



**UNIVERSIDADE
FEDERAL RURAL
DE PERNAMBUCO**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

LARA VALESCA MENDONÇA DA COSTA SANTOS

**MICROBIOTA BACTERIANA ASSOCIADA A PELE DE *Scinax x-signatus*
(SPIX, 1824) (ANURA: HYLIDAE) EM PERNAMBUCO, BRASIL**

**Recife
2020**

LARA VALESCA MENDONÇA DA COSTA SANTOS

MICROBIOTA BACTERIANA ASSOCIADA A PELE DE *Scinax x-signatus* (Spix, 1824) (AMPHIBIA: ANURA: HYLIDAE) EM PERNAMBUCO, BRASIL

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas/UFRPE como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora Msc. Alcina Gabriela Maria Medeiros da Fonsêca Santos.

Coorientadores: Prof. Dr. Geraldo Jorge Barbosa de Moura e Msc. Paula Mariana Salgueiro de Souza

**RECIFE
2020**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

237m

Santos, Lara Valesca Mendonça da Costa Santos

MICROBIOTA BACTERIANA ASSOCIADA A PELE DE *Scinax x-signatus* (SPIX, 1824) (ANURA: HYLIDAE) EM PERNAMBUCO, BRASIL: Microbiologia na herpetofauna / Lara Valesca Mendonça da Costa Santos Santos. - 2020.

40 f. : il.

Orientadora: Alcina Gabriela Maria Medeiros da Fonseca Santos.

Coorientadora: Geraldo Jorge Barbosa de Moura Paula Mariana Salgueiro de Souza.

Inclui referências.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Bacharelado em Ciências Biológicas, Recife, 2020.

1. Anfíbios. 2. Bactéria. 3. Simbiose. I. Santos, Alcina Gabriela Maria Medeiros da Fonseca, orient. II. Souza, Geraldo Jorge Barbosa de Moura Paula Mariana Salgueiro de, coorient. III. Título

LARA VALESCA MENDONÇA DA COSTA SANTOS

MICROBIOTA BACTERIANA ASSOCIADA A PELE DE *Scinax x-signatus* (Spix, 1824) (AMPHIBIA: ANURA: HYLIDAE) EM PERNAMBUCO, BRASIL.

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas/UFRPE como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovado em _____ Nota: _____

BANCA EXAMINADORA

MSc. Alcina Gabriela Maria Medeiros da Fonsêca Santos
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof^a Dr^a Luciana de Oliveira Franco
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. Marcos Antônio Barbosa de Lima
Universidade Federal Rural de Pernambuco

*À família, aos amigos e
ao R.U. nosso de cada
dia.*

AGRADECIMENTOS

A Deus e a todas as Boas Energias emanadas do universo.

A Dananilza, o amor da minha vida, por toda ajuda, pelo computador por onde pude fazer todo trabalho, por cada passagem de ônibus, pelas vezes que ela disse “me diga aí o nome desse professor que eu vou lá falar com ele”, por todo incentivo e investimento para que eu não só chegasse onde estou, mas para que eu fosse mais além. Muito rainha.

A Flávio José, o varzeano mais curioso de Pernambuco, por ter sido um dos melhores acontecimentos da minha vida, pela leveza diária pela qual é conhecido, pelo aprendizado, por todas as experiências trocadas, carinho, amor, palhaçadas, determinação, parceria e incentivos. Obrigada pela tortinha de limão Deborah em 2017 hahaha e por tudo me deu a honra de conhecer há 3 anos. Te amo.

A minha Orientadora Alcina Gabriela, minha mãe-em-ciência, por ler meus e-mails com carinho, pela orientação ao longo de quase 3 anos, pela paciência em ler 4 projetos de TCC para que somente o 5º viesse a ser o definitivo e em ouvir “Alcina, vou mudar tudo, tô gostando dessa introdução não”, por ter embarcado comigo numa ideia muito distante do que se imaginava, pelas respostas a dúvidas enviadas às 2:15 da madrugada de um domingo, pela clareza das correções, pela capacidade de simplificar situações que muitas vezes enfrentei como fim de linha, pela companhia nos campos, pelas caronas, pela instrução nos trabalhos e resumos dos quais participei, pela oportunidade de participar de coletas de seu trabalho maravilhoso, enfim, pela melhor orientação que já tive na rural. Me perdoe por gostar de Naruto, pelo menos eu gosto de Harry Potter, me dá uma colher de chá, vai. Você também me abandona e vai pra Bahia as vezes, estamos quites.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Geraldo Jorge Barbosa de Moura, pelo acolhimento e boas-vindas ao LEHP, pelo incentivo em projetos inovadores, disponibilidade e paciência ao longo de 5 projetos de TCC pela sugestão desta espécie linda alvo do estudo.

A Prof^a. Dr^a Anna Carolina Soares Almeida, por ser a minha luz no fim do túnel em um momento em que já estava sem esperanças em um projeto pelo qual me apaixonei quase que instantaneamente, por todo suporte e custeio destinado a concretização deste trabalho, pela simpatia, compreensão, confiança a mim direcionadas, sem a senhora nada disso aconteceria, minha eterna gratidão, espero que possa contar comigo para qualquer coisa e que não meça esforços pra isso, assim como fez comigo.

A minha có-orientadora Msc. Paula Salgueiro, uma doutoranda cantora maravilhosa com quem eu tive a honra de aprender um pouco mais sobre a microbiologia, um poço de gentileza e organização que dedicou um tempo maior do que o que possuía para que tudo desse certo.

Aos companheiros do LEHP, pela atenção, acolhimento e aprendizado ao longo desses anos, e a Ubiratã Ferreira Souza, que juntamente com Alcina, não mediu esforços pra ajudar na concretização desse trabalho. Não me recordo de um campo em que encontramos uma poça d'água com uma profundidade considerável e Bira não tenha praticamente mergulhado com uma máquina fotográfica na mão. Amigo, você vai longe.

A toda a equipe do Jardim Botânico do Recife, em especial ao professor Jefferson Rodrigues Maciel, pela recepção, simpatia e suporte na permissão das coletas noturnas.

A Prof. Dr. Yone Cavalcanti. Ela talvez não saiba que foi em uma de suas aulas que tive a ideia deste trabalho.

A Monara Barros, pelos primórdios da minha iniciação científica, pela dedicação em sanar todas as dúvidas e pela transmissão de mais amor pela biologia.

Aos makakos, Sexteto e a Pedrickson Swayze, obrigada pela amizade dos dias difíceis e dos dias felizes, vocês são peças essenciais na minha vida.

RESUMO

A presença de uma microbiota simbiote em animais extremamente sensíveis como os anfíbios anuros é crucial para o desenvolvimento de um sistema imunológico capaz de combater os principais agentes infecciosos presentes no ambiente. *Scinax x-signatus* é um anuro que possui um comportamento generalista e sinantrópico ocorrendo em florestas e áreas urbanas, mas não existem estudos de identificação da microbiota bacteriana associada a pele deste animal. O objetivo deste trabalho foi identificar a microbiota cutânea de *Scinax x-signatus* em duas áreas no Jardim Botânico do Recife (08°04' S; 34°59' W) e comparar a microbiota residente e transiente. Foram realizados enxagues com água destilada estéril nos animais para a remoção da microbiota transiente e swabs esfregados na pele para coletar a microbiota residente. As amostras foram identificadas preditivamente em meios de cultura seletivos, como Ágar Cromogênico, Cetremide, Ágar EMB e Ágar MacConkey. Para as análises, utilizamos Teste de Fisher e Análise de Cluster para verificar a similaridade entre as áreas de coleta. Foram coletados 12 indivíduos que resultaram em 24 isolados, 13 de microbiota transiente e 11 de microbiota residente e os métodos preditivos indicaram 5 táxons: *Pseudomonas spp.* (43%) mais ocorrente nas amostras, *Escherichia coli* (22%), *Klebsiella pneumoniae* (18%), *Enterococcus faecalis* (12%) e *Staphylococcus aureus* (4%). A microbiota da área Antropizada demonstrou menor similaridade entre as amostras transiente e residente. A análise de Cluster indicou que a microbiota da área controle se mostrou mais similar a respeito das amostras transientes e residentes, possivelmente devido ao grau reduzido de heterogeneidade espacial. Os espécimes de *Scinax x-signatus* apresentaram na pele bactérias de interesse médico que são similares com outras espécies de anuros. *S. x-signatus* apresenta grande importância ecológica para os ecossistemas, e estudos destinados a investigação de potenciais antimicrobianos na pele e na microbiota associada a *S. x-signatus* são de suma importância para a produção de fármacos.

Keywords: Anfíbios, bactéria, simbiose.

ABSTRACT

The presence of a symbiotic microflora in extremely sensitive animals like amphibians is crucial for the development of an immune system capable of fighting the main opportunistic infectious agents in the environment. *Scinax x-signatus* is a anuro which has a general and synanthropic behavior occurring in forests and urban areas, but there are no identification studies of bacterial microbiota associated with skin of this animal. The objective of this study was to identify the skin microbiota of *Scinax x-signatus* in two areas in the Botanical Garden Reef (08 ° 04 'S, 34 ° 59' W) and compare the resident and transient microorganisms. Rinses were performed with sterile distilled water to remove the animals from transient microflora and swabs wiped on the skin to collect the resident microflora. Samples were predictively you identify in selective media, as Chromogenic Agar, Cetremide, EMB Agar and MacConkey agar For the analyzes, we used Fisher Test and Cluster Analysis to verify the similarity between the collection areas. 24 sample were isolated from bacterial microflora and predictive methods were taxa 5: *Pseudomonas spp.* (43%) occurring in most samples, *Escherichia coli* (22%), *Klebsiella pneumoniae* (18%), *Enterococcus faecalis* (12%) and *Staphylococcus aureus* (4%), with the lower frequency. The microbiota from the anthropized area showed less similarity between the resident and transient samples. Cluster Analysis indicated that the microbiota from the control area was more similar among transients and residents samples, possibly due to the low degree of spatial heterogeneity. *Scinax x-signatus* specimes presented skin microorganisms of medical interest that are similar to other species of frogs. *S. x-signatus* has great ecological importance to ecosystems, and studies to research antimicrobial potential on the skin and in the microbiota associated with *S. x-signatus* are very important for the production of pharmaceuticals.

