prédio 900, especialmente **João Victor, Guilherme, Maju e Rayssa** pela amizade nesses quatro últimos anos que se passaram de forma apressada, mas bem vividos.

À família de minha companheira, que acabou se tornando minha família também. Especialmente ao meu sogro **Rubemar Borges** e aos avós **Rúbia Borges e Rubemar Borges**. Especialmente, gostaria de agradecer imensamente a minha sogra **Talita Maia** por ser luz em minha vida. Eu sou muito agradecido por ter lhe conhecido.

À minha família, especialmente ao meu tio **Francisco de Assis, Francisco José, Marilene Farias, Márcia Farias, Daniel, Gabriel** e à minha irmã **Jéssica Lustosa**. Muito obrigado por todo amor e apoio. Amo vocês imensamente.

Aos meus avós, a quem levo na memória, e que me ajudaram a me criar e me tornar a pessoa quem sou, **Maria Carmosa e José Custódio**. Estarão vivos em meu coração para sempre.

Às minhas segundas mães, que me levam no coração como se eu fosse seus próprios filhos: **Maura Farias e Marúsia Farias**. Obrigado por sempre olharem para mim. Amo imensamente vocês.

À minha mãe **Marfisa Farias**, quem me concedeu a vida. Minha mãe uma vez me disse uma frase da qual não esquecerei jamais: “você nasceu nú, e eu lhe cobri”. E de todas as formas possíveis. Mãe, muito obrigado por tudo, e saiba que tudo que eu conquistar não é meu, é nosso. Te amo imensamente.

“Daria tudo que sei pela metade do que ignoro” (René Descartes).

RESUMO

Diversas espécies de anfíbios estão sofrendo declínio populacional, tornando-os o grupo de vertebrados com as maiores taxas de extinção. Várias evidências apontam a quitridiomicose, doença causada pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), como uma das principais causas. No Brasil, infecções causadas pelo fungo quitrídio são relatadas em quase todos os biomas, mas principalmente nas regiões Sul e Sudeste. Em contraste, a região Nordeste permanece relativamente pouco estudada, embora casos confirmados de *Bd* já tenham sido registrados. Em resposta, diversas estratégias de conservação têm sido propostas; entre elas, uma abordagem promissora é o uso de probióticos. Nesse contexto, o presente estudo buscou (i) trazer atualizações sobre o panorama das infecções pelo fungo quitrídio no Ceará e (ii) prospectar por probióticos em ninhos de espuma de anuros. Para a detecção de *Bd*, 51 amostras de swabs de pele de anuros ocorrentes em diferentes regiões do Ceará coletadas em campo tiveram seu DNA extraído e avaliadas através da reação em cadeia da polimerase (PCR). A extração de DNA foi realizada utilizando o reagente PrepMan Ultra®, e a PCR ocorreu utilizando os primers específicos *Bd1a* e *Bd2a*. Os fragmentos de 300 pb amplificados evidenciando a presença do fungo quitrídio foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1%. Paralelamente, 53 bactérias isoladas dos ninhos de espuma dos anuros *Leptodactylus vastus*, *Physalaemus cuvieri* e *Adenomera hylaedactyla*, pertencentes a coleção de microrganismos do Laboratório de Recursos Genéticos (LarGen) da Universidade Federal do Ceará, foram testadas contra o patógeno *Bd in vitro*. Para avaliar a inibição de crescimento do *Bd* pelos isolados, foram realizados ensaios semiquantitativos em placas de 96 poços com os seguintes controles: controle positivo (1% de triptona + zoósporos de *Bd*), controle negativo (apenas triptona), controle com deficiência de nutrientes (água destilada + zoósporos de *Bd*) e *Bd* inativado pelo calor (aquecido a 70 °C por 1 hora + 1% de triptona). Foi utilizada a linhagem panzootica (*Bd* GPL 131) em nossos ensaios. A placa contendo o cultivo foi monitorada por meio de leituras de absorbância (492 nm) nos dias 0, 4, 7 e 10, e o escore de inibição foi então obtido a partir dos dados de densidade óptica. Indivíduos das espécies *Rhinella dapsilis*, *Odontophrynus carvalhoi*, *Adelophryne baturitensis*, no município de Guaramiranga, *Dendropsophus minusculus*, em Fortaleza, *Proceratophrys cristiceps*, em Pacatuba, e *Boana raniceps*, em Pacoti, testaram positivo para a presença do *Bd*, sendo o primeiro registro para Fortaleza e para algumas espécies. A busca por probióticos em ninhos de espumas mostrou resultados positivos, com mais de 70% dos microrganismos testados inibindo fortemente o fungo, dentre os gêneros utilizados, se destacaram *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Chryseobacterium*, *Microbacterium*, *Streptomyces*, *Serratia*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Brevundimonas*, *Comamonas*, *Dyella*, *Kurthia* e *Niabella*. Este é um dos primeiros trabalhos a prospectar probióticos isolados de ninhos de espuma com atuação contra o fungo quitrídio e de detecção de *Bd* no estado do Ceará. Os resultados são de suma importância na conservação dos anfíbios, visto o impacto negativo da quitridiomicose sobre populações do grupo no mundo.

Palavras-chave: Anfíbios; *Bd*; Patógeno.

ABSTRACT

Several amphibian species are undergoing population declines, making them the vertebrate group with the highest extinction rates. Multiple lines of evidence indicate chytridiomycosis as one of the main causes of these declines, a disease caused by the fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*). In Brazil, infections caused by the chytrid fungus have been reported in nearly all biomes, particularly in the South and Southeast regions. In contrast, the Northeast region remains relatively understudied, although confirmed cases of *Bd* have already been recorded. In response, several conservation strategies have been proposed; among them, a promising approach is the use of probiotics. In this context, the present study aimed to (i) provide updates on the chytridiomycosis scenario in Ceará and (ii) prospect for probiotics in anuran foam nests. For *Bd* detection, 51 skin swab samples from anurans occurring in different regions of Ceará, collected in the field, had their DNA extracted and were evaluated by Polymerase Chain Reaction PCR. DNA extraction was performed using the PrepMan Ultra® reagent, and PCR was carried out using the *Bd1a* and *Bd2a* specific primers. The amplified 300 bp fragments indicating the presence of the chytrid fungus were visualized by electrophoresis on a 1% agarose gel. In parallel, 53 bacteria isolated from the foam nests of the anurans *Leptodactylus vastus*, *Physalaemus cuvieri*, and *Adenomera hylaedactyla*, belonging to the Microorganism Collection of the Laboratory of Genetic Resources (LarGen), were tested against the pathogen in vitro. To evaluate the inhibition of *Bd* growth by the isolates, semiquantitative assays were performed in 96-well plates with the following controls: positive control (1% tryptone + *Bd* zoospores), negative control (tryptone only), nutrient-depleted control (distilled water + *Bd* zoospores), and heat-killed *Bd* (heated at 70 °C for 1 hour + 1% tryptone). We used the panzootic lineage (*Bd* GPL 131) in our assays. The plate was monitored by absorbance readings (492 nm) on days 0, 4, 7, and 10, and the inhibition score was then obtained from the optical density data. Individuals of the species *Rhinella dapsilis*, *Odontophrynus carvalhoi*, and *Adelophryne baturitensis* in the municipality of Guaramiranga, *Dendropsophus minusculus* in Fortaleza, *Proceratophrys cristiceps* in Pacatuba, and *Boana raniceps* in Pacoti, tested positive for the presence of *Bd*, representing the first record for Fortaleza and for some of these species. The search for probiotics in foam nests yielded positive results, with more than 70% of the tested microorganisms strongly inhibiting the fungus. Among the genera identified, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Chryseobacterium*, *Microbacterium*, *Streptomyces*, *Serratia*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Brevundimonas*, *Comamonas*, *Dyella*, *Kurthia* and *Niabella* stood out. This is one of the first studies to prospect probiotics isolated from foam nests with activity against the chytrid fungus and to detect *Bd* in the state of Ceará. Our results are of great importance for amphibian conservation, given the negative impact of chytridiomycosis on amphibian populations worldwide.

Keywords: Amphibians; *Bd*; Pathogen.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Características que diferenciam os quitrídios de outros fungos	18
Figura 2 - O ciclo de vida das espécies de <i>Batrachochytrium</i> em cultura	19
Figura 3 - Ciclo de vida epibiótico de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	20
Figura 4 - Ciclo de vida endobiótico de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	21
Figura 5 - Quitridiomiose associada ao declínio de anfíbios ao longo do tempo	23
Figura 6 - Distribuição espacial do número de espécies de anfíbios infectadas por <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> em cada país	23
Figura 7 - Distribuição geográfica de girinos infectados e não infectados por <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	24
Figura 8 - Mapa do estado do Ceará, Brasil, com os pontos onde foram coletadas as amostras	29
Figura 9 - Desenho esquemático do ensaio de inibição do crescimento do <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	33
Figura 10 - Resultado de PCR para detecção de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> em gel de agarose (1%).....	35
Figura 11 - Crescimento de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> frente aos sobrenadantes de cultivos bacterianos.....	37
Figura 12 - Grau de inibição do crescimento de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> por sobrenadantes de cultivos bacterianos de ninhos de espuma de <i>Adenomera hylaedactyla</i> , <i>Leptodactylus vastus</i> e <i>Physalaemus cuvieri</i>	41
Figura 13 - Distribuição dos índices de inibição do crescimento de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> por isolados bacterianos dos ninhos de espuma de <i>Adenomera hylaedactyla</i> , <i>Leptodactylus vastus</i> e <i>Physalaemus cuvieri</i>	42
Figura 14 - Distribuição dos índices de inibição do crescimento de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> por gênero dos isolados bacterianos dos ninhos de espuma de <i>Adenomera hylaedactyla</i> , <i>Leptodactylus vastus</i> e <i>Physalaemus cuvieri</i>	42
Figura 15 - Proporção dos níveis de inibição do crescimento de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> entre isolados bacterianos dos ninhos de espumas de <i>Adenomera hylaedactyla</i> , <i>Leptodactylus vastus</i> e <i>Physalaemus cuvieri</i>	43
Figura 16 - Inclinação das regressões lineares de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> ao longo do tempo.....	46
Figura 17 - Variação relativa da densidade de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> ao longo do	

tempo..... 46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição dos tratamentos utilizados no ensaio semiquantitativo de inibição do crescimento de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	33
Tabela 2 - Interpretação dos resultados a partir do valor dos índices de inibição	34
Tabela 3 - Espécies de anuros amostradas distribuídas nas famílias taxonômicas e locais de coleta	36
Tabela 4 - Escore de inibição do crescimento de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> por bactérias isoladas dos ninhos de espumas de <i>L. vastus</i> , <i>P. cuvieri</i> e <i>A. hylaedactyla</i>	38

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1 Declínio populacional de anfíbios	17
2.2 <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	18
2.3 Panorama da quitridiomiose	22
2.4 Probióticos como estratégia de conservação contra a quitridiomiose	25
2.5 Ninhos de espuma como fonte de probióticos contra a quitridiomiose	26
3 OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo geral	28
3.2 Objetivos específicos	28
4 METODOLOGIA	29
4.1 Detecção de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> no estado do Ceará	29
4.1.1 Coleta de amostras	29
4.1.2 Extração de DNA	30
4.1.3 Amplificação por PCR	30
4.1.4 Eletroforese em gel de agarose	31
4.2 Ensaio de inibição do crescimento de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	31
4.2.1 Caracterização da coleção microbiana	31
4.2.3 Obtenção dos sobrenadantes livres de células	31
4.2.4 Colheita de zoósporos de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	32
4.2.5 Ensaio de inibição do crescimento do <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	32
4.2.6 Cálculo do escore de inibição	33
5 RESULTADOS	35
5.1 Detecção de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> no estado do Ceará	35
5.2 Bactérias de ninhos de espuma podem inibir o crescimento de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	37
6 DISCUSSÃO	44
6.1 Detecção de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> no estado do Ceará	44
6.2 Prospecção por probióticos em ninhos de espuma	45
6.2.1 Bactérias com índice de inibição > 1.0	45
6.2.2 Bactérias de ninhos de espuma podem inibir o crescimento de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	47

7 CONCLUSÃO.....	51
REFERÊNCIAS.....	52

1 INTRODUÇÃO

Os anfíbios possuem as maiores taxas de extinção entre todos os vertebrados, sendo a classe mais ameaçada globalmente (IUCN, 2026). A preocupação com o problema do declínio populacional do grupo data desde a segunda metade do século XX (Barinaga, 1990; Blaustein & Wake, 1990; Pechmann & Wilbur, 1994). A principal causa é a quitridiomiose, doença causada pelo fungo quitrídio *Batrachochytrium dendrobatidis* Longcore, Pessier & Nichols, 1999 (*Bd*) (Longcore *et al.*, 1999). Essa doença representa a maior perda de biodiversidade já registrada atribuível a uma doença (Scheele *et al.*, 2019).

A quitridiomiose está envolvida com o declínio de ao menos 500 espécies de anfíbios e 90 extinções presumidas no último meio século (Scheele *et al.*, 2019). A doença é difundida tanto geograficamente quanto taxonomicamente, com cerca de 60 famílias em mais de 80 países já testando positivo para o patógeno (Castro Monzon, Rödel, Jeschke, 2020). No Brasil, *Bd* está presente em pelo menos 100 espécies (Valencia-Aguilar *et al.*, 2015), com a maioria dos trabalhos com foco na Mata Atlântica. Na Caatinga, único bioma exclusivamente brasileiro, ainda não existem muitos dados sobre a quitridiomiose (Amorim *et al.*, 2019; Benício *et al.*, 2020; Dos Santos *et al.*, 2024; Mendes *et al.*, 2024), o que limita o conhecimento sobre a distribuição do *Bd* no país e, conseqüentemente, as tomadas de decisão para estratégias de conservação.

Algumas dessas estratégias envolvem ações como manejo do habitat, conservação de espécies em cativeiro e tratamentos químicos com antifúngicos diretamente na pele ou no ambiente contaminado (Woodhams *et al.*, 2011). Uma outra abordagem, no entanto, se destaca: a bioaugmentação de bactérias isoladas de anfíbios que tenham capacidade de inibir o crescimento do *Bd*, também chamado de probióticos (Harris *et al.*, 2006; 2009). A fonte mais explorada na prospecção de probióticos é a pele de anfíbios, e alguns gêneros já são amplamente relatados pela sua capacidade de inibição do patógeno em laboratório, como *Pseudomonas spp.* (Rebollar *et al.*, 2019; Nava-González *et al.*, 2021; Wax *et al.*, 2023).

Essas e outras bactérias também foram encontradas em ninhos de espumas de três membros da família Leptodactylidae (Monteiro *et al.*, 2023; Castro *et al.*, 2024), que podem também possuir atividade de inibição do crescimento do *Bd*. Os ninhos possuem uma microbiota diferente tanto do ambiente quanto dos indivíduos adultos, e representam um contato inicial entre o girino e microrganismos (McGrath-Blaser *et al.*, 2021; Monteiro *et al.*, 2023), atuando como uma primeira linha de defesa contra patógenos. Apesar dessa relação

interessante, atualmente não existe nenhum estudo publicado sobre a atividade anti-*Bd* de bactérias isoladas de ninhos de espumas.

Diante disso, o presente trabalho abordou duas principais questões acerca da conservação de anfíbios: (i) o monitoramento do *Bd* no estado do Ceará, e (ii) a prospecção de bactérias isoladas de ninhos de espumas como possíveis probióticos, uma abordagem inovadora, visando a elaboração de estratégias eficazes para a remediação da quitridiomiose e conservação dos anfíbios.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Declínio populacional de anfíbios

O declínio populacional de anfíbios já era relatado a partir do final da década de 1980 (Barinaga, 1990; Blaustein, 1994; Pechmann & Wilbur, 1994; Alford & Richards, 1999; Houlahan *et al.* 2000), com trabalhos que já indicavam taxas de declínio de populações estudadas desde o início da década de 1950 (Houlahan *et al.*, 2000; Alford, Dixon & Pechmann. 2001). Na época, os desafios eram extensos, e a grande questão a ser respondida era: esses declínios faziam parte de flutuações naturais das populações ou realmente eram parte de uma grande perda da biodiversidade?

Para obter as respostas, houve uma grande concentração de esforços para identificar as possíveis causas de declínio dessas populações, o que incluía fatores como comercialização de anuros, contaminação química, radiação UVB, modificação e perda de habitat, espécies invasoras, predação, mudanças climáticas e doenças (Barinaga, 1990; Alford & Richards, 1999). Entretanto, embora esses fatores pudessem explicar bem determinados declínios populacionais locais, não elucidavam completamente situações mais generalizadas (Carey & Alexander, 2003).

Uma descoberta importante ocorreu no final da década de 1990, quando Berger e colaboradores (1998) encontraram um quitridiomiceto associado a alterações na epiderme de anuros doentes e mortos coletados na Austrália e no Panamá. Um ano mais tarde, Longcore e colaboradores (1999) isolaram, a partir de uma rã-flecha-azul (*Dendrobates tinctorius*) morta de cativeiro nos Estados Unidos, um fungo quitrídio, o qual descreveram como *Batrachochytrium dendrobatidis*. No mesmo período, Bosch e colaboradores (2000) publicaram um artigo que também relatava a presença quitridiomicose em anuros mortos, dessa vez na Espanha.

