

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

Julia Ienes Lima

**DIVERSIDADE BACTERIANA CULTIVÁVEL DO SAPINHO-ADMIRÁVEL-DA-
BARRIGA-VERMELHA, *Melanophryniscus admirabilis*: ASPECTOS
ECOLÓGICOS DA RELAÇÃO BACTÉRIA-HOSPEDEIRO**

Porto Alegre

2021

Julia Ienes Lima

DIVERSIDADE BACTERIANA CULTIVÁVEL DO SAPINHO-ADMIRÁVEL-DA-BARRIGA-VERMELHA, *Melanophryniscus admirabilis*: ASPECTOS ECOLÓGICOS DA RELAÇÃO BACTÉRIA-HOSPEDEIRO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestra em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Guedes Frazzon

Porto Alegre

2021

CIP - Catalogação na Publicação

Lima, Julia Ienes
Diversidade bacteriana cultivável do
sapinho-admirável-da-barriga-vermelha,
Melanophryniscus admirabilis: aspectos ecológicos da
relação bactéria-hospedeiro / Julia Ienes Lima. --
2021.
104 f.
Orientadora: Ana Paula Guedes Frazzon.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. *Melanophryniscus admirabilis*. 2. Diversidade
bacteriana. 3. Resistência antimicrobiana. 4.
Conservação. 5. Interação bactéria-hospedeiro. I.
Frazzon, Ana Paula Guedes, orient. II. Título.

*“Nothing in Biology makes sense,
except in the light of Evolution.”*

Theodosius Dobzhansky

Agradecimentos

À minha mãe, Angela Ienes, por sempre estar ao meu lado, por ser minha maior incentivadora, melhor amiga e meu porto seguro. Ao meu pai, Adriano Lima, meu mano João Vitor Lima, e à toda minha família, por todo amor, apoio, torcida e compreensão pelos momentos de ausência. Amo muito vocês!

À minha orientadora, Ana Paula Guedes Frazzon, por todo suporte, carinho, compreensão e conhecimento compartilhado; por ser muito mais do que orientadora, és uma amiga, uma segunda mãe, e uma inspiração. Obrigada por ter embarcado comigo em mais uma jornada, é uma honra estar trilhando este caminho ao teu lado.

Ao Professor Márcio Borges Martins, por ter aceito embarcar novamente nesta jornada microbiológica, por todo conhecimento compartilhado e atenção que me foi dada. Com certeza, teu apoio e entusiasmo foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao Matheus Coutinho por ser meu parceiro, apoiar minhas escolhas e, sempre me incentivar a voar cada vez mais alto. Obrigada pela companhia na caminhada que estamos percorrendo juntos, com certeza em breve alcançaremos os objetivos que almejamos.

Aos meus amigos e amigas, por compreenderem minhas ausências devido a correria do mestrado, e por mesmo assim continuarem ao meu lado. À Gabriela Wachholz, um agradecimento especial, por sempre se fazer presente, mesmo quando está do outro lado do Oceano.

A todos do Laboratório 222C, que muito me auxiliaram na realização deste trabalho, e em especial, à Luana Dornelles, Juliana Heck, Débora Buzatto, e principalmente, à Rosana Huff, que desde meu TCC têm sido uma verdadeira anja, compartilhando comigo tanto conhecimento, alto astral e autoclaves. A companhia de vocês, foi essencial para manter a alegria nos dias difíceis (e pandêmicos).

Muito obrigada às gurias do Laboratório de Herpetologia, Michele Abadie, Débora Bordignon e Luisa, e ao Pedro Thomas, que me acompanharam em campo, me ensinaram a metodologia de busca e captura e fizeram uma ótima companhia na viagem. O apoio de vocês foi fundamental para a realização deste trabalho.

A Profª Drª Selene Coutinho pela grande contribuição para a realização deste trabalho.
O material fornecido foi de grande ajuda, e muito bem utilizado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa, sem a qual não seria possível realizar este estudo.

DIVERSIDADE BACTERIANA CULTIVÁVEL DO SAPINHO-ADMIRÁVEL-DA-BARRIGA-VERMELHA, *Melanophryniscus admirabilis*: ASPECTOS ECOLÓGICOS DA RELAÇÃO BACTÉRIA-HOSPEDEIRO

Autora: Julia Ienes Lima¹

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Guedes Frazzon

A microbiota de um hospedeiro tem sido considerada como parte de seu sistema imune inato. Em anuros, a microbiota da superfície cutânea vem sendo bastante investigada, visto que está na linha de frente no combate contra potenciais patógenos, principalmente contra o fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), responsável pela doença quitridiomíose, a qual tem causado o declínio populacional de diversas espécies de anuros no mundo todo. *Melanophryniscus admirabilis* é um anuro micro-endêmico da região sul do Brasil, a qual está próxima de diversas ameaças ao habitat, tais como plantações de eucaliptos, fumo, soja e pecuária. A espécie está classificada como Criticamente em Perigo (CR) de extinção de acordo com o ICMBIO e a IUCN, e o conhecimento acerca de sua microbiota ainda é escasso. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivos: (i) identificar, por meio das técnicas de MALDI-TOF e sequenciamento parcial do gene *16S rRNA* a comunidade bacteriana cultivável presente na epiderme, cavidade oral, e fezes de 15 indivíduos de *M. admirabilis*; (ii) analisar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados obtidos, e (iii) detectar a presença do fungo *Bd* por *nested-PCR*. Após realização da coleta de material biológico e características morfológicas, os animais foram soltos no local de captura. Foram identificados 173 isolados bacterianos, dos quais as espécies mais abundantes foram *Bacillus* sp., *Serratia* sp., *Hafnia alvei*, *Citrobacter* sp. e *Enterobacter* sp. Perfis de multirresistência aos antimicrobianos foram observados em 21% dos isolados da ordem Enterobacterales, havendo alta frequência de resistência a ampicilina, enquanto que somente 5% foram suscetíveis a todos os antimicrobianos testados. A presença do fungo *Bd* não foi detectada em nenhum dos indivíduos analisados. Alguns dos microrganismos identificados são capazes de produzir substâncias com atividade contra o fungo *Bd*, além de serem potenciais microrganismos patogênicos para humanos, e apresentarem potencial zoonótico. Muitos estão diretamente relacionados com a dieta desses animais, bem como seu habitat. É possível que as bactérias identificadas nos animais analisados tenham um papel importante na manutenção dessa espécie em um ambiente modulado por ações antrópicas desenvolvidas na região, como por exemplo, o uso de herbicidas, agentes promotores de crescimento animal, e uso de antimicrobianos como tratamento profilático em criações de gado, suínos e aves. Diante disso, a conscientização sobre a preservação do habitat desses animais, é essencial para a conservação do sapinho-admirável-da-barriga-vermelha, além de evitar possíveis casos de zoonoses para humanos e, portanto, novas epidemias e pandemias.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (104 p.) Agosto, 2021.

CULTIVABLE BACTERIAL DIVERSITY OF ADMIRABLE-RED-BELLY-TOADS *Melanophryniscus admirabilis*: ECOLOGY ASPECTS OF HOST-BACTERIA INTERACTIONS

Author: Julia Ines Lima¹

Adviser: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Guedes Frazzon

In recent years, the host microbiota has been considered as part of its innate immune system. In anurans, the skin surface microbiota has been extensively investigated, given that it is the front line of combat against potential pathogens, primarily against the fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), responsible for the chytridiomycosis disease, that has caused the population decline of several species of anurans worldwide. *Melanophryniscus admirabilis* is a microendemic anuran from southern Brazil, which is close to several threats to the habitat, such as eucalyptus, tobacco, soy, and livestock plantations. The species is classified as Critically Endangered according to ICMBio and IUCN, and knowledge about your microbiota is still scarce. Thus, the present study has the aim: (i) to identify, through MALDI-TOF and 16S *rRNA* partial gene sequencing, the cultivable bacterial community present in the oral cavity, epidermis, and feces of 15 *M. admirabilis* individuals; (ii) to analyze the antimicrobial susceptibility profile of the isolates, and (iii) to detect the presence of *Bd* fungus by nested-PCR in the samples. The animals were released at the place of capture after carrying out the biological samples collection and morphological data. 173 bacterial isolates were identified, which the most abundant species were *Bacillus* sp., *Serratia* sp., *Hafnia alvei*, *Citrobacter* sp. e *Enterobacter* sp. Multidrug-resistance profile was observed in 21% of Enterobacteriales order, with a great abundance of ampicillin resistance, therefore, only 5% were susceptible to all antimicrobials tested. The presence of the *Bd* fungus was not detected in any of the analyzed individuals. Some of the microorganisms identified are capable of producing substances with activity against the *Bd* fungus, in addition to being potential pathogenic to humans, and have zoonotic potential. In addition, many of these microorganisms are directly related to the diet of these animals, as well as their habitat. The identified bacteria from the analyzed animals may play an important role in maintaining this species in an environment modulated by anthropic actions developed in the region, such as the use of herbicides, animal growth-promoting agents, and the use of antimicrobials as a prophylactic treatment in livestock, swine, and poultry. Therefore, awareness about the preservation of the habitat of these animals is essential for the conservation of the admirable-red-belly-toads, in addition to avoiding possible cases of zoonosis for humans and, therefore, new epidemics and pandemics.

¹Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (104 p.) August, 2021.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS	2
2.1.	Objetivo geral.....	2
2.2.	Objetivos específicos.....	2
3.	REVISÃO DA LITERATURA	3
3.1.	Declínio populacional de anuros.....	3
3.1.1	O fungo <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> que ameaça a população mundial de anfíbios.....	4
3.2.	O microendêmico <i>Melanophryniscus admirabilis</i> (sapinho-admirável-da-barriga-vermelha).....	6
3.3.	A microbiota e sua relação com a conservação de espécies.....	9
3.3.1.	Microbiota da epiderme de anuros.....	10
3.3.2.	Microbiota intestinal e oral de anuros.....	12
3.4.	O gênero <i>Enterococcus</i> em animais selvagens.....	13
3.5.	Resistência das bactérias aos antimicrobianos.....	15
4.	MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1.	Área de estudo.....	16
4.2.	Coleta das amostras.....	17
4.3.	Isolamento das bactérias presente nas amostras.....	20
4.4.	Identificação das espécies bacterianas.....	21
4.4.1.	Por meio da espectrometria de massa (MALDI-TOF).....	21
4.4.2.	Por sequenciamento parcial do gene <i>16S rRNA</i>	21
4.4.3.	Identificação do gênero <i>Enterococcus</i>	22
4.5.	Ensaio de motilidade e coloração de endósporos.....	24
4.6.	Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos.....	25
4.7.	Deteção do fungo <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	26
4.8.	Análises estatísticas.....	27
5.	RESULTADOS	29
5.1.	Diversidade de bactérias cultiváveis e esforço amostral.....	29

5.2.	Análises da diversidade.....	33
5.2.1.	Entre espécimes de <i>Melanophryniscus admirabilis</i> : diversidade alfa..	33
5.2.2.	Entre as diferentes comunidades bacterianas: diversidade beta.....	34
5.3.	Ocorrência do gênero <i>Enterococcus</i> nas amostras.....	37
5.4.	Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos da ordem Enterobacterales.....	37
5.5.	Deteção do fungo <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	42
6.	DISCUSSÃO	43
6.1.	Bactérias cultiváveis entre os espécimes de <i>M. admirabilis</i> coletados: diversidade alfa.....	43
6.2.	Bactérias cultiváveis entre os grupos amostrais: diversidade beta....	44
6.2.1.	Diversidade e relevância das bactérias isoladas de amostras epidérmicas de <i>M. admirabilis</i>	45
6.2.2.	Diversidade e relevância das bactérias isoladas de amostras orais de <i>M. admirabilis</i>	51
6.2.3.	Diversidade e relevância das bactérias isoladas das amostras de fezes de <i>M. admirabilis</i>	55
6.3.	Ausência de enterococos nas amostras testadas.....	57
6.4.	Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos das bactérias da ordem Enterobacterales.....	58
6.5.	Ausência do fungo <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> nas amostras testadas.....	61
6.6.	Impactos na conservação de <i>Melanophryniscus admirabilis</i>	63
7.	CONCLUSÃO	66
8.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
9.	REFERÊNCIAS	68

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Dados morfológicos dos indivíduos de <i>M. admirabilis</i> amostrados.....	19
Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores, sequências de DNAs e massa molecular geradas nas reações de PCR para 16S <i>rRNA</i> , gênero-específica, espécie-específica (<i>E. casseliflavus</i> , <i>E. hirae</i> e <i>E. mundtii</i>) e fungo <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	24
Tabela 3. Descrição dos agentes antimicrobianos utilizados no estudo.....	26
Tabela 4. Informações sobre o crescimento bacteriano obtido a partir dos suabes obtidos dos 15 indivíduos de <i>M. admirabilis</i>	29
Tabela 5. Lista de espécies e abundância de isolados encontrados nas amostras orais, epidérmicas e fecais de <i>Melanophryniscus admirabilis</i>	31
Tabela 6. Valores obtidos ao aplicar o teste de Kruskal-Wallis entre as comunidades bacterianas obtidas das amostras).....	35
Tabela 7. Resistência aos antimicrobianos observada nos isolados de amostras de epiderme (n = 47), oral (n = 56) e fezes (n = 2)*	41

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Indivíduo de <i>Melanophryniscus admirabilis</i> . Foto: Pedro Peloso (reprodução autorizada pelo autor).....	7
Figura 2. Trecho de ocorrência do sapinho-admirável-da-barriga-vermelha, <i>M. admirabilis</i> , ao longo do Rio Forqueta, no norte do Rio Grande do Sul, Brasil. (Foto: Arquivo pessoal da autora (2019)).....	17
Figura 3. Procedimento de coleta de material biológico em campo. A) Coleta de suabe epidérmico; B) Indivíduo mantido em saco <i>zip-lock</i> para obtenção do material fecal (Fotos: Arquivo pessoal da autora (2019)).....	20
Figura 4. Representação de modelo do estudo, no qual foram baseadas as análises estatísticas realizadas. O quadro verde representa a α -diversidade, ou seja, as comunidades bacterianas entre os indivíduos de <i>M. admirabilis</i> . A β -diversidade é representada pelo círculo verde, sendo composta pelo conjunto de comunidades bacterianas das fezes, da epiderme e da cavidade oral. A seta laranja indica os testes estatísticos realizados somente para a β -diversidade; enquanto que a seta cinza, indica os testes realizados para ambas diversidades (Ilustração: Julia Ienes; Fonte: Arquivo pessoal da autora (2021)).....	28
Figura 5. Crescimento atípico obtido nas placas de BHI do suabe epidérmico do espécime M2 (Foto: Arquivo pessoal da autora (2019))..	30
Figura 6. Curvas de rarefação de espécies. As imagens A e B representam as curvas de rarefação de espécies das amostras orais e epidérmicas, respectivamente.....	32
Figura 7. Análises da diversidade alfa para as comunidades bacterianas presentes na epiderme (verde) e na cavidade oral (rosa) dos espécimes de <i>M. admirabilis</i> . A) Índice de Simpson; B) Índice de Shannon. C) Índice Chao-1.....	34
Figura 8. Análise de diversidade beta entre as três comunidades bacterianas. Resultados observados quanto a riqueza (esquerda) e diversidade (centro e direita) de espécies. Letras diferentes (em azul) indicam diferença estatística significativa ($P < 0.05$) pelo teste de Kruskal-Wallis.....	35
Figura 9. Dendrograma de similaridade de Jaccard para as amostras de epiderme, orais e fecal.....	36
Figura 10. Composição das comunidades bacterianas presentes na cavidade oral (vermelho), epiderme (verde) e fezes (marrom) de <i>M. admirabilis</i> . O+F+E indicam espécies que ocorreram em todos os grupos amostrais (amarelo); Comp. Indicam espécies compartilhadas entre dois grupos amostrais (cinza).....	36

Figura 11. Classificação dos isolados de *Enterobacteriaceae* submetidos ao teste de suscetibilidade a antimicrobianos. AMP, ampicilina; ASB, ampicilina/sulbactam; CFO, ceftioxina; CIP, ciprofloxacina; CLO, cloranfenicol; GEN, gentamicina; IPM, imipenem; NIT, nitrofurantoína; NOR, norfloxacina; TET, tetraciclina; S, suscetível; R, resistente..... 38

Figura 12. Prevalência de fenótipos observados no teste de suscetibilidade a antimicrobianos quanto a origem dos isolados: epiderme (n = 60), oral (n = 56) e fezes (n = 4). AMP, ampicilina; ASB, ampicilina/sulbactam; CFO, ceftioxina; CIP, ciprofloxacina; CLO, cloranfenicol; GEN, gentamicina; IPM, imipenem; NIT, nitrofurantoína; NOR, norfloxacina; TET, tetraciclina; S, suscetível; R, resistente..... 39

Figura 13. Eletroforese em gel de agarose para a detecção do fungo *B. dendrobatidis* nas amostras epidérmicas de *Melanophryniscus admirabilis*. C+, controle positivo; C-, controle negativo..... 42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\sum n_i$	Número total de isolados de cada espécie
A	Alfa
B	Beta
°C	Graus Celcius
1-D'	Índice de Simpson
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
<i>Bd</i>	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>
BHIA	Agar Infusão Cérebro e Coração (<i>Brain Heart Infusion Agar</i>)
CRC	Comprimento Rostro-Cloacal
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DR	Dupla-resistência
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
G	Gramas
H'	Índice de Shannon
HCl	Ácido Clorídrico
ID	Identificação
IJ	Índice de Jaccard
IUCN	<i>International Union for Conservation of Nature and Natural Resources</i>
J'	Índice de Equabilidade de Pielou
M	Molar
M	Metros
Mg	Miligramas
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitros
Mm	Milímetro
MR	Múltipla-resistência
NaCl	Cloreto de Sódio

n_i	Total de isolados em cada grupo amostral
Pb	Pares de base
PCH	Pequena Central Hidroelétrica
PCoA	Análise de Coordenadas Principais
PCR	Reação em Cadeira da Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
pH	Potencial Hidrogeniônico
rRNA	Ácido Ribonucleico Ribossomal
Rpm	Rotações por minuto
SDS	Doceeryl sulfato de sódio
TGI	Trato Gastrointestinal
U	Unidade
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UR	Única-resistência
µg	Microgramas
µL	Microlitros
µM	Micromolares
VES	<i>Visual Encounter Survey</i>

1. INTRODUÇÃO

Estudos a respeito da microbiota de anuros têm se tornado cada vez mais frequentes, principalmente devido ao seu potencial contra diversos patógenos, com ênfase no fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) (Walke & Belden, 2016). O fungo *Bd* tem sido responsável pelo declínio populacional de diversas espécies de anuros no mundo todo, devido a sua capacidade de provocar a doença chamada quitridiomicrose (Berger et al., 1998; Olson et al., 2013). A quitridiomicrose é uma doença cutânea, causada através do zoósporo do fungo, que penetra as camadas profundas da epiderme do indivíduo, podendo leva-lo a morte devido aos impactos na respiração cutânea e osmorregulação (Berger et al., 1998).

Estudos recentes têm salientado que alguns microrganismos da pele dos anuros são capazes de inibir o crescimento do fungo *Bd*, atuando como parte do seu sistema imune inato (Colombo et al., 2015; Bates et al., 2018; Woodhams et al., 2020), no entanto, o conhecimento acerca da microbiota desses animais ainda é escasso. A importância da microbiota na conservação de espécies ameaçadas tem se tornado cada vez mais relevante. O conhecimento da microbiota comensal de um hospedeiro pode auxiliar nas ações de conservação da espécie, bem como atuar como um bioindicador de uma população livre de patógenos (Redford et al., 2012; Bahrndorff et al., 2016; West et al., 2019).

É estimado que a Classe Amphibia abranja um total de 8,285 espécies, das quais 1,188 podem ser encontradas no Brasil, sendo em sua maioria (1,144 espécies) pertencentes a Ordem Anura (AmphibiaWeb, 2021; Segalla et al., 2021). Atualmente no Brasil, 40 espécies de anuros estão sob risco de extinção (ICMBio, 2014), dentre elas, o sapinho-admirável-da-barriga-vermelha, *Melanophryniscus admirabilis* (Di-Bernardo et al., 2006). *Melanophryniscus admirabilis* é uma espécie microendêmica de um trecho de 700 metros nas margens do Rio Forqueta, na região norte do Rio Grande do Sul, Brasil (Di-Bernardo et al., 2006; Vasconcelos, 2015).

Por ter sido uma espécie descrita recentemente, ainda são escassos os estudos a seu respeito (Lima, 2014; Vasconcelos, 2015), no entanto, nos últimos anos foram realizados trabalhos a fim de verificar o impacto da exposição aos herbicidas no metabolismo desses animais (Silva et al., 2020), e a caracterização da microbiota

oral, bem como seu potencial metabólico diante do ambiente no qual se encontra (Mann et al., 2021).

Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo identificar, caracterizar e verificar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos da comunidade bacteriana cultivável presente na epiderme, cavidade oral e fezes de indivíduos de *M. admirabilis*. A partir dos resultados obtidos, é esperado correlacionar os dados desse estudo com o impacto das atividades antropogênicas sobre a população de *M. admirabilis*, e assim, contribuir para o desenvolvimento de estudos e ações de conservação e preservação da espécie.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Este estudo teve como objetivo identificar por meio de métodos dependentes de cultivo e espectrometria de massa, bactérias em *Melanophryniscus admirabilis*, bem como inferir seus benefícios e ameaças para o hospedeiro. Ademais, verificar se esta única população conhecida de sapinhos-admiráveis-da-barriga-vermelha está sendo atingida pelo fungo *B. dendrobatidis*, a fim de obter dados que auxiliem na conservação desta espécie de anuro.

2.2. Objetivos específicos

a) Identificar a diversidade de bactérias cultiváveis presentes na superfície epidérmica, cavidade oral e fezes de *M. admirabilis*;

b) Determinar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados bacterianos obtidos das amostras de *M. admirabilis*;

c) Verificar a presença de *Enterococcus* spp. na superfície epidérmica e no TGI de *M. admirabilis*;

d) Detectar a presença do fungo *B. dendrobatidis* na superfície epidérmica de *M. admirabilis* através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR);

e) Correlacionar a comunidade bacteriana isolada dos *M. admirabilis* com sua conservação e preservação no ambiente

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Declínio populacional de anuros

Nos últimos anos, os anfíbios em geral vêm passando por uma crise global de conservação caracterizada principalmente pela extinção de espécies e declínios populacionais (Butchart et al., 2010; IUCN, 2013). De acordo com a lista de espécies mundialmente ameaçadas – *Red List* – elaborada pela *International Union for Conservation of Nature* (IUCN), atualmente há cerca de 35.500 espécies em risco de extinção. Dentre as 8,285 espécies de anfíbios descritas, cerca de 40% estão classificadas como em risco de extinção. (IUCN, 2021). A classe Amphibia é composta por três ordens principais: Anura, que abrange os sapos, rãs e pererecas; Caudata, representada pelas salamandras e tritões; e Gymnophiona, que compreende as cecílias, popularmente conhecidas como cobras-cegas (Wake & Koo, 2018).

De acordo com Collins & Storfer (2003), os principais fatores pelo declínio populacional de anfíbios podem ser classificados em duas classes. A primeira classe abrange fatores que estariam acometendo esses animais há mais de um século. Dentre elas, os autores citam a introdução de espécies exóticas, a super-exploração de terras, bem como as mudanças no uso dessas terras como fragmentação e destruição de habitat. Já a segunda classe compreende fatores que começaram a afetar as populações de anfíbios nos últimos 30 anos. Como principais causas estão as alterações globais – tais como aumento no nível de radiação ultravioleta, aumento na concentração de dióxido de carbono na atmosfera, alterações biogeoquímicas nos ciclos dos elementos essenciais – e o surgimento de doenças infecciosas, principalmente causadas pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*, e por vírus do gênero *Ranavírus*, e o aumento do uso de pesticidas e demais toxinas ambientais.

As fragmentações das florestas e alterações químicas causadas na água devido às práticas de agricultura, impactam diretamente no sucesso reprodutivo desses animais, bem como em suas densidades populacionais (Nyström et al., 2007). Além disso, o aumento das práticas de agricultura também promoveu ao longo dos anos uma drástica redução de habitats para a biodiversidade em geral, e isto, junto com o aumento da urbanização e a construção de mais rodovias terrestres, acabaram contribuindo para o declínio populacional de algumas espécies de anuros (Arntzen et al., 2017).

As mudanças climáticas afetam os anfíbios de diversas maneiras, dentre elas, através do aumento do nível do mar devido ao aquecimento global, podendo causar a morte desses animais (Haddad et al., 2008). O estudo indica que este fator provoca inundações em áreas de ocorrência de diversas espécies de anfíbios, os quais não tolerariam a concentração salina da água por conta da grande permeabilidade da pele e respectivas funções fisiológicas. Os autores também sugerem que o aumento das temperaturas pode provocar alterações climático-vegetacionais, que influenciariam diretamente nas florestas ombrófilas - local de ocorrência de diversas espécies endêmicas de anuros – já que os bancos de nuvens seriam deslocados para altitudes maiores. No Brasil, as populações de anuros já estão sendo impactadas por esses fatores. Um estudo realizado em 2005 verificou que em cinco coleções científicas de museus brasileiros, não haviam entradas de espécimes de 13 espécies de anuros nos últimos 15 anos (Eterovick et al., 2005).

3.1.1. O fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* que ameaça a população mundial de anfíbios

Dentre os diversos fatores ambientais que estão levando populações de anfíbios ao declínio em todo o mundo, uma doença de pele denominada de quitridiomiose tem sido apontada como uma das mais prováveis causas de morte em massa de anfíbios (Berger et al., 1998). A quitridiomiose em anuros é causada pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), que pertence ao filo Chytridiomycota, sendo o primeiro do filo a parasitar um animal do filo Vertebrata, o anuro *Dendrobates azureus*, conhecido popularmente como sapo-flecha-azul-venenoso (Longcore et al.,

1999) Fungos do gênero *Batrachochytrium* são parasitas obrigatórios de outros fungos, algas, plantas vasculares, rotíferos, nematódeos ou insetos (Berger et al., 1998).

O fungo quitrídio geralmente é detectado em anuros encontrados mortos, mas pode estar presente em sapos e girinos saudáveis e ser, portanto, assintomático (Berger et al., 1999; Garner et al., 2006). De acordo com Berger et al., (1999), o fungo não é distribuído uniformemente na superfície do corpo, sendo encontrado mais frequentemente no estrato córneo dos dedos, seguido da superfície ventral, especialmente nas coxas e região inguinal, sendo necessária a realização de cortes histológicos nos animais para a detecção do fungo. No entanto, estudos recentes detectaram a presença do fungo em anuros de vida livre utilizando somente suabes epidérmicos (Coutinho et al., 2015; Lambertini et al., 2021), sem ser necessário efetuar a eutanásia e/ou realização de cortes histológicos no animal, sendo, portanto, um modo menos invasivo.

O primeiro registro de *B. dendrobatidis* em anuros do gênero *Melanophryniscus* foi realizado por Agostini et al. (2015), em uma população de *M. aff. montevidensis*, onde 11 dos 32 espécimes capturados foram positivos para o fungo, e os mesmos eram aparentemente saudáveis. Conforme a IUCN (2013), *M. montevidensis* é uma espécie considerada “Vulnerável” em relação ao risco de extinção, mas de acordo com Agostini et al., (2015), não é possível afirmar que haja uma relação direta entre a presença do fungo na população e o declínio da mesma. Contudo, animais positivos para a presença de *B. dendrobatidis* podem ter uma baixa probabilidade de sobrevivência em casos de desenvolvimento da quitridiomicose.

Diversos estudos têm demonstrado que a infecção pelo fungo *Bd* pode impactar a microbiota bacteriana da pele de anuros, muitas vezes, mas talvez não exclusivamente, na forma de disbiose (Jani & Briggs, 2014; Bates et al., 2018; Becker et al., 2019). Na microbiologia, a disbiose é definida como uma alteração na composição da microbiota, que resulta em um desequilíbrio entre bactérias benéficas e prejudiciais ao organismo (Ducatelle et al., 2014). Kueneman et al., (2014) afirmam que a comunidade microbiana da pele de anuros pode mediar a suscetibilidade da doença causada pelo fungo. A investigação da presença do fungo *Bd* em anuros da

Mata Atlântica é essencial para a elaboração de ações efetivas para conservação de espécies (Ruthsatz et al., 2020).

3.2. O microendêmico *Melanophryniscus admirabilis* (sapinho-admirável-da-barriga-vermelha)

O gênero *Melanophryniscus* Gallardo, 1961 consiste em 29 espécies pertencentes à família Bufonidae, distribuídas pelo norte da Argentina, sul da Bolívia, região sul do Brasil, Paraguai e Uruguai (Frost, 2021). Muitas dessas espécies ocorrem em áreas restritas e sob um forte impacto ambiental, o que predispõe a problemas de conservação (Vasconcelos, 2015). No entanto, para a maioria delas inexistem estudos de história natural, distribuição geográfica, ecologia populacional e principalmente sobre a microbiota.

