Ananda Brito de Assis

Microbiota Cutânea e Secreções Dérmicas de
Proceratophrys boiei (Amphibia, Anura) em
Fragmentos de Floresta Atlântica

*Cutaneous Microbiota and Skin Secretions on Proceratophrys
boiei (Amphibia, Anura) in Atlantic Forest Fragments*

São Paulo

2015

Ananda Brito de Assis

Microbiota Cutânea e Secreções Dérmicas de
Proceratophrys boiei (Amphibia, Anura) em
Fragmentos de Floresta Atlântica

Cutaneous Microbiota and Skin Secretions on Proceratophrys boiei
(Amphibia, Anura) in Atlantic Forest Fragments

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Doutor em Ciências, na Área de
Fisiologia Geral.

Orientador: Carlos A. Navas Iannini

Co-orientadora: Cristine C. Barreto

São Paulo

2015

Assis, Ananda Brito de.

Microbiota cutânea e secreções dérmicas de *Proceratophrys boiei* (Amphibia, Anura) em fragmentos de Floresta Atlântica / Ananda Brito de Assis ; orientador Carlos Arturo Navas Iannini. -- São Paulo, 2015.

201f.

Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia Geral.

1. Microbiota cutânea. 2. Secreção dérmica. 3. Fragmentos florestais. I. Iannini, Carlos Arturo Navas. II. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Departamento de Fisiologia Geral. III. Título.

Comissão Julgadora

Prof (a). Dr(a).

Prof (a). Dr(a).

Prof (a). Dr(a).

Prof. Dr.
(Orientador)

A meu pai, que me mostrou
o regozijo do saber.

*A vida é uma união simbiótica e cooperativa que
permite o triunfo aos que se associam.*

Lynn Margulis

Agradecimentos

Os agradecimentos pela oportunidade de realizar esta pesquisa e por todo o aprendizado durante o meu processo de doutoramento são primeiramente ao meu orientador Carlos Arturo Navas Iannini e minha co-orientadora Cristine Chaves Barreto.

As colaborações com outros grupos foram fundamentais para a troca de experiências e aprendizado teórico e metodológico nas diferentes áreas do conhecimento relacionadas a este trabalho: Laboratório de Ecologia Microbiana do Instituto Oceanográfico (Universidade de São Paulo), que tem a supervisão da professora Vivian Helena Pellizari; Laboratório de Fisiologia de Tripanossomatídeos do Instituto de Biociências (Universidade de São Paulo), coordenado pela professora Lucile Floeter-Winter; grupo de pesquisa em Ecofisiologia Microbiana, do Programa em Ciências Genômicas e Biotecnologia (Universidade Católica de Brasília), coordenado pela professora Cristine Chaves Barreto; grupo de Bioprospecção e Caracterização Molecular do Programa em Ciências Genômicas e Biotecnologia (Universidade Católica de Brasília), coordenado pela professora Beatriz Simas Magalhães; grupo de pesquisa da professora Catherine Bevier do Colby College, Maine (EUA).

Agradeço o apoio técnico, fundamental, recebido por Telma Pazini, Vagner Alberto e, especialmente Anna Carolina Padovani, que além da atuação técnica foi uma grande parceira nas atividades em campo. Nessa fase do trabalho, eu ainda contei com o apoio de verdadeiros parceiros, que me ajudaram a transpor muitos dos desafios encontrados e sem os quais as metas de amostragem não teriam sido alcançadas: Benedito D. A. dos Santos, Renata Vaz, Michelle Granato e Mayan B. de Assis. Agradeço aos colegas Leandro e Wellington do Laboratório de Ecologia da Paisagem e Conservação pelas dicas para a confecção dos mapas.

Agradeço também pela infraestrutura utilizada nesta pesquisa, que foi cedida pelo Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo; Programa em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília e Parque Estadual Serra do Mar – Núcleos de Santa Virgínia e Cunha. Bem como pelo financiamento e bolsa recebido da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2011/50079-7 e FAPESP 2010/52075-6, respectivamente).

Agradeço ainda a pessoas queridas que atuaram indiretamente durante meu doutorado e compartilharam vivências incríveis durante esses anos: meus amigos e, principalmente, aos amigos do Laboratório de Ecofisiologia e Fisiologia Evolutiva. À minha família agradeço imensamente pelo apoio permanente: meu pai Fernando, mãe Marina e irmãos Alden e Mayan. Ao Pedro, meu marido, por todo o companheirismo, dedicação e amor.

Índice

Introdução geral	Erro! Indicador não definido.
A pele como um órgão de defesa nos anfíbios	2
Secreções cutâneas	3
Microbiota cutânea.....	5
Acessando a diversidade microbiana	8
Implicações da microbiota e secreções cutâneas para anfíbios da Floresta Atlântica.....	10
Objetivos	15
Material e Métodos Gerais	Erro! Indicador não definido.
Áreas de Estudo.....	18
Espécie modelo	26
Coleta de espécimes	29
Amostragem da microbiota cutânea.....	30
Variáveis ambientais	31
CAPÍTULO I – “Diversidade de Bactérias Cultiváveis da Microbiota Cutânea em Populações de <i>P. boiei</i>”	Erro! Indicador não definido.
Resumo	34
Abstract	35
1. Introdução.....	36
A colonização da pele dos anfíbios	36
Diversidade microbiana.....	38
2. Materiais e Métodos	39
Estimativas de densidade e riqueza microbianas	39
Análises	40
3. Resultados	42
Densidade bacteriana.....	42
Riqueza bacteriana	44
Relação entre densidade e riqueza bacterianas.....	49
Variáveis ambientais	49
Similaridade com base nas distâncias entre locais	53
Efeitos da amostragem	56
4. Discussão e conclusões	59

Diversidade microbiana.....	59
Microbiota & Ambiente	62

CAPÍTULO II – “Diversidade Bacteriana da Microbiota Cutânea e sua Relação com Micro-habitats ocupados por *P. boiei*: Estudo Metagenômico” Erro! Indicador não definido.

Resumo	67
Abstract	68
1. Introdução	69
A dinâmica microbiana e as doenças	69
Moduladores da microbiota cutânea nos anfíbios	70
2. Materiais e métodos	74
Locais de estudo	74
Amostragem dos microambientes	74
Extração de DNA metagenômico	76
Amplificação e purificação do gene RNAr 16S	76
Construção e sequenciamento das bibliotecas de RNAr 16S	77
Análises	77
3. Resultados	81
Diversidade microbiana - UTOs	82
Relações com variáveis ambientais	92
Diversidade taxonômica	96
4. Discussão e conclusões	109

CAPÍTULO III – “Atividade Antimicrobiana na pele de *Proceratophrys boiei*: Secreção e Microbiota Cutâneas” Erro! Indicador não definido.

Resumo	118
Abstract	119
1. Introdução	120
Proteção sobre a pele dos anfíbios: metabólitos bacterianos e peptídeos.....	120
Vulnerabilidade dos anfíbios às doenças.....	122
2. Material e Métodos	125
Microbiota cutânea.....	125
Secreção cutânea	129
<i>B. dendrobatidis</i>	132
3. Resultados	135

Microbiota cutânea	135
Secreção cutânea	143
5. Discussão e conclusões	153
Conclusões Gerais	Erro! Indicador não definido.
Resumo Geral / <i>Abstract</i>	Erro! Indicador não definido.
Referências Bibliográficas	Erro! Indicador não definido.
Anexos	Erro! Indicador não definido.

INTRODUÇÃO GERAL

A pele como um órgão de defesa nos anfíbios

Todos os organismos vivos estão continuamente expostos a condições que podem comprometer sua integridade física. Os vertebrados possuem mecanismos gerais e sofisticados para a defesa contra o ataque de agentes estranhos, químicos ou biológicos, os quais entram em contato com seus corpos juntamente com o ar, a água, alimentos ou através de lesões no tegumento. Os anfíbios são um grupo de vertebrados particular em relação a exposição a injúrias ambientais, pois, apesar de terem um sistema imunológico complexo, têm um ciclo de vida que inclui uma fase aquática e outra terrestre, além de uma pele altamente permeável que pode permitir a passagem livre de agentes químicos e biológicos do ambiente (FEDER & BURGGREN, 1992). A pele desses animais apresenta características únicas dentre os vertebrados e atua como uma interface bastante funcional entre o organismo e o meio externo. Além da defesa contra microrganismos e injúrias ambientais, esse órgão desempenha funções vitais como a troca gasosa e a regulação osmótica e termal. (FEDER & BURGGREN, 1992).

Além da proteção mecânica, a pele inclui mecanismos bioquímicos e biológicos derivados tanto da comunidade microbiana ali residente quanto da secreção de moléculas bioativas a partir das glândulas dérmicas. Entre os mecanismos bioquímicos é conhecida a atividade antimicrobiana de várias famílias de peptídeos secretados por glândulas dérmicas granulares (SIMMACO *et al.*, 1998; ROLLINS-SMITH *et al.*, 2002). A relevância dessas moléculas é tanta que, aparentemente, são responsáveis por diferenças interpopulacionais na susceptibilidade ao patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), considerado por diversos autores como a causa de declínios e extinções populacionais de anuros em diversas regiões do mundo (FISHER *et al.*, 2009). Já os mecanismos biológicos de proteção incluem a microbiota cutânea residente, a qual é composta por bactérias produtoras de antibióticos que

inibem o crescimento, *in vitro*, de patógenos importantes para populações selvagens de anfíbios (HARRIS *et al.*, 2006; WOODHAMS *et al.*, 2007; LAUER *et al.*, 2008; BRUCKER, 2008).

Secreções cutâneas

A derme dos anfíbios é rica em diversos tipos de glândulas granulares, que são estruturas neuroendócrinas distribuídas especialmente na região dorsal do animal (TOLEDO & JARED, 1995). Essas glândulas são responsáveis pela produção, armazenamento e liberação de moléculas bioativas (TOLEDO & JARED, 1995). Por isso, a pele dos anfíbios é considerada um sistema efetivo contra predadores e microrganismos patogênicos (ZASLOFF, 2002). O repertório de substâncias bioativas inclui além de esteróides e alcalóides, peptídeos com propriedades antimicrobianas (CLARKE, 1997; TYLER *et al.*, 2007). Os peptídeos antimicrobianos são considerados moléculas efetoras da imunidade inata e apresentam ampla heterogeneidade, em termos de estrutura e espectro de ação, além da especificidade com a espécie de anfíbio produtora (ZASLOFF, 2009; MOR *et al.*, 1994; CONLON *et al.*, 2004).

Os mecanismos por meio dos quais peptídeos antimicrobianos causam a morte celular envolvem principalmente a perturbação múltipla e irreversível da membrana celular, além de mecanismos adicionais e complementares (YEAMAN & YOUNT, 2003). O primeiro registro sobre a ocorrência de peptídeo com atividade antimicrobiana se deu há cerca de quarenta e cinco anos e foi identificado como Bombinina, isolado da espécie de anuro europeu *Bombina variegata* (CSORDAS & MICHL, 1970). Desde então centenas de peptídeos de anfíbios têm sido estudados, principalmente sob uma perspectiva bioprospectiva devido ao seu potencial antimicrobiano. Apesar de peptídeos antimicrobianos serem encontrados desde insetos até organismos maiores, como mamíferos (SIMMACO *et al.*, 1998), a produção nas glândulas dérmicas dos

anfíbios ocorre em concentrações altas dentre todos os animais, pois, estes apresentam um grande investimento nesse mecanismo de proteção (ZASLOFF, 2009). Assim, os peptídeos antimicrobianos têm um papel importante no combate a patógenos específicos de populações selvagens dos anfíbios, tais como, *B. dendrobatidis*, *Basidiobolus ranarum*, iridivírus e herpesvírus (ROLLINS-SMITH *et al.*, 2005).

Fatores externos e internos parecem modular ou afetar a secreção de moléculas bioativas na pele dos anfíbios. Em algumas espécies de anuros a dieta parece ser um fator externo essencial na modulação das secreções cutâneas. Por exemplo, a produção de tetrodotoxina (TTX), uma potente toxina presente na pele de alguns anuros da família Dendrobatidae, pode ser produzida mediante o sequestro de moléculas da dieta desses animais ou mesmo por microrganismos simbióticos (DALY *et al.*, 1997). Outro componente biótico modulador parece ser a própria comunidade microbiana residente na pele dos anuros, que é um estímulo externo para a produção de secreções nas glândulas dérmicas em algumas espécies estudadas. Um exemplo é derivado do trabalho de MANGONI e col., 2001, onde foi observado que indivíduos da espécie *Rana esculenta*, ao terem o conteúdo de suas glândulas dérmicas liberado, e permanecerem em ambiente estéril, não voltam a secretar compostos bioativos até serem novamente expostos a microrganismos. Dadas essas observações, cenários de retroalimentação são possíveis mesmo se ainda não foram investigados formalmente: As mesmas secreções cutâneas poderiam alterar o substrato pele e favorecer a permanência de certos tipos de microrganismos que, por sua vez, poderiam modular a secreção, determinando assim o perfil da microbiota.

Outros fatores ambientais, particularmente poluentes, podem também afetar a produção de peptídeos em anuros. Por exemplo, o inseticida comercializado como carbaril (1-nafitil metilcarbamato), mimetiza o neurotransmissor norepinefrina no

sistema nervoso simpático, interferindo na via de liberação de moléculas através das glândulas dérmicas (DAVIDSON *et al.*, 2007). De modo geral, alguns poluentes favorecem o estresse fisiológico em anuros (CHRISTIN *et al.*, 2004) e tal condição também pode afetar a secreção cutânea, como demonstrado na espécie *Rana esculenta*. Nesse anfíbio a exposição à glicocorticóides, hormônios relacionados ao estresse, inibe a transcrição dos genes codificantes para peptídeos antimicrobianos (SIMMACO *et al.*, 1997).

Esses exemplos mostram que o ambiente no qual o animal está inserido, incluindo parâmetros físicos, entorno microbiológico e ambiente biótico, está relacionado a características das secreções dérmicas nos anfíbios com efeitos potenciais sobre as barreiras de proteção da pele e a sua ação contra agentes patogênicos.

Microbiota cutânea

Populações de microrganismos podem desenvolver resistências aos antibióticos o que as capacita para viver sob determinadas concentrações desses agentes. Tal característica é essencial nos processos adaptativos durante a ocupação de microambientes adversos (SALLE, 1961). Certamente, este é um fenômeno comum durante o estabelecimento de associações entre microrganismos e hospedeiros. Como é o caso dos anfíbios que hospedam, sobre sua pele, uma comunidade microbiana composta por populações de microrganismos capazes de se multiplicar nesse microambiente. Essa comunidade pode ser definida como microbiota cutânea residente; o termo microbiota residente refere-se aos microrganismos que estão sempre presentes sobre ou dentro de organismos hospedeiros, adaptados às condições locais (BLACK, 1999). Outro grupo de microrganismos somente está presente sob determinadas condições, persistindo enquanto dure as condições que os favoreçam.

Esses consistem na microbiota transiente a qual pode ser composta inclusive por patógenos oportunistas (BLACK, 1999).

Microbiota residente e transiente já foram observados sobre a pele dos anfíbios, onde se diferenciam em termos de composição e de fixação neste substrato, uma vez que, a microbiota transiente é facilmente lavada através de banhos com água destilada (LAUER *et al.*, 2007). Condições favoráveis ao estabelecimento de uma comunidade microbiana sobre a pele dos anfíbios é dada pela umidade, necessária à troca gasosa e termorregulação, e proporcionadas pela produção de muco em glândulas dérmicas especializadas (FEDER & BURGGREN, 1992). Tais secreções mucosas são normalmente constituídas de glicoproteínas, compostas por carbono orgânico, e, por isso, criam um substrato nutricionalmente rico para o crescimento de diversos tipos de fungos e bactérias (DUCKLOW & MICHELL, 1979; BRIZZI *et al.*, 2002).

Nos anfíbios as secreções liberadas através das glândulas granulares incluem várias famílias de peptídeos, muitos deles com atividade antimicrobiana. O perfil dos peptídeos secretados (diversidade e atividade) varia entre espécies ou mesmo entre populações, o que poderia determinar mudanças na estrutura da comunidade microbiana residente (DUDA *et al.*, 2002; CONLON *et al.*, 2007). O ambiente físico-químico cutâneo também pode ser influenciado por fatores físicos ambientais. Além dos fatores mencionados, as características da pele também podem ser afetadas pela temperatura ambiental, fator associado à modulação fisiológica da quantidade de muco secretado (LILLYWHITE, 1974). Além da temperatura, variáveis como intensidade e tipo de radiação solar, pH e umidade ou ainda concentração de diversos produtos químicos externos, poderiam também afetar o ambiente da pele e, consequentemente, a composição da microbiota ali residente (PELCZAR *et al.*, 1981; MADIGAN *et al.*, 2009).

As primeiras observações desse sistema constam no trabalho de BETTIN & GREVEN (1986) que isolaram e identificaram bactérias da pele do urodelo *Salamandra salamandra*. Posteriormente, no ano 2000, a propriedade antimicrobiana de morfotipos bacterianos isolados da microbiota cutânea da salamandra *Plethodon ventralis* foi constatada (AUSTIN, 2000). Nesse trabalho foi sugerido que compostos produzidos pelas bactérias dessas comunidades poderiam prevenir a infecção fúngica dos ovos chocados pelas fêmeas e estas bactérias seriam transmitidas aos ovos durante o cuidado parental executado pelas mães. A importância da microbiota cutânea dos anfíbios foi principalmente reconhecida em 2006, quando HARRIS e col. demonstraram a eficácia de bactérias isoladas da pele das salamandras *Plethodon cinereus* e *Hemidactylium scutatum* contra o desenvolvimento do fungo quitrídio *B. dendrobatidis*, envolvido no declínio mundial de populações selvagens de anfíbios (BERGER *et al.*, 1999). Este trabalho marca o início de uma série de publicações onde se demonstra a atividade antimicrobiana de compostos produzidos por bactérias isoladas de diferentes espécies de anfíbios. Alguns exemplos são os trabalhos de LAUER e col., 2007 que, utilizando ferramentas moleculares e eletromicrografia para a caracterização da microbiota residente de salamandras da espécie *Plethodon cinereus*, revelaram uma ampla distribuição de bactérias sobre a pele, como também bactérias com propriedades antifúngicas.

Em 2007, WOODHAMS e col. estudaram duas populações de *Rana muscosa* expostas ao fungo *Bd*: uma delas em declínio e a outra resistente às infecções. Nesse estudo foi constatado que a variação na suscetibilidade ao *Bd* guardava relação com a proporção de indivíduos que hospedavam pelo menos uma bactéria com atividade antifúngica, a qual era superior na população persistente. LAUER e col., 2008 isolaram bactérias da pele de três populações de salamandras e realizaram ensaios destas contra

duas espécies de fungo (*Mariannea elegans* e *Rhizomucor variabilis*), que atacam os ovos destes anfíbios. Utilizando identificação molecular, esses autores chegaram ao número de 48 espécies de bactérias cutâneas, além de constatar que a maior parte dos indivíduos de todas as populações hospedava bactérias contra o crescimento de pelo menos um dos dois fungos. BRUCKER e col., 2008 detectaram dois metabólitos com potente ação contra fungos patógenos, na pele de salamandras da espécie *Plethodon cinereus*. Eles são produzidos pela bactéria simbiote *Janthinobacterium lividum* em concentrações letais para o fungo *Bd*.

Acessando a diversidade microbiana

Estimar a diversidade microbiana de um hábitat ou hospedeiro usando um sistema de coleta, isolamento, classificação e identificação é um desafio, entre outros aspectos, devido à variação espacial e temporal de determinados fatores e às limitações de amostragem (O'DONNELL *et al.*, 1996). Apesar das limitações, a diversidade taxonômica é um bom indicativo da biodiversidade microbiana, cujo estudo tem sido favorecido devido às ferramentas moleculares, especialmente ao uso do gene do rRNA 16S, que tem revolucionado os estudos em Ecologia, diversidade e filogenia microbianas. Apesar da limitação do gene rRNA 16S, o qual não permite a identificação no nível taxonômico de espécie, este marcador e outros, como o 18S, permitem a determinação da composição e das estruturas de comunidades microbianas, dispensando a necessidade do cultivo das células microbianas (COLE *et al.*, 2010).

Atualmente é possível descrever padrões da diversidade estrutural e funcional de comunidades microbianas a partir de uma amostra ambiental (HANDELSMAN *et al.*, 2007), graças às análises metagenômicas que permitem o acesso à diversidade, função e relações entre os microrganismos de comunidades em diversos ambientes. Tai análises

são realizadas a partir de técnicas moleculares que permitem o estudo de comunidades biológicas diretamente em seus habitats naturais (XU, 2010). Uma abordagem alternativa consiste no isolamento de cepas microbianas e é limitada aos elementos cultiváveis da comunidade microbiana. Trata-se da abordagem típica da maioria dos estudos em microbiota cutânea de anfíbios, pois permite isolamento de morfotipos específicos e a sua subsequentemente análise contra agentes patogênicos específicos, como o fungo *Bd* (HARRIS *et al.*, 2006; Woodhams *et al.*, 2007; LAUER *et al.*, 2008; BRUCKER *et al.*, 2008).

Os métodos de cultivo e os independentes deste são, ambos, necessários e complementares, sobretudo porque os resultados de testes de elementos isolados da microbiota contra agentes patogênicos não são fáceis de interpretar em termos de significância ecológica, pois, o contexto microambiental oferecido pelo substrato pele é muito mais complexo do que aquele *in vitro*. Por outro lado, as análises de diversidade total permitem postular quão complexo é o entorno microbiológico e como ele varia entre ambientes e entre espécies de anuros. Além disso, a identificação taxonômica dá acesso às informações sobre a composição e caracterização desses sistemas, o que permite o entendimento das relações entre comunidades e o reconhecimento de aspectos da relação entre microrganismos e hospedeiro, bem como de sua função. Essas considerações ganham especial relevância no contexto brasileiro, pois a diversidade de espécies bacterianas hospedadas pelas espécies de anfíbios é ainda pouco conhecida.

A densidade microbiana é importante na relação da comunidade residente com o hospedeiro, pois, certas doenças podem resultar de perturbações no equilíbrio dinâmico das populações residentes (BLACK, 1999). Além disso, em alguns casos, a biossíntese de compostos antimicrobianos é determinada pela densidade populacional

dos microrganismos produtores. A produção da violaceína, um antibiótico produzido pela bactéria *Chromobacterium violaceum*, é densidade-dependente e especula-se sobre a ocorrência dessa regulação na infecção por *Bd* em espécies de salamandras (BRUCKER *et al.*, 2008). A riqueza de espécies nas comunidades residentes na pele pode estar relacionada ao micro-habitat ocupado pelos indivíduos. Em estudo anterior (ASSIS, 2011) verificou-se que a espécie *Proceratophrys boiei*, que ocupa o folhiço, detém um maior número de morfotipos bacterianos quando comparada a espécies arborícolas ou de áreas abertas.

Implicações da microbiota e secreções cutâneas para anfíbios da Floresta Atlântica

Estudos sobre a pele dos anfíbios como interface com o ambiente são indispensáveis no contexto atual de declínios populacionais desse grupo, pois doenças são causa de grande parte dos declínios de populações de anuros. Por sua vez, tais doenças são em boa parte causadas ou agravadas pela infecção de patógenos que atuam na pele. De fato, o termo *Emerging Infectious Diseases* (EIDs), antes usado apenas para se referir a doenças humanas deflagradas em larga escala geográfica, agora é aplicado também à vida selvagem, fazendo alusão à série de epidemias constatadas no meio natural nesses últimos anos, salientando o caso dos anfíbios anuros (DASZAK *et al.*, 2000). Nesse grupo, tais doenças são em boa parte causadas ou agravadas pela infecção por patógenos que atuam através da pele.

Alguns componentes da microbiota residente são patógenos oportunistas com os quais os indivíduos normalmente convivem, até que eventos de imunossupressão ocorram. Por exemplo, *Aeromonas hydrophila* e *Pseudomonas aeruginosa*, espécies bacterianas presentes em água e solo, são os principais agentes causadores da doença-das-pernas-vermelhas, que infecciona órgãos internos e pele (MOURIÑO *et al.*, 2006; CAREY *et al.*, 1999). *B. dendrobatidis* é um parasita intracelular que ataca os

indivíduos por meio das partes queratinizadas do epitélio dos anfíbios adultos e partes da boca dos girinos, invadindo as células (SYMONDS *et al.*, 2008; WELDON *et al.*, 2004; LONGOCORE, 1999). Especula-se que as causas da morte dos indivíduos incluam queda na eficiência da respiração cutânea e da regulação osmótica por meio da pele, em decorrência das alterações significativas que ocorrem no epitélio, além da imunossupressão e doenças sistêmicas associadas a infecção (BERGER *et al.*, 1999).