Essas publicações relatavam pela primeira vez a quitridiomicose e, nos anos seguintes, outros diversos casos foram relatados (Bradley *et al.*, 2002; Garner *et al.*, 2006; Puschendorf & Bolaños, 2006; Skerratt *et al.*, 2007; Gaertner *et al.*, 2009; Fong *et al.*, 2015), mostrando como o fungo quitrídio estava associado a casos de mortalidade de anfíbios ao redor do mundo. Todos esses estudos alertavam a comunidade científica de que as doenças infecciosas, especialmente a quitridiomicose, levavam populações inteiras a declínios populacionais generalizados (Daszak *et al.*, 2003; Green, Converse, Schrader, 2006), levantando o temor

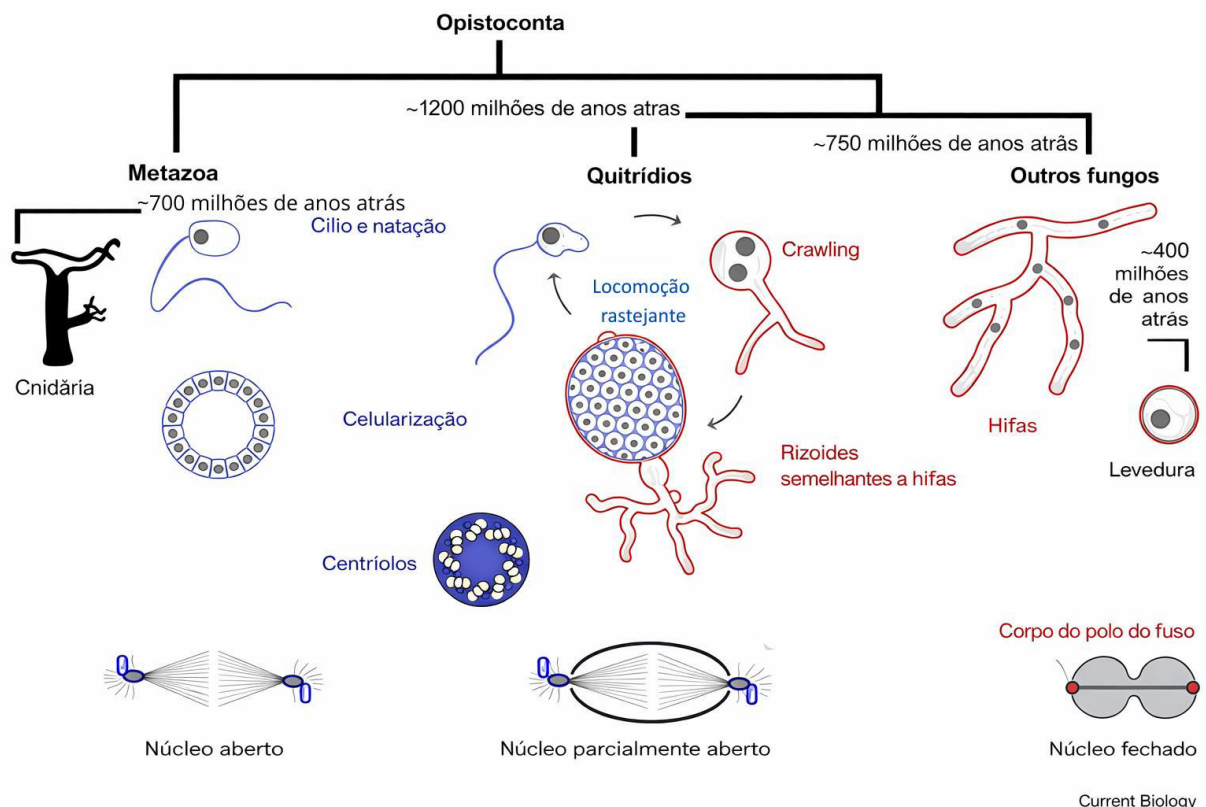
acerca da grande perda de diversidade de anfíbios ao redor do mundo.

Em resposta, diversos esforços foram realizados para aumentar o entendimento acerca desse patógeno (Boyle *et al.*, 2003; 2004; 2007; Annis *et al.*, 2004; Lambertini *et al.*, 2013), com um aumento substancial das pesquisas sobre o fungo quitrídio (Crawford-Ash *et al.*, 2025), que mostram o impacto e a relevância das questões: a ênfase da pesquisa na área nos anos seguintes se voltou para o grande problema da pandemia da quitridiomiose.

2.2 *Batrachochytrium dendrobatidis*

Chytridiomycota é um filo monofilético do reino Fungi que abrange organismos zoospóricos heterotróficos, produtores de células reprodutivas que permitem ao esporo nadar por meio de cílios móveis, ou poderem rastejar em superfícies com movimentos ameboides (Barr, 2001; Medina & Buchler, 2020; Lee *et al.*, 2024) (Figura 1).

Figura 1 - Características que diferenciam os quitrídios de outros fungos

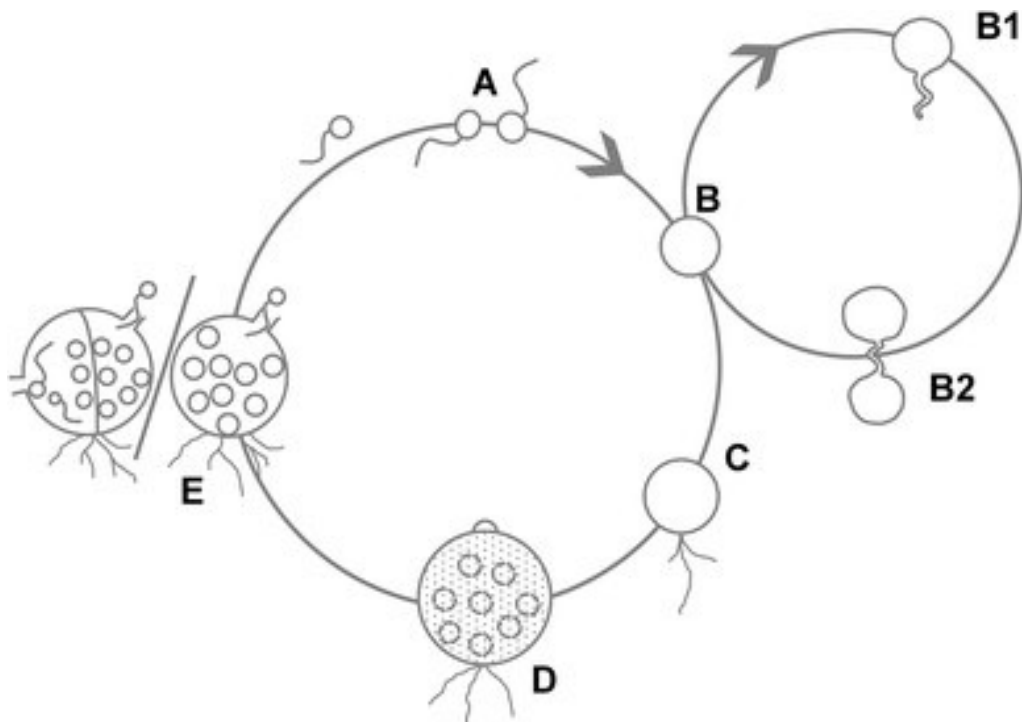


Alguns representantes do filo são relatados como organismos parasitas causadores de doenças em bactérias, protozoários e em plantas (Ngando, 2012; Obidiegwu, Flath, Gebhardt, 2014; McKindles *et al.*, 2021). Em 1998, ocorreu o primeiro relato de um fungo quitrídio

parasitando vertebrados, com o descobrimento da espécie *Batrachochytrium dendrobatidis*, causador da panzootia quitridiomicose. Mais à frente, um segundo agente etiológico foi relatado, a espécie *Batrachochytrium salamandrivorans* (*Bsal*), dessa vez associado a salamandras (Martel *et al.*, 2013). Esses achados aumentaram os temores para uma outra grande extinção massa no grupo dos anfíbios (Crawford-Ash *et al.*, 2025).

Tanto o *Bd* quanto o *Bsal* possuem dois principais estágios de vida: um zoósporo móvel com um único flagelo localizado na região posterior e um corpo reprodutivo denominado zoosporângio, no qual são produzidos os zoósporos assexuados (Longcore *et al.*, 1999; Berger *et al.*, 2005; Van Rooij *et al.*, 2015). O ciclo de vida do *Bd* inicia com o encistamento do zoósporo, desenvolvendo uma parede celular e absorvendo seu flagelo, formando uma célula germinante com rizóides finos. Ocorre a maturação, e a célula germinante se desenvolve em zoosporângio, que possui um citoplasma capaz de se clivar mitoticamente para produzir novos zoósporos, liberados após a completa maturação do zoosporângio (Berger *et al.*, 2005; Van Rooij *et al.*, 2015) (Figura 2).

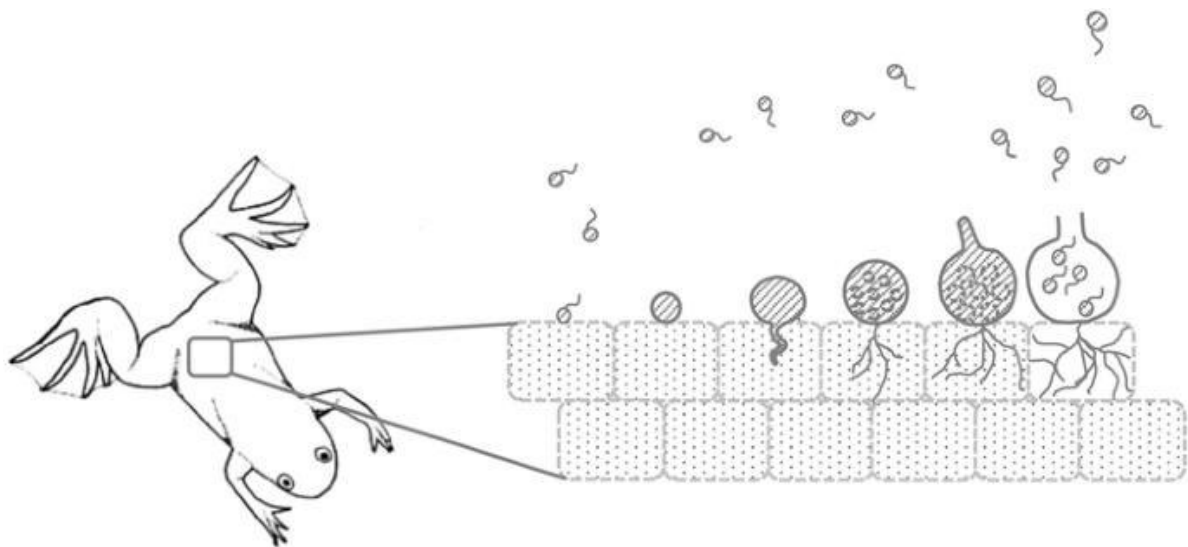
Figura 2 - O ciclo de vida das espécies de *Batrachochytrium* em cultura



Fonte: Van Rooij *et al.* (2015, p. 3). Os estágios A-E correspondem ao ciclo de vida de *Batrachochytrium dendrobatidis* em cultura, enquanto os estágios B1-B2 acontecem em *Batrachochytrium salamandrivorans*. (A) zoósporos flagelados e móveis; (B) zoósporo encistado; (B1) célula germinante com tubo germinativo; (B2) transferência do conteúdo celular para um talo recém-formado; (C) cisto de zoósporo com rizóides; (D) esporângio imaturo; (E) zoosporângio maduro com tubo de descarga (à direita), talo colonial contendo vários esporângios, cada um com seu próprio tubo de descarga (à esquerda).

Em laboratório, o *Bd* é geralmente cultivado em caldo triptona, gelatina hidrolisada e lactose (TGhL) ou caldo de triptona 1% (T1%), completando seu ciclo de vida entre 4 e 7 dias, com temperatura ótima de crescimento próximas a 20 °C (Webb, 2010; Prostack & Fritz-Laylin, 2021). Em organismos tolerantes à infecção, o patógeno se desenvolve apenas na camada mais superficial da pele, sem haver a internalização dos zoósporos (ciclo epibiótico). Nesse caso, as células superficiais parecem ser usadas apenas como fonte de nutrientes para zoosporângios se desenvolverem (Figura 3) (Van Rooij *et al.*, 2012).

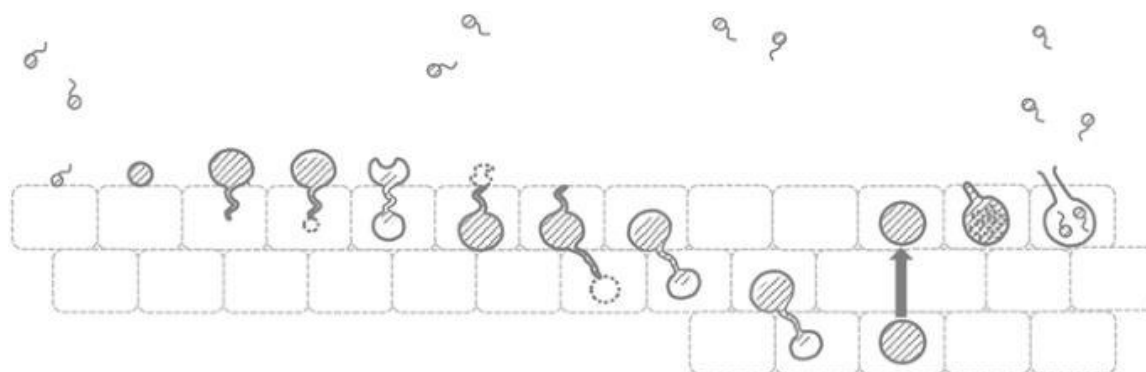
Figura 3 - Ciclo de vida epibiótico de *Batrachochytrium dendrobatidis*



Fonte: Van Rooij *et al.* (2015, p. 10).

Já na pele de anfíbios suscetíveis, o fungo, ao colonizar a epiderme do hospedeiro, encista, e o flagelo é então absorvido e a parede celular é formada (ciclo endobiótico). Ocorre a germinação, seguido do desenvolvimento do tubo germinativo, que invade as células da epiderme do hospedeiro, surgindo então um novo esporângio na extremidade desse tubo germinativo. O fungo então se prolifera dentro das células das camadas mais profundas da pele e zoosporângios ainda imaturos são transportados para camadas mais superficiais, encerrando seu desenvolvimento e liberando novos zoósporos para o ambiente (Figura 4) (Berger *et al.*, 2005; Van Rooij *et al.*, 2012; 2015).

Figura 4 - Ciclo de vida endobiótico de *Batrachochytrium dendrobatidis*



Fonte: Van Rooij *et al.* (2015, p. 10).

Em uma infecção grave de quitridiomycose, *Bd* pode interferir nas funções vitais da pele, que funciona não somente como órgão sensorial e de defesa, mas que também possui papéis fisiológicos essenciais para a manutenção da vida, como a osmorregulação e termorregulação, participação importante na troca gasosa de O₂ e CO₂, além de papéis importantes desempenhados na reprodução. O comprometimento da pele inicia com a ruptura física do órgão por meio de proteases secretadas pelo fungo, o que prejudica o transporte de eletrólitos e acarreta desequilíbrios iônicos de sódio, potássio e cloreto no sangue (Voyles *et al.*, 2009; revisado em Van Rooij *et al.*, 2015). Esse desequilíbrio afeta a força de contração e o bombeamento cardíaco, podendo levar o hospedeiro à morte (Salla *et al.*, 2018).

Em girinos, os principais sinais clínicos são a despigmentação das peças bucais, letargia, baixa capacidade de natação, que reduz a capacidade de forrageamento e, conseqüentemente, leva a uma redução do tamanho corporal (revisado em Van Rooij *et al.*, 2015; Cornell Wildlife Health Lab, 2018). Em adultos, os sinais mais comuns são a descamação excessiva da pele, vermelhidão e descoloração do órgão. Outros sintomas como morte súbita sem doença aparente e distúrbios cutâneos significativos também são relatados. A infecção por quitridiomycose pode ainda ocorrer de forma assintomática (Van Rooij *et al.*, 2015; Cornell Wildlife Health Lab, 2018).

Desde que foi identificado como uma das principais causas do declínio populacional de anfíbios, diversas técnicas de diagnóstico de *Bd* foram descritas, dentre elas, exames visuais, microscópicos e moleculares (Lambertini *et al.*, 2013). Annis e colaboradores (2004) desenvolveram um ensaio baseado em DNA que identifica *Bd* em amostras de anfíbios, através da técnica de PCR utilizando primers específicos *Bd1a* e *Bd2a*, que amplificam um fragmento de aproximadamente 300 pb das regiões espaçadoras transcritas internas (ITS) do DNA ribossomal (rDNA). Um método ainda mais preciso para detecção de *Bd* foi

desenvolvido em 2006, por Boyle e colaboradores, através de ensaios quantitativos usando PCR em tempo real (qPCR).