A maioria das espécies desse gênero apresentam hábitos diurnos (Colombo et al., 2008), no entanto, algumas também apresentam hábitos noturnos (Colombo et al., 2007). O gênero *Melanophryniscus* é de grande interesse farmacológico devido aos alcalóides presentes em sua epiderme, adquiridos através da sua dieta rica em artrópodes (Daly et al., 2007; Grant et al., 2012; Hantak et al., 2013). A presença destes alcalóides torna os indivíduos impalatáveis, o que é evidenciado pela coloração aposemática, geralmente vermelha, da planta das patas traseiras e dianteiras dos indivíduos. A coloração aposemática é exposta através de uma postura de defesa denominada reflexo “unken”, na qual os indivíduos arqueiam as plantas das patas traseiras e dianteiras, sinalizando sua impalatabilidade aos possíveis predadores (Bordignon et al., 2018; Vargas et al., 2019).

Melanophryniscus admirabilis Di Bernardo, Maneyro & Grillo, 2006, popularmente chamado de sapinho-admirável-da-barriga-vermelha (Figura 1), é uma espécie endêmica do Rio Grande do Sul, encontrado até o momento somente no município de Arvorezinha, Rio Grande do Sul, Brasil (Fonte et al., 2021; ICMBio, 2018). Morfologicamente a espécie é caracterizada pela presença de muitas glândulas desenvolvidas na superfície dorsal, lateral e ventral do corpo, cuja coloração é bem contrastante do restante da coloração verde do dorso (Di-Bernardo et al., 2006).



Figura 1. Indivíduo de *Melanophryniscus admirabilis*. Foto: Pedro Peloso (reprodução autorizada pelo autor).

Para reprodução e crescimento larval indivíduos dessa espécie utilizam poças marginais rasas e sazonais que se formam em depressões de rochas basálticas ao longo das margens do Rio Forqueta (Di-Bernardo et al., 2006). O período reprodutivo da espécie ocorre entre os meses de Setembro e Outubro, podendo ter ocorrência de breves eventos de reprodução explosiva ao longo do período (Fonte et al., 2021).

A população de *M. admirabilis* é muito pequena – e ainda indeterminada – cuja área de ocorrência compreende aproximadamente 700 metros ao longo das margens do rio Forqueta, no extremo sul da Mata Atlântica brasileira, em um vale estreito, limitado por encostas íngremes (Vasconcellos, 2015). A região está próxima de diversas ameaças ao habitat, tais como plantações de eucaliptos, soja e fumo, e pecuária, portanto, o uso de herbicidas pode afetar diretamente essa população de *M. admirabilis*.

Atualmente *M. admirabilis* está avaliado como Criticamente em Perigo em nível nacional (ICMBio, 2018), e também em nível global (IUCN, 2013). Outras nove espécies do gênero – *M. cambaraensis*, *M. dorsalis*, *M. macrogranulosus*, *M. montevidensis*, *M. setiba*, *M. orejasmirandai*, *M. devincenzii*, *M. peritus* e *M. langonei* – também estão sob risco de extinção e classificadas dentre as categorias Criticamente em Perigo, Em Perigo ou Vulnerável (ICMBio, 2018; IUCN, 2013).

A fim de verificar o impacto de herbicidas no desenvolvimento dos girinos da espécie, Silva et al., (2020) analisaram as possíveis alterações no perfil metabólico e no balanço oxidativo causadas pela exposição aos herbicidas sulfentrazone e glifosato, os quais são altamente utilizados na região de ocorrência de *M. admirabilis*. O estudo constatou que *M. admirabilis* possui alta capacidade antioxidativa, a fim de garantir a sobrevivência dos girinos, visto que não foi constatada nenhuma mortalidade entre os grupos analisados. No entanto, isso requer alta demanda fisiológica para metabolizar esses xenobióticos, que foi verificada através da redução na concentração dos níveis de glicogênio, após período de exposição aos herbicidas.

Até o momento, somente um estudo foi realizado para avaliar a microbiota bacteriana residente de *M. admirabilis* (Mann et al., 2021), no qual os autores avaliaram a composição da microbiota oral de *M. admirabilis*. O estudo identificou vias metabólicas de degradação de xenobióticos, como benzoato e tolueno, na comunidade bacteriana oral de *M. admirabilis*. Os autores sugerem que, em conjunto com a mobilização enzimática, a comunidade bacteriana capaz de degradar xenobióticos, seja um dos fatores que auxiliam os *M. admirabilis* habitarem um ambiente relativamente antropizado.

Além das ameaças já citadas, recentemente foi sugerido um projeto de construção de uma Pequena Central Hidrelétrica (PCH) na região de Perau de Janeiro. A construção desta hidrelétrica afetaria a área de ocorrência de *M. admirabilis*, aumentando o risco de extinção da espécie. Entretanto, devido a mobilizações de pesquisadores, autoridades ambientais e empreendedores, o projeto foi arquivado, por hora (Fonte et al., 2021; ICMBio/MMA, 2018; SiBBR, 2019).

Por ser uma espécie em risco de extinção, é de extrema importância a realização de estudos a respeito de temas que possam contribuir para a conservação e preservação, como por exemplo, compreender os aspectos ecológicos, morfológicos e fisiológicos deste anuro, assim como a microbiota presente nestes animais. e sugeriram que a comunidade bacteriana oral poderia ter papéis importantes na saúde e sobrevivência de *M. admirabilis* no seu ecossistema.

3.3. A microbiota e sua relação com a conservação de espécies

Microbiota é definido como um grupo de microrganismos que vivem em determinado ambiente. Englobam as bactérias, os fungos, os protozoários assim como os vírus. A microbiota desempenha um papel importante na manutenção da saúde animal, além disso, a adaptação e a persistência de espécies animais em ambientes impactados têm sido associadas à microbiota. A composição da microbiota pode ajudar a promover uma maior compreensão do estado fisiológico das espécies e divergências de nicho sob diferentes condições ambientais. Relações simbióticas entre organismos multicelulares e microrganismos são comuns na natureza. Atualmente, já há diversas evidências de que os microrganismos associados a plantas e animais desempenham diversas funções relevantes para a saúde e sobrevivência do hospedeiro (Berg, 2009; Archie & Tung, 2015; Bahrndorff et al., 2016; Ross et al., 2019; Plaza et al., 2020).

A diversidade de microrganismos em um hospedeiro, bem como seus genes, é denominada microbioma (West et al., 2019). Zaneveld et al., (2017) demonstraram como o *Princípio Anna Karenina* enunciado por Lev Tolstoy pode ser aplicado ao microbioma. No famoso conto de Tolstoy, Anna Karenina, tem-se o princípio: “todas as famílias felizes são iguais; cada família infeliz é infeliz à sua maneira”. No caso, Zaneveld et al., (2017) partem do pressuposto de que “todos os microbiomas saudáveis são similares; cada microbioma disbiótico é disbiótico a sua maneira”, e, portanto, indivíduos que sofrem disbiose, tem maior variação na composição de seu microbioma do que indivíduos saudáveis.

Atualmente, diversos estudos têm sido realizados a fim de descobrir métodos que restabeleçam o equilíbrio da microbiota, e dentre eles, a engenharia de microbioma - *engineering microbiome* - tem tido destaque (Foo et al., 2017). Engenharia de microbioma é uma metodologia experimental que tem como objetivo aumentar o *fitness* do hospedeiro a partir de uma seleção artificial de comunidades microbianas (Mueller & Sachs, 2015). Dentre as técnicas que podem ser utilizadas na engenharia de microbioma, está o fornecimento de substrato natural para o hospedeiro, o uso de probióticos e prebióticos, a aplicação de uma dieta saudável e o transplante de microbiota fecal (Song et al., 2019; West et al., 2019).

Recentemente, essa metodologia tem sido associada como uma das principais ferramentas na conservação de espécies de plantas e animais (Mueller & Sachs, 2015; Epstein et al., 2019; Song et al., 2019). Redford et al., (2012) sugere que os casos de reintrodução de fauna mal-sucedidos possam ter relação com a alteração no microbioma, causado pelo manejo do animal em cativeiro. De fato, a condição em cativeiro promove uma dieta diferente daquela ao qual o animal estava acostumado na natureza, e essa alteração na dieta, pode promover alterações na microbiota do espécime, e conseqüentemente, suas funções fisiológicas (Faith et al., 2011). Essa hipótese foi comprovada no trabalho de Passos et al., (2018), no qual foi comparado a microbiota epidérmica de indivíduos selvagens e de cativeiro de *Mantella aurantiaca*, e foi constatado que os animais de cativeiro possuem menor diversidade e abundância bacteriana em relação aos animais de vida livre, o que provavelmente os tornam mais suscetíveis a infecções.

No entanto, para que todas as técnicas da engenharia de microbioma sejam de fato eficazes para a conservação de diversas espécies, o primeiro passo é ter conhecimento da microbiota natural do hospedeiro. West et al., (2019) sugere a criação de um “índice de microbioma saudável” para espécies ameaçadas de extinção, a fim de auxiliar na identificação de mudanças na comunidade microbiana que possam causar vulnerabilidade e doenças no hospedeiro.

Considerando o atual *status* de conservação de *M. admirabilis* - Criticamente em Perigo de extinção - os estudos que visam identificar a microbiota desta espécie são essenciais para compreender se os microrganismos podem auxiliar no metabolismo dos xenobióticos presentes no habitat, bem como sua atuação no combate a potenciais patógenos.

3.3.1. Microbiota da epiderme de anuros

A pele dos anuros é um importante órgão do sistema imune inato e é a linha de frente para defesa contra patógenos (Varga et al., 2019). Devido a isso, diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de analisar a diversidade da microbiota da pele de anfíbios (McKenzie et al., 2012; Kueneman et al., 2014; Loudon et al., 2014;

Rebollar et al., 2020), no entanto, ainda não há dados referentes a microbiota cutânea do gênero *Melanophryniscus*.

A constituição da comunidade bacteriana epidérmica de anuros é afetada principalmente por fatores abióticos, como temperatura, precipitação e elevação, e até mesmo pela dieta alimentar, podendo o ambiente, portanto, ser capaz de modular essa comunidade (Medina et al., 2017; Ruthsatz et al., 2020). Em sua revisão, Varga et al., (2019) reforçam que a exposição a antibióticos e outros contaminantes antropogênicos, também podem levar a alterações na microbiota da epiderme de anuros. Além disso, fatores específicos dos hospedeiros também causam alterações nesta microbiota, como a espécie, estágio de desenvolvimento, comportamento, variações genéticas e o próprio sistema imune, através da produção de anticorpos e peptídeos antimicrobianos (Rebollar et al., 2020).

Em geral, a maioria dos trabalhos sobre microbiota da epiderme de anuros utiliza técnicas de sequenciamento de nova geração para a identificação dos microrganismos presentes, sendo estes pertencentes em sua maioria aos filos Proteobacteria, Actinobacteria e Firmicutes (Catenazzi et al., 2018; Estrada et al., 2019; Varga et al., 2019). Algumas bactérias presentes na superfície epidérmica dos anuros são capazes de produzir metabólitos secundários com propriedades antimicrobianas, antifúngicas e antiparasitárias (Loudon et al., 2014; Bresciano et al., 2015; Woodhams et al., 2018; Bartel et al., 2019), o que pode promover uma interação de competição com outros microrganismos, muitos deles patogênicos (Ruthsatz et al., 2020). No entanto, a presença de patógenos também pode modular a composição microbiana, podendo causar um aumento na suscetibilidade do hospedeiro (Jani et al., 2018; Rebollar et al., 2016; Bates et al., 2018).

Desse modo, a identificação de microrganismos na epiderme de *M. admirabilis* pode gerar informações que auxiliem nas estratégias de conservação da espécie, visto que, em caso de presença de microrganismos patogênicos na população, isto pode cooperar para a uma redução da população. Além disso, o habitat desta espécie está muito impactado com as atividades humanas, e é sabido que micro-organismos comensais de humanos, possam ser patogênicos para os animais, sendo este mais um motivo para conservação do habitat desses animais.

3.3.2. Microbiota intestinal e oral de anuros

Estudos em humanos, animais domésticos e de laboratório têm demonstrado a importância da microbiota intestinal sobre a digestão de alimentos, síntese de nutrientes vitais, fisiologia, desenvolvimento, comportamento e performance do sistema imune (Jiménez & Sommer, 2017). Foi a partir de 2010 que se intensificaram os estudos com espécies de animais selvagens, tanto as que vivem em cativeiros quanto as que vivem em seus habitats naturais (Yildirim et al., 2010; Amato et al., 2013; Menke et al., 2014; Cheng et al., 2015; Carrillo-Araujo et al., 2015).

O estudo de Kohl et al., (2013) foi o primeiro que analisou a microbiota intestinal de sapos adultos e girinos, e os autores verificaram diferenças na diversidade bacteriana em relação ao estágio de vida. Os girinos apresentaram uma microbiota mais semelhante à dos peixes, enquanto os sapos adultos possuíram uma microbiota mais semelhante a amnioto. Além disso, foi observado que os sapos apresentaram uma baixa diversidade filogenética em sua microbiota, provavelmente devido às mudanças na alimentação e a ampla reorganização dos órgãos intestinais durante a metamorfose, tais como a alteração de um estômago não ácido quando girinos para um estômago ácido quando adultos.

Bletz et al., (2017) comprovaram que a comunidade microbiana intestinal pode ser mediada de acordo com os fatores ambientais do meio em que o animal se encontra, visto que diferentes habitats possuem diferentes recursos alimentares e fontes de nutrientes. Os autores analisaram dois grupos de salamandras de dois habitats diferentes: um córrego com baixas temperaturas e fluxo contínuo de água durante o ano, e uma lagoa cujas temperaturas variam constantemente ao longo do ano, e a abundância de água é limitada. Os autores supõem que a microbiota do hospedeiro vertebrado tem um papel importante na plasticidade fenotípica do mesmo, isto é, na capacidade de um único genótipo alterar sua expressão a fim de exibir um fenótipo diferente em virtude das pressões causadas pelo ambiente.

Fontaine et al. (2018) analisaram a microbiota intestinal de salamandras para verificar se esses animais apresentariam alterações na diversidade de espécies bacterianas em relação a mudanças de temperatura, visto que esses animais são ectotérmicos, bem como os anuros, e sua temperatura corpórea não é constante

comparado a outros grupos de animais. Os autores verificaram que diferentes temperaturas (10, 15 e 20 °C) proporcionam uma alteração na composição da microbiota intestinal desses animais. O mesmo resultado foi obtido por Kohl & Yahn (2016), no entanto, os autores analisaram a microbiota intestinal de girinos e verificaram que em temperaturas mais altas (28 °C) havia uma alta abundância do gênero *Mycobacterium*.

Visto que salamandras e anuros pertencem à mesma classe (Amphibia) e compartilham de muitos aspectos fisiológicos, é provável que os resultados obtidos nos trabalhos de Bletz et al., (2017) e Fontaine et al., (2018) também sejam aplicados a anuros. Diferente do que foi visto para a microbiota intestinal e cutânea, os estudos a respeito da microbiota oral de anuros são quase inexistentes (Hacioglu & Tosunoglu, 2014; Mann et al., 2021). A dieta rica em artrópodes de alguns anuros influencia na produção de alcalóides, os quais são secretados através de glândulas distribuídas pelo corpo desses animais (Rodríguez et al., 2011; Saporito et al., 2012, 2015). É provável que além da aquisição de alcalóides, a própria dieta desses animais também possa modular sua microbiota oral.

Recentemente foi realizado o primeiro estudo de caracterização da microbiota oral de *M. admirabilis* (Mann et al., 2021), no qual foi identificado a prevalência de bactérias dos filos Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria e Fusobacteria. O mesmo trabalho sugere que a prevalência do filo Proteobacteria esteja relacionada com a dieta, visto que esses microrganismos fazem parte do microbioma cuticular de formigas, e no trato gastrointestinal de artrópodes (Yun et al., 2014), os quais são principais componentes da dieta alimentar de *M. admirabilis* (Lima, 2014). Ainda, os autores também têm a hipótese de que assim como sua ocorrência restrita, o próprio ambiente endógeno oral – como por exemplo, a saliva – poderia modular a microbiota oral desses animais.

3.4. O gênero *Enterococcus* em animais selvagens

O gênero *Enterococcus* compreende espécies bacterianas ubíquas sendo associadas a humanos, animais, alimentos, esgotos, águas, solos, plantas (Pieniz et al., 2015; Prichula et al., 2016, 2020; Cassenego et al., 2011; Medeiros et al., 2017; Huescas et al., 2019; Huff et al., 2020; Araújo et al., 2020). São cocos Gram-positivos

e aparecem em pares ou cadeias com um formato mais ovalado. São catalase negativa, anaeróbios facultativos, capazes de crescer em 6,5% de NaCl, em 40% de sais biliares, em pH 9,6 e em temperaturas de 10°C e 45°C (Devriese et al., 2006).

Enterococcus são considerados comensais do trato gastrointestinal de humanos, e podem atuar como patógenos oportunistas em sítios corporais extra-intestinais (Devriese et al., 2006; Kosecka-Strojek et al., 2019). Em humanos, *Enterococcus faecium* e *E. faecalis* estão associados a altos índices de mortalidade e é considerado a principal bactéria associada a infecções nosocomiais (Mitchell, 2011). Diversos estudos já verificaram a presença de *Enterococcus* em animais marinhos, como leões marinhos (*Arctocephalus australis* e *A. tropicalis*) (Santestevan et al., 2015), pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) (Prichula et al., 2020), aves marinhas (*Sterna trudeaui* e *Himantopus melanurus*), tartarugas marinhas (*Eretmochelys imbricata* e *Chelonia mydas*) e mamíferos marinhos, como baleias-jubarte, baleias-minke e golfinho de risso (*Megaptera novaeangliae*, *Balaenoptera acutorostrata* e *Grampus griseus*, respectivamente) (Prichula et al., 2016). Além destes, a presença de *Enterococcus* também já foi registrada em mamíferos terrestres como o graxaim-do-campo (*Lycalopex gymnocercus*), o gato-do-mato-grande (*Leopardus geoffroyi*) (Araujo et al., 2020), e macacos-prego (*Sapajus nigritus*) (Grassotti et al., 2018), bem como em invertebrados pertencentes a Ordem Lepidoptera, *Heliconius erato phyllis* (Huff et al., 2020).

Até momento, somente quatro estudos avaliariam enterococos em anuros. O primeiro conduzido por Rana et al., (2011) isolaram *E. faecium* resistentes à vancomicina a partir de *pellets* fecais de sapos da espécie *Rana sylvatica*. O estudo abordou o papel dos anfíbios como sentinelas para doenças que afetam humanos, visto que atualmente muitas espécies selvagens, de vida livre, têm sido capturadas para serem comercializadas como *pets* e, portanto, tornando anfíbios potenciais portadores de patógenos. O segundo, realizado por Wang et al., (2016) com anuros das espécies *Rana limncharis*, *Rana exilispinosa* e *Amolops afghanus*, observou que estas espécies produziam 12 peptídeos antimicrobianos (AMP, *antimicrobial peptide*) nas suas peles que foram capazes de inibir o crescimento de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212).

No terceiro estudo, com a espécie de anuro *Lithobates palustris*, foi observado que esta espécie também sintetiza um AMP, denominado palustrina, que foi capaz de inibir o crescimento de *E. faecalis* (Cardoso et al., 2014). Os mesmos autores demonstraram que o gênero *Phyllomedusa* também é capaz de sintetizar um AMP que inibiu o crescimento de *E. faecalis*. Recentemente, resultados similares foram obtidos por Barran et al., (2020), onde o peptídeo ocelatina, produzido pelo anuro *Leptodactylus nesiotus*, foi capaz de inibir o crescimento de *E. faecium*. Ainda não existem trabalhos que detectaram a presença de enterococos em amostras de *M. admirabilis*.

3.5. Resistência das bactérias aos antimicrobianos

Antimicrobianos desenvolvem um papel importante no controle e tratamento de doenças infecciosas, no entanto, atualmente são um dos principais problemas de saúde pública mundial do século XXI (Abushaheen et al., 2020). Infecções causadas por bactérias resistentes a antimicrobianos tem se tornado cada vez mais comuns e difíceis, ou até mesmo impossíveis, de serem tratadas (Arzanlou et al., 2017). De acordo com a *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD), no Brasil, Indonésia e Rússia, cerca de 60% das infecções são causadas por microrganismos resistentes, e nestes países a resistência está prevista para aumentar de 4 a 7 vezes mais rápido do que em relação a outros países da Europa, América do Norte e Austrália (Hofer, 2019).

A resistência a antimicrobianos é definida como a habilidade de um microrganismo sobreviver e estar viável sob influência de agentes antimicrobianos, e pode ser do tipo intrínseca, adaptativa ou adquirida (Arzanlou et al., 2017; Abushaheen et al., 2020). Resistência intrínseca pode ser definida por um traço universal compartilhado entre as espécies bacterianas, independente de exposição prévia a antimicrobianos e não relacionada a transferência horizontal de genes (Reygaert, 2018). Já a resistência adaptativa refere-se à habilidade de um microrganismo adaptar-se e sobreviver frente a diversas condições de estresse devido a rápidas alterações em seu transcriptoma em resposta a estímulos ambientais (Arzanlou et al., 2017). Resistência adquirida ocorre quando um microrganismo

sensível a antibióticos se torna resistente através de mutações em genes pré-existentes, ou pela aquisição de genes de outro microrganismo através da transferência horizontal de genes (Boerlin & Reid-Smith, 2008).

Os mecanismos de resistência antimicrobiana já descritos podem ser classificados em quatro categorias principais: a) destruição enzimática de agentes antimicrobianos; b) modificação nos alvos dos antimicrobianos; c) redução na captação dos antimicrobianos; d) efluxo ativo do antimicrobiano (Reygaert, 2018; Arzanlou et al., 2017). As bactérias que compõem a microbiota da epiderme de anfíbios que produzem peptídeos antimicrobianos provavelmente desenvolveram algum destes mecanismos de resistência para habitar este ambiente, assim como as bactérias da cavidade oral e intestinal, pois estas necessitam de um mecanismo que as permitam sobreviver diante do contato com os alcaloides adquiridos através da dieta destes animais, (Rodríguez et al., 2011; Saporito et al., 2012, 2015), sendo portanto, um exemplo de resistência adaptativa.

No caso da microbiota bacteriana de *M. admirabilis*, outro exemplo de desenvolvimento de resistência adaptativa, seria a contaminação através do ambiente. Ambientes de água doce são suscetíveis a possível contaminação com antibióticos provenientes de diferentes fontes, tais quais como escoamento agrícola, descargas de esgoto e lixiviação de fazendas próximas (Nnadozie & Odume, 2019).

Diante disso, o presente estudo justifica-se pela ausência de informações sobre o isolamento e identificação de bactérias cultiváveis presentes na cavidade oral, fezes e epiderme de *M. admirabilis*, bem como, em relação ao perfil de suscetibilidade a antimicrobianos destes microrganismos. Além disso, a partir dos resultados obtidos, é esperado correlacioná-los com o impacto das atividades antropogênicas sobre a população de *M. admirabilis* e assim, contribuir para desenvolvimento de estudos relacionados a conservação e preservação da espécie.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Área de estudo

Atualmente, a única população de sapinhos-admiráveis-de-barriga-vermelha ocorre em uma área de aproximadamente 700 metros às margens do rio

Forqueta, na região norte do estado do Rio Grande do Sul. O clima predominante da região é o subtropical úmido, que de acordo com o sistema geral de Köppen (1931), caracteriza-se por temperaturas médias compreendidas entre -3°C e 18°C para o mês mais frio, e superiores a 22°C para o mês mais quente (FEPAM, 2013).

O município de Arvorezinha possui 10.225 habitantes, destes, cerca de 3.950 moram na zona rural da cidade, onde desenvolvem culturas de fumo, erva-mate e milho, bem como atividades de pecuária como avicultura, bovinocultura e suinocultura. O acesso ao sítio de ocorrência da espécie se dá por uma propriedade privada, cujo visitação é permitida para turistas que têm como atrativo principal a cachoeira e as trilhas ecológicas. O trecho de ocorrência de *M. admirabilis* é formado por um lajedo rochoso (Figura 2), o qual é limitado, de um lado pelo rio Forqueta e, do outro, pela mata ciliar que cobre as encostas íngremes do local (Vasconcellos, 2015).

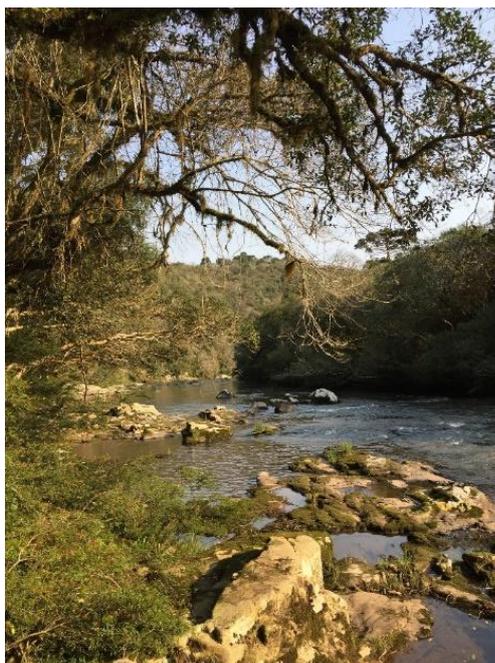


Figura 2. Trecho de ocorrência do sapinho-admirável-da-barriga-vermelha, *M. admirabilis*, ao longo do Rio Forqueta, no norte do Rio Grande do Sul, Brasil. (Foto: Arquivo pessoal da autora (2019)).

4.2. Coleta das amostras

As coletas aconteceram no mês de setembro de 2019, em virtude de compreender o período reprodutivo desta espécie de anuro, no qual os indivíduos

ficam mais abundantes e são encontrados mais facilmente, visto que utilizam as poças de água para acasalarem. A busca pelos animais se deu por meio do método de Procura Visual (*Visual Encounter Survey* – VES; Crump & Scott Jr. 1994), não limitada por tempo, em períodos diurnos e noturnos. O trecho de ocorrência da espécie às margens do rio foi percorrido a pé, observando sob as rochas, vegetação e nas poças d'água, e durante a noite, a vocalização dos animais também auxiliou no processo de busca. A área de ocorrência já é previamente setorizada em quadrantes, de 15 metros cada (Vasconcellos, 2015) e está setorização foi utilizada para determinar o local de captura dos animais.

Conforme encontrados, os espécimes de *M. admirabilis* eram capturados independente do sexo. A captura dos animais foi realizada com luvas estéreis e individuais para cada animal, a fim de evitar contaminação cruzada na microbiota epidérmica, acarretando em um resultado falso-positivo nas análises posteriores (Figura 3A). Primeiramente, foram coletados dois suabes epidérmicos, ambos passados por todo o corpo do animal – dorso, ventre, região entre os dígitos, patas posteriores e anteriores – e, em seguida, um foi mantido em meio de transporte Stuart, e outro foi mantido em álcool etílico absoluto, para análises da microbiota bacteriana e presença do fungo *Bd*, respectivamente.

Um terceiro suabe foi introduzido cuidadosamente na boca do animal, seguido de movimentos circulares, e após mantido em meio de transporte Stuart. Todos os suabes, assim como as fezes, foram conservados em temperatura ambiente durante o processo de busca pelos animais, e em seguida foram mantidos sob refrigeração a 4° C até o momento das análises, realizadas no Laboratório de Microbiologia Ambiental e de Alimentos, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Ao todo, foram amostrados 15 animais, os quais após a realização das coletas de materiais biológicos, foram medidos o comprimento rostro-cloacal (CRC) e a massa de cada indivíduo, com auxílio de paquímetro (resolução de 0.01 mm) e balança (0.1 g), respectivamente (Tabela 1). Também foi realizado registro fotográfico do padrão de manchas ventrais (fotoidentificação), a fim de evitar a recaptura de um mesmo indivíduo e para posterior identificação dos indivíduos, conforme Vasconcellos (2015).

Tabela 1. Dados morfológicos dos indivíduos de *M. admirabilis* amostrados.

Espécime	Sexo¹	Massa (g)	CRC² (mm)	Quadrante
M1	F	4.21	39.96	6
M2	M	2.95	32.54	6
M3	M	3.83	36.77	17
M4	M	3.56	36.23	24
M5	M	2.97	31.26	24
M6	M	3.69	37.40	24
M7	M	3.06	33.54	24
M8	F	4.07	36.56	24
M9	SI	1.60	27.51	24
M10	M	3.86	30.75	24
M11	F	3.21	32.77	24
M12	M	3.13	32.19	24
M13	F	4.35	37.93	24
M14	M	3.43	31.92	24
M15	F	4.54	37.65	24

¹F: fêmea; M: macho; SI: sexo indefinido (animal juvenil). ²CRC: Comprimento rostro-cloacal.