Um fato importante e nem sempre levado em consideração é que a susceptibilidade às doenças causadas por fungos e bactérias varia muito entre espécies e mesmo entre populações de anfíbios. Por exemplo, no Brasil, apesar da detecção da ampla distribuição do *Bd* em populações de anfíbios, ainda não há registro de declínios populacionais atribuídos diretamente à presença do quitrídio (CARNAVAL *et al.*, 2006). Pelo que foi exposto, o sistema de defesa dos anfíbios, que inclui a atividade antimicrobiana da microbiota e secreções cutâneas, pode ser um excelente indicador da susceptibilidade desse grupo às doenças infecciosas.

Além das doenças, a perda e a fragmentação dos habitats estão entre as principais ameaças à preservação das populações selvagens de anfíbios. Hoje, as áreas de Floresta Atlântica que persistem, compõem um grande mosaico de remanescentes descontínuos e com grande evidência de impactos antropogênicos (RIBEIRO *et al.*, 2009; PINTO & BRITO, 2005; MORELLATO & HADDAD, 2000; TURNER & CORLETT, 1996). A fragmentação, além de dificultar o acesso a locais de reprodução e alterar os valores médios e a variância de diversas variáveis físicas (NAVAS & OTANI, 2007; SAUNDERS *et al.*, 1991), deixa as populações remanescentes susceptíveis a agentes invasores e causadores de doenças (BREARLEY *et al.*, 2013). O grau de tolerância das espécies de anfíbios às condições modificadas pela fragmentação é pouco conhecido, mas aparentemente pode mudar muito de espécie para espécie. A relação entre

impacto ambiental, ecofisiologia e vulnerabilidade a agentes patogênicos é ainda uma área de pesquisa emergente (LIPS *et al.*, 2008), mas essas considerações são importantes no contexto dos remanescentes de Floresta Atlântica (KENNEDY & SMITH, 1995).

Extinções de microrganismos ocorrem muito frequentemente em clareiras de florestas e em diferentes usos da terra como a prática da agricultura. Já foi observado, por exemplo, que a composição das comunidades microbianas difere em habitats de diferentes tamanhos e qualidades (RANTALAINEN, 2004). A estrutura dessas comunidades é, primariamente, determinada pelas condições abióticas do habitat. Diferenças nas condições de temperatura e umidade, por exemplo, entre habitats fragmentados e contínuos, determinam diferença nas comunidades microbianas (RANTALAINEN, 2004). HENLE e col. (2004) descreveram 12 características preditoras da sensibilidade das espécies à fragmentação do habitat, a saber: tamanho populacional, flutuação da população, poder de dispersão, potencial reprodutivo, sobrevivência anual, socialização, tamanho corporal, posição trófica, especialização ecológica, micro-habitat e uso de matriz, traços sensíveis à perturbações e competição, raridade, posição biogeográfica. Nesse contexto, o estudo das comunidades microbianas poderia elucidar os efeitos da fragmentação numa perspectiva mais ampla e funcional e, ainda, as consequências para a microbiota cutânea dos anfíbios e a vulnerabilidade destes a doenças.

A literatura permite inferir que há efeitos da fragmentação sobre a microbiota cutânea dos anuros de floresta. Esse postulado parte das premissas principais: a) a comunidade microbiana presente na pele dos anfíbios é composta em parte de populações bacterianas do ambiente (MULETZ *et al.*, 2012; LOUDON *et al.*, 2014; KUENEMAN *et al.*, 2014); b) as comunidades microbianas do ambiente são

afetadas por alterações em variáveis ambientais (KENNEDY & SMITH, 1995) e pelo processo de fragmentação (RANTALAINEN, 2004; BURKEY, 2013). Essas premissas não têm sido estudadas em conjunto, mas são suportadas individualmente na literatura. Por exemplo, CULP & FALKINHAM (2007) demonstraram que uma fração das bactérias isoladas da pele de anfíbios guarda relação com aquelas amostradas no ambiente onde os indivíduos são capturados.

Com relação à segunda premissa, sabemos que o solo das florestas experimenta alterações profundas nos componentes abióticos a partir de impactos antropogênicos, e que essas alterações determinam mudança na composição das comunidades microbianas de solo, sendo essas utilizadas como indicadores de qualidade do solo (ZILLI *et al.*, 2003). Finalmente, sabe-se que algumas variáveis da paisagem potencialmente importantes afetando variáveis ambientais incluem tamanho, forma, grau de isolamento, tipo de entorno e histórico de perturbações dos diversos fragmentos (VIANA & PINHEIRO, 1998). Assim, esses atributos da paisagem poderiam guardar relação com a diversidade, o tamanho e a composição das comunidades microbianas cutâneas em anuros.

A Floresta Atlântica, apesar do histórico de intensa exploração de seus recursos e perdas de habitats, guarda ainda grande diversidade de espécies e endemismos, sendo por isso considerada um *hotspot* de biodiversidade (MYERS *et al.*, 2000; MORELLATO & HADDAD, 2000). A fauna de anfíbios elucida bem essa realidade, a qual se compõe de cerca de 400 espécies, dentre as quais 340 podem ser consideradas endêmicas. Essa fração representa 44% das espécies relacionadas para o Brasil (HADDAD *et al.*, 2008). A compreensão da diversidade biológica e dos fatores abióticos nos remanescentes desse bioma é indispensável para a conservação dos anfíbios (POUGH *et al.*, 1998; RODRIGUES, 2005).

O estado atual do conhecimento indica que variações na microbiota cutânea e secreções dérmicas podem ter causas extrínsecas ou intrínsecas, sendo a microbiota ambiental um fator muito importante, determinante da microbiota residente na pele de anfíbios. Também considera-se que a microbiota cutânea possa oferecer proteção contra agentes patogênicos por meio da liberação de metabólitos de ação antimicrobiana. As secreções cutâneas possuem moléculas de ação antimicrobiana e parecem, por sua vez, ser influenciadas pela própria microbiota dérmica e pelo entorno ambiental. São conhecidos ainda alguns possíveis mecanismos mediante os quais variáveis bióticas e abióticas afetam a estrutura da microbiota ambiental.

Um dos aspectos desta pesquisa foi investigar se características da microbiota cutânea de anfíbios variam entre localidades e se têm relação com características físico-químicas e climáticas do ambiente. Essa pergunta foi apresentada no contexto de duas hipóteses alternativas, dentre as quais a primeira é fundamentada na expectativa de que a microbiota ambiental seja fortemente afetada por características ambientais e, conseqüentemente, influencie a composição da microbiota cutânea. Essa hipótese seria favorecida por uma relação entre a descrição sintética das características dos fragmentos e a composição, riqueza e abundância da microbiota cutânea dos anfíbios. De outra maneira, a ausência de relação entre o perfil físico do fragmento e as variáveis microbiológicas que descrevem as comunidades cutâneas favoreceria a visão de especificidade, na qual o filtro principal é constituído pelas características intrínsecas à pele dos anfíbios.

Cada uma das premissas aqui apresentadas tem sido estudada só de maneira independente, de modo que a associação entre tais premissas é, no momento, uma inferência que precisa de confirmação. Conseqüentemente, consideramos essencial desenhar e realizar um estudo integrado com uma espécie única de anuro, no qual seja

analisada a relação entre a microbiota ambiental e a microbiota da pele, o efeito das secreções cutâneas sobre agentes patogênicos potenciais e, ainda, a relação entre essa microbiota e potenciais patógenos de importância para os anfíbios. Acrescenta-se, finalmente, a importância de estudar as variações entre populações nas características desses dois principais sistemas de proteção da pele. Acreditamos que esta linha de pesquisa possui grande potencial para vislumbrar processos ecológicos, evolutivos e ecofisiológicos relevantes na história natural de anfíbios anuros, além de ter potencial para o achado de material bioprospectivo, mas com a compreensão de seu significado ecológico.

Objetivos

No marco de um estudo comparativo entre fragmentos da Floresta Atlântica do Estado de São Paulo, o objetivo central desta proposta foi avaliar, em um sistema-modelo único (*Proceratophrys boiei*), a influência do ambiente sobre a microbiota cutânea de anfíbios, bem como sobre determinadas propriedades das secreções dérmicas desses indivíduos, conforme descrito acima. Os objetivos específicos foram:

1. Testar se a composição da microbiota ambiental varia entre os fragmentos e micro-habitats de Floresta Atlântica amostrados e se tem relação com alguns parâmetros ambientais analisados;
2. Verificar se a diversidade da microbiota cutânea de *P. boiei* é relacionada à diversidade da microbiota nos ambientes que ocupa. Além disso, em termos de composição, se a microbiota cutânea é um subconjunto da microbiota ambiental que ocorre nos seus micro-habitats;
3. Testar se a riqueza e abundância de bactérias da microbiota cutânea de *P. boiei* varia entre os diferentes os remanescentes de Floresta Atlântica ocupados por essa espécie;
4. Testar se a riqueza e a abundância de bactérias presente na pele de *P. boiei* com atividade antimicrobiana varia entre populações ou locais de amostragem;
5. Avaliar o efeito antimicrobiano das secreções

sobre alguns patógenos e se os perfis das secreções cutâneas diferem entre populações de *P. boiei*. O termo “ambiente” deve ser entendido como o conjunto de fatores quantificáveis da paisagem, hábitat e do microclima associados à área de vida de *P. boiei* nos locais de estudo.

MATERIAL E MÉTODOS GERAIS

Áreas de Estudo

A área de estudo localiza-se no domínio da Floresta Atlântica, bioma que já esteve entre as maiores florestas americanas, ocupando, nesse cenário, cerca de 150 milhões de hectares que se entendiam entre as regiões tropical, com o limite norte no Estado do Rio Grande do Norte, e subtropical, com o limite sul no Estado do Rio Grande do Sul. No entanto, historicamente, esse bioma brasileiro sofre um intenso processo de desmatamento que o tem reduzido a fragmentos florestais com diferentes graus de isolamento e tamanhos. Os remanescentes atuais representam apenas 11,4% de sua extensão original e são compostos por florestas de crescimento secundário, com estágios recente e médio de sucessão (RIBEIRO *et al.*, 2009; VIANA *et al.*, 1997; METZGER, 2009). Os fragmentos menores que 250 ha representam 97% do total de fragmentos (245.173) e cerca de 42% do total da Floresta; 83,4% dos fragmentos são menores que 50 ha e correspondem a 20,2% da área de Floresta Atlântica (RIBEIRO *et al.*, 2009). A degradação ambiental é atribuída ao uso da terra para a prática da agricultura, pecuária e urbanização (VIANA *et al.*, 1997; DALE & PEARSON 1997; MORELLATO & HADDAD 2000; TABARELLI *et al.*, 2005). No entanto, apesar da intensa ação antrópica, a Floresta Atlântica é considerada um *hotspot* de biodiversidade, pois, abriga expressiva diversidade florística e faunística que representam 8% do total mundial de espécies, além de ter um alto grau de endemismo (MYERS *et al.*, 2000; SILVA & CASTELETTI, 2003).

Os remanescentes florestais utilizados nesta pesquisa situam-se a leste do estado de São Paulo, na mesorregião do Vale do Paraíba Paulistano (Figura 1) – municípios de Redenção da Serra, Ubatuba, Cunha e São Luís do Paraitinga. A região caracteriza-se historicamente pela atividade agrícola, desde o século XVIII com a produção cafeeira e algodoeira, pela industrialização do final do século XIX e pela

expansão urbana associada ao desenvolvimento econômico (FERNANDES & COELHO, 2013).

Figura 1. Municípios da mesorregião do Vale do Paraíba onde se situam as florestas consideradas nesta pesquisa: na porção mais norte, o município de Cunha; mais ao sul, Ubatuba; a Oeste Redenção da Serra; na porção central São Luís do Paraitinga.

Florestas contínuas

A Serra do Mar é a sub-região biogeográfica melhor preservada de Floresta Atlântica, a qual possui 36,5% de sua vegetação original, principalmente, ao longo das montanhas costeiras no Estado de São Paulo. Ela está distribuída em 1.109,546 ha de florestas contínuas, que representam 7% da Floresta Atlântica remanescente (RIBEIRO *et al.*, 2009). A preservação desse fragmento deve-se, em parte, à implementação da Unidade de Conservação Parque Estadual Serra do Mar (PESM) em 30 de agosto de 1977 (Decreto Estadual 10.251), com uma área de 315.390,69 ha que abrange parte de 23 municípios desde Ubatuba, na divisa com o Estado do Rio de Janeiro, até Pedro de Toledo no litoral sul. Sua gestão é realizada por meio de oito núcleos administrativos, sendo três sedes localizadas no planalto: Cunha, Santa Virgínia e Curucutu, e cinco na

região litorânea: Picinguaba, Caraguatatuba, São Sebastião, Cubatão e Pedro de Toledo (INSTITUTO FLORESTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2006).

Os núcleos de Santa Virgínia (23°17' a 23°24' S e 45°30' a 45°11' W) e Cunha (23°13' a 23°17' S e 44°59' a 45°02'O) foram incluídos nesta pesquisa como referências de florestas preservadas e contínuas. O primeiro possui 17.500 ha de área que abrangem quatro municípios do Vale do Paraíba do Sul: São Luís do Paraitinga, Cunha, Ubatuba e Natividade da Serra. A vegetação é caracterizada como Ombrófila Densa Montana e Alto Montana (floresta nebulosa) (KRONKA ET AL., 2005; INSTITUTO FLORESTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2006). Ela é composta por um mosaico com áreas de floresta madura, pastagens, plantios de *Eucalyptus* spp. e florestas secundárias em diferentes estágios de regeneração (VELOSO *et al.*, 1991; TABARELLI *et al.*, 1993; TABARELLI *et al.*, 1997). Santa Virgínia situa-se no Planalto de Paraitinga-Paraibuna, cuja altitude varia entre 87m e 1.100 m. Nesse núcleo, todos os indivíduos foram capturados na trilha da Pirapitinga (23°20'38"S 45°09'19"W), que apresenta Floresta Ombrófila Densa em diferentes estágios de regeneração, em riachos temporários ou permanentes.

O Núcleo de Cunha está a leste do Núcleo de Santa Virgínia, com o qual faz divisa, e possui uma área de 12.000 ha, que incluem os municípios de Cunha e Ubatuba. Sua vegetação é composta pela Floresta Ombrófila Densa Montana e Alto Montana (INSTITUTO FLORESTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2006). O núcleo está inserido no Planalto de Piratininga e sua altitude varia entre 1.000 m e 1.228 m de altitude. Nessa unidade, os espécimes foram capturados nas trilhas do Rio Bonito (23°14'09''S 45°01'05''W) e do Rio Paraibuna (23°13'09''S 45°01'37''W), onde a maior porção da floresta é composta por vegetação secundária e diversos riachos temporários ou permanentes.

Fragmentos florestais

Os fragmentos florestais considerados neste trabalho possuem áreas inferiores a 60,4 ha e situam-se no município de São Luís do Paraitinga (23° 13' 32"S; 45° 18' 58" W), no Estado de São Paulo (Figura 3), onde a vegetação predominante é composta por Floresta Ombrófila Densa Montana e vegetação secundária da Floresta Ombrófila Densa Montana (KRONKA *et al.*, 2005). A paisagem é intensamente fragmentada, diferentes fisionomias compõem um verdadeiro mosaico de florestas dispersas em pequenos fragmentos (11,8%), florestas de crescimento recente (21,4%), pastagens (59,8%), agricultura, plantios de *Eucalyptus* spp. (3,7%) e áreas urbanas (3,3%) (BECKER, 2007). Estima-se que neste município existam 772 fragmentos, dos quais 511 têm áreas menores que 10 ha e apenas 11 possuem acima de 200 ha; além disso, dos 73.700 ha de território do município 7.728 ha encontra-se dentro da Unidade de Conservação Parque Estadual Serra do Mar – Núcleo de Santa Virgínia. A qualidade dos fragmentos florestais varia bastante se forem observadas as variáveis: área, drenagem, cobertura vegetal, tipo de matriz, isolamento, comprimento de borda, além da composição de espécies de anfíbios (observações pessoais; não publicado). Em apenas três dos 15 fragmentos, haviam trilhas de acesso para os pontos amostrais. Nos demais fragmentos a amostragem foi realizada por meio do acesso direto aos corpos de água ou através de pequenos acessos abertos, sem a criação de novas trilhas.

Os fragmentos foram escolhidos, para esta pesquisa, com base nos seguintes critérios: acessibilidade, tamanho, cobertura vegetal e drenagem, que aumentariam as chances de captura dos indivíduos. Foram utilizadas imagens do satélite *Landsat 5* e sobreposição de camadas (*shapes*), da drenagem e dos fragmentos, em conjunto com observações de campo, assim, foi possível determinar os fragmentos com presença de riachos, com boa cobertura vegetal, tamanho, e boa acessibilidade (Figura 4).

Figura4. Imagem *Landsat 5* e *shapes* de drenagem e fragmentos florestais, cedidos pelo Instituto Florestal de São Paulo. Créditos: Ananda Brito.

Para a estimativa da área dos fragmentos foi utilizado o programa *GE-Path 1.4.6*, e foram considerados como delimitadores dessas áreas: estradas, ocupação humana e rios. Os mesmos critérios foram considerados para as delimitações das áreas de amostragem dentro das unidades de conservação. Ao todo foram escolhidos 33 fragmentos para a amostragem em São Luís do Paraitinga e no limite com municípios

vizinhos, sendo realizada a captura dos espécimes em 15 deles (Figura 3). A área dos sítios variou entre 60,36 ha e 3.06 ha nos fragmentos; e foi estimada em 165.78 ha e 2.886,36 ha nos núcleos de Santa Virgínia (PESM-NSV) e Cunha (PESM-CUN), respectivamente. O grau de isolamento dessas manchas de hábitat foi também estimado por meio de retas traçadas da borda do fragmento até a borda do outro mais próximo. Para essas estimativas também foi utilizado o programa *GE-Path 1.4.6*. A distância entre os fragmentos estudados e outros fragmentos variou entre 16 m e 340,9 m (Tabela 1).

Tabela 1. Localização e caracterização das florestas de amostragem.

Local	Coordenada		Altitude (m)	Área (ha)	Isolamento (m)
1. Saad cachoeira	23°09'42" S	45°13'44" W	775	3,06	41,7
2. Gonzaga	23°14'08" S	45°22'05" W	744	6,29	186,6
3. Fonte da liberdade	23°09'47" S	45°13'14" W	761	7,22	34,8
4. Irene	23°12'42" S	45°15'53" W	788	9,69	260,7
5. João Leite	23°17'23" S	45°21'38" W	804	10,37	340,9
6. Diolga	23°13'33" S	45°16'38" W	972	11,05	53,6
7. Sidney	23°15'39" S	45°18'52" W	794	15,79	9,7
8. G4	23°16'11" S	45°22'48" W	783	16,38	147,6
9. Embaúba	23°13'05" S	45°12'06" W	773	19,63	84,8
10. Ditinha	23°16'17" S	45°23'26" W	753	21,23	182,1
11. Pimenta	23°13'39" S	45°17'18" W	832	26,26	53,6
12. Rancho do Mato	23°13'12" S	45°17'12" W	771	27,16	110,4
13. Pantheon	23°16'33" S	45°12'32" W	755	33,99	16,0
14. Ditão	23°16'31" S	45°20'08" W	977	38,22	43,8
15. Benedita	23°13'16" S	45°16'08" W	862	60,36	16,0
16. PESH-NSV	23°20'15" S	45°09'11" W	867	165,78	6,2
17. PESH-CUN	23°14'24" S	45°01'08" W	1077	2.886,36	5,9

Para o estudo apresentado no capítulo dois desta tese um terceiro ponto de amostragem foi incluído. Trata-se da fazenda Paraíso Ecolodge (24°13'16''S; 48°22'16''W), que possui área de floresta contínua com o Parque Estadual Intervales (PEI) e está localizada a sudoeste do Estado de São Paulo, no município de Ribeirão Grande. A área da circunferência considerada para a amostragem nesta localidade foi

1.395,8 ha e o principal ponto amostral está situado na trilha do Turista, dentro da fazenda. A vegetação predominante é a Floresta Ombrófila Densa Baixo-Montana e Montana (LEONEL, 2001) composta, em sua maioria, por floresta secundária

Espécie modelo

A espécie selecionada para este estudo foi o anuro *Proceratophrys boiei* (WIED-NEUWIED, 1824), pertencente à família Cycloramphidae (Figura 5). Sua distribuição compreende áreas de transição entre os biomas Cerrado e Floresta Atlântica, principalmente neste, desde o Estado de Santa Catarina até o Espírito Santo (PRADO & POMBAL, 2008). Esse anuro possui hábito terrestre, ocupando o folhiço, com o qual pode ser facilmente confundido (Figura 6). Durante os eventos de reprodução explosiva, característica dessa espécie, os indivíduos são encontrados associados a riachos no interior e na borda da mata (*sensu* WELLS, 1977; ZINA *et al.*, 2007). Apresenta-se nessa espécie um dimorfismo sexual de tamanho, sendo as fêmeas maiores que os machos, 40 mm a 74,3 mm e 39,8 mm a 61,9 mm, respectivamente (PRADO & POMBAL, 2008). Segundo os dados da literatura, a estação reprodutiva vai de setembro a janeiro (BERTOLUCI, 1998), porém, nesta pesquisa, a atividade reprodutiva foi observada até o mês de março, embora tais eventos fossem mais frequentes entre os meses de novembro e janeiro.

Aspectos da microbiota residente da pele de *P. boiei* foram analisados em um estudo prévio (ASSIS, 2011), no qual foi observado que essa espécie abriga uma grande diversidade bacteriana. A pesquisa realizada até agora sugere que o micro-habitat ocupado por *P. boiei* seja um fator importante na determinação das características da microbiota residente, pois algumas famílias de bactérias típicas de solo foram identificadas na pele da espécie. Além disso, neste estudo foi detectada uma maior

densidade de bactérias heterotróficas cultiváveis nas comunidades cutâneas encontradas em fragmentos florestais da Floresta Atlântica, quando comparadas àquelas amostradas em áreas contínuas, embora a amostragem tenha sido restrita. Ainda, entre as espécies investigadas, a que apresentou a maior quantidade de bactérias isoladas com potencial inibitório de patógenos, detectados em experimentos *in vitro*.

Características da história natural de *P. boiei* favorecem o contato com diversas comunidades da microbiota ambiental. Um exemplo é o hábito terrícola e semifossorial, que deve permitir que o animal entre em contato com um amplo mosaico das comunidades microbiológicas que ali ocorrem (Figuras 5 A e B). *P. boiei* também mantém contato com corpos de água (principalmente no período reprodutivo), normalmente riachos, adjacentes ou internos à floresta, o que aumenta ainda mais a diversidade microbiana com a qual os indivíduos mantêm contato.

Figura 5. Imagens da espécie de estudo *P. boiei*. A – B) Espécimes executando o comportamento de enterrar-se; C) Vista lateral de fêmea; D) Vista dorsal de fêmea (à esq.) e macho (à dir.); E) Vista dorsal de macho sobre papel milimetrado; F) Vista ventral; G) Amostragem da microbiota cutânea de um indivíduo de *P. boiei*. Fotos: Ananda Brito.

Figura 6. *P. boiei* sobre folhiço, no interior de floresta, um micro-hábitat típico da espécie. Foto: Ananda Brito.

Coleta de espécimes

Os espécimes de *P. boiei* foram capturados por busca ativa durante a estação reprodutiva e em trilhas já existentes, juntos aos riachos ou em estreitos acessos temporários criados para a amostragem. A maioria dos indivíduos encontrava-se no coro de vocalização, próximos a riachos permanentes ou temporários, e foram identificados a partir do reconhecimento do canto e de características morfológicas. Para evitar o contato direto, luvas estéreis foram utilizadas para a manipulação dos indivíduos, sendo trocadas a cada nova captura. Durante o transporte até a base de pesquisa os animais foram mantidos individualmente em saco estéreis *Whirl-Pak*® (3.637 mL). Para cada indivíduo coletado as medidas de peso, comprimento rostro-cloacal, temperatura corpórea, hora e sexo foram tomadas.

Amostragem da microbiota cutânea

A amostragem da microbiota cutânea foi feita, em cada grupo de indivíduos, com o limite máximo de três horas após a captura e em alojamentos de pesquisa próximos aos locais de coleta. Os animais eram previamente lavados, em dois banhos de água Milli-Q autoclavada, para a remoção das bactérias transientes e acesso às bactérias residentes (LAUER *et al.*, 2007). Cada cotonete estéril era passado cinco vezes ao longo do comprimento rostro-cloacal do dorso e do ventre, sendo em seguida depositado em 1 mL de solução fisiológica (NaCl 0,9%) estéril.