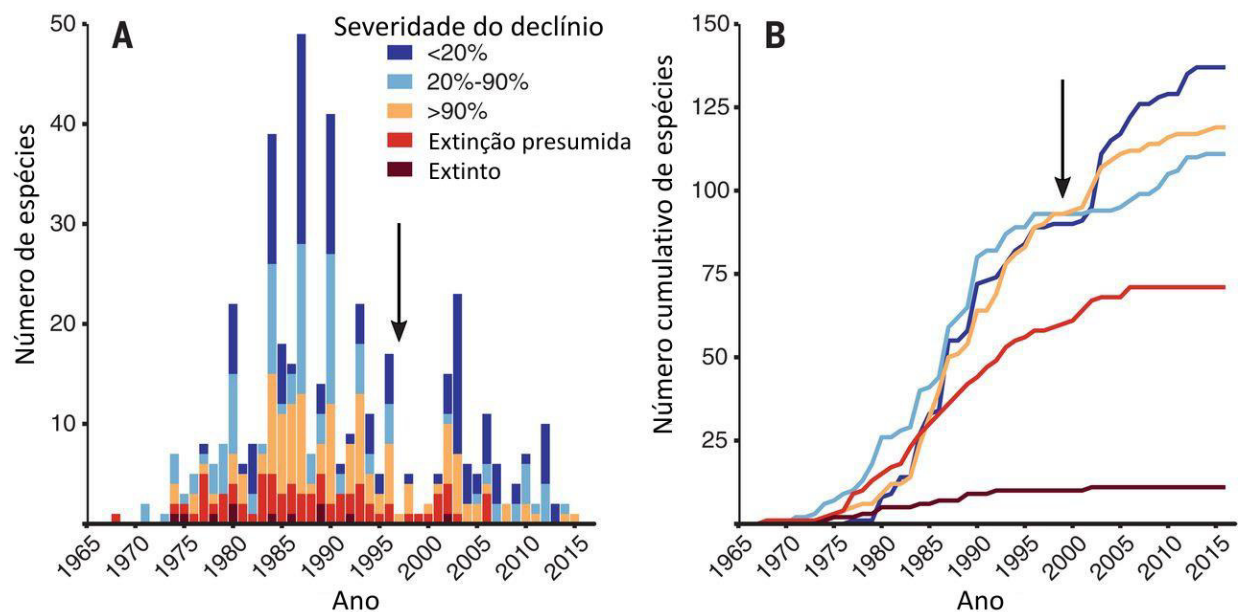
2.3 Panorama da quitridiomicose

O *Bd* é encontrado em todos os continentes, com exceção da Antártida (Fisher, Garner, Walker, 2009) e é geneticamente diverso, possuindo linhagens distintas que variam de acordo com a localização e a virulência (Byrne *et al.*, 2019), sendo elas *Bd* GPL (linhagem panzoótica global), ASIA1, ASIA2/BRAZIL, ASIA3 e CAPE (O’Hanlon *et al.*, 2018; Byrne *et al.*, 2019). Ainda não foram elucidados os processos que levaram a essa ampla distribuição, mas é conhecido que vários fatores influenciam a distribuição do patógeno, como a espécie hospedeira e temperatura (Gear *et al.*, 2025). Contudo, o transporte internacional de anfíbios vivos muitas vezes é apontado como uma das principais causas da expansão do *Bd*, principalmente a linhagem pandêmica.

O’Hanlon e colaboradores realizaram análises de sequenciamento de genomas completos e sugerem a origem do *Bd* na Ásia, através da linhagem *Bd*ASIA-1, que possui as características genéticas de uma população ancestral que deu origem à panzootia (2018). O’Hanlon e colaboradores (2018) também sugerem que a linhagem *Bd*GPL surgiu no século XX, sendo uma expansão recente do patógeno. As outras linhagens são geneticamente divergentes de *Bd*GPL, com disseminação menor e pouco associadas com grandes declínios generalizados de anfíbios. Dentre todas as linhagens, *Bd*GPL é considerada a mais virulenta, estando presente na maioria dos declínios populacionais de anfíbios (Farrer *et al.*, 2011; Becker *et al.*, 2017; Belasen *et al.*, 2022; Yacoub *et al.*, 2025).

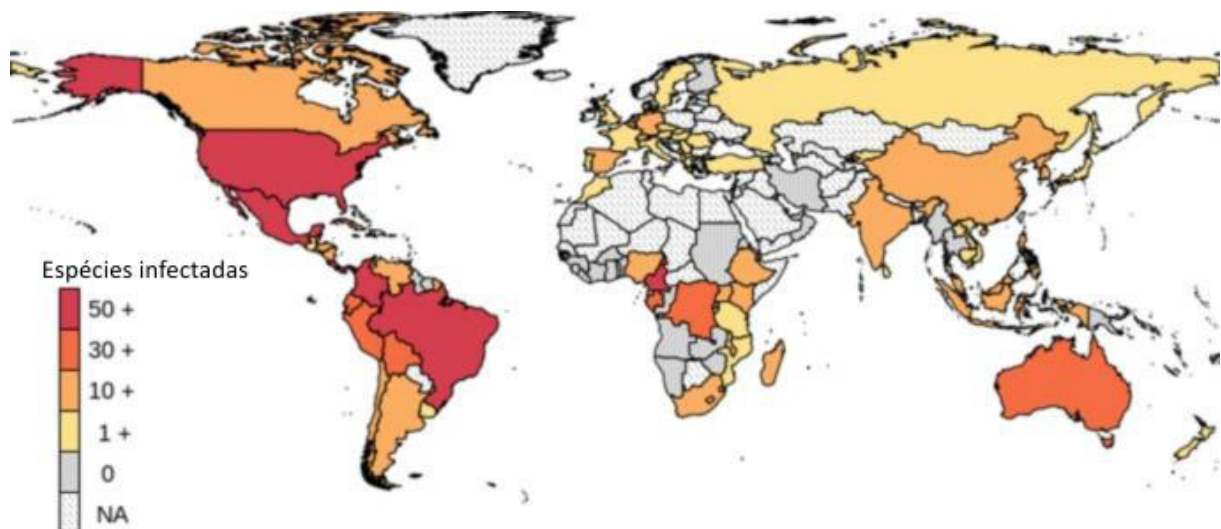
Os dados atuais apontam que a panzootia da quitridiomicose está envolvida diretamente no declínio de ao menos 500 espécies de anfíbios nos últimos 50 anos, além de 90 extinções presumidas (Scheele *et al.*, 2019) (Figura 5). *Bd* é extremamente difundido geograficamente e taxonomicamente, contaminando mais de 60 famílias de anfíbios em pelo menos 86 países (Castro Monzon, Rödel, Jeschke, 2020) (Figura 6). Um desafio ainda a ser superado é a diferença nos números de espécies amostradas entre os países, principalmente pela ausência de estudos em determinadas regiões, como por exemplo a África continental, Índia e regiões equatoriais da América do Sul.

Figura 5 - Quitridiomycose associada ao declínio de anfíbios ao longo do tempo



Fonte: Adaptado de Scheele *et al.* (2019, p. 4). (A) Declínios por ano com as barras empilhadas por gravidade do declínio, representada por cores. (B) Curvas de declínio acumulativas. Cada cor representa uma intensidade de declínio. Em (A) e (B), a seta indica o ano da descoberta do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* e a quitridiomycose (1998).

Figura 6 - Distribuição espacial do número de espécies de anfíbios infectadas por *Batrachochytrium dendrobatidis* em cada país

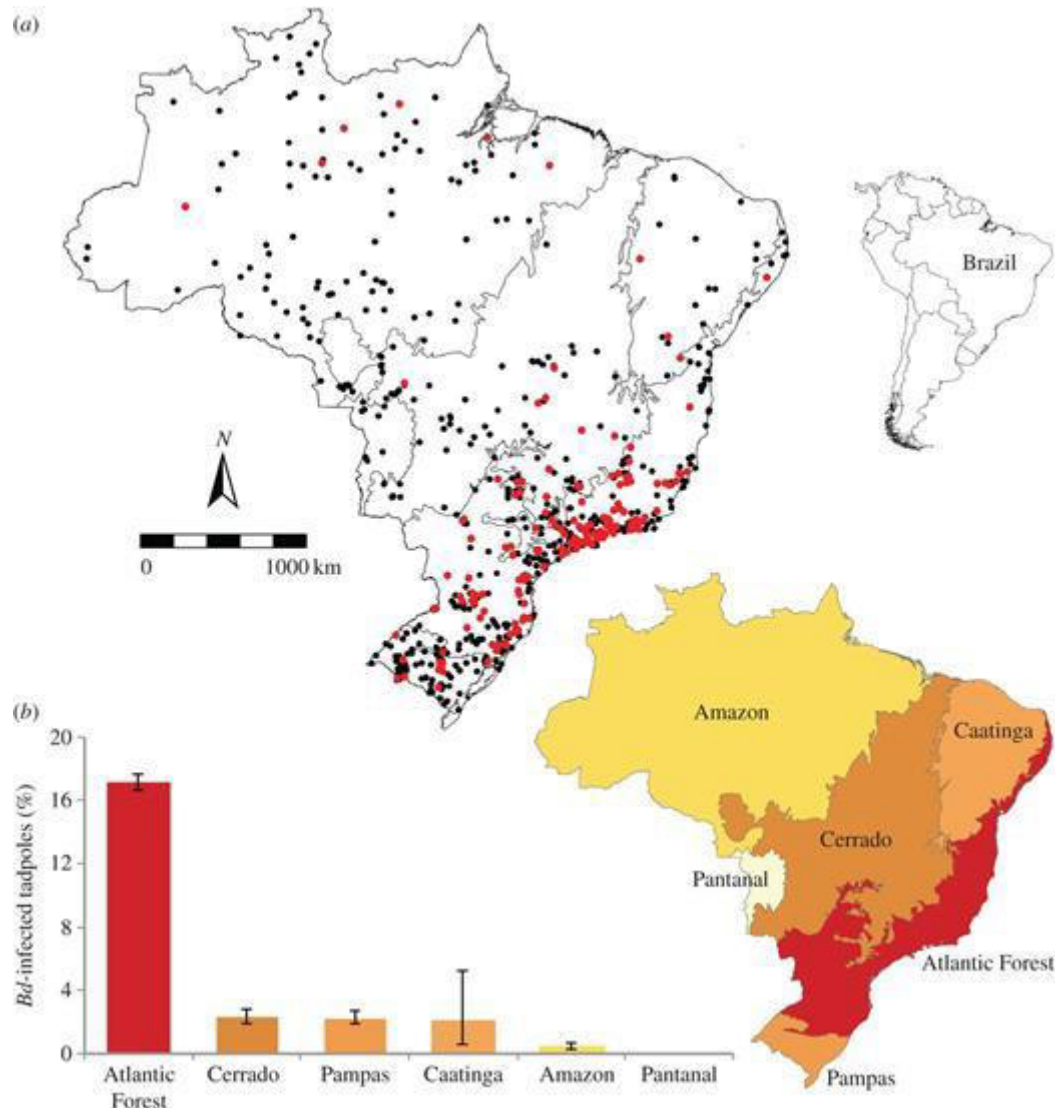


Fonte: Adaptado de Castro Monzon, Rödel, Jeschke (2020, p. 273).

No Brasil, o *Bd* já estava presente em registros antigos associados a anfíbios e alguns declínios anteriores podem estar relacionados à doença (Carvalho, Becker, Toledo, 2017). Sabe-se que ao menos 100 espécies são hospedeiras do patógeno no Brasil (Valencia-Aguilar *et al.*, 2015), incluindo espécies endêmicas com distribuições restritas (Ernetti *et al.*, 2025).

No entanto, os dados são distribuídos de forma assimétrica pelo país, com a grande maioria dos estudos sendo concentrados no Sudeste e no Sul do país, especialmente na Mata Atlântica, em contraste com a pouca amostragem em outras regiões, como é o caso do Nordeste brasileiro (Carvalho *et al.*, 2006; Vieira *et al.*, 2012; Carvalho *et al.*, 2017; Greenspan *et al.*, 2018; Amorim *et al.*, 2019; Benício *et al.*, 2020) (Figura 7).

Figura 7 - Distribuição geográfica de girinos infectados e não infectados por *Batrachochytrium dendrobatidis*



Fonte: Carvalho *et al.* (2017, p. 4). (a) Distribuição geográfica de girinos infectados por *Bd* (pontos vermelhos) e não infectados por *Bd* (pontos pretos) coletados entre 1930 e 2015. (b) Proporção de girinos infectados por *Bd* nos domínios fitogeográficos brasileiros; cores mais quentes indicam maior proporção de indivíduos infectados por *Bd*.

No Nordeste brasileiro, o primeiro estudo a relatar a existência do *Bd* na região foi publicado somente em 2017 (Carvalho *et al.*), e a região ainda continua com poucos trabalhos sobre a prevalência da quitridiomiose em anfíbios (Amorim *et al.*, 2019; Benício *et al.*, 2020;

Dos Santos *et al.*, 2024). No estado do Ceará, há apenas um único trabalho publicado sobre a presença de *Bd* em anfíbios, que relata 20 espécies contaminadas com o patógeno (Mendes *et al.*, 2024). Esses dados ressaltam a necessidade de novos estudos que avaliem a quitridiomiose no estado. Neste trabalho, são apresentadas atualizações sobre o panorama da doença no Ceará.

2.4 Probióticos como estratégia de conservação contra a quitridiomiose

Por ser um dos principais causadores do declínio populacional de várias espécies de anfíbios, diversas estratégias de conservação foram propostas ao longo dos últimos anos visando controlar e mitigar a infecção por quitridiomiose. Woodhams e colaboradores (2011) propuseram que a mitigação bem-sucedida deve ser específica ao contexto, visto que o *Bd* é um patógeno generalista. Eles destacaram que inicialmente o objetivo não era necessariamente eliminar o patógeno, mas reduzir seus efeitos negativos e aumentar a resistência e sobrevivência das populações naturais.

Diversos autores utilizaram tratamento químico em populações infectadas com *Bd* através de aplicações periódicas de antifúngicos e antibióticos *in vitro*. Os resultados são heterogêneos, ao passo que alguns trabalhos apresentaram redução e até mesmo eliminação do quitrídio da pele dos animais (Bowerman *et al.*, 2010; Martel *et al.*, 2010; Rendle *et al.*, 2015). Em contrapartida, outros autores relataram não somente a ineficácia, como também toxicidade para os hospedeiros (Mujisers *et al.*, 2012).

Knapp e colaboradores (2022) realizaram ensaios *in situ* com tratamentos utilizando itraconazol em populações de rãs afetadas pela quitridiomiose. Contudo, apesar da boa resposta a curto prazo, apresentando redução das taxas de infecção, não causaram mudanças duradouras na dinâmica da doença a longo prazo. Os efeitos *in situ* do tratamento químico devem ainda ser mais estudados, visto os riscos que podem desencadear no meio ambiente, como toxicidade, efeitos colaterais a outras espécies, além da falta de eficácia confiável em contextos naturais.

A utilização de probióticos, em contraste com outras estratégias, reforçam um mecanismo biológico que já está presente no sistema: a microbiota protetora na pele dos anfíbios. Harris e colaboradores, em 2006, foram os primeiros a relatar a inibição do *Bd* por bactérias isoladas de pele de anfíbios. Mais tarde, relataram que a adição de *Janthinobacterium lividum* à pele de uma rã infectada com *Bd* preveniu a morbidade e reduziu a mortalidade em ambiente controlado (Harris *et al.*, 2009). Em laboratório, Muletz e

colaboradores (2012) conseguiram introduzir naturalmente *J. lividum* no solo transmitido para a pele de um anfíbio, que inibiu a quitridiomiose cinco dias após a exposição ao *Bd*.

A utilização de probióticos como estratégia já é bastante relatada *in vitro* na literatura, e alguns gêneros bacterianos são frequentemente associados à inibição de *Bd*, como *Janthinobacterium*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Aeromonas*, *Chryseobacterium* entre outras (Harris *et al.*, 2006; Harris *et al.*, 2009; Rebollar *et al.*, 2019; Nava-González *et al.*, 2021; Wax *et al.*, 2023). A principal fonte de probióticos relatada na literatura é a microbiota associada a pele de anfíbios.

2.5 Ninhos de espuma como fonte de probióticos contra a quitridiomiose

Uma fonte pouco explorada para prospecção de bactérias anti *Bd* são os ninhos de espumas, um modo reprodutivo dentre cerca de 71 existentes para anfíbios (Nunes-de-Almeida; Haddad; Toledo, 2021). São microambientes úmidos e resistentes que participam do desenvolvimento dos girinos e ocorrem principalmente em ambientes secos ou com altas temperaturas para algumas espécies de anuros (Crump, 2015), pois dispõem de atributos físicos, químicos e biológicos que protegem os ovos e girinos de diversas variáveis (Fischer, 2023).

A estrutura é constituída por uma diversidade de compostos bioquímicos que a conferem grande resistência, como uma gama de proteínas e carboidratos (Cooper *et al.*, 2005; Fleming *et al.*, 2009; Hissa *et al.*, 2008; Hissa *et al.*, 2016). Por exemplo, proteínas ranaspuminas na espuma conferem estabilidade física ao ninho, protegendo-o de variações ambientais, agentes biológicos, desidratação e outros riscos eminentes (Fleming *et al.*, 2009).

A microbiota dos ninhos, embora pouco estudada, parece possuir um papel central na defesa do girino, principalmente contra patógenos, já que possuem uma microbiota única, que difere tanto da presente no ambiente quanto daquela encontrada nos progenitores (McGrath-Blaser *et al.*, 2021; Monteiro *et al.*, 2023). Isso sugere uma significativa influência na saúde dos filhotes, por ser o primeiro contato com microrganismos, dando início ao processo de colonização da pele e promovendo uma primeira linha de defesa contra patógenos, o que pode incluir o fungo quitrídio, indicando o potencial probiótico de bactérias isoladas dos ninhos de espuma.