Por fim, o espécime foi mantido de forma individual em um saco tipo *zip-lock*, por um período de 15 minutos, para obtenção do material fecal (Figura 3B). Ao término do processo, os animais foram colocados no local exato de captura. Este trabalho foi realizado sob licença permanente para coleta de material zoológico, de número 10341-1, fornecida pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) e pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Além disso, o acesso ao patrimônio genético está permitido mediante licença do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), de número A9A34FDA72680.



Figura 3. Procedimento de coleta de material biológico em campo. A) Coleta de suabe epidérmico; B) Indivíduo mantido em saco *zip-lock* para obtenção do material fecal. (Fotos: Arquivo pessoal da autora)

4.3. Isolamento das bactérias presente nas amostras

O pool de fezes, os suabes orais e epidérmicos foram mergulhados em 3 mL de Água Peptonada, por 24 horas a 37 °C. Este cultivo foi semeado pelo método de esgotamento em meios seletivos e diferenciais Ágar MacConkey e Ágar Sal/Manitol, e incubadas a 37 °C por 24 e 48 horas, respectivamente. Além disso, 100 µL do cultivo foram utilizados para diluição seriada em solução salina 0,75%, até 10⁻⁵, as quais foram plaqueadas em meio de cultura que permite o crescimento de uma grande variedade de tipos de organismos, o meio Ágar Infusão Cérebro Coração (BHIA, *Brain Heart Infusion agar*). As diluições foram plaqueadas em duplicata e as placas incubadas a 37 °C por 24 horas. Para as amostras de suabes epidérmicos somente alíquotas das diluições 10⁻⁴ e 10⁻⁵ foram plaqueadas, já as amostras fecais e de suabes orais tiveram todas suas diluições plaqueadas.

Ao término da incubação, foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC), e as colônias que apresentaram morfologias diferentes foram semeadas em BHI pelo método de esgotamento a fim de obter colônias puras,

e posteriormente incubadas a 37 °C por 24 horas. Características fenotípicas das colônias foram analisadas, tais como morfologia e pigmentação, seguidos de realização de testes de coloração de Gram e catalase. Todos os isolados foram armazenados em solução contendo 10% de leite desnatado em pó (Molico, Nestlé®) e glicerol 10% (v/v), sob refrigeração à -20 °C até o momento das análises.

4.4. Identificação das espécies bacterianas

4.4.1. Por meio da espectrometria de massa (MALDI-TOF)

Todos os isolados obtidos através dos meios BHIA, MacConkey e Sal Manitol foram identificados através de MALDI-TOF. Para tal, a partir de cada cultura foram realizados repiques em meio BHIA para obtenção de colônias puras, que posteriormente foram adicionadas a 300 µL de água milli-Q estéril, seguido da adição de 900 µL de etanol absoluto. Por fim, a solução foi homogeneizada em vórtex e encaminhada para realização da análise efetuada pela equipe técnica do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia do ICBS/UFRGS (Fotos: Autora).

4.4.2. Por sequenciamento parcial do gene 16S rRNA

Para os isolados submetidos ao MALDI-TOF que não puderam ser identificados pelo equipamento, foi realizada amplificação do gene *16S rRNA* por reação em cadeia da polimerase (PCR) – cuja sequência dos oligonucleotídeos iniciadores encontram-se na Tabela 2 – para posterior identificação através de sequenciamento Sanger. Para extração de DNA foi utilizado o método de lise térmica, conforme protocolo de Donato (2007), que consiste na adição de uma solução alcalina contendo SDS (dodecyl sulfato de sódio) ao inóculo das culturas pré incubadas em caldo BHI, seguido de tampão TE 1x [Tris HCl 1M, EDTA 0,5M, pH 8,0]. Como controle positivo foi utilizada a cepa *Enterococcus durans* 605E.

A reação da PCR foi realizada em um volume total de 25 µL, contendo 1x de tampão *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®), 0,4 µM de cada oligonucleotídeo

iniciador (Invitrogen®), 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen®), 200 µM de dNTPs (Ludwig Biotecnologia Ltda), 1U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen®), 100 ng de DNA e água MilliQ para completar o volume. A PCR foi realizada nas condições de 5 minutos a 94°C, seguida por 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 58°C e 1 minuto a 72°C, com um ciclo de extensão final de 10 minutos a 72°C, utilizando Termociclador – 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystem, California, EUA).

Os produtos amplificados foram corados com o fluoróforo GelRed® (Biotium) e visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em fotodocumentador L.Pix (Loccus Biotecnologia, Molecular Imaging). Foram interpretadas como positivas as amostras que amplificaram fragmentos de aproximadamente 503 pares de bases, e estas foram purificadas com o kit Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter), conforme instruções do fabricante. O sequenciamento das amostras foi realizado pela empresa ATCGene Análises Moleculares.

As sequências de bases nitrogenadas obtidas no sequenciamento foram analisadas no programa Chromas v2.6.6 (Technelysium®), e em seguida, foram submetidas a análise de similaridade utilizando o *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). As sequências que apresentaram maior similaridade no BLAST, foram alinhadas no ClustalW utilizando a função “*build*” do ETE3 v3.1.1. (Huerta-Cepas et al., 2016), seguida da construção de uma árvore filogenética utilizando FastTree v2.1.8 (Prince et al. 2009), a fim de determinar à qual espécie do banco de dados a sequência obtida estava mais relacionada.

4.4.3. Identificação do gênero *Enterococcus*

As amostras orais, fecais e epidérmicas foram submetidas ao isolamento de *Enterococcus* spp. empregando os protocolos descritos por Santestevan et al., 2015; Prichula et al., 2016. As amostras também foram submetidas a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), para verificar a presença do gênero do *Enterococcus* spp. Para tanto, o DNA total das amostras foi extraído por meio do kit de purificação *PureLink™ Genomic DNA Mini Kit* (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA), conforme recomendações do fabricante. Foram utilizados oligonucleotídeos

iniciadores gênero-específico (Tabela 2) referentes à amplificação do gene *tuf*, um constituinte essencial do genoma bacteriano, responsável por codificar o fator de alongação EF-Tu (Ke et al., 1999). A reação da PCR foi realizada em um volume total de 25 µL, contendo 1x de tampão *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®), 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Invitrogen®), 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen®), 200 µM de dNTPs (Ludwig Biotecnologia Ltda), 1U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen®), 100 ng de DNA e água MilliQ para completar o volume. Para a amplificação foi utilizado o Termociclador – 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystem, California, EUA), nas seguintes condições: 3 minutos a 95°C, seguida por 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C e 1 minuto a 72°C, com um ciclo de extensão final de 7 minutos a 72°C.

Os produtos amplificados foram corados com GelRed® (Biotium) e visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em fotodocumentador L.Pix (Loccus Biotecnologia, Molecular Imaging). Foram interpretadas como positivas as amostras que amplificaram fragmentos de aproximadamente 112 pares de bases. Para determinar a espécie de enterococos das amostras que apresentaram resultado positivo para o gene *tuf*, foram realizadas PCR espécie-específica para *Enterococcus casseliflavus*, *E. hirae* e *E. mundtii*. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para cada espécie constam na Tabela 2.

Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores, sequências de DNAs e massa molecular geradas nas reações de PCR para *16S rRNA*, gênero-específica, espécie-específica (*E. casseliflavus*, *E. hirae* e *E. mundtii*) e fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*.

Oligonucleotídeos Iniciadores	Sequência (5'-3')	Massa do fragmento (pb) ¹	Referência
<i>16S rRNA</i>			
FC27	AGAGTTTGATCCTGGCTGAG	503	Gontang et al. (2007)
R530	CCGCGGCTGCTGGCACTGA		
<i>Enterococcus spp.</i>			
tuf_F	TACTGACAAACCATTCATGATG	112	Ke et al. (1999)
tuf_R	AACTTCGTCACCAACGCGAAC		
<i>E. casseliflavus</i>			
CA1	TCCTGAATTAGGTGAAAAAAC	288	Jackson et al. (2004)
CA2	GCTAGTTTACCGTCTTTAACG		
<i>E. hirae</i>			
HiR1	TTATGTCCCWGTWTTGAAAAATCAA	180	Knijff et al. (2001) Prichula et al. (2016)
HiR2	TATTGATAAGCTAATGCAAGCGC		
<i>E. mundtii</i>			
MU1-F	CAGACATGGATGCTATTCCATCT	94	Jackson et al. (2004)
MU2-R	GCCATGATTTTCCAGAAGAATG		
<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>			
Bd1a	CAGTGTGCCATATGTCACG	300	Annis et al. (2004)
Bd2a	CATGGTTCATATCTGTCCAG		

¹ Pares de bases.

4.5. Ensaio de motilidade e coloração de endósporos

Para identificar dois isolados cujas sequências do gene *16S rRNA* obtiveram altos índices de similaridade com mais de uma espécie bacteriana no alinhamento de sequências através do BLAST, foram realizados ensaios de motilidade e teste de coloração de endósporos. Para ambos os ensaios, as bactérias foram previamente inoculadas em placas de ágar BHI e incubadas por 24 horas a 37 °C. A partir do crescimento obtido, uma unidade formadora de colônia foi selecionada e inoculada com auxílio de uma agulha estéril em tubos contendo meio de cultivo SIM (Sulfeto de hidrogênio, Indol e Motilidade), seguido de incubação a 37° C por 24 horas.

Para o teste de coloração de endósporos, foi realizado o método de Wirtz-Conklin, o qual consiste em fixar uma suspensão bacteriana sobre uma lâmina, cobrir a mesma com corante verde malaquita e aquecê-la por 5 minutos em Bico de Bunsen,

evitando a secagem do corante. Em seguida, o corante verde malaquita foi retirado com água destilada, e a suspensão bacteriana coberta com solução aquosa de safranina por 30 segundos, seguida de uma nova lavagem. Se há esporulação, os esporos ficam corados de verde, enquanto que as células vegetativas se coram de rosa.

4.6. Teste de suscetibilidade a antimicrobianos

A determinação do perfil de suscetibilidade antimicrobiana foi verificada através do método de disco de difusão, de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2021). As amostras foram avaliadas quanto à suscetibilidade aos seguintes antimicrobianos: ampicilina (AMP), ampicilina-sulbactam (ASB), cefoxitina (CFO), ciprofloxacina (CIP), cloranfenicol (CLO), gentamicina (GEN), imipenem (IPM), nitrofurantoína (NIT), norfloxacina (NOR) e tetraciclina (TET) (Tabela 3). O teste foi realizado somente para os isolados identificados como pertencentes a ordem *Enterobacteriales* já que foram os mais abundantes (vide Sessão 5.1; Tabela 5).

Os isolados utilizados encontravam-se em solução de leite desnatado (Molico, Nestlé®), e foram repicados em ágar BHI por método de esgotamento e incubados em estufa bacteriológica por 24 h à 37 °C, com exceção dos isolados dos gêneros *Serratia* e *Yersinia*, os quais após estocados, só apresentaram crescimento de unidades formadoras de colônias sob incubação à 30 °C. Posteriormente, as amostras foram padronizadas em 5 mL de solução salina 0,85%, até atingir a turvação equivalente à solução padrão 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente $1 \text{ a } 2 \times 10^8 \text{ UFC mL}^{-1}$), e semeadas em placas de Ágar Müller-Hinton.

Os discos contendo os antimicrobianos foram colocados sobre a superfície dos meios, respeitando a distância estabelecida de 24 mm entre seus centros, e as placas foram incubadas a 37 °C, durante 16 a 24 horas. O diâmetro dos halos de inibição de crescimento foi analisado e as amostras foram classificadas como suscetíveis, intermediárias ou resistentes, através das faixas de interpretação específica para *Enterobacteriales* (CLSI, 2021). Entretanto, isolados suscetíveis e intermediários foram considerados em uma categoria única e classificados como “suscetíveis”, seguido determinação do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST, 2019). Amostras que apresentaram resistência a três

ou mais classes de antimicrobianos foram consideradas com perfil de múltipla resistência (MR) (Schwarz et al., 2010).

Tabela 3. Descrição dos agentes antimicrobianos utilizados no estudo.

Classe	Antimicrobiano	Sigla	Concentração (µg)	Mecanismo de ação ¹
Aminoglicosídeos	Gentamicina	GEN	10	Síntese Proteica
Anfenicóis	Cloranfenicol	CLO	30	Síntese Proteica
Nitrofuranos	Nitrofurantoína	NIT	300	Síntese Proteica
Tetraciclina	Tetraciclina	TET	30	Síntese Proteica
β-lactâmicos combinados	Ampicilina/Sulbactam	ASB	10/10	Síntese de PC
Carbapenêmicos	Imipenem	IPM	10	Síntese de PC
Cefalosporinas	Cefoxitina	CFO	30	Síntese de PC
Penicilinas	Ampicilina	AMP	10	Síntese de PC
Quinolonas	Ciprofloxacina	CIP	5	DNA girase
	Norfloxacina	NOR	10	DNA girase

¹ Reygaert, 2018; PC: Parede Celular.

4.7. Detecção do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*

A detecção do fungo *B. dendrobatidis* foi realizada pela técnica de PCR, conforme protocolo de Coutinho et al. (2015). Foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores referentes à amplificação da sequência de rDNA de *B. dendrobatidis* (Tabela 2). A extração de DNA fúngico das amostras foi realizada com o *PureLink™ Genomic DNA Mini Kit* (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA), conforme recomendações do fabricante.

As reações de PCR convencional foram realizadas em um volume total de 25 µL com 5 µL de DNA (50 ng), 1x de tampão *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®), 1 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Invitrogen®), 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen®), 200 µM de dNTPs (Ludwig Biotecnologia Ltda), 1U de *Taq* DNA Polimerase

(Invitrogen®), e água MilliQ para completar o volume. A amplificação foi realizada em Termociclador – 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystem, California, EUA) – sob as seguintes condições: 10 minutos a 93 °C, seguido de 40 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.

Após a amplificação, as amostras foram coradas com GelRed® (Biotium) e submetidas a eletroforese em gel de agarose (1%), seguida de visualização em fotodocumentador L.Pix (Loccus Biotecnologia, Molecular Imaging). Para todos os produtos obtidos, foi realizado *nested-PCR*, que consiste na repetição da reação de amplificação citada acima, pois de acordo com Coutinho et al (2015), a PCR *singleplex* pode gerar resultados falso-negativos, portanto, a detecção do fungo *Bd* é mais precisa através da técnica de *nested-PCR*. Foram interpretadas como positivas as amostras obtidas no *nested-PCR* que amplificaram fragmentos de aproximadamente 300 pares de bases.

4.8. Análises Estatísticas

Para avaliar a suficiência amostral foi elaborada uma curva de rarefação de espécies para cada grupo amostral (epiderme e oral). Como foi utilizado um *pool* de fezes de vários indivíduos, a curva de rarefação não foi elaborada para este grupo, assim como o mesmo não fora considerado para α -diversidade (alfa). A α -diversidade foi considerada como a diversidade bacteriana de cada espécime (indivíduo amostrado) de *M. admirabilis*, em relação aos dois tipos de amostras: i) epiderme, e ii) cavidade oral, separadamente. A β -diversidade (beta) foi considerada como a diversidade bacteriana total de cada um dos três grupos amostrais: i) epiderme, ii) cavidade oral, e iii) fezes. (Figura 4).

O estimador Chao-1 foi utilizado para analisar a riqueza de espécies, enquanto que os índices de Simpson (1-D) e Shannon (H) foram utilizados para as análises relacionadas à diversidade bacteriana, cujos valores foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0.05$). A similaridade entre os grupos amostrais foi analisada utilizando o Índice de Jaccard (IJ). Para visualizar o perfil da comunidade bacteriana entre os grupos amostrais, foi realizada análise de coordenadas principais (PCoA, *Principal Coordinates Analyzes*), a qual foi calculada utilizando o índice de

dissimilaridade de Bray-Curtis. As análises estatísticas foram realizadas nos softwares *PAST* v.4.06 (Hammer, Harper & Ryan, 2001) e RStudio v.1.3.1093, enquanto que os gráficos foram elaborados no software GraphPad Prism v.8.

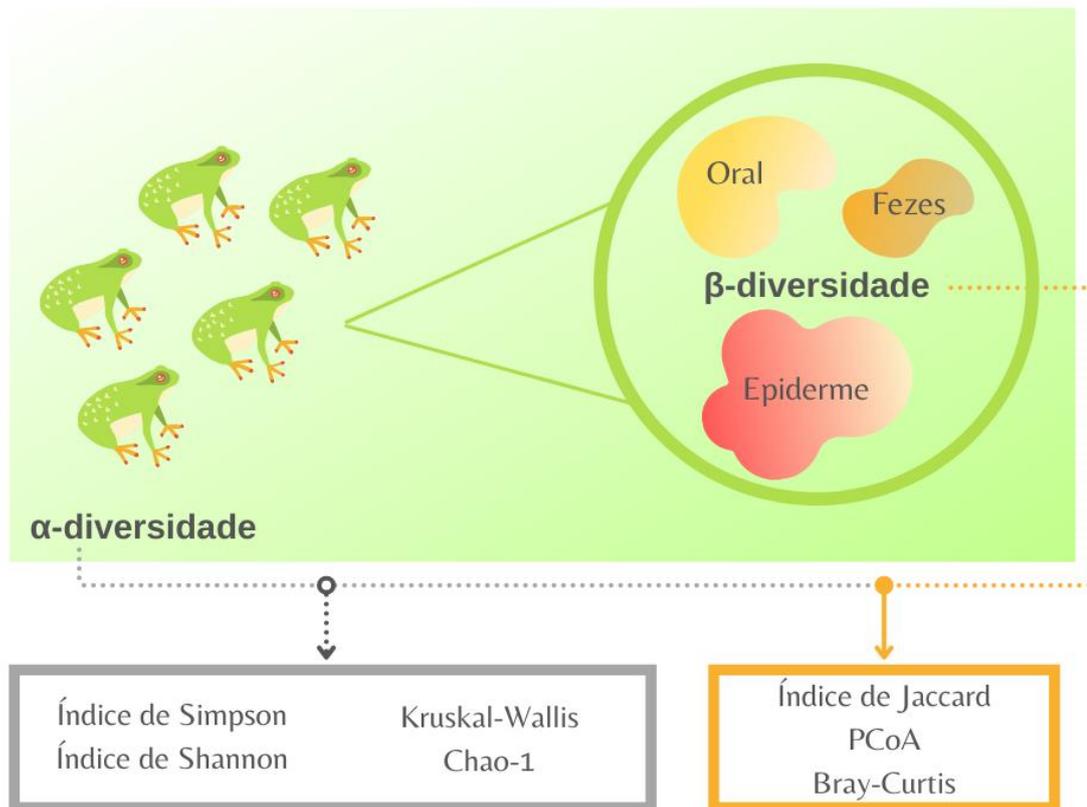


Figura 4. Representação de modelo do estudo, no qual foram baseadas as análises estatísticas realizadas. O quadro verde representa a α -diversidade, ou seja, as comunidades bacterianas entre os indivíduos de *M. admirabilis*. A β -diversidade é representada pelo círculo verde, sendo composta pelo conjunto de comunidades bacterianas das fezes, da epiderme e da cavidade oral. A seta laranja indica os testes estatísticos realizados somente para a β -diversidade; enquanto que a seta cinza, indica os testes realizados para ambas diversidades (Ilustração: Julia Ienes-Lima; Fonte: Arquivo pessoal da autora (2021)).

5. RESULTADOS

5.1. Diversidade de bactérias cultiváveis e esforço amostral

Do total de 30 suabes – 15 orais e 15 epidérmicos – e um pool de fezes correspondente a 6 animais, foi possível isolar bactérias de 67% (n = 10) suabes orais e 60% (n = 9) epidérmicos e dos pools de fezes. De uma das amostras epidérmicas houve crescimento atípico (Figura 5; Tabela 4) e por questões de segurança biológica, essa amostra foi desconsiderada do *n* total.

TABELA 4. Informações sobre o crescimento bacteriano obtido a partir dos suabes obtidos dos 15 indivíduos de *M. admirabilis*.

ID das amostras	Swab Epidérmico	Cresc. Bacteriano	Swab Oral	Cresc. Bacteriano
M1	S	S	S	S
M2	S	AT*	S	S
M3	S	N	S	N
M4	S	S	S	N
M5	S	S	S	S
M6	S	S	S	N
M7	S	S	S	S
M8	S	S	S	S
M9	S	N	S	N
M10	S	S	S	S
M11	S	S	S	N
M12	S	S	S	S
M13	S	NR	S	S
M14	S	NR	S	S
M15	S	NR	S	S

ID = identificação; S = sim; N = não; AT* = crescimento atípico, vide figura abaixo; NR = não realizado.

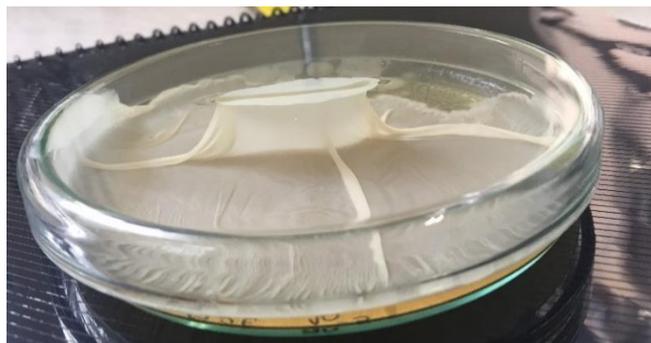


Figura 5. Crescimento atípico obtido nas placas de BHI do suabe epidérmico do espécime M2 (Foto: Arquivo pessoal da autora (2019))

A partir dos 10 suabes orais, 9 suabes epidérmicos e do *pool* de fezes, foram obtidos ao todo, 173 isolados bacterianos. Destes, 134 foram identificados através de espectrometria de massa (MALDI-TOF, Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry) e 39 pelo sequenciamento e análise do gene 16S *rRNA*.

Do total de 173 isolados obtidos, 83 foram isolados de amostras epidérmicas, 74 isolados de amostras orais, e 16 isolados a partir do *pool* de fezes (Tabela 5). Entre os três tipos de amostras, a que apresentou maior riqueza de espécies (S) foram as provenientes da epiderme, com 19 espécies ao todo, enquanto que as amostras orais e fecais tiveram riquezas de 17 e 7 espécies, respectivamente.

Dentre as amostras epidérmicas, as espécies mais abundantes foram do gênero *Bacillus* (26,51%), *Hafnia alvei* (22,89%) e *Enterobacter* sp. (15,66%). Nas amostras orais, o gênero *Serratia* foi o mais abundante, representando 28,38% dos isolados, cuja espécie de maior abundância foi *Serratia marcescens* (14,86%). As espécies de *Bacillus* sp. (17,57%) e *Citrobacter* sp. (16,22%) também foram abundantes entre as amostras orais. Já nas amostras fecais, a espécie *Morganella morganii* foi a mais abundante, representando 43,75% dos 16 isolados obtidos.

Isolados de *Bacillus* sp. e *Hafnia alvei* foram identificados nos três tipos de amostras, em diferentes abundâncias, sendo ambas mais abundantes nas amostras epidérmicas. No entanto, houveram espécies que foram isoladas somente em um tipo de amostra, como por exemplo, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Citrobacter freundii*, *C. braakii*, *Enterobacter* spp., *Lactococcus garvieae*, *Providencia rettgeri*, *Yersinia enterocolitica* e *Y. nurmii* foram espécies exclusivas de amostras epidérmicas.

Tabela 5. Lista de espécies e abundância de isolados encontrados nas amostras orais, epidérmicas e fecais de *Melanophryniscus admirabilis*.

Gram / Família / Espécie bacteriana	n _i = n° de isolados (%)			Σn _i
	Oral (N = 10)	Epiderme (N = 9)	Fezes (pool)	
Gram-Positivas				
Bacillaceae				
<i>Bacillus cereus</i>	4 (5.41)	11 (13.25)	0	15
<i>Bacillus sp.</i>	8 (10.81)	11 (13.25)	1 (6.25)	20
<i>Bacillus thuringiensis</i>	1 (1.35)	0	1 (6.25)	2
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> ^c	0	0	2 (12.50)	2
Staphylococcaceae				
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ^c	0	0	3 (18.75)	3
Streptococcaceae				
<i>Lactococcus garvinae</i> ^a	0	3 (3.61)	0	3
Gram-Negativas				
Aeromonadaceae				
<i>Aeromonas hidrophyla</i>	5 (6.76)	3 (3.61)	0	8
<i>Aeromonas jandaei</i>	0	1 (1.20)	0	1
Enterobacteriaceae				
<i>Buttiauxella sp.</i> ^b	5 (6.76)	0	0	5
<i>Citrobacter braakii</i> ^a	0	2 (2.41)	0	2
<i>Citrobacter freundii</i> ^a	0	7 (8.43)	0	7
<i>Citrobacter gillenii</i> ^b	3 (4.05)	0	0	3
<i>Citrobacter sp.</i>	9 (12.16)	1 (1.20)	0	10
<i>Enterobacter asburiae</i> ^a	0	2 (2.41)	0	2
<i>Enterobacter cloacae</i> ^a	0	6 (7.23)	0	6
<i>Enterobacter sp.</i> ^a	0	5 (6.02)	0	5
<i>Providencia rettgeri</i> ^a	0	1 (1.20)	0	1
<i>Raoultella ornithinolytica</i> ^b	10 (13.51)	0	0	10
<i>Serratia fonticola</i>	4 (5.41)	3 (3.61)	0	7
<i>Serratia liquefaciens</i>	1 (1.35)	3 (3.61)	0	4
<i>Serratia marcescens</i> ^b	11 (14.86)	0	0	11
<i>Serratia oryzae</i> ^b	2 (2.70)	0	0	2
<i>Serratia sp.</i>	2 (2.70)	0	0	2
<i>Serratia surfactantfaciens</i> ^b	1 (1.35)	0	0	1
Hafniaceae				
<i>Hafnia alvei</i>	1 (1.35)	19 (22.89)	2 (12.50)	22
Morganellaceae				
<i>Morganella morganii</i> ^c	0	0	6 (37.50)	6
<i>Morganella morganii subsp. sibonii</i> ^c	0	0	1 (6.25)	1
Moraxellaceae				
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ^a	0	1 (1.20)	0	1
Pseudomonadaceae				
<i>Pseudomonas luteola</i> ^b	1 (1.35)	0	0	1
Yersiniaceae				
<i>Yersinia enterocolitica</i> ^a	0	1 (1.20)	0	1
<i>Yersinia massiliensis</i> ^b	6 (8.11)	0	0	6
<i>Yersinia nurmii</i> ^a	0	2 (2.41)	0	2
<i>Yersinia sp.</i>	0	1 (1.20)	0	1
Total				173 (100)

Tabela 5 (cont.). N = número total de amostras/suabes; n_i = total de isolados em cada grupo amostral; $\sum n_i$ = número total de isolados de cada espécie; % = frequência absoluta em porcentagem; ^a espécies que ocorreram somente em amostras de epiderme; ^b espécies que ocorreram somente em amostras orais; ^c espécies que ocorreram somente em amostras fecais.

Já *Buttiauxella* sp., *Citrobacter gillenii*, *Pseudomonas luteola*, *Raoultella ornithinolytica*, *Serratia marcescens*, *S. oryzae*, *S. surfactantfaciens* e *Yersinia massiliensis* foram identificadas apenas em isolados de amostras orais. Dentre as espécies bacterianas identificadas nos isolados da amostra fecal, *Lysinibacillus sphaericus*, *Morganella morganii* e *Staphylococcus epidermidis* foram as únicas que ocorreram exclusivamente neste grupo.

Ao analisar a curva de rarefação de espécies para as amostras de epiderme e oral, foi observado que embora esteja no início da faixa de *platô*, o qual representa o acúmulo de espécies, o nosso *n* amostral foi suficiente para garantir uma representação significativa das comunidades bacterianas epidérmicas e oral presentes na população de *M. admirabilis* (Figuras 6A e 6B).

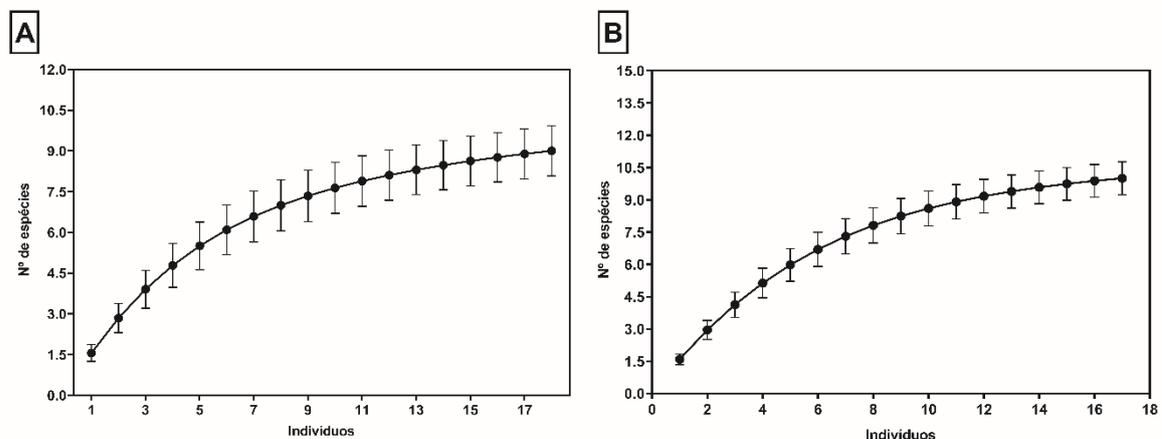


Figura 6. Curvas de rarefação de espécies. As imagens **A** e **B** representam as curvas de rarefação de espécies das amostras orais e epidérmicas, respectivamente.