Em um procedimento piloto observou-se a necessidade de realizar diluições seriadas antes da inoculação das amostras, pois, a falta desse procedimento tornava impossível a contagem de colônias após o crescimento na placa de petri, seguindo os procedimentos padrão (A. Brito de Assis, dados não publicados). Assim, cada amostra inicial era homogeneizada com o auxílio de vórtex, em máxima velocidade, durante 1 min, diluída 100 vezes em NaCl 0,9% e cultivada pelo método de espalhamento em placa de petri 90 x 15 mm, contendo meio R2A ágar (Difco). Esse meio tem sido utilizado para o cultivo de bactérias cutâneas de anfíbios e possui baixo teor de nutrientes, o que demanda um tempo maior de incubação. Em contrapartida, ele permite o crescimento de grupos bacterianos de crescimento lento, que pode ser suprimido por grupos bacterianos de crescimento rápido se a comunidade for cultivada em meios de cultivo com alto teor de nutrientes. O cultivo de cada amostra foi realizado em triplicatas e próximo à chama de um bico de Bunsen para evitar a contaminação das placas. Controles para a identificação de possíveis contaminações foram feitos utilizando-se duas placas de petri, contendo o mesmo meio de cultivo, deixadas abertas a 10 cm e 40 cm da chama, para as quais nenhum crescimento de colônias bacterianas era esperado.

As amostras foram incubadas à temperatura ambiente de campo: entre 22°C e 30°C. Após a amostragem para o cultivo da microbiota cutânea (capítulos 1 e 3) era realizada a amostragem para a análise da comunidade por método independente de cultivo, por meio de biblioteca de clones (capítulo 2). Essa amostragem seguiu o mesmo protocolo descrito acima, porém, ao final o cotonete impregnado com as células bacterianas era depositado em meio GTE (Glicose 20% – Tris-HCL 1M pH 7,4 –EDTA 0,5M pH 8,0) e estocados imediatamente em *freezer* a -20°C.

Variáveis ambientais

As medidas de variáveis abióticas foram tomadas em campo. No momento da coleta dos espécimes foram aferidos os valores de temperatura, umidade relativa, pH e temperatura do solo nos micro-hábitat onde encontravam-se os indivíduos. Os parâmetros dos corpos de água ocupados também foram medidos: pH, temperatura, oxigênio dissolvido, condutividade, sólidos dissolvidos totais e salinidade.

Para a caracterização microclimática das florestas, estando elas situadas em unidades de conservação ou em uma paisagem fragmentada, foram colocados registradores de temperatura e umidade junto aos micro-hábitats, programados para realizarem 8 leituras por dia, nos seguintes horários: 06:00; 09:00; 12:00; 15:00; 18:00; 21:00; 12:00 e 03:00. Tomando como referência os locais onde os animais foram encontrados, os aparelhos foram dispostos da seguinte forma: 1 carregador da marca *Hobo* modelo UA-001-64 – para medição de temperatura – junto ao riacho; 1 carregador *Hobo* modelo U10-003 – para medição de temperatura e umidade relativa do ar – a 10 m do riacho e a 3 m de altura do solo, sobre as árvores; 1 carregador da marca *Hobo* modelo UA-001-64 – para medição de temperatura – a 20 m do riacho junto ao

solo e 1 carregador *Hobo* modelo U10-003 – para medição de temperatura e umidade relativa do ar – a 50 m do riacho e a 3 m de altura do solo, sobre as árvores.

Foram utilizados 80 registradores de temperatura e umidade relativa em 20 áreas de amostragem sendo 18 fragmentos e 2 pontos de floresta contínua, durante o período 12/2011 a 10/2013. Destes, 77 registradores foram recuperados no mês de outubro de 2013 e três foram perdidos durante uma queimada, em um dos fragmentos.

CAPÍTULO I

“Diversidade de Bactérias Cultiváveis da Microbiota
Cutânea em Populações de *P. boiei*”

Resumo

Embora o processo de colonização da pele dos anfíbios não seja conhecido, existem fortes indícios de que fatores associados à biologia das espécies e ao ambiente possam ser os seus principais elementos. A estrutura da microbiota cutânea parece ser fundamental para uma interação harmônica com o seu hospedeiro e variações nessa comunidade também devem ser consequências das condições do hábitat e dos indivíduos. Este capítulo teve como objetivo geral avaliar se a diversidade da microbiota cutânea da espécie de anfíbio *Proceratophrys boiei* apresenta variações importantes entre indivíduos, populações e contextos ambientais distintos. A riqueza e abundância de morfotipos bacterianos foram avaliadas em indivíduos capturados em diferentes remanescentes de Floresta Atlântica: desde fragmentos pequenos, com impacto evidente do uso da terra, até florestas preservadas em unidades de conservação. Relações entre variáveis abióticas, tanto no contexto do micro-hábitat como da paisagem, e a microbiota cutânea também foram avaliadas. Os resultados indicaram que a riqueza e a densidade totais de morfotipos bacterianos da microbiota cutânea de *P. boiei* varia entre indivíduos e entre populações. Os maiores valores de riqueza bacteriana foram encontrados nas populações procedentes das florestas preservadas, o que as diferenciaram dos fragmentos, porém os totais de densidade bacteriana não foram diferentes entre os dois contextos ambientais. Foram encontradas variações na dominância de morfotipos e na distribuição dos mesmos entre as populações. Variáveis abióticas atreladas aos perfis geográfico, microclimático e físico-químico dos locais de amostragem, reduzidas a componentes principais, não mostraram relações consistentes com as comunidades bacterianas de *P. boiei*, mas diferenças na densidade e riqueza bacterianas foram observadas entre adultos e juvenis. Esta pesquisa mostrou que a estrutura da microbiota cutânea de *P. boiei* apresenta variações importantes entre locais, populações e indivíduos, porém não houve evidências consistentes de que tais variações sejam relacionadas às variáveis ambientais aqui testadas, mas a características intrínsecas dos indivíduos, como a fase de vida. Contudo, o estudo indica que a qualidade do hábitat pode ser importante para a riqueza bacteriana hospedada por essa espécie. Os padrões encontrados nesta pesquisa revelam características próprias da microbiota cutânea dessa espécie que podem ser consideradas em estudos futuros sobre a saúde e a interação entre microrganismos e populações selvagens de anfíbios.

Palavras-chave: anfíbios. microbiota cutânea. populações. fragmentos florestais.

Abstract

Although the process of colonization of the skin of amphibians leading to the composition of their skin microbiota is unknown, there are strong indications that factors associated with the biology of the species and the environment can be key elements. The structure of the skin microbiota appears to be essential for a harmonic interaction with its host and variations in this community should be consequences of habitat and individual conditions. This research aimed to evaluate if the diversity of skin microbiota of the frog species *Proceratophrys boiei* presents significant variations between individuals, populations and different environmental contexts. Were evaluated the richness and abundance of bacterial morphotypes in individuals caught in different remnants of Atlantic Forest: from small fragments, with obvious impact of land use, even preserved forests in protected areas. Evaluations on the relationships between abiotic variables, both within the microhabitat as the landscape contexts, and the skin microbiota were proceeded. The results indicated that the richness and total density of bacterial morphotypes of *P. boiei* skin microbiota varies between individuals and populations. There were a largest bacterial richness in populations coming from continuous forests; however, the total bacterial density did not differ between fragments and continuous forests. The diversity index showed variations in morphotypes dominance and distribution through populations. Abiotic variables linked to geographic, microclimate and physical chemical profiles of sampling sites, reduced in main components, showed no consistent relationship with the bacterial communities of *P. boiei*, but there are differences in bacterial density and richness between adults and juveniles. This research showed that the structure of the skin microbiota *P. boiei* varies among locations, populations and individuals; however, no consistent evidence related these variations to the environmental variables tested here, but to the intrinsic characteristics of individuals, such as life stage. However, our study indicates that the quality of habitats can be important for bacterial wealth hosted by this species. Although the consequences of the found standards have not been addressed in this research, they reveal own skin microbiota characteristics of this species that may be considered in future studies on health and the interaction between microorganisms and wild amphibian populations.

Keywords: amphibians. skin microbiota. populations. forest fragments.

1. Introdução

A colonização da pele dos anfíbios

O processo pelo qual ocorre a colonização da pele dos anfíbios por microrganismos simbiossantes ainda é desconhecido. Alguns estudos indicam que a microbiota cutânea resulta da transmissão vertical durante a postura e o cuidado dos ovos (AUSTIN, 2000; WALKE *et al.*, 2011), do hábitat ocupado pelas espécies (CULP & FALKINHAM, 2007; KUENEMAN *et al.*, 2014) e, embora não existam estudos em anfíbios, é possível que também do contato entre indivíduos coespecíficos durante interações sociais, tais como o acasalamento, as interações agressivas, os agrupamentos para a hibernação ou entre as larvas em ambientes aquáticos, ou seja, por transmissão horizontal (BLETZ *et al.*, 2013).

Uma vez em contato com a pele, é provável que a habilidade de o microrganismo estabelecer populações dependerá da sua capacidade de lidar com certos fatores inerentes à biologia do animal. Dentre os fatores mais estudados estão as secreções cutâneas, compostas por moléculas bioativas que podem causar danos à integridade celular de fungos e bactérias, como peptídeos antimicrobianos secretados pelas glândulas granulosas (SIMMACO *et al.*, 1998); ou servirem de substrato energético, como mucopolissacarídeos secretados pelas glândulas mucosas (DUCKLOW & MICHELL, 1979; BRIZZI *et al.*, 2002). Pouco estudada, porém com efeitos bem evidentes, é a influência das temperaturas corpóreas e do regime termal dos micro-hábitats ocupados pelos anfíbios sobre sua microbiota cutânea (G. Vasconcelos Maia, dados não publicados). Assim, variações interespecíficas na biologia dos anfíbios devem determinar os diferentes perfis da microbiota cutânea observados entre espécies (KUENEMAN *et al.*, 2014).

Não existem estudos acerca da dinâmica populacional da comunidade residente da pele dos anfíbios, apesar de serem de grande valor para o entendimento da relação entre a comunidade e o seu hospedeiro. Sabe-se que a dinâmica populacional de comunidades microbianas do ambiente tem consequência para a produtividade do ecossistema. Essa dinâmica é influenciada por uma variedade de fatores ambientais, entre eles, a disponibilidade de água e nutrientes, a temperatura, o pH e a salinidade, entre outros parâmetros bioquímicos (ATLAS & BARTHA, 1993).

Se considerado que a microbiota ambiental contribui para a composição da microbiota cutânea, a dinâmica das populações de microrganismos do ambiente teria consequências importantes para as comunidades hospedadas pelos anfíbios. Porém, em determinadas condições experimentais essas comunidades cutâneas apresentam certa estabilidade. O trabalho de KÜNG e col. (2014) mostrou que a microbiota cutânea da espécie *Colosthetus panamansisse* se mantém estável mesmo após a aplicação direta da bactéria probiótica *Lysinibacillus fusiformis* sobre a pele. Nesse mesmo trabalho, foi observado que o tratamento atuou como um estímulo ao aumento da produção de peptídeos antimicrobianos nessa espécie, o que aumentou a eficiência da secreção contra o fungo quitrídio *Batrachochytrium dendrobatidis*.

Por outro lado, a transmissão ambiental de bactérias foi demonstrada experimentalmente por MULETZ e col. (2012). Nesse trabalho, bactérias da espécie *Janthinobacterium lividum*, que produz metabólitos antimicrobianos, foram inoculadas no solo onde eram mantidos espécimes da salamandra *Plethodon cinereus*. A transmissão ambiental dessas cepas aos indivíduos levou à colonização de *J. lividum* sobre a pele em grande abundância e, como resultado, uma significativa redução na infecção pelo fungo *B. dendrobatidis* foi observada. Porém, após o 42º dia de experimento, a bactéria não foi detectada na pele e no solo tratados, indicando que não

houve a integração de *J. lividum* à comunidade cutânea hospedada por *P. cinereus* de maneira permanente.

Diversidade microbiana

O conceito de diversidade microbiana está intimamente ligado ao entendimento da composição genética, do ambiente, da ecologia e do papel funcional dos microrganismos (HUNTER-CEVERA, 1998). A abundância microbiana é importante na relação da comunidade residente com o hospedeiro, pois pode influenciar na deflagração de doenças infecciosas e na atuação da microbiota residente contra patógenos invasores (MADIGAN *et al.*, 2009; BRUCKER *et al.*, 2008). A riqueza de espécies nas comunidades residentes na pele pode estar relacionada ao micro-hábitat ocupado pelas espécies de anfíbios. Em estudo anterior (ASSIS, 2011), verificou-se que a espécie *Proceratophrys boiei*, que ocupa o folhiço, detém um maior número de morfotipos bacterianos quando comparada a espécies arborícolas ou de áreas abertas. A composição bacteriana da microbiota cutânea pode ser determinante para a sua interação saudável com o hospedeiro. Por exemplo, espécies patogênicas de bactérias, como *Aeromonas hydrophila*, fazem parte da microbiota normal dos anfíbios (HOFF *et al.*, 1984) e, como patógenos oportunistas, aumentam suas populações em momentos de imunossupressão e infecções virais (BARRA *et al.*, 1998). Embora a microbiota dos anfíbios ainda seja pouco estudada, no homem, a importância da composição da microbiota é conhecida e sabe-se que algumas desordens fisiológicas estão associadas a perturbações da estrutura normal das comunidades simbiotes (GERRITSEN *et al.*, 2011).

Considerando a importância da estrutura das comunidades microbianas residentes sobre a pele dos anfíbios e possíveis variações entre locais ou populações, dado o contexto ambiental que os animais ocupam, este capítulo teve como objetivo geral o estudo da diversidade bacteriana da pele de diferentes indivíduos e populações

de *P. boiei*, localizados em fragmentos florestais e florestas preservadas de Mata Atlântica. Foi considerada a hipótese: A abundância e riqueza bacterianas da microbiota cutânea de *P. boiei* variam entre populações e possuem relação com variáveis ambientais, tanto no nível do micro-habitat quanto no nível da paisagem.

2. Materiais e Métodos

Para esta abordagem, apenas as bactérias cultiváveis foram utilizadas, pois tal escolha, permitiu a análise imediata da diversidade e a realização dos experimentos tratados no capítulo 2.

Estimativas de densidade e riqueza microbianas

Para a estimativa da densidade bacteriana por indivíduo foram seguidas as recomendações do método padrão “contagem de placa heterotrófica” (CPH), utilizado comumente para estimar o número de bactérias heterotróficas vivas, coletadas em corpos de água. Uma colônia que surge a partir da proliferação de uma única célula bacteriana é denominada Unidade Formadora de Colônia – UFC (MADIGAN *et al.*, 2009) e essa nomenclatura será utilizada no decorrer deste trabalho. Na contagem de UFCs foram consideradas todas as unidades visualizadas com o auxílio de lupa e em aparelho contador de colônia (*Quimis®*). A quantidade de UFC/mL foi determinada pela fórmula: $100 \times \text{UFC} / 0,1$; em que 100 é o fator de diluição, UFC é o número total de colônias visualizadas e 0,1 é a correção do volume em mL (EATON *et al.*, 1995). A média de cada triplicata de amostra foi considerada.

As riquezas de morfotipos bacterianos foram estimadas para cada indivíduo e isoladamente para cada fragmento. Assim, indivíduos de fragmentos diferentes podem apresentar o mesmo morfotipo, mas receberam identificações distintas, pois a cada novo local de amostragem novas identificações e isolamento de morfotipos eram feitos. Para

a estimativa da riqueza bacteriana da microbiota cutânea de *P. boiei* as colônias de bactérias foram caracterizadas de acordo com formato, cor, borda, textura, brilho e diâmetro (EATON *et al.*, 1995; OGRAM & FENG, 1997) e demais características exclusivas de cada tipo de colônia. Foi denominado morfotipo uma colônia representante de um grupo de colônias com as mesmas características morfológicas. Cada morfotipo foi isolado pelo método de esgotamento em placa contendo meio de cultivo R2A estéril.

Análises

O teste de Kruskal-Wallis (H) foi utilizado para as comparações entre comunidades microbianas, no que se refere à densidade de unidades formadoras de colônias (UFC) e riqueza de morfotipos bacterianos. O teste de Dunn serviu às comparações das densidades entre pares de locais. Mann-Whitney (W) foi usado para a comparação entre duas amostras, seja em relação à densidade ou riqueza. A diversidade alfa foi avaliada para quantificar e representar a variação de morfotipos entre as comunidades cutâneas. Para esta abordagem foi utilizado o programa *PAST* (HAMMER *et al.*, 2001) e os seguintes parâmetros:

Índice de Shannon (H') – é uma medida do grau de incerteza em prever a que espécie (nesta seção, morfotipo) pertenceria um indivíduo (nesta seção, colônia bacteriana) se o mesmo fosse retirado aleatoriamente de uma população. Esse índice é sensível às variações nas abundâncias, considerando que tanto as espécies mais comuns quanto as raras têm o mesmo peso (ODUM, 1988). Quanto maior o valor do índice maior é a diversidade.

Índice de Simpson – é uma medida de *Dominância (D)* que mede a probabilidade de dois indivíduos, que sejam retirados aleatoriamente de uma comunidade, pertencerem à mesma espécie. Esse índice dá mais peso às espécies mais

comuns e pouco peso às espécies raras, de modo que as variações nas distribuições das abundâncias são melhor representadas (ODUM, 1988). Para que Simpson seja considerado uma medida de diversidade esse índice é expresso como $1/D$, tal como o utilizamos neste trabalho. Ele varia de 0 a 1: quanto mais próximo ao 1 menor a chance de que os dois indivíduos pertençam à mesma espécie e, portanto, maior a diversidade.

Equitabilidade (J) – expressa a uniformidade da distribuição de indivíduos entre as espécies existentes na comunidade (GOTELLI, 2009). A medida varia entre 0 e 1, em que o 1 corresponde à máxima diversidade, quando todas as espécies são igualmente abundantes (SMITH & WILSON, 1996).

As relações entre variáveis bióticas ou entre estas e as variáveis ambientais foram investigadas através do índice de correlação de Spearman (ρ) devido à natureza dos dados bióticos. Para a análise dos dados ambientais optamos inicialmente por reduzir a variação ambiental a componentes principais, variáveis complexas, entretanto sintéticas; posteriormente verificamos a relação entre essas variáveis e o perfil microbiano observado nos locais de amostragem. As análises de componentes principais foram executadas no programa estatístico SPSS 21, usando uma rotação Varimax e considerando só os componentes com autovalores superiores a 1. A relação entre os componentes principais e as variáveis: densidade e riqueza bacterianas da microbiota cutânea de *P. boiei* foi avaliada, utilizando-se o índice de correlação de Spearman.

A análise de agrupamento foi realizada para a visualização das relações entre os locais de amostragem, de acordo com as variáveis de diversidade microbiana: densidade e riqueza. Essa análise foi baseada na distância euclidiana, com o método de ligação centroide e 90% de similaridade e, assim como as análises de Kruskal-Wallis (H), Mann-Whitney (W), Dunn e as correlações de Spearman, também ela foi executada no programa *Minitab*® 17.

3. Resultados

Densidade bacteriana

Foram amostrados 202 espécimes de *P. boiei* procedentes de 17 locais. A densidade média total de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) amostradas na pele de *P. boiei* foi: $1,5 \times 10^5$ UFC/mL (desvio-padrão= 96,9), com intervalo e confiança de 136,7 e 165,3. Usando um nível de significância de 0,05, o teste de Anderson-Darling (A-quadrado = 4,97, p-valor = 0,005) indica que os dados de densidade bacteriana não seguem uma distribuição normal (Figura 1).

Figura 1. Distribuição de frequências dos valores de densidade bacteriana encontrados em 17 locais de amostragem (barras pretas) da microbiota cutânea de *P. boiei*.

Foram observadas variações entre os valores de densidade entre os indivíduos: de $3,66 \times 10^3$ UFC/mL e a maioria dos indivíduos apresentou valores de densidade entre $7,66 \times 10^4$ e $2,42 \times 10^5$ UFC/mL (Figura 2). As densidades bacterianas cutâneas distinguiram-se entre os fragmentos florestais amostrados ($H = 50,63$, $gl = 14$, $p\text{-valor} < 0,001$; Kruskal-Wallis). Os maiores valores de densidade bacteriana cutânea foram encontrados nos fragmentos Saad ($2,65 \times 10^5$ UFC/mL) e Sidney ($2,63 \times 10^5$ UFC/mL), seguidos dos fragmentos Fonte da Liberdade ($2,08 \times 10^5$ UFC/mL), Ditão ($1,96 \times 10^5$

UFC/mL) e João Leite ($1,64 \times 10^5$ UFC/mL). As menores densidades bacterianas foram encontradas nos fragmentos Rancho do Mato, Diolga e Irene, que apresentaram $9,39 \times 10^1$, $9,3 \times 10^1$ e $8,06 \times 10^1$ UFC/mL, respectivamente (Figura 5).

Figura 5. Boxplot da distribuição dos valores de densidade bacteriana da pele de machos da espécie *P. boiei* para cada local amostrado. O traço central representa o valor da mediana; os limites superiores e inferiores correspondem aos valores máximos e mínimos, respectivamente; as barras cinzas correspondem à distribuição de 50% dos valores de densidade e os asteriscos representam *outliers*.

A análise entre pares de fragmentos revelou que Saad e Sidney destacam-se, pois, são os fragmentos que se distinguem da maioria dos demais. Saad, Sidney e Ditão foram os únicos fragmentos que apresentaram diferença em relação às densidades bacterianas dos indivíduos procedentes das florestas de Cunha (p-valor = 0,001 e 0,017, respectivamente) e Santa Virgínia (p-valor = 0,001, 0,002 e 0,045, respectivamente), unidades do Parque Estadual Serra do Mar (PESM). Não foi observada diferença entre

estas unidades e os demais fragmentos, o que explica o resultado geral encontrado para a comparação das densidades entre fragmentos e florestas preservadas ($W = 14,604$, $p\text{-valor} = 0,337$; Mann-Whitney). As densidades bacterianas dos indivíduos procedentes das duas unidades do Parque Estadual são similares ($W = 84,0$, $p\text{-valor} = 0,591$; Mann-Whitney).

Riqueza bacteriana

Foram identificados 517 morfotipos de colônias bacterianas, considerando-se todas as amostras. É importante destacar que a identificação dos morfotipos foi independente entre os locais de amostragem. A média de morfotipos por indivíduo foi: Saad, 22; Sidney, 14; Fonte, 22; Ditão, 16; João, 19; PESM – Cunha, 28; Pimenta, 20; Embaúba, 16; G4, 31; Benedita, 18; Gonzaga, 15; PESM – Santa Virgínia, 30; Pantheon, 13; Diolga, 11; Rancho, 14; Ditinha, 16; Irene, 13.

As maiores riquezas de morfotipos foram encontradas nas microbiotas de animais procedentes das áreas de florestas preservadas do PESM – Núcleos de Santa Virgínia e Cunha, nas quais foram identificados 69 e 59 morfotipos, respectivamente. As comunidades desses Núcleos diferiram-se em relação àquelas dos fragmentos quanto ao número de morfotipos por indivíduo ($W = 2,074$, $p\text{-valor} = 0,004$; Mann-Whitney). Nas amostras dos fragmentos as riquezas variaram de um total de 48 morfotipos em Benedita a 14 morfotipos nos fragmentos Pantheon e Diolga, sendo observada diferença significativa entre todos os locais ($H=86,9$, $gl = 17$, $p\text{-valor} < 0,000$; Mann-Whitney). O gráfico Boxplot a seguir ilustra os totais e a distribuição das riquezas de morfotipos identificados em cada local de amostragem (Figura 6).

Figura 6. Boxplot da distribuição das riquezas de morfotipos bacterianos da pele indivíduos de *P. boiei* em cada local amostrado. Acima, o número total de morfotipos identificados por local de amostragem. O traço central representa o valor da mediana; limites superiores e inferiores correspondem aos valores máximos e mínimos, respectivamente; as barras cinzas correspondem à distribuição de 50% dos valores de densidade e os asteriscos representam *outliers*.

A distribuição da riqueza de morfotipos bacterianos variou entre os indivíduos em cada local de amostragem e apresentou diferentes tendências entre estes. Por exemplo, enquanto no fragmento Fonte da liberdade 87% dos indivíduos possuem 100% dos morfotipos identificados nesse local, no fragmento G4 apenas 11% dos indivíduos apresentam 100% dos morfotipos ali identificados. O fragmento onde houve o maior fracionamento na distribuição dos percentuais de morfotipos foi Gonzaga, por exemplo, 3% dos indivíduos com apenas 10% dos morfotipos (Figura 7).

Figura 7. A figura representa a distribuição dos diferentes percentuais de morfotipos entre os indivíduos de cada local amostrado. Por exemplo, a porção laranja do gráfico correspondente ao fragmento Embaúba mostra que 61% dos indivíduos abrigam 100% dos morfotipos identificados nesse local e 39% dos indivíduos abrigam 80% dos morfotipos (em amarelo).