Castro e colaboradores (2024) realizaram a descrição da microbiota dos ninhos das espécies *Adenomera hylaedactyla* (Cope, 1868), *Leptodactylus vastus* Lutz, 1930 e *Physalaemus cuvieri* Fitzinger, 1826. Os resultados compreenderam ao todo 183 morfotipos

bacterianos identificados a nível de gênero, que incluem bactérias amplamente relatadas por inibir *in vitro* o crescimento do fungo quitrídio, como *Pseudomonas spp.* No entanto, essas bactérias ainda não haviam sido testadas frente a suas atividades de inibição do *Bd* em laboratório. Logo, considerando a importância do ninho de espuma nas fases iniciais da vida de determinados grupos de anfíbios, e o potencial das bactérias na remediação da quitridiomíose, este trabalho buscou fazer uma prospecção por novas bactérias com potencial anti-*Bd*. A busca por probióticos em ninhos de espuma se mostra inovadora e pode apontar novos caminhos para superar os desafios presentes na conservação dos anfíbios.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo contribuir para o monitoramento da infecção de anuros por *Batrachochytrium dendrobatidis* no estado do Ceará, além de prospectar por microrganismos provenientes dos ninhos de espumas de *Leptodactylus vastus*, *Physalaemus cuvieri* e *Adenomera hylaedactyla* com potencial probiótico contra o fungo *Bd* visando a conservação dos anfíbios.

3.2 Objetivos específicos

- Monitorar a presença do *Bd* em localidades do estado do Ceará através de PCR convencional;
- Encontrar bactérias isoladas dos ninhos de espumas de *Leptodactylus vastus*, *Physalaemus cuvieri* e *Adenomera hylaedactyla* com atividade de inibição do crescimento do *Bd* em ensaios semiquantitativos.

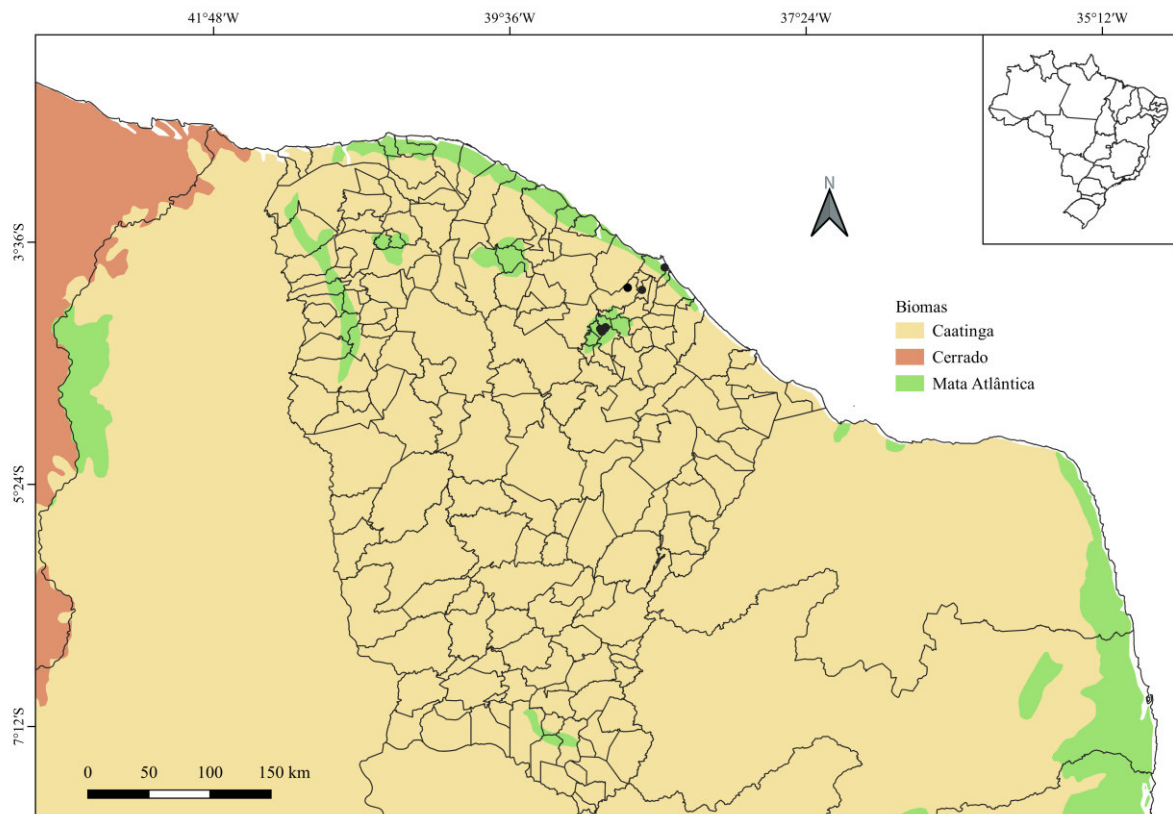
4 METODOLOGIA

4.1 Detecção de *Batrachochytrium dendrobatidis* no estado do Ceará

4.1.1 Coleta de amostras

As amostras foram coletadas sob a licença SISBIO nº 94963, nos municípios Guaramiranga, Fortaleza, Maranguape, Pacatuba e Pacoti, localizados no estado do Ceará (Figura 8), no período chuvoso, quando a atividade dos anfíbios é tipicamente elevada. Em campo, foram obtidas amostras dos indivíduos capturados utilizando *swabs* estéreis para cada indivíduo amostrado. O *swab* foi passado 5x nas patas dianteiras e traseiras, além da região dorsal e ventral do corpo do animal e então colocado em um tubo *ependorf* de 1,5 mL vazio. As luvas foram trocadas após a amostragem para cada indivíduo, visando evitar contaminação cruzada. As amostras de *swab* coletadas foram colocadas em caixas térmicas refrigeradas em gelo até o laboratório, onde foram armazenadas a -20°C até a extração de DNA.

Figura 8 - Mapa do estado do Ceará, Brasil, com os pontos onde foram coletadas as amostras



Fonte: elaborado por Bruno Guilhon.

4.1.2 Extração de DNA

As extrações de DNA foram realizadas no Laboratório de Recursos Genéticos (LarGen) seguindo protocolo adaptado por Lambertini e colaboradores (2013) a partir de Boyle e colaboradores (2004). Foram adicionados 50 μL do reagente PrepMan Ultra® (Applied Biosystems) diretamente nos tubos *ependorf* contendo o swab. Após, seguiu-se de agitação em vórtex por 45 segundos e centrifugação por 30 segundos a 12.000 rpm, e novamente agitação em vórtex por 45 segundos e centrifugação por 30 segundos a 12.000 rpm. Após, as amostras foram aquecidas em água fervente por 10 minutos, resfriadas a temperatura ambiente por 2 minutos e centrifugadas por 1 minuto a 12.000 rpm. O *swab* foi então invertido dentro do tubo *ependorf*, utilizando pinças flambadas entre cada amostra visando evitar contaminação cruzada. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 12.000 rpm, os *swabs* foram descartados e novamente foram centrifugados por 30 segundos e 45 μL da solução foram transferidos para novos tubos *ependorf*, onde foram centrifugados, uma última vez, por 10 minutos a 12.000 RPM. Por último, foi preparada uma diluição de 1:10 com água ultrapura.

4.1.3 Amplificação por PCR

As reações de PCR foram realizadas no laboratório de biologia molecular do Lembiotech e do LarGen. Todas as amostras extraídas foram submetidas à PCR convencional utilizando os primers específicos *Bd1a* (5'- CAGTGTGCCATATGTCACG-3', *Bd2a*: 5'-CATGGTTCATATCTGTCCAG-3') e *Bd2a* (5'-CATGGTTCATATCTGTCCAG-3') (Annis *et al.*, 2004). A reação foi composta por 5 μL de GoTaq Buffer 5x, 3 μL de MgCl_2 (25mM), 0,5 de dNTPs (1000 μM), 5 μL de cada primer (5 μM), 0,2 μL de Taq Polimerase (5U) e 4,3 μL de água, resultando em um Mix de 23 μL . 2 μL de DNA da amostra foi adicionado para um volume total de reação de 25 μL . Foi utilizado um controle negativo com água ultrapura em vez de DNA. As condições do Termociclador foram estabelecidas seguindo protocolo de Annis e colaboradores (2013). A desnaturação inicial ocorreu a 95°C por 5 minutos, seguida de 44 ciclos de 45 segundos a 93 °C, 45 segundos a 60 °C, 1 minuto a 72 °C, e extensão final a 72 °C por 10 minutos.

4.1.4 Eletroforese em gel de agarose

Foram utilizados 2 μ L de cada amostra amplificada para análise em gel de agarose 1%, juntamente com marcador molecular de 1 Kb (Thermo Scientific). O gel foi corado com SYBRsafe e visualizado no transiluminador de LED azul (Kasvi). A amostra foi considerada positiva para o patógeno *Bd* quando foram detectadas bandas de amplificação com tamanho aproximado de 300 pb (pares de bases).

4.2 Ensaio de inibição do crescimento de *Batrachochytrium dendrobatidis*

4.2.1 Caracterização da coleção microbiana

As coleções microbianas provenientes de amostras de ninhos de espuma de rãs foram coletadas no estado do Ceará, respectivamente em São Gonçalo do Amarante e em Pacatuba. A primeira, de *Adenomera hylaedactyla* sob a licença SISBIO 58036-6, por Martins (2020), e a segunda, de *Leptodactylus vastus* e *Physalaemus cuvieri* sob a licença SISBIO 58036-1, por Castro (2019), resultando no isolamento de 183 morfotipos. A identificação dos microrganismos da coleção foi realizada pelos autores através do sequenciamento do gene ribossomal 16S até o nível de gênero.

As coleções estão armazenadas no Laboratório de Recursos Genéticos (LarGen) e no Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia (Lembiotech) da Universidade Federal do Ceará (UFC), criopreservadas a -80 °C, em tubos criogênicos contendo as culturas microbianas e glicerol a 20%. Os isolados foram cadastrados no SISGEN sob o número A35A5E2.

4.2.3 Obtenção dos sobrenadantes livres de células

Primeiramente, as bactérias foram recuperadas da coleção armazenada a -80 °C e cultivadas em meio sólido ATGE (ágar 15 g/L, triptona 5 g/L, glicose 1 g/L, extrato de levedura 2,5 g/L, pH final de $7,0\pm 0,2$ a 25 °C) a 30 °C por 48 horas. Em seguida, foram cultivadas em 2 mL de meio líquido T1% a 35 °C por 48 horas sob agitação constante de 150 rpm e, então, foram transferidos 250 μ L desse cultivo bacteriano para 2,750 mL de caldo T1%, onde cresceram a 35 °C por mais 72 horas sob agitação constante de 150 rpm. A densidade óptica (OD) das culturas foi obtida a 600 nm. Em seguida, as bactérias foram centrifugadas

por 15 minutos a 9.000 rpm, 20 °C, e então finalmente filtradas através de membranas de 0,22 µm para obtenção dos sobrenadantes livres de células (SLC) posteriormente utilizados em nossos ensaios anti *Bd*.

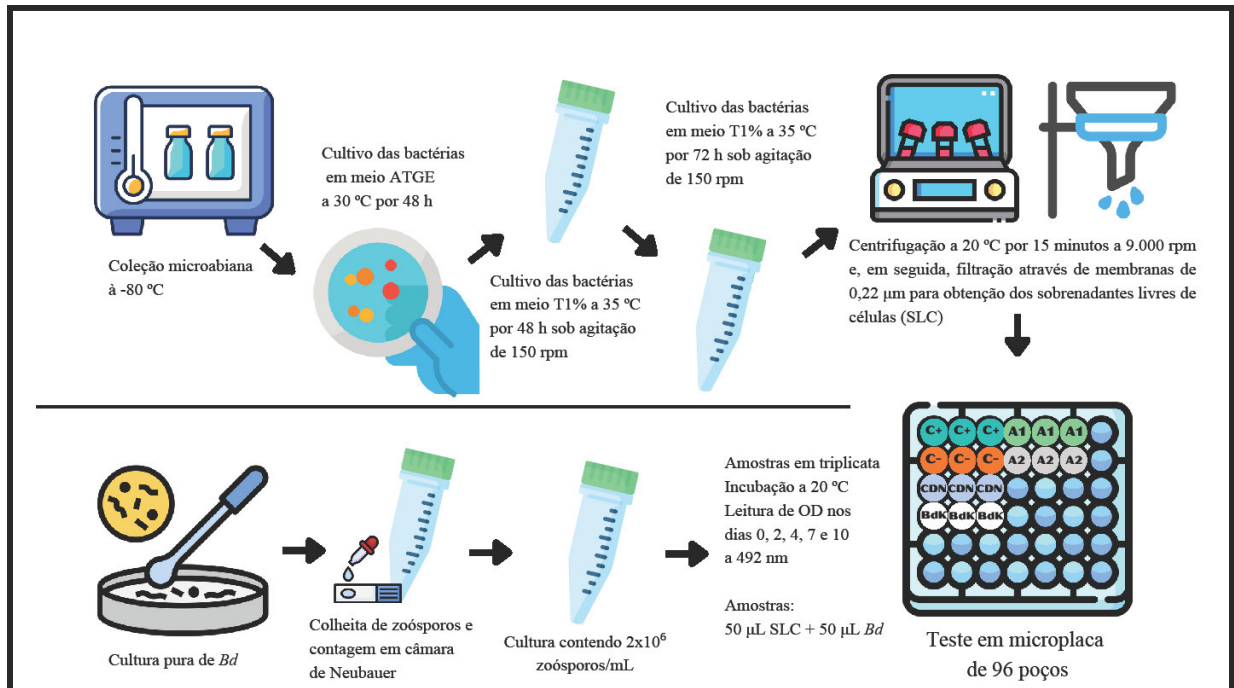
4.2.4 Colheita de zoósporos de *Batrachochytrium dendrobatidis*

O *Bd* GPL 131 foi cultivado em meio AT1% (ágar e triptona 0,1 g/L) em placa de Petri à 21 °C por 7 dias. Foram adicionados 5 mL de meio T1% sobre a placa, agitados suavemente com movimento *up and down* para liberar os zoósporos da superfície, e então o cultivo foi deixado parado por 10 minutos. Após, o líquido contendo *Bd* foi recuperado e passado por filtro de café estéril para obtenção de uma cultura contendo apenas zoósporos viáveis. Eles foram quantificados utilizando câmara de Neubauer e então diluídos para a concentração final de 2×10^6 zoósporos/mL.

4.2.5 Ensaio de inibição do crescimento do *Batrachochytrium dendrobatidis*

Os SLCs provenientes das isolados foram testados quanto a habilidade de inibir o crescimento do fungo quitrídio em microplacas de 96 poços (Figura 9). Os seguintes controles foram incluídos: controle positivo (50 µL de cultura contendo 2×10^6 zoósporos/mL de *Bd* + 50 µL de T1%), controle negativo (100 µL de T1%), controle depletado de nutrientes (50 µL de cultura contendo 2×10^6 zoósporos/mL de *Bd* + 50 µL de água destilada) e controle morto pelo calor (50 µL de cultura contendo 2×10^6 zoósporos/mL de *Bd* aquecido a 70 °C por 1 hora + 50 µL T1%). As amostras consistiam em 50 µL de cultura contendo 2×10^6 zoósporos/mL de *Bd* + 50 µL do SLC bacteriano (Tabela 1). Tanto os controles quanto as amostras foram realizadas em triplicata, na presença dos antibióticos Canamicina e Ampicilina (2000x diluídos). Foram realizadas réplicas biológicas independentes, obtidas a partir da reativação de novos cultivos bacterianos a partir de um mesmo estoque em duas semanas distintas, os quais foram testados contra cultivos independentes do *Bd* GPL 131. O crescimento do *Bd* foi monitorado por meio de leituras de absorbância a 492 nm nos dias 0, 2, 4, 7 e 10 em espectrofotômetro de microplacas (EPOCH).

Figura 9 - Desenho esquemático do ensaio de inibição do crescimento de *Batrachochytrium dendrobatidis*



Fonte: elaborado pelo autor. C+: controle positivo; C-: controle negativo; CDN: controle depletado de nutrientes; BdK: controle *Bd* morto pelo calor; A1 e A2: exemplos de amostras genéricas.

Tabela 1 - Descrição dos tratamentos utilizados no ensaio semiquantitativo de inibição do crescimento de *Batrachochytrium dendrobatidis*

TRATAMENTO	SLC	Cultura de zoósporos	Água destilada estéril	T1%
Amostra	50 µL	50 µL	-	-
C+	-	50 µL	-	50 µL
CDN	-	50 µL	50 µL	-
BdK	-	50 µL (mortos pelo calor)	-	50 µL
C-	-	-	-	100 µL

Fonte: elaborado pelo autor. C+: controle positivo; CDN: controle depletado de nutrientes; BdK: cultura de zoósporos de *Bd* morto pelo calor (aquecido a 70 °C por 1 hora); C-: controle negativo.

4.2.6 Cálculo do escore de inibição

Para calcular o índice de inibição para cada isolado, foi utilizado o software RStudio (R v4.5.1). Primeiramente, foi realizada a regressão linear dos valores de OD a 492 nm nos dias 0, 2, 4, 7 e 10. A inclinação média das réplicas foi normalizada em relação à inclinação média do controle depletado de nutrientes para determinar a proporção de crescimento. O índice de inibição (I) foi calculado como um menos essa proporção de crescimento, onde: valores ≤ -0.25 indicam facilitação do crescimento do *Bd*; > -0.25 e $< 0,25$ indicam ausência

de efeito; ≥ 0.25 e < 0.5 indicam inibição fraca; ≥ 0.50 e < 0.75 indicam inibição moderada e valores ≥ 0.75 indicam inibição forte do crescimento do *Bd* (Tabela 2) (Rebollar *et al.*, 2019).