5.2. Análises da diversidade bacteriana

5.2.1. Riqueza das espécies entre as amostras de *Melanophryniscus admirabilis*: diversidade alfa

Entre os 10 indivíduos obtidos amostras orais, a riqueza de espécies em cada um variou de 1 a 4 táxons bacterianos. Já entre os nove indivíduos os quais foram obtidas amostras epidérmicas, a riqueza de espécies variou de 1 a 5 táxons bacterianos.

Os parâmetros de diversidade alfa (Índices de Shannon, Simpson e Chao1) foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, o qual demonstrou que entre os espécimes de *M. admirabilis* não houveram diferenças significativas na riqueza e diversidade de espécies das comunidades bacterianas da epiderme ($H_{(\text{chi}^2)} = 6.872$; $H_c = 16.27$; $P = 0.574$) e da cavidade oral ($H_{(\text{chi}^2)} = 3.614$; $H_c = 9.017$; $P = 0.912$) (Fig. 7). Quando o valor para os índices de Simpson e Shannon é igualado a 0, este indica a presença de somente um táxon bacteriano na amostra.

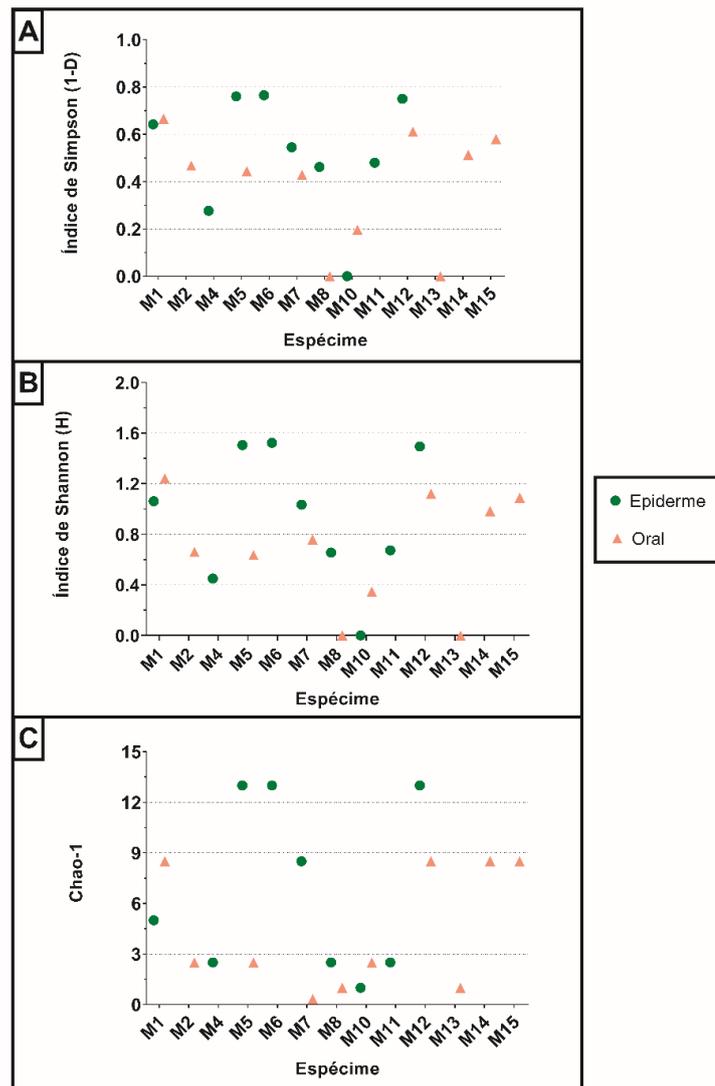


Figura 7. Análises da diversidade alfa para as comunidades bacterianas presentes na epiderme (verde) e na cavidade oral (rosa) dos espécimes de *M. admirabilis*. A) Índice de Simpson; B) Índice de Shannon. C) Índice Chao-1.

5.2.2. Diferenças nas comunidades bacterianas entre as amostras: diversidade beta

As métricas de riqueza e diversidade de espécies (Índices de Simpson, Shannon e Chao-1) foram aplicadas para cada par de comunidades, seguido da realização do teste de Kruskal-Wallis (Tabela 6). Foi verificado que a comunidade bacteriana cultivável oriunda do *pool* de fezes apresenta riqueza e diversidade de espécies significativamente menor ($P < 0.05$) em relação as comunidades da epiderme e da cavidade oral (Figura 8).

Tabela 6. Valores obtidos ao aplicar o teste de Kruskal-Wallis entre as comunidades bacterianas obtidas das amostras.

Tipo de amostra	H _{chi²}	H _c	Valor de P
Oral x Epiderme	0,072	0,080	0,776
Epiderme x Fezes	7,602	9,821	0,001*
Oral x Fezes	5,629	7,603	0,005*

(*) indica valor estatisticamente significativo ($P < 0.05$).

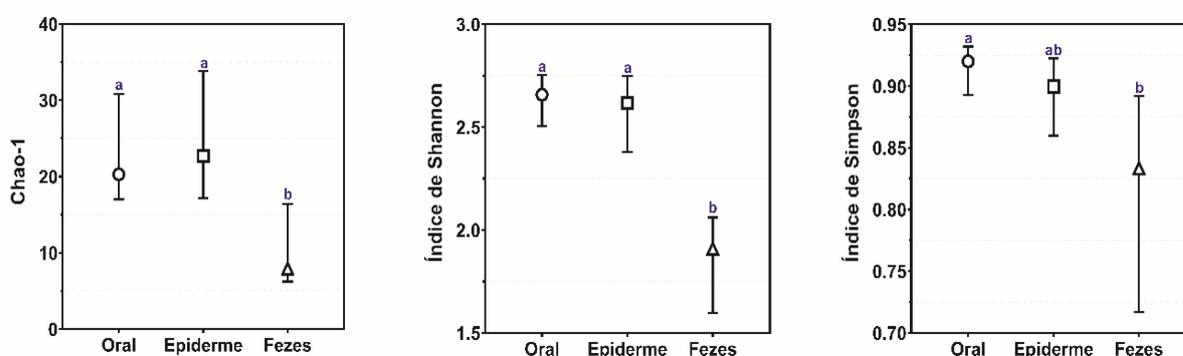


Figura 8. Análise de diversidade beta entre as três comunidades bacterianas. Resultados observados quanto a riqueza (esquerda) e diversidade (centro e direita) de espécies. Letras diferentes (em azul) indicam diferença estatística significativa ($P < 0.05$) pelo teste de Kruskal-Wallis.

Os resultados obtidos através da aplicação do Índice de Jaccard, demonstraram que as comunidades bacterianas analisadas possuem baixa similaridade entre si. No entanto, as comunidades epidérmicas e orais são mais similares, cujo grau de similaridade é de aproximadamente 24%, e diferem consideravelmente da comunidade bacteriana presente nas fezes dos indivíduos (Figura 9). Estes dados foram sustentados pelo resultado obtido através da Análise de Coordenadas Principais (PCoA), onde foi possível verificar a ocorrência de determinadas bactérias em grupos amostrais específicos (Figura 10)

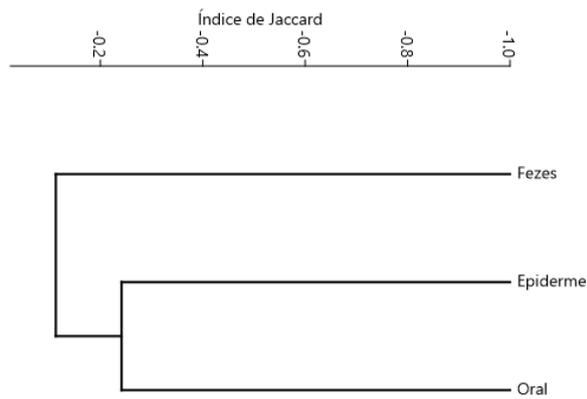


Figura 9. Dendrograma de similaridade de Jaccard para as amostras de epiderme, orais e fecal.

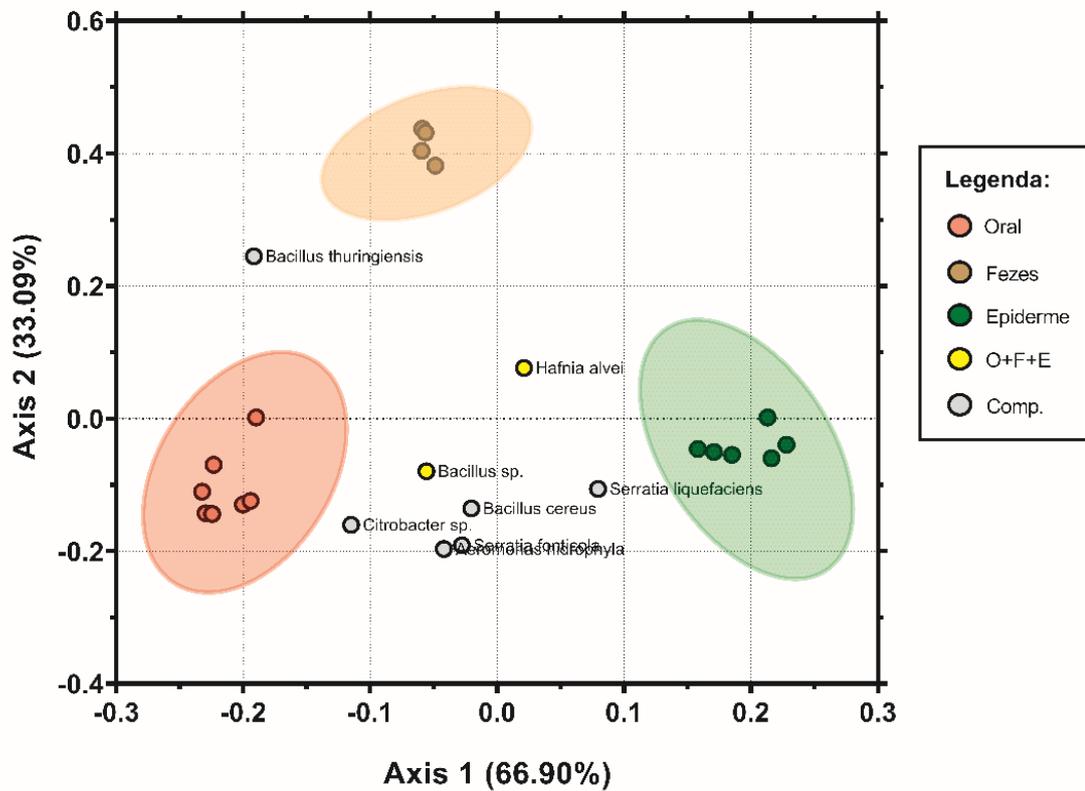


Figura 10. Composição das comunidades bacterianas presentes na cavidade oral (vermelho), epiderme (verde) e fezes (marrom) de *M. admirabilis*. **O+F+E** indicam espécies que ocorreram em todos os grupos amostrais (amarelo); **Comp.** indicam espécies compartilhadas entre dois grupos amostrais (cinza).

5.3. Ocorrência do gênero *Enterococcus* nas amostras

De todas as amostras analisadas no presente trabalho, nenhuma delas apresentou crescimento de enterococos através dos métodos de cultivo, nem mesmo sob concentrações mais baixas de cloreto de sódio (NaCl) no meio de cultura. Para confirmar a ausência, ou presença destes microrganismos nas amostras, foi realizada amplificação do gene *tuf*, por reação da PCR. Somente nas amostras do *pool* de fezes, foi obtido resultado positivo para o gene *tuf*, no entanto, ao realizar PCRs espécie-específico, não houve amplificação positiva para nenhuma das espécies de enterococos testadas. Portanto, nas amostras epidérmicas, orais e fecais de *M. admirabilis* testadas não foi possível detectar a presença de enterococos.

5.4. Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos da ordem Enterobacteriales

Cento e vinte isolados pertencentes a ordem Enterobacteriales (Adeolu et al., 2016) foram submetidos ao teste de suscetibilidade aos antimicrobianos, e destes, 105 (87,5%) apresentaram resistência a pelo menos um dos antimicrobianos utilizados (Figura 11). Resistência a ampicilina (n = 99; 83%), cefoxitina (n = 38; 32%) e nitrofurantoína (n = 27; 27%) foi comumente observada, enquanto que resistência a norfloxacin, cloranfenicol e gentamicina foi observada somente em apenas 1% dos isolados. Somente 15 (12,5%) isolados foram suscetíveis a todos os antimicrobianos testados.

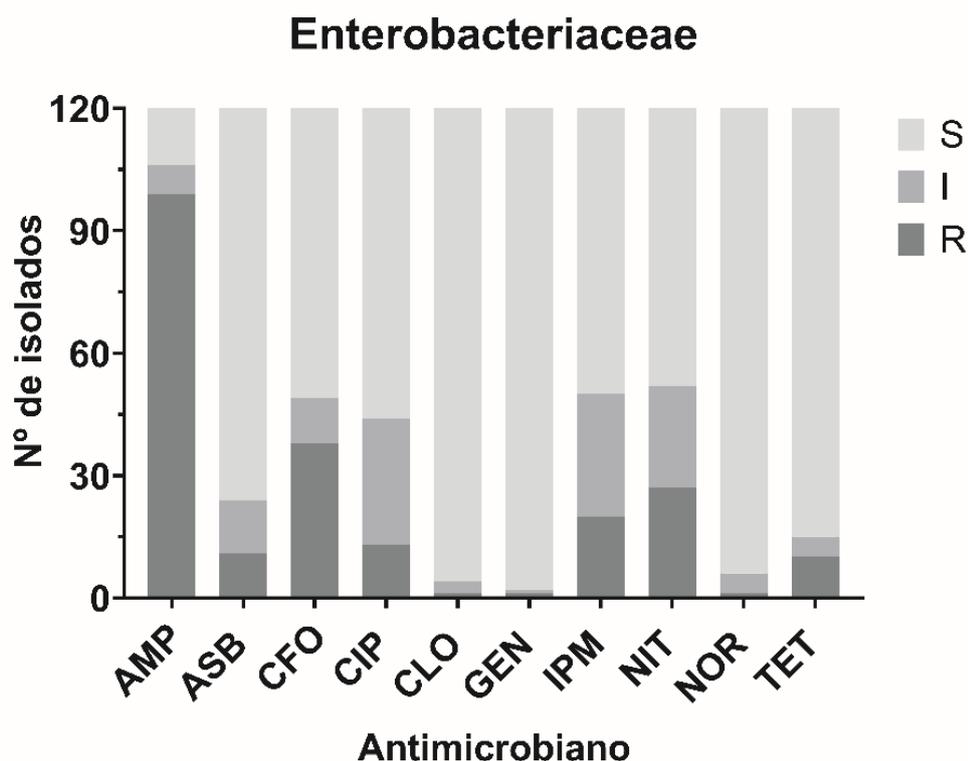


Figura 11. Classificação dos isolados de Enterobacteriaceae submetidos ao teste de suscetibilidade a antimicrobianos. AMP, ampicilina; ASB, ampicilina/sulbactam; CFO, ceftioxime; CIP, ciprofloxacina; CLO, cloranfenicol; GEN, gentamicina; IPM, imipenem; NIT, nitrofurantoína; NOR, norfloxacina; TET, tetraciclina; S, suscetível; R, resistente.

Em relação aos isolados de origem epidérmica (n = 60), foi observada prevalência de isolados com fenótipos de resistência a ampicilina (n = 43; 72%), seguido de resistência a ceftioxime (n = 23; 38%) (Figura 12). Todos isolados de origem epidérmica apresentaram fenótipo de suscetibilidade a ampicilina-sulbactam, gentamicina e norfloxacina.

Quanto aos isolados provenientes da cavidade oral (n = 56), todos apresentaram fenótipo de resistência a pelo menos um dos antimicrobianos utilizados. O fenótipo de resistência a ampicilina foi observado em 55 (98%) isolados, enquanto que, resistência a nitrofurantoína, imipenem, ceftioxime foi observada em 17 (30%), 15 (27%), 15 (27%) isolados, respectivamente. Dos quatro isolados bacterianos de origem fecal, 2 (50%) foram suscetíveis a todos os antimicrobianos testados, enquanto que o fenótipo de resistência a nitrofurantoína foi observada em ambos demais (n = 2; 50%).

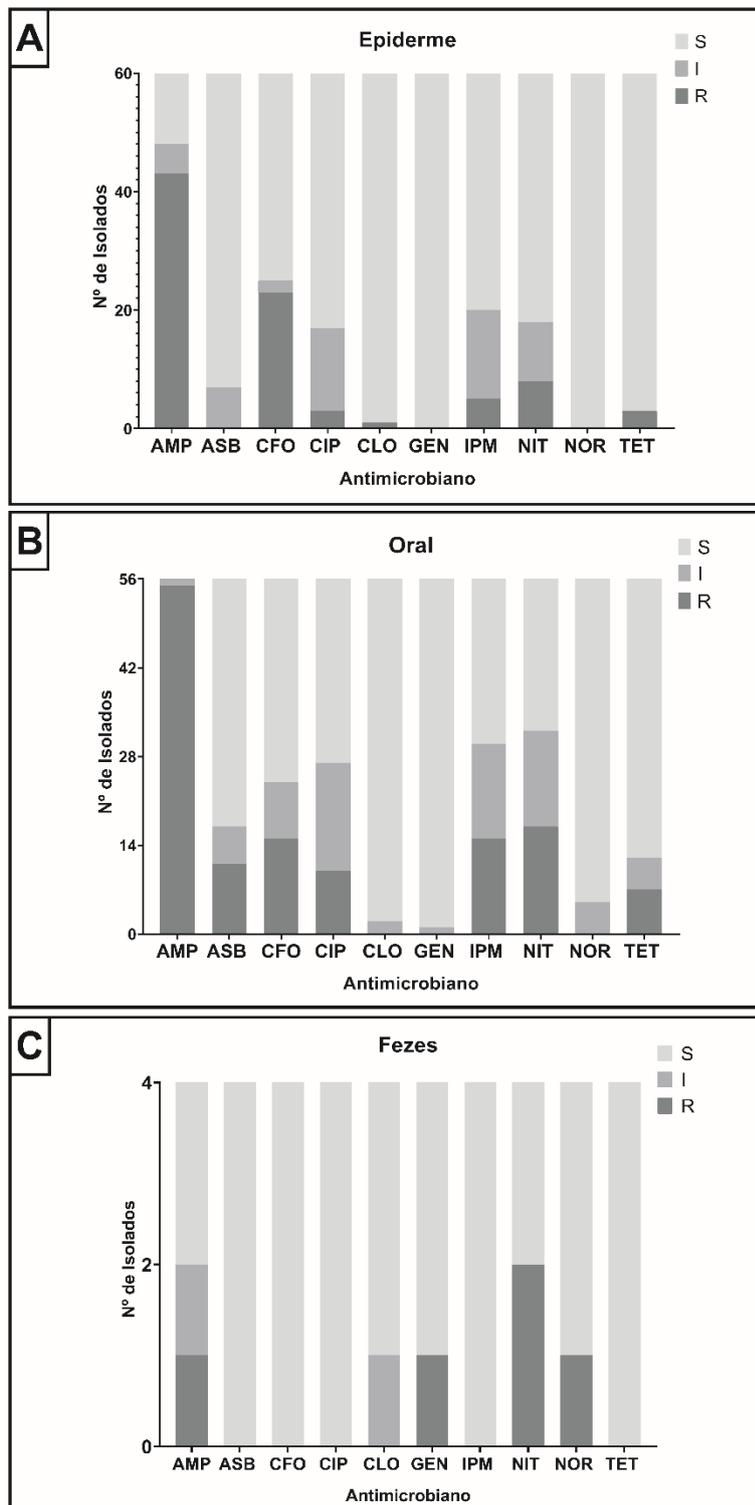


Figura 12. Prevalência de fenótipos observados no teste de suscetibilidade a antimicrobianos quanto a origem dos isolados: epiderme (n = 60), oral (n = 56) e fezes (n = 4). AMP, ampicilina; ASB, ampicilina/sulbactam; CFO, ceftioxina; CIP, ciprofloxacina; CLO, cloranfenicol; GEN, gentamicina; IPM, imipenem; NIT, nitrofurantoína; NOR, norfloxacina; TET, tetraciclina; S, suscetível; R, resistente.

A relação de espécies bacterianas, bem como o número de isolados classificados como resistentes pode ser observada na Tabela 8, para qual, somente foram considerados os isolados que apresentaram resistência a pelo menos um (1) antimicrobiano testado. Portanto, nos isolados resistentes provenientes de amostras epidérmicas foi observado que de 47 isolados, 6 (13%) apresentaram múltipla resistência (MR), 22 (47%) apresentaram resistência a duas classes de antimicrobianos (DR), 19 (40%) foram resistentes a somente um antimicrobiano (UR) (Tabela 7).

O perfil de múltipla resistência foi observado em 15 (27%) dos 56 isolados de amostras orais. Vinte e dois isolados (39%) orais apresentaram resistência a dois antimicrobianos diferentes, e 34% (n = 19) foram resistentes a somente um antimicrobiano (Tabela 7). Dentre os isolados da amostra de fezes, um (50%) apresentou perfil de múltipla resistência, enquanto que no outro, foi observado resistência dupla (n = 1; 50%).

Tabela 7. Resistência a antimicrobianos observada nos isolados de amostras de epiderme (n = 47), oral (n = 56) e fezes (n = 2)*.

Espécie (n)	Nº de isolados resistentes ^a										Perfil de Resistência (%) ^b		
	AMP	ASB	CFO	CIP	CLO	GEN	IPM	NIT	NOR	TET	SR	DR	MDR
Epiderme													
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (1)	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0 (0)	0 (0)	1 (100)
<i>Citrobacter braakii</i> (2)	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0 (0)	2 (100)	0 (0)
<i>Citrobacter freundii</i> (7)	7	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0 (0)	7 (100)	0 (0)
<i>Citrobacter sp.</i> (1)	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0 (0)	1 (100)	0 (0)
<i>Enterobacter sp.</i> (4)	4	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0 (0)	4 (100)	0 (0)
<i>Enterobacter asburiae</i> (2)	2	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0 (0)	1 (50)	1 (50)
<i>Enterobacter cloacae</i> (6)	5	0	6	1	0	0	0	0	0	0	1 (17)	4 (67)	1 (17)
<i>Hafnia alvei</i> (10)	9	0	0	0	0	0	1	0	0	0	10 (100)	0 (0)	0 (0)
<i>Providencia rettgeri</i> (1)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (100)	0 (0)	0 (0)
<i>Serratia fonticola</i> (3)	3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2 (67)	1 (33)	0 (0)
<i>Serratia liquefaciens</i> (1)	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0 (0)	1 (100)	0 (0)
<i>Serratia marcescens</i> (5)	3	0	0	1	0	0	4	5	0	3	1 (20)	1 (20)	3 (60)
<i>Yersinia enterocolitica</i> (1)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (100)	0 (0)	0 (0)
<i>Yersinia nurmii</i> (2)	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2 (100)	0 (0)	0 (0)
<i>Yersinia sp.</i> (1)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (100)	0 (0)	0 (0)
Oral													
<i>Buttiauxella warmboldiae</i> (5)	4	0	5	0	0	0	0	0	0	0	1 (20)	4 (80)	0 (0)
<i>Citrobacter gillenii</i> (3)	3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2 (67)	1 (33)	0 (0)
<i>Citrobacter sp.</i> (9)	9	0	0	0	0	0	0	1	0	0	8 (89)	1 (11)	0 (0)
<i>Enterobacter asburiae</i> (1)	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0 (0)	1 (100)	0 (0)
<i>Hafnia alvei</i> (1)	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0 (0)	0 (0)	1 (100)
<i>Raoultella ornithinolytica</i> (10)	10	0	2	2	0	0	7	1	0	0	1 (10)	7 (70)	2 (20)
<i>Raoultella sp.</i> (1)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (100)	0 (0)	0 (0)
<i>Serratia fonticola</i> (4)	4	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2 (50)	2 (50)	0 (0)
<i>Serratia liquefaciens</i> (1)	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0)	1 (100)	0 (0)
<i>Serratia marcescens</i> (11)	11	6	4	4	0	0	4	7	0	6	2 (18)	0 (0)	9 (82)
<i>Serratia oryzae</i> (2)	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1 (50)	1 (50)	0 (0)
<i>Serratia sp.</i> (2)	2	2	1	1	0	0	1	2	0	1	0 (0)	0 (0)	2 (100)
<i>Serratia surfactantfaciens</i> (1)	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0 (0)	1 (100)	0 (0)
<i>Yersinia massiliensis</i> (5)	5	1	1	2	0	0	0	4	0	0	1 (20)	1 (20)	3 (60)
Fezes													
<i>Morganella morganii</i> (2)	1	0	0	0	0	1	0	2	1	0	0 (0)	1 (50)	1 (50)

*Para o n de isolados nesta tabela, foram considerados somente os isolados que apresentaram resistência a no mínimo um (1) antimicrobiano testado. ^a AMP, ampicilina; ASB, ampicilina-sulbactam; CFO, cefoxitina; CIP, ciprofloxacina; CLO, cloranfenicol; GEN, gentamicina; IPM, imipenem; NIT, nitrofurantoína; NOR, norfloxacina; TET, tetraciclina. ^b UR, única resistência; DR, dupla resistência; MR, múltipla resistência.

5.5. Detecção do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*

Dos 15 suabes epidérmicos coletados em campo para fazer o estudo do fungo, foi possível extrair DNA total de 13 amostras, pois em duas houve vazamento do etanol presente no tubo, inviabilizando a preservação do material genético e biológico. Após a extração de DNA total dos suabes conforme citado no item 4.8, todas as amostras foram submetidas a PCR convencional para detecção do fungo *B. dendrobatidis*. Como não houve amplificação na primeira PCR, as amostras submetidas a reamplificação através de auto *nested-PCR* (Coutinho et al., 2015).

Novamente não houve amostras positivas, havendo amplificação somente do controle positivo (Figura 13). Para confirmar o resultado obtido, também foi efetuada a extração do DNA total dos suabes que foram mantidos em meio de transporte Stuart, os quais já estavam armazenados com glicerol em alíquotas da água peptonada após incubação (item 4.3) e os submetemos a mesma condição de PCR. Todas as reações de PCR foram realizadas em duplicata. Todas as amostras de epiderme testadas foram negativas para a presença do fungo *Bd*.

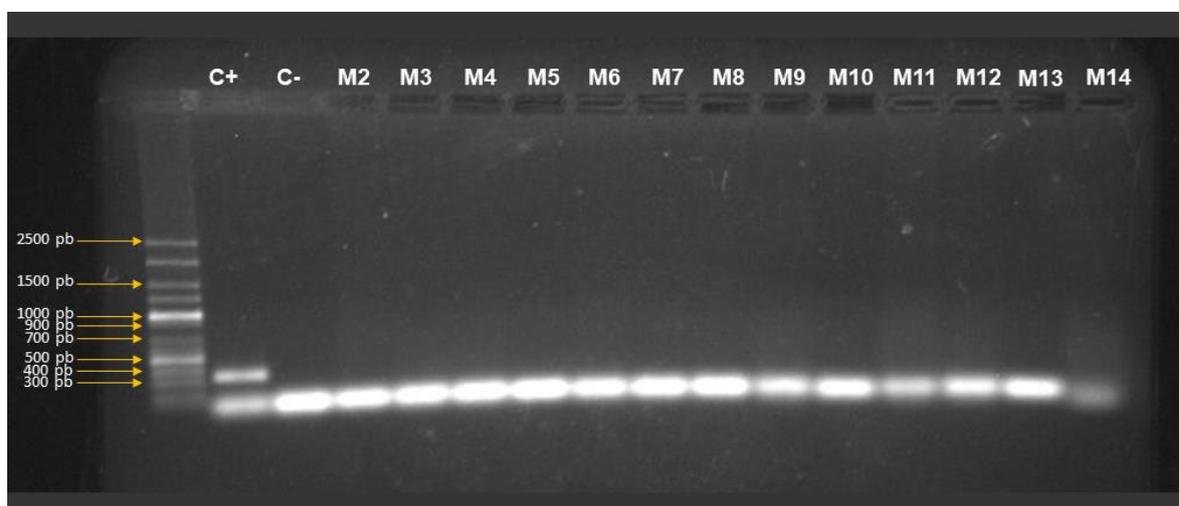


Figura 13. Eletroforese em gel de agarose para a detecção do fungo *B. dendrobatidis* nas amostras epidérmicas de *Melanophryniscus admirabilis*. **C+**, controle positivo; **C-**, controle negativo.