As abundâncias de morfotipos variaram entre os indivíduos de um mesmo local ($p\text{-valor} < 0,000$; Kruskal-Wallis). Esse mesmo valor de significância foi observado em todos os locais de amostragem, com exceção dos fragmentos Irene ($p\text{-valor} = 0,645$; Kruskal-Wallis) e Diolga ($p\text{-valor} = 0,148$; Kruskal-Wallis), onde apenas 3 e 4 indivíduos foram capturados, respectivamente. Uma vez que a distribuição de morfotipos entre os indivíduos mostrou heterogeneidade, a diversidade alfa dessas comunidades foi investigada. Para essa abordagem foram utilizados os índices de diversidade de Shannon (H'), Simpson ($1-D$) e Dominância (D), além da Equabilidade (J). A diversidade de Shannon apresentou uma amplitude entre 2,04 e 3,73; a de Simpson foi de 0,75 a 0,96; o índice de dominância variou entre 0,03 e 0,24 e para os valores de Equabilidade a variação foi de 0,70 e 0,95.

O índice de Simpson mostrou que a microbiota cutânea de *P. boiei* apresenta altos valores de diversidade, pois na maioria dos locais os valores estiveram acima de 0,8. Diversidade acima de 0,75 e variação entre os locais foram observados no índice de Shannon. Os resultados do índice D foram relativamente baixos, mostrando que existe pouca dominância de morfotipos e, ao mesmo tempo, os resultados opostos mostrados no índice J indicam certa uniformidade na distribuição dos morfotipos nos indivíduos, com valores acima de 0,8 para a maioria dos locais. Com exceção do fragmento Irene, que possui um número reduzido de amostras, as duas unidades do PESH: Santa Virgínia e Cunha possuem os maiores valores de Equabilidade e as maiores diversidades. Apesar de Ditinha e Bendita possuírem as maiores riquezas de morfotipos (48 e 41 morfotipos, respectivamente), esses fragmentos apresentaram os valores mais baixos de Equabilidade. G4 foi o fragmento com melhor diversidade de morfotipos, apresentou os mais altos valores nos índices de Shannon e Simpson, além dos mais baixos valores de D e mais altos valores de J (figura 8).

Figura 8. Índices de Diversidade e Equitabilidade de morfotipos nos locais: 1. PESM – Cunha; 2. PESM – Santa Virgínia; 3. G4; 4. Gonzaga; 5. Irene; 6. Ditão; 7. Sidney; 8. Saad Cachoeira; 9. Pimenta; 10. Ditinha; 11. Rancho do Mato; 12. Diolga; 13. Benedita; 14. João Leite; 15. Embaúba; 16. Pantheon; 17. Fonte da Liberdade.

Relação entre densidade e riqueza bacterianas

Uma maior densidade poderia ser explicada por uma maior riqueza bacteriana, portanto, para investigar essa relação o coeficiente correlação de Spearman foi aplicado. O resultado dessa análise revelou que existe uma fraca relação linear entre densidade e riqueza bacterianas na microbiota cutânea de *P. boiei*. A média dos valores dessas variáveis para cada local foi utilizada (Figura 7).

Figura 7. Correlação entre densidade e riqueza na microbiota cutânea de *P. boiei*.

Variáveis ambientais

Para a redução das variáveis ambientais a componentes principais, primeiramente, optou-se por eliminar locais de amostragem ou substituir os valores faltantes pela média dos valores obtidos. Até uma variável ausente por local foi substituída pela média de todos os locais. Dessa análise integrada, eliminaram-se os dados de locais com duas ou mais variáveis ausentes, a saber, os fragmentos: Fonte da Liberdade, Saad Cachoeira e Embaúba. Duas variáveis foram eliminadas da presente análise: temperatura corpórea e média de temperatura de incubação das amostras de comunidades microbianas, que estão apresentadas nas seções seguintes. A base de

dados foi constituída por variáveis atreladas ao perfil geográfico, microclimático e físico-químico dos remanescentes amostrados (Tabela 4).

Tabela 4: Variáveis descritivas compiladas para análise de dados: perfil geográfico, perfil microclimático e físico-químico da água.

ABREVIACÃO	DESCRIÇÃO	UNIDADE
AREA	Área	m ²
PERI	Perímetro	m
DISTFR	Distância do fragmento mais próximo	m
DISTOC	Distância da ocupação humana mais próxima	m
TSOLMIC	Média das temperaturas do solo	°C
TMAXMIC	Média das temperaturas máximas	°C
TMINMIC	Média das temperaturas mínimas	°C
TMEDMIC	Média das temperaturas médias	°C
TAMPMIC	Média das amplitudes de temperatura	°C
TMMAX	Temperatura máxima das máximas	°C
TMMIN	Temperatura mínima das mínimas	°C
URMINMIC	Média das umidades relativas mínimas	%
URMEDMIC	Média das umidades relativas	%
URAMPMIC	Média das amplitudes de umidade relativa.	%
PHAG	pH da água	pH
TAG	Temperatura da água	°C
DOAG1	Oxigênio dissolvido	mg/mL
CONDAG	Condutividade da água	µS/cm ²
TDSAG	Totais de sólidos dissolvidos	mg/mL
SALAG	Salinidade da água	°/00

Se consideradas todas as variáveis de caráter ecológico, inclusive as que descrevem fragmentos da perspectiva da paisagem, os locais de amostragem podem ser caracterizados por 6 componentes independentes. Alguns componentes são claramente associados a grupos de variáveis correlacionadas e de natureza similar, enquanto que outros sinalizam possíveis interações não consideradas *a priori*. Esses componentes

descrevem de maneira integrativa as características ambientais dos remanescentes de Mata Atlântica analisados (Tabela 5).

Tabela 5. Componentes principais descrevendo o perfil dos fragmentos analisados. Coeficientes com valores altos dentro dos componentes são sinalizados para a fácil visualização de sua relação com as variáveis testadas. Os componentes selecionados foram principalmente influenciados por 1) variabilidade termal e hídrica; 2) dimensões do remanescente e mínimos de temperaturas; 3) perfil físico-químico da água; 4) isolamento do fragmento e temperatura do solo; 5) salinidade da água e 6) distância da ocupação humana. Os coeficientes maiores para cada componente aparecem sombreados para melhor visualização.

VARIÁVEIS	PCA 1	PCA 2	PCA 3	PCA 4	PCA 5	PCA 6
AREA	0,046	-0,807	0,226	0,415	-0,062	0,228
PERI	0,078	-0,776	0,122	0,548	0,008	0,084
DISTF	-0,225	0,122	0,035	-0,79	-0,031	0,179
DISTO	0,149	-0,013	-0,064	0,275	-0,18	-0,861
TSOLMIC	0,433	0,141	-0,022	-0,832	-0,174	0,102
TMAXMIC	0,941	0,024	0,053	0,039	0,056	0,128
TMINMIC	-0,452	0,751	-0,047	0,102	-0,232	0,369
TMEDMIC	0,372	0,815	-0,031	-0,229	-0,114	0,332
TAMPMIC	0,893	-0,344	0,061	-0,026	0,145	-0,087
TMMAX	0,855	0,143	-0,053	0,395	-0,069	0,089
TMMIN	-0,294	0,794	0,119	0,257	0,07	0,021
URMINMIC	-0,831	0,122	0,071	0,139	0,133	0,433
URMEDMIC	-0,627	-0,216	0,034	0,342	0,48	-0,104
URAMPMIC	0,831	-0,122	-0,071	-0,14	-0,132	-0,433
PHAG	0,073	0,282	-0,856	-0,045	-0,281	-0,142
TAG	0,038	0,674	0,256	-0,192	-0,423	-0,109
DOAG1	0,012	-0,1	-0,912	0,005	0,027	0,07
CONDAG	0,079	0,593	0,577	-0,032	0,498	0,122
TDSAG	0,081	0,569	0,595	-0,017	0,502	0,132
SALAG	-0,067	-0,101	0,258	0,085	0,884	0,159

Obs.: Os maiores coeficientes para cada componente aparecem sombreados para melhor visualização.

Não foi observada correlação entre os fatores isolados da análise de componentes e as variáveis microbianas: riqueza, abundância, média de morfotipos e

diversidade de Shannon (p-valor >0,067; Spearman). Uma vez que o objetivo desta pesquisa envolve o impacto do contexto ambiental sobre as comunidades microbianas cutâneas de *P. boiei*, cabe perguntar também se as variáveis ambientais medidas guardam relação com as variáveis dos fragmentos estudados: área, perímetro, grau de isolamento e contato com ocupação humana. Afinal, é possível que variáveis diretamente associadas às comunidades microbianas tenham maior efeito que variáveis da paisagem. Por isso, foram explorados componentes principais apenas a partir das variáveis microambientais (Tabela 6).

Tabela 6. Componentes principais descrevendo o perfil ambiental dos fragmentos analisados com base nas propriedades físico-químicas e microclimáticas.

VARIÁVEIS	PC1	PC2	PC3	PC4
TSOLMIC	0,516	0,352	0,245	-0,491
TMAXMIC	0,797	0,365	-0,229	0,299
TMINMIC	-0,611	0,489	0,564	0,138
TMEDMIC	0,157	0,843	0,409	0,135
TAMPMIC	0,868	0,028	-0,432	0,143
TMMAX	0,679	0,329	-0,083	0,502
TMMIN	-0,528	0,563	0,199	0,351
URMINMIC	-0,92	-0,062	0,054	0,068
URMEDMIC	-0,656	-0,389	-0,365	0,244
URAMPMIC	0,92	0,063	-0,055	-0,068
PHAG	0,237	-0,161	0,796	0,36
TAG	-0,033	0,671	0,443	-0,294
DOAG1	0,173	-0,448	0,51	0,413
CONDAG	-0,284	0,819	-0,421	0,023
TDSAG	-0,285	0,81	-0,446	0,024
SALAG	-0,299	0,087	-0,751	0,234

A variável perímetro ($r = -0,576$, p-valor = 0,031; Pearson) mostrou correlação com o segundo componente dessa análise, porém a variável área apresentou apenas uma tendência à correlação ($r = -0,531$, p-valor = 0,051; Pearson). Foi considerado que essas

relações poderiam ser moduladas exclusivamente pelo impacto dos dois pontos de florestas contínuas que possuem as menores médias de temperatura. Portanto, em uma análise seguinte as duas áreas contínuas foram excluídas para testar se características dos fragmentos guardam relação com os parâmetros medidos, integrados nos componentes principais, de natureza microclimática e físico-química. Nessa análise não foi observada relação entre as variáveis perímetro ($r = -0,047$, $p\text{-valor} = 0,886$; Pearson) e área ($r = 0,127$, $p\text{-valor} = 0,694$; Pearson) e o segundo componente, como não foi observada relação com os demais componentes ($p\text{-valor} > 0,183$; Pearson) e demais variáveis dos fragmentos, como DISTF ($p\text{-valor} > 0,125$; Pearson) e DISTO ($p\text{-valor} > 0,362$; Pearson). Não foi observada relação entre as variáveis microbianas: riqueza, abundância e diversidade (Shannon) e os fatores isolados na análise de componentes ($p\text{-valor} > 0,067$, em todos os casos; Spearman).

Similaridade com base nas distâncias entre locais

A similaridade entre os pontos amostrais foi observada através de um dendrograma construído com os dados de densidade e riqueza bacterianas. Para essa abordagem foi utilizada uma análise de agrupamento baseada na distância euclidiana, com método de ligação centroide, assim como padronização das variáveis, e 90% de similaridade. A observação dos dendrogramas permite a melhor visualização dos agrupamentos de populações de *P. boiei* em termos da diversidade bacteriana de sua microbiota cutânea. Foram detectados quatro grandes agrupamentos com 85,9%, 70,9%, 64,1% e 88% de similaridade, respectivamente da esquerda para a direita. Os locais de florestas preservadas do Parque Estadual, núcleos de Cunha e Santa Virgínia formam juntos com o fragmento G4 o último agrupamento de 88% de similaridade. Os maiores percentuais de similaridade foram observados entre as duplas de fragmentos João Leite

e Pimenta (95,1%) e Rancho do Mato e Pantheon (94,9 %). Sidney e Saad apresentaram os menores valores de similaridade (64,1%), no entanto constituíram um grupo à parte dos demais locais (Figura 8).

Figura 8. Análise de agrupamento. Dendrograma dos locais de amostragem, construído a partir dos valores de densidade e riqueza, baseado na distância euclidiana, com o nível de similaridade de 90%.

Uma análise das distâncias entre os pontos de amostragem também foi realizada pelo método de agrupamento, com base nas latitudes e longitudes dos pontos de coleta dos espécimes de *P. boiei*. Para a construção da matriz de similaridade foi utilizada a distância euclidiana e o método de ligação centroide, com um nível de similaridade de 90%. Dessa maneira, foi possível agrupar os locais de amostragem de acordo com as distâncias entre os mesmos (Figura 9).

Figura 9. Análise de agrupamento. Dendrograma dos pontos amostrais, construído a partir dos valores de latitude e longitude (graus decimais), baseado na distância euclidiana, com o nível de similaridade de 90%.

Uma comparação entre os grupos, formados a partir das variáveis de diversidade bacteriana e as distâncias entre as procedências das amostras, mostra pouca relação entre os padrões observados nas comunidades microbianas e a distribuição espacial dos remanescentes. Alguns grupos mostram apenas pouca evidência da influência do local: as duas unidades do Parque Estadual que se agrupam separadamente dos demais locais em ambas as análises; os fragmentos Diolga, Rancho do Mato, Pantheon e Irene, que também se encontram agrupados em ambas as análises.

Efeitos da amostragem

Temperatura de incubação

Para as estimativas de densidade e riqueza bacterianas as amostras das comunidades microbianas de *P. boiei* foram incubadas à temperatura ambiente do campo. Porém, não houve correlação entre as temperaturas aferidas, que variaram entre 21,5°C e 34°C, e os valores de densidade ($\rho = 0,016$, p-valor = 0,879; Spearman) e riqueza bacteriana ($\rho = 0,149$, p-valor = 0,166; Spearman), como mostram os gráficos (Figura 10).

Figura 10. Correlações entre as temperaturas de incubação e a densidade (A) e riqueza (B) bacterianas das amostras de microbiota cutânea de *P. boiei*.

Tamanho corpóreo, sexo e fase de vida

Não foi observada correlação entre o tamanho dos indivíduos, ou seja, o comprimento rostro-cloacal (CRC), e os valores de densidade ($\rho = 0,024$, p-valor = 0,755; Spearman) e riqueza ($\rho = -0,025$, p-valor = 0,738; Spearman) de bactérias cutâneas.

A espécie *P. boiei* apresenta dimorfismo sexual no qual as fêmeas têm maior tamanho que os machos. Nessa análise a distinção entre machos e fêmeas foi feita pelo CRC, pelas observações realizadas em campo, ou seja, da atividade vocal e reprodutiva, e pelos dados disponíveis na literatura, de acordo com o quais machos possuem entre

39,8 mm e 61,9 mm e fêmeas 40,0 mm e 74,3 mm de CRC (PRADO & POMBAL, 2008). Os indivíduos capturados que não executavam comportamentos típicos da atividade reprodutiva, no momento da coleta, e possuíam CRC entre 13 mm e 38 mm foram considerados juvenis. Dois indivíduos foram excluídos da análise por possuírem CRC 31 mm e 32 mm e apresentarem atividade vocal. Foi observada diferença entre as densidades bacterianas se considerarmos o sexo e a fase de vida dos indivíduos ($H = 7,21$, $gl = 2$, $p\text{-valor} = 0,027$; Kruskal-Wallis), porém não foi observada diferença entre as riquezas bacterianas nos mesmos grupos ($H = 1,58$, $gl = 2$, $p\text{-valor} = 0,454$; Kruskal-Wallis). O resultado para as densidades é explicado pela diferença entre machos e juvenis ($p\text{-valor} = 0,022$, Mann-Whitney) e entre fêmeas e juvenis ($p\text{-valor} = 0,017$, Mann-Whitney). Não foi observada diferença nas densidades bacterianas entre machos e fêmeas ($p\text{-valor} = 0,257$, Mann-Whitney).

A análise do CRC foi realizada para verificar as diferenças entre machos, fêmeas e juvenis relacionadas ao comprimento dos indivíduos. O resultado mostrou que existe diferença de densidade e riqueza bacteriana entre os grupos, se considerado o CRC ($H = 64,15$, $g = 2$, $p\text{-valor} < 0,000$; Kruskal-Wallis) e que tal diferença pode ser observada entre machos e juvenis ($p\text{-valor} < 0,000$, Mann-Whitney), fêmeas e juvenis ($p\text{-valor} < 0,000$, Mann-Whitney) e machos e fêmeas ($p\text{-valor} < 0,000$, Mann-Whitney), Figura 11.

Figura 11. Correlações entre o tamanho corpóreo e a densidade bacteriana da microbiota cutânea de *P. boiei*, para fêmeas e machos adultos e juvenis.

Estação de amostragem

A amostragem de bactérias cutâneas foi realizada durante as estações reprodutivas em dois anos consecutivos. Uma análise comparativa entre as duas estações foi feita para investigar se existem diferenças, detectáveis a partir da porção cultivável da microbiota cutânea de *P. boiei*, entre as mesmas. Para essa análise, os locais e meses em que foram capturados os indivíduos foram agrupados por estação reprodutiva: *Estação reprodutiva 1* – Dezembro (2011) a Março (2012): Pimenta, Pantheon, Sidney, Rancho do Mato, Irene, Gonzaga, Ditinha, Benedita, Diolga, Ditão, Núcleo de Cunha e Núcleo de Santa Virgínia. *Estação reprodutiva 2* – Outubro (2012) a Fevereiro (2013): Saad, Fonte, João Leite, Embaúba, Ditão, Ditinha, Benedita, Núcleo de Cunha e Núcleo de Santa Virgínia.

Foi observada diferença entre as densidades bacterianas (p -valor = 0,005, Mann-Whitney), sendo observados na estação 2 os maiores valores. Porém, não foi observada diferença nas riquezas de morfotipos entre as estações 1 e 2 (p -valor = 0,013, Mann-Whitney).

4. Discussão e conclusões

Diversidade microbiana

Foi demonstrado que os valores de densidade bacteriana total em *P. boiei* são bastante variáveis, mesmo dentro de um grupo de indivíduos oriundo de um mesmo local. Considerando que a maioria foi capturada no mesmo intervalo de tempo e no mesmo ponto amostral durante atividade reprodutiva, é razoável sugerir que características intrínsecas dos animais possam determinar tal variação. Neste trabalho apenas a microbiota residente foi amostrada, ou seja, aquela que estabelece populações sobre a pele e para a qual não é esperada uma ocupação transitória desse microambiente (BLACK, 1999). Dessa forma, a variação nas densidades não poderia ser explicada apenas por mudanças bruscas devido ao contato com diferentes micro-habitats. Uma evidência que sustenta essa afirmação é a existência de uma resistência da microbiota cutânea à colonização por novos microrganismos (KÜNG *et al.*, 2014).

Dados na literatura acerca das abundâncias naturais de bactérias residentes (porção cultivável) sobre a pele de espécies de anfíbios são raros e as metodologias variadas, portanto, não é possível comparar os padrões encontrados na microbiota cutânea de *P. boiei* com outras espécies. Porém, sabe-se que a redução da densidade total de bactérias da microbiota cutânea, após tratamento com antibióticos, afeta a produção de peptídeos antimicrobianos e, por consequência, aumenta a susceptibilidade a infecções (MANGONI *et al.*, 2001). Em situação contrária, a integridade da microbiota cutânea fornece resistência a doenças como a quitridiomicose (BECKER & HARRIS, 2010). Além disso, flutuações na densidade total de bactérias ocorrem com certa periodicidade devido à troca do estrato córneo da pele dos anfíbios, com um aumento expressivo na densidade total de unidades formadoras de colônias dias antes da troca e uma drástica diminuição posterior a esse processo (MEYER *et al.*, 2012).

A amplitude de variação no número total de morfotipos por indivíduo entre 1 e 12, considerando todos os locais amostrados, é inferior à encontrada em *Plethodon cinereus*, que apresenta variação entre 4 e 19 morfotipos (LAUER *et al.*, 2007), e também àquela apresentada pela salamandra *Hemidactylium scutatum*, entre 1 e 21 morfotipos por indivíduo (LAUER *et al.*, 2008). *P. boiei* apresenta as maiores médias de morfotipos por indivíduo, ou seja, entre 13 e 31, a depender do local de amostragem, em comparação com a espécie de salamandra *P. cinereus*, que possui em média entre 4,1 e 4,5 morfotipos por indivíduos (AUSTIN, 2000). Em três espécies de *Atelopus* o número total de morfotipos isolados foi igual a duas localidades amostradas neste trabalho: *Atelopus elegans* e *A. spurrelli* (40 e 23 morfotipos, respectivamente); porém, a riqueza foi inferior à espécie *Atelopus* aff. *limosus* (85 morfotipos) em relação à maior riqueza encontrada em *P. boiei*, neste trabalho, 69 morfotipos (FLECHAS *et al.*, 2012). No entanto, em *P. boiei* a distribuição da riqueza de morfotipos não é uniforme: em 8 localidades menos de 50% dos indivíduos possuíam todos os morfotipos identificados; em 6 localidades mais de 50% dos indivíduos apresentaram todos os morfotipos e em 3 localidades exatamente a metade dos indivíduos possuíam 100% dos morfotipos.

A riqueza e o percentual de morfotipos bacterianos sobre a pele de anfíbios têm implicações na resistência das populações às doenças infecciosas. Já foi demonstrado que a presença de bactérias produtoras de metabólitos antimicrobianos, em um determinado percentual de indivíduos de uma população, pode ser decisiva para a ocorrência ou não de uma epidemia causada pelo fungo *B. dendrobatidis* (WOODHAMS *et al.*, 2007). Segundo esse pressuposto, apenas certa fração de indivíduos deve abrigar bactérias inibidoras sobre a pele para que uma doença não se espalhe na população (CRUSE & LEWIS, 2004). Uma consequência da variação na distribuição da riqueza de morfotipos poderia ser a perda desse percentual de bactérias protetoras.

Assim como a riqueza, a abundância de morfotipos na pele de *P. boiei* varia entre indivíduos e entre locais. Mesmo que os valores de dominância tenham sido baixos e a uniformidade na distribuição de morfotipos alta, foi possível observar que alguns poucos morfotipos se destacam dos demais por possuírem altas abundâncias relativas em todos os indivíduos de um mesmo local (Figura 1, Anexos). Já foi demonstrado que maiores abundâncias de determinados tipos de bactéria sobre a pele de anfíbios podem aumentar a proteção dos indivíduos contra agentes patogênicos (MULETZ *et al.*, 2012). Porém, esses tratamentos devem levar em consideração a resistência à colonização e os custos das respostas imunológicas mediante a bioaugmentação (KÜNG *et al.*, 2014). A preservação e a manutenção da dinâmica populacional de comunidades dérmicas bem estabelecidas pode ser a melhor alternativa para o entendimento e desenvolvimento de estratégias para a prevenção e combate às infecções. No entanto, informações sobre as abundâncias das populações dessas comunidades são escassas, sendo este estudo inédito para o contexto brasileiro.

A preservação das proporções bacterianas originais da microbiota cutânea dos anfíbios deve ser fundamental à manutenção da estrutura dessas comunidades, assim como para as interações com seu hospedeiro. Sabe-se, por exemplo, que espécies de bactérias oportunistas, como *Aeromonas hydrophila*, são comumente encontradas na microbiota cutânea de anfíbios (BARRA *et al.*, 1998; CULP & FALKINHAM, 2007). Nesses casos, as baixas abundâncias devem contribuir para a manutenção de uma relação saudável entre a comunidade e o seu hospedeiro. A importância da estrutura das comunidades microbianas é demonstrada no trabalho de Küng e colaboradores (2014), que observaram resistência da microbiota cutânea do sapo *Colostethus panamansis* à colonização experimental pela bactéria *Lysinibacillus fusiformis*. Ao mesmo tempo, as variações interindividuais ou populacionais nas características da secreção (BRUCKER *et*

al., 2008) devem afetar as abundâncias de bactérias sobre a pele do anfíbio, pois já foi demonstrado o efeito de componentes da secreção dérmica sobre sua própria microbiota cutânea (ASSIS *et al.*, submetido). Esse sinergismo deve desempenhar um papel importante na prevenção da colonização de bactérias estrangeiras (MYERS *et al.*, 2012).

A diferença nas densidades bacterianas observadas entre adultos e juvenis não deve ser interpretada apenas pela diferença de tamanho dos indivíduos, pois não existe diferença entre machos e fêmeas que também se distinguem pelo tamanho corpóreo. Uma vez descartados os vieses metodológicos e o contexto ambiental, pois esses juvenis foram capturados nas mesmas localidades dos adultos, é possível propor que características ontogenéticas devem explicar a diferença observada. Esse resultado corrobora o trabalho de KUENEMAN e col. (2014), que observaram diferenças na composição da comunidade microbiana entre as fases de girino e pós-metamórficas em *Rana cascadae*.