Keyword: Amphibians, bacteria, symbiosis

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** *Scinax x-signatus* (Spix, 1824) em Bromélia no Jardim Botânico do Recife. Foto: Ubiratã Souza, 2019..... 17
- Figura 2:** Mapa de localização do Jardim Botânico do Recife. Fonte: Do Nascimento et al., 201720
- Figura 3** A – Banhos de água destilada estéril para remoção de microbiota transiente do indivíduo de *Scinax x-signatus*; B – Indivíduo banhado, preparado para a coleta da microbiota residente; C – Amostras armazenadas em isopor para transporte a geladeira. Fonte: Souza, 201922
- Figura 4:** A – Amostras dos swabs armazenadas em LB caldo dispostas para semeio; B – Meio de cultura já solidificado e semeado em placas de Petri identificadas; C – Semeio por esgotamento. Fotos: Santos, 2019. 22
- Figura 5:** Dendrograma comparando a diversidade bacteriana entre a microbiota residente e transiente na Área Controle e Área Antropizada, baseando-se nas categorias referentes a: Amostra transiente da Área Antropizada (Antrop_Trans), Amostra residente da Área Antropizada (Antrop_Resid); Amostra residente da Área Controle (Controle_Res) e Amostra Transiente da Área Controle (Controle_Trans). Coph Cor.: 0,909130
- Figura 6:** Dendrograma comparando a diversidade bacteriana entre a microbiota residente e transiente nos locais específicos da Área Antropizada, baseando-se nas categorias referentes a: Amostras transientes e residentes de banheiro (BAN_Transi e BAN_Reside), Paredes de Sala de Aula (PSA_Reside e PSA_Transie) Ar condicionados (AR_Residen e AR_Transie) e Bromelial de Visitação (BROV_Trans e BROV_Resi). Coph Cor.: 0,887831

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Animais e seus respectivos locais de captura separados por: Área Controle e Área Antropizada. ORQ= Orquidário; LA= Lago; BRO=Bromélia; FOL= Folhíço; PSA=Paredes Sala de Aula; AR=Ar Condicionado; BROV= Bromelial de Visitação; BAN= Banheiro 21
- Tabela 2:** Microrganismos e as respectivas colorações que indicam presença no meio 4.5 Agar Cromogênico Infecções Do Trato Urinário (UTIC)24
- Tabela 3:** Identificações preditivas dos táxons de bactéria associados a pele de *S. x-signatus* e suas respectivas áreas de coleta no Jardim Botânico do Recife. A.C. = Área Controle; A.A. = Área Antropizada 26
- Tabela 4:** Táxons identificados preditivamente, quantidade de indivíduos de *S. x-signatus* e a frequência de ocorrência (F.O.) em porcentagem nos 12 indivíduos e nas 24 amostras obtidas 27
- Tabela 5:** Frequências de ocorrência de bactérias encontradas na pele dos indivíduos de *S. x-signatus* da área controle (5) e da área antropizada (7) do JBR..... 28
- Tabela 6:** Frequência de bactérias encontradas nas amostras transiente e residente da pele de *S. x-signatus* coletadas na Área Antropizada. F.O. (%) = Frequência de Ocorrência em porcentagem28
- Tabela 7:** Frequência de bactérias encontradas nas amostras transiente e residente da pele de *S. x-signatus* coletadas na Área Controle. F.O. (%) = Frequência de Ocorrência em porcentagem29

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	OBJETIVOS.....	15
2.1	OBJETIVO GERAL	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3.1	MICROBIOTA CUTÂNEA E SISTEMA IMUNOLÓGICO DOS ANUROS: PREDISPONETES E MODULADORES AMBIENTAIS.....	15
3.2	OS ANFÍBIOS ANUROS: <i>Scinax x-signatus</i>	17
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1	AREA DE ESTUDO.	19
4.2	AMOSTRAGEM DOS ANUROS.....	20
4.3	COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO DOS ANUROS	21
4.4	CULTIVO DO MATERIAL BIOLÓGICO.	22
4.5	MÉTODOS PREDITIVOS DE IDENTIFICAÇÃO.....	24
	4.5.1 IDENTIFICAÇÃO CROMOGÊNICA.....	24
	4.5.2 IDENTIFICAÇÃO PREDITIVA PARA <i>Pseudomonas spp.</i>	24
	4.5.3 IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS E VERIFICAÇÃO DE <i>Escherichia coli</i>	25
5.	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	25
6.	RESULTADOS.....	26
6.1	MICROBIOTA CUTÂNEA DE <i>Scinax x-signatus</i>	26
6.2	FREQUÊNCIAS DE OCORRÊNCIA DOS TÁXONS PREDITIVAMENTE IDENTIFICADOS.....	26
6.3	ÁREA CONTROLE E ÁREA ANTROPIZADA	27
6.4	MICROBIOTA TRANSIENTE E RESIDENTE	28
7.	DISCUSSÃO.	31
8.	CONCLUSÃO.....	35
9.	REFERÊNCIAS.....	36

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os anfíbios anuros representam grande biodiversidade encontrada na região neotropical e são conhecidos como bioindicadores de qualidade ambiental, tendo em vista os declínios populacionais mediante a degradação das florestas tropicais (MYERS et al., 2000; SILVA et al., 2018; DA SILVA et al., 2019), introdução de espécies exóticas (BOELTER e CECHIN, 2007; LOUETTE et al., 2014; BATISTA et al., 2015), poluição das águas continentais, uma vez que muitas espécies se agregam próximas a regiões de corpos d'água em seus períodos reprodutivos, alterações climáticas, tendo em vista que sua época reprodutiva ocorre habitualmente em períodos chuvosos (DUELLMAN; TRUEB, 1986; D'AMEN et al., 2011), doenças infecciosas emergentes (DASZAK et al., 1999; KATZENBERGER et al., 2018) e radiação ultravioleta (UV), que pode interferir no desenvolvimento dos ovos e embriões, bem como ocasionar anomalias e comprometer o sistema imunológico do organismo (VERDADE et al., 2011).

Sabe-se que a primeira barreira mecânica contra patógenos nos anuros é a pele (CAREY et al., 1999), que possui extrema vascularização, umidade e permeabilidade, requisitos importantes para a eficiência das trocas gasosas cutâneas que respondem por grande parte da respiração dos anfíbios (MOURIÑO et al., 2006; WELLS, 2007; ASSIS, 2012; FAVARELLI et al., 2015). No entanto, a epiderme relativamente pequena acarreta em altas taxas de perda de água, ao passo que a alta permeabilidade e umidade requeridas pelas trocas gasosas cutâneas acabam por tornar os anuros sensíveis a moduladores ambientais, que interferem na dinâmica dos mecanismos de defesa (HADDAD et al., 2008) tornando-os vulneráveis à proliferação de uma microbiota cutânea, composta por microrganismos simbiotes e oportunistas patogênicos.

A própria fisiologia do anfíbio anuro é capaz de determinar a presença de uma microbiota cutânea. Muitas secreções liberadas na pele dos anuros, como mucos, possuem em sua composição glicoproteínas, criando assim um ambiente rico em termos nutricionais para o crescimento e desenvolvimento de

microrganismos (BRIZZI et al., 2002). Estes, por sua vez, criam uma associação simbiótica, tendo em vista a ação antifúngica contra muitos patógenos conhecidos, como exemplo de uma população de *Rana mucosa* estudada por Woodhamns et al. (2007), a qual apresentou ao menos uma bactéria produtora de metabólitos que atuam na inibição do fungo Bd (*Batrachochytrium dendrobatidis*), um dos principais patógenos causadores de declínios populacionais nos anfíbios anuros (BERGER et al., 1999; IUCN, 2017)

A microbiota cutânea, de uma maneira geral, pode ter sua composição e riqueza moduladas pela alteração de alguns parâmetros abióticos, como temperatura, disponibilidade de água, pH, oxigênio e radiação (MADINGAN et al., 2004., MADINGAN et al., 2009).

Outro fator intrínseco, como estudado por MCKENZIE et al. (2012), também pode ser levado em consideração, a particularidade das espécies, sendo este o mais forte preditor de comunidades, deste modo, a imunidade contra patógenos fornecida pela microbiota cutânea poderia ser entendida como “um fenótipo estendido” dos hospedeiros (ROLLINGS-SMITH; WOODHAMS, 2012; KUENEMEN et al., 2014). Todos esses fatores atuando em sinergismo com a intensificação das atividades antrópicas podem acarretar na mudança de distribuição espacial das espécies de anuros e de microrganismos presentes na pele e no ambiente, permitindo assim interações com uma nova microbiota (HADDAD et al., 2008; ASSIS, 2012; COSTA et al., 2012) como também numa maior susceptibilidade a agentes microbianos patogênicos.

Scinax x-signatus (Spix, 1824) é o anuro alvo deste estudo pertencente à família Hylidae, cuja maioria das espécies conseguem sucesso reprodutivo em ambientes com grande heterogeneidade espacial, sendo encontradas desde áreas de mata até ambientes mais antropizados (GONÇALVES et al., 2012; PALMEIRA; GONÇALVES, 2015), caracterizando-se, desta forma, como espécies sinantrópicas, uma vez que a heterogeneidade espacial oriunda das intensas atividades antrópicas acaba por elencar novos nichos para ocupação de espécies com maior plasticidade ambiental.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Descrever a microbiota bacteriana cutânea de *Scinax x-signatus*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Isolar e identificar, ao menor nível taxonômico possível, a microbiota bacteriana de *Scinax x-signatus*.