6. DISCUSSÃO

6.1. Bactérias cultiváveis entre os espécimes de *M. admirabilis* coletados: diversidade alfa

A partir das análises relacionadas a diversidade alfa, foi possível notar que a similaridade de diversidade bacteriana epidérmica e da cavidade oral entre os espécimes não está relacionada ao local de ocorrência (quadrantes) dos mesmos, visto que os sapos M1 e M2 – que foram coletados em quadrante diferente dos demais – não apresentaram diferenças significativas em relação aos demais espécimes. Em relação a riqueza de espécies, embora alguns sapos tenham apresentado uma riqueza de espécies maior (M5, M6 e M12) em relação aos demais, os resultados obtidos a partir do índice de Chao-1 não indicaram nenhuma diferença estatisticamente significativa.

As mesmas análises também nos mostram que entre machos e fêmeas não houve diferenças significativas em relação a riqueza e diversidade de espécies bacterianas. Algumas fêmeas apresentaram valor de 0 para os índices de diversidade (M8 e M13; Figura 7), o que indica total dominância de um táxon sobre os demais. Neste caso, os táxons em questão são *Hafnia alvei* entre os isolados epidérmicos, e *Raoultella ornithinolytica* entre os isolados orais. Informações mais detalhadas a respeito das espécies bacterianas serão discutidas nas sessões 6.2.1 e 6.2.2., respectivamente.

Nas amostras das outras duas fêmeas (M1 e M11), a diversidade bacteriana observada foi similar entre si, e também, em relação a diversidade dos machos. No entanto, para uma melhor compreensão a respeito da relação entre sexo e bactérias isoladas, um número maior e equivalente de machos e fêmeas deve ser analisado.

Estes resultados indicam que, possivelmente, o presente trabalho, retrata efetivamente uma parcela significativa da microbiota comensal desses animais, embora nenhuma espécie bacteriana específica (ou particular) tenha sido isolada em todos os indivíduos. Isto pode ter ocorrido devido alguma interação de competição entre os microrganismos no meio de cultura utilizado para o isolamento, pois a

diversidade fenotípica das colônias obtidas foi muito baixa. Diversas espécies do gênero *Bacillus* são produtoras de uma grande variedade de compostos antimicrobianos, como bacteriocinas, peptídeos, lipopeptídeos (Bartel et al., 2019), e podem apresentar caráter competitivo contra outras bactérias, como por exemplo, *Listeria monocytogenes* (Alonso et al., 2020).

No presente trabalho, *Bacillus* sp. foi uma das espécies mais abundantes dentre os isolados obtidos (37/173). O crescimento atípico obtido na amostra epidérmica do indivíduo M2 - que teve que ser desconsiderada da contagem do trabalho - é provavelmente de alguma espécie de bacilo, de acordo com os especialistas consultados (observação pessoal de docentes do Departamento de Microbiologia). A presença de bactérias do gênero *Bacillus* pode ser uma explicação para a baixa riqueza de espécies observada em cada indivíduo de *M. admirabilis*, visto que em situação *in vitro* estes microrganismos poderiam estar secretando compostos antimicrobianos que inibem o crescimento de outros microrganismos.

Analisando a microbiota oral de *M. admirabilis* através de sequenciamento de fragmentos da região V4 do gene *16S rRNA*, Mann et al., (2021) verificaram que Enterobacteriaceae foi a terceira família bacterianas mais abundante identificada, similar ao presente trabalho. Portanto, a realização de análises genotípicas por meio de sequenciamento de nova geração para identificação de microrganismos não-cultiváveis, seria de extrema importância para complementar os resultados obtidos.

6.2. Bactérias cultiváveis entre os grupos amostrais: diversidade beta

Ao analisar as três comunidades bacterianas entre si, foi observado que a comunidade bacteriana presente nas fezes obteve menor riqueza e diversidade de espécie comparado com as demais. Diferentes fatores podem ter influenciado neste resultado, tais como a dieta restrita dos animais, as condições de cultivo em laboratório, e a pequena quantidade de amostra obtida. Por exemplo, para um estudo de imunoenensaio enzimático, foram necessários 100 mg de conteúdo fecal de anuros da espécie *Geocrinia* sp. (Hogan et al., 2013), e para a análise de presença de *Entamoeba* em sapos cururu (*Rhinella marina*), e outras espécies nativas da Austrália,

como *Limnodynastes convexiusculus*, *Cyclorana australis*, e *Litoria* sp., os animais foram mantidos em sacos plásticos por um período de 24 horas (Rivory et al., 2020).

Logo, diante do n amostral do qual foi obtido o conteúdo fecal no presente trabalho ($n = 6$), a metodologia utilizada foi considerada como uma variável significativa para a quantidade de espécies bacterianas observada nas amostras fecais, visto que o esforço amostral possui uma relação direta com a riqueza de espécies (Melo, 2008).

Em contraste, Melo (2008) indica que para os índices de diversidade, o esforço amostral não é significativo. A diferença observada nos resultados dos índices de Simpson e Shannon para as amostras fecais (Fig. 9) não está relacionada ao tamanho amostral, e sim as características de cada teste estatístico. O Índice de Simpson está relacionado a dominância de espécies, logo, um valor alto representa uma baixa diversidade e um maior grau de dominância de uma espécie. Já o Índice de Shannon considera o mesmo peso para espécies raras e comuns, portanto, quanto maior o valor do índice, maior a diversidade de espécies (Uramoto et al., 2005). Isto posto, nossos resultados indicam que a comunidade bacteriana fecal de *M. admirabilis* possui menor diversidade bacteriana do que as comunidades epidérmicas e orais, e que nesta, a espécie *Morganella morganii* é predominante em relação as demais bactérias.

6.2.1. Diversidade e relevância das bactérias isoladas de amostras epidérmicas de *M. admirabilis*

A diversidade da comunidade bacteriana presente na pele de anuros é afetada por fatores abióticos como elevação, latitude e algumas variáveis bioclimáticas (Ruthsatz et al., 2020; Lambertini et al., 2021), bem como por fatores hospedeiro-específicos como a própria espécie, estágio de desenvolvimento e habitat (McKenzie et al., 2012; Bletz et al., 2017; Prest et al., 2018). Além disso, alguns microrganismos da microbiota presente na pele dos anfíbios, são capazes de secretar metabólitos antifúngicos capazes de inibir o crescimento do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Loudon et al., 2014; Woodhams et al., 2015; Bresciano et al., 2015).

Neste presente estudo, *Bacillus* sp. foi um dos microrganismos mais abundantes na comunidade bacteriana epidérmica. Resultados similares foram obtido

por Flechas et al., (2019), onde identificaram este gênero na comunidade bacteriana da epiderme de anuros como *Dendropsophus labialis* (Hylidae) e *Rheobates palmatus* (Aromobatidae). O gênero *Bacillus* é capaz de produzir diversos compostos antimicrobianos, dentre eles peptídeos, bacteriocinas, lipopeptídeos ribossomais e não-ribossomais (Sumi et al., 2015; Bartel et al., 2019). Através de métodos dependentes de cultivo, Rebollar et al., (2019) identificaram que 20 dos 50 isolados de bacilos obtidos de *Dendropsophus ebraccatus* (Anura: Hylidae), foram capazes de inibir o crescimento do fungo *Bd*. Bactérias com capacidade de inibir o crescimento de fungos sobre a epiderme de anuros tem sido documentada. Um dos microrganismos mais conhecidos por inibir o crescimento do fungo *Bd*, é a bactéria *Janthinobacterium lividum*, a qual é capaz de produzir os metabólitos secundários violaceína e indol-3-carboxaldeído, que possuem propriedade antifúngica (Brucker et al., 2008).

Outra bactéria identificada com elevada frequência nas amostras de epiderme foi *Bacillus cereus*. Esta espécie habita diversos ambientes, como solo, água, certas plantas, em alimentos, larvas de insetos, pele de humanos e em quase todas as superfícies (Glasset et al., 2018). A presença desta bactéria em epiderme de anuros foi demonstrada anteriormente por Flechas et al., (2019), em amostras de *D. labialis* e *R. palmatus*, no qual a espécie foi isolada e demonstrou inibir o crescimento de *Bd* em girinos e anuros adultos.

Além de bacilos, outra espécie que também foi abundante no presente estudo e também é capaz de inibir o crescimento do fungo *Bd* (Madison et al., 2017), são as bactérias *Serratia* sp. Bactérias do gênero *Serratia* são comumente encontradas em amostras epidérmicas de diversas espécies de anfíbios (Woodhams et al., 2015, 2018). No presente estudo foram isoladas as espécies de *S. liquefaciens* em amostras epidérmicas do sapo M1, e de *S. fonticola* no sapo M5. Estes resultados corroboram novamente com Flechas et al., (2019), que isolaram estas espécies de suabes de epiderme de *D. labialis* e *R. palmatus*. Segundo os autores estas espécies também demonstraram capacidade de inibir o crescimento de *Bd* em ambas as espécies de anuros. Por outro lado, uma das doenças bacterianas mais comum em anfíbios, é a síndrome *red leg*, a qual confere uma manifestação cutânea de septicemia bacteriana, e pode ser causada por bactérias da espécie *S. liquefaciens*, embora seja comumente atribuída a *Aeromonas hydrophila*, bem como a outros

gêneros bacterianos tais quais *Pseudomonas*, *Chryseobacterium*, *Acinetobacter* e *Citrobacter freundii* (Pessier, 2002; Schadich & Cole, 2010). Embora todos os indivíduos analisados no presente trabalho não apresentassem nenhum sintoma clínico de lesões - como hemorragia ou eritema nos membros posteriores (Schadich & Cole, 2010) - a presença dos isolados de *S. liquefaciens* na epiderme do sapo M1 poderia ser um indício de início de infecção e desenvolvimento da síndrome *red leg*.

Duas espécies de *Aeromonas* foram identificadas nas amostras de epiderme. A *A. hydrophila* é comumente encontrada em ambientes aquáticos, podendo atuar como um patógeno oportunista para humanos, aves, anfíbios, répteis e diversas espécies de peixes de água doce, tais como salmão, carpas, bagre-americano e a truta-arco-íris, sendo responsável por causar septicemia nesses animais (Cao et al., 2020; Richardson et al., 2021; Yin et al., 2021). Muitas outras espécies do gênero também são patogênicas para peixes, dentre elas, *A. jandaei* (Cheek et al., 2020; Pessoa et al., 2020), que também foi identificada no presente trabalho. A ictiofauna do Rio Forqueta possui uma grande riqueza de espécies, e peixes como carpas e bagres já foram registrados no local (Ferrer et al., 2013). É provável que os próprios peixes sejam os vetores de contaminação para os sapinhos-admiráveis-da-barriga-vermelha, visto que cepas que infectam esses animais possuem crescimento ótimo em temperaturas entre 22 e 25 °C (Janda & Abbott, 2010).

No presente trabalho, *A. hydrophila* foi um dos microrganismos que foram isolados tanto em amostras epidérmicas, quanto em amostras orais, apesar de não ter sido tão abundante em ambas. Alguns isolados só puderam ser identificados através do sequenciamento do gene *16S rRNA*, pois cresceram em pouca quantidade, que não foi suficiente para identificação confiável por meio do Maldi-TOF. O baixo crescimento desse microrganismo neste estudo pode ter sido devido a temperatura de incubação ao qual foi submetido (padrão de 37 °C), o que nos leva à hipótese de que as cepas de *A. hydrophila* e *A. jandaei* que infectam peixes, também são capazes de contaminar anuros.

Entretanto, apesar deste microrganismo ser patogênico para anuros, os espécimes dos quais *A. hydrophila* foram isolados não apresentavam nenhum sintoma aparente da síndrome *red leg*, porém, estudos *in-vitro* demonstraram que a *A. hydrophila* causa morbidade ou mortalidade nos animais a partir do sexto dia de

exposição (Pearson, 1998; Schadich & Cole, 2010), o que junto com a baixa abundância, e a presença de *S. liquefaciens* em um espécime (M1), pode ser um indicativo de que talvez nossa coleta tenha sido realizada num período inicial de infecção.

Neste estudo, *Citrobacter freundii* foi isolada somente em amostras epidérmicas, bem como outra espécie do gênero, *C. braakii*. A espécie *C. freundii* já foi isolada de suabes de epiderme de *D. labialis* e *R. palmatus* (Flechas et al., 2019) e de *Pelophylax ridibundus* (Dökenel & Özer, 2019). Nos anuros *D. labialis* e *R. palmatus*, os isolados de *C. freundii* demonstraram capacidade de inibir o crescimento de *Bd* (Flechas et al., 2019). Por outro lado, esta espécie é um dos patógenos comuns em raniculturas, por ser um dos agentes etiológicos da síndrome *red-leg* (Mauel et al., 2002; Pasteris et al., 2011). Esta espécie, pertencente à família Enterobacteriaceae possui ampla distribuição, ocorrendo na água, no solo, em alimentos e no intestino de humanos e animais (Liu et al., 2018). Em humanos é um patógeno causador de diversas infecções envolvendo o trato urinário, rins, fígado, meninges e corrente sanguínea (Liu et al., 2018; Samonis et al., 2009). A presença de *C. braakii* pode estar associada ao habitat de *M. admirabilis*, uma vez que esta espécie foi isolada de amostras de água onde viviam anuros *P. ridibundus* (Dökenel & Özer, 2019).

Somente um isolado de *Acinetobacter calcoaceticus* foi identificado neste trabalho, o qual fora isolado a partir de amostras epidérmicas. *Acinetobacter calcoaceticus* é comumente isolada a partir de fontes ambientais como solo e água, e também em ambientes hospitalares (Bilgic et al., 1995; Zhan et al., 2011). A presença dessa espécie já foi descrita recentemente em amostras de epiderme de girinos de *R. palmatus*. Nestes animais esta espécie apresentou atividade inibitória frente a *Bd* (Flechas et al., 2019). A presença de *A. calcoaceticus* em ambientes naturais é de suma relevância, principalmente em águas residuais das indústrias (como em esgotos) visto que este microrganismo atua como biorremediador, pois utiliza como fonte de carbono, o fenol que é descartado nos esgotos (Zhan et al., 2011).

Além disso, em ambientes naturais *A. calcoaceticus* atua ativamente em importantes processos metabólicos, bem como nos ciclos de nutrientes, e também tem sido utilizado como bioindicador de contaminação fecal em águas doces (Serwecińska et al., 2021). Sua baixa presença dentre os isolados identificados no

presente trabalho, bem como a ausência de isolados de *Escherichia coli*, um dos principais indicadores de contaminação fecal em ambientes aquáticos, poderia ser um indicativo de que o nível de contaminação fecal no ambiente da região é relativamente baixo. No entanto, o grupo dos coliformes fecais é composto por outras bactérias além de *E. coli*, como as pertencentes aos gêneros *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella* (Serwecinska et al., 2021).

Destas, dentre os microrganismos obtidos neste trabalho estão os gêneros *Citrobacter* e *Enterobacter*, sendo este último, um dos gêneros mais abundantes entre as amostras epidérmicas de *M. admirabilis*. *Enterobacter cloacae* é uma espécie onipresente em ambientes terrestres e aquáticos como água, solo, alimentos e esgotos, ocorre como microrganismo comensal do trato intestinal de humanos e animais, e é considerado um patógeno de plantas e insetos (Davin-Regli & Pagès, 2015). Sua presença pode, portanto, ser um indicativo de que na verdade há contaminação fecal a partir do Rio Forqueta, porém, a presença de *A. calcoaceticus* e *E. coli* na microbiota desses animais pode estar sendo inibida por algum metabólito secundário produzido por estes.

Já *E. asburiae* faz parte do complexo de *Enterobacter cloacae* e recentemente fora identificada na urina de novilhos em uma fazenda no estado de Minas Gerais, Brasil, sendo esta a primeira identificação em animais de criação (Giannattasio-Ferraz et al., 2020). Zhou et al., (2019) demonstraram que uma cepa de *E. asburiae* foi capaz de reduzir a toxicidade de cádmio em plantações de milho devido à redução nas taxas de transpiração, bem como a inibição da expressão de genes relacionados à captação de ferro causados pela sua presença. Portanto, a presença de bactérias dessa espécie na epiderme dos sapos pode ser justificada pela provável disseminação destas no Rio Forqueta, a partir das plantações de milho e criações de gado na região ao redor do local de ocorrência da população de *M. admirabilis*.

Hafnia alvei foi uma das espécies bacterianas abundantes dentre as amostras epidérmicas. *H. alvei* é uma bactéria Gram-negativa, componente da microbiota intestinal de humanos e alguns animais como répteis, peixes, aves, e alguns invertebrados (Padilla et al., 2015). É um microrganismo comumente encontrado em ambientes naturais como no solo e água, e também em esgotos (Moreno et al., 2009). *H. alvei* é considerada um patógeno oportunista em humanos,

geralmente acometendo pacientes imunocomprometidos, causando diversas patologias como septicemia, endocardites, pneumonia, meningite, infecções do trato urinário, entre outros (Alaygut et al., 2020). Já na medicina veterinária, tem sido relacionado a diversas doenças em uma grande variedade de espécies animais, como vacas, galinhas, cabras, patos, peixes e abelhas (Padilla et al., 2015), no entanto, ainda não há estudos relacionados a sua patogenicidade em anuros. Considerando que este microrganismo, no presente trabalho, foi detectado nos três tipos de amostras – orais, epidérmicas e fecal – é provável que *H. alvei* faça parte de algum componente da dieta alimentar dos sapos, tornando-se comum no trato gastrointestinal desses animais, e conseqüentemente, presente nas fezes dos mesmos. A liberação das fezes no ambiente, pode ser uma explicação para a presença deste microrganismo na superfície cutânea dos sapos, assim como o próprio contato com a água.

Alguns microrganismos identificados nas amostras epidérmicas tiveram baixíssima abundância (1 a 3 isolados), como *Lactococcus garvieae*, *Providencia rettgeri*, *Yersinia enterocolitica* e *Y. nurmii*, as quais ocorreram exclusivamente neste tipo de amostra. Apesar de baixa abundância, a presença de *L. garvieae* requer atenção, pois esta bactéria é considerada um patógeno zoonótico emergente sendo responsável pela doença denominada de lactococose em peixes, causando septicemia hemorrágica nesses animais (Meyburgh et al., 2017). Em humanos, esta bactéria pode causar endocardite, colecistite e discoespondilite, e tais infecções geralmente estão associadas com a ingestão de frutos-do-mar crus (Chan et al., 2011; Kim et al., 2013). *Lactococcus garvieae* é uma bactéria Gram-positiva, amplamente distribuída no ambiente (Guijarro et al., 2015), e já foi isolada em animais endotérmicos, como vacas, porcos, gatos e cavalos (Aguado-Urda et al., 2013). Diversos estudos têm considerado *L. garvieae* como um probiótico para anuros, devido a capacidade de produção de metabólitos antagonistas (Montel-Mendoza et al., 2012), e pela capacidade de inibição do fungo *B. dendrobatidis* (Niederle et al., 2019). Diante disso, sua presença na população de *M. admirabilis* pode estar sendo benéfica para estes animais, atuando em sinergia com as bactérias do gênero *Bacillus* na proteção contra o fungo *Bd*. Além disso, sua presença pode ser utilizada para conscientização da conservação de *M. admirabilis*, visto que entre os animais e a

bactéria pode haver uma relação de comensalismo, e desta forma, evitando que este patógeno atinja humanos.

O mesmo pode ser aplicado para a presença das bactérias do gênero *Yersinia*. Na Europa, Yersiniose é a terceira zoonose mais frequentemente reportada, a qual é causada pela bactéria *Y. enterocolitica*, que está amplamente distribuída no ambiente (Morka et al., 2018). Porcos são considerados reservatórios assintomáticos de cepas patogênicas de *Y. enterocolitica* (De Boer & Nouws, 1991; Laukkanen-Ninios et al., 2014), e como há algumas criações de porcos ao redor da região do Perau de Janeiro, próximo do Rio Forqueta, está poderia ser uma justificativa para a presença deste microrganismo na superfície epidérmica dos sapos.

O gênero *Providencia* tem sido identificado em amostras orais e cloacais de diversos répteis, como serpentes (Iqbal et al., 2014; Artavia-León et al., 2017) e tartarugas (Hacioglu & Tosunoglu, 2014), no entanto, ainda não havia sido detectada em amostras de anuros. *P. rettgeri* é um bacilo Gram-negativo, pertencente à família Enterobacteriaceae (Sharma et al., 2017). É considerado um patógeno nosocomial, podendo causar quadros de peritonite, infecções do trato urinário e sepse neonatal (Barrios et al., 2013; Wang et al., 2014; Sharma et al., 2017). Na área clínica tem chamado atenção por ser um microrganismo multirresistente, produtor da Nova Deli metalo- β -lactamase (NDM), a mais recente descoberta metalo- β -lactamase de Classe B transferida de forma molecular (Barrios et al., 2013; Carvalho-Assef et al., 2013).

6.2.2. Diversidade e relevância das bactérias isoladas de amostras orais de *M. admirabilis*

Bactérias do gênero *Bacillus* sp. foram as mais frequentes nas amostras de suabes orais. *Bacillus thuringiensis*, é uma bactéria utilizada como controle biológico, como alternativa aos produtos químicos, eficaz contra estágios larvais de insetos de diversas ordens devido a liberação de toxinas, denominadas Cry ou Cyt (Bravo et al., 2011). No presente trabalho, este microrganismo teve baixa abundância, sendo isolado somente no sapo M1 e no *pool* de fezes, o que indica que provavelmente sua presença esteja associada à sua alimentação, a qual é composta majoritariamente por artrópodes (Lima, 2014).

Outro microrganismo que pode estar associado a dieta alimentar dos animais, são as bactérias do gênero *Serratia*, por terem sido isoladas somente em amostras orais, e por *S. marcescens* ser um microrganismo simbiote de formigas saúva, *Atta sexdens rubropilosa* (Sclocco & Teseo, 2020). Bactérias do gênero *Serratia* são Gram-negativas, pertencentes à família Enterobacteriaceae, e atualmente estão descritas 18 espécies (Soenens & Imperial, 2020). São microrganismos de ampla distribuição, estando presentes no solo, na água, em plantas, alimentos, insetos, animais vertebrados e em humanos (Pan et al., 2021).

Somente quatro espécies do gênero (*S. marcescens*, *S. lymuthica*, *S. nematodiphila* e *S. rubidaea*) são capazes de produzir um pigmento vermelho denominado prodigiosina, o qual além de possuir propriedades antifúngicas, sendo eficaz na inibição do fungo *Bd* (Woodhams et al., 2018), também possui atividades antibacterianas, anti malária, antiparasitária e imunossupressoras (Pan et al., 2021).

Em seu trabalho utilizando cepas selvagens e mutantes (com alteração na rota de síntese de prodigiosina) de *S. marcescens*, Madison et al. (2019) verificaram que a presença de prodigiosina modula a composição da microbiota cutânea do hospedeiro, sendo *Serratia* o microrganismo mais abundante. A prodigiosina é capaz de inibir o crescimento de bactérias do gênero *Bacillus*, como *B. cereus*, *B. subtilis* e *B. thuringiensis* (Soenens & Imperial, 2020), o que explica a ausência de bactérias deste gênero nas amostras orais em que houveram isolados de *Serratia* sp., (M2, M5, M7, M14 e M15) bem como a presença de bacilos somente nas amostras que não houve crescimento de *Serratia* sp. (M1, M10 e M12).

Além da prodigiosina, bactérias deste gênero também são capazes de produzir carbapenêmicos, compostos orgânicos voláteis e outros metabólitos secundários com potencial de inibição de diversos microrganismos, tais como *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterobacter faecalis*, e também contra parasitas como *Caenorhabditis elegans* (Soenens & Imperial, 2020). A produção de todos esses metabólitos secundários nas bactérias *Serratia*, justifica a prevalência deste gênero dentre as amostras orais do presente estudo, sendo este o primeiro registro deste microrganismo em amostras orais de indivíduos do gênero *Melanophryniscus*.

Os isolados de *Yersinia massiliensis*, *Serratia oryzae* e *S. fonticola* foram identificados a partir do gene *16S rRNA*, e ao comparar com as sequências genéticas do banco de dados do NCBI apresentaram similaridade de 99,7%, 99,15% e 99,15%, respectivamente, com as cepas presentes do banco de dados (códigos de acesso NR_044152.1; NR_157762.1; NR_116808.1). *Yersinia massiliensis* é um bacilo flagelar Gram-negativo, tendo sido isolado pela primeira vez em amostras de água doce (Merhej et al., 2008). Este microrganismo tem sido encontrado em amostras de água e de alimentos, incluindo leite pasteurizado, e está classificada como não patogênica para humanos, embora ainda sejam escassos os estudos relacionados a esta espécie (Souza et al., 2011). Não há registros na literatura sobre a ocorrência dessa espécie em animais, sendo este o primeiro trabalho a detectar esse microrganismo em anuros, bem como em animais vertebrados em geral.

Serratia oryzae também é uma bactéria que foi descrita recentemente, sendo isolada de caules de arroz (Zhang et al., 2017). Embora não faça parte da dieta alimentar dos sapos, ao redor da região há plantações de arroz, as quais podem estar sendo irrigadas pelo Rio Forqueta, sendo este um intermédio de contato entre a bactéria e o hospedeiro. Visto que este microrganismo foi obtido a partir de amostras orais, uma outra hipótese pode ser elaborada: a de que os artrópodes dos quais os sapos se alimentam, percorram as plantações de arroz, e então, tornam-se vetores deste microrganismo, o que explicaria sua presença na cavidade oral dos sapos.

A outra espécie do gênero identificada nas amostras orais do presente estudo, *S. fonticola*, foi primeiramente isolada em amostras de água doce, e já foram isoladas em amostras de pele de crocodilo e anuros (Flechas et al., 2019; Garcia et al., 2008; Gavini et al., 1979). Recentemente, foi descoberta como patogênica para humanos, podendo causar quadros de infecção do trato biliar, e endocardite, embora os casos de infecção ainda sejam raros (Hai et al., 2020; Espinoza et al., 2021). Além disso, Hai et al., (2020) verificaram que esta espécie foi resistente a todas as classes de antibióticos testadas, o que a torna um potencial patógeno emergente para humanos. Até o momento, não existem relatos da presença dessa bactéria em amostra de suabes orais de anuros.

Além de *Serratia* sp., outra bactéria abundante dentre os isolados de amostras orais foi *Raoultella ornithinolytica*, um bacilo Gram-negativo e encapsulado,

comumente encontrado em ambientes naturais aquáticos, e pode ser isolada em peixes e artrópodes como carrapatos e cupins (Sękowska, 2017). Recentemente, *R. ornithinolytica* foi isolada pela primeira vez em amostras de suínos (JiaQi et al., 2018). Assim como visto para a bactéria *Y. enterocolitica* isolada a partir das amostras epidérmicas no presente trabalho, a criação de suínos nas proximidades do Perau de Janeiro poderiam ser a fonte de contato entre este microrganismo e os sapos. No entanto, como este microrganismo fora isolado em amostras orais, a hipótese mais provável é que sua presença esteja relacionada a alimentação, composta por artrópodes.

Atualmente, *R. ornithinolytica* foi classificada como um patógeno zoonótico emergente, por ter a capacidade de converter histadina em histamina em peixes, provocando a denominada síndrome escombóide, a qual também pode afetar humanos em caso de ingestão de um animal contaminado, provocando quadros de e envenenamento com sintomas como rubor da pele, náuseas, vômitos e tontura (Kanki et al., 2002; Sękowska, 2017). Embora não haja estudos sobre como este microrganismo afeta o metabolismo de anuros, a busca por este entendimento é essencial diante do potencial zoonótico desta bactéria.

Registros de ocorrência do gênero *Buttiauxella* em animais são escassos, no entanto, recentemente foi identificado sua presença em uma análise do microbioma de salamandras da área urbana de Nova York (Barnes et al., 2020). Sua ocorrência no presente trabalho pode ser considerada como primeiro registro em anfíbios da Ordem Anura. Assim como *Buttiauxella*, a bactéria *Pseudomonas luteola* também não é comumente isolada em animais. *P. luteola* é um bacilo Gram-negativo, que apresenta motilidade e é comumente encontrada no solo, na água e em ambientes úmidos (Milliron et al., 2020). Os únicos registros em animais foram em trutas-arco-íris, zebra-fish, furões e em gatos domésticos, todos eles associados a algum quadro de inflamação (Altinok et al., 2007; Baum et al., 2015; Cantas et al., 2012; Milliron et al., 2020).

A partir de sequenciamento do gene *16S rRNA* através do *Ion Personal Genome Machine*, Mann et al., (2021) identificaram 39 ordens predominantes nas amostras orais de *M. admirabilis*, das quais sete ordens foram as mais representativas: Burkholderiales, Bacteroidales, Lactobacillales, Clostridiales,

Enterobacteriales, Pseudomonales e Actinomycetales. Duas dessas ordens foram identificadas no presente trabalho, Enterobacteriales e Pseudomonadales, sendo a primeira a mais abundante. Outras ordens que foram identificadas no presente estudo – Aeromonadales e Bacillales – podem ter sido pouco representativas nas amostras analisadas por Mann et al., (2021), com uma abundância menor que 5% e, portanto, categorizadas como “outros”. Estes resultados tornam-se complementares, aumentando o conhecimento a respeito da microbiota oral de *M. admirabilis*, bem como fortalecem a ideia de que o conjunto do uso de métodos dependentes de cultivo e não-dependentes de cultivo podem fornecer maiores resultados.