Tabela 2 - Interpretação dos resultados a partir do valor dos índices de inibição

Interpretação dos resultados	
$I \geq 1,0$	Inibição forte
$0,50 \leq I < 0,75$	Inibição moderada
$0,25 \leq I < 0,50$	Inibição fraca
$-0,25 \leq I < 0,25$	Sem efeito
$I < -0,25$	Facilitação

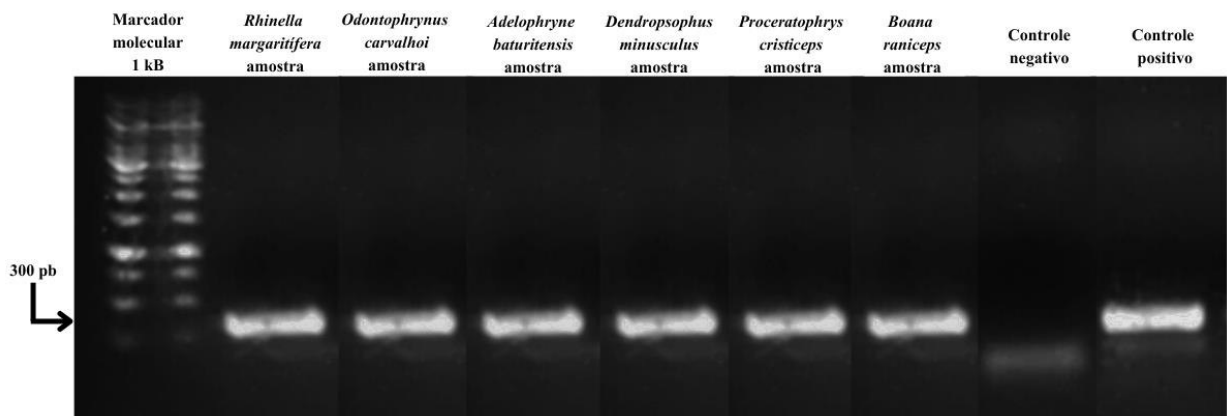
Fonte: elaborada pelo autor. I: Índice de inibição.

5 RESULTADOS

5.1 Detecção de *Batrachochytrium dendrobatidis* no estado do Ceará

Ao todo, 51 indivíduos foram amostrados e testados quanto à presença ou ausência de *Bd* através de PCR convencional, dos quais seis testaram positivo (Figura 10, Tabela 2), sendo as espécies *Rhinella dapsilis* (Myers and Carvalho, 1945), *Odontophrynus carvalhoi* Savage and Cei, 1965, *Adelophryne baturitensis* Hoogmoed, Borges & Cascon, 1994, *Dendropsophus minusculus* (Rivero, 1971), *Proceratophrys cristiceps* (Müller, 1883) e *Boana raniceps* (Cope, 1862). As três primeiras foram amostrados no município de Guaramiranga, enquanto *D. minusculus* foi amostrado em Fortaleza, *P. cristiceps* em Pacatuba e *B. raniceps* em Pacoti.

Figura 10 - Resultado de PCR para detecção de *Batrachochytrium dendrobatidis* em gel de agarose (1%)



Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 3 - Espécies de anuros amostradas distribuídas nas famílias taxonômicas e locais de coleta

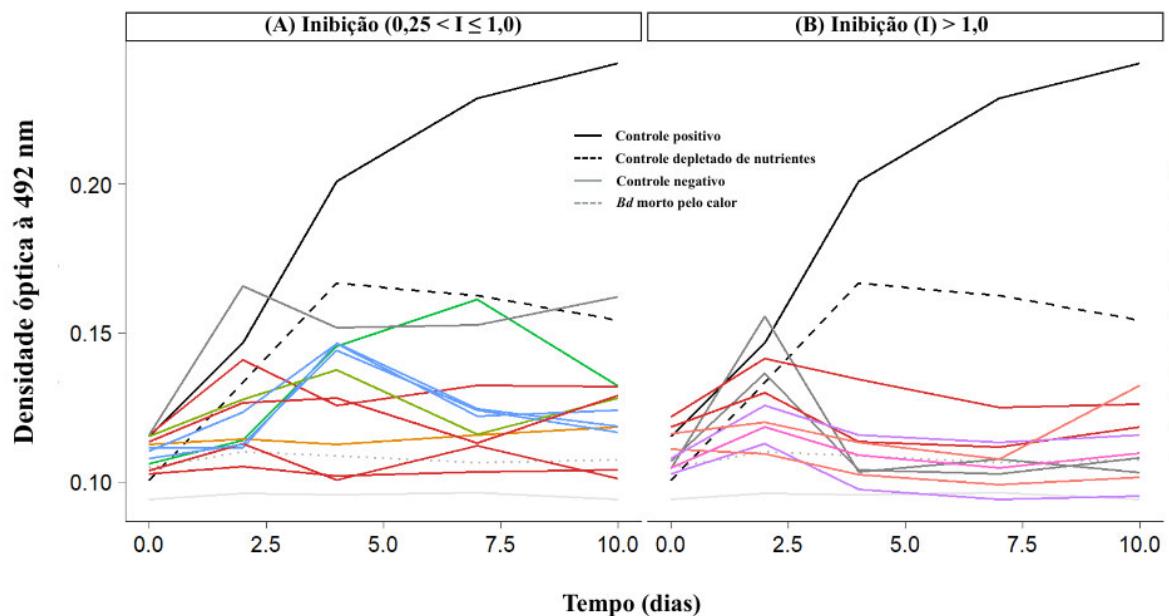
Família	Espécie	Guaramiranga	Pacoti	Pacatuba	Fortaleza	Maranguape
Bufonidae	<i>Rhinella casconi</i>	- (0/4)	NC	NC	NC	NC
	<i>Rhinella dapsilis</i> *	+ (1/7)	NC	NC	NC	NC
	<i>Rhinella granulosa</i>	NC	NC	NC	- (0/1)	- (0/1)
Eleutherodactylidae	<i>Adelophryne baturitensis</i> *	+ (1/3)	NC	NC	NC	NC
Hylidae	<i>Boana raniceps</i>	NC	+ (1/1)	NC	- (0/1)	NC
	<i>Dendropsophus minusculus</i> *	NC	NC	NC	+ (1/2)	NC
	<i>Dendropsophus nanus</i>	NC	- (0/1)	NC	NC	NC
	<i>Dendropsophus tapacurensis</i>	NC	NC	NC	NC	- (0/1)
	<i>Scinax similis</i>	NC	NC	NC	- (0/1)	NC
	<i>Scinax tapacurensis</i>	NC	NC	NC	NC	- (0/1)
	<i>Scinax x-signatus</i>	NC	NC	- (0/2)	- (0/1)	NC
	<i>Trachycephalus typhonius</i>	NC	- (0/1)	NC	NC	NC
Leptodactylidae	<i>Dermatonotus muelleri</i>	NC	NC	NC	- (0/1)	NC
	<i>Leptodactylus vastus</i>	NC	NC	- (0/2)	NC	NC
	<i>Physalaemus albifrons</i>	NC	NC	NC	- (0/2)	NC
	<i>Physalaemus cuvieri</i>	NC	NC	NC	- (0/2)	NC
	<i>Pleurodema diplolister</i>	NC	NC	NC	- (0/1)	NC
Microhylidae	<i>Elachistocleis piauiensis</i>	NC	NC	NC	- (0/1)	NC
Odontophrynidae	<i>Odontophrynus carvalhoi</i> *	+ (1/3)	NC	NC	NC	NC
	<i>Proceratophrys aff. renalis</i>	NC	NC	NC	NC	- (0/1)
	<i>Proceratophrys cristiceps</i> *	NC	NC	+ (1/3)	NC	- (0/4)
Strabomantidae	<i>Pristimantis relictus</i>	NC	NC	NC	NC	- (0/3)

Fonte: elaborado pelo autor. Registros negativos são representados com (-) e registros positivos com (+). Entre parênteses tem-se o número de positivos em relação ao total. NC representa não coletado. *: primeiro registro de infecção por Bd na espécie.

5.2 Bactérias de ninhos de espuma podem inibir o crescimento de *Batrachochytrium dendrobatidis*

Foram testados 53 isolados bacterianos obtidos dos ninhos de espuma de *Leptodactylus vastus*, *Physalaemus cuvieri* e *Adenomera hylaedactyla*. A Figura 11 mostra a curva de crescimento do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* frente aos sobrenadantes de cultivos bacterianos testados, evidenciando a inibição do crescimento do fungo quitrídio para tratamentos com SLC que apresentaram crescimento inferior ao controle depletado de nutrientes.

Figura 11 - Crescimento de *Batrachochytrium dendrobatidis* frente aos sobrenadantes de cultivos bacterianos



Fonte: elaborado pelo autor. (A) Crescimento de *Bd* sob exposição de sobrenadantes bacterianos que apresentaram escore de inibição ($I > 0,25$ e $\leq 1,0$). (B) Crescimento de *Bd* sob exposição de sobrenadantes bacterianos que apresentaram escore de inibição ($I > 1,0$).

O grau de inibição dos SLC produzido por cada bactéria foi obtido (Tabela 4, Figura 12). Apenas as bactérias L10 (*Kurthia*), L9 e L23 (gêneros não identificados) não inibiram o crescimento do *Bd*, e nenhuma apresentou facilitação. Os demais isolados, cepas dos gêneros *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Brevundimonas*, *Burkholderia*, *Chryseobacterium*, *Dyella*, *Kurthia*, *Microbacterium*, *Niabella*, *Pedobacter*, *Streptomyces*, *Enterobacter*, *Camamonas*, *Lysinibacillus*, *Serratia*, *Aeromonas*, *Kurthia* inibiram o crescimento do fungo quitrídio *in vitro*.

Tabela 4 - Escore de inibição do crescimento de *Batrachochytrium dendrobatidis* por bactérias isoladas dos ninhos de espumas de *L. vastus*, *P. cuvieri* e *A. hylaedactyla*

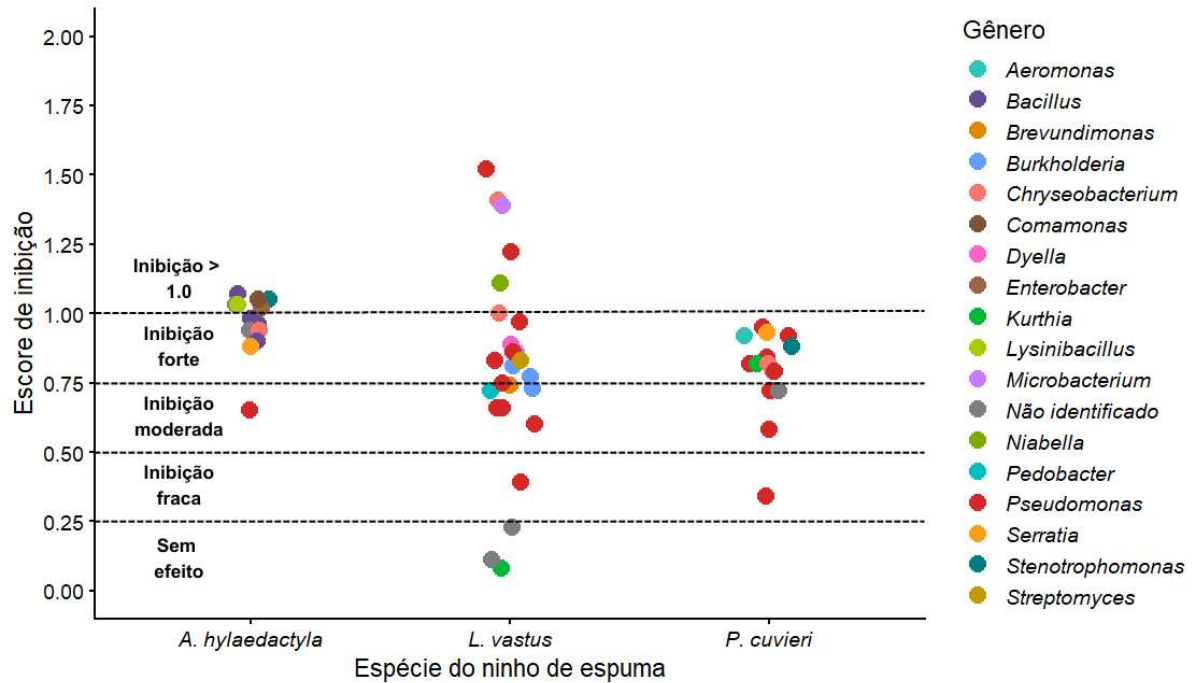
Espécie	Cepas	Gênero	OD	Inibição (I) > 1,0
<i>Leptodactylus vastus</i>	L31	<i>Pseudomonas</i>	-	1,52±0,12
	L15	<i>Chryseobacterium</i>	1,41	1,41±0,28
	L17	<i>Microbacterium</i>	0,78	1,39±0,29
	L52	<i>Pseudomonas</i>	1,06	1,22±0,46
	L4	<i>Niabella</i>	-0,003	1,11±0,17
<i>Adenomera hylaedactyla</i>	A2	<i>Stenotrophomonas</i>	1,13	1,05±0,03
	B1	<i>Enterobacter</i>	1,27	1,02±0,06
	B3	<i>Bacillus</i>	0,54	1,07±0,002
	A4	<i>Comamonas</i>	1,24	1,05±0,01
	B5	Não identificado	1,26	1,03±0,03
	B2	<i>Lysinibacillus</i>	1,08	1,03±0,01
Espécie	Cepas	Gênero	OD	Inibição forte (1,0 ≤ I < 0,75)
<i>Leptodactylus vastus</i>	L14	<i>Chryseobacterium</i>	0,83	1,00±0,07
	L51	<i>Pseudomonas</i>	1,09	0,97±0,33
	L7	<i>Dyella</i>	1,14	0,89±0,05
	L6	<i>Microbacterium</i>	0,37	0,86±0,26
	L28	<i>Pseudomonas</i>	0,92	0,86±0,001
	L49	<i>Pseudomonas</i>	1,01	0,83±0,56

	L32	<i>Streptomyces</i>	1,02	0,83±0,14
	L12	<i>Burkholderia</i>	1,49	0,81±0,02
	L13	<i>Burkholderia</i>	1,53	0,77±0,19
<i>Physalaemus cuvieri</i>	P13	Não identificado	1,04	0,99±0,01
	P11	Não identificado	1,01	0,99±0,01
	P23	<i>Pseudomonas</i>	-	0,95±0,06
	P2	<i>Serratia</i>	1,61	0,93±0,05
	P6	<i>Aeromonas</i>	1,23	0,92±0,0002
	P36	<i>Pseudomonas</i>	0,96	0,92±0,20
	P16	<i>Stenotrophomonas</i>	1,05	0,88±0,07
	P137	<i>Pseudomonas</i>	0,60	0,84±0,05
	P8	<i>Kurthia</i>	0,91	0,82±0,19
	P3	<i>Chryseobacterium</i>	0,97	0,82±0,21
	P119	<i>Pseudomonas</i>	0,90	0,79±0,08
<i>Adenomera hylaedactyla</i>	A9	<i>Bacillus</i>	0,44	0,98±0,01
	A8	<i>Bacillus</i>	0,63	0,96±0,11
	A11	Não identificado	1,23	0,94±0,16
	A1	<i>Chryseobacterium</i>	1,03	0,94±0,07
	A3	<i>Bacillus</i>	0,27	0,90±0,01
Espécie	Cepas	Gênero	OD	Inibição moderada (0,75 ≤ I < 0,50)

<i>Leptodactylus vastus</i>	L50	<i>Pseudomonas</i>	-	0,75±0,35
	L3	<i>Brevundimonas</i>	0,81	0,74±0,03
	L5	<i>Burkholderia</i>	1,43	0,73±0,08
	L1	<i>Pedobacter</i>	-0,014	0,72±0,17
	L21	<i>Pseudomonas</i>	1,04	0,66±0,07
	L109	<i>Pseudomonas</i>	-	0,66±0,36
	L118	<i>Pseudomonas</i>	1,20	0,60±0,24
<i>Physalaemus cuvieri</i>	P54	<i>Pseudomonas</i>	1,04	0,27±0,14
	P17	Não identificado	0,68	0,72±0,28
	P127	<i>Pseudomonas</i>	0,85	0,58±0,29
<i>Adenomera hylaedactyla</i>	A10	<i>Serratia</i>	0,29	0,88±0,15
	B8	<i>Pseudomonas</i>	0,37	0,65±0,07
Espécie	Cepas	Gênero	OD	Inibição fraca (0,50 ≤ I < 0,25)
<i>Leptodactylus vastus</i>	L24	<i>Pseudomonas</i>	0,92	0,39±0,52
<i>Physalaemus cuvieri</i>	P42	<i>Pseudomonas</i>	-	0,34±0,71
Espécie	Cepas	Gênero	OD	Sem efeito (0,25 ≤ I < -0,25)
<i>Leptodactylus vastus</i>	L9	Não identificado	-0,02	0,23±0,06
	L23	Não identificado	1,07	0,11±0,23
	L10	<i>Kurthia</i>	1,05	0,08±0,11

Fonte: elaborado pelo autor. I: índice de inibição.