Descrever a composição e frequência de ocorrência referentes a microbiota bacteriana presente na pele de *Scinax x-signatus*;

Comparar, através análises estatísticas, a similaridade da microbiota transiente e residente encontrada nas amostras de uma área controle e em uma área antropizada.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 OS ANFÍBIOS ANUROS: *Scinax x-signatus*

Acredita-se que os ancestrais mais prováveis dos anfíbios teriam sido pertencentes ao grupo dos sarcopterygii (peixes de nadadeiras lobadas). A classe Amphibia é representada hoje por cerca de 8.099 espécies, das quais 213 pertencem à ordem Gymnophiona (Cecilia), 732 pertencem a ordem Urodela (Salamandras e Tritões) e 7.148 a ordem Anura (sapos, rãs e pererecas), sendo destas 1.093 conhecidas no Brasil (POUGH et al., 2008; AMPHIBIA WEB, 2018; SBH, 2019). A ordem anura compreende animais vertebrados tetrápodes que, em sua grande maioria, partilham da necessidade de um ciclo de vida bifásico para completar seu desenvolvimento, sendo a fase larval dulcícola com respiração branquial e a fase adulta terrestre pós metamórfica com respiração pulmonar e cutânea (DUELLMAN; TRUEB, 1986; HADDAD, 2008). Por mais que os anfíbios tenham sido os primeiros vertebrados a acessarem o ambiente terrestre, muitos anuros ainda apresentam uma grande dependência por ambientes aquáticos ou úmidos para reprodução e sobrevivência (DUELLMAN; TRUEB, 1986; COSTA et al., 2012). Um dos motivos relacionado a essa

dependência está atrelado ao caráter bioindicador dos anuros: a característica morfofuncional da pele desses organismos, que é extremamente vascularizada, de modo a comportar até 95% dos capilares respiratórios do corpo, uma porcentagem que facilita significativamente as trocas gasosas cutâneas, nas quais a captação de O₂ pode atingir de 0% a 100% e a excreção de CO₂ pode atingir 20% a 100% (CZOPEK, 1983; TATTERSALL, 2007).

Quanto ao habitat, sabe-se hoje que todas as 3 classes possuem representantes exclusivamente aquáticos, semiaquáticos e terrestres, desta forma, os ambientes se comportam como principais determinantes de distribuição dos anuros (RODRÍGUEZ; BELMONTES et al., 2005). A espécie em estudo é *Scinax x-signatus* (Spix, 1824) (**Figura 1**) popularmente conhecida como “rãzinha” ou “perereca de banheiro” e é um anuro da família Hylidae que possui ampla distribuição na América do Sul, ocorrendo na Colômbia, Venezuela, Guiana, Suriname e no território brasileiro, com exceção apenas do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (RODRIGUES; CAMARASCHI, 2004). Este táxon atualmente está classificado como Pouco Preocupante (LC) pela IUCN (RODRIGUES et al., 2010). Quanto ao hábitat, esta espécie pode ser caracterizada como generalista, sendo bastante encontrada em florestas e bordas de mata, bordas de lago, bromélias, áreas abertas e ambientes antropizados, uma vez que a heterogeneidade espacial acaba por gerar modificações de habitats às quais esta espécie tem a capacidade de se adequar e adquirir sucesso reprodutivo devido a sua maior plasticidade ambiental (CARDOSO et al., 1989; RODRIGUES; CAMARASCHI, 2004; GONÇALVES et al., 2012; PALMEIRA; GONÇALVES, 2015). Apesar do caráter bioindicador de qualidade ambiental e do comportamento sinantrópico comumente descrito para *Scinax x-signatus*, não existem estudos relacionados a identificação da microbiota bacteriana associada a pele desta espécie. Desta forma, este trabalho tem grande relevância na caracterização da microbiota cutânea deste táxon e identificação de possíveis bactérias de interesse médico interagindo com *S. x-signatus*, uma vez que estudos mostram a ocorrência constante desta espécie próximas a edificações e em banheiros de residências, logo, em contato frequente com humanos (BORGES-NOJOSA; SANTOS, 2005; PEREIRA et al., 2016).



Figura 1 *Scinax x-signatus* (Spix, 1824) em Bromélia no Jardim Botânico do Recife. Foto: Ubiratã Souza, 2019.

3.1 MICROBIOTA CUTÂNEA E SISTEMA IMUNOLÓGICO DOS ANUROS: PREDISPOANTES E MODULADORES AMBIENTAIS

Os anuros possuem um sistema imunológico integrado, onde são observados dois mecanismos de defesa: bioquímicos e biológicos (CAREY et al., 1999; ASSIS, 2012). Os bioquímicos se evidenciam pelo potencial antimicrobiano de peptídeos liberados pelas glândulas granulares na pele, que são capazes de determinar o perfil da microbiota presente na pele dos anuros, já que existem famílias de peptídeos restritas a determinadas espécies (DUDA et al., 2002; CONLON, 2007). As glândulas mucosas, por sua vez, secretam um muco que confere umidade e nutrientes à pele, tornando-a um substrato propício ao estabelecimento de uma microbiota simbiote, composta principalmente por bactérias e fungos, e é nesta simbiose que se apresenta o mecanismo biológico de defesa, pois enquanto a pele dos anuros fornecem os nutrientes e condições favoráveis ao metabolismo da microbiota, esta proporciona proteção à pele do anuro contra possíveis microrganismos patogênicos como o fungo *Bd*, através do potencial antimicrobiano das substâncias sintetizadas pelo metabolismo e pela competição com patógenos por espaço e nutrientes (HARRIS et al., 2006; LAUER et al., 2007; WOODHAMNS et al., 2007; LAUER et al., 2008; Assis, 2012).

Desta forma, presença de uma microbiota simbiote em animais extremamente sensíveis como os anfíbios anuros é crucial para o desenvolvimento de um sistema imunológico capaz de combater os principais agentes infecciosos oportunistas presentes no ambiente (MACPHERSON;

HARRIS, 2004). Muitos microrganismos datam de longos processos de coevolução com os vertebrados que vai além de requerimentos básicos a sobrevivência de ambos, os animais isentos de microbiota ou “*germ-free*” exemplificam a necessidade desta relação, pois a ausência da microbiota nesses animais acarreta do comprometimento de funções relacionadas ao sistema imunológico, como a quantidade anormal de células imunes e estruturas linfóides comprometidas (SEKIROV et al., 2010; VIEIRA et al., 2011).

Os mecanismos fisiológicos essenciais ao hospedeiro acabam formando um microambiente cutâneo disponível à colonização de uma microbiota que se comporta de forma residente, ou seja, aquela composta por microrganismos sempre presentes na pele do hospedeiro por já estarem adaptadas às condições físico-químicas do substrato, e uma microbiota transiente, aquela cuja ocorrência no hospedeiro varia de acordo com condições específicas e o tempo que elas durarão (BLACK, 1999). Não obstante, podem ser encontradas algumas espécies de microrganismos patogênicos oportunistas na pele dos anuros que compõem a microbiota cutânea sem causar danos ao hospedeiro, mas se favorecem de uma imunossupressão do mesmo para atingir o seu potencial metabólico causando declínios populacionais (CLARKE, 1997; CAREY et al., 1999, KATZENBERGER et al., 2018), como exemplos das espécies de bactérias *Aeromonas hydrophila* e *Pseudomonas aeruginosa*, conhecidas por causar a doença-da-pata-vermelha, levando a mortalidade de girinos, edemas subcutâneos e septicemia em ranídeos (MAUEL et al., 2002; MOURIÑO et al., 2006). Quanto aos fungos, o *Batrachochytrium dendrobatidis* é o mais conhecido parasita intracelular que possui acesso, na maioria das vezes, pela pele, preferindo as regiões queratinizadas do hospedeiro, adentrando nas células e causando alterações fisiológicas nas células do tecido epitelial que comprometem as taxas de trocas gasosas cutâneas em anuros adultos, provocam letargia, imunossupressões e morte de girinos (BERGER et al., 1999; BLAUSTEIN et al., 2005).

Um fator a ser considerado é que a heterogeneidade espacial produto da fragmentação de habitats na Mata Atlântica não só é um preditor de declínios populacionais dos anfíbios, mas também atua como forte modulador das comunidades microbianas com as quais os anuros interagem. As duas espécies de bactérias citadas acima como causadoras de patologias em anuros são comumente encontradas no ambiente, mais especificamente no solo e corpos d'água. Em 2004, Henle et al. elencaram 12 características teoricamente preditoras da sensibilidade das espécies mediante a uma alteração de habitat, dentre elas, destaca-se para este estudo a “especialização ecológica”. Uma vez exposto a impactos antropogênicos, os ambientes passam por alterações físico-químicas alterações de pH, temperatura, umidade, radiação solar e disponibilidade de nutrientes nos solos, o que acaba tornando os microrganismos bastante vulneráveis a tais variáveis, onde o grau de impacto nas espécies varia de acordo com as condições requeridas por eles (MADIGAN et al., 2004; ZILLI et al., 2003; CORREIA; OLIVEIRA, 2005; ASSIS, 2012)

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ÁREA DE ESTUDO

O Jardim Botânico do Recife (08°04' S; 34°59' W) foi criado em 1979 pelo Decreto Municipal de 11.341 de 1º de agosto e está inserido no grupo de Unidades de Conservação às margens da BR-232 no bairro do Curado, Recife, Pernambuco, conforme a **Figura 2**. Inicialmente, a área contava com apenas 5,5 hectares, atualmente ocupa uma área de 11,23 hectares, tendo 60% de sua cobertura composta por um fragmento de Mata Atlântica caracterizada como Ombrófila Densa (DE OLIVEIRA et al, 2016; VIANNA et al, 2017). A região em que o JBR está inserido possui uma precipitação anual de 1800 mm (INMET, 2018). O JBR é um local que recebe a visita de várias pessoas de Pernambuco e de outros estados quase todos os dias, e possui instalações como salas de aula, banheiros, lanchonetes e áreas de visitação, se mostrando como um local apropriado para o estudo em questão no tocante a estudar as áreas mais antropizadas e as menos antropizadas da unidade.