6.2.3. Diversidade e relevância das bactérias isoladas das amostras de fezes de *M. admirabilis*

Nas amostras de fezes a riqueza de espécies foi baixa, em comparação as demais. Diferente do observado nas amostras orais e epidérmicas, aqui o gênero *Bacillus*, não fora abundante, totalizando apenas 2 isolados dentre os 16 obtidos a partir do *pool* de fezes. Em trabalhos cujo objetivo foi identificar a microbiota intestinal de outra espécie de anuro (*Rana dybowskii*) a partir de análises do gene *16S rRNA*, também foi constatada uma baixa representatividade da família Bacillaceae (Tong et al., 2019, 2020). Embora tenham sido empregados métodos dependentes de cultivo no presente trabalho, o resultado obtido reflete o que fora verificado nos estudos citados.

A partir do meio de cultivo Sal/Manitol, só foi obtido crescimento bacteriano na amostra fecal, nos quais os isolados foram identificados como *Staphylococcus epidermidis*. Esta bactéria tem sido relacionada como agente patogênico de anuros, como causador de úlceras na pele desses animais, e um possível microrganismo causador da síndrome *red-leg* (Mauel et al., 2002; Tong et al., 2019). Este gênero foi identificado em amostra de fezes de *Rana dybowskii* (Tong et al., 2020). Estudos identificaram a presença de *S. epidermidis* em amostras cloacais de rãs-touro americanas, *Lithobates catesbeianus*, e de amostras intestinais de *R. dybowskii*, ambas mantidas em cativeiro (Montel-Mendoza et al., 2012; Tong et al., 2019).

Nas amostras fecais do presente trabalho, também foram isolados *Morganella morganii*, *Hafnia alvei* e *Lysinibacillus sphaericus*. A bactéria *Morganella morganii* é uma bactéria Gram-negativa, comumente encontrada no ambiente e no trato intestinal de humanos, demais mamíferos (González-Fuentes et al., 2010; Suzuki et al., 2021) e répteis (Wimalasena et al., 2017; 2019) como componente natural da microbiota. Estudos a respeito da presença desse microrganismo em anuros ainda são escassos, no entanto, a nível de gênero, *Morganella* foi identificado em amostras do intestino de *Fejervarya limnocharis*, uma espécie de rã que ocorre no sul e sudeste asiático (Chang et al., 2016).

Morganella morganii também foi isolada em amostras de bexiga urinária de indivíduos de *Rana temporaria* (Fock et al., 2013). A patogenicidade de *M. morganii* em anfíbios foi verificada em um estudo com a salamandra gigante chinesa, *Andrias davidianus* (Wang et al., 2013). Nele, os autores realizaram necropsia em um espécime de *A. davidianus* encontrado morto, isolaram o microrganismo e realizaram experimentos de infecção *in vivo*. Verificaram que nesses animais, o índice de mortalidade foi de 70% (2 dos 3 animais infectados; outros 3 animais compunham o grupo controle), e as alterações patológicas causadas pela infecção por *M. morganii* atingiam o baço, coração, fígado, rins e intestino das salamandras.

Os mecanismos de patogenicidade de *M. morganii* ainda são desconhecidos, e em anfíbios, os estudos ainda estão restritos a Ordem Caudata (Wang et al., 2013). No entanto, Chang et al., (2016) sugere que o intestino de anfíbios atua como reservatórios de diversos patógenos, os quais são adquiridos através da dieta alimentar, na qual são ingeridos artrópodes que estão em sua maioria, em contato direto com o solo.

Até o momento, há um único registro de *H. alvei* na microbiota intestinal de anuros (Montel-Mendoza et al., 2012), sendo este feito com espécies de cativeiro, e através de metodologias cultiváveis. Entretanto, em amostras de bexiga urinária de *Rana temporaria*, *H. alvei* foi o microrganismo mais abundante (Fock et al., 2013). A maioria dos trabalhos sobre a microbiota intestinal, ou fecal, de anuros é realizada através de metodologias não-cultiváveis, a qual, muitas vezes, limita a identificação dos microrganismos a nível de família. Um estudo com *Rana pipiens* identificou isolados de *H. alvei* em amostras de baço submetidos a pH 5.5 (Simon et al., 2002).

Os autores sugerem que a presença desse microrganismo no baço, pode ser devido as alterações no ambiente as quais desencadeiam uma cascata de eventos fisiológicos, que se iniciam com uma imunossupressão, seguida de distribuição sistêmica de bactérias oportunistas, podendo levar sapos adultos a morte. A exposição a pH mais ácidos promove um rompimento na integridade da barreira do epitélio intestinal, permitindo que bactérias comensais do intestino se desloquem para a corrente sanguínea, e assim, atingindo o baço (Simon et al., 2002). Diante os resultados obtidos no presente estudo, é provável que *H. alvei* seja adquirido através da dieta alimentar, tornando-se componente da microbiota intestinal desses animais.

6.3. Ausência de enterococos nas amostras testadas

No presente trabalho, o resultado positivo obtido para o gene *tuf* na amostra do *pool* de fezes não pode ser tido como uma garantia da presença do gênero *Enterococcus*, visto que o mesmo gene também é considerado um marcador para outros gêneros bacterianos como *Staphylococcus* e *Streptococcus* (Iversen et al., 2020; Kosecka-Strojek et al., 2020). Visto isso, a confirmação do gene *tuf* nas amostras fecais é justificada pela presença dos isolados de *Staphylococcus epidermidis* obtidos nessas mesmas amostras, a partir do meio de cultura Sal-Manitol.

Bactérias do gênero *Enterococcus* têm sido isoladas em diversos animais selvagens, tanto em vertebrados (Santestevan et al., 2015; Prichula et al., 2016, 2020; Medeiros et al., 2016, 2017; Grassotti et al., 2018; Araujo et al., 2020) quanto em invertebrados (Huff et al., 2020). Em anuros, a presença de enterococos tem sido relacionada a patogenicidade nesses animais, sendo comumente encontrado na microbiota intestinal de indivíduos diarreicos (Tong et al., 2020), no entanto, ainda são escassos os registros a cerca deste microrganismo em anuros.

Conforme visto em outras espécies de anuros, como *Lithobates palustris* (Ranidae), *Rana limnocharis* (Dicroglossidae), e o gênero *Phyllomedusa* (Phyllomedusidae), há diversos peptídeos antimicrobianos capazes de inibir o crescimento de *Enterococcus* spp., (Barran et al., 2020; Cardoso et al., 2014; Wang et al., 2016), bem como de *E. coli* (Rollins-Smith et al., 2005) logo, é provável que os indivíduos de *M. admirabilis* também sejam capazes de produzir AMP similares, e

estes estejam de fato inibindo o crescimento de enterococos. Estudos relacionados à produção de peptídeos antimicrobianos em *M. admirabilis* são de suma importância, principalmente diante da ausência de espécies bacterianas como *E. coli* e *Enterococcus* spp. na epiderme destes animais, verificada no presente trabalho.

6.4. Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos das bactérias da família Enterobacteriaceae

Foi observada uma grande incidência de isolados resistentes aos beta-lactâmicos. Resistência a ampicilina foi observada em 99 isolados, enquanto que a resistência a ampicilina-sulbactam foi observada em somente 11 isolados. Bactérias Gram-negativas possuem três possíveis mecanismos de resistência a antibióticos beta-lactâmicos: a) a partir da produção da enzima beta-lactamase, responsável pela hidrólise do anel beta-lactâmico, e então inativando o antibiótico; b) produção de bombas de efluxo que removem o antibiótico do periplasma, reduzindo sua concentração para níveis subtóxicos, e; c) alteração dos poros da membrana externa da bactéria para prevenir a entrada do antibiótico (Arzanlou et al., 2017).

O uso de ampicilina e ampicilina-sulbactam no presente estudo, permitiu distinguir os isolados que produzem e os que não produzem a enzima beta-lactamase, totalizando 88 e 11 isolados, respectivamente. Nos isolados de *Serratia* sp., *Raoultella ornithinolytica* e *Hafnia alvei* foi observada resistência a diferentes antimicrobianos. A produção de beta-lactamases de amplo espectro (ESBL, *extended-spectrum β -lactamases*) era originalmente observada em *E. coli* e *Klebsiella* spp., porém nos últimos anos tem sido documentada em outras bactérias da ordem Enterobacteriales isoladas de animais domésticos e selvagens (Smet et al., 2010).

Todos isolados do gênero *Citrobacter* provenientes da epiderme foram resistentes a ampicilina e cefoxitina, enquanto que os isolados obtidos nas amostras orais apresentaram fenótipo de resistência a ampicilina e nitrofurantoína. Este resultado pode ser um indicativo que a população de *Citrobacter* sp. da epiderme, é geneticamente distinta da população deste mesmo gênero presente na cavidade oral dos animais.

Embora tenham sido considerados como “suscetíveis”, os isolados que apresentaram fenótipo intermediário são tão relevantes quanto aqueles de fenótipo resistente. Isto porque de acordo com a norma da EUCAST, de janeiro de 2019, a categoria “intermediário” foi alterada para “suscetível, aumentando exposição”, a qual consiste na alta probabilidade de sucesso terapêutico se a exposição ao agente for aumentada a partir de ajustes na dose, ou concentração do mesmo no local de infecção (EUCAST, 2019). Ou seja, os isolados que foram classificados como “intermediário”, também podem apresentar fenótipo de resistência se forem expostos a doses, ou concentrações mais baixas de um determinado antimicrobiano.

As novas definições do EUCAST visam reduzir o uso de carbapenêmicos na área clínica, e restringir o uso de antimicrobianos reservas no combate às resistências emergentes. Alguns estudos já foram realizados utilizando esta nova classificação, e foi observado que diante dos ajustes específicos, os antimicrobianos testados apresentaram eficácia contra um número maior de isolados em relação ao tratamento empírico (Rothe et al., 2019; Torumkuney et al., 2020).

No entanto, assim como no trabalho de Suravaram et al., (2021), a utilização desta classificação promoveu mudanças na interpretação do perfil de resistência dos isolados obtidos de *M. admirabilis*, em relação a classificação utilizada pelo CLSI. A baixa incidência de isolados multi-resistentes no presente trabalho, pode estar relacionada a aplicação desta categorização. Portanto, é de suma importância acompanhar a longo prazo o perfil de resistência dos isolados classificados como intermediário, bem como dos demais isolados bacterianos presentes nesta população.

Assim como no presente trabalho, a baixa incidência de resistência a cloranfenicol também foi observada em bactérias isoladas de *Rana tigrina rugulosa*, (Wang et al., 2019). Antimicrobianos da classe dos anfenicóis não são utilizados com frequência na medicina veterinária, ao contrário das penicilinas, cefalosporinas de primeira à quarta geração, inibidores de beta-lactamases e carbapenêmicos, que são comumente utilizados (Smet et al., 2010). Esta pode ser uma explicação para a abundância de isolados resistentes a ampicilina no presente trabalho, visto que nas aproximações do sítio de ocorrência de *M. admirabilis* há criação de suínos, gado e avicultura.

Altos níveis de bactérias multirresistentes em amostras fecais de suínos de fazendas já foi identificado anteriormente (Sayah et al., 2005). Além disso, já foi

demonstrado que as criações de suínos podem alterar o microbioma epidérmico de anfíbios de ambientes generalistas, que são encontrados próximos as fazendas (Preuss et al., 2020), logo, é possível que está mesma prática pode estar relacionada com o perfil de resistência a antimicrobianos observado nos isolados de *Melanophryniscus admirabilis*.

Estudos tem demonstrado que a proximidade com a agricultura animal e humanos tem aumentado a resistência a antimicrobianos de isolados bacterianos em populações naturais e selvagens (Kozak et al., 2009; Allen et al., 2010). Em ambientes naturais a existência de genes de resistência pode ocorrer naturalmente diante da pressão seletiva do próprio ambiente, no entanto, as atividades humanas tem aumentado essa pressão devido ao uso excessivo de antimicrobianos na medicina clínica e na agricultura (Allen et al., 2010). Os antibióticos de uso humano podem atingir as populações naturais através de processos de irrigação do solo com águas do esgoto (Kinney et al., 2006), que poderiam estar alcançando a superfície das águas do Rio Forqueta.

Um levantamento com a população rural próxima da região, a respeito do uso de antimicrobianos em suas criações seria uma opção a ser considerada para avaliar este impacto sobre a população de *M. admirabilis*, e assim, determinar a origem da resistência a antimicrobianos nesses animais. Outra hipótese para o elevado número de isolados resistentes presentes nos indivíduos de *M. admirabilis*, é que estes anuros podem estar produzindo um peptídeo antimicrobiano de estrutura química similar aos beta-lactâmicos. No entanto, somente a estrutura química dos alcaloides 267C e 321B de *Melanophryniscus* sp. está descrita, entre os bufonídeos (Daly et al., 2003; Daly et al., 1984), visto que até recentemente, a presença de peptídeos nesta família de anuros não era um consenso, e foi confirmada há poucos anos atrás (Rodriguez et al., 2020; Rodriguez et al., 2017).

Embora haja inúmeros estudos que analisam o potencial antimicrobiano dos peptídeos secretados pela epiderme de anuros frente a microrganismos multirresistentes (Rodriguez et al., 2020; Ogawa et al., 2020; Giacometti et al., 2005; Wang et al., 2016; Mangoni et al., 2008), ainda há um *gap* em relação as suas similaridades químicas com os antimicrobianos atuais. Na literatura ainda são escassos os trabalhos sobre resistência a antimicrobianos em bactérias isoladas de anuros, portanto, a realização de estudos relacionados a esta abordagem é de suma

importância, principalmente diante do potencial emergente de patógenos resistentes e do atual cenário de multirresistência bacteriana.

Diante dos resultados obtidos no presente estudo, é provável que os indivíduos de *Melanophryniscus admirabilis* estejam atuando como reservatórios de genes de resistência para patógenos que podem causar doenças tanto em animais, quanto aos humanos, sendo este mais um aspecto que deve ser abordado em ações de conservação dessa espécie.

6.5. Ausência do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* nas amostras testadas

A ausência do fungo *Bd* nas 13 amostras analisadas nos indica que há possibilidade deste patógeno ainda não ter atingido a população de *M. admirabilis* presente no Perau de Janeiro. Um dos fatores que não nos permite fazer tal afirmação, é o tamanho do *n* amostral, pois como ainda não há uma definição do tamanho populacional dessa espécie de sapo, é difícil quantificar quão representativa foi nossa amostragem para este tópico, visto que a riqueza de espécies a ser analisada é limitada a um microrganismo (fungo *Bd*).

Entretanto, a ausência dos fungos pode mesmo ter ocorrido baseado nos dados do tamanho populacional que não interferiu nas análises de diversidade bacteriana, pois é possível determinar uma correlação entre a quantidade de indivíduos amostrados, e o número de espécies bacterianas identificadas entre eles, através da curva de rarefação de espécies. Além disso, os primers utilizados neste estudo são capazes de detectar uma quantidade mínima de zoósporos fúngicos, igual a 10 (Coutinho et al., 2015), a qual em casos de infecção sintomática é uma quantidade razoável e fácil de ser obtida, porém, Lampo et al., (2006) detectaram a presença do fungo *Bd* em indivíduos assintomáticos da espécie *Atelopus mucubajensis* através de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) e análises histológicas, e haviam aproximadamente 4 zoósporos por 2 mg de amostra.

Agostini et al., (2015) também utilizou a técnica de RT-qPCR para verificar a presença do fungo *Bd* em 35 espécimes de *Melanophryniscus* aff. *montevidensis*, a partir de suabes epidérmicos, dos quais 11 foram *Bd*-positivo, cuja quantidade de

zoósporos por suabe variou de 0,34 a 915. Todos os espécimes avaliados também estavam aparentemente saudáveis. Um estudo com anuros de outras espécies presentes na Mata Atlântica do estado de Santa Catarina, Brasil, que apresentavam sintomas clínicos de quitridiomicose, verificou através de RT-qPCR que a quantidade de zoósporos variava entre 70 a 6.178 (Preuss et al., 2015).

Apesar do n amostral e da técnica que foi utilizada, o resultado obtido no presente trabalho pode estar relacionado ao fato da temperatura durante os dias de coleta. Durante o mês de setembro, a temperatura média na região de Arvorezinha é de 16 °C (IRGA, 2021), no entanto, nos dias de coleta, a temperatura máxima registrada foi de 26 °C e nos últimos anos, as temperaturas durante o período de primavera no estado do RS têm sido cada vez mais altas e fora do comum (IPCC, 2018; Prestes et al., 2018; Regotto et al., 2021). O fungo *Bd* consegue crescer e se reproduzir sob temperaturas entre 4 e 25 °C (Piotrowski et al., 2004), e alguns trabalhos têm relacionado a temperatura corpórea dos anuros com a presença do fungo (Rowley & Alford, 2013; Ruggeri et al., 2015). Em *Litoria lesueuri*, *L. serrata* e *L. nannotis* a probabilidade de infecção por *Bd* diminui significativamente quando a temperatura corpórea desses animais esteve acima de 25 °C (Rowley & Alford, 2013). Este fato se deve às altas taxas de renovação da epiderme em temperaturas mais elevadas, o que pode levar à perda ou redução da infecção pelo fungo (Piotrowski et al., 2014), visto que este infecta o estrato córneo e os estratos intermediários da epiderme dos animais (Berger et al., 1998).

Como o período de reprodução de *M. admirabilis* tem coincidido com os períodos de altas temperaturas durante a primavera, pode ser que a prevalência do fungo *Bd* esteja sendo afetada pela temperatura, e provavelmente, alguns indivíduos de *M. admirabilis* estejam conseguindo manter uma infecção endêmica e assintomática sem causar efeitos no restante da população. Diante disto, para podemos afirmar que a população do sapinho-admirável-de-barriga-vermelha está livre do patógeno, um número maior de suabes epidérmicos devem ser analisados, para posteriormente realizar a quantificação dos zoósporos através de PCR quantitativa em tempo real.

Outro ponto importante para a justificar a ausência de *Bd* nas amostras avaliadas, foi a identificação de bactérias isoladas da epiderme de *M. admirabilis* que

apresentavam capacidade de inibir o crescimento do fungo em amostras de *R. palmatus* e *D. labilis* (Flechas et al., 2019), como por exemplo, os gêneros *Bacillus* e *Enterobacter*.

6.6. Impactos na conservação de *Melanophryniscus admirabilis*

A presença ou ausência de microrganismos em todos os membros de uma espécie, pode ser usada como bioindicador de um hospedeiro saudável (West et al., 2019). É de suma importância a realização de trabalhos cujo objetivo seja identificar a microbiota de uma espécie e/ou população, para então formar um banco de dados que auxilie na prevenção de patógenos e doenças que possam causar danos em populações que já estejam ameaçadas de extinção (Redford et al., 2012; West et al., 2019).

Os resultados obtidos no presente trabalho são o passo inicial, pois a partir disto, será possível desenvolver ensaios “*Bd-challenge*”, que são baseados na medida de crescimento do fungo *Bd* na presença de bactérias sobrenadantes através de unidades de absorvância (Bell et al., 2013). De acordo com Rebollar et al., (2020), esta metodologia é mais acurada, quantificável e reproduzível, e permite que diversas cepas bacterianas sejam testadas simultaneamente, diferente dos ensaios clássicos de competição em placas de Petri.

Diante da crise global de resistência a antibióticos, os peptídeos antimicrobianos provenientes de animais vertebrados têm chamado atenção da indústria farmacêutica (Sumi et al., 2015). Além disso, alguns trabalhos verificaram que as bactérias presentes na epiderme de outros anuros podem ser eficazes contra fungos patogênicos de humanos, como os dermatófitos (Lauer & Hernandez, 2015).

Estas podem ser mais umas das razões para aumentar os esforços de conservação de espécies ameaçadas de anuros, como é o caso do sapinho-admirável-da-barriga-vermelha, para que estudos acerca de sua microbiota, bem como os metabólitos secundários produzidos por esta, se tornem cada vez mais abundantes.

Ainda, conforme Simon et al., (2002), o pH do ambiente tem influência direta na microbiota desses animais, podendo converter o fenótipo de microrganismo

comensal, para microrganismo patogênico. Dentre os fatores que podem provocar tais mudanças no pH do ambiente, estão as práticas de agricultura, que através do uso recorrente de fertilizantes e pesticidas proporcionam não somente alterações no solo, como também criam uma pressão seletiva sob os microrganismos do solo (Berthrong et al., 2013), bem como nos invertebrados e plantas (Wardle et al., 1999; José-Maria et al., 2010).

A contaminação por metais pesados, como o cobre, também pode influenciar a microbiota dos anuros (Yang et al., 2020). O cobre (Cu) está ampla e naturalmente presente no solo, sedimentos e água, mas pode ser tóxico em altas concentrações (Lance et al., 2012). A poluição ambiental de cobre tem se intensificado devido ao amplo uso de produtos comerciais como promotores de crescimento animal, fertilizantes, bactericidas e fungicidas, aditivos nas rações animais e no controle de doenças em criações de gado e aves domésticas (WHO, 1998). Alguns estudos já analisaram o impacto das altas concentrações de Cu em anfíbios, as quais podem acarretar em deformações embrionárias, atraso na metamorfose, redução do tamanho corporal, e até mesmo, na morte dos indivíduos (Chen et al., 2007; García-Muñoz et al., 2010; Lance et al., 2012; Xia et al., 2012).

Yang et al., (2020) verificaram que a exposição ao cobre induz uma mudança significativa na estrutura da comunidade e diversidade da microbiota intestinal de *Rana chensinensis*, promovendo aumento na abundância do gênero *Flavobacterium*, e diminuição de bactérias do filo Fusobacteria. Além disso, os autores também verificaram, através de predições funcionais via PICRUSt, que a exposição ao cobre altera rotas correspondentes a genes para metabolismo, processamento de informações ambientais e genéticas, processos celulares e sistemas orgânicos. Recentemente, uma análise similar foi realizada para o microbioma oral de *M. admirabilis*, onde foi verificado a presença de rotas metabólicas essenciais para a sobrevivência destes no ambiente ao qual se encontram, como por exemplo, para degradação de xenobióticos, pesticidas e outros compostos aromáticos fenólicos (Mann et al., 2021).

Portanto, as práticas de agricultura e pecuária da região podem afetar a população de *M. admirabilis* através de: (i) impacto causado na dieta alimentar desses animais devido ao uso de pesticidas, tanto diretamente sobre os animais, quanto na

abundância dos artrópodes, o que pode interferir diretamente na microbiota intestinal dos sapinhos, e tais alterações podem promover desequilíbrios entre as microbiotas benéficas e patogênicas; (ii) alterações no pH ambiental, causando o rompimento da camada do epitélio intestinal, e então permitindo que bactérias do trato gastrointestinal atinjam outros órgãos podendo levar os indivíduos de *M. admirabilis* a óbito, e: (iii) por alterações nas concentrações de cobre no solo e na água, que também podem promover alterações na microbiota intestinal desses animais, seguida de quadros de disbiose.

Sob essa perspectiva, é essencial promover a conscientização, sobre o uso excessivo de pesticidas, fertilizantes e agrotóxicos nas plantações e fazendas em torno da região do Perau de Janeiro, a fim de amenizar os impactos causados por ações antrópicas na população dos sapinhos-admiráveis-da-barriga-vermelha.

7. CONCLUSÃO

A partir dos resultados do presente trabalho, foi possível identificar as bactérias que compõem a microbiota da epiderme, cavidade oral e fezes dos indivíduos de *Melanophryniscus admirabilis*, como, por exemplo, *Bacillus* sp., *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* e *Hafnia alvei*. A grande maioria dos isolados de Enterobacteriaceae analisados apresentaram resistência a ampicilina, seguido de resistência a nitrofurantoína, imipenem e cefoxitina, e somente 5% dos isolados foram suscetíveis a todos os antimicrobianos testados.

Em nenhuma das amostras analisadas foi identificada a presença de bactérias do gênero *Enterococcus*. Este resultado sugere que *M. admirabilis* produz algum tipo de alcaloide ou peptídeo antimicrobiano que é capaz de inibir o crescimento destes microrganismos, ou não foi possível cultivar espécies nos meios de cultivo testados, já que foi detectado o gênero nos ensaios de PCR.

Nas amostras analisadas não verificou-se a presença do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*. Tal ausência pode estar relacionada com a presença de bactérias do gênero *Bacillus* na superfície epidérmica dos animais, as quais são capazes de inibir o crescimento do fungo *Bd*.

Dentre os microrganismos identificados, estão algumas bactérias com capacidade de produzir compostos com atividade frente ao *Bd*, outras com potencial zoonótico, como por exemplo *Raoultella ornithinolytica* e *Lactococcus garvieae*. Outras bactérias, associadas a doenças em anfíbios, como a síndrome *red-leg* foram identificadas em amostras de epiderme do presente trabalho – *Aeromonas hydrophila*, *Citrobacter freundii* e *Serratia liquefaciens*.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Portanto, a partir deste trabalho, há perspectivas de estudos mais aprofundados sobre o potencial antimicrobiano dos metabólitos secundários produzidos pelos indivíduos de *M. admirabilis*. Os resultados obtidos no presente trabalho podem ser o passo inicial para identificação do microbioma de *M. admirabilis*, e, com isso, a criação de um sistema de acompanhamento microbiológico, a fim de analisar a presença de potenciais patógenos para estes animais, e elaborar estratégias para combatê-los de maneira eficaz.

Além disso, a identificação de bactérias patogênicas para humanos, e/ou com potencial zoonótico emergente, pode auxiliar na conscientização para preservação da região do Perau de Janeiro, bem como na conservação dos sapinhos-admiráveis-da-barriga-vermelha, os quais podem estar atuando como sentinelas destes patógenos, evitando assim, o contato direto para com humanos e, portanto, novas pandemias.

9. REFERÊNCIAS

- Abushaheen MA, Muzaaheed, Fatani AJ, Alosaimi M, Mansy W, George M, Acharya S, Rathod S, Divakar DD, Jhugroo C, Vellappally S, Khan AA, Shaik J, Jhugroo P. 2020. Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. *Disease-a-Month*, 66(6), 100971.
- Adeolu M, Alnajjar S, Naushad S, Gupta RS. 2016. Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for *Enterobacterales* ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov., and *Budviciaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(12), 5575-5599.
- Agostini MG, Cortelezzi A, Berkunsky I, Soler G, Burrowes P. 2015. First record of *Batrachochytrium dendrobatidis* infecting threatened populations of Tandilean Red-belly toad (*Melanophryniscus* aff. *montevidensis*) in Argentina. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 86(3), 826–828.
- Aguado-Urda M, Gibello A, Blanco MdM, Fernández-Garayzábal JF, López-Alonso V, López-Campos GH. 2013. Global Transcriptome Analysis of *Lactococcus garvieae* Strains in Response to Temperature. *PLoS ONE*, 8(11), e79692.
- Alaygut D, Bayram A, Soyaltın E, Alparslan C, Çamlar SA, Mutlubaş F, Yavaşcan Ö, Demir BK. 2020. Urinary tract infection caused by *Hafnia alvei* in a healthy child. *Turkish Journal of Nephrology*, 29(3), 250–252.
- Allen HK, Donato J, Wang HH, Cloud-Hansen KA, Davies J, Handelsman J. 2010. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews Microbiology*, 8(4), 251–259.
- Alonso VPP, Harada AMM, Kabuki DY. 2020. Competitive and/or Cooperative Interactions of *Listeria monocytogenes* With *Bacillus cereus* in Dual-Species Biofilm Formation. *Frontiers in Microbiology*, 11.
- Altinok I, Balta F, Capkin E, Kayis S. 2007. Disease of rainbow trout caused by *Pseudomonas luteola*. *Aquaculture*, 273(4), 393–397.
- Amato KR, Yeoman CJ, Kent A, Righini N, Carbonero F, Estrada A, Kaskins HR, Stumpf RM, Yildirim S, Torralba M, Gillis M, Wilson BA, Nelson KE, White BA, Leigh ST. Habitat degradation impacts black howler monkey (*Alouatta pigra*) gastrointestinal microbiomes. *The ISME Journal*, 7, 1344-1353.
- AmphibiaWeb. **Information on amphibian biology and conservation**. 2021. University of California, Bekerley, CA, USA. Disponível em: < <https://amphibiaweb.org/>>. Acesso em: 09 jan. 2021.
- Annis SL, Dastoor FP, Ziel H, Daszak P, Longcore JE. 2004. A DNA-based assay identifies *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians. *J Wildl Dis*, 40(3):420-428.