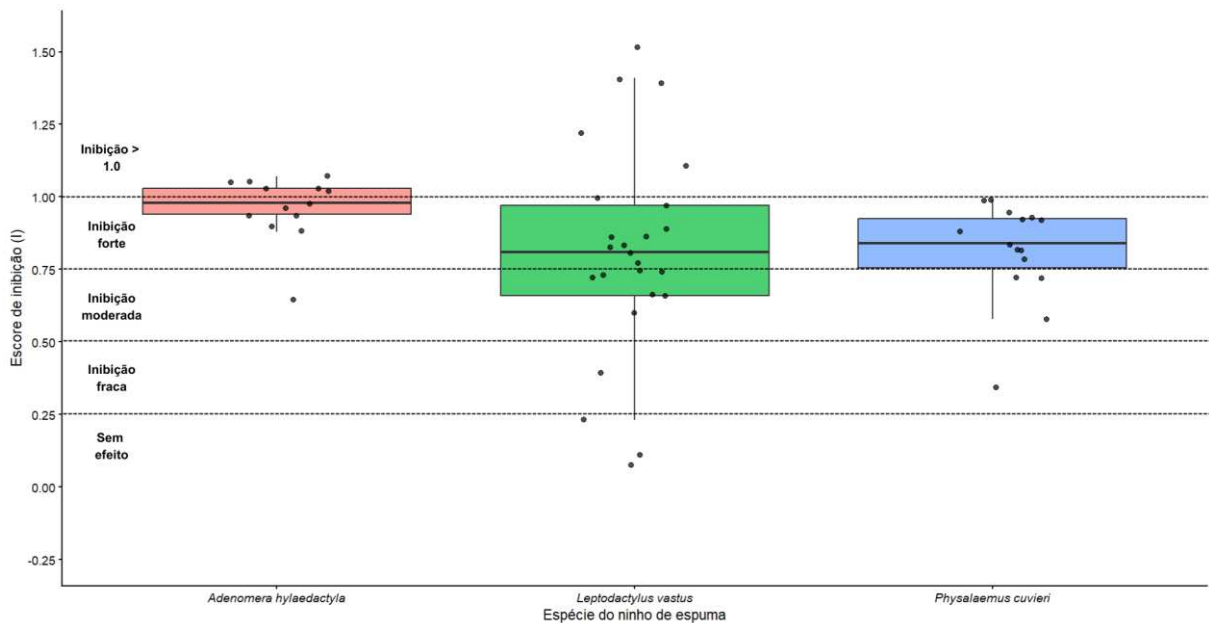
Figura 12 - Grau de inibição do crescimento de *Batrachochytrium dendrobatidis* por sobrenadantes de cultivos bacterianos de ninhos de espuma de *Adenomera hylaedactyla*, *Leptodactylus vastus* e *Physalaemus cuvieri*



Fonte: elaborado pelo autor.

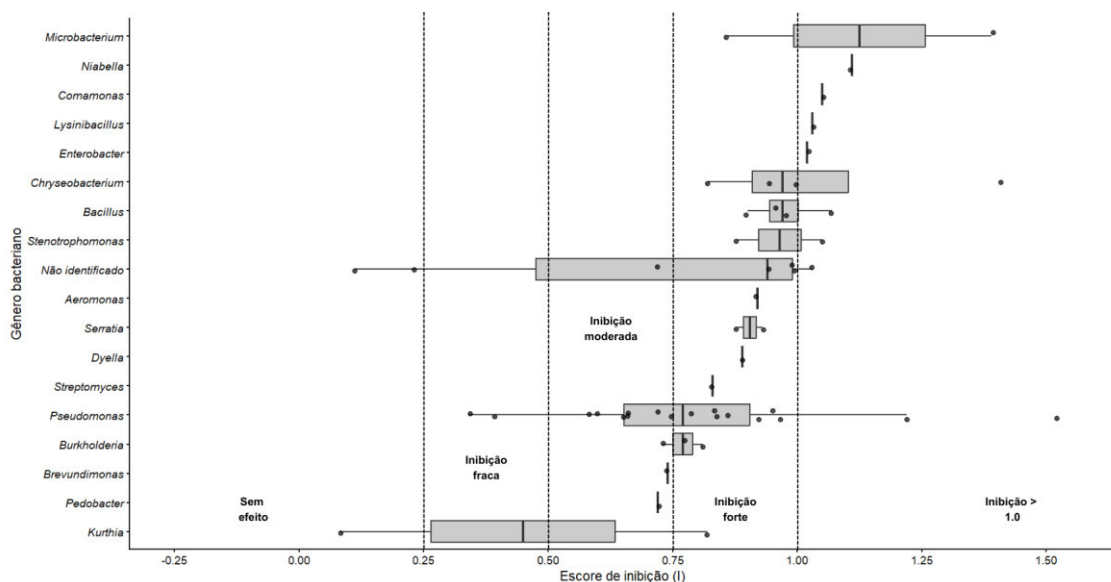
Todos os ninhos apresentaram microrganismos capazes de inibir *Bd* nos ensaios quantitativos realizados (Figura 13), e praticamente todos os isolados testados apresentaram algum grau de inibição (Figura 14).

Figura 13 - Distribuição dos índices de inibição do crescimento de *Batrachochytrium dendrobatidis* por isolados bacterianos dos ninhos de espuma de *Adenomera hylaedactyla*, *Leptodactylus vastus* e *Physalaemus cuvieri*



Fonte: elaborado pelo autor.

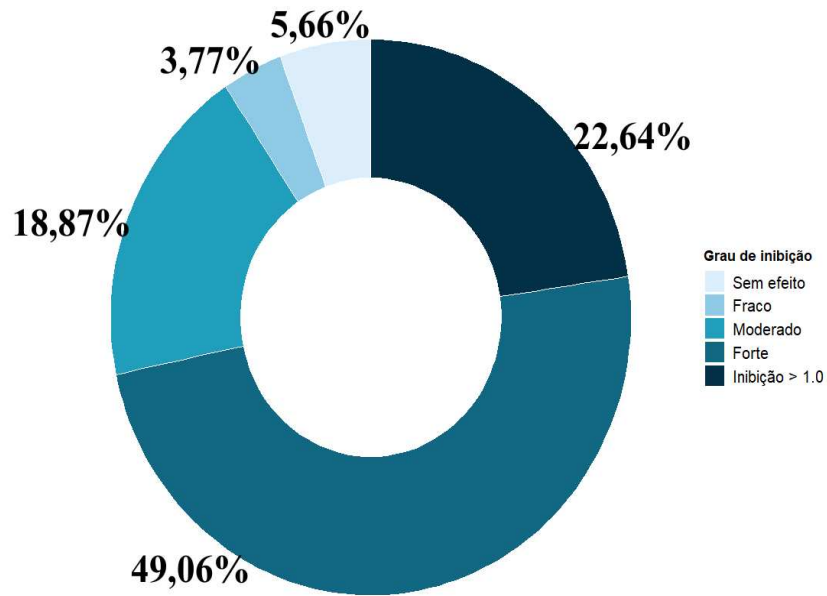
Figura 14 - Distribuição dos índices de inibição do crescimento de *Batrachochytrium dendrobatidis* por gênero dos isolados bacterianos dos ninhos de espuma de *Adenomera hylaedactyla*, *Leptodactylus vastus* e *Physalaemus cuvieri*



Fonte: elaborado pelo autor.

Dentre os 53 isolados de ninho de espuma testados, 50 (94,34%) apresentaram algum grau de inibição em ensaio de crescimento do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Figura 15). Dentre elas, 2 (3,77%) apresentaram inibição fraca, 12 (18,87%) inibição moderada, 25 (49,06%) inibição forte e 11 (22,64%) inibição superior a um.

Figura 15 - Proporção dos níveis de inibição do crescimento de *Batrachochytrium dendrobatidis* entre isolados bacterianos dos ninhos de espumas de *Adenomera hylaedactyla*, *Leptodactylus vastus* e *Physalaemus cuvieri*



Fonte: elaborado pelo autor.

6 DISCUSSÃO

6.1 Detecção de *Batrachochytrium dendrobatidis* no estado do Ceará

Este é o segundo trabalho que buscou investigar a presença de *Batrachochytrium dendrobatidis* em populações de anuros no estado do Ceará. O fungo foi detectado em amostradas de seis espécies (*Rhinella dapsilis*, *Adelophryne baturitensis*, *Boana raniceps*, *Dendropsophus minusculus*, *Odontophrynus carvalhoi*, *Proceratophrys cristiceps*), de 22 espécies testadas, em quatro localidades diferentes do estado.

Rhinella dapsilis é uma espécie terrestre e diurna membro da família Bufonidae, vive na serrapilheira de floresta primárias (Rodríguez & Duellman, 1994), com a reprodução associado a riachos (Zimmerman & Bogart, 1988). Possui populações no Brasil, Colômbia, Equador e Peru (*Amphibian Species of the World*, 2026). O gênero *Rhinella* possui registros positivos para quitridiomycose no Ceará na Chapada do Araripe e Planalto da Ibiapaba (Mendes *et al.*, 2024). Neste estudo, foi identificado um indivíduo com resultado positivo para *Bd* em Guaramiranga-CE. Além disso, o *Bd* já foi detectado em outras espécies do gênero (Coutinho *et al.*, 2015; Ruggeri, Toledo e Potsch., 2017; Ruggeri *et al.*, 2018).

Odontophrynus carvalhoi é uma espécie da família Odontophrynidae endêmica do Brasil, com distribuição no leste e nordeste do Brasil (*Amphibian Species of the World*, 2026). Nesta pesquisa, três indivíduos da espécie foram amostrados em Guaramiranga-CE, com resultado positivo para *Bd* em uma amostra. Esse dado é inédito para a espécie.

Adelophryne baturitensis é uma espécie da família Eleutherodactylidae, endêmica do nordeste brasileiro, ocorre em altitudes entre 600 e 1000 m acima do nível do mar (Hoogmoed, Borges, Cascon, 1994; *Amphibian Species of the World*, 2026). Foram amostrados três indivíduos da espécie em Guaramiranga-CE, com resultado positivo para *Bd* em uma das amostras. Esse é o primeiro registro do fungo para a espécie.

Dendropsophus minusculus é uma perereca da família Hylidae de ampla distribuição neotropical, ocorrendo em várias regiões do Brasil e da América do Sul (Zina *et al.*, 2014). O *Bd* já foi detectado em algumas espécies do gênero na Mata Atlântica (Rodríguez *et al.*, 2014; Coutinho *et al.*, 2015; Ruggeri *et al.*, 2018). Esse foi o primeiro registro de *Bd* para a espécie e o de uma espécie com o fungo na capital Fortaleza.

Proceratophrys cristiceps é uma espécie da família Cycloramphidae, encontrados exclusivamente na América do Sul, no nordeste brasileiro (Frost *et al.*, 2006; *Amphibian Species of the World*, 2026). Quatro indivíduos foram amostrados em Maranguape-CE, com

nenhum registro positivo para *Bd*, e três indivíduos foram amostrados em Pacatuba-CE, com um registro positivo para quitridiomycose. Já existem registros para o gênero *Proceratophrys* em outros estados (Rodriguez *et al.*, 2014; Ruggeri *et al.*, 2018). No entanto, esse é o primeiro registro de quitridiomycose para a espécie.

Boana raniceps é um anuro da família Hylidae, amplamente distribuída no país, com hábito de vida associados a corpos de água (Vaconcelos *et al.*, 2022; *Amphibians Species of the World*, 2026). A espécie já havia sido registrada com *Bd* no estado do Ceará nas cidades de Farias Brito e Planalto da Ibiapaba (Mendes *et al.*, 2024), e nesta pesquisa, uma amostra da região de Pacoti testou positivo para o fungo. Contudo, outras espécies do gênero também já testaram positivo para quitridiomycose na Mata Atlântica e no Cerrado (Rodrigueza *et al.*, 2014; Jenkinson *et al.*, 2016; Ruggeri *et al.*, 2018).

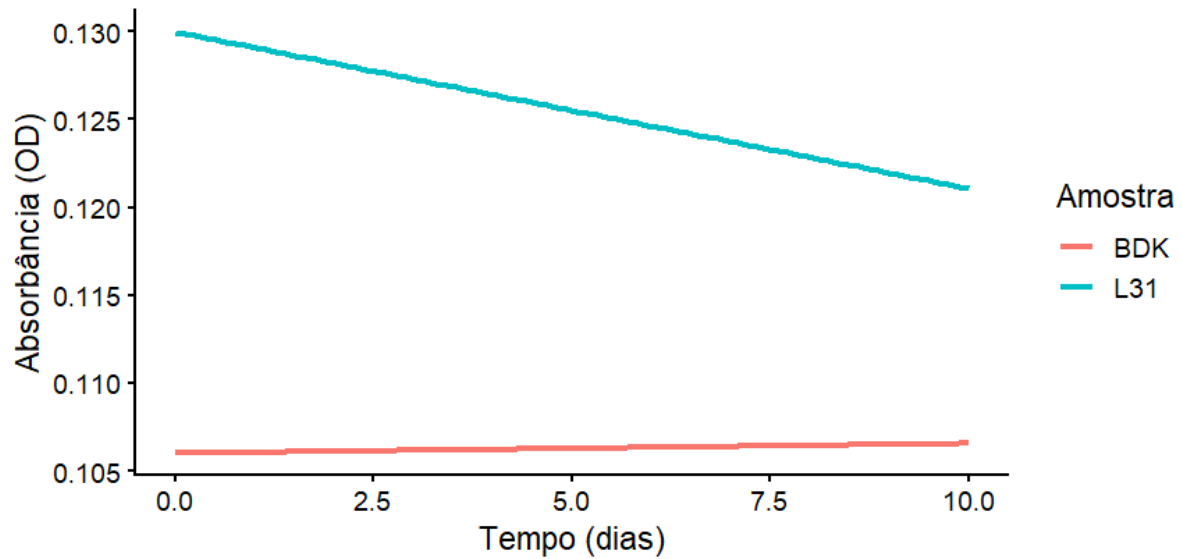
Este trabalho traz então atualizações da presença do fungo *Bd* no estado do Ceará. Juntando os dados obtidos por Mendes e colaboradores (2024), são conhecidas, atualmente, 25 espécies infectadas com o fungo no estado. Por último, é importante salientar que este estudo faz parte de uma investigação mais ampla relacionada à quitridiomycose no Ceará e no bioma Caatinga. Novos dados serão integrados, com o aumento das áreas estudadas e dos grupos taxonômicos, além de dados relacionados à quantidade de DNA da infecção e a linhagem do *Bd*.

6.2 Prospecção por probióticos em ninhos de espuma

6.2.1 Bactérias com índice de inibição > 1.0

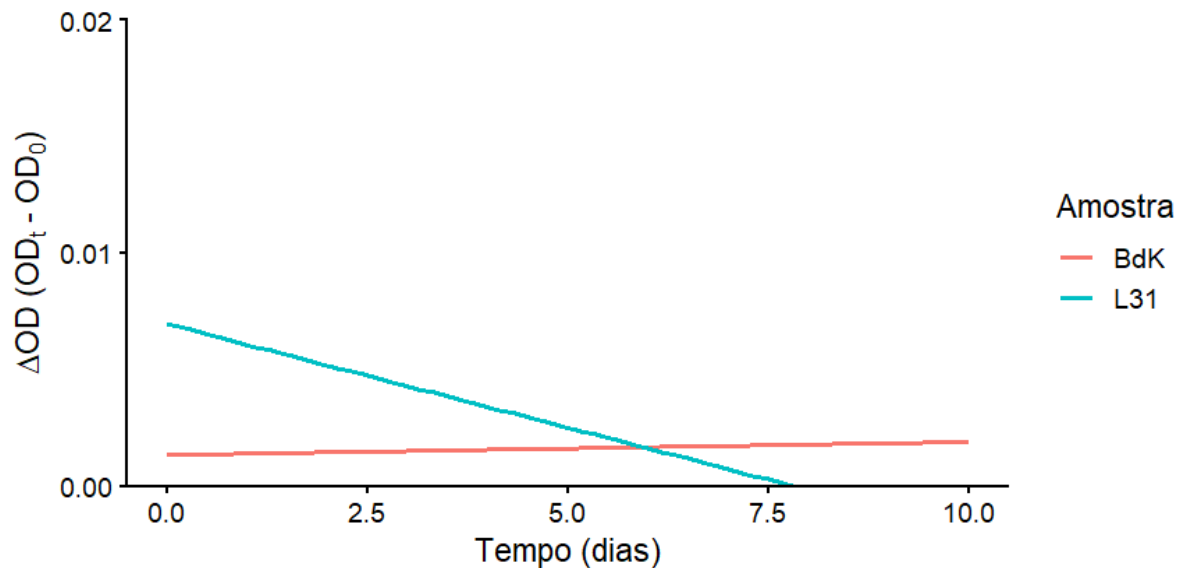
Foram identificados onze isolados bacterianos que apresentaram um grau de inibição superior a um nos ensaios de crescimento de *Bd*. A principal característica desse grupo é a diminuição da densidade óptica ao longo do tempo, gerando uma reta com inclinação negativa. O controle morto pelo calor (*BdK*) utilizado nos ensaios é caracterizado por não possuir uma queda na concentração de *Bd* ao longo do tempo, com a inclinação da reta próximo a zero (Figuras 16 e 17).