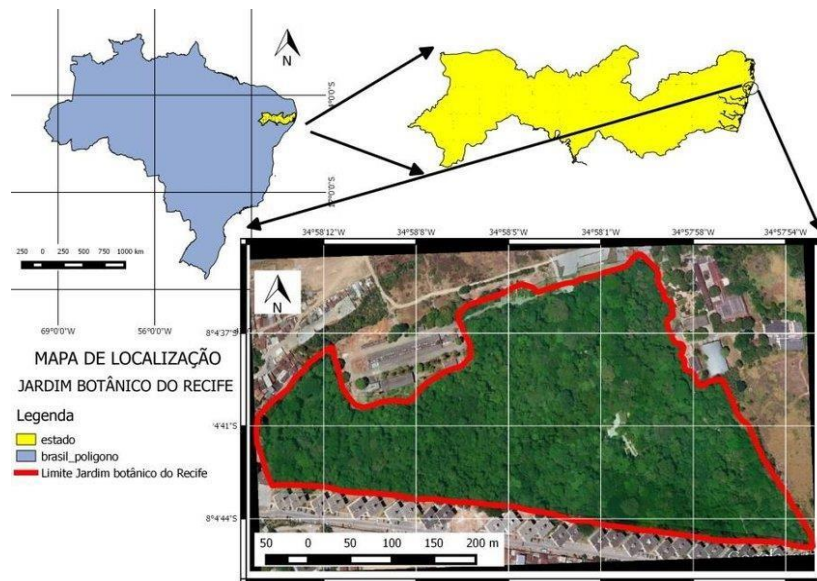


Figura 2 Mapa de localização do Jardim Botânico do Recife. Fonte: Do Nascimento et al., 2017

4.2 AMOSTRAGEM DOS ANUROS

Foram coletadas amostras biológicas de 12 indivíduos de *Scinax x-signatus* capturados através do método de busca ativa limitada por tempo, tendo início às 16:30 e encerrando às 20:00 em sítios de vocalização e/ou locais próximos à vegetação, buracos, troncos caídos e paredes. As idas a campo ocorreram nos meses de Novembro e Dezembro de 2019 e as coletas foram separadas por: a) Amostragem dos indivíduos da Área Controle (A.C.), percorrendo a pé uma área de mata com o auxílio de lanternas, e termo higrômetro para a obtenção de temperatura e umidade relativa do ar, onde obtivemos 5 indivíduos, sendo 1 encontrado em, 2 no folhicho, 1 no lago e 1 no orquidário ; b) Coleta dos indivíduos da Área Antropizada (A.A.) nos JBR, como banheiros, paredes da sala de aula, bromelial de visitação e casa de ferragens, onde são vistas uma maior frequência de visitantes e funcionários, sendo encontrados 7 indivíduos, , dois encontrados em banheiros, 3 em paredes de sala de aula, 1 no ar condicionados e 1 nos bromeliais de visitação , conforme

a **Tabela 1**. Assim que localizados, os animais foram identificados e capturados para a coleta do material biológico.

Tabela 1 Animais e seus respectivos locais de captura separados por: Área Controle e Área Antropizada. ORQ= Orquidário; LA= Lago; BRO=Bromélia; FOL= Folhiço; PSA=Paredes Sala de Aula; AR=Ar Condicionado; BROV= Bromelial de Visitação; BAN= Banheiro.

Espécie	Área Controle				Área Antropizada			
	ORQ.	LA	BRO	FOL	PSA	AR	BROV	BAN
<i>Scinax x-signatus</i> (Spix, 1824)								
<i>S. x-signatus</i> 1	X							
<i>S. x-signatus</i> 2		X						
<i>S. x-signatus</i> 3			X					
<i>S. x-signatus</i> 4				X				
<i>S. x-signatus</i> 5				X				
<i>S. x-signatus</i> 6					X			
<i>S. x-signatus</i> 7					X			
<i>S. x-signatus</i> 8					X			
<i>S. x-signatus</i> 9						X		
<i>S. x-signatus</i> 10							X	
<i>S. x-signatus</i> 11								X
<i>S. x-signatus</i> 12								X
Total por área		5				7		

4.3 COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO DOS ANUROS

A coleta da microbiota cutânea foi dividida em duas etapas para cada animal capturado:

Na primeira etapa, com o auxílio de um recipiente estéril vazio e 50 mL de água destilada estéril autoclavada, foram realizados banhos em cada animal a fim de remover da pele algum material associado ao ambiente, como sedimentos e/ou a microbiota transiente (alóctone), conforme LAUER et al (2007). Após as lavagens, swabs estéreis foram mergulhados no recipiente contendo o material oriundo da lavagem da pele dos anuros (**Figura 3A**) em movimentos circulares por cerca de 1 minuto, para garantir adesão do material biológico no swab.

Na segunda etapa, foram feitas as coletas da microbiota residente (autóctone), a qual se teve acesso após a lavagem da pele dos animais para remoção da microbiota transiente (**Figura 3B**). Neste caso, os swabs foram passados delicada e precisamente por todo corpo do animal: dorso, ventre, cabeça, membros e região externa da cloaca, por cerca de 1 minuto. Após as duas etapas terem sido realizadas em todos os animais, os swabs foram

armazenados em tubos Falcon estéreis devidamente identificados de acordo com o indivíduo capturado e o tipo de material que fora coletado por cada swab

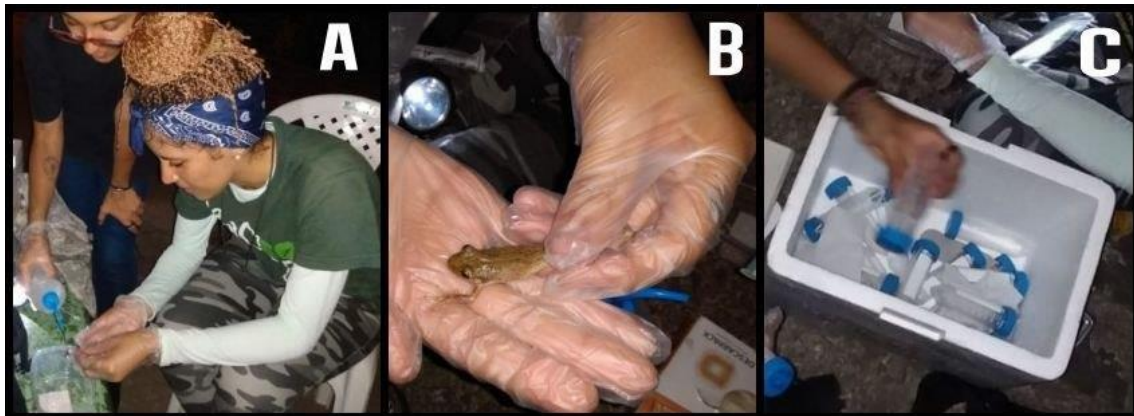


Figura 3 A – Banhos de água destilada estéril para remoção de microbiota transiente do indivíduo de *Scinax x-signatus*; B – Indivíduo banhado, preparado para a coleta da microbiota residente; C – Amostras armazenadas em isopor para transporte a geladeira. Fonte: Souza, 2019

(microbiota transiente/residente e data de coleta), para que pudessem ser transportados em caixa térmica e armazenados (**Figura 3C**) em geladeira, ficando lá no máximo 6 horas até o semeio em meio de cultura. A vantagem deste método está no fato de não ser invasivo, sem a necessidade de transportes dos espécimes de *S. x-signatus* do campo ao laboratório. Após o processo, os anuros tiveram as medidas de CRC aferidas e foram liberados no local de amostragem.

4.4 CULTIVO DO MATERIAL BIOLÓGICO

Todas as análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Genética Bioquímica e Sequenciamento de DNA (GENOMA/UFRPE). Em laboratório, cada tubo Falcon contendo swab com as amostras de microbiota receberam 10 mL de caldo LB nutritivo e foram armazenados em uma incubadora Shaker por cerca de 16 horas para a proliferação das amostras contidas nos swabs. Após esse tempo, os tubos foram retirados das incubadoras para que as amostras fossem semeadas no meio de cultura (**Figura 4 A**) a fim de verificar o crescimento bacteriano.

Neste estudo, o meio de cultura utilizado para semear as amostras a fim de verificar crescimento foi o Agar Mueller-Hinton – Difco, que possui proteínas

e carboidratos que favorecem o crescimento de cepas bacterianas. O Ágar Muller-Hinton foi homogeneizado em 900ml de água destilada em um recipiente adequado e fora autoclavado a 120°C por 20 minutos. Após esterilizado, o meio foi distribuído em placas de Petri estéreis em uma capela de manipulação e foram mantidas sob luz UV até que o meio solidificasse (**Figura 4B**). Depois de solidificados, os meios foram semeados com as amostras da microbiota contida no caldo LB dos tubos de Falcon através de alças plásticas de 1ul usando a técnica de semeio por esgotamento (**Figura 4C**). Todo o manuseio foi realizado em uma bancada desinfectada próximo a chama do Bico de Bunsen a fim de evitar possíveis contaminações do meio. Após o semeio, todas as placas receberam as devidas identificações e foram incubadas em estufa por 24 horas. Depois do período de incubação, as placas foram envolvidas em filme PVC e foram armazenadas em geladeira para posterior identificação preditiva nos meios seletivos.

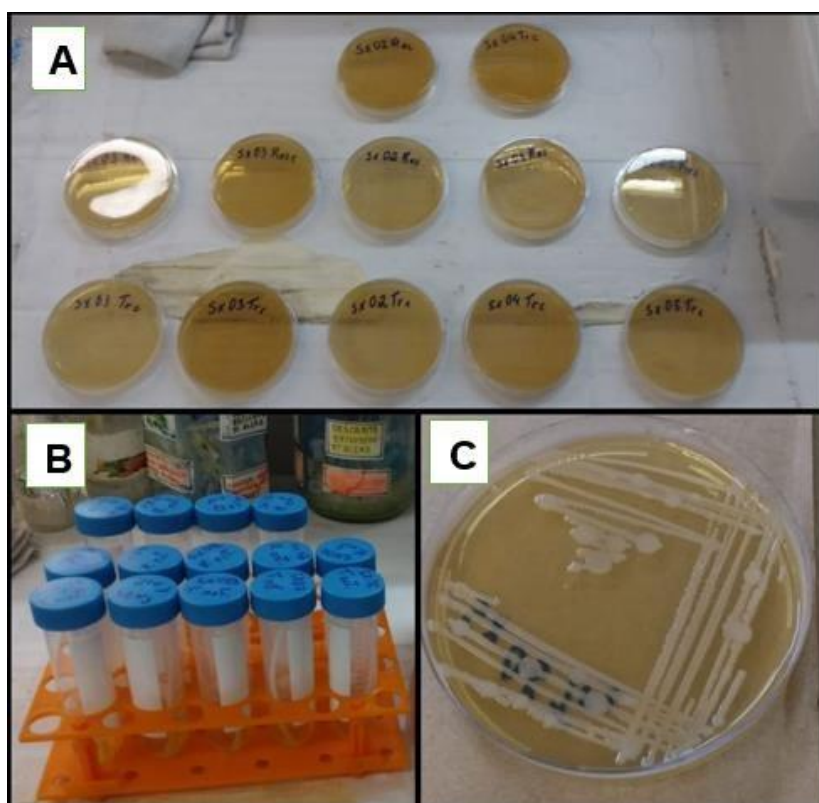


Figura 4 A – Meio de cultura já solidificado e semeado em placas de Petri identificadas; B – Amostras dos swabs armazenadas em LB caldo dispostas para semeio C – Semeio por esgotamento. Fotos: Santos, 2019.