Microbiota & Ambiente

Variações na riqueza e abundância bacterianas da microbiota cutânea de *P. boiei*, observada entre os locais de amostragem, indicam que essa comunidade é afetada pelo contexto ambiental onde vivem os animais, mesmo se a variação interindividual for considerada. Neste trabalho análises baseadas nos componentes principais não mostram influência direta das características ambientais consideradas sobre a riqueza e a abundância bacteriana da pele de *P. boiei*. Porém, é possível que existam relações indiretas ou complexas entre as características do ambiente e o perfil microbiano da pele dos anuros que o habitam. Tal resultado favorece explicações no mínimo parciais atreladas ao perfil químico e nutricional da pele dos indivíduos, de variação físico-química perceptível em escalas compatíveis com o tamanho dos indivíduos e não representadas na escala de medição usada nas variáveis ecológicas aqui tratadas ou,

ainda, uma função das duas. Assim, esse resultado favorece a hipótese de especificidade do microambiente pele, em lugar de eleger a hipótese alternativa de filtro induzido pela variação ambiental. Esse resultado é corroborado pelo trabalho de KONOPKA (2009) que afirma que comunidades microbianas devem ser definidas por características físico-químicas do microambiente ocupado, considerando inadequada a perspectiva em macroescala para o estudo dessas comunidades.

É possível que haja contato entre os grupos situados em fragmentos florestais muito próximos, mas não entre os fragmentos mais distantes. Além das limitações postas pela capacidade de dispersão, o Rio Paraitinga serve de barreira geográfica: os fragmentos florestais Ditinha, Gonzaga e G4 estão no lado oposto do rio em relação aos demais fragmentos. Contudo, não foi observada uma relação entre a distância dos fragmentos florestais ou grupos populacionais e a diversidade da microbiota cutânea de *P. boiei*, representada aqui pela abundância e riqueza de morfotipos bacterianos. Esses resultados devem ser entendidos no contexto de uma problemática complexa na qual a indução é importante e em que respostas categóricas não são possíveis.

Salientamos que o método de análise pode detectar tendências marcantes dos dados, mas pode falhar em detectar relações mais sutis ou complexas entre o perfil microbiológico dos animais e o perfil ambiental. É essencial ressaltar que as variáveis ambientais neste estudo foram coletadas em associação à proposta de pesquisa sobre microbiota cutânea de anfíbios. Portanto, o delineamento amostral dos dados ambientais não foi desenhado para uma comparação do impacto da paisagem sobre variação microclimática, pois a amostragem não foi aleatória. Pelo contrário, a amostragem foi atrelada à presença da espécie *P. boiei*. Sob essa ótica, os resultados derivam de comparações entre medidas microclimáticas e físico-químicas em localidades

específicas dos remanescentes de Floresta Atlântica selecionadas por concentrar populações dessa espécie.

No contexto desse tipo de localidade, a diferença mais destacada é aquela entre florestas preservadas e fragmentos, que é modulada pela amplitude termal. Existem também diferenças entre os fragmentos que podem estar influenciadas pela área e que estão atreladas à variação no perfil físico-químico da água. Assim, os indivíduos de *P. boiei* parecem expostos à maior amplitude termal e temperaturas mais baixas nos Núcleos Cunha e Santa Virgínia, em comparação com aquelas de áreas com maior fragmentação. Já nos fragmentos, as propriedades da água apresentam variação atrelada ao tamanho dos fragmentos, com possível influência de fatores locais. Entretanto, o conjunto de condições que reflete o intervalo de distribuição da espécie amostrado neste trabalho não parece explicar de maneira direta o perfil microbiológico dos indivíduos em termos de riqueza e abundância de morfotipos. Esta é uma análise inédita cujos resultados não podem ser comparados com trabalhos anteriores.

Sob a perspectiva da microbiota ambiental, e não das variáveis abióticas tratadas neste capítulo, trabalhos anteriores mostram que a posição taxonômica é o principal fator na determinação do perfil da microbiota cutânea de anfíbios e o ambiente um fator secundário, que contribui para a determinação do perfil da microbiota cutânea de espécies de anfíbios (CULP & FALKINHAM, 2007; MCKENZIE *et al.*, 2012; KUENEMAN *et al.*, 2014). Mesmo utilizando métodos independentes de cultivo, KUENEMAN e col. (2014) concluíram que no caso de *Rana cascadae* a distribuição espacial dos sítios de amostragem é o segundo fator de influência na composição da microbiota cutânea (KUENEMAN *et al.*, 2014). É possível que os efeitos das variáveis ambientais atuem mais diretamente sobre as comunidades microbianas ambientais do que sobre a microbiota cutânea dos anfíbios. Já foi observado, por exemplo, que a composição das

comunidades microbianas do solo difere entre hábitats de diferentes tamanhos e qualidades (RANTALAINEN, 2004). Uma pesquisa que integre os dois níveis de efeito – variáveis ambientais e comunidades microbianas ambientais e comunidades microbianas ambientais e microbiota cutânea – poderá fornecer uma maior compreensão sobre os possíveis efeitos das alterações no ambiente sobre a microbiota cutânea dos anfíbios.

CAPÍTULO II

“Diversidade Bacteriana da Microbiota Cutânea e sua
Relação com Micro-hábitats ocupados por *P. boiei*: Estudo
Metagenômico”

Resumo

Variações na estrutura das comunidades microbianas ambientais dependem sobremaneira das condições do hábitat. As interações entre microrganismos e hospedeiros também estão sujeitas à qualidade do ambiente, além da resposta dos indivíduos quando em contato com bactérias e fungos. A composição das comunidades microbianas residentes sobre a pele dos anfíbios parece estar relacionada à espécie hospedeira e, de maneira menos evidente e pouco estudada, ao hábitat ocupado pela mesma. Portanto, a avaliação do papel das comunidades microbianas ambientais para a composição da microbiota cutânea dos anfíbios é fundamental para o entendimento das consequências das alterações dos habitats para a interação anfíbio-micróbio. Fragmentos florestais representam bons contextos ambientais para essa avaliação, pois são produtos de intenso impacto antropogênico e apresentam importantes alterações abióticas e bióticas, se comparados às florestas preservadas. Nesta pesquisa, a diversidade taxonômica das comunidades microbianas dos habitats ocupados por *Proceratophrys boiei* foi descrita. Além disso, a relação entre as comunidades ambientais e a microbiota cutânea dessa espécie foi avaliada, assim como, se existem variações importantes na estrutura das comunidades microbianas nos microambientes: pele, água, solo e matriz, entre diferentes fragmentos de Floresta Atlântica. A abordagem metodológica consistiu basicamente na construção de bibliotecas de clones do gene RNAr 16S, para análises metagenômicas. Medidas de variáveis ambientais dos micro-habitats e dos remanescentes foram consideradas para a investigação de suas relações com as comunidades estudadas. Foram obtidas 26 bibliotecas de 8 localidades distintas, em que diferentes valores de diversidade entre os microambientes água, solo, pele e matriz foram observados. Variações na microbiota cutânea entre populações de *P. boiei* foram menos evidentes. Houve pouco compartilhamento de UTOs entre as comunidades microbianas ambientais e a microbiota cutânea de *P. boiei*, porém existem relações taxonômicas entre essas comunidades, a depender do nível hierárquico observado. Algumas variáveis ambientais abióticas mostraram relação com as comunidades avaliadas. A microbiota cutânea de *P. boiei* apresenta grande riqueza bacteriana e as principais famílias identificadas foram: Bradyrhizobiaceae, Phyllobacteriaceae, Hyphomicrobiaceae, Methylobacteriaceae e Rhizobiaceae, entre as quais apenas esta última foi detectada em outras espécies de anfíbios. A microbiota cutânea de *P. boiei* apresenta certa estabilidade entre as populações estudadas e sua composição possui pouca relação com as comunidades microbianas ambientais, apesar de poder ser influenciada por estas e por certas variáveis abióticas. Além disso, a pele dessa espécie parece oferecer um microambiente com características únicas, proporcionando o estabelecimento de uma comunidade bastante particular.

Palavras-chave: anfíbios. microbiota cutânea. micro-habitats. fragmentos florestais. metagenoma.

Abstract

Variations in the structure of environmental microbial communities depend greatly of habitat conditions. The interactions between microorganisms and hosts are also subject to the environmental quality and to the response of individuals when in contact with bacteria and fungi species. The composition of the microbial communities living on the skin of amphibians seems related to the host species and to the habitat occupied, but this feature is little studied. Therefore, the evaluation of the role of environmental microbial communities to the composition of the skin microbiota of amphibians is critical to the understanding of the consequences of changes in habitat for the frog-microbe interaction. Forest fragments represent good environmental contexts for such assessment because results from intense anthropogenic impact and have important abiotic and biotic changes, compared to the preserved forests. This research describes the taxonomic diversity of microbial communities in habitats occupied by *Proceratophrys boiei*. Furthermore, the study evaluates the relationship between the environmental community and cutaneous microbiota. Also, the study tests whether the structure of microbial communities varies across microenvironments: skin, water, soil and matrix between different fragments of Atlantic Forest. The methodological approach consisted primarily in the construction of clone libraries 16S rRNA gene for metagenomic analyzes. Measurements of environmental variables of microhabitats and the forest were investigated in terms of their relationship with the communities studied. In total 26 gene libraries of 8 localities were obtained and different values of diversity between the microenvironments water, soil, skin and matrix were observed. Variations in skin microbiota among *P. boiei* populations were less evident. There was little sharing UTOs between environmental microbial communities and skin microbiota, but there are taxonomic relationships between these communities, depending on the hierarchical level observed. Some abiotic environmental variables showed a relationship with the evaluated communities. The cutaneous microbiota *P. boiei* features large bacterial richness and the main identified families were: Bradyrhizobiaceae, Phyllobacteriaceae, Hyphomicrobiaceae, Methylobacteriaceae and Rhizobiaceae, only the last mentioned was detected in other species of amphibians. Cutaneous microbiota *P. boiei* presents certain stability among the studied populations and their composition bears little relationship with environmental microbial communities, although it can be influenced by these, and by certain abiotic variables. Furthermore, the skin of this species appears to offer unique characteristics as a substrate, providing the establishment of a particular community.

Keywords: amphibians. skin microbiota. microhabitats. forest fragments. metagenome.

1. Introdução

A dinâmica microbiana e as doenças

Microorganismos apresentam sistemas regulatórios e grande capacidade de ajustes às condições externas, onde sinais ambientais são rapidamente percebidos e traduzidos em repostas tanto no nível da célula quanto da população (DUNNY & WINANS, 1999). Dessa forma, a estrutura das comunidades microbianas apresenta um grande dinamismo dependente do ambiente, tal como, as associações estabelecidas com espécies hospedeiras. Sabe-se, por exemplo, que a degradação dos ecossistemas causada pelo homem está relacionada à emergência de doenças infecciosas em ambientes naturais (DASZAK *et al.*, 2001). Isso acontece porque o impacto ambiental causado altera as interações patógeno-hospedeiro e, além disso, a regulação das abundâncias populacionais, exercida pela diversidade biológica local, é perdida (EPSTEIN *et al.*, 1997). BREARLEY e col. (2013) propõem um modelo conceitual para elucidar os principais processos através dos quais a alteração de paisagens por atividades humanas favorecem a disseminação de doenças infecciosas em populações naturais. Basicamente, nesse contexto ambiental a prevalência de doenças infecciosas acontece porque há um aumento na transmissão dos microrganismos, por meio de vetores ou não, e, por outro lado, um prejuízo na resposta do hospedeiro. Segundo ESPTEIN e col. (1997), a diversidade biológica provê um tamponamento contra a proliferação descontrolada de pestes e microrganismos danosos.

A dinâmica dos microrganismos, seja no solo ou na água, também é afetada por variáveis abióticas. A Lei da Tolerância de SHELFORD (1913) descreve a influência dos parâmetros abióticos no controle da abundância dos organismos em um ecossistema, em que cada espécie demanda um conjunto complexo de condições e, se o mínimo ou

máximo tolerado é excedido, a sobrevivência é comprometida. De fato, o crescimento e a distribuição dos microrganismos são afetados por temperatura, radiação, pH, salinidade, oxigênio e nutrientes, entre outros fatores (ATLAS & BARTHA, 1993). Em ambientes antropizados, como os fragmentos florestais, essas e outras variáveis ambientais são alteradas (SAUNDERS *et al.*, 1991). Por isso, nesse tipo de paisagem, o sinergismo entre as alterações na biologia das espécies hospedeiras e a dinâmica de microrganismos patogênicos deve afetar a microbiota associada às espécies de vertebrados que ocupam esses habitats.

Moduladores da microbiota cutânea nos anfíbios

Estudos recentes indicam que no grupo dos anfíbios a posição sistemática é o principal determinante na composição da comunidade microbiana associada à pele (KUENEMAN *et al.*, 2014). Diferenças nas características do microambiente dérmico entre as linhagens desse grupo devem explicar diferenças nas estruturas das comunidades microbianas hospedadas. Essas características são atribuídas principalmente ao perfil das secreções dérmicas e, mais especificamente, à complexidade dos peptídeos antimicrobianos produzida pelas glândulas cutâneas que é espécie-específica (CONLON *et al.*, 2004). No entanto, diferenças nas densidades de morfotipos de colônias bacterianas foram observadas em estudo anterior entre populações da espécie *Proceratophrys boiei*, na qual as comunidades mais densas foram observadas nos indivíduos procedentes de fragmentos de Floresta Atlântica quando comparados àqueles capturados em florestas preservadas do mesmo bioma (ASSIS, 2011). Por outro lado, utilizando a técnica de pirosequenciamento, MCKENZIE e col. (2012) compararam as composições da microbiota cutânea entre as populações de anfíbios e observaram que, apesar de existirem diferenças entre elas, a procedência dos indivíduos não era um determinante importante no perfil das comunidades cutâneas.

Porém, nesse caso não havia paisagens contrastantes, em termos da qualidade dos habitats, como no trabalho de ASSIS (2011).

É possível que a colonização da pele dos anfíbios ocorra durante o contato entre os indivíduos, seja durante as interações sociais ou por meio dos eventos reprodutivos durante a postura dos ovos e / ou o cuidado parental (BLETZ *et al.*, 2013; WALKE *et al.*, 2011; AUSTIN, 2000), ou ainda a partir do contato com microrganismos do ambiente de onde os microrganismos não só participariam da colonização da pele como também auxiliariam na manutenção da estrutura das comunidades dérmicas (LOUDON *et al.*, 2014). Nesse caso, características próprias das espécies de anfíbios delimitariam a estrutura das comunidades cutâneas: a pele seria favorável ao estabelecimento de populações de certos grupos de microrganismos ao mesmo tempo em que seria hostil à ocupação de outros (ASHCROFT *et al.*, 2007; ASSIS *et al.*, aceito para publicação). Além das características morfológicas e fisiológicas da pele, que variam entre espécies, aspectos relacionados à biologia dos grupos de anfíbios devem afetar a colonização deste microambiente e, portanto, a diversidade da microbiota cutânea associada. Anfíbios ocupam diversos habitats: existem espécies arborícolas, terrestres, aquáticas, além de diversos modos reprodutivos e hábitos específicos, como o comportamento de enterrar-se e a estivação sazonal em condições ambientais extremas (WELLS, 2007). É esperado que esses aspectos contribuam para as diferenças observadas entre as espécies de anfíbios em relação aos microrganismos hospedados sobre pele. Essa é uma questão ainda não resolvida e as pesquisas sobre a microbiota cutânea de anfíbios têm explorado apenas raramente tais fatores. KUENEMAN e col. (2014) mostraram que, apesar das comunidades cutâneas das espécies *Anaxyrus boreas*, *Taricha torosa*, *Pseudacris regilla* e *Lithobates catesbeianus* serem distintas das comunidades ambientais, existe similaridade entre a comunidade microbiana da pele de *A. boreas*

(terrestre) e do solo; do mesmo modo que a microbiota da espécie aquática *P. regilla* possui similaridade com a comunidade microbiana do corpo de água ocupado. Esses resultados indicam o microambiente como um fator importante para a estrutura da microbiota cutânea dos anfíbios.

Até o momento, a literatura mostra que a estrutura da microbiota cutânea dos anfíbios varia entre espécies e indica que o ambiente pode ser um elemento importante para a composição e manutenção de sua estrutura (KUENEMAN *et al.*, 2014; CULP *et al.*, 2007; LOUDON *et al.*, 2014). A identificação do papel do ambiente sobre a dinâmica microbiana presente na pele dos anfíbios é fundamental para o entendimento das consequências da alteração do hábitat para a interação microrganismo-hospedeiro. Esse argumento é muito pertinente para o caso dos anfíbios, pois a microbiota cutânea desses animais é compreendida por muitos autores como um complemento do sistema imune e como uma barreira protetora contra patógenos importantes, como o fungo quitrídio *Batrachochytrium dendrobatidis* (HARRIS *et al.*, 2009). Já foi demonstrado, por exemplo, que alterações na estrutura dessas comunidades cutâneas levam à maior susceptibilidade dos anfíbios à quitridiomicose, em condições experimentais (BECKER & HARRIS, 2010). Da mesma maneira, parece haver um sinergismo entre os metabólitos produzidos por bactérias da microbiota cutânea e peptídeos antimicrobianos secretados por glândulas dérmicas no combate às infecções na pele dos anfíbios (MYERS *et al.*, 2012).

As condições do hábitat podem determinar alterações nas comunidades microbianas ambientais e na relação micróbio-hospedeiro, conforme comentado. Paisagens fragmentadas são um bom cenário para avaliar a influência do ambiente sobre a diversidade microbiana hospedada pelos anfíbios, pois esses hábitats apresentam variações em elementos bióticos e abióticos, devido ao histórico da atividade humana

local (BENNETT & SAUNDERS, 2010). Nesta pesquisa, a microbiota cutânea do anuro *P. boiei* foi avaliada a partir de diferentes remanescentes de Floresta Atlântica, com o objetivo primeiro de descrever a diversidade taxonômica das populações bacterianas e das comunidades microbianas dos micro-habitats ocupados por essa espécie. O papel das comunidades microbianas dos micro-habitats para a estrutura da microbiota cutânea foi investigado, assim como a possibilidade de haver estabilidade na estrutura da microbiota entre os locais ou populações de *P. boiei*. Dessa forma, duas escalas ambientais foram avaliadas: micro-habitat e floresta. O micro-habitat foi caracterizado segundo parâmetros físico-químicos da água, aspectos microclimáticos do ambiente terrestre e características relacionadas à estrutura dos remanescentes de Floresta Atlântica, para analisar se possíveis diferenças entre locais podem estar atreladas a essas variáveis abióticas. Os resultados obtidos neste capítulo são complementares àqueles que compõem o capítulo 1, porém, a abordagem metodológica é independente e elimina o viés inerente ao método do cultivo lá utilizado.

As seguintes hipóteses propostas nesta pesquisa foram testadas: 1. A diversidade da microbiota cutânea de *P. boiei* relaciona-se com a diversidade da microbiota ambiental e, em termos de composição, a microbiota cutânea é um subconjunto da microbiota que ocorre nos seus micro-habitats. 2. As diversidades das comunidades microbianas cutânea e ambiental variam entre os fragmentos; além disso, existe variação entre as comunidades dos micro-habitats. 3. As comunidades microbianas ambiental e cutânea tem relação com variáveis ambientais abióticas.

2. Materiais e métodos

Locais de estudo

Cinco fragmentos florestais e três pontos de florestas contínuas foram considerados para a amostragem das comunidades microbianas. Fragmentos florestais: Ditão (12 indivíduos), Rancho do Mato (10), Gonzaga (14), Benedita (11) e Ditinha (15); florestas preservadas: PESM – Núcleo de Santa Virgínia (3), PESM – Núcleo de Cunha (2) e Parque Estadual de Intervalos – Fazenda Paraíso (7). Em cada localidade, amostras das comunidades microbianas de quatro microambientes (ou microambientes) foram tomadas: solo, água, matriz (apenas para fragmentos) e pele, conforme descrito na seção seguinte. Para a construção da biblioteca de clones as amostras das comunidades foram agrupadas por local e por microambiente, totalizando 28 bibliotecas.

Amostragem dos microambientes

Solo

As amostras de solo foram pareadas com a captura dos espécimes de *P. boiei*. Dessa forma, para cada indivíduo encontrado, uma amostragem da comunidade microbiana de seu entorno era realizada. A partir do ponto central onde se encontrava o espécime, geralmente sobre o folhíço, pontos dispersos em uma área de aproximadamente 50 cm de diâmetro, a cada 10 cm aproximadamente, foram amostrados com o auxílio de 5 cotonetes estéreis, até que estivessem saturados de amostra. O número de cotonetes foi escolhido a partir da observação de que, após a utilização de toda a sua área de superfície, havia um retorno de parte da amostra ao solo. Cada grupo de cinco cotonetes foi estocado em um tubo de polipropileno, contendo 10 ml do tampão GTE (Glicose 20% – Tris-HCL 1M pH 7,4 –EDTA 0,5M pH 8,0) e

estocados em *freezer* a -20°C , após serem identificados com o código do indivíduo correspondente. As diferenças de microambientes não foram consideradas durante a amostragem, apesar dos indivíduos estarem quase sempre sobre o folheto.

Água

A amostragem das comunidades microbianas dos corpos de água foi realizada durante a coleta dos indivíduos nos riachos utilizados durante o evento reprodutivo. Um riacho por local foi amostrado, quando havia forte evidência de que o mesmo era utilizado pela população local de *P. boiei*. A amostragem consistia na coleta de um litro de água de cada riacho onde havia grande concentração de indivíduos. Esse material foi armazenado em sacos estéreis do tipo *Whirl-Pak*® (3.637 mL) para seu transporte até a base onde foi filtrado através de membrana de polycarbonato com poros de $0,22\ \mu\text{m}$, com o auxílio de um sistema filtrante e bomba a vácuo. As membranas foram preservadas, individualmente, em tubos de polipropileno estéreis contendo 30 ml de solução tampão GTE e estocadas em *freezer* a -20°C . O tempo entre a coleta da água e a sua filtração foi de até 3 horas.

Matriz

A matriz é a unidade de paisagem no entorno do fragmento, entendida nos estudos de fragmentação como o conjunto de unidade de não-habitat para uma determinada comunidade ou espécie estudada (METZGER, 2001). O solo da matriz dos fragmentos foi amostrado seguindo o procedimento realizado para a amostragem dos solos do interior das florestas. Os pontos amostrados nas matrizes dos fragmentos situavam-se a 50 m da borda e em linha reta com a altura do riacho onde foram coletados os espécimes de *P. boiei*.

Pele

A amostragem da microbiota cutânea para as análises moleculares foi realizada sob as mesmas condições da amostragem para as análises da diversidade cultivada, descrita nos métodos gerais deste trabalho. Brevemente, um cotonete estéril por indivíduo foi passado cinco vezes ao longo do comprimento rostro-cloacal do dorso e do ventre. As amostras foram homogeneizadas em 1 mL de solução tampão GTE e estocadas em *freezer* a -20°C. Para essa análise foram considerados 74 machos adultos, procedentes de oito localidades distintas, como detalhado acima.

Extração de DNA metagenômico

O DNA total das comunidades microbianas de todos os microambientes: solo, água, matiz e pele, foi extraído com a utilização do *kit Power Soil™ DNA Isolation* (MOBIO Laboratories, Inc.), seguindo as instruções do fabricante. O agrupamento das amostras por local e por microambiente foi realizado antes da extração de DNA, utilizando-se o *pellet* formado após a centrifugação dos materiais. Para amostras ambientais, estocadas em tubo de polipropileno de 50 mL a centrifugação foi feita a 5.000 rpm, durante 15 min; as amostras da microbiota, estocadas em tubos de polipropileno de 1,5 mL, foram centrifugadas a 13.000 rpm, durante 5 min.

Amplificação e purificação do gene RNAr 16S

Para a amplificação do gene RNAr 16S foi utilizada PCR (do inglês *Polymerase Chain Reaction*), com os oligonucleotídeos iniciadores universais: 27F [5'-AGAGTTTGTACMTGGCTCAG-3'] e 1492R [5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'] (LANE, 1991). O volume final do sistema de reação foi de 25µl e foi composto por: 1 unidade de enzima *Top Taq DNA Polimerase*, tampão de reação para a enzima, 20µM

de cada oligonucleotídeo iniciador e o tampão de corrida *Coral load* (Qiagen®). As condições da incubação foram: 3 minutos de desnaturação a 95°C, seguidos de 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos de anelamento a 52°C, 1 minuto e 40 segundos de extensão a 72°C, com um ciclo final de extensão de 7 minutos a 72°C e resfriamento a 4°C. O produto da reação foi analisado em gel de agarose 1%, contendo Brometo de Etídeo (0,5µg/ml). O tempo de corrida foi de aproximadamente 25 minutos sob a voltagem de 92 V. A observação das bandas foi realizada sobre transluminador UV.