Figura 16 - Inclinação das regressões lineares de *Batrachochytrium dendrobatidis* ao longo do tempo



Fonte: elaborado pelo autor. *BdK*: controle *Bd* morto pelo calor; L31: cepa bacteriana (consultar Tabela 1).

Figura 17 - Variação relativa da densidade de *Batrachochytrium dendrobatidis* ao longo do tempo



Fonte: elaborado pelo autor. *BdK*: controle *Bd* morto pelo calor; L31: cepa bacteriana (consultar Tabela 1).

Bell e colaboradores (2013) testaram o crescimento de *Bd* em meio com 100% de depleção de nutrientes (50 μ L de meio TGhL contendo 2×10^6 zoospóros/mL de *Bd* + 50 μ L de água estéril), e constataram que pode existir imprecisões nos resultados pela influência da depleção de nutrientes de até 63,5% ($I = 0,635$). Os autores concluem que efeitos de inibição confiáveis, portanto, podem ser constatados para microrganismos que apresentem $I > 0,635$. Contudo, neste trabalho foram comparados os resultados das amostras com o controle depletado de nutrientes, ao passo que Bell e colaboradores compararam com o controle

positivo. Essa metodologia garante o grau de confiabilidade e precisão dos resultados.

Existe então a possibilidade de que estes microrganismos não somente desaceleram o crescimento do quitrídio (atividade antifúngica *fugistática*), mas também possuem atividade antifúngica *fungicida* levando a possível lise celular, o que pode explicar a inclinação negativa da reta. Bell e colaboradores (2013) relataram casos com total inibição com lise celular em seu estudo, mas que só puderam ser confirmadas com inspeção visual em microscopia, e associado com os resultados de absorbância.

Contudo, a investigação da atividade antifúngica *fungicida* foge ao escopo do presente trabalho, e inspeções visuais não foram realizadas. Desse modo, investigações complementares são necessárias para confirmar a natureza *fungicida*, os compostos envolvidos e a dinâmica temporal da interação. Portanto, para dar continuidade a discussão, o presente trabalho tratou este grupo como inibidores fortes, destacando a atividade anti-*Bd*.

6.2.2 Bactérias de ninhos de espuma podem inibir o crescimento de *Batrachochytrium dendrobatidis*

Os microrganismos isolados dos ninhos de *L. vastus*, *P. cuvieri* e *A. hylaedactyla* apresentaram atividade anti-*Bd* em ensaios semiquantitativos em microplacas de 96 poços, onde o fungo quitrídio cresceu em meio com os SLC produzidos pelas bactérias. Esses achados são um dos primeiros relatos da inibição do crescimento de *B. dendrobatidis* por microrganismos provenientes de ninhos de espuma de anuros.

Dentre os isolados testados, algumas cepas se destacam, como as do gênero *Niabella*, que apresentaram atividade inibitória de grau forte ($L4 - I = 1,11$). Embora já houvesse relatos de bactérias do gênero associadas a pele de anfíbios (Abarca *et al.*, 2018a; 2018b), ainda não havia nenhum registro quanto a capacidade anti-*Bd* na literatura. O mesmo acontece para os gêneros *Comamonas* ($A4 - I = 1,05$), *Dyella* ($L7 - I = 0,89$), *Kurthia* ($P8 - I = 0,82$), *Burkholderia* ($L12 - I = 0,81$; $L13 - I = 0,77$) e *Brevundimonas* ($L3 - I = 0,74$), cujos isolados também apresentaram inibição forte, contudo até o presente momento também não existem publicações que relatem a inibição do fungo. O presente trabalho, portanto, se torna o primeiro relato de microrganismos dos gêneros *Burkholderia*, *Brevundimonas*, *Comamonas*, *Dyella*, *Kurthia* e *Niabella* com atividade anti-*Bd*.

Todos os isolados testados do gênero *Pseudomonas* apresentaram algum efeito inibitório, principalmente as cepas L31 ($I = 1,52$), L52 ($I = 1,22$), L51 ($I = 0,97$), L28 ($I = 0,86$), L49 ($I = 0,83$), P23 ($I = 0,95$), P36 ($I = 0,92$), P137 ($I = 0,84$), P119 ($I = 0,79$), que

exibiram inibição forte. O primeiro ensaio de inibição de *B. dendrobatidis*, em placa, realizado por Harris e colaboradores em 2006, já havia demonstrado a atividade anti-*Bd* por cepas do gênero, que hoje é amplamente relatada na literatura (Harris *et al.*, 2006; Myers *et al.*, 2012; Bell *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2014; Yasumiba *et al.*, 2015; Madison *et al.*, 2017; Brooks *et al.*, 2023; Geiser *et al.*, 2024; González-Serrano *et al.*, 2025). Esta pesquisa, no entanto, apresenta um dos primeiros registros de inibição de *Bd* por isolados bacterianos do gênero obtidos a partir de ninhos de espuma.

Os dois isolados de *Stenotrophomonas* testados neste estudo apresentaram atividade anti-*Bd* (A2 - I = 1,05; P16 - I = 0,88). Na literatura, o gênero já é relatado como inibidor do crescimento do patógeno (Harris *et al.*, 2015; Muletz-Wolz *et al.*, 2017; Abarca *et al.*, 2021). Nava-González e colaboradores (2021) investigaram inibição de *Bd* em populações de vida selvagem do sapo *Lithobates spectabilis* e da salamandra *Ambystoma rivulare*. No trabalho, cerca de 80% dos indivíduos testaram positivo para infecção por quitridiomiose, contudo nenhum indivíduo morto ou visivelmente doente foi registrado. Os autores argumentaram que a riqueza bacteriana e abundância relativa de microrganismos inibidores de *Bd* presentes na microbiota desses anfíbios estavam relacionadas de forma negativa à intensidade da infecção pelo fungo. Dentre os gêneros microbianos mais abundantes encontrados nessas populações, destacaram *Pseudomonas* e *Stenotrophomonas*.

Os quatro isolados do gênero *Chryseobacterium* testados neste trabalho também apresentaram todos inibição forte (L15 - I = 1,41; L14 - I = 1,0; P3 - I = 0,82; A1 - I = 0,94). Bactérias do gênero isoladas da pele de anfíbios já haviam sido registradas com atividade de inibição do patógeno (Antwis *et al.*, 2015; Yasumiba *et al.*, 2015; Cárdenas *et al.*, 2017; Abarca *et al.*, 2021), e mais recentemente, uma cepa de *Chryseobacterium* foi incluída em um consórcio microbiano experimental introduzido em uma população de anfíbios (Becker *et al.*, 2021). Embora esse tratamento não tenha reduzido significativamente a infecção por *Bd*, o estudo reforça o potencial probiótico do gênero.

Outro gênero que se destacou neste estudo foi *Microbacterium*. Sua capacidade de inibir o *Bd* já havia sido relatada anteriormente (Madison *et al.*, 2017; Abarca *et al.*, 2021; Wax *et al.*, 2023). Wax e colaboradores (2023) testaram 4 bactérias do gênero, das quais metade apresentou algum grau de inibição, trazendo à tona o debate sobre a relação da variação genética na capacidade de inibir o crescimento do fungo quitrídio. Neste trabalho, os dois isolados de *Microbacterium* (L17 - I = 1,39; L6 - I = 0,86) inibiram fortemente o crescimento do fungo quitrídio, e se mostram como candidatos promissores a potenciais probióticos.

Todos os isolados de *Bacillus* inibiram fortemente *Bd* (B3 – I = 1,07; A9 – I = 0,98; A8 – I = 0,96; A3 – I = 0,90). Espécies do gênero são relatadas por possuírem atividade de inibição do fungo *in vitro* (Harris *et al.*, 2006; Loundon *et al.*, 2014; Abarca *et al.*, 2021; González-Serrano *et al.*, 2025). Kloser, Stockton e Weeks (2024) relataram que compostos orgânicos voláteis da bactéria de solo *Bacillus thuringiensis* inibiram o crescimento de *Bd* enquanto metabólitos secundários levaram à facilitação do crescimento do fungo, ressaltando que a inibição e facilitação podem ocorrer por um mesmo microrganismo, a depender das condições. Nas condições estabelecidas, as respostas dos isolados neste estudo nos testes foram semelhantes entre si, com nenhuma apresentando facilitação.

Os dois isolados do gênero *Serratia* apresentaram inibição forte (P2 – I = 0,94; A10 – I = 0,88). Espécies do gênero são documentadas pela atividade anti-*Bd* (Antwis *et al.*, 2015; Abarca *et al.*, 2021). Madison e colaboradores (2017) realizaram o sequenciamento do transcriptoma de duas cepas de *Serratia marcescens* com forte inibição para o fungo, e discutiram sobre a possível utilização de mutantes em ensaios de bioaumentação como estratégia de remediação. Novos estudos ainda devem ser realizados, principalmente *in situ* para entender quais seriam as consequências. Este estudo registrou, então, primeiros registros de inibição de *Bd* por isolados bacterianos do gênero obtidos a partir de ninhos de espuma.

Um isolado do gênero *Enterobacter* apresentou inibição forte (B1 – I: 1,02). Embora existam registros para a atividade anti *Bd* do gênero em ensaios iniciais de *screening* (Abarca *et al.*, 2021; González-Serrano *et al.*, 2025), o conhecimento ainda não é tão difundido quanto em outros gêneros citados acima. Novas investigações, inclusive com a cepa abordada neste trabalho, devem ainda ser realizadas.

Também foi obtido inibição forte para um isolado do gênero *Streptomyces* (L32 – I = 0,83) nos ensaios. Bactérias desse gênero são conhecidas pela produção de metabólitos antimicrobianos variados, como antibióticos, antifúngicos, fitopatógenos (Procópio *et al.*, 2012), além de também conseguirem inibir o crescimento do *Bd* (Harris *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2014; Mutnale, Reddy & Vasudevan, 2020; Abarca *et al.*, 2021). Por exemplo, a espécie *Streptomyces tendae* produz o antifúngico nicomicina Z (Möhrle *et al.*, 1995), que interage com peptídeos da pele de anfíbios para inibir o *Bd* (Holden *et al.*, 2014).

Para o gênero *Lysinibacillus*, até o momento só existe uma publicação que relata inibição para *B. dendrobatidis* (Madison *et al.*, 2017). Em nossos ensaios, um isolado do gênero (B2 – I = 1,03) inibiu fortemente o patógeno. Esse resultado é um dos primeiros registros de atividade anti-*Bd* em *Lysinibacillus*.

Também foi encontrada uma cepa de *Pedobacter* com capacidade anti-*Bd*. O isolado

apresentou grau moderado de inibição ($I = 0,72$). Estudos anteriores já haviam verificado a atividade inibitória de isolados do gênero em relação a inibição do fungo (Harris *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2013; Wax *et al.*, 2023).

Alguns isolados também inibiram o patógeno nos ensaios (B5 – $I = 1,03$; P13 – $I = 0,99$; P11 – $I = 0,99$; A11 – $I = 0,94$; P17 – $I = 0,72$), mas não estão identificados. Os próximos passos para esses microrganismos são a identificação, pelo menos, a nível de gênero.

A utilização do método de Bell e colaboradores (2013) no lugar do método qualitativo de Harris e colaboradores (2006) se dá principalmente pelo maior controle dos resultados, através da quantificação dos efeitos inibitórios. No entanto, os resultados apresentam algumas limitações que podem ser superadas em próximos estudos. Por exemplo, a técnica abordada não forneceu informações acerca de competição direta por espaço e recursos pelo microrganismo e patógeno (discutido em Antwis *et al.*, 2015), o que poderia ser possível de visualizar em ensaios em meio sólido.

Como o principal objetivo desta etapa do estudo foi realizar um *screening* inicial da coleção microbiana dos ninhos de espumas, foi empregada exclusivamente a técnica semiquantitativa, por ser a mais utilizada hoje para se avaliar inicialmente o potencial probiótico de uma coleção de microrganismos. Em futuros trabalhos, recomenda-se o uso das duas abordagens de forma a complementar as limitações das duas técnicas.

Finalmente, a taxa superior a 70% de inibição forte do *Bd* reafirma a relevância dessa investigação e reforça a originalidade do estudo. Diante do exposto, é possível afirmar que os microrganismos avaliados neste trabalho mostram potencial como possíveis probióticos na remediação à quitridiomiose. Os próximos passos envolvem a construção de consórcios microbianos, tendo em visto que a utilização de vários microrganismos pode reduzir a abundância de *Bd* no hospedeiro de forma mais eficaz (Piovia-Scott *et al.*, 2017). Além disso, estudos que testem o efeito dessas bactérias contra o crescimento de *B. dendrobatidis in vivo* ainda precisam ser realizados para elucidar questões inerentes aos critérios de probióticos eficazes (verificar Bletz *et al.*, 2013), como a capacidade de colonização da pele e a redução da carga de infecção.

7 CONCLUSÃO

O estudo apresenta atualizações sobre o panorama de distribuição geográfica do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* no estado do Ceará, a partir da detecção do patógeno em seis populações de anuros. Além disso, também mostra que os ninhos de espuma de *Leptodactylus vastus*, *Physalaemus cuvieri* e *Adenomera hylaedactyla* são fontes promissoras na busca por probióticos que podem ser empregados na remediação da quitridiomicose, como bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Chryseobacterium*, *Microbacterium*, *Streptomyces*, *Serratia*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Brevundimonas*, *Comamonas*, *Dyella*, *Kurthia* e *Niabella*. Este estudo ressalta a importância e a relevância de aprofundar o conhecimento sobre a quitridiomicose na região e estratégias de remediação, principalmente quando a doença é a principal causa do declínio de populações de anfíbios no mundo.

REFERÊNCIAS

- ABARCA, J. G. *et al.* Assessment of bacterial communities associated with the skin of Costa Rican amphibians at La Selva Biological Station. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, art. 2001, 2018a.
- ABARCA, J. G. *et al.* Characterization of the skin microbiota of the cane toad *Rhinella cf. marina* in Puerto Rico and Costa Rica. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, art. 2624, 2018b.
- ABARCA, J. G. *et al.* Genotyping and differential bacterial inhibition of *Batrachochytrium dendrobatidis* in threatened amphibians in Costa Rica. **Microbiology**, v. 167, n. 3, 1 mar. 2021.
- ALFORD, R. A.; RICHARDS, S. J. Global Amphibian Declines: A Problem in Applied Ecology. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 30, p. 133–165, 1999.
- ALFORD, R. A.; DIXON, P. M.; PECHMANN, J. H. K. Global amphibian population declines. **Nature**, v. 412, n. 6846, p. 499–500, ago. 2001.
- AMORIM, F. O. *et al.* New records of *Batrachochytrium dendrobatidis* in the state of Bahia, Brazil: histological analysis in anuran amphibian collections. **Diseases of Aquatic organisms**, v. 136, n. 2, p. 147-155, 2019.
- AmphibiaWeb. *Boana raniceps*. Disponível em: <<https://amphibiaweb.org/species/928>>. Acesso em: 9 jan. 2026.
- AmphibiaWeb. *Odontophrynus carvalhoi*. Disponível em: <<http://amphibiaweb.org/species/5608>>. Acesso em: 9 jan. 2026.
- AmphibiaWeb. *Proceratophrys cristiceps*. Disponível em: <<https://amphibiaweb.org/species/5622>>. Acesso em: 9 jan. 2026.
- AmphibiaWeb. *Rhinella dapsilis*. Disponível em: <<https://amphibiaweb.org/species/158>>. Acesso em: 8 jan. 2026.
- ANNIS, S. L. *et al.* A DNA-based assay identifies *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 40, n. 3, p. 420-428, 2004.
- ANTWIS, R. E. *et al.* Amphibian symbiotic bacteria do not show a universal ability to inhibit growth of the global panzootic lineage of *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 11, p. 3706-3711, 2015.
- BARINAGA, M. Where have all the froggies gone? **Science**, v. 247, n. 4946, p. 1033–1034, 2 mar. 1990.
- BARR, D. J. S. Chytridiomycota. In: **Systematics and evolution: Part A**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2001. p. 93-112.
- BECKER, C. G. *et al.* Variation in phenotype and virulence among enzootic and panzootic amphibian chytrid lineages. **Fungal Ecology**, v. 26, p. 45-50, 2017.

- BECKER, M. H. *et al.* Genetically modifying skin microbe to produce violacein and augmenting microbiome did not defend Panamanian golden frogs from disease. **ISME Communications**, v. 1, n. 1, 18 out. 2021.
- BELL, S. C. *et al.* Screening bacterial metabolites for inhibitory effects against *Batrachochytrium dendrobatidis* using a spectrophotometric assay. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 103, n. 1, p. 77-85, 2013.
- BENÍCIO, R. A. *et al.* Worrying news for Brazilian Caatinga: prevalence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians. **Tropical Conservation Science**, v. 12, p. 1940082919892626, 2019.
- BERGER, L. *et al.* Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 15, p. 9031-9036, 1998.
- BERGER, L. *et al.* Life cycle stages of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Diseases of aquatic organisms**, v. 68, n. 1, p. 51-63, 2005.
- BLAUSTEIN, A. R. Chicken little or nero's fiddle? A perspective on declining amphibian populations. **Herpetologica**, v. 50, n. 1, p. 85-97, 1994.
- BLETZ, M. C. *et al.* Mitigating amphibian chytridiomycosis with bioaugmentation: characteristics of effective probiotics and strategies for their selection and use. **Ecology Letters**, v. 16, n. 6, p. 807 - 820, 3 mar. 2013.
- BOSCH, J.; MARTÍNEZ-SOLANO, I. Chytrid fungus infection related to unusual mortalities of *Salamandra salamandra* and *Bufo bufo* in the Penalara Natural Park, Spain. **Oryx**, v. 40, n. 1, p. 84-89, 2006.
- BOSCH, J.; MARTÍNEZ-SOLANO, I.; GARCÍA-PARÍS, M. Evidence of a chytrid fungus infection involved in the decline of the common midwife toad (*Alytes obstetricans*) in protected areas of central Spain. **Biological conservation**, v. 97, n. 3, p. 331-337, 2001.
- BOWERMAN, J. *et al.* Terbinafine hydrochloride in ethanol effectively clears *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians. **Journal of Herpetological Medicine and Surgery**, v. 20, n. 1, p. 24-28, 2010.
- BOYLE, AD H. DG *et al.* Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Diseases of aquatic organisms**, v. 73, n. 3, p. 175-192, 2007.
- BOYLE, D. G. *et al.* Cryo-archiving of *Batrachochytrium dendrobatidis* and other chytridiomycetes. **Diseases of aquatic organisms**, v. 56, n. 1, p. 59-64, 2003.
- BOYLE, D. G. *et al.* Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. **Diseases of aquatic organisms**, v. 60, n. 2, p. 141-148, 2004.