4.5 MÉTODOS PREDITIVOS DE IDENTIFICAÇÃO

4.5.1 IDENTIFICAÇÃO CROMOGÊNICA

Esta forma de identificação foi realizada através de um meio de cultura Agar cromogênico Infecções do Trato Urinário (UTIC), que permite a identificação preditiva de principais organismos patogênicos conhecidos através da coloração, pois possui em sua composição substratos cromogênicos que são clivados por enzimas produzidas por algumas bactérias. As interações substrato-enzima produzem colorações na colônia que acusam os microrganismos de forma mais célere, conforme a tabela abaixo:

Tabela 2: Microrganismos e as respectivas colorações que indicam presença no meio Agar Cromogênico Infecções Do Trato Urinário (UTIC).

Microrganismos	Coloração da Colônia
<i>Escherichia coli</i>	Rosa
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Azul escuro
<i>Proteus mirabilis</i>	Marrom
<i>Staphylococcus aureus</i>	Branco/Creme
<i>Enterococcus faecalis</i>	Azul claro
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Âmbar
<i>Salmonella typhi</i>	Âmbar
<i>Salmonella typhimurium</i>	Âmbar

4.5.2 IDENTIFICAÇÃO PREDITIVA PARA *Pseudomonas spp*

Este meio é utilizado no isolamento e identificação preditiva de bactérias do gênero *Pseudomonas spp.* através da produção de pigmentos solúveis em água que interagem dando uma cor que varia de verde amarelado a um marrom amarelado (GILLIGAN, 1995). A cetrimida é adicionada ao meio A criado por King, Ward e Raney pois atua como um detergente amônio que provoca a liberação de nitrogênio e fósforo das células bacterianas de *Pseudomonas spp.* Outros ingredientes que compõem o meio, como Cloreto de Magnésio e Sulfato de Potássio aumentam a produção dos pigmentos solúveis das células (KING; WARD; RANEY, 1954) contribuindo com a seletividade deste meio.

4.5.3 IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS E VERIFICAÇÃO DE *Escherichia coli*

O Eosina azul de metileno foi utilizado como meio seletivo e diferencial, sendo seletivo ao crescimento de bactérias Gram-negativas, utilizado na identificação de coliformes totais e coliformes fecais e é diferencial na identificação de *Escherichia coli*. Dentre os principais componentes deste meio, temos a lactose, que ajuda na diferenciação de microrganismos fermentadores e não-fermentadores e Azul de Metileno, um indicador de pH. O potencial diferencial permite a visualização da colônia de *Escherichia coli*, que apresenta uma coloração verde com brilho metálico, esta característica se dá pela rapidez na fermentação da lactose e produção de ácidos por *E. coli* que reduzem o pH do meio de maneira muito rápida, enquanto *Pseudomonas aeruginosa* não apresenta coloração. Outros bastonetes não patogênicos fermentadores e representantes do gênero *Salmonella spp.* e *Shigella spp.* também crescem neste meio.

Outro meio mais antigo também foi destinado ao cultivo de bactérias Gram-negativas através da indicação de fermentação da lactose caracterizada pela cor rosa, o Agar McConkey. O meio apresenta sais biliares e cristais violeta em sua composição, inibindo assim os microrganismos gram-positivos.

Todas as amostras utilizadas neste trabalho foram estocadas em LB caldo e glicerol e armazenadas em um Freezer a -80°C para posterior reativação das células e análise molecular.

5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O teste de Fisher foi utilizado para verificar a associação entre as variáveis Área De coleta e Ocorrência dos táxons. Também foram realizadas análises de Cluster através da distância euclidiana, sendo o algoritmo os grupos pareados. Todas análises foram realizadas no programa PAST. Para as frequências das espécies, foi utilizado o Índice de Frequência de Ocorrência ($FOi = \frac{fi}{n} \times 100$) (Hynes, 1950 por Barros, 2016), onde foram verificados o número de indivíduos contendo um táxon específico (f_i) em relação ao número total de indivíduos analisados (N). O mesmo índice foi aplicado para verificar as frequências das espécies em relação as amostras.

6 RESULTADOS

6.1 MICROBIOTA CUTÂNEA DE *Scinax x-signatus*

De um total de 24 isolados de microbiota bacteriana associada a pele dos 12 indivíduos de *S. x-signatus* amostrados, houve crescimento bacteriano em todos (100%). As identificações presuntivas indicaram a presença de 5 táxons na pele dos anuros, sendo 4 destes identificados a nível de espécie e 1 a nível de gênero, estando distribuídos nas 4 seguintes famílias: Pseudomonadaceae (*Pseudomonas spp.*), Enterobacteriaceae (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*), Enterococcaceae (*Enterococcus faecalis*) e Staphylococcaceae (*Staphylococcus aureus*), conforme a **Tabela 3**.

Tabela 3 Identificações preditivas dos táxons de bactéria associados a pele de *S. x-signatus* e suas respectivas áreas de coleta no Jardim Botânico do Recife. A.C. = Área Controle; A.A. = Área Antropizada.

Família	Espécies	Área de Coleta
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas spp.</i>	A.C.; A. A.
Enterobacteriaceae	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	A.C.; A. A.
Enterobacteriaceae	<i>Escherichia coli</i>	A.C.; A. A.
Enterococcaceae	<i>Enterococcus faecalis</i>	A.C.; A. A.
Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus aureus</i>	A.A.

6.2 FREQUÊNCIAS DE OCORRÊNCIA DOS TÁXONS PREDITIVAMENTE IDENTIFICADOS

Para os 12 indivíduos de *S. x-signatus* amostrados, as frequências de ocorrência (F.O.%) obtidas para os táxons identificados foi: *Pseudomonas spp.* (33%), *Escherichia coli* (21%), *Klebsiella pneumoniae* (21%), *Enterococcus faecalis* (18%) e *Staphylococcus aureus* (6%). Deste modo, o gênero *Pseudomonas spp.* apresentou a maior frequência de ocorrência na pele de *S. x-signatus*, enquanto *Staphylococcus aureus* apresentou a menor frequência de ocorrência (**Tabela 4**).

Para as 24 isolados contendo microbiota transiente e residente de isolados bacterianos oriundas dos 12 indivíduos de *S. x-signatus*, foram obtidas as seguintes frequências de ocorrência: *Pseudomonas spp.* (43%), *Escherichia coli* (22%), *Klebsiella pneumoniae* (18%), *Enterococcus faecalis* (12%) e *Staphylococcus aureus* (4%). Em relação a estas 24 amostras isoladas, *Pseudomonas spp.* e *Staphylococcus aureus* se mantiveram com a maior e menor frequência dentre as demais espécies, respectivamente.

Tabela 4: Táxons identificados preditivamente, quantidade de indivíduos de *S. x-signatus* e a frequência de ocorrência (F.O.) em porcentagem nos 12 indivíduos e nas 24 amostras obtidas.

Táxons isolados	Indivíduos (n=12)	F.O. Indivíduos	F.O. Amostras Isoladas (n=24)
<i>Pseudomonas spp.</i>	11	33.30%	43%
<i>Escherichia coli</i>	7	21.20%	22%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7	21.20%	18%
<i>Enterococcus faecalis</i>	6	18.20%	12%
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	6.10%	4%
TOTAL	33	100%	100%

6.3 ÁREA CONTROLE E ÁREA ANTROPIZADA

Na área controle, que obteve 5 indivíduos amostrados, foram observados 4 táxons dos 5 identificados preditivamente, são eles: *Pseudomonas spp.* (33,33%) com a maior frequência na área, *Escherichia coli* (33,33%), *Klebsiella pneumoniae* (16,67%) e *Enterococcus faecalis* (16,67%). Não houve registro de *Staphylococcus aureus* nas amostras referentes a esta área dentro dos limites das identificações preditivas.

Nas amostras dos indivíduos da área antropizada ocorreram todos os táxons de bactérias identificados, com as seguintes frequências: *Pseudomonas spp.* (31,82%), *Klebsiella pneumoniae* (22,73%), *Escherichia coli* (18,18%), *Enterococcus faecalis* (18,18%) e *Staphylococcus aureus* (9,09%). O Teste de Fisher não revelou correlação significativas entre a presença ou ausência de cada uma das espécies associadas a pele dos anuros e as áreas controle e antropizada, conforme a **Tabela 6**.

Tabela 5: Frequências de ocorrência de bactérias encontradas na pele dos indivíduos de *S. x-signatus* da área controle (5) e da área antropizada (7) do JBR.

Bactérias	Área Controle (n=5)	F (%)	Área Antropizada (n=7)	F (%)	Valor “P”
<i>Pseudomonas spp.</i>	4	33,33	7	31,82	1
<i>Escherichia coli</i>	4	33,33	4	18,18	0,2929
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	16,67	5	22,73	0,5581
<i>Enterococcus faecalis</i>	2	16,67	4	18,18	0,2929
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	2	9,09	0,4697
TOTAL	12	100	22	100	

Pseudomonas spp. e *Escherichia coli* apresentaram a mesma frequência na área controle (33.33%), enquanto que na área antropizada mostram 31.82% e 18.18%, respectivamente. As espécies de bactérias *Klebsiella pneumoniae* (22.73%) e *Enterococcus faecalis* (18.18%) apresentaram maior frequência em relação a área controle, onde ambas tiveram 16.67%. *E. coli* apresentou maior frequência na Área Controle (33.33%) e *Staphylococcus aureus*, que não ocorreu na área controle, apresentou a menor frequência da área antropizada (9.09%)

6.4 MICROBIOTA TRANSIENTE E RESIDENTE

As 24 amostras foram separadas em isolados transientes e residentes a fim de comparar a composição da microbiota bacteriana de ambos nas duas áreas de coleta, conforme as **Tabelas 6 e 7**.

Tabela 6: Frequência de bactérias encontradas nas amostras da microbiota transiente e residente da pele de *S. x-signatus* coletadas na Área Antropizada. F.O. (%) = Frequência de Ocorrência em porcentagem.

Bactérias	Área Antropizada			
	Transiente (8)	F.O. (%)	Residente (9)	F.O. (%)
<i>Pseudomonas spp.</i>	7	36.84	8	42.11
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7	36.84	2	10.50
<i>Escherichia coli</i>	2	10.53	5	26.32
<i>Enterococcus faecalis</i>	3	15.79	2	10.50

<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0.00	2	10.50
TOTAL	19	100	19	100

Tabela 7: Frequência de bactérias encontradas nas amostras transiente e residente da pele de *S. x-signatus* coletadas na Área Controle. F.O. (%) = Frequência de Ocorrência em porcentagem.