Após ter sido observado resultado da PCR, a purificação de seu produto foi realizada utilizando o *kit PCR GeneJet™* (ThermoScientific), seguindo as recomendações do fabricante. A quantificação da concentração de DNA foi feita em espectrofotômetro (Nanodrop).

Construção e sequenciamento das bibliotecas de RNAr 16S

A clonagem e o sequenciamento das bibliotecas foram realizados pela empresa MACROGEN Inc. – Coréia do Norte, utilizando o *primer* universal 27F. Os clones foram sequenciados pelo método de Sanger.

Análises

A qualidade das sequências de RNAr 16S foi analisada por meio da ferramenta *Sequence Scanner 2* (Applied Biosystems) e as sequências de baixa qualidade foram retiradas. Para a edição final foi utilizado o programa *BioEdit* (HALL, 1999) e, após retiradas as extremidades, foram obtidas sequências com cerca de 800 pares de base. As análises iniciais foram feitas pelo *Ribossomal Database Project* 11, utilizando-se a ferramenta *Classifier*, que se baseia na inferência Bayesiana simples para determinar a

hierarquia taxonômica das sequências (WANG *et al.*, 2007). Foi utilizado um limite de confiança de 90% para as análises das sequências.

O teste de permutação ANOSIM (*uma / duas vias*) foi empregado para avaliar a significância das diferenças entre os grupos, definidas pela ordenação MDS. A matriz de similaridade foi construída a partir das frequências dos filos identificados para as comunidades amostradas e para o teste de significância foi realizada permutação, sendo o cálculo de R realizado 999 vezes. Os valores resultantes do teste ANOSIM têm amplitude de -1 a +1, sendo que os valores da estatística R, com a dissimilaridade de Bray-Curtis, iguais a +1 são obtidos apenas quando todas as réplicas dentro dos grupos são mais similares entre si do que qualquer réplica de grupos diferentes (QUINN & KEOUGH, 2002). A análise do percentual de contribuição dos táxons para as similaridades dentro e entre grupos foi realizada pelo procedimento de porcentagem de similaridades (SIMPER). A contribuição cumulativa de 90% foi aplicada. Para essas análises foi utilizado o programa estatístico *PRIMER 5* (CLARKE & WARWICK, 2001).

A construção das bibliotecas de clones do gene RNAr 16S também permitiu a realização de análises baseadas nas UTOs (Unidades Taxonômicas Operacionais). Para essa abordagem foi utilizado o programa Mothur, seguindo os procedimentos operacionais padrão para análise de sequências de RNAr 16S obtidas pelo método de Sanger (SCHLOSS *et al.*, 2009). Desse modo, as sequências foram alinhadas usando o banco de dados SILVA como referência, sendo retiradas as colunas que continham apenas *gaps* no programa *BioEdit*; a detecção e exclusão das quimeras foram realizadas através dos comandos: *chimera.slayer* e *remove.seqs*, respectivamente. A matriz de distância evolutiva foi feita através do programa *DNADIST*, que consta no pacote *PHYLIP 3.63*.

Foram utilizados estimadores para a medida das diversidades nos microambientes: água, solo, matriz e pele. O índice *Chao1* é um estimador de riqueza que baseia na frequência de espécies raras para estimar o número de espécies não detectadas (GOTELLI, 2009). O índice de *Shannon* - se baseia na riqueza e é influenciado pela distribuição das abundâncias das espécies, assumindo que todas as espécies estão representadas na amostra (ODUM, 1988). *Simpson* é um índice que fornece a probabilidade de dois indivíduos retirados aleatoriamente de uma comunidade pertencerem à mesma espécie, assim como ressalta a abundância dos táxons mais comuns e produz um valor de diversidade baseado na dominância, ou seja, quanto maior o seu valor maior a dominância de um ou poucos táxons e, portanto, menor a diversidade. O estimador *Invsimpson* é o inverso do índice de Simpson ($1/D$), cujo aumento reflete o aumento na diversidade (MAGURRAN, 1988). Os valores de cobertura foram obtidos a partir do estimador *Good* baseado no cálculo: $C = 1 - N/n_1$, em que n_1 refere-se ao número de UTOs amostrados e N ao número total de indivíduos na amostra (SCHLOSS, *et al.*, 2009).

Para essas estimativas foi considerado o nível de gênero, com distância de 0,03 entre as sequências, o que corresponde uma similaridade de 97% para a definição das UTOs. O diagrama de Venn foi feito para a visualização do compartilhamento de UTOs entre as amostras de solo, água, pele e matriz, utilizando a distância de 0,03.

Comparações entre a diversidade de todas as amostras foram feitas através das medidas de dissimilaridade de Jaccard e Yue & Clayton (Y&C). O índice de Jaccard baseia-se na presença e ausência de UTOs, portanto, é uma medida qualitativa, sendo a dissimilaridade medida a partir do compartilhamento de UTOs entre as amostras. Já o índice Y & C baseia-se na abundância relativa de UTOs compartilhadas sendo, portanto, uma medida da estrutura da comunidade (YUE & CLAYTON, 2005). Os dendrogramas

foram construídos com um *cut-off* de 0,03. O método *unifrac* foi aplicado para a comparação entre as amostras com base nas linhagens dos táxons. Esse método mede a distância filogenética entre conjuntos de táxons e é usado para determinar se comunidades são significativamente diferentes, sendo bastante eficiente para comparar muitas comunidades simultaneamente usando técnicas de clusterização e ordenação de semelhanças entre amostras (LOZUPONE & KNIGHT, 2005). A versão *unweighted* do método *unifrac* foi utilizada a qual considera a presença e ausência de UTOs, levando em conta a fração do comprimento do braço da árvore filogenética que é exclusiva para a comunidade (LOZUPONE *et al.*, 2007). O programa *Mothur* foi utilizado para as análises de UTOs e o programa *MEGA 6* para a visualização e edição dos dendrogramas.

O programa *Mothur* também foi utilizado para a análise de PCoA (*Principal Coordinate Analysis*), que é uma técnica de escalonamento multidimensional métrico e foi aplicada para a visualização da beta diversidade para cada um dos quatro microambientes: pele, solo, água e matriz, com base na distância *theta* YC. Os eixos obtidos na PCoA foram utilizados para avaliar a correlação entre as variáveis ambientais e a diversidade das comunidades microbianas. Gráficos *biplots* (LEGENDRE & LEGENDRE, 2012) foram construídos utilizando os pacotes *Calibrate* (GRAFFELMAN, 2015) e *Shape* (SOETAERT, 2014) do programa R.

A relação entre as comunidades microbianas e variáveis ambientais foi avaliada para cada microambiente: pele, solo, água e matriz. As variáveis abióticas consideradas referem-se aos parâmetros físico-químicos da água dos riachos: pH, temperatura, oxigênio dissolvido, condutividade, totais de sólidos dissolvidos e salinidade. Microclimas dos micro-habitats terrestres utilizados pelos espécimes de *P. boiei*: temperaturas média, máxima e mínima, amplitude de temperatura, umidades relativas

mínima, média e amplitude de umidade relativa. Além disso, também foram consideradas medidas estruturais dos remanescentes de estudo: área, perímetro, distância do fragmento mais próximo e distância da influência antrópica mais próxima. Dessa análise as bibliotecas de pele e solo de Intervalles foram excluídas, pois, nesse local as medidas das variáveis ambientais não foram realizadas.

3. Resultados

Foram obtidas 26 bibliotecas metagenômicas do gene RNAr 16S de amostras procedentes de cinco fragmentos florestais: Ditão, Rancho, Gonzaga, Benedita e Ditinha; e três florestas preservadas: PESM – Núcleo de Santa Virgínia, PESM – Núcleo de Cunha e Parque Estadual de Intervalles – Fazenda Paraíso. A amostragem e o sequenciamento das comunidades microbianas dos microambientes: água, matriz, pele e solo foram realizados para todos os fragmentos florestais citados. Não foi obtido o sequenciamento de três amostras procedentes das florestas preservadas: corpo de água de Intervalles e microbiota cutânea dos Núcleos de Santa Virgínia e Cunha. Para essas amostras, duas tentativas de sequenciamento foram realizadas, sem que houvesse a obtenção de resultados satisfatórios. Após a eliminação de quimeras e sequências de baixa qualidade, o total de 2.228 sequências de alta qualidade, com tamanho médio de 800 pares de bases, foi considerado para as análises subsequentes. Os valores de cobertura variaram entre 28,21% e 94,25% na distância 0,03 (Tabela 1).

Tabela 1. Valores de cobertura, calculados pelo estimador *Good*, número de sequências e de UTOs por amostra.

Local	Substrato	Cobertura (%)	Sequências	OTUs
Benedita	Água	44,8	87	63
	Matriz	72,5	80	32
	Solo	21,1	76	66
	Pele	44,9	89	67
PESM - Cunha	Água	58,5	94	62
	Solo	35,3	85	69
Ditão	Água	51,1	88	64
	Matriz	42,0	88	67
	Solo	39,8	83	64
	Pele	50,0	90	64
Ditinha	Água	39,1	87	68
	Matriz	60,0	80	50
	Solo	94,3	87	6
	Pele	53,2	79	51
Gonzaga	Água	36,4	88	70
	Matriz	56,2	89	55
	Solo	47,3	91	67
	Pele	45,6	79	57
Intervales	Solo	28,2	78	66
	Pele	47,6	84	63
PESM - Santa Virgínia	Água	37,5	88	68
	Solo	32,9	85	72
Rancho do Mato	Água	56,0	91	58
	Matriz	50,0	86	55
	Solo	50,0	84	58
	Pele	52,2	92	66

Diversidade microbiana - UTOs

Não houve diferença entre as diversidades dos microambientes solo, água, pele e matriz, estimada pelos índices: Chao 1, Shannon, Simpson e Invsimpson (Kruskal-Wallis, $p > 0,123$). A maior riqueza foi observada nas amostras de solo, seguida pelas amostras de água e pele, tendo o microambiente matriz a menor riqueza microbiana observada. O índice de diversidade de Shannon mostrou a diversidade mais alta para o microambiente água, seguido pelo solo e a pele. Os três microambientes apresentam diversidades semelhantes, enquanto que a matriz apresentou a menor diversidade observada. O índice de Simpson (D) revelou a maior dominância de UTOs para os

microambientes solo e matriz e o estimador Invsimpson confirmou a maior diversidade para as amostras de água (Figura 1, A-D).

Figura 1. A) Médias dos valores de riqueza estimadas pelo índice de Chao1; B) médias dos valores de diversidade estimadas pelos índices de Shannon; C) Simpson e D) Invsimpson, todas nos microambientes solo, água, pele e matriz. As barras correspondem aos intervalos de confiança dos índices. Distância utilizada: 0,03.

A diversidade de UTOs foi estimada para as comunidades cutâneas de *P. boiei* nos diferentes locais amostrados. Embora um teste não tenha sido aplicado, devido ao agrupamento prévio das amostras por localidade, é possível perceber pouca diferença na diversidade entre as amostras da microbiota cutânea de *P. boiei*. O estimador Chao1

revelou variação na riqueza entre 113 e 136, nos fragmentos Rancho do Mato e Benedita, respectivamente. A diversidade estimada pelo índice de Shannon variou entre 3,7 no fragmento Ditinha e 4,1 nos fragmentos Rancho do Mato e Benedita. O índice de Simpson revelou que a maior dominância de UTOs esteve na população do fragmento Ditinha, seguido do fragmento Gonzaga. No fragmento Rancho do Mato e na Fazenda Paraíso – Intervalos foram detectadas as maiores diversidades: 135 e 124 respectivamente, seguindo o índice Invsimpson (Figura 2).

A diversidade da microbiota cutânea mostrou relação com o número de indivíduos das amostras: Shannon (Pearson, $r = -0,800$, $p\text{-valor} = 0,056$), Simpson (Pearson, $r = -0,866$, $p\text{-valor} = 0,026$) e Invsimpson (Pearson, $r = -0,898$, $p\text{-valor} = 0,015$). Não foi observada relação com o índice de Chao1 (Pearson, $r = -0,224$, $p\text{-valor} = 0,670$) e o valor de cobertura (Pearson, $r = -0,203$, $p\text{-valor} = 0,700$).

Figura 2. A) Valores de riqueza de UTOs amostradas da pele de *P. boiei* por localidade, segundo o estimador Chao1; B) diversidade de UTOs estimada pelos índices de Shannon; C) Simpson e D) Invsimpson, para a microbiota cutânea de diferentes populações. As barras correspondem aos intervalos de confiança dos índices.

Para analisar a influência das comunidades microbianas ambientais sobre a microbiota cutânea de *P. boiei*, foi utilizado um diagrama de Venn construído a partir das UTOs geradas por 2.228 sequências. Através do diagrama é possível observar que apenas 8 UTOs (0,67%) foram compartilhadas entre todos os microambientes amostrados. As amostras dos corpos de água compartilharam 15,6% de UTOs com os outros microambientes, solo 23,3% e matriz 19,6%. As amostras das comunidades cutâneas apresentaram o maior percentual de compartilhamento de UTOs com os demais microambientes: 33,1%. Sendo que o solo foi o microambiente com o qual houve o maior número de UTOs compartilhadas: 65, ou seja, 21,5% do total de UTOs presentes nas amostras de microbiota cutânea. O microambiente com o qual houve o menor compartilhamento de UTOs procedentes da pele de *P. boiei* foi a matriz dos fragmentos, com a qual houve apenas 9,9 % de sobreposição (Figura 3).

Diagrama de Venn à distância 0,03

Riqueza total de UTOs: 1.185

Água: 415- Matriz: 229 - Solo: 409 - Pele: 302

Substrato	Compartilhamento
Água	15.6%
Solo	23.3%
Pele	33.1%
Matriz	19.6%

Figura 3. Diagrama de Venn comparando as associações de UTOs entre amostras de comunidades microbianas dos microambientes solo, água, matriz e pele. A tabela indica o percentual de UTOs compartilhado com outros microambientes. As áreas sobrepostas mostram o número de UTOs compartilhado entre os respectivos microambientes.

Comparações entre todas as amostras com base nas sequências obtidas foram realizadas através das medidas de dissimilaridade de Jaccard e Yue & Clayton (Y&C). Os agrupamentos das amostras foram construídos com base nas matrizes de distância obtidas a partir dos índices, considerando 97% de similaridade para a definição das UTOs. O índice de Jaccard propõe uma maior relação da microbiota cutânea com as comunidades presentes no solo ocupado pelos indivíduos de *P. boiei* (Figura 4). Ao observar o dendrograma de Yue e Clayton, é possível notar uma maior relação da microbiota cutânea com as comunidades presentes nos corpos de água (Figura 4). Em ambos os casos as comunidades microbianas amostradas das matrizes dos fragmentos têm menor relação com as comunidades cutâneas.

Figura 4. Dendrogramas construídos a partir dos índices de Jaccard e de Yue & Clayton, para a comparação das diversidades de UTOs entre os microambientes pele, solo, água e matriz. As barras abaixo dos dendrogramas indicam a distância entre as comunidades com base nos respectivos índices.

Não existem agrupamentos óbvios por locais de amostragem (Figura 5), sobretudo quando considerado o índice de Jaccard. Nesse dendrograma, áreas distintas

tanto do ponto de vista paisagístico, como pequenos fragmentos e extensas florestas preservadas, quanto do ponto de vista geográfico, agrupam-se. Por exemplo, as comunidades presentes no solo do PESH – Cunha e na pele dos espécimes do fragmento Rancho do Mato ou as comunidades presentes na pele dos indivíduos de Intervalos – Fazenda Paraíso e no solo do fragmento Benedita, no município de São Luís do Paraitinga.

Figura 5. Dendrograma construído a partir do índice de Jaccard para a comparação das diversidades de UTOs entre os locais de amostragem. Mostra que os agrupamentos entre as amostras estão mais relacionados ao tipo de microambiente do que ao local de procedência. A barra abaixo do dendrograma indica a distância entre as comunidades com base no índice de Jaccard.

Os diagramas mostram maior similaridade genética entre microambientes do que entre locais. Porém, ao utilizar o índice de Yue & Clayton, que está baseado nas abundâncias relativas de UTOs, é possível perceber uma maior tendência à formação de grupos de locais. Por exemplo, as amostras de solo procedentes das três florestas preservadas consideradas para essa análise agrupam-se, como mostrado no dendrograma. Porém, a partir da observação global desta representação é possível constatar a importância do microambiente no agrupamento das amostras (Figura 6). Os agrupamentos observados para ambos os índices revelam que é possível definir as comunidades microbianas de acordo com seus respectivos microambientes. As matrizes dos fragmentos mostraram-se bastante relacionadas, principalmente segundo o índice de Jaccard. Assim, a diversidade das comunidades do entorno dos fragmentos possui pouca relação com aquelas observadas nas comunidades de seu interior.

Figura 6. Dendrograma construído a partir do índice de Yue & Clayton para a comparação das diversidades de UTOs entre os locais de amostragem. Ele mostra que os agrupamentos entre as amostras estão mais relacionados ao tipo de microambiente do que ao local de procedência. A barra abaixo do dendrograma indica a distância entre as comunidades com base no índice de Yue & Clayton.

As estruturas das comunidades dos microambientes são distintas entre si (R global médio = 0,875, p-valor <0,001; *Unifrac unweighted*). Quando as amostras para cada tipo de microambiente são comparadas entre os locais, é possível observar que este fator também pode ser importante na distinção das comunidades. Para as amostras de pele houve diferença entre a maioria dos locais (p-valor < 0,047), porém três pares de

localidade não mostraram diferença significativa ($p\text{-valor} > 0,065$). Nas amostras de água quatro pares de amostras não apresentaram diferenças ($p\text{-valor} > 0,053$), porém as demais comparações apresentaram diferenças ($p\text{-valor} < 0,045$). Treze pares de amostras de solo não apresentaram diferença significativa ($p\text{-valor} > 0,051$), enquanto que os demais quinze pares de amostras foram diferentes entre si ($p\text{-valor} < 0,045$). As amostras de matriz foram diferentes entre si ($p\text{-valor} < 0,044$), com exceção de um par de amostras ($p\text{-valor} > 0,065$).

Relações com variáveis ambientais

A relação entre as comunidades microbianas e as variáveis ambientais (Tabela 2) foi avaliada para cada microambiente, pele, solo, água e matriz, considerando os agrupamentos por locais. Como visto na seção anterior, existe maior similaridade genética dentro de cada microambiente do que dentro de cada local, embora tenham sido observadas similaridades entre locais para um mesmo tipo de microambiente, em alguns casos. A representação das distâncias *theta* *YC* pela ordenação PCoA mostrou a similaridade entre locais para cada microambiente. Porém, alguns padrões podem ser destacados, um deles é o agrupamento entre as amostras de solo das florestas contínuas e o fragmento Benedita. Além disso, as amostras do solo entre os fragmentos Rancho do Mato e Ditão que, apesar de serem fragmentos de uma mesma região, estão distantes entre si (Figura 7).

Tabela 2. Propriedades físico-químicas da água e solo e características dos remanescentes de amostragem das comunidades microbianas.

	Parâmetros	Rancho	Gonzaga	Benedita	Ditinha	Ditão	Cunha	Stª Virgínia
ÁGUA	pH	6,7	6,5	7,2	7,3	5,7	6,0	6,7
	Temperatura (°C)	20,7	20,4	20,3	19,4	19,4	17,6	16,9
	Oxigênio dissolvido (%)	90,6	61,8	74,1	75,0	80,6	68,6	75,3
	Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}^2$)	63,8	39,0	41,4	40,1	140,1	10,6	20,0
	Totais de sólidos dissolvidos (mg/mL)	30,0	18,2	19,3	18,7	66,8	6,6	9,0
	Salinidade (°/00)	0,0	-0,1	-0,1	-0,1	0,1	0,0	0,0
SOLO	Temperatura média (°C)	18,7	18,9	17,1	18,8	18,7	15,2	15,5
	Amplitude de temperatura (°C)	19,4	28,0	26,2	25,0	24,9	28,6	23,3
	Temperatura máxima* (°C)	31,3	36,4	38,6	37,2	37,9	36,0	30,8
	Temperatura mínima* (°C)	4,7	3,3	4,8	4,7	7,0	2,1	2,6
	Umidade relativa mínima* (%)	37,5	15,0	17,9	46,1	47,0	38,2	35,6
	Umidade relativa média (%)	90,7	54,4	82,3	89,4	89,3	94,1	94,1
	Amplitude de umidade relativa (%)	62,5	85,0	82,1	53,9	53,0	61,8	64,4
FLORESTA	Área (ha)	27,2	6,3	60,4	21,2	38,2	2886,0	165,8
	Perímetro (km)	3,8	1,5	8,4	3,5	4,5	26592,7	7682,3
	Distância do próximo fragmento (m)	110,4	186,6	16,0	182,1	43,8	5,9	6,2
	Distância da ocupação humana (m)	14,5	46,2	611,4	14,4	13,4	79,5	153,0

A umidade relativa média dos micro-habitats (URMED) correlaciona-se negativamente com o eixo 1 ($\rho = -0,9$, p-valor = 0,037; Spearman), assim como, existe uma tendência à correlação entre temperatura da água (TAG) e o eixo 2 ($\rho = -0,87$, p-valor = -0,53; Spearman), para a *diversidade microbiana da pele*. A distância da ocupação humana (DISTO) foi positivamente correlacionada ao eixo 1 ($\rho = 0,85$, p-valor = 0,013; Spearman) e a salinidade (SAL) negativamente correlacionada ao eixo 2 ($\rho = -0,9$, p-valor <0,000; Spearman), para a *diversidade microbiana do solo*. A umidade relativa média (URMED) e a temperatura da água mostraram correlação positiva e negativa ($\rho = 0,88$; p-valor = 0,008; $\rho = -0,85$, p-valor = 0,013; Spearman) respectivamente, com o primeiro eixo e a amplitude de temperatura (TAMP) correlação positiva com o segundo eixo ($\rho = 0,82$, p-valor = 0,023; Spearman), para a *diversidade microbiana dos corpos de água*. Finalmente, área (AREA) e perímetro (PERI) estiveram positivamente correlacionadas ao eixo 1 ($\rho = 0,9$, p-valor = 0,037; $\rho = 0,9$, p-valor = 0,037; Spearman) e a distância do fragmento mais próximo (DISTF) e a

temperatura média dos micro-hábitats apresentaram correlações negativas com este mesmo eixo ($\rho = -0,9$, p-valor=0,037; $\rho = -0,97$, p-valor= 0,004; Spearman) os parâmetros da água pH e oxigênio dissolvido (DO) foram negativamente correlacionados ao eixo 2 ($\rho = -0,9$, p-valor = 0,037; $\rho = -0,9$, p-valor = -0,037; Spearman), Figura 7.

Figura 7. Ordenação (PCoA) das distâncias theta YC das comunidades microbianas, por microambiente, baseada nas sequências do gene 16S rRNA, nos locais: fragmentos Ditinha (Dth), Ditão (Dit), Gonzaga (Gon), Benedita (Ben) e Rancho do Mato (RM); florestas preservadas PESM – Cunha (PESM-Cun) e PESM – Santa Virgínia (PESM-SV). As setas indicam correlação significativa (Spearman) entre variáveis ambientais e os eixos da PCoA. Na PCoA da microbiota da pele o eixo 1 representa 30,9% e o eixo 2 26,5% da variância total entre os sítios; na PCoA da microbiota do solo, o eixo 1 representa 22,2% e o eixo 2 18,6%; na PCoA da água o eixo 1 representa 19,4% e o eixo 2 17,6%; na microbiota da matriz o eixo 1 representa 36,8% e o eixo 2 27,3%.

Diversidade taxonômica

Foram identificados 16 filos bacterianos, sendo Proteobacteria o filo dominante, o qual representou pelo menos 52% do número de sequências em cada local de amostragem. Actinobacteria foi o segundo filo mais comum, com 14,2 % do total de sequências analisadas. O filo Acidobacteria foi o terceiro mais comum com 5,5% do total de sequências obtidas. Os demais filos não foram detectados em todas as amostras, porém, o filo Firmicutes foi o segundo em dominância no fragmento Benedita, com 28,7% do total de sequências desse local. O filo Cyanobacteria superou o percentual de Actinobacteria nesse local, com 18,2% do total de sequências. Lentisphaerae e Nitrospirae foram identificados apenas nos fragmentos Rancho do Mato (RM) e Ditinha (DTH), ambos com um percentual de 0,1% das sequências analisadas (Figura 8).

Figura 8. Distribuição (abundância relativa) dos filos bacterianos nos locais de amostragem Benedita, Ditão, Gonzaga, Ditinha e Rancho do Mato, PESM-Cunha, Intervalos e PESM-Santa Virgínia. Em acordo com a análise de clones das bibliotecas RNAr 16S, sequenciados pelo método de Sanger e classificados pelo *Ribosomal Database Project*.