- BRADLEY, G. A. *et al.* Chytridiomycosis in native Arizona frogs. **The Journal of Wildlife Diseases**, v. 38, n. 1, p. 206-212, 2002.
- BROOKS, J. M.; SISSON, A. E.; BAKER, M. A. Bacteria from the skin of salamanders inhibit *Batrachochytrium dendrobatidis*. **BIOS**, v. 94, n. 3, 27 out. 2023.
- BYRNE, A. Q. *et al.* Cryptic diversity of a widespread global pathogen reveals expanded threats to amphibian conservation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 41, p. 20382-20387, 2019.
- CARVALHO, T.; BECKER, C. G.; TOLEDO, L. F. Historical amphibian declines and extinctions in Brazil linked to chytridiomycosis. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 284, n. 1848, p. 20162254, 8 fev. 2017.
- CAREY, C.; ALEXANDER, M. A. Climate change and amphibian declines: is there a link? **Diversity Distributions**, v. 9, n. 2, p. 111–121, mar. 2003.
- CASTRO MONZON, F.; RÖDEL, M.-O.; JESCHKE, J. M. Tracking *Batrachochytrium dendrobatidis* infection across the globe. **EcoHealth**, v. 17, 17 nov. 2020.
- CASTRO, Z. *et al.* Pioneer access of the foam nest bacterial community of Leptodactylidae frogs and its biotechnological potential. **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, 1 jan. 2024.
- COOPER, A. *et al.* Adsorption of frog foam nest proteins at the air-water interface. **Biophysical journal**, v. 88, n. 3, p. 2114-2125, 2005.
- CORNELL WILDLIFE HEALTH LAB. **Chytridiomycosis**. Disponível em: <<https://cwhl.vet.cornell.edu/disease/chytridiomycosis>>. Acesso em: 8 jan. 2026
- COUTINHO, S. D. *et al.* The use of singleplex and nested PCR to detect *Batrachochytrium dendrobatidis* in free-living frogs. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 551 – 555, 1 jun. 2015.
- CRAWFORD-ASH, J. *et al.* Evolution of research on global amphibian declines. **Conservation Biology**, p. e70146, 2025.
- CRUMP, M. L. Anuran reproductive modes: evolving perspectives. **Journal of Herpetology**, v. 49, n. 1, p. 1-16, 2015.
- DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A. A.; HYATT, A. D. Infectious disease and amphibian population declines. **Diversity Distributions**, v. 9, n. 2, p. 141 – 150, mar. 2003.
- DE LIMA PROCÓPIO, R. E. *et al.* Antibiotics produced by *Streptomyces*. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 16, n. 5, p. 466–471, set. 2012.
- DOS SANTOS, P. *et al.* Occurrences of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Pernambuco state, Brazil, with the inclusion of two new cases of infection from the Caatinga. **North-Western Journal of Zoology**, v. 20, n. 1, 2024.

- ERNETTI, J. R. *et al.* Chytrid fungus in threatened Brazilian amphibians: A focus on island populations. **Journal for Nature Conservation**, p. 126996, 2025.
- FARRER, R. A. *et al.* Multiple emergences of genetically diverse amphibian-infecting chytrids include a globalized hypervirulent recombinant lineage. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 46, p. 18732-18736, 2011.
- FISCHER, E. K. Form, function, foam: evolutionary ecology of anuran nests and nesting behaviour. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 378, n. 1884, p. 20220141, 2023.
- 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, 2009.
- FROST, D. R. *et al.* The amphibian tree of life. **Bulletin of the American Museum of natural History**, v. 2006, n. 297, p. 1-291, 2006.
- GAERTNER, J. P. *et al.* Detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* in endemic salamander species from Central Texas. **EcoHealth**, v. 6, n. 1, p. 20-26, 2009.
- GARNER, T. WJ *et al.* The emerging amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* globally infects introduced populations of the North American bullfrog, *Rana catesbeiana*. **Biology letters**, v. 2, n. 3, p. 455-459, 2006.
- GEISER, V.-P. *et al.* Effects of symbiotic bacteria in pathogenic interactions: the case of *Batrachochytrium dendrobatidis* and *Pseudomonas sp.* in amphibian populations. **Journal of Biological Systems**, v. 32, n. 04, p. 1289–1317, 20 jul. 2024.
- GONZÁLEZ-SERRANO, F. *et al.* Amphibian skin bacteria contain a wide repertoire of genes linked to their antifungal capacities. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 3, 27 fev. 2025.
- GREEN, D. E.; CONVERSE, K. A.; SCHRADER, A. K. Epizootiology of sixty-four amphibian morbidity and mortality events in the USA, 1996-2001. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 969, n. 1, p. 323-339, 2002.
- GREENSPAN, S. E. *et al.* Hybrids of amphibian chytrid show high virulence in native hosts. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 9600, 2018.
- HARRIS, R. N. *et al.* Amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* is inhibited by the cutaneous bacteria of amphibian species. **EcoHealth**, v. 3, n. 1, p. 53-56, 2006.
- HARRIS, R. N. *et al.* Skin microbes on frogs prevent morbidity and mortality caused by a lethal skin fungus. **The ISME journal**, v. 3, n. 7, p. 818-824, 2009.
- HISSA, D. C. *et al.* Frog foam nest protein diversity and synthesis. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology**, v. 325, n. 7, p. 425-433, 2016.
- HISSA, D. C. *et al.* Novel surfactant proteins are involved in the structure and stability of

- foam nests from the frog *Leptodactylus vastus*. **Journal of Experimental Biology**, v. 211, n. 16, p. 2707-2711, 2008.
- HISSA, D. C. *et al.* Novel surfactant proteins are involved in the structure and stability of foam nests from the frog *Leptodactylus vastus*. **Journal of Experimental Biology**, v. 211, n. 16, p. 2707-2711, 2008.
- HOOGMOED, M.; BORGES, D.; CASCON, P. Three new species of the genus *Adelophryne* (Amphibia: Anura: Leptodactylidae) from northeastern Brazil, with remarks on the other species of the genus. **Zoologische Mededelingen**, v. 68, n. 24, [s.d.].
- HOLDEN, W. M. *et al.* Nikkomycin Z is an effective inhibitor of the chytrid fungus linked to global amphibian declines. **Fungal Biology**, v. 118, n. 1, p. 48–60, jan. 2014.
- HOULAHAN, JEFF. E. *et al.* Quantitative evidence for global amphibian population declines. **Nature**, v. 404, n. 6779, p. 752–755, abr. 2000.
- IUCN. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2025-2.
<<https://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 13 jan. 2026
- JENKINSON, T. S. *et al.* Amphibian - killing chytrid in Brazil comprises both locally endemic and globally expanding populations. **Molecular Ecology**, v. 25, n. 13, p. 2978 – 2996, 1 jul. 2016.
- KNAPP, R. A. *et al.* Effectiveness of antifungal treatments during chytridiomycosis epizootics in populations of an endangered frog. **PeerJ**, v. 10, p. e12712, 5 jan. 2022.
- LAMBERTINI, C. *et al.* Diagnóstico do fungo Quitrídio: *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Herpetol Bras**, v. 2, p. 12-17, 2013.
- LONGCORE, J. E.; PESSIER, A. P.; NICHOLS, D. K. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. **Mycologia**, v. 91, n. 2, p. 219-227, 1999.
- LOUDON, A. H. *et al.* Interactions between amphibians' symbiotic bacteria cause the production of emergent anti-fungal metabolites. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, 21 ago. 2014.
- MADISON, J. D. *et al.* Characterization of *Batrachochytrium dendrobatidis* inhibiting bacteria from amphibian populations in Costa Rica. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 290, 2017.
- MARTEL, A. *et al.* Developing a safe antifungal treatment protocol to eliminate *Batrachochytrium dendrobatidis* from amphibians. **Medical Mycology**, v. 49, n. 2, p. 143–149, fev. 2011.
- MARTEL, A. *et al.* *Batrachochytrium salamandrivorans* sp. nov. causes lethal chytridiomycosis in amphibians. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 38, p. 15325-15329, 2013.

- MCGRATH-BLASER, S. *et al.* Early life skin microbial trajectory as a function of vertical and environmental transmission in Bornean foam-nesting frogs. **Animal microbiome**, v. 3, n. 1, p. 83, 2021.
- MCKINDLES, K. M. *et al.* Isolation and characterization of Rhizophydiales (Chytridiomycota), obligate parasites of *Planktothrix agardhii* in a Laurentian Great Lakes embayment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 87, n. 4, p. e02308-20, 2021.
- MEDINA, E. M.; BUCHLER, N. E. Chytrid fungi. **Current Biology**, v. 30, n. 10, p. R516-R520, 2020.
- MÖHRLE, V.; ROOS, U.; BORMANN, C. Identification of cellular proteins involved in nikkomycin production in *Streptomyces tendae* Tü901. **Molecular Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 561–571, fev. 1995.
- MONTEIRO, F. A. C. *et al.* Neotropical frog foam nest's microbiomes. **Microorganisms**, v. 11, n. 4, p. 900, 1 abr. 2023.
- MUIJSERS, M. *et al.* Antibacterial therapeutics for the treatment of chytrid infection in amphibians: Columbus's egg?. **BMC Veterinary Research**, v. 8, n. 1, p. 175, 2012.
- MULETZ-WOLZ, C. R. *et al.* Inhibition of fungal pathogens across genotypes and temperatures by amphibian skin bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 21 ago. 2017.
- MULETZ, C. R. *et al.* Soil bioaugmentation with amphibian cutaneous bacteria protects amphibian hosts from infection by *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Biological Conservation**, v. 152, p. 119-126, 2012.
- MUTNALE, M. C.; REDDY, G. S.; VASUDEVAN, K. Bacterial community in the skin microbiome of frogs in a coldspot of chytridiomycosis infection. **Microbial Ecology**, 13 jan. 2021.
- MYERS, J. M. *et al.* Synergistic inhibition of the lethal fungal pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*: the combined effect of symbiotic bacterial metabolites and antimicrobial peptides of the frog *Rana muscosa*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 38, n. 8, p. 958–965, ago. 2012.
- NAVA-GONZÁLEZ, B. *et al.* Inhibition of *Batrachochytrium dendrobatidis* infection by skin bacterial communities in wild amphibian populations. **Microbial ecology**, v. 82, n. 3, p. 666-676, 2021.
- NGUYEN, T. T. *et al.* Exploring diversity within chytridiales and rhizophydiales (Chytridiomycota) in Korea. **Mycobiology**, v. 53, n. 1, p. 27-35, 2025.
- NUNES-DE-ALMEIDA, C. H. L.; HADDAD, C. F. B.; TOLEDO, L. F.. A revised classification of the amphibian reproductive modes. *Salamandra*, v. 57, n. 3, p. 413-427, 2021.
- O'HANLON, S. J. *et al.* Recent Asian origin of chytrid fungi causing global amphibian declines. **Science**, v. 360, n. 6389, p. 621-627, 2018.

PARK, S. T. *et al.* Inhibition of *Batrachochytrium dendrobatidis* caused by bacteria isolated from the skin of boreal toads, *Anaxyrus (Bufo) boreas boreas*, from Grand Teton National Park, Wyoming, USA. **Microbiology Insights**, v. 7, p. MBI. S13639, 2014.

PECHMANN J. H. K.; WILBUR, H. M. Putting declining amphibian populations in perspective: natural fluctuations and human impacts. **Herpetologica**, v. 50, n. 1, p. 65–84, 1994.

PUSCHENDORF, R.; BOLAÑOS, F.; CHAVES, G. The amphibian chytrid fungus along an altitudinal transect before the first reported declines in Costa Rica. **Biological Conservation**, v. 132, n. 1, p. 136–142, set. 2006.

PROSTAK, S. M.; FRITZ-LAYLIN, L. K. Laboratory maintenance of the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Current Protocols**, v. 1, n. 12, p. e309, 2021.

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

RENDLE, M. E. *et al.* Itraconazole treatment of *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) infection in captive caecilians (Amphibia: Gymnophiona) and the first case of *Bd* in a wild neotropical caecilian. **Journal of Zoo and Aquarium Research**, v. 3, n. 4, p. 137-140, 2015.

RODRIGUEZ, D. *et al.* Long-term endemism of two highly divergent lineages of the amphibian-killing fungus in the Atlantic Forest of Brazil. **Molecular Ecology**, v. 23, n. 4, p. 774 – 787, 29 jan. 2014.

RUGGERI, J. *et al.* Amphibian chytrid infection is influenced by rainfall seasonality and water availability. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 127, n. 2, p. 107 – 115, 31 jan. 2018.

RUGGERI, J.; TOLEDO, L. F.; POTSCHE, S. Stream tadpoles present high prevalence but low infection loads of *Batrachochytrium dendrobatidis* (Chytridiomycota). **Hydrobiologia**, v. 806, p. 303–311, 1 set. 2017.

SALLA, R. F. *et al.* Novel findings on the impact of chytridiomycosis on the cardiac function of anurans: sensitive vs. tolerant species. **PeerJ**, v. 6, p. e5891, 2018.

SIME-NGANDO, T. Phytoplankton chytridiomycosis: fungal parasites of phytoplankton and their imprints on the food web dynamics. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 361, 2012.

SKERRATT, L. F. *et al.* Spread of chytridiomycosis has caused the rapid global decline and extinction of frogs. **EcoHealth**, v. 4, n. 2, p. 125-134, 2007.

STUART, S. N. *et al.* Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. **Science**, v. 306, n. 5702, p. 1783 – 1786, 14 out. 2004.

SUN, D. *et al.* Associations of *Batrachochytrium dendrobatidis* with skin bacteria and fungi on Asian amphibian hosts. **ISME Communications**, v. 3, n. 1, p. 1–10, 22 nov. 2023.

- VALENCIA-AGUILAR, A. *et al.* Chytrid fungus acts as a generalist pathogen infecting species-rich amphibian families in Brazilian rainforests. **Diseases of aquatic organisms**, v. 114, n. 1, p. 61-67, 2015.
- VASCONCELOS, B. *et al.* New records of *Boana raniceps* (Cope, 1862) (Anura, Hylidae) in Distrito Federal, Central Brazil:: evidence of recent distribution expansion?. **Heringeriana**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. e917969, 2022.
- VOSENBERG, BART. T. L. H. *et al.* *Synchytrium endobioticum*, the potato wart disease pathogen. **Molecular Plant Pathology**, v. 23, n. 4, p. 461–474, 14 jan. 2022.
- VIEIRA, C. A. *et al.* First record of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Paraná, Brazil. **Herpetological Review**, v. 43, n. 1, p. 93, 2012.
- VOYLES, J. *et al.* Pathogenesis of chytridiomycosis, a cause of catastrophic amphibian declines. **Science**, v. 326, n. 5952, p. 582-585, 2009.
- WAX, N. *et al.* Comparative genomics of bacteria from amphibian skin associated with inhibition of an amphibian fungal pathogen, *Batrachochytrium dendrobatidis*. **PeerJ**, v. 11, p. e15714, 2023.
- WEBB, Rebecca. Culture methods for *Bd*. School of Public Health, Tropical Medicine and Rehabilitation Sciences, James Cook University, June 2010. Disponível em: <<https://arwh.org/wp-content/uploads/2021/03/Attachment-2-Culture-Methods-for-Bd.pdf>>.
- WOODHAMS, D. C. *et al.* Mitigating amphibian disease: strategies to maintain wild populations and control chytridiomycosis. **Frontiers in zoology**, v. 8, n. 1, p. 8, 2011.
- YASUMIBA, K.; BELL, S.; ALFORD, R. Cell density effects of frog skin bacteria on their capacity to inhibit growth of the chytrid fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Microbial Ecology**, v. 71, n. 1, p. 124–130, 12 nov. 2015.
- ZIMMERMAN, B. L.; BOGART, J. P. Ecology and calls of four species of Amazonian forest frogs. **Journal of Herpetology**, v. 22, n. 1, p. 97–108, 1988.
- ZINA, J. *et al.* The recognition of *Dendropsophus minusculus* () (Hylidae, Dendropsophini) as a highly polymorphic, multi-domain distributed species. **Brazilian Journal of Biology**, v. 74, n. 3 suppl 1, p. S146–S153, 1 ago. 2014.