Área controle				
Bactérias	Transiente (3)	F.O. (%)	Residente (4)	F.O. (%)
<i>Pseudomonas spp.</i>	3	50.00	3	37.50
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	33.33	0	0.00
<i>Escherichia coli</i>	1	16.67	3	37.50
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0.00	2	25.00
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0.00	0	0.00
TOTAL	6	100	8	100

Área Controle: *Pseudomonas spp.* apresentou a maior frequência das amostras transientes (50.00%), enquanto nas residentes apresentou 37.50%. *Klebsiella pneumoniae* ocorreu apenas nas amostras transientes da área controle com 33.33%. *E. coli* e *Pseudomonas spp.* obtiveram as mesmas frequências nas amostras residentes (37.50%), mas nas amostras transientes *E. coli* apresentou frequência menor (16.67%). *Enterococcus faecalis* esteve presente apenas nas amostras residentes (25.00%), enquanto *Staphylococcus aureus* não esteve presente em nenhum dos dois grupos amostrais da área controle.

Área Antropizada: *Pseudomonas spp.* obteve a mesma frequência que *Klebsiella pneumoniae* nas amostras transientes (36.64%) e a maior frequência nas amostras residentes (42.21%). *Klebsiella pneumoniae* demonstrou maior frequência de ocorrência nas amostras transientes (36.64%) em relação à das amostras residentes (10.50%), enquanto *Escherichia coli* obteve maior frequência nas amostras residentes (26.32%) que nas amostras residentes (10.53%). *Enterococcus faecalis* obteve maior frequência nas amostras transientes (15.79%) que nas residentes (10.50%), enquanto *Staphylococcus aureus* ocorreu apenas nas amostras residentes, com 10.50% de ocorrência.

A análise de Cluster utilizada na comparação entre a microbiota transiente e residente associadas a pele de *S. x-signatus* revelaram a segregação de dois grupos: o grupo da Área Controle e o grupo da Área Antropizada, conforme a

Figura 5. O cluster da área controle mostrou maior similaridade das amostras transientes e residentes entre si do que a Área Antropizada.

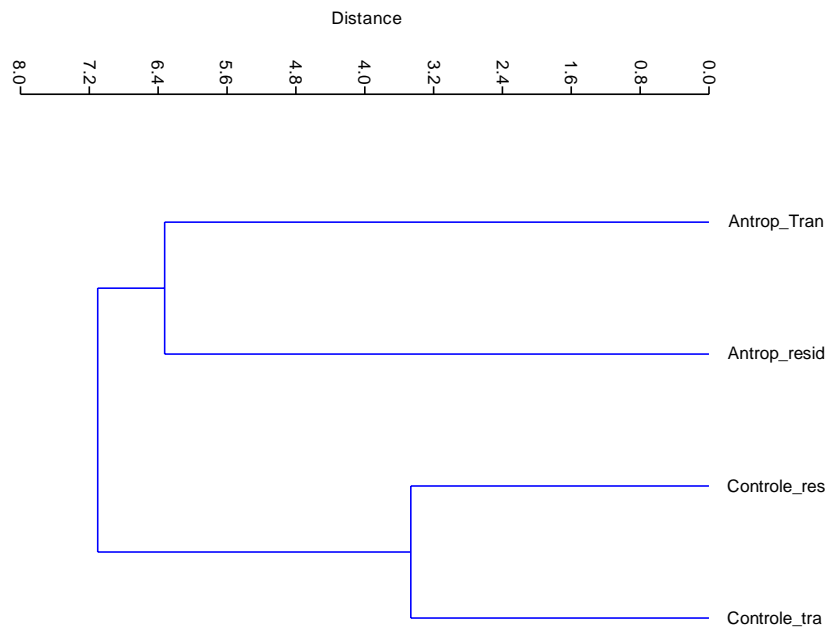


Figura 5: Dendrograma comparando a diversidade bacteriana entre a microbiota residente e transiente na Área Controle e Área Antropizada, baseando-se nas categorias referentes a: Amostra transiente da Área Antropizada (Antrop_Tran), Amostra residente da Área Antropizada (Antrop_resid); Amostra residente da Área Controle (Controle_Res) e Amostra Transiente da Área Controle (Controle_Tran). Coph Cor.: 0,9091

A análise de Cluster demonstrou uma maior similaridade entre as amostras transientes dos indivíduos coletados no Ar condicionado e no Bromelial de Visitação (**Figura 6**). A segunda maior similaridade foi revelada entre as amostras transientes e residentes encontradas nos indivíduos amostrados na parede da sala de aula, enquanto que as amostras residentes dos indivíduos coletados em banheiro não demonstraram similaridade com nenhum dos outros dois grupos formados.

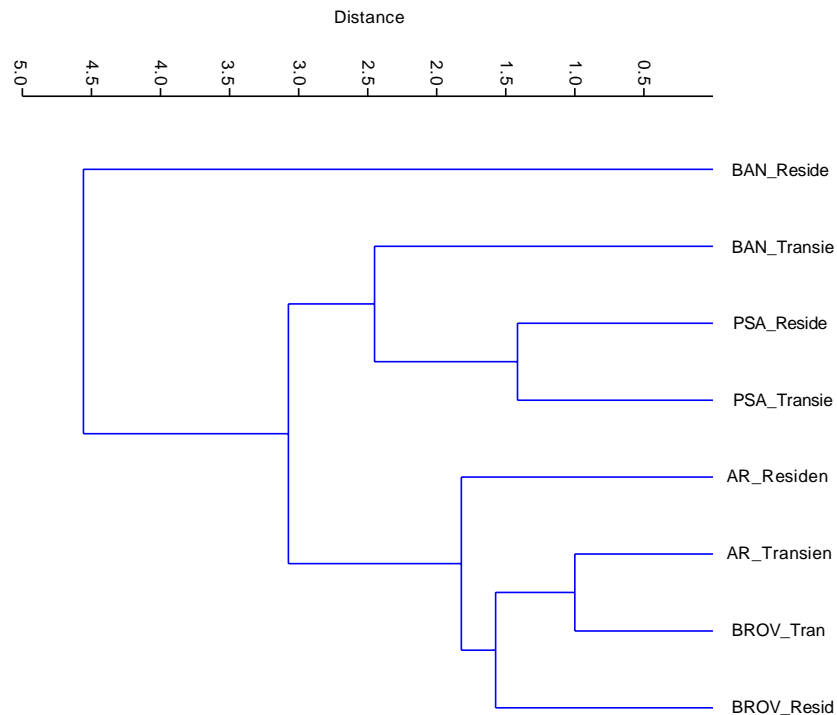


Figura 6: Dendrograma comparando a diversidade bacteriana entre a microbiota residente e transiente nos locais específicos da Área Antropizada, baseando-se nas categorias referentes a: Amostras transientes e residentes de banheiro (BAN_Transie e BAN_Reside), Paredes de Sala de Aula (PSA_Reside e PSA_Transie) Ar condicionados (AR_Residen e AR_Transie) e Bromelial de Visitação (BROV_Tran e BROV_Resi). Coph Cor.: 0,8878

7. DISCUSSÃO

Sinantropia diz respeito a convivência de determinadas espécies de animais com o homem, podendo cada espécie ter um grau diferente de acordo com as condições por ela requeridas (FERNANDES, 2019). *Scinax x-signatus* demonstra neste trabalho o comportamento generalista quanto ao hábitat, ocorrendo nas duas áreas de coleta, bem como o comportamento sinantrópico devido a sua grande plasticidade ambiental, corroborando com os estudos de GONÇALVES et al. (2012), PALMEIRA; GONÇALVES (2015) e PEREIRA et al, (2016)

Neste trabalho, obtivemos as identificações preditivas de isolados bacterianos associados a pele de *Scinax x-signatus* no JBR através do cultivo das amostras em meios seletivos, que trouxeram maior celeridade aos resultados. Os 5 táxons identificados: *Pseudomonas spp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*

possuem interesse à saúde animal e pública, uma vez que podem se comportar como patógenos oportunistas causadores de diversas patologias que acometem animais e o homem. No que diz respeito a microbiota cutânea associada a pele de anuro *Scinax x-signatus*, foi verificada uma considerada escassez na literatura apesar do caráter generalista e sinantrópico deste anuro. Ao nosso conhecimento, este é o primeiro estudo relacionado a caracterização da microbiota cutânea desta espécie.

Neste estudo, *Pseudomonas spp.* apresentou a maior frequência de ocorrência (43%) dentre as 24 amostras, estando presente nas duas áreas de amostragem. Resultados similares foram vistos também por BIE et al (2019) ao comparar a microbiota cutânea de *Rana dybowskii* em uma área selvagem e em uma área de fazenda, onde a frequência de *Pseudomonas spp.* se mostrou dominante nestas duas áreas, o que sinaliza um caráter ubíquo do gênero. HARRIS et al (2006) observou a presença de *Pseudomonas spp.* na pele da salamandra *Hemidactylium scutatum* e mostrou sua eficácia contra o fungo patógeno *Bd in vitro*. O gênero *Pseudomonas spp.* é um gênero composto por bactérias Gram-negativas bacilares ubíquas, ou seja, estão presentes em todos os lugares, desde os ecossistemas aquáticos aos terrestres, no ar e na pele (MORADALI et al. 2017). Alguns representantes deste gênero possuem potencial patogênico oportunista, ocasionando infecções no trato respiratório de organismos imunossuprimidos, bem como estão associados de maneira pouco frequente a casos de meningite aguda (MORADALI et al. 2017; MEYNET et al, 2018). Além disso, algumas espécies de *Pseudomonas spp.* possuem resistência a grande maioria dos antibióticos, desenvolvendo também uma multirresistência em casos de tratamentos com quimioterapia, deixando poucas opções de antibióticos voltados ao uso clínico (ANDRADE et al, 2003).