Ao se observar a distribuição dos filos entre os microambientes a dominância do filo Proteobacteria é mantida. No entanto, o filo Actinobacteria nas amostras de matriz possui menor percentual quando comparado aos filos Firmicutes (23,7%) e Cyanobacteria (11,6%). Nas amostras de água o filo Firmicutes (8%) é o terceiro filo mais abundante, depois do filo Actinobacteria (9,9%) e Proteobacteria (61,5%). O percentual do filo Proteobacteria no solo (66,5%) é superior ao percentual desse filo na pele (59,2%), cedendo lugar ao filo Actinobacteria (24,1%) sendo inferior ao percentual deste mesmo filo no solo (12,7%). A proporção de Acidobacteria na pele é menor se comparada aos demais microambientes. O microambiente com o maior número de filos foi a água, 20 filos, seguido da pele e do solo, 16 filos cada, e matriz com 15 filos (Figura 9).

Figura 9. Distribuição (abundância relativa) dos filos bacterianos nos microambientes de amostragem água, pele, solo e matriz dos fragmentos. Em acordo com a análise de clones das bibliotecas RNAr 16S, sequenciados pelo método de Sanger e classificados pelo *Ribosomal Database Project*.

A relação de dominância do filo Proteobacteria é modificada quando os microambientes são observados em cada localidade de amostragem. Na matriz do fragmento Benedita a dominância é observada para o filo Firmicutes (65,2%) ao mesmo tempo em que na microbiota cutânea dos animais presentes no local esse filo não foi detectado. O mesmo aconteceu para a amostra de solo desse mesmo fragmento. Ainda nesse local, a pele dos animais apresentou uma dominância do filo Actinobacteria (46,8%) ao invés do filo Proteobacteria (45,8%). Esse perfil de comunidade bacteriana cutânea não foi observado nos demais locais, onde a maior abundância de bactérias cutâneas refere-se ao filo Proteobacteria. A matriz do fragmento Gonzaga é dominada pelo filo Cyanobacteria (38,5%), que não ocorre na amostra da microbiota cutânea dos

animais desse mesmo local. Nas amostras de solo e água esse filo foi detectado em baixas abundâncias (Figura 10).

As análises anteriores mostraram que o solo pode ser um importante componente para a determinação do perfil da microbiota cutânea de *P. boiei*. Porém, é possível observar que no fragmento Ditinha o solo apresenta apenas dois filos, Proteobacteria (97,8%) e Acidobacteria (2,2%), enquanto que na pele dos indivíduos desse local existe uma maior diversidade de filos, apesar da alta dominância desse filo (68%), assim como na amostra de água (82%). Porém, na matriz do fragmento a dominância de proteobactérias apresenta um valor muito inferior (46%), se comparada aos demais microambientes desse fragmento. (Figura 10).

Figura 10. Distribuição (abundância relativa) dos filos bacterianos por tipo de amostra (pele, matriz, solo e água) nos locais de amostragem: 1. Benedita, 2. Ditão, 3. Gonzaga, 4. Ditinha e 5. Rancho do Mato, 6. PESM-Cunha, 7. PESM-Santa Virgínia e 8. Intervalas. A distribuição foi feita de acordo com a análise de clones das bibliotecas RNAr 16S, sequenciados pelo método de Sanger e classificados pelo *Ribossomal Database Project*.

Análise de similaridade - ANOSIM

ANOSIM foi utilizada para avaliar a significância das diferenças observadas nas distribuições dos táxons, representadas na seção anterior. Essa análise foi feita com base na identificação taxonômica das sequências obtidas por meio das bibliotecas de clones. A partir da elaboração da ANOSIM de uma via foram avaliadas as diferenças entre as comunidades por microambiente e, posteriormente, por local. O microambiente como um fator dependente do local foi avaliado através da ANOSIM de duas vias. Tais análises foram realizadas para os níveis taxonômicos filo e família, ao invés de gênero, pois, comparativamente, foi obtido um número maior de identificações nesse nível. Foi utilizado o total de 999 permutações por teste realizado.

Filo – A análise de similaridade revelou que existem diferenças nas comunidades bacterianas entre os microambientes amostrados, solo, água, pele e matriz ($R = 0,238$, $p\text{-valor} = 0,01$; Anosim). A avaliação entre pares de microambientes mostrou que a diferença no teste global se refere aos pares: água e matriz, solo e matriz, matriz e pele (Tabela 2). Esse resultado mostra que a comunidade microbiana do entorno dos fragmentos diferencia-se daquelas encontradas em seu interior, esteja ela presente na pele, no solo ou na água. Fica demonstrado também que essas três comunidades são similares entre si, se observado o nível taxonômico de filo.

Tabela 2. ANOSIM. Comparação entre as comunidades microbianas das amostras de água, solo, pele e matriz. Análise feita para o nível taxonômico filo.

Comparação	Estatística R	p-valor
Água & Solo	0,090	0,150
Água & Matriz	0,378	0,040*
Água & Pele	0,011	0,400
Solo & Matriz	0,582	0,010*
Solo & Pele	0,021	0,390
Matriz & Pele	0,452	0,020*

* diferença significativa a um nível de significância de 0,05.

Não foi detectada diferença nas comunidades microbianas entre fragmentos: Ditão, Benedita, Rancho do Mato, Gonzaga, Ditinha e florestas preservadas: PESM – Núcleo de Cunha, Fazenda Paraíso – Intervalos e PESM – Núcleo de Santa Virgínia ($R = -0,033$, $p\text{-valor} = 0,64$; Anosim). A análise de similaridade de duas vias, fator microambiente dependente do fator local, também não indicou diferenças entre as amostras de comunidades bacterianas ($R = -0,033$, $p\text{-valor} = 0,63$; Anosim).

Família – No nível taxonômico de família, existe diferença entre as comunidades bacterianas dos microambientes solo, água, pele e matriz ($R = 0,286$, $p\text{-valor} = 0,01$; Anosim). A análise entre pares revelou que as diferenças acontecem entre todos os pares de microambientes, com exceção do par água e pele ($R = 0,172$, $p\text{-valor} = 0,055$; Anosim), cujas comunidades são similares com relação às famílias bacterianas (Tabela 3). Mesmo nesse nível taxonômico, não foi observada diferença entre as amostras, com relação ao local: Fragmentos – Ditão, Benedita, Rancho do Mato, Gonzaga, Ditinha e florestas preservadas – PESM – Núcleo de Cunha, Fazenda Paraíso – Intervalos e PESM – Núcleo de Santa Virgínia ($R = -0,088$, $p\text{-valor} = 0,866$). Também não foi encontrada diferença na análise do microambiente aninhado no fator local ($R = -0,088$, $p\text{-valor} = 0,859$; Anosim). Dessa forma, é possível afirmar que, tanto no nível taxonômico de filo quanto no de família, as diferenças dentro de cada local são maiores que as diferenças entre os mesmos.

Tabela 3. ANOSIM. Comparação entre as comunidades microbianas das amostras de água, solo, pele e matriz. Análise feita para o nível taxonômico família.

Comparação	Estatística R	P-valor
Água & Solo	0,125	0,046
Água & Matriz	0,380	0,011
Água & Pele	0,172	0,055*
Solo & Matriz	0,390	0,013
Solo & Pele	0,811	0,020
Matriz & Pele	0,384	0,020

* diferença significativa a um nível de significância de 0.05.

Percentual de similaridade - SIMPER

A partir da confirmação das diferenças entre as comunidades, através da análise ANOSIM, a contribuição dos táxons para tais padrões observados foi determinada pela análise SIMPER. Dessa forma, foram revelados os principais táxons responsáveis pelas diferenças e similaridades entre os grupos de amostras.

Filo – Para o nível filo, a análise SIMPER mostrou que a similaridade média, calculada pelo índice Bray-Curtis, entre as amostras de água (71,17%), solo (76,9%), matriz (53,39%) e pele (76,25%), deve-se principalmente pelo filo Proteobacteria e Actinobacteria, com exceção das amostras de matriz, em que o filo Firmicutes apresentou a segunda contribuição mais importante para a similaridade (Tabela 4). Segundo a análise ANOSIM, as comunidades bacterianas das matrizes dos fragmentos são diferentes em relação às comunidades de solo, pele e água. Por meio da análise SIMPER foram identificadas as contribuições de cada filo para a determinação dessas diferenças. As diferenças entre as abundâncias do filo Proteobacteria, entre os microambientes, foi o fator que mais contribuiu para as dissimilaridades entre os pares de amostras, pois, a abundância do mesmo nas amostras da matriz é caracteristicamente inferior. O filo Firmicutes ocupa o segundo lugar em termos de contribuição para a

diferença entre os grupos e possui as maiores abundâncias nas matrizes se comparadas aos demais microambientes (Tabela 5).

Tabela 4. SIMPER. Contribuição dos filos para a similaridade dentro dos grupos de amostras: água, solo, matriz e pele.

Substratos	Filos	Abundância média	Contribuição (%)
AGUA 71.17*	Proteobacteria	0,62	76,36
	Actinobacteria	0,10	8,95
	Firmicutes	0,08	5,96
SOLO 76,9*	Proteobacteria	0,67	77,38
	Actinobacteria	0,13	11,02
	Acidobacteria	0,07	5,46
MATRIZ 53.69*	Proteobacteria	0,37	55,45
	Firmicutes	0,24	17,32
	Actinobacteria	0,11	12,83
	Acidobacteria	0,06	4,87
PELE 76.25*	Proteobacteria	0,59	68,94
	Actinobacteria	0,24	21,86

* similaridade média do grupo.

Tabela 5. SIMPER. Contribuição dos filos para as diferenças entre os grupos de água, solo, pele e matriz.

Comparações	Filos	Abundância média		Contribuição (%)
		AGUA	MATRIZ	
AGUA & MATRIZ 42.77*	Proteobacteria	0,62	0,37	29,00
	Firmicutes	0,08	0,24	22,56
	Cyanobacteria	0,02	0,12	13,44
	Actinobacteria	0,1	0,11	7,68
SOLO & MATRIZ 45.36*		SOLO	MATRIZ	
	Proteobacteria	0,67	0,37	32,35
	Firmicutes	0,01	0,24	25,44
	Cyanobacteria	0,02	0,12	12,20
PELE & MATRIZ 44.04*		PELE	MATRIZ	
	Proteobacteria	0,59	0,37	25,38
	Firmicutes	0,02	0,24	24,98
	Actinobacteria	0,24	0,11	16,74
	Cyanobacteria	0,03	0,12	12,77
	Acidobacteria	0,03	0,06	4,81
	Planctomycetes	0,03	0,02	2,89
	Chloroflexi	0,01	0,03	2,86

* dissimilaridade média do grupo.

Família – Para o nível de família a similaridade média das amostras do microambiente pele foi a maior observada (35,3%), seguido pelas amostras de solo (33,4%), matriz (28,7%) e a água, com o menor percentual (19,8%). Hyphomicrobiaceae, Xanthobacteraceae e Comamonadaceae foram as famílias que mais contribuíram para a similaridade nas amostras de água e solo. A família Bacillaceae apresentou a maior abundância média entre as amostras das matrizes, sendo a que mais contribuiu para a similaridade entre as mesmas e o maior percentual de contribuição entre todos os grupos analisados. Nas comunidades cutâneas a família Rhizobiaceae foi a mais representativa entre as amostras, qual contribuiu em 18,05% para a similaridade desse grupo (Tabela 6).

Tabela 6. SIMPER. Contribuição das famílias para a similaridade dentro dos grupos: água, solo, matriz e pele.

Substratos	Famílias	Abundância média	Contribuição (%)
AGUA 19.83*	Hyphomicrobiaceae	0,07	17,48
	Xanthobacteraceae	0,07	10,06
	Comamonadaceae	0,05	8,57
	Sinobacteraceae	0,04	8,56
SOLO 33.41*	Bradyrhizobiaceae	0,06	10,21
	Comamonadaceae	0,05	8,48
	Xanthobacteraceae	0,05	7,50
	Hyphomicrobiaceae	0,04	5,60
MATRIZ 28.66*	Bacillaceae	0,19	21,53
	Other	0,06	13,19
	Sphingomonadaceae	0,08	12,74
	Methylobacteriaceae	0,03	7,30
PELE 35.30*	Rhizobiaceae	0,11	18,05
	Bradyrhizobiaceae	0,09	14,89
	Phyllobacteriaceae	0,06	11,38
	Hyphomicrobiaceae	0,06	9,18
	Methylobacteriaceae	0,04	6,60

* similaridade média do grupo.

A análise SIMPER também mostrou o percentual de contribuição das famílias de bactérias para a diferença observada na análise de similaridade. Nessa abordagem também foi incluído o par de microambientes: água e pele (77,8% de dissimilaridade),

que apresentou uma significância muito baixa na análise ANOSIM, indicando que similaridade entre esses dois grupos é fracamente suportada pelo teste estatístico. Esse resultado é suportado pelo baixo percentual de contribuição da família Rhizobiaceae, ou seja, apenas 5,24%. Água e Matriz foram os grupos que mais se diferenciaram, em termos da abundância média de táxons (83,8% de dissimilaridade), sendo Bacillaceae a família que apresentou a contribuição mais importante para a dissimilaridade observada, a qual não foi detectada na amostra de água enquanto apresentou o maior valor de abundância nas amostras da matriz. Esse padrão foi observado para todas as comparações entre matriz e demais microambiente: solo (75,8% de dissimilaridade) e pele (80,5% de dissimilaridade), e indica que a família Bacillaceae é o táxon que melhor caracteriza esse microambiente, determinando, portanto, as diferenças observadas (Tabela 7).

A comparação entre as comunidades bacterianas do solo e da pele resultou no menor valor de dissimilaridade média (72%). Neste caso, a família Erythrobacteraceae apresentou uma abundância muito maior no solo quando comparada à pele de *P. boiei*, diferença que produziu a contribuição de 9,14% para a dissimilaridade entre esses grupos. Rhizobiaceae é a família que melhor caracteriza as comunidades cutâneas, pois sua abundância média é alta e superior quando comparada com os demais microambientes. Além disso, sua abundância tem importante contribuição para as dissimilaridades entre os grupos, ficando atrás apenas de Erythrobacteraceae, que representa o solo, e Bacillaceae, que representa a matriz. As demais famílias características da microbiota cutânea de *P. boiei* e que contribuem para as diferenças entre esta e os microambientes água, solo e matriz são: Bradyrhizobiaceae e Phyllobacteriaceae. As amostras de água são representadas pela família Xanthobacteraceae, a qual possui abundância média maior nesse microambiente e

também contribui para a sua distinção em relação aos microambientes solo (75,9% de dissimilaridade), matriz e pele (Tabela 7).

Tabela 7. SIMPER. Contribuição de famílias bacterianas para a diferença entre os grupos de água, solo, pele e matriz.

Substratos	Filos	Abundância média		Contribuição (%)
		AGUA	SOLO	
AGUA & SOLO 75,92*	Erythrobacteraceae	0,01	0,12	8,47
	Xanthobacteraceae	0,07	0,05	4,23
	Hyphomicrobiaceae	0,07	0,04	3,45
	Bradyrhizobiaceae	0,02	0,06	3,34
	Comamonadaceae	0,05	0,05	3,05
	Methylobacteriaceae	0,03	0,02	2,45
	Sinobacteraceae	0,04	0,02	2,38
		AGUA	MATRIZ	(%)
AGUA & MATRIZ 83,81*	Bacillaceae	0	0,19	11,39
	Sphingomonadaceae	0,02	0,08	4,05
	Xanthobacteraceae	0,07	0,01	3,87
	Hyphomicrobiaceae	0,07	0,01	3,55
	Other	0,02	0,06	2,95
	Acetobacteraceae	0,03	0,05	2,78
	Comamonadaceae	0,05	0,02	2,55
		SOLO	MATRIZ	(%)
SOLO & MATRIZ 75,79*	Bacillaceae	0	0,19	12,5
	Erythrobacteraceae	0,12	0,02	8,72
	Sphingomonadaceae	0,03	0,08	4,55
	Bradyrhizobiaceae	0,06	0,02	3,04
	Other	0,03	0,06	2,95
	Comamonadaceae	0,05	0,02	2,87
	Xanthobacteraceae	0,05	0,01	2,74
		AGUA	PELE	(%)
AGUA & PELE 77,28*	Rhizobiaceae	0,03	0,11	5,24
	Bradyrhizobiaceae	0,02	0,09	4,97
	Xanthobacteraceae	0,07	0,02	4,31
	Hyphomicrobiaceae	0,07	0,06	3,61
	Phyllobacteriaceae	0,01	0,06	3,23
	Methylobacteriaceae	0,03	0,04	3,03
	Comamonadaceae	0,05	0,03	2,78
		SOLO	PELE	(%)
SOLO & PELE 72,03*	Erythrobacteraceae	0,12	0,02	9,14
	Rhizobiaceae	0,02	0,11	5,72
	Bradyrhizobiaceae	0,06	0,09	3,91
	Xanthobacteraceae	0,05	0,02	3,21
	Phyllobacteriaceae	0,02	0,06	3,14
	Hyphomicrobiaceae	0,04	0,06	2,97
	Comamonadaceae	0,05	0,03	2,86
		MATRIZ	PELE	(%)
MATRIZ & PELE 80,52*	Bacillaceae	0,19	0	11,69
	Rhizobiaceae	0,01	0,11	5,92
	Sphingomonadaceae	0,08	0,02	4,6
	Bradyrhizobiaceae	0,02	0,09	4,45
	Phyllobacteriaceae	0	0,06	3,47
	Acetobacteraceae	0,05	0	2,86
	Hyphomicrobiaceae	0,01	0,06	2,86

* dissimilaridade média do grupo.

4. Discussão e conclusões

A diversidade da microbiota cutânea de P. boiei relaciona-se com a diversidade da microbiota ambiental e, em termos de composição, a microbiota cutânea é um subconjunto da microbiota que ocorre nos seus micro-habitats. A baixa similaridade entre as comunidades microbianas ambientais e as residentes, tanto nas análises de UTOs quando nas análises taxonômicas, está de acordo com achados anteriores, em que o ambiente é considerado um fator secundário para a determinação da estrutura das comunidades cutâneas de anfíbios (KUENEMAN *et al.*, 2014) e ressalta a importância do indivíduo como um microambiente regulador da comunidade hospedada. Além disso, mesmo que as comunidades microbianas presentes nos corpos de água e no solo, ambos micro-habitat ocupados pela espécie de anuro *P. boiei*, possuam certa relação com microbiota cutânea abrigada por essa espécie, a hierarquia taxonômica deve ser observada.

O presente estudo mostrou que as comunidades bacterianas dos microambientes água, solo, pele e matriz são distintas entre si, apesar de estarem em contato. A pouca similaridade existente é observada principalmente entre as amostras de solo, água e pele. Dessa forma, a microbiota cutânea de *P. boiei* está relacionada, em certa medida, às comunidades microbianas presentes nos corpos de água e nos microambientes terrestres que essa espécie ocupa. A importância do microambiente para a composição da microbiota cutânea dos anfíbios é corroborada pelo trabalho de KUENEMAN e col. (2014), no qual fica evidente que a espécie terrestre *Anaxyrus boreas* possui microbiota cutânea semelhante às comunidades microbianas encontradas no solo, enquanto que a espécie predominantemente aquática *Pseudacris regilla* apresenta microbiota semelhante às comunidades microbianas dos corpos de água.

A literatura indica que o perfil da microbiota cutânea é fortemente influenciado pela posição taxonômica do anfíbio hospedeiro (MCKENZIE *et al.*, 2012). Entretanto, outros fatores, como as comunidades presentes nos micro-hábitats, tal qual apresentado neste trabalho, parecem explicar parte dos perfis dessas comunidades residentes dos anfíbios, nos quais certa sobreposição entre as composições das comunidades é observada (KUENEMAN *et al.*, 2014; CULP *et al.*, 2007; LOUDON *et al.*, 2014). Esses resultados indicam que a microbiota cutânea dos anfíbios não consiste em um sistema fechado, podendo ser colonizada por microrganismos presentes em seus hábitats. Nesse sistema, a pele serviria de substrato para interações complexas entre microrganismos e entre estes e seu hospedeiro.

Além do microambiente, a hierarquia taxonômica é um outro aspecto a ser observado quando comparadas as comunidades microbianas ambientais e cutâneas. Nesta pesquisa foi observado que, para o nível de filo, as comunidades cutâneas são similares àquelas do solo e da água e diferentes das comunidades da matriz dos fragmentos. Porém, para o nível taxonômico de família, houve diferenças entre todos os microambientes água, pele, solo e matriz, exceto entre as amostras de água e pele, nas quais foi observada uma tendência à similaridade. A dependência da hierarquia taxonômica para as análises de comparação entre comunidades também foi observada por LAUER e col. (2008), ao compararem a diversidade de bactérias entre as espécies de salamandras *Plethodon cinereus* e *Hemidactylium scutatum*, assim como, entre duas populações de *H. scutatum*, onde a diversidade bacteriana compartilhada diminuía conforme os níveis taxonômicos filo, família, gênero e espécie, tanto entre as duas espécies de salamandras quanto entre as duas populações de *H. scutatum*. As especializações em relação aos microambientes ocupados devem ocorrer nos níveis de

organização mais baixos, nos quais pequenas modificações nas estruturas genéticas promovem diferenças entre espécies, mas não entre famílias bacterianas.

A menor relação com as comunidades microbianas das matrizes dos fragmentos, em todas as análises, deve estar atrelada ao fato de essa espécie ocupar o interior dos remanescentes florestais e sua reprodução ocorrer em riachos situados dentro ou na borda desses refúgios, não sendo comumente encontrada na matriz dos fragmentos (DIXO, 2005; observações pessoais). Uma análise comparativa entre espécies tolerantes à matriz, espécies não florestais e espécies especialistas em florestas poderia fornecer informações sobre a influência do tipo de microambiente na colonização da pele dos anfíbios e sobre o impacto do ambiente da matriz para essas comunidades.

As diversidades das comunidades microbianas ambientais variam entre os fragmentos; além disso, existe variação entre as comunidades dos micro-habitats. Os padrões de riqueza microbiana observados nos microambientes são os esperados, com o solo das áreas florestadas apresentando o maior valor seguido da água e por último a matriz dos fragmentos onde o impacto das atividades humanas resulta na redução de fontes energéticas e no desequilíbrio das características físico-químicas, condições desfavoráveis ao desempenho e à diversidade microbianos (EPSTEIN *et al.*, 1997; MADSEN, 2008, ATLAS & BARTHA, 1993). O tipo de microambiente, água, solo, pele e matriz, foi o fator mais importante para o agrupamento das amostras de comunidades bacterianas. Esse resultado indica que as condições microambientais são mais importantes na determinação da estrutura das comunidades microbianas do que as condições macroambientais, por exemplo na escala do fragmento ou paisagem (KONOPKA, 2009). No entanto, o fator local não deve ser desconsiderado, pois variações nas comunidades bacterianas entre os remanescentes foram observadas. As amostras das comunidades bacterianas das matrizes, por exemplo, apesar de formarem um grupo

consistente e distinto dos demais microambiente, são, ao mesmo tempo, distintas entre si. Isso indica que existem fatores próprios dos locais que modulam essas comunidades. Diferenças menores foram observadas entre as comunidades bacterianas dos microambientes água, solo e pele. A similaridade entre amostras com procedências distantes entre si indica, mais uma vez, que o fator microambiente é o principal na determinação dos perfis dessas comunidades.

Os efeitos da fragmentação das florestas incidem também sobre as condições dos microambientes, alterando suas características físicas e químicas (SAUNDERS *et al.*, 1991) e, portanto, suas comunidades microbianas. Um resultado que indica essa relação é observado no agrupamento entre as amostras de solo dos três locais de floresta preservadas amostrados, segundo o índice de Yue & Clayton. Um outro indicador é o agrupamento entre as comunidades microbianas dos solos das florestas preservadas dos Núcleos de Cunha e Santa Virgínia e o fragmento Benedita, na PCA. Este fragmento possui a melhor qualidade em termos de área, cobertura vegetal, drenagem e, talvez, o menor impacto humano dentre todos os fragmentos estudados nesta pesquisa. Em outras palavras, e a grosso modo, assemelha-se mais às florestas preservadas do núcleo do PESM, o que deve proporcionar condições microambientais de solo mais similares e, por consequência, uma comunidade microbiana mais relacionada. É conhecido que o nível de perturbação em uma paisagem é tão ou mais importante que as formas de uso da terra na determinação da composição e distribuição das comunidades de microrganismos no solo de um determinado local (MA *et al.*, 2015). Assim, o grau de impacto nos fragmentos pode também estar relacionado às estruturas das comunidades microbianas ambientais, mas as evidências são menores para o caso da microbiota cutânea.