- Araújo AJG, Grassotti TT, Frazzon APG. 2021. Characterization of *Enterococcus* spp. isolated from a fish farming environment in southern Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 81(4), 954–961.
- Araujo GO, Huff R, Favarini MO, Mann MB, Peters FB, Frazzon J, Frazzon APG. 2020. Multidrug Resistance in Enterococci Isolated From Wild Pampas Foxes (*Lycalopex gymnocercus*) and Geoffroy's Cats (*Leopardus geoffroyi*) in the Brazilian Pampa Biome. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 606377.
- Archie EA, Tung J. 2015. Social behavior and the microbiome. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, 6, 28–34.
- Arntzen JW, Abrahams C, Meilink WRM, Iosif R, Zuiderwijk A. 2017. Amphibian decline, pond loss and reduced population connectivity under agricultural intensification over a 38 year period. *Biodiversity and Conservation*, 26(6), 1411–1430.
- Artavia-León A, Romero-Guerrero A, Sancho-Blanco C, Rojas N, Umaña-Castro R. 2017. Diversity of Aerobic Bacteria Isolated from Oral and Cloacal Cavities from Free-Living Snakes Species in Costa Rica Rainforest. *International Scholarly Research Notices*, 2017, 1–9.
- Arzanlou M, Chai WC, Venter H. 2017. Intrinsic, adaptive and acquired antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. *Essays in Biochemistry*, 6(1), 49-59.
- Bahrndorff S, Alemu T, Alemneh T, Lund-Nielsen J. 2016. The Microbiome of Animals: Implications for Conservation Biology. *International Journal of Genomics*, 2016.
- Barnes EM, Carter EL, Lewis JD. 2020. Predicting Microbiome Function Across Space Is Confounded by Strain-Level Differences and Functional Redundancy Across Taxa. *Frontiers in Microbiology*, 11, 101.
- Barran G, Kolodziejek J, Coquet L, Leprince J, Jouenne T, Nowotny N, Conlon JM, Mechkarska M. 2020. Peptidomic analysis of skin secretions of the caribbean frogs *Leptodactylus insularum* and *Leptodactylus nesiotus* (Leptodactylidae) identifies an ocellatin with broad spectrum antimicrobial activity. *Antibiotics*, 9(10), 1–15.
- Barrios H, Garza-Ramos U, Reyna-Flores F, Sanchez-Perez A, Rojas-Moreno T, Garza-Gonzalez E, Llaca-Diaz JM, Camacho-Ortiz A, Guzman-Lopez S, Silva-Sanchez J. 2013. Isolation of carbapenem-resistant NDM-1-positive *Providencia rettgeri* in Mexico. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(8), 1934–1936.
- Bartel LC, Abrahamovich E, Mori C, López AC, Alippi AM. 2019. *Bacillus* and *Brevibacillus* strains as potential antagonists of *Paenibacillus* larvae and *Ascosphaera apis*. *Journal of Apicultural Research*, 58(1), 117–132.
- Bates KA, Clare FC, O'Hanlon S, Bosch J, Brookes L, Hopkins K, McLaughlin EJ, Daniel O, Garner TWJ, Fisher MC, Harrison XA. 2018. Amphibian chytridiomycosis outbreak dynamics are linked with host skin bacterial community structure. *Nature Communications*, 9(1), 1–11.
- Baum B, Richter B, Reifinger M, Klang A, Finnberg C, Loncaric I, Spergser J, Eisenberg T, Künzel F, Preis S, Pantchev N, Rütgen B, Guija De Arespacochaga

- A, Hewicker-Trautwein M. 2015. *Pyogranulomatous panniculitis* in ferrets (*Mustela putorius furo*) with intralesional demonstration of *Pseudomonas luteola*. *Journal of Comparative Pathology*, 152(2–3), 114–118.
- Becker CG, Bletz MC, Greenspan SE, Rodriguez D, Lambertini C, Jenkinson TS, Guimarães PR, Assis APA, Geffers R, Jarek M, Toledo LF, Vences M, Haddad CFB. 2019. Low-load pathogen spillover predicts shifts in skin microbiome and survival of a terrestrial-breeding amphibian. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 286(1908), 20191114.
- Bell SC, Alford RA, Garland S, Padilla G, Thomas AD. 2013. Screening bacterial metabolites for inhibitory effects against *Batrachochytrium dendrobatidis* using a spectrophotometric assay. *Dis Aquat Org*, 103, 77-85.
- Berg G. 2009. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: Perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(1):11-18.
- Berger L, Speare R, Daszak P, Green DE, Cunningham AA, Goggin CL, Slocombe R, Ragan MA, Hyatt AD, McDonald KR, Hines HB, Lips LR, Marantelli G, Parkes H. 1998. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(15):9031–9036.
- Berger L, Speare R, Kent A. 1999. Diagnosis of chytridiomycosis in amphibians by histological examination. *Zoos' Print Journal*, 15(1):184–190.
- Berthrong ST, Buckley DH, Drinkwater LE. 2013. Agricultural Management and Labile Carbon Additions Affect Soil Microbial Community Structure and Interact with Carbon and Nitrogen Cycling. *Microbial Ecology*, 66(1):158–170.
- Bilgic H, Serdar AE, Tasan Y, Ekiz K, Seber O. 1995. A case of *Acinetobacter calcoaceticus* pneumonia. *Thorax*, 50(3):315–316.
- Bletz MC, Archer H, Harris RN, McKenzie VJ, Rabemananjara FCE, Rakotoarison A, Vences M. 2017. Host Ecology Rather Than Host Phylogeny Drives Amphibian Skin Microbial Community Structure in the Biodiversity Hotspot of Madagascar. *Frontiers in Microbiology*, 8(8):1530.
- Boerlin P, Reid-Smith RJ. 2008. Antimicrobial resistance: its emergence and transmission. *Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases*, 9(2):115-126.
- Bordignon DW, Caorsi VZ, Colombo P, Abadie M, Brack IV, Dasoler BT, Borges-Martins M. 2018. Are the unken reflex and the aposomatic colouration of Red-Bellied Toads efficient against bird predation? *PLoS ONE*, 13(3): e0193551.
- Bravo A, Likitvivatanavong S, Gill SS, Soberón M. 2011. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(7):424-431.
- Bresciano JC, Salvador CA, Paz-y-Miño C, Parody-Merino AM, Bosch J, Woodhams DC. 2015. Variation in the Presence of Anti-*Batrachochytrium dendrobatidis*

- Bacteria of Amphibians Across Life Stages and Elevations in Ecuador. *EcoHealth*, 12(2): 310–319.
- Brucker RM, Harris RN, Schwantes CR, Gallaher T.N, Flaherty DC, Lam BA, Minbiole KPC. 2008. Amphibian chemical defense: Antifungal metabolites of the microsymbiont *Janthinobacterium lividum* on the salamander *Plethodon cinereus*. *Journal of Chemical Ecology*, 34(11):1422–1429.
- Butchart SHM, Walpole M, Collen B, Strien AV, Scharlemann JPW, Almond REA, Baillie JE, Bomhard B, Brown C, Bruno J, Carpenter KE, *et al.* 2010. Global Biodiversity: Indicators of Recent Declines. *Science*, 328(5923):1164-1168.
- Cantas L, Sørby JRT, Aleström P, Sørum H. 2012. Culturable gut microbiota diversity in zebrafish. *Zebrafish*, 9(1):26–37.
- Cao Y, Li S, Han S, Wang D, Zhao J, Xu L, Liu H, Lu T. 2020. Characterization and application of a novel *Aeromonas* bacteriophage as treatment for pathogenic *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout. *Aquaculture*, 523, 735193.
- Cardoso M, Cobacho N, Cherobim M, Pinto M, Santos C, Maximiano M, Barros E, Dias S, Franco O, Navas C. 2014. Insights into the antimicrobial activities of unusual antimicrobial peptide families from amphibian skin. *J Clin Toxicol*, 4:205.
- Carrilo-Araujo M, Tas N, Alcántara-Hernández RJ, Gaona O, Schondube JE, Medellín RA, Jansson JK, Falcón LI. 2015. Phyllostomid bat microbiome composition is associated to host phylogeny and feeding strategies. *Frontiers in Microbiology*, 6:447.
- Carvalho-Assef APD, Pereira OS, Albano RM, Beriao GC, Chagas TPG, Timm LN, Da Silva RCF, Facil DR, Asensi MD. 2013. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(12):2956–2957.
- Cassenego APV, D’Azevedo PA, Ribeiro AML, Frazzon J, Van Der Sand ST, Frazzon APG. 2011. Species distribution and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from broilers infected experimentally with *Eimeria* spp and fed with diets containing different supplements. *Braz. J. Microbiol.* 42 480–488.
- Catenazzi A, Flechas SV, Burkart D, Hooven ND, Townsend J, Vredenburg VT. 2018. Widespread elevational occurrence of antifungal bacteria in Andean Amphibians decimated by disease: A complex role for skin symbionts in defense against chytridiomycosis. *Frontiers in Microbiology*, 9(3).
- Chan JFW, Woo PCY, Teng JLL, Lau SKP, Leung SSM, Tam FCC, Yuen KY. 2011. Primary infective spondylodiscitis caused by *Lactococcus garvieae* and a review of human *L. garvieae* infections. *Infection*, 39(3):259-264.
- Chang CW, Huang BH, Lin SM, Huang CL, Liao PC. 2016. Changes of diet and dominant intestinal microbes in farmland frogs. *BMC Microbiology*, 16(1), 33.
- Chen TH, Gross JA, Karasov WH. 2007. Adverse effects of chronic copper exposure in larval northern Leopard frogs (*Rana pipiens*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26(7), 1470.

- Cheng Y, Fox S, Pemberton D, Hogg C, Papenfuss AT, Belov K. 2015. The Tasmanian devil microbiome – implications for conservation and management. *Microbiome*, 3:76.
- Cheok YY, Pua SM, Chua KH, Than JAMA. 2020. Isolation and molecular identification of *Aeromonas* species from the tank water of ornamental fishes. *Acta Veterinaria Hungarica*, 68(2), 130–139.
- Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI. 2021. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing – 31st Edition.
- Collins JP, Storer A. 2003. Global amphibian declines: sorting the hypotheses. *Diversity Distributions*, 9(2):89-98.
- Colombo BM, Scalvenzi T, Benlamara S, Pollet N. 2015. Microbiota and mucosal immunity in amphibians. *Frontiers in Immunology*, 6(3).
- Colombo P, Kindel A, Vinciprova G, Krause L. 2008. Composition and threats for conservation of anuran amphibians from Itapeva State Park, Municipality of Torres, Rio Grande do Sul, Brazil
- Colombo P, Zank C, Schmidt LEC, Gonçalves F, Marinho JR. 2007. Anura, Bufonidae, *Melanophryniscus simplex*: distribution extension. *Check List*, 3(4), 305.
- Coutinho SD, Burke JC, de Paula CD, Rodrigues MT, Catão-Dias JL. 2015. The use of singleplex and nested PCR to detect *Batrachochytrium dendrobatidis* in free-living frogs. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2), 551–555.
- Crump ML, Scott NJJ. 1994. **Visual encounter surveys**. Em: W.R. Heyer, M.A. Donnelly, R.W. McDiarmid, L.A.C. Hayek, M.S. Foster, (Eds). *Measuring and Monitoring Biological Diversity - Standard Methods for Amphibians*, pp. 84-92. Smithsonian Institution Press, Washington D. C.
- Dalmolin DA, Renner S, Grillo HZ, Kahn TR. 2012. Ecological Notes, Natural History and Conservation of *Melanophryniscus admirabilis* (Di Bernardo et al. 2006), Brazil. *FrogLog*, 100.
- Daly JW, Hight RJ, Myers CW. 1984. Occurrence of skin alkaloids in non-dendrobatid frogs from Brazil (Bufonidae), Australia (Myobatrachidae) and Madagascar (Mantellinae). *Toxicon*, 22(6):905-919.
- Daly JW, Wilham JM, Spande TF, Garraffo HM, Gil RR, Silva GL, Vaira M. 2007. Alkaloids in bufonid toads (*Melanophryniscus*): Temporal and geographic determinants for two Argentinian species. *Journal of Chemical Ecology*, 33(4), 871–887.
- Daly JW. 2003. Ernest Guenther award in chemistry of natural products. Amphibian skin: A remarkable source of biologically active arthropod alkaloids. *Journal of Medicinal Chemistry*, 46(4):445-452.
- Davin-Regli A, Pagès JM. 2015. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; Versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Frontiers in Microbiology*, 6(5):392.
- De Boer E, Nouws JFM. 1991. Slaughter pigs and pork as a source of human pathogenic *Yersinia enterocolitica*. *International Journal of Food Microbiology*,

12(4), 375–378.

- Devriese L, Baele M, Butaye P. 2006. **The Genus *Enterococcus***. Em: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E (Eds). *The Prokaryotes*. Springer, New York, NY, p.163–174.
- Di-Bernardo M, Maneyro R, Grillo H. 2006. New Species of *Melanophryniscus* (Anura: Bufonidae) from Rio Grande do Sul, Southern Brazil. *Journal of Herpetology*, 40(2), 261–266.
- Dökenel G, Özer S. 2019. Bacterial agents isolated from cultured marsh frog (*Pelophylax ridibundus*, Pallas 1771). *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 36(2), 115–124.
- Donato ST. 2007. **Comparação de métodos convencionais e semi-automatizados para identificação de *Enterococcus* spp. frente à biologia molecular em identificações discrepantes**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- Ducatelle R, Eeckhaut V, Haesebrouck F, Van-Immerseel F. 2014. A review on prebiotics and probiotics for the control of dysbiosis: Present status and future perspectives. *Animal*, 9(1), 43–48.
- Epstein HE, Smith HA, Torda G, Oppen MJ. 2019. Microbiome engineering: enhancing climate resilience in corals. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 17(2), 100–108.
- Espinoza VE, Valdez M, Burcovschii S, Fong I, Petersen G, Heidari A. 2021. The first case report of endocarditis caused by *Serratia fonticola*. *Journal of Investigative Medicine*, 69(1):278–279.
- Estrada A, Hughey MC, Medina D, Rebollar EA, Walke JB, Harris RN, Belden LK. 2019. Skin bacterial communities of neotropical treefrogs vary with local environmental conditions at the time of sampling. *PeerJ*, 7:e7044.
- Eterovick PC, De Queiroz-Carnaval ACO, Borges-Nojosa DM, Silvano DL, Segalla MV, Sazima I. 2005. Amphibian Declines in Brazil: An Overview. *Biotropica*, 37(2), 166–179.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST. 2019. New definitions of S, I and R from 2019. Disponível em: <<https://www.eucast.org/newsiandr/>> Acesso em: 03 out. 2021.
- Faith JJ, McNulty NP, Rey FE, Gordon JI. 2011. Predicting a human gut microbiota's response to diet in gnotobiotic mice. *Science*, 33(6038):101-104.
- FEPAM – Fundação Estadual de Proteção Ambiental. 2013. Diagnóstico Ambiental da Bacia do Taquari-Antas/RS. Disponível em: <<http://www.fepam.rs.gov.br/biblioteca/Taquari-Antas/>> Acesso em: 18 jan. 2021.
- Ferrer J, Camana M, Jacobi CM, Souza LB, Furlan EO, Duz JVV, Gastal ERS, Nunes RR, Carvalho TP. Inventário ictiológico da bacia do rio Forqueta com ênfase na região do Perau de Janeiro, Arvorezinha – RS. *Boletim Sociedade Brasileira de*

Ictiologia, 126: 4-12.

- Flechas SV, Acosta-González A, Escobar LA, Kueneman JG, Sánchez-Quitian ZA, Parra-Giraldo CM, Rollins-Smith LA, Reinert LK, Vredenburg VT, Amézquita A, Woodhams DC. 2019. Microbiota and skin defense peptides may facilitate coexistence of two sympatric Andean frog species with a lethal pathogen. *ISME Journal*, 13(2), 361–373.
- Fock E, Lavrova E, Parnova R. 2013. Colonization of frog *Rana temporaria* L. urinary bladder by Gram-negative bacteria leads to decreased effect of arginine-vasotocin on water reabsorption from the urinary bladder. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 319(9).
- Fontaine SS, Novarro AJ, Kohl KD, 2018. Environmental temperature alters the digestive performance and gut microbiota of a terrestrial amphibian. *Journal of Experimental Biology*, 221(20).
- Fonte LFM, Abadie M, Bordignon DW, Mendes T, Zank C, Krob A, Kindel A, Borges-Martins M. 2021. Admirable Redbelly Toad: The Amphibian That Defied a Hydropower Plant. Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences, Elsevier.
- Foo JL, Ling H, Lee YS, Chang MW. 2017. Microbiome engineering: Current applications and its future. *Biotechnology Journal*, 12(3).
- Frost, Darel R. 2021. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.1. Disponível em: < <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php>>. Acesso em: 18 jan. 2021. American Museum of Natural History, New York, USA.
- Garcia ME, Lanzarot P, Costas E, Lopez-Rodas V, Marín M, Blanco JL. 2008. Isolation of *Serratia fonticola* from skin lesions in a Nile Crocodile (*Crocodylus niloticus*) with an associated septicaemia. *Veterinary Journal*, 176(2), 254–256.
- García-Muñoz E, Guerrero F, Parra G. 2010. Intraspecific and interspecific tolerance to copper sulphate in five Iberian amphibian species at two developmental stages. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 59(2), 312–321.
- Garner TWJ, Perkins MW, Govindarajulu P, Seglie D, Walker S, Cunningham AA, Fischer MC. 2006. The emerging amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* globally infects introduced populations of the North American bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Biology Letters*, 2(3):455-459.
- Gavini F, Ferragut C, Izard D. 1979. *Serratia fonticola*, a new species from water. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 29(2), 92–101.
- Giacometti A, Cirioni O, Kamysz W, Silvestri C, Licci A, Riva A, Łukasiak J, Scalise G. 2005. In vitro activity of amphibian peptides alone and in combination with antimicrobial agents against multidrug-resistant pathogens isolated from surgical wound infection. *Peptides*, 26(11), 2111–2116.
- Giannattasio-Ferraz S, Maskeri L, Oliveira AP, Barbosa-Stancioli EF, Putonti C. 2020. Draft Genome Sequence of *Enterobacter asburiae* UFMG-H9, Isolated from Urine from a Healthy Bovine Heifer (Gyr Breed) . *Microbiology Resource*

Announcements, 9(21).

- Glasset B, Herbin S, Granier SA, Cavalie L, Lafeuille E, Guérin C, Ruimy R, Casagrande-Magne F, Levast M, Chautemps N, Decosser JW, Belotti L, Pelloux I, Robert J, Brisabois A, Ramarao N. 2018. *Bacillus cereus*, a serious cause of nosocomial infections: Epidemiologic and genetic survey. *PLoS ONE*, 13(5).
- Gontang EA, Fenical W, Jensen PR. 2007. Phylogenetic Diversity of Gram-Positive Bacteria Cultured from Marine Sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(10):3272-3282.
- González-Fuentes M, Latif F, Fernández F, Villanueva MP, Ulloa J, Fernández H. 2010. Especies de la familia Enterobacteriaceae en heces de lobo marino común, *Otaria flavescens* establecido en el río Valdivia. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 45(2), 331–334.
- Grant T, Colombo P, Verrastro L, Saporito RA. 2012. The occurrence of defensive alkaloids in non-integumentary tissues of the Brazilian red-belly toad *Melanophryniscus simplex* (Bufonidae). *Chemoecology*, 22(3), 169–178.
- Grassotti TT, Zvoboda DA, Costa LFX, De Araújo AJG, Pereira RI, Soares RO, Wagner PGC, Frazzon J, Frazzon APG. 2018. Antimicrobial Resistance Profiles in *Enterococcus* spp. Isolates From Fecal Samples of Wild and Captive Black Capuchin Monkeys (*Sapajus nigritus*) in South Brazil. *Frontiers in Microbiology*, 9(10), 2366.
- Guijarro JÁ, Cascales D, García-Torrico AI, García-Domínguez M, Méndez J. 2015. Temperature-dependent expression of virulence genes in fish-pathogenic bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 6(7).
- Hacioglu N, Tosunoglu M. 2014. Determination of antimicrobial and heavy metal resistance profiles of some bacteria isolated from aquatic amphibian and reptile species. *Environmental Monitoring and Assessment*, 186(1):407–413.
- Haddad C, Giovanelli J, Alexandrino J. 2008. **O aquecimento global e seus efeitos na distribuição e declínio dos anfíbios.** Em: Buckeridge MS (Eds), *Biologia e as mudanças climáticas no Brasil*. RIMA, p. 12.
- Hai PD, Hoa LTV, Tot NH, Phuong LL, Quang VV, Thuyet BT, Son PN. 2020. First report of biliary tract infection caused by multidrug-resistant *Serratia fonticola*. *New Microbes and New Infections*, 36.
- Hammer O, Harper DAT, Ryan PD. 2001. Past: Paleontological Statistics Software package for education and data analysis. University of Oslo, Norway.
- Hantak MM, Grant T, Reinsch S, McGinnity D, Loring M, Toyooka N, Saporito RA. 2013. Dietary Alkaloid Sequestration in a Poison Frog: An Experimental Test of Alkaloid Uptake in *Melanophryniscus stelzneri* (Bufonidae). *Journal of Chemical Ecology*, 39(11–12):1400–1406.
- Hofer U. 2019. The cost of antimicrobial resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 17(1):3.
- Hogan LA, Lisle AT, Johnston SD, Goad T, Robertston H. 2013. Adult and Juvenile

- Sex Identification in Threatened Monomorphic Geocrinia Frogs Using Fecal Steroid Analysis. *Journal of Herpetology*, 47(1):112-118.
- Huecas CGY, Pereira RI, Prichula J, D'Azevedo PA, Frazzon J, Frazzon APG. 2019. Frequency of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs) in non-clinical *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* strains. *Brazilian Journal of Biology*, 79(3), 460–465.
- Huff R, Pereira RI, Pissetti C, De Araújo AM, D'Azevedo PA, Frazzon J, Frazzon APG. 2020. Antimicrobial resistance and genetic relationships of enterococci from siblings and non-siblings *Heliconius erato phyllis* caterpillars. *PeerJ*, 2020(2).
- ICMBio. 2014. Lista das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção (Portarias MMA nº 444/2014 e nº 445/2014). Disponível em: < <http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/fauna-brasileira/lista-de-especies.html>>. Acesso em: 18 jan. 2021.
- ICMBio. 2018. **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume V—Anfíbios**. Em: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (Org.). Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Brasília
- IPCC, Intergovernmental Panel on Climate Change. 2018. Spatial and seasonal pattern of present-day warming. Disponível em: < <https://www.ipcc.ch/sr15/graphics/>>. Acesso em: 03 out. 2021.
- Iqbal J, Sagheer M, Tabassum N, Siddiqui R, Khan NA. 2014. Culturable Aerobic and Facultative Anaerobic Intestinal Bacterial Flora of Black Cobra (*Naja naja karachiensis*) in Southern Pakistan. *ISRN Veterinary Science*, 2014, 1–5.
- IRGA. 2021. Médias Climatológicas. Instituto Rio Grandense do Arroz. Disponível em: < <https://irga.rs.gov.br/medias-climatologicas>>. Acesso em: 18 jan. 2021.
- IUCN. 2013. ***Melanophryniscus admirabilis*. The IUCN Red List of Threatened Species**. Disponível em: < <https://www.iucnredlist.org/species/135993/44846478>> Acesso em: 18 jan. 2021.
- IUCN. 2021. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2020-3. Disponível em: < <https://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 18 jan. 2021.
- Iversen S, Johannesen TB, Ingham AC, Edslev SM, Tevell S, Månsson E, Nilsdotter-Augustinsson Å, Söderquist B, Stegger M, Andersen P. 2020. Alteration of bacterial communities in anterior nares and skin sites of patients undergoing arthroplasty surgery: Analysis by 16s rRNA and staphylococcal-specific *tuf* gene sequencing. *Microorganisms*, 8(12), 1–13.
- Jackson CR, Fedorka-Cray PJ, Barret JB. 2004. Use of a genus- and- species-specific multiplex PCR for identification of Enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 42:3558-3565.
- Janda JM, Abbott SL. 2010. The genus *Aeromonas*: Taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(1):35-73.

- Jani AJ, Briggs CJ. 2014. The pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* disturbs the frog skin microbiome during a natural epidemic and experimental infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(47), E5049–E5058.
- Jani AJ, Briggs CJ. 2018. Host and Aquatic Environment Shape the Amphibian Skin Microbiome but Effects on Downstream Resistance to the Pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* Are Variable. *Frontiers in Microbiology*, 9:487.
- JiaQi T, WenLong D, Wei W, Yu W, HongWei Z, XiQing Z, XueSong L, HongXia M, YunHang G. 2018. Isolation and identification of *Raoultella ornithinolytica* and detection of macrolide resistance gene. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 40(1), 1–4.
- Jiménez R, Sommer S. 2017. The amphibian microbiome: natural range of variation, pathogenic dysbiosis, and role in conservation. *Biodiversity and Conservation*, 26.
- José-María L, Armengot L, Blanco-Moreno JM, Bassa M, Sans FX. 2010. Effects of agricultural intensification on plant diversity in Mediterranean dryland cereal fields. *Journal of Applied Ecology*, 47(4), 832–840
- Kanki M, Yoda T, Tsukamoto T, Shibata T. 2002. *Klebsiella pneumoniae* produces no histamine: *Raoultella planticola* and *Raoultella ornithinolytica* strains are histamine producers. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(7), 3462–3466.
- Ke D, Picard FJ, Martineau F, Menard C, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. 1999. Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(11):3497-3503.
- Kim JH, Go J, Cho CR, Kim JII, Lee MS, Park SC. 2013. First report of human acute acalculous cholecystitis caused by the fish pathogen *Lactococcus garvieae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(2), 712–714.
- Kinney CA, Furlong ET, Zaugg SD, Burkhardt MR, Werner SL, Cahill JF, Jogensen GR. 2006. Survey of Organic Wastewater Contaminants in Biosolids Destined for Land Application. *Environmental Science and Technology*, 40(23), 7207–7215.
- Knijff E, Dellaglio F, Lombardi A, et al., 2001. Rapid identification of *Enterococcus durans* and *Enterococcus hirae* by PCR with primers targeted to the *ddl* genes. *J. Microbiol. Methods*. 47, 35–40.
- Kohl KD, Cary TL, Karasov WH, Dearing MD. 2013. Restructuring of the amphibian gut microbiota through metamorphosis. *Environmental Microbiology Reports*, 5(6), 899–903.
- Kohl KD, Yahn J. 2016. Effects of environmental temperature on the gut microbial communities of tadpoles. *Environmental Microbiology*, 18(5), 1561–1565.
- Köppen, W. 1931. *Climatologia*. México, Fundo de Cultura Econômica.
- Kosecka-Strojek M, Sabat AJ, Akkerboom V, Kooistra-Smid AMD, Miedzobrodzki J, Friedrich AW. 2019. Development of a reference data set for assigning *Streptococcus* and *Enterococcus* species based on next generation sequencing of

- the 16S-23S *rRNA* region. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 8(1).
- Kosecka-Strojek M, Wolska M, Żabicka D, Sadowy E, Międzobrodzki J. 2020. Identification of clinically relevant streptococcus and enterococcus species based on biochemical methods and 16s *rRNA*, *SODA*, *TUF*, *RPOB*, and *RECA* gene sequencing. *Pathogens*, 9(11), 1–21.
- Kozak GK, Boerlin P, Janecko N, Reid-Smith RJ, Jardine C. 2009. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from Swine and wild small mammals in the proximity of swine farms and in natural environments in Ontario, Canada. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(3), 559–566.
- Kueneman JG, Parfrey LW, Woodhams DC, Archer HM, Knight R, McKenzie VJ. 2014. The amphibian skin-associated microbiome across species, space and life history stages. *Molecular Ecology*, 23(6), 1238–1250.
- Lambertini C, Becker CGM, Belasen A, Valencia-Aguilar A, Nunes-de-Almeida CHL, Betancourt-Román CM, Rodriguez D, Da Silva-Leite D, Oliveira IS, Gasparini JL, Ruggeri J, Mott T, Jenkinson TS, James TY, Zamudio KR, Toledo LF. 2021. Biotic and abiotic determinants of *Batrachochytrium dendrobatidis* infections in amphibians of the Brazilian Atlantic Forest. *Fungal Ecology*, 49.
- Lampo M, Barrio-Amorós C, Han B. 2006. *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in the recently rediscovered *Atelopus mucubajensis* (Anura, Bufonidae), a critically endangered frog from the Venezuelan Andes. *EcoHealth*, 3(4), 299–302.
- Lance SL, Erickson MR, Flynn RW, Mills GL, Tuberville TD, Scott DE. 2012. Effects of chronic copper exposure on development and survival in the southern leopard frog (*Lithobates [Rana] sphenoccephalus*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(7), 1587–1594.
- Lauer A, Hernandez T. 2015. Cutaneous Bacterial Species from *Lithobates catesbeianus* can Inhibit Pathogenic Dermatophytes. *Mycopathologia*, 179(3–4), 259–268.
- Laukkanen-Ninios R, Fredriksson-Ahomaa M, Maijala R, Korkeala H. 2014. High prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in pig cheeks. *Food Microbiology*, 43, 50–52.
- Lima TMF. 2014. **Descrição da dieta de *Melanophryniscus admirabilis* (Anura: Bufonidae)**. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Liu LH, Wang NY, Wu AYJ, Lin CC, Lee CM, Liu CP. 2018. *Citrobacter freundii* bacteremia: Risk factors of mortality and prevalence of resistance genes. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 51(4), 565–572.
- Longcore JE, Pessier AP, Nichols DK. 1999. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia*, 91(2), 219–227.
- Loudon AH, Holland JA, Umile TP, Burzynski EA, Minbiole KPC, Harris RN. 2014. Interactions between amphibians' symbiotic bacteria cause the production of emergent anti-fungal metabolites. *Frontiers in Microbiology*, 5(8).