Escherichia coli obteve a segunda maior frequência entre as 24 amostras, ocorrendo também nas duas áreas de coleta, tendo maior frequência nas amostras residentes. Este trabalho corrobora com dados encontrados por PASTERIS et al (2006, 2008, 2009a), que também encontraram

isolados de *E. coli* nas amostras residentes do ranídeo *Lithobates catesbeianus*. *E. coli* é uma bactéria Gram-negativa que comumente compõe a microbiota intestinal de humanos saudáveis sem oferecer riscos à saúde. Porém em um evento de imunossupressão, até mesmo as cepas comuns de *E. coli* podem aproveitar a violação das barreiras gastrointestinais e causar infecções. Ainda segundo TURNER et al (2006), existem no mínimo 6 categorias de *E. coli* associadas com tipos de diarreia, podendo ser transmitidas no contato com alimentos ou água contaminados (NATARO; KAPER, 1998).

Klebsiella pneumoniae também ocorreu nas amostras de *S. x-signatus* com a terceira maior frequência dentre as 24 amostras, estando presente apenas nas amostras transiente da área controle e predominando nestas na área Antropizada. *Klebsiella pneumoniae* é uma bactéria Gram-negativa entérica que é bastante conhecida por quadros de septicemia em ambientes hospitalares e pela resistência aos antibióticos comumente usados, bem como se comporta como patógeno oportunista, causando pneumonias e podendo provocar lesões necrosantes e hemorrágicas nos pulmões de indivíduos imunodeprimidos (ESCOBAR et al, 1996; SANTOS, 2007). Em anuros, SCHADICH e COLE (2010) isolaram *K. pneumoniae* de indivíduos de *Litoria ewingii*, anuro da família Hylidae, que apresentavam septicemia e induziu a septicemia a partir destes isolados em indivíduos saudáveis que posteriormente também apresentaram septicemia, comprovando a patogenicidade desta bactéria. A predominância desta espécie nas amostras transientes podem ser resultado da presença dos indivíduos de *S. x-signatus* nas instalações com maior grau de antropização, como banheiros, porém, nenhum dos indivíduos coletados apresentava algum tipo de ferimento ou quaisquer anomalias cutâneas que pudessem ser provocadas pela *K. Pneumoniae*.

Enterococcus faecalis apresentou a segunda menor frequência dentre as 24 amostras, ocorrendo apenas nas amostras residentes da Área Controle e em maior frequência nas amostras transientes da Área Antropizada. BIE et al (2019) Também encontrou *E. faecalis* na pele do ranídeo *R. dybowskii* em uma área com maior heterogeneidade espacial.

Enterococcus faecalis é uma espécie de bactéria Gram-positiva amplamente encontrada nos ambientes e em outros animais, o que pode explicar a ocorrência nas amostras residentes da Área Controle, mas também é uma das espécies do gênero *Enterococcus* que apresenta maior dominância no trato gastrointestinal dos humanos (KUHN, 2003). Esta espécie também

apresenta um caráter oportunista patogênico diante de uma imunossupressão ou quando entram em contato com regiões do corpo distintas das quais comumente ocorrem, causando infecções no trato urinário, em feridas, na próstata e podem estar associadas em até 20% dos casos de endocardites (NALLAPAREDDY et al, 2006; FISHER; PHILIPS, 2009, BUSH; PEREZ, 2017). *E. faecalis* também foi encontrado em anuros acometidos pelo *Ranavirus*, *Batrachochytrium dendrobatidis* e *Aeromonas hydrophila* (MILLER et al., 2008).

A espécie que apresentou a menor frequência entre nas 24 amostras foi *Staphylococcus aureus*, que ocorreu apenas nas amostras residentes da área antropizada. BIE et al., (2019) encontrou esta espécie em maiores frequências nos indivíduos de *Rana dybowskii* coletados em fazenda. *S. aureus* é uma bactéria Gram-positiva do grupo dos cocos comumente encontrada na pele, mucosas nasais, intestino e garganta de indivíduos saudáveis. Possui ampla distribuição pelos ambientes, tornando-se viável por longos períodos em poeira (Santos et al., 2008). Seu reservatório natural na verdade são os humanos, e esta bactéria pode causar infecções que apresentam riscos maiores a indivíduos imunossuprimidos, como endocardites, abscessos, infecções urinárias e metastáticas (LOWY, 1998; MURRAY, 1999). A presença das bactérias apenas nas amostras residentes em uma das áreas pode indicar que esta bactéria compõe naturalmente a microbiota residente de *S. x-signatus* até mesmo em outros fragmentos.

A microbiota da Área Antropizada demonstrou menor similaridade entre as amostras transiente e residente, possivelmente devido a heterogeneidade espacial encontrada capaz de elencar novos nichos e permitir um contato maior dos indivíduos amostrados de *S. x-signatus* com a microbiota encontrada em humanos. Desta forma, a microbiota da Área Controle se mostrou mais similar a respeito das amostras transientes e residentes devido a um menor grau de heterogeneidade espacial. Quanto aos locais de coleta dentro da Área Antropizada, as amostras transientes dos bromeliais de visitação e do ar condicionado foram as mais similares. Observamos que as bromélias dos bromeliais de visitação do JBR eram constantemente lavadas por questões estéticas e os visitantes entravam em constante contato com as mesmas, o que permitiu o contato com a microbiota transiente encontrada nos indivíduos de *S. x-signatus* que foram coletados no local. Quanto ao ar-condicionado, não obtivemos informações sobre a frequência de manutenção dos aparelhos, tendo em vista que manutenções não realizadas regularmente nos filtros podem

se tornar ambientes férteis para bactérias, fungos e impurezas.

8. CONCLUSÃO

No presente estudo, foram isolados e identificados através de análises preditivas, 5 táxons bacterianos oriundos das amostras transientes e residentes de cada indivíduo de *Scinax x-signatus*, 1 a nível de gênero e 4 a nível de espécie. Serão realizadas análises moleculares com as amostras isoladas neste estudo a fim de identificar outros possíveis microrganismos componentes da microbiota cutânea. *Pseudomonas spp* foi o gênero bacteriano com maior frequência, ocorrendo nas duas áreas de estudo, seja nas amostras transientes ou nas residentes. *Staphylococcus aureus* por sua vez foi a espécie que obteve menor frequência, ocorrendo apenas nas amostras residentes da área controle. Nos indivíduos de *Scinax x-signatus*, todos os táxons identificados preditivamente possuem importância médica, podendo ocasionar riscos a saúde humana de indivíduos acometidos com algum grau de imunossupressão, no entanto, nenhum dos espécimes coletados neste estudo demonstraram sinais patológicos referentes a possíveis infecções causadas pelas bactérias encontradas. Não foi possível inferir comparações a respeito da composição da microbiota bacteriana associada a pele de *S. x-signatus* encontrada em outras espécies do gênero *Scinax spp*. devido a escassez de trabalhos dessa natureza voltados ao gênero, porém houve similaridades entre alguns microrganismos encontrados na pele de anuros da mesma família de *Scinax x-signatus*, bem como de anuros de famílias distintas e até mesmo entre os táxons de ordens distintas dentro da classe dos anfíbios.

A microbiota da Área Antropizada demonstrou menor similaridade entre as amostras transiente e residente, possivelmente devido a heterogeneidade espacial encontrada capaz de elencar novos nichos e permitir um contato maior com a microbiota encontrada em humanos. Desta forma, a microbiota da Área Controle se mostrou mais similar a respeito das amostras transientes e residentes.

Por fim, a sinantropia característica da espécie *Scinax x-signatus* torna-o acessível a uma gama de microrganismos presentes em áreas urbanas e fragmentadas, podendo este anuro carrear alguns microrganismos causadores de infecções que podem evoluir para doenças a depender do grau de imunossupressão do homem. Porém, *Scinax x-signatus* se mostra neste estudo como um anuro que desempenha importantes papéis ecológicos em quaisquer

ecossistemas em que estejam inseridos, pois além de atuar no controle de biológico através da predação de insetos e outras pragas e na bioindicação de qualidade ambiental, se faz de suma importância futuros estudos com esta espécie voltados a geração de produtos a partir de possíveis metabólitos antimicrobianos produzidos pela sua pele e pelos microrganismos que a ela são associados.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMPHIBIAWEB. 2019. <<https://amphibiaweb.org>> University of California, Berkeley, CA, USA. Accessed 25 Oct 2019.

ANDRADE, S. S. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Latin American medical centres: 5 year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–2001). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2003, 52(1), 140-141.

ASSIS, A. B. Microbiota, secreções e microclima: Consequências para os anfíbios. *Revista da Biologia* 8, 2012, 45-48.

BATISTA, M.; SILVA, M.; BARRETO, C. Effects of introduction and decline of a Bullfrog population (*Lithobates catesbeianus*) in a community of amphibians in the Cerrado from Central Brazil. *Herpetology Notes*, v. 8, 2015, p. 263-265.

BERGER, L.; SPEARE, R.; HYATT, A. Chytrid fungi and amphibian declines: overview, implications and future directions. In: CAMPBELL, A. *Decline and Disappearances of Australian Frogs*. Environment Australia: Canberra, 1999. P. 23-33, 1999.

BLAUSTEIN, A. R et al . Interspecific variation in susceptibility of frog tadpoles to the pathogenic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Conservation Biology*, v. 19, n. 5, 2005, p. 1460-1468.

BOELTER, R. A.; CECHIN, S. Z. Impact of the bullfrog diet (*Lithobates catesbeianus* – Anura, Ranidae) on native fauna: case study from the region of Agudo – RS – Brazil. *Natureza e Conservação*, 2007. 5(2): 115 – 123.

BORGES-NOJOSA, D.M.; SANTOS, E.M. Herpetofauna da Área de Betânia e Floresta, Pernambuco. In *Análise das Variações da Biodiversidade do Bioma Caatinga* (F.S. Araújo, M.N.J. Rodal & M.R.V. Barbosa, eds.). Ministério do Meio Ambiente, Brasília 2005, p.277-291.

BIE, J. et al. Detection and comparative analysis of cutaneous bacterial communities of farmed and wild *Rana dybowskii* (Amphibia: Anura). *The European Zoological Journal*, 2019, 86(1), 413-423.

BUSH, L.M.; PEREZ, M.T. Infecções por enterococos. Manual MSD Versão para profissionais de saúde, 2017, disponível em <https://www.msmanuals.com/pt-pt/profissional/doen%C3%A7as-infecciosas/cocos-gram-positivos/infec%C3%A7%C3%B5es-por-enterococos>

CARDOSO, A. J.; ANDRADE, G. V.; HADDAD, C. F. B. Distribuição espacial em

comunidades de anfíbios (Anura) no sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Biologia*, 1989, 49(1): 241-249.

CAREY, C., COHEN, N., & ROLLINS-SMITH, L. Amphibian declines: an immunological perspective. *Developmental & Comparative Immunology*, 1999, 23(6), 459–472

CORREIA, M. E. F.; OLIVEIRA, L. D. Importância da fauna de solo para a ciclagem de nutrientes. *Processos biológicos no sistema solo-planta: ferramentas para uma agricultura sustentável*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005, 77-99.

COSTA, T. R. N.; CARNAVAL, A. C. O. Q.; TOLEDO, L. F. Mudanças climáticas e seus impactos sobre os anfíbios brasileiros. *Revista da Biologia*, 2012, v. 8, p. 33-37.

CONLON, J. M., et al. Peptide defenses of the Cascades frog *Rana cascadae*: implications for the evolutionary history of frogs of the Amerana species group. *Peptides*, 2007, 28(6), 1268-1274.

CUNNINGAN, A. A.; et al. Pathological and microbiological findings from incidentes of unusual mortality of the common frog (*Rana temporaria*). *Philosophical Transactions of the Royal Society London*, 1996, v, 351, p. 1539 – 1557.

DASZAK, P., et al. Emerging infectious diseases and amphibian population declines. *Emerging infectious diseases*, 1999, 5(6), 735.

DA SILVA, R. R., et al. Análise da Fragmentação Florestal em Áreas do Bioma Mata Atlântica a Partir de Diferentes Sistemas Sensores. *Anuário do Instituto de Geociências*, 2019, v. 41, n. 2, p. 390-396.

DE ASSIS, ANANDA BRITO. Microbiota, secreções cutâneas e microclima: consequências para os anfíbios. *Revista da Biologia*, 2018 v. 8, p. 45-48.

DUELLMAN, W.E.; TRUEB, L. *Biology of amphibians*. New York: Mcgraw-hill Book Co., 1986, 670 p, .

ESCOBAR, A. M. et al. Sepsis por *Klebsiella pneumoniae*—Revisão de 28 casos. *Jornal de pediatria*, 1996, 72(4), 230-4.

FARAVELLI, I. Ajustes fisiológicos ao ambiente costeiro marinho em *Thoropa taophora* (Anura, Cycloramphidae). Diss. Universidade de São Paulo, 2015.

FEDER, E.; BURGGREN, W. *Environmental physiology of the amphibians*. University of Chicago Press, 1992.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*, 2009, 155(6), 1749-1757.

GILLIGAN, P. H. 1995. *Pseudomonas* and *Burkholderia*, 1995, p. 509-519. In P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Tenover, and R.

H. YOLKEN., Manual of clinical microbiology, 6th ed. American Society of Microbiology, Washington, D.C.

GONÇALVES, U. Fauna da Serra da Mão, p. 45-69. In: Inventário da Biota da Serra da Mão Alagoas. Menezes, A. F. (Coord.). Maceió: Instituto do Meio Ambiente de Alagoas, 2012, 130 p.

HADDAD, C.F.B. Anfíbios: uma análise da Lista Brasileira de Anfíbios Ameaçados de Extinção. In Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção (A.B.M. Machado, G.M. Drummond, & A.P. Paglia, eds.) Ministério do Meio Ambiente, Brasília, DF, 2008.

HADDAD, C. F. B., GIOVANELLI, J. G. R. E ALEXANDRINO, J. O aquecimento global e seus efeitos na distribuição e declínio dos anfíbios. In: Marcos S. Buckeridge. (Org.). Biologia e Mudanças Climáticas no Brasil. 1 ed. São Carlos SP: Rima Editora. 2008, p. 195-206.

HARRIS, R. N., et al. Amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* is inhibited by the cutaneous bacteria of amphibian species. EcoHealth, 2006 v. 3, n. 1, p. 53.

HEYER, W. R. et al. Frogs of Boracéia. Arquivos de Zoologia (São Paulo), 1990, 31(4), 231-410.

IUCN. International Union for Conservation of Nature. IUCN red list of threatened species. Version 2017.3, 2017. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org> (acesso em novembro de 2019).

KATZENBERGER, M. et al. Tolerância e sensibilidade térmica em anfíbios. Revista da Biologia, 2018, 8, 25-32.

KING, E. O.; M. K. WARD; E. E. RANEY. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. J. Lab. Clin. Med., 1954, 44:301.

KUENEMAN, J. G., et al. The amphibian skin-associated microbiome across species, space and life history stages. Molecular ecology, 2014, 23(6), 1238-1250.

KÜHN, I., et al. Comparison of enterococcal populations in animals, humans, and the environment-a European study. International journal of food microbiology, 2003, 88(2-3), 133-145.

LAUER, A et al. Common cutaneous bacteria from the eastern red-backed salamander can inhibit pathogenic fungi. Copeia, v. 2007, n. 3, p. 630-640.

LOUETTE, G.; DEVISSCHER, S.; ADRIAENS, T. Combating adult invasive American bullfrog *Lithobates catesbeianus*. European journal of wildlife research, 2014, v. 60, n. 4, p. 703-706.

LOWY, F. D. *Staphylococcus aureus* Infections. New England Journal of Medicine, 1998, 339(8), 520–532. doi:10.1056/nejm199808203390806

MACPHERSON, A.J.; HARRIS, N.L. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol* , 2004. 4, 478-485, 2004.

MADIGAN, M. T., MARTINKO, J.M. E PARKER, J. *Microbiologia de Brock*. São Paulo: Prentice Hall, 10ª Ed, 2004.

MORADALI MF; GHODS S; REHM BHA. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: A paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2017, 7:39.

MAUEL, M.J. et al. Bacterial pathogens isolated from cultured bullfrogs (*Rana catesbeiana*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2002, v.14, p.431-433.

MEYNET, E ET AL. Killed but metabolically active *Pseudomonas aeruginosa* - based vaccine induces protective humoral- and cell-mediated immunity against *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infections. *Vaccine*, 2018, 36(14), 1893–1900. doi:10.1016/j.vaccine.2018.02.040

MILLER, D. L., et al. Concurrent Infection with *Ranavirus*, *Batrachochytrium dendrobatidis*, and *Aeromonas* in a Captive Anuran Colony. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 2008, 39(3), 445–449. doi:10.1638/2008-0012.1

MOURIÑO, J.L.P et al. Isolamento de *Aeromonas hydrophila* em girinos de rã-touro na metamorfose, 2006.

MURRAY, P. R. et al. *Manual of clinical microbiology*. 1999. American Society of Microbiology Press, Washington DC, 2005, 6.

MYERS, N; et al. hotspots de biodiversidade para as prioridades de conservação. *Natureza*, 2000, n. 403, pág. 853-858.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 1998,11(1), 142–201. doi:10.1128/cmr.11.1.142

PALMEIRA, C. N. S.; GONÇALVES, U.. Anurofauna de uma localidade na parte septentrional da Mata Atlântica, Alagoas, Brasil. *Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão*, 2015 v. 37, n. 1.

PASTERIS, S.E.; BÜHLER, M.I.; NADER-MACÍAS, M.E. Microbiological and histological studies in farmed-bullfrog (*Rana catesbeiana*) displaying red-leg syndrome. *Aquaculture*, 2006, 251, 11–18.

PASTERIS, S.E., et al. Genotypic identification of lactic acid bacteria from a *Rana catesbeiana* hatchery. V Argentinean Congress of General Microbiology (SAMIGE). Santa Fe, Argentina, 2008 Abstr TEC13, pp. 88.

PASTERIS, S.E. et al. Beneficial properties of lactic acid bacteria isolated from a *Rana catesbeiana* hatchery. *Aquaculture Research* , 2009a, 40, 1605–1615.

PASTERIS, S.E., et al. Characterization of the beneficial properties of lactobacilli isolated from bullfrog (*Rana catesbeiana*) hatchery. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2009b, 95, 375–385.

PEREIRA, E. N.; LIRA, C. S.; SANTOS, E. M. Ocupação, distribuição espacial e sazonal dos anfíbios anuros, em fragmento de mata atlântica. *Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais*, 2016, v. 7, n. 2, p. 70-83.

RODRIGUEZ M.A.; BELMONTES, J.A.; HAWKINS, B.A. Energy, water and large-scale patterns of reptile and amphibian species richness in Europe. *Acta Oecol* 2005, 28: 65-70.

RODRIGUES, M. T., CARAMASCHI, U., Abraham Mijares 2010. *Scinax x-signatus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T56005A11404900. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-2.RLTS.T56005A11404900.en>. Downloaded on 08 January 2020.

ROSENTHAL M et al. Skin microbiota: microbial community structure and its potential association with health and disease. *Infection, Genetics and Evolution*, 2011, 11, 839–848.

SANTOS, D. F. D. Características microbiológicas de *Klebsiella pneumoniae* isoladas no meio ambiente hospitalar de pacientes com infecção nosocomial. Goiânia (GO): Universidade Católica de Goiás, 2007.

Santos, A. L. D et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 2007, 43(6), 413-423.

SBH. 2019. Sociedade Brasileira de Herpetologia (SBH). Lista de espécies de anfíbios do Brasil. Disponível em: <<http://sbherpetologia.org.br/listas/lista-anfibios/>>. Acesso em: 27 Out. 2019.

SCHADICH, E.; COLE, A. L. Pathogenicity of *Aeromonas hydrophila*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* to brown tree frogs (*Litoria ewingii*). *Comparative medicine*, 2010, 60(2), 114-117.

SEKIROV, I., et al Gut microbiota in health and disease. *Physiol Ver*, 2010, 90, 859-904.

SILVA, J. L. C., et al. Aspectos da degradação ambiental no Nordeste do Brasil. *Revista Gestão & Sustentabilidade Ambiental*, 2018 7(2), 180-191.

TURNER, S. M. et al. Weapons of mass destruction: virulence factors of the global killer enterotoxigenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 2006, 263(1), 10-20.

VIEIRA, A. T. Microbiota, dieta e sistema imune: um diálogo constante via ativação do receptor acoplado à proteína-G 43 (Gpr43), 2011.

WOODHAMS, D. C., et al. Symbiotic bacteria contribute to innate immune defenses of the threatened mountain yellow-legged frog, *Rana muscosa*.

Biological Conservation, 2007, 138(3-4), 390–398.
doi:10.1016/j.biocon.2007.05004,.

ZILLI, J.E et al. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. Cadernos de Ciência & Tecnologia, 2003, 20, 391-411.