- Loudon AH, Woodhams DC, Parfrey LW, Archer H, Knight R, McKenzie V, Harris RN. 2014. Microbial community dynamics and effect of environmental microbial reservoirs on red-backed salamanders (*Plethodon cinereus*). *ISME Journal*, 8(4), 830–840.
- Madison JD, Berg EA, Abarca JG, Whitfield SM, Gorbatenko O, Pinto A, Kerby JL. 2017. Characterization of *Batrachochytrium dendrobatidis* inhibiting bacteria from amphibian populations in Costa Rica. *Frontiers in Microbiology*, 8(2).
- Madison JD, Ouellette SP, Schmidt EL, Kerby JL. 2019. *Serratia marcescens* shapes cutaneous bacterial communities and influences survival of an amphibian host. *Proceedings of the Royal Society B*, 286(1914).
- Mangoni ML, Maisetta G, Di Luca M, Gaddi LMH, Esin S, Florio W, Brancatisano FL, Barra D, Campa M, Batoni G. 2008. Comparative analysis of the bactericidal activities of amphibian peptide analogues against multidrug-resistant nosocomial bacterial strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(1), 85–91.
- Mann MB, Prichula J, De Castro IMS, Severo JM, Abadie M, De Freitas Lima TMF, Caorsi V, Borges-Martins M, Frazzon J, Frazzon APG. 2021. The Oral Bacterial Community in *Melanophryniscus admirabilis* (Admirable Red-Belly Toads): Implications for Conservation. *Microorganisms*, 9(2), 220.
- Mauel MJ, Miller DL, Frazier KS, Hines ME. 2002. Bacterial pathogens isolated from cultured bullfrogs (*Rana castesbeiana*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 14(5), 431–433.
- McKenzie VJ, Bowers RM, Fierer N, Knight R, Lauber CL. 2012. Co-habiting amphibian species harbor unique skin bacterial communities in wild populations. *ISME Journal*, 6(3), 588–596.
- Medeiros AW, De Amorim DB, Tavares M, De Moura TM, Franco AC, D’Azevedo PA, Frazzon J, Frazzon APG. 2017. Enterococcus species diversity in fecal samples of wild marine species as determined by real-time PCR. *Canadian Journal of Microbiology*, 63(2), 129–136.
- Medeiros AW, Giongo A, Valdez FP, De Amorim DB, Tavares M, D’Azevedo PA, Franco AC, Frazzon J, Frazzon APG. 2016. Characterization of the faecal bacterial community of wild young South American (*Arctocephalus australis*) and Subantarctic fur seals (*Arctocephalus tropicalis*). *FEMS Microbiology Ecology*, 92(3).
- Medina D, Hughey MC, Becker MH, Walke JB, Umile TP, Burzynski EA, Iannetta A, Minbiole KPC, Belden LK. 2017. Variation in Metabolite Profiles of Amphibian Skin Bacterial Communities Across Elevations in the Neotropics. *Microbial Ecology*, 74(1), 227–238.
- Melo, AS. 2008. O que ganhamos “confundindo” riqueza de espécies e equabilidade em um índice de diversidade? *Biota Neotrop*, 8(3).
- Menke S, Wasimuddin MM, Melzheimer J, Mfune JKE, Heinrich S, Thalwitzer S, Wachter B, Sommer S. 2014. Oligotyping reveals differences between gut microbiomes of free-ranging sympatric Namibian carnivores (*Acinonyx jubatus*,

- Canis mesomelas*) on a bacterial species-like level. *Frontiers in Microbiology*, 5(526).
- Merhej V, Adékambi T, Pagnier I, Raoult D, Drancourt M. 2008. *Yersinia massiliensis* sp. nov., isolated from fresh water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(4), 779–784.
- Meyburgh CM, Bragg RR, Boucher CE. 2017. *Lactococcus garvieae*: An emerging bacterial pathogen of fish. *Diseases of Aquatic Organisms*, 123(1):67-69.
- Milliron SM, Seyler ZG, Myers AN, Rodrigues-Hoffmann A, Hnot M, Wiener DJ. 2021. *Pyogranulomatous panniculitis* in a domestic cat associated with *Pseudomonas luteola* infection. *Veterinary Dermatology*, 32(1), 83-e15.
- Mitchell, M. A. 2011. **Zoonotic Diseases Associated with Reptiles and Amphibians: An Update.** In *Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice*, 14(3):439-456. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract.*
- Montel-Mendoza G, Pasteris SE, Ale CE, Otero MC, Bühler MI, Nader-Macías MEF. 2012. Cultivable microbiota of *Lithobates catesbeianus* and advances in the selection of lactic acid bacteria as biological control agents in raniculture. *Research in Veterinary Science*, 93(3), 1160–1167.
- Moreno C, Troncoso M, Coria-De-La P, Ledermann W, Del Valle G, Nuñez C, Araya P, Fernández J, Fernández A. 2010. Report of four clinical cases of *Hafnia alvei* bacteremia in a pediatric cardiac surgery unit. *Revista chilena de infectología : organo oficial de la Sociedad Chilena de Infectología*, 27(1), 40–44.
- Morka K, Bystrón J, Bania J, Korzeniowska-Kowal A, Korzekwa K, Guz-Regner K, Bugla- Płoskońska G. 2018. Identification of *Yersinia enterocolitica* isolates from humans, pigs and wild boars by MALDI TOF MS. *BMC Microbiology*, 18(1).
- Mueller UG, Sachs JL. 2015. Engineering Microbiomes to Improve Plant and Animal Health. *Trends in Microbiology*, 23(10):606-617.
- Niederle MV, Bosch J, Ale CE, Nader-Macías ME, Ficoseco CA, Toledo LF, Valenzuela-Sánchez A, Soto-Azat C, Pasteris SE. 2019. Skin-associated lactic acid bacteria from North American bullfrogs as potential control agents of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *PLoS ONE*, 14(9).
- Nnadozie CF, Odume ON. 2019. Freshwater environments as reservoirs of antibiotic resistant bacteria and their role in the dissemination of antibiotic resistance genes. *Environmental Pollution*, 254, 113067.
- Nyström P, Hansson J, Månsson J, Sundstedt M, Reslow C, Broström A. 2007. A documented amphibian decline over 40 years: Possible causes and implications for species recovery. *Biological Conservation*, 138(3–4):399–411.
- Ogawa D, Suzuki M, Inamura Y, Saito K, Hasunuma I, Kobayashi T, Kikuyama S, Iwamuro S. 2020. Antimicrobial Property and Mode of Action of the Skin Peptides of the Sado Wrinkled Frog, *Glandirana susurra*, against Animal and Plant Pathogens. *Antibiotics*, 9(8), 457.

- Olson DH, Aanensen DM, Ronnenberg KL, Powell CI, Walker SF, Bielby J, Garner TWJ, Weaver G, Fisher MC. 2013. Mapping the Global Emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the Amphibian Chytrid Fungus. *PLoS ONE*, 8(2), e56802.
- Padilla D, Acosta F, Ramos-Vivas J, Grasso V, Bravo J, El Aamri F, Real F. 2015. The pathogen *Hafnia alvei* in veterinary medicine: A review. *Journal of Applied Animal Research*, 43(2): 231–235.
- Pan X, Tang M, You J, Liu F, Sun C, Osire T, Fu W, Yi G, Yang T, Yang ST, Rao Z. 2021. Regulator RcsB Controls Prodigiosin Synthesis and Various Cellular Processes in *Serratia marcescens* JNB5-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(2).
- Passos LG, Garcia G, Young RJ. 2018. Comparing the bacterial communities of wild and captive golden mantella frogs: Implications for amphibian conservation. *PLoS ONE*, 13(10).
- Pasteris SE, Guidoli MG, Otero MC, Bühler MI, Nader-Macías ME. 2011. In vitro inhibition of *Citrobacter freundii*, a red-leg syndrome associated pathogen in raniculture, by indigenous *Lactococcus lactis* CRL 1584. *Veterinary Microbiology*, 151(3–4): 336–344.
- Pearson MD. 1998. **Motile *Aeromonas septicaemia* of farmed *Rana* spp.** Tese (Doutorado em Aquatic Veterinary Studies) – Institute of Aquaculture, University of Stirling, Scotland.
- Pessier AP. 2002. An overview of amphibian skin disease. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 11(3), 162–174.
- Pessoa RBG, Marques DSC, Lima ROHA, Oliveira MBM, Lima GMS, Carvalho EVMM, Coelho LCBB. 2020. Molecular characterization and evaluation of virulence traits of *Aeromonas* spp. isolated from the tambaqui fish (*Colossoma macropomum*). *Microbial Pathogenesis*, 147.
- Pieniz S, Moura TM, Cassenego APV, Andreazza R, Frazzon APG, Camargo FAO, Brandelli A. 2015. Evaluation of resistance genes and virulence factors in a food isolated *Enterococcus durans* with potential probiotic effect. *Food Control*, 51, 49–54.
- Piotrowski JS, Annis SL, Longcore JE. 2004. Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a Chytrid Pathogen of Amphibians. *Mycologia*, 96(1), 9.
- Plaza PI, Blanco G, Lambertucci AS. 2020. Implications of bacterial, viral and mycotic microorganisms in vultures for wildlife conservation, ecosystem services and public health. *Ibis*, 162(4):1109-1124.
- Prest TL, Kimball AK, Kueneman JG, McKenzie VJ. 2018. Host-associated bacterial community succession during amphibian development. *Molecular Ecology*, 27(8), 1992–2006.
- Prestes A, Klausner V, Silva IR, Ojeda-González A, Lorensi C. 2018. Araucaria growth response to solar and climate variability in South Brazil. *Ann. Geophys.*, 36, 717-

729.

- Preuss JF, Greenspan SE, Rossi EM, Gonsales EML, Neely WJ, Valiati VH, Woodhams DC, Becker CG, Tozetti AM. 2020. Widespread Pig Farming Practice Linked to Shifts in Skin Microbiomes and Disease in Pond-Breeding Amphibians. *Environmental Science and Technology*, 54(18), 11301–11312.
- Preuss JF, Lambertini C, Leite DS, Toledo LF, Lucas EM. 2015. *Batrachochytrium dendrobatidis* in near threatened and endangered amphibians in the southern Brazilian Atlantic Forest. *North-Western Journal of Zoology*, 11(2):360-362.
- Prichula J, Pereira RI, Wachholz GR, Cardono LA, Tolfo NCC, Santestevan NA, Medeiros AW, Tavares M, Frazzon J, D’Azevedo PA, Frazzon APG. 2016. Resistance to antimicrobial agents among enterococci isolated from fecal samples of wild marine species in the southern coast of Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 105(1), 51–57.
- Prichula J, Van-Tyne D, Schwartzman J, Sant’Anna FH, Pereira RI, Da Cunha GR, Tavares M, Lebreton F, Frazzon J, D’Azevedo PA, Seixas A, Frazzon APG, Gilmore MS. 2020. Enterococci from wild magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) as an indicator of marine ecosystem health and human impact. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(19).
- Rana SW, Kumar A, Walia SK, Berven K, Cumper K, Walia SK. 2011. Isolation of Tn1546-like elements in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated from wood frogs: An emerging risk for zoonotic bacterial infections to humans. *Journal of Applied Microbiology*, 110(1), 35–43.
- Rebollar EA, Jani AJ, Becker GC, Harrison ZA, Price SJ, Hopkins K, Leung WTM, Sergeant C, Garner TWJ. 2019. Diversity-Stability Dynamics of the Amphibian Skin Microbiome and Susceptibility to a Lethal Viral Pathogen. *Frontiers in Microbiology*, 10:2883.
- Rebollar ER, Hughey MC, Medina D, Harris RN, Ibáñez R, Belden LK. 2016. Skin bacterial diversity of Panamanian frogs is associated with host susceptibility and presence of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *The ISME Journal*, 10:1682-1695.
- Rebollar, EA, Martínez-Ugalde E, Orta AH. 2020. The amphibian skin microbiome and its protective role against chytridiomycosis. *Herpetologica*, 76(2):167-177.
- Redford KH, Segre JA, Salafsky N, Del Rio CM, McAloose D. 2012. Conservation and the Microbiome. *Conservation Biology*, 26(2), 195–197.
- Regotto P, Dereczynski C, Chou SC, Bazzanela AC. 2021. Observed changes in air temperature and precipitation extremes over Brazil. *International Journal of Climatology*, 41(11), 5125-5142.
- Reygaert CW. 2018. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, 4(3):482–501.
- Richardson BM, Griffin MJ, Colvin ME, Wise DJ, Ware C, Mischke CC, Greenway TE, Byars TS, Hanson LA, Lawrence ML. 2021. Using quantitative polymerase chain reaction (qPCR) and occupancy models to estimate atypical *Aeromonas*

hydrophila (aAh) prevalence in catfish. *Aquaculture*, 530, 735687.

- Rivory P, Brown G, Shilton C, Shine R, Šlapeta J. 2020. Apparent lack of spill-over of parasites from an invasive anuran: PCR detects *Entamoeba* in cane toads (*Rhinella marina*) but not in sympatric Australian native frogs. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 12, 207–213.
- Rodríguez A, Poth D, Schulz S, Vences M. 2011. Discovery of skin alkaloids in a miniaturized eleutherodactylid frog from Cuba. *Biology Letters*, 7(3), 414–418.
- Rodríguez C, Ibáñez R, Rollins-Smith LA, Gutiérrez M, Durant-Archibold AA. 2020. Antimicrobial Secretions of Toads (Anura, Bufonidae): Bioactive Extracts and Isolated Compounds against Human Pathogens. *Antibiotics* 2020, 9(12):843.
- Rodríguez C, Rollins-Smith LA, Ibáñez R, Durant-Archibold AA, Gutiérrez M. 2017. Toxins and pharmacologically active compounds from species of the family Bufonidae (Amphibia, Anura). *Journal of Ethnopharmacology*, 198, 235–254.
- Rollins-Smith LA, King JD, Nielsen PF, Sonnevend A, Conlon JM. 2005. An antimicrobial peptide from the skin secretions of the mountain chicken frog *Leptodactylus fallax* (Anura:Leptodactylidae). *Regulatory Peptides*, 124(1–3), 173–178.
- Ross AA, Hoffmann AR, Neufeld JD. 2019. The skin microbiome of vertebrates. *Microbiome*, 7(1).
- Rothe K, Wantia N, Spinner CD, Schneider J, Lahmer T, Waschulzik B, Schmid RM, Busch DH, Katchanov J. 2019. Antimicrobial resistance of bacteraemia in the emergency department of a German university hospital (2013-2018): potential carbapenem-sparing empiric treatment options in light of the new EUCAST recommendations. *BMC Infectious Diseases*, 19(1091).
- Rowley JLL, Alford RA. 2013. Hot bodies protect amphibians against chytrid infection in nature. *Scientific Reports*, 3(1), 1–4.
- Ruggeri J, Longo AV, Gaiarsa MP, Alencar LRV, Lambertini C, Leite DS, Carvalho-E-Silva SP, Zamudio KR, Toledo LF, Martins M. 2015. Seasonal variation in population abundance and chytrid infection in stream-dwelling frogs of the Brazilian Atlantic Forest. *PLoS ONE*, 10(7).
- Ruthsatz K, Lyra ML, Lambertini C, Belasen AM, Jenkinson TS, Leite DS, Becker CG, Haddad CFB, James TY, Zamudio KR, Toledo LF, Vences M. 2020. Skin microbiome correlates with bioclimate and *Batrachochytrium dendrobatidis* infection intensity in Brazil's Atlantic Forest treefrogs. *Scientific Reports*, 10(1), 1–15.
- Samonis G, Karageorgopoulos DE, Kofteridis DP, Matthaiou DK., Sidiropoulou V, Maraki S, Falagas ME. 2009. *Citrobacter* infections in a general hospital: Characteristics and outcomes. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 28(1), 61–68.

- Santestevan NA, Zvoboda DA, Prichula J, Pereira RI, Wachholz GR, Cardoso LA, De Moura TM, Medeiros AW, Amorim DB, Tavares M, D’Azevedo PA, Franco AC, Frazzon J, Frazzon APG. 2015. Antimicrobial resistance and virulence factor gene profiles of *Enterococcus* spp. isolates from wild *Arctocephalus australis* (South American fur seal) and *Arctocephalus tropicalis* (Subantarctic fur seal). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(12), 1935–1946.
- Saporito RA, Donnelly MA, Spande TD, Garrafo HM. 2012. A review of chemical ecology in poison frogs. *Chemoecology*, 22(3):159-168.
- Saporito RA, Norton RA, Garrafo MH, Spande TF. 2015. Taxonomic distribution of defensive alkaloids in Nearctic *Oribatid mites* (Acari, Oribatida). *Experimental and Applied Acarology*, 67(3), 317–333.
- Sayah RS, Kaneene JB, Johnson Y, Miller RA. 2005. Patterns of antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic- and wild-animal fecal samples, human septage, and surface water. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(3), 1394–1404.
- Schadich E, Cole ALJ. 2010. Pathogenicity of *Aeromonas hydrophila*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* to brown tree frogs (*Litoria ewingii*). *Comparative Medicine*, 60(2), 114–117.
- Schwarz S, Silley P, Simjee S, Woodford N, Van Duijkeren E, Johnson AP, Gaastra W. 2010. Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(4), 601–604.
- Sclocco A, Teseo S. 2020. Microbial associates and social behavior in ants. *Artificial Life and Robotics*, 25(4), 552–560.
- Sękowska A. 2017. *Raoultella* spp.— clinical significance, infections and susceptibility to antibiotics. *Folia Microbiologica*, 62(3):221-227.
- Serwecińska L, Kiedrzyńska E, Kiedrzyński M. 2021. A catchment-scale assessment of the sanitary condition of treated wastewater and river water based on fecal indicators and carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. *Science of the Total Environment*, 750, 142266.
- Sharma D, Sharma P, Soni P. 2017. First case report of *Providencia Rettgeri* neonatal sepsis. *BMC Research Notes*, 10(1), 536.
- SiBBr. 2019. *Melanophryniscus admirabilis*. Em: Ficha de Espécies do Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira (SiBBr). Disponível em: https://ferramentas.sibbr.gov.br/ficha/bin/view/especie/melanophryniscus_admirabilis Acesso em: 18 jan. 2021.
- Silva PR, Borges-Martins M, Oliveira GT. 2020. *Melanophryniscus admirabilis* tadpoles’ responses to sulfentrazone and glyphosate-based herbicides: an approach on metabolism and antioxidant defenses. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 4156-4172.
- Silva PR. 2017. **Influência dos herbicidas Sulfentrazone (Boral® 500 SC) e Glifosato (Roundup® Original) na composição bioquímica e nas defesas**

antioxidantes de *Melanophryniscus admirabilis* (Anura: Bufonidae).
Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Faculdade de Biociências, Pontifícia
Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

- Simon MP, Vatnick I, Hopey HA, Butler K, Korver C, Hilton C, Weimann RS, Brodtkin MA. 2002. Effects of Acid Exposure on Natural Resistance and Mortality of Adult *Rana pipiens*. *Journal of Herpetology*, 36(4).
- Smet A, Martel A, Persoons D, Dewulf J, Heyndrickx M, Herman L, Haesebrouck F, Butaye P. 2010. Broad-spectrum β -lactamases among Enterobacteriaceae of animal origin: molecular aspects, mobility and impact on public health. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(3), 295–316.
- Soenens A, Imperial J. 2020. Biocontrol capabilities of the genus *Serratia*. *Phytochemistry Reviews*, 19(3):577-587.
- Song J, Woodhams DC, Martino C, Allaband C, Mu A, Montgomery SJM, Suchodolski JS, Knight R. 2019. Engineering the microbiome for animal health and conservation. *Experimental Biology and Medicine*, 244, 494–504.
- Souza RA, Falcão DP, Falcão JP. 2011. Emended description of *Yersinia massiliensis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(5), 1094–1097.
- Sumi CD, Yang BW, Yeo IC, Hahm YT. 2015. Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: A new era for antibiotics. *Canadian Journal of Microbiology*, 61(2), 93–103.
- Suravaram S, Hada V, Siddiqui IA. 2021. Comparison of antimicrobial susceptibility interpretation among Enterobacteriaceae using CLSI and EUCAST breakpoints. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 39(3), 315-319.
- Suzuki A, Akuzawa K, Kogi K, Ueda K, Suzuki M. 2021. Captive environment influences the composition and diversity of fecal microbiota in Indo-Pacific bottlenose dolphins, *Tursiops aduncus*. *Marine Mammal Science*, 37(1), 207–219.
- Tong Q, Cui LY, Du XP, Hu ZF, Bie J, Xiao JH, Wang HB, Zhang JT. 2020. Comparison of Gut Microbiota Diversity and Predicted Functions Between Healthy and Diseased Captive *Rana dybowskii*. *Frontiers in Microbiology*, 11.
- Tong Q, Liu XN, Hu ZF, Ding JF, Bie J, Wang HB, Zhang JT. 2019. Effects of captivity and season on the gut microbiota of the brown frog (*Rana dybowskii*). *Frontiers in Microbiology*, 10(8).
- Torumkunej D, Smayevsky J, Relloso MS, Sucari A, Pennini M, Brilla E, Vilches V, De la Cruz Y, Morrissey I. 2020. Results from the Survey of Antibiotic Resistance (SOAR) 2015–17 in Latin America (Argentina, Chile and Costa Rica): data based on CLSI, EUCAST (dose-specific) and pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) breakpoints. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(S1), i43-i59.
- Uramoto K, Walder JMM, Roberto E, Zucchi A. 2005. Quantitative Analysis and Distribution of the Population of Species in the Genus *Anastrepha* (Diptera:

- Tephritidae) on Luiz de Queiroz campus, Piracicaba, SP, Brazil. *Neotrop. Entomol.* 34(1).
- Varga JFA, Bui-Marinós MP, Katzenback BA. 2019. Frog skin innate immune defences: Sensing and surviving pathogens. *Frontiers in Immunology*, 10(1).
- Vargas ND, Guimarães M, Caorsi V, Bordignon DW, Borges-Martins M. 2019. An experimental assessment of the antipredatory function of green dorsal coloration in poisonous Neotropical red-bellied toads. *Journal of Zoology*, 310: 171-179.
- Vasconcelos MA. 2015. **Conservação do sapinho-admirável-de-barriga-vermelha, *Melanophryniscus admirabilis* (anura: bufonidae): estudo de ecologia populacional.** Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Wake DB, Koo MS. 2018. Amphibians. *Current Biology*, 28(21):R1237-R1241.
- Walke JB, Belden LK. 2016. Harnessing the Microbiome to Prevent Fungal Infections: Lessons from Amphibians. *PLOS Pathogens*, 12(9), e1005796.
- Wang L, Wei Y, Huang Y. 2013. *Morganella morganii* as a causative agent of disease in the Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*). *Asian Herpetological Research*, 4(3), 197–201.
- Wang S, Zeng Z, Yang Q, Qiao S. 2016. Antimicrobial peptides as potential alternatives to antibiotics in food animal industry. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(5):603.
- Wang TKM, Ahn Y, Dunlop J. 2014. *Providencia rettgeri* peritonitis in a patient on peritoneal dialysis with perforated appendicitis. *Peritoneal Dialysis International*, 34(5):569-570.
- Wang Y, Zhang Y, Lee WH, Yang X, Zhang Y. 2016. Novel Peptides from Skins of Amphibians Showed Broad-Spectrum Antimicrobial Activities. *Chemical Biology and Drug Design*, 87(3), 419–424.
- Wardle DA, Nicholson KS, Bonner KI, Yeates GW. 1999. Effects of agricultural intensification on soil-associated arthropod population dynamics, community structure, diversity and temporal variability over a seven-year period. *Soil Biology and Biochemistry*, 31(12), 1691–1706.
- West AG, Waite DW, Deines P, Bourne DG, Digby A, McKenzie VJ, Taylor MW. 2019. The microbiome in threatened species conservation. *Biological Conservation*, 229, 85-98.
- WHO. 1995. Copper Environmental Health Criteria 200. World Health Organization, Geneva.
- Wimalasena SHM, Shin GW, Pathirana HNK, De Silva BCJ, Hossain S, Heo GJ. 2017. Characterization of Quinolone Resistant Determinants in *Morganella morganii* Isolated from Pet Turtles. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 12(4), 189–196.
- Wimalasena SHMP, Pathirana HNKS, Shin GW, De Silva BCJ, Hossain S, Heo GJ.

2019. Characterization of quinolone-resistant determinants in tribe proteeae isolated from pet turtles with high prevalence of qnrd and novel gyrb mutations. *Microbial Drug Resistance*, 25(4), 611–618.
- Woodhams DC, Alford RA, Antwis RE, Archer H, Becker MH, Belden LK, Bell SC, Bletz M, Daskin JH, Davis LR, Flechas SV, Lauer A, Gonzales A, Harris RN, Holden WM, Hughey MC, Ibáñez R, Knight R, Kueneman J, McKenzie V. 2015. Antifungal isolates database of amphibian skin-associated bacteria and function against emerging fungal pathogens. *Ecology*, 96(2), 595–595.
- Woodhams DC, LaBumbard BC, Barnhart KL, Becker MH, Bletz MC, Escobar LA, Flechas SV, Forman ME, Iannetta AA, Joyce MD, Rabemananjara F, Gratwicke B, Vences M, Minbiole KPC. 2018. Prodigiosin, Violacein, and Volatile Organic Compounds Produced by Widespread Cutaneous Bacteria of Amphibians Can Inhibit Two *Batrachochytrium* Fungal Pathogens. *Microbial Ecology*, 75(4), 1049–1062.
- Woodhams DC, Rollins-Smith LA, Reinert LK, Lam BA, Harris RN, Briggs CJ, Vredenburg VT, Patel BT, Caprioli RM, Chaurand P, Hunziker P, Bigler L. 2020. Probiotics Modulate a Novel Amphibian Skin Defense Peptide That Is Antifungal and Facilitates Growth of Antifungal Bacteria. *Microbial Ecology*, 79(1), 192–202.
- Xia K, Zhao H, Wu M, Wang H. 2012. Chronic toxicity of copper on embryo development in Chinese toad, *Bufo gargarizans*. *Chemosphere*, 87(11), 1395–1402.
- Yang Y, Song X, Chen A, Wang H, Chai L. 2020. Exposure to copper altered the intestinal microbiota in Chinese brown frog (*Rana chensinensis*). *Environmental Science and Pollution Research*, 27(12), 13855–13865.
- Yildirim S, Yeoman CJ, Sipos M, Torralba M, Wilson BA, Goldberg TL, Stumpf RM, Leigh SR, White BA, Nelson KE. 2010. Characterization of the Fecal Microbiome from Non-Human Wild Primates Reveals Species Specific Microbial Communities. *PLoS ONE*, 5(11), e13963.
- Yin L, Xu W, Liu X, Wang Y, Ge P, Wang X, Zhou H. 2021. Autophagy promotes innate defense against *Aeromonas hydrophila* in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) monocytes/macrophages. *Aquaculture*, 535, 736391.
- Yun JH, Roh SW, Whon TW, Jung MJ, Kim MS, Park DS, Yoon C, Nam YD, Kim YJ, Choi JH, Kim JY, Shin NR, Kim SH, Lee WJ, Bae JW. 2014. Insect gut bacterial diversity determined by environmental habitat, diet, developmental stage, and phylogeny of host. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(17), 5254–5264.
- Zaneveld JR, McMinds R, Thurber RV. 2017. Stress and stability: Applying the Anna Karenina principle to animal microbiomes. *Nature Microbiology*, 2(8).
- Zhan Y, Yan Y, Zhang W, Yu H, Chen M, Lu W, Ping S, Peng Z, Yuan M, Zhou Z, Elmerich C, Lin M. 2011. Genome sequence of *Acinetobacter calcoaceticus* PHEA-2, isolated from industry wastewater. *Journal of Bacteriology*, 193(10):2672–2673.
- Zhang CW, Zhang J, Zhao JJ, Zhao X, Zhao DF, Yin HQ, Zhang XX. 2017. *Serratia*

oryzae sp. Nov., isolated from rice stems. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(8), 2928–2933.

Zhou C, Ge N, Guo J, Zhu L, Ma Z, Cheng S, Wang J. 2019. *Enterobacter asburiae* Reduces Cadmium Toxicity in Maize Plants by Repressing Iron Uptake-Associated Pathways. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(36), 10126–10136.