Para a microbiota cutânea de *P. boiei*, os resultados observados nos índices de diversidade indicam que, apesar de pouca, existe diferença entre locais nas diversidades da microbiota cutânea. Essas diferenças ficam mais evidentes na comparação par a par, pelo método *unifrac*. A partir dos resultados é possível afirmar que a microbiota cutânea de *P. boiei*, apesar de possuir uma estrutura própria, ou seja, com pouca relação com as comunidades dos microambientes ocupados, apresenta variações entre locais. Conforme resultados do Capítulo 1 desta tese, a microbiota cutânea de *P. boiei* possui variação entre indivíduos e entre populações. Apesar de a análise individual não ter sido realizada na presente abordagem, a variação entre populações também foi observada no nível das UTOs, confirmando o padrão observado no componente cultivado da microbiota cutânea.

Resultados de trabalhos anteriores também mostram a existência da variação entre indivíduos (LAUER *et al.*, 2007) e entre locais (KUENEMAN *et al.*, 2014), mas essas variações são menores que aquelas observadas entre espécies, o que ressalta a importância da espécie hospedeira para a composição da microbiota cutânea dos anfíbios estudados (MCKENZIE *et al.*, 2012). Na presente pesquisa, as variações entre locais são interpretadas como indicadores da influência ambiental para a comunidade microbiana associada e, sob tal aspecto, as consequências para os anfíbios carecem de investigação.

Apesar da variação, os filos Proteobacteria, Actinobacteria e Acidobacteria, os principais identificados, apresentaram abundâncias relativas similares na microbiota cutânea de *P. boiei*, entre os locais amostrados. Considerando somente os dois primeiros filos foi possível observar uma contribuição de mais de 90% para a similaridade de microbiotas cutâneas entre locais. Resultados parecidos foram encontrados em trabalho anterior nas espécies *Ambystoma tigrinum*, *Pseudacris triseriata* e *Lithobates pipiens*,

em que, com apenas uma exceção, as proporções do gênero *Curvibacter* foram as mais altas entre todos os respectivos locais de amostragem dessas espécies (MCKENZIE *et al.*, 2012).

Em uma pesquisa anterior, a estabilidade da microbiota cutânea da espécie de salamandra *Plethodon cinereus* foi atribuída ao contato com os microrganismos do solo e à fração de bactérias simbiontes que mantinham suas populações mesmo na ausência desse repositório de bactérias (LOUDON *et al.*, 2014). Mesmo que existam variações, se forem observadas as relações entre as microbiotas cutâneas de anfíbios com procedências distintas, tanto do ponto de vista da distância geográfica quanto da qualidade do hábitat, é possível afirmar que existe certa estabilidade na microbiota cutânea de *P. boiei*.

Uma fração da comunidade que deve apresentar estabilidade estaria relacionada às famílias de bactérias Rhizobiaceae, Bradyrhizobiaceae, Phyllobacteriaceae, Hyphomicrobiaceae e Methylobacteriaceae, que foram responsáveis pela similaridade encontrada entre as microbiotas cutâneas de diferentes procedências. À exceção de Rhizobiaceae, que foi identificada para as espécies *Notophthalmus viridescens* (CULP *et al.*, 2007) e *Agalychnis callidryas* (ANTWIS *et al.*, 2014), as demais famílias Bradyrhizobiaceae, Phyllobacteriaceae, Hyphomicrobiaceae e Methylobacteriaceae, não foram detectadas em outras espécies de anfíbios previamente estudadas, o que mostra certa especificidade da comunidade hospedada para com a espécie de anfíbio. Por outro lado, se considerado um nível taxonômico superior, é possível observar que os principais filos já foram identificados na microbiota cutânea de outras espécies de anfíbios (Tabela 1, Anexos). Mesmo que ocorram variações na dominância destes filos entre espécies, ou mesmo entre populações, a partir desses trabalhos, junto com os dados para *P. boiei* aqui apresentados, é possível afirmar que esses são os filos mais

comuns na microbiota cutânea dos anfíbios estudados até o momento, independentemente da distribuição geográfica e das relações filogenéticas entre elas.

As principais famílias identificadas na microbiota cutânea de *P. boiei* caracterizam esse sistema, pois, apresentaram abundâncias muito superiores em relação às suas abundâncias nos demais microambientes: água, solo e matriz, ou foram ausentes nestes. A família Rhizobiaceae é composta por gêneros de bactéria que ocorrem em associações benéficas, quando auxiliam na fixação de nitrogênio atmosférico ou maléficas no caso de gêneros patogênicos de plantas. Membros da família Phyllobacteriaceae também são encontrados em associação com raízes de plantas. Na família Hyphomicrobiaceae são encontrados gêneros que utilizam fonte de carbono para seu crescimento, capazes de crescer em ambientes oligotróficos, como corpos de água, ou no solo onde podem apresentar autotrofia. Bradyrhizobiaceae inclui gêneros associados às raízes de plantas para a fixação de nitrogênio. A família Methylobacteriaceae contém grupos metanotróficos, sendo utilizados em determinadas condições para a despoluição ambiental devido à capacidade de degradar clorometanos; outros grupos podem se associar a leguminosas para a fixação de nitrogênio (KERSTERS *et al.*, 2006). A partir dessas descrições, é possível concluir que as principais famílias de bactérias hospedadas por *P. boiei* são caracterizadas por ocuparem normalmente o solo e estarem em associação com raízes de plantas, em alguns grupos.

As comunidades microbianas ambiental e cutânea têm relação com variáveis ambientais abióticas. As variações na diversidade das comunidades microbianas entre locais, que estão relacionadas à porção pouco estável da microbiota cutânea, podem estar ligadas às condições microambientais de cada remanescente de floresta. Embora abordagens experimentais sejam necessárias, a presente pesquisa indicou que algumas variáveis abióticas têm relação com as comunidades microbianas estudadas dos

microambientes: pele, solo, água e matriz. A umidade média relativa dos microhábitas e a temperatura dos riachos ocupados por *P. boiei* podem ser fatores significativos para a microbiota cutânea dessa espécie. Os fatores abióticos dos micro-hábitats terrestres: amplitude de temperatura, temperatura média e umidade relativa média. Os parâmetros da água são: temperatura, pH, percentual de oxigênio dissolvido e salinidade. Além das variáveis espaciais: tamanho e isolamento das florestas. Todas essas variáveis devem ter relação com as comunidades microbianas do ambiente e podem ser consideradas em pesquisas futuras.

Na presente pesquisa, variações nas linhagens bacterianas entre as comunidades de diferentes procedências foram identificadas para os quatro microambientes analisados pele, água, solo e matriz, o que indica que as condições ambientais locais podem afetar essas comunidades. Porém, existe uma consistência nas estruturas das mesmas, nas quais o microambiente é o maior preditor de seus perfis. A diversidade e certa particularidade quanto à composição da microbiota cutânea de *P. boiei* indicam que existem características próprias da pele dessa espécie e de sua biologia que, possivelmente, modulam a estrutura da comunidade microbiana associada. Porém, não é pertinente afirmar que esse sistema está isolado das condições ambientais, sejam elas de natureza biótica ou abiótica. Assim, pesquisas futuras que investiguem sobre a maneira como a microbiota cutânea residente interage com o ambiente que o animal ocupa proporcionarão a compreensão sobre as consequências da alteração do hábitat para essas comunidades hospedadas.

CAPÍTULO III

“Atividade Antimicrobiana na pele de *Proceratophrys boiei*:
Secreção e Microbiota Cutâneas”

Resumo

Na pele dos anfíbios, peptídeos antimicrobianos e metabólitos produzidos por bactérias residentes devem atuar na proteção contra agentes patogênicos. O percentual de bactérias com produção de antimicrobianos e o espectro de ação dos peptídeos produzidos na derme devem estar relacionados às diferenças na vulnerabilidade dos anfíbios aos patógenos. A presente pesquisa teve como objetivos a identificação e determinação dos percentuais de bactérias produtoras de antimicrobianos na microbiota cutânea da espécie *Proceratophrys boiei*; a caracterização taxonômica dos gêneros bacterianos com atividade antimicrobiana e seus espectros de ação; a investigação das variações do efeito e da composição de bactérias com atividade antimicrobiana entre populações de *P. boiei*; a avaliação dos perfis da secreção cutânea de *P. boiei* em diferentes populações e seu efeito contra o crescimento de patógenos conhecidos. Além disso, a eficiência dos metabólitos e da secreção cutânea contra o crescimento de diferentes cepas do fungo quitrídio *Batrachochytrium dendrobatidis* foi testada. Foram detectados 84 morfotipos com atividade antimicrobiana entre 517 morfotipos bacterianos isolados de diferentes populações de *P. boiei*. Os percentuais de bactérias com atividade antimicrobiana variaram entre as populações de 5,6% a 64% de bactérias com tal propriedade, entre todos os morfotipos isolados em cada local. Os gêneros antimicrobianos mais abundantes foram: *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Chryseobacterium* e *Pedobacter*. Suas abundâncias, assim como as dos demais gêneros, variaram entre as populações de *P. boiei*. Os espectros de ação variaram entre os gêneros bacterianos identificados, sendo observado no gênero *Microbacterium* o maior espectro e em *Pedobacter* o menor espectro. A secreção cutânea de *P. boiei* não mostrou atividade microbiana contra o crescimento do patógeno *Aeromonas hydrophila*, mas foi demonstrada para o patógeno *Escherichia coli*, e não houve diferenças importantes entre populações. Do mesmo modo, os perfis de secreção cutânea foram similares entre as populações de anfíbios. O total de 18 gêneros bacterianos apresentou atividade antimicrobiana contra o crescimento do fungo quitrídio, assim como os extratos naturais da secreção cutânea de 29 indivíduos. Porém, nesse caso, houve diferenças importantes na susceptibilidade das cepas aos extratos. Os resultados mostraram que a microbiota cutânea de *P. boiei* é composta por populações de bactérias capazes de inibir o crescimento de patógenos importantes. Todos os indivíduos apresentaram pelo menos um tipo bacteriano com atividade antimicrobiana, mas os percentuais e abundâncias de bactérias com essa propriedade variaram entre populações e tal resultado pode ter implicações importantes para a susceptibilidade desses animais a doenças infecciosas. Em relação à atividade antimicrobiana, a secreção cutânea de *P. boiei* não está entre as mais potentes se comparada a espécies tipicamente produtoras de secreções antibióticas, como *Phyllomedusa distincta*. Porém, mostrou importância para a inibição do fungo quitrídio *B. dendrobatidis*. Secreção cutânea e metabólitos bacterianos devem atuar em sinergia no combate às infecções, porém, as diferenças entre populações devem ser observadas em ambos os componentes. **Palavras-chave:** anfíbios. microbiota cutânea. secreção cutânea. populações. atividade antimicrobiana. *Batrachochytrium dendrobatidis*.

Abstract

On the skin of amphibians antimicrobial peptides and metabolites produced by living bacteria must act in protecting against pathogens. The percentage of bacteria with production of antimicrobial molecules and the action spectrum of antimicrobial peptides produced in the dermis must imply differences in vulnerability to pathogens. This research aimed to identify and determine the percentage of antibiotic-producing bacteria on the skin microbiota of *Proceratophrys boiei*; to make a taxonomic characterization of bacterial genera with antimicrobial activity and their action spectrum; to investigate the effect of variations and composition of bacteria with antimicrobial activity among populations of *P. boiei*; to evaluate profiles of skin secretion in different populations and its effect against the growth of pathogens known. Furthermore, the efficiency of metabolites and skin secretions against the growth of different strains of the fungus chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* was tested. In total, 84 morphotypes were detected with antimicrobial activity between 517 morphotypes bacterial isolates from different populations of *P. boiei*. The percentage of bacteria with antimicrobial activity varied among the populations of 5.6% to 64% of bacteria with such property among all morphotypes isolated at each location. The most abundant antimicrobial genus were: *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Chryseobacterium* and *Pedobacter* and their abundances as well as those of other genus, varied among populations of *P. boiei*. The action spectrum across several bacterial genera identified, so that the genus *Mycobacterium* displayed the largest spectrum and *Pedobacter* the lowest one. The skin secretion of *P. boiei* showed no microbial activity against the growth of the pathogen *Aeromonas hydrophila*, but it was effective against the pathogen *Escherichia coli*, with no significant differences between populations. Also, skin secretion profiles were similar between populations. The 18 bacterial genera showed antimicrobial activity against the growth of chytrid fungus, as well as natural extract of skin secretion of 29 individuals. However, in this case, there were major differences in the susceptibility of strains to the extracts. The results showed that the microbiota skin of *P. boiei* consists of populations of bacteria capable of inhibiting the growth of important pathogens. All individuals sampled had at least one bacterial type with antimicrobial activity, but the percentage and abundance of bacteria with this property varied between populations. This finding may have important implications for the susceptibility of these animals to infectious diseases. In terms of antimicrobial activity, the skin secretion of *P. boiei* does not figure among the most potent, if compared to other amphibian species such as *Phyllomedusa distincta*. However, it does inhibit the chytrid fungus *B. dendrobatidis*. Skin secretion and bacterial metabolites should work together and complement each other in fighting infection, however, differences between populations should be observed in both components.

Keywords: amphibians. skin microbiota. skin secretion. populations. antimicrobial activity. *Batrachochytrium dendrobatidis*.

1. Introdução

Proteção sobre a pele dos anfíbios: metabólitos bacterianos e peptídeos

Moléculas antibióticas são produzidas por uma grande diversidade de organismos, desde microrganismos até animais complexos. É provável que o sucesso evolutivo em diversos grupos esteja atrelado a esses compostos, que atuam na defesa dos mesmos, favorecendo o estabelecimento de populações nos mais variados habitats (ZASLOFF, 2002). Uma evidência para esse postulado é a existência dos peptídeos antimicrobianos, uma classe de antibióticos bem conhecida, cuja especificidade deve refletir a adaptação das espécies aos diferentes perfis microbianos encontrados na natureza (SIMMACO *et al.*, 1998). Nos vertebrados, essas moléculas produzidas no tecido epitelial atuam como uma barreira contra microrganismos invasores e, como parte do sistema imune inato, executam essa função protetora de maneira mais imediata que a imunidade adaptativa desses animais (BOMAN, 2000).

A proteção provida por microrganismos a organismos eucarióticos é também comum na natureza (WHITE & TORRES, 2009). Nos anfíbios, a pele junto com a microbiota cutânea residente e os peptídeos antimicrobianos são barreiras naturais que previnem o acesso, a colonização e a invasão desse tecido por agentes patogênicos. A microbiota residente pode ser compreendida pela comunidade de microrganismos, nesse caso, presente sobre a pele dos anfíbios sem lhes causar doenças e adaptada às condições ali prevalentes, em que fontes nutricionais devem ser providas pelas secreções cutâneas ao mesmo tempo em que ocorre a liberação de metabólitos secundários que possuem efeito antibiótico contra microrganismos invasores e/ou transientes dos hospedeiros (BECKER *et al.*, 2009; BECKER *et al.*, 2015).

A heterogeneidade dos peptídeos antimicrobianos presente em diferentes espécies de anfíbios tem sido demonstrada por muitos estudos, nos quais famílias de

peptídeos com pouca ou nenhuma similaridade mostram especificidade para com variados microrganismos (MOR *et al.*, 1994; CONLON *et al.*, 2004). Foi recentemente demonstrado que variações no perfil peptídico das secreções dérmicas influenciam diretamente a habilidade de cada animal resistir às infecções por microrganismos patogênicos. A susceptibilidade dos anfíbios ao fungo quitrídio *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) foi examinada por WOODHAMS e col. (2006a) com base nos peptídeos antimicrobianos. Os autores demonstraram que a efetividade dos peptídeos cutâneos se relaciona com o grau de declínio de populações de anfíbios quando em contato com o *Bd*. Ao mesmo tempo, populações produtoras extratos peptídicos com menor poder inibitório do crescimento desse fungo mostraram declínio na mesma área de estudo.

A microbiota cutânea dos anfíbios, um componente biológico de proteção, deve proporcionar maior proteção para o anfíbio devido à redução do espaço onde o patógeno pode se fixar; o metabólito antimicrobiano produzido poderem matar o patógeno diretamente; e, finalmente, devido aos metabólitos produzidos podem repelir o patógeno invasor (LAM *et al.*, 2011). Essa comunidade microbiana pode evitar verdadeiras epidemias, deflagradas por patógenos importantes como o *Bd*, em populações selvagens deste grupo. WOODHAMS e col. (2007) observaram que 85% dos indivíduos de uma população persistente de *Rana muscosa*, em contato com o fungo *Bd*, abrigava bactéria anti-*Bd* sobre a pele, ao mesmo tempo em que a propriedade antimicrobiana dos peptídeos dérmicos, por si só, não explicava a diferença na vulnerabilidade à quitridiomiose entre as populações. LAM e col. (2010), explicaram a persistência de certas populações de *Rana muscosa*, que co-ocorria com o *Bd*, pela presença de bactérias anti-*Bd* na microbiota cutânea. Os autores sugeriram que uma alta proporção de indivíduos com bactéria anti-*Bd* poderia limitar a disseminação da doença na

população, embora um estudo paralelo dos peptídeos não tenha sido realizado, como no trabalho de Woodhams, citado acima.

Conforme dito, peptídeos e microbiota cutânea devem atuar como sistemas complementares na proteção dos anfíbios contra microrganismos patogênicos (MYERS *et al.*, 2012). Uma evidência para essa afirmação é que a regulação da produção dos peptídeos cutâneos é estimulada pela presença de microrganismos sobre a pele. Nesse caso, a microbiota cutânea atuaria como um regulador da proteção exercida pelos peptídeos, ao mesmo tempo em que seria regulada pelos mesmos, uma vez que atuaria como um filtro impedindo a colonização por determinadas bactérias ambientais não resistentes à ação de tais moléculas (MANGONI *et al.*, 2001; ASHCROFT *et al.*, 2007).

Vulnerabilidade dos anfíbios às doenças

Os anfíbios têm um ciclo de vida que inclui uma fase aquática e outra terrestre, além de uma pele altamente permeável, a qual é considerada a chave do sucesso evolutivo do grupo. Essa alta permeabilidade, ao mesmo tempo, pode facilitar a livre passagem de elementos prejudiciais do ambiente, como químicos sintéticos, além da infecção por agentes biológicos, como bactérias e fungos (WELLS, 2007). Por isso, apesar de possuir um sistema imune sofisticado, o modo de vida desse grupo pode promover uma grande susceptibilidade às alterações ambientais e a um amplo espectro de agentes patogênicos, especialmente àqueles que promovem infecções na pele (PESSIER, 2002). Na pele dos anfíbios a resposta mediada pelo sistema imune adaptativo é mais lenta. Por isso, a imunidade executada pelas barreiras naturais, primariamente peptídeos antimicrobianos, consiste em um mediador imediato da permanência dos indivíduos no ambiente (ROLLINS-SMITH *et al.*, 2002).

Os anfíbios são o grupo de vertebrados em que foram detectadas as maiores perdas populacionais nas últimas décadas e entre as principais causas desse fenômeno

estão as doenças infecciosas (HOULAHAN *et al.*, 2000). Porém, a literatura sobre a dinâmica da relação hospedeiro-agente-ambiente é escassa e consiste, principalmente, de casos reportados ou pesquisas com grande ênfase em animais cativos. No hábitat natural os agentes etiológicos podem causar alterações fisiológicas que comprometem a sustentabilidade das populações ou a morte direta dos indivíduos (BLAUSTEIN & KIESECKER, 2002). Muitos dos agentes causam infecções ou invadem o corpo dos animais pela pele. Por exemplo, a micobacteriose, a mais antiga infecção conhecida dos anfíbios, é causada por bactérias do gênero *Mycobacterium* que invadem o corpo do hospedeiro por meio da pele e do trato respiratório e acometem outros órgãos (HOFF *et al.*, 1984). Outro exemplo é a doença das pernas vermelhas, caracterizada por septicemia bacteriana, em que normalmente está envolvida a bactéria oportunista *Aeromonas hydrophila* (REICHENBACH-KLINKE & ELKAN, 1965). A maioria das doenças conhecidas dos anfíbios (estudada em animais de cativeiro) é causada por bactérias, geralmente Gram negativas, como as pertencentes aos gêneros *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Arizona*, *Edwardsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas* e *Mima*. Contudo, as Gram positivas *Staphylococcus* e *Streptococcus* também estão relacionadas a doenças sistêmicas e locais (DE PAULA, 2011).

Entre as doenças causadas por fungos, a quitridiomicose tem recebido muita atenção e, atualmente, é uma doença de anfíbio bem estudada. Isso tem ocorrido, em parte, por causa do dramático declínio populacional e por sua ampla ocorrência em diferentes partes do mundo, com mais 500 espécies infectadas em cada continente, com exceção da Antártica, onde não existem espécies de anfíbios (OLSON *et al.*, 2013). Embora pesquisas experimentais não tenham demonstrado causalidade direta com eventos de extinção em campo, *B. dendrobatidis* é um parasita intracelular que ataca as

partes queratinizadas do epitélio de anfíbios adultos e partes bucais dos girinos, e invade as células (SYMONDS *et al.*, 2008; WELDON *et al.*, 2004; LONGCORE *et al.*, 1999).

Nem todas as populações de anfíbios sucumbem por ocasião da chegada do *Bd*, ou seja, a susceptibilidade varia entre populações. Rodriguez e col. (2014) demonstraram, pelo uso de métodos moleculares, que populações de anfíbios da Floresta Atlântica convivem com o *Bd* há mais de cem anos, sem nenhuma evidência de perdas em massa de anfíbios nesse bioma. Características fisiológicas, como a imunidade, e comportamentais das espécies hospedeiras que convivem com o *Bd* devem estar adaptadas à convivência com o fungo nessas populações (LIPS, 2014). Utilizando técnicas de proteômica FISHER e col. (2009) mostraram diferenças no crescimento, nas características morfológicas e na virulência entre diferentes cepas do *Bd*. Uma diversidade genética e fenotípica do *Bd* é observada entre populações e regiões geográficas (SCHLOEGEL *et al.*, 2012) e pode ser uma das explicações para a variação na virulência, uma vez que, essas variações podem estar ligadas à dinâmica patógeno-hospedeiro.

A vulnerabilidade das populações de anfíbios aos patógenos no ambiente natural desses vertebrados pode ser afetada pela eficácia das secreções dérmicas e da microbiota cutânea contra agentes patogênicos. BOMAN e col. (2000) sugerem que tais componentes biológicos e bioquímicos estão ligados e operam sinergicamente para proteger o hospedeiro contra agentes de doenças infecciosas. Esses mecanismos de defesa são especialmente relevantes para os anfíbios pela constante exposição a uma grande diversidade de micróbios nos seus ambientes aquático e terrestres. A investigação de mecanismos que influenciam a vulnerabilidade dos anfíbios às doenças é urgente, dadas as recentes perdas de populações selvagens.

Como discutido acima, diferenças na susceptibilidade dos anfíbios dependem de características intrínsecas e extrínsecas, que serão observadas neste capítulo. Secreção e microbiota cutânea foram os fatores intrínsecos, enquanto a procedência do hospedeiro e a diversidade de patógenos foram os fatores extrínsecos considerados. O objetivo geral deste capítulo foi investigar se a microbiota cutânea e as secreções dérmicas da espécie de anfíbio anuro *P. boiei* atuam na proteção contra microrganismos patogênicos. Objetivos mais específicos consistiram em fazer uma “varredura” em espécimes de diferentes populações para determinar os percentuais bacterianos capazes que inibir o crescimento de patógenos *in vitro* e identificar os gêneros bacterianos com atividade antimicrobiana. Em seguida, o objetivo foi verificar se existem variações importantes entre populações nos percentuais, atividade antimicrobiana e diversidade de bactérias com produção de antimicrobianos, bem como nos perfis das secreções em diferentes populações de *P. boiei*. Dada a importância atual do fungo *B. dendrobatidis*, esses dois componentes de proteção de *P. boiei* também foram testados para verificar suas eficácias contra diferentes cepas do fungo.

2. Material e Métodos

Microbiota cutânea

Isolamento e identificação de morfotipos bacterianos

A riqueza bacteriana da microbiota cutânea de *P. boiei* foi estimada de acordo com a morfologia da colônia. A identificação dos morfotipos foi realizada sob lupa (*Quimis*[®]) e sua descrição foi baseada na cor, forma, borda, elevação, superfície (lisa ou rugosa) e no brilho da colônia; além de outros aspectos ocasionalmente observados como, por exemplo, a presença de grânulos (EATON *et al.*, 1995; OGRAM & FENG, 1997). Cada morfotipo foi isolado em capela de fluxo laminar (*Germ Free*

Laboratories Inc.) por meio da transferência de uma pequena amostra da colônia para uma nova placa com o meio R2A ágar, pelo método de esgotamento (MADIGAN *et al.*, 2009). Após a certificação da pureza das colônias por microscopia de lâminas preparadas pelo método de coloração de Gram, os morfotipos foram transferidos para um tubo de vidro de 5 mL, contendo meio R2A ágar inclinado (*stab*), e estocados em geladeira a 8°C. Com exceção dos fragmentos G4 e Pimenta, os morfotipos bacterianos foram isolados por local de amostragem. Essa alteração nos procedimentos de amostragem se deu devido à impossibilidade de realizar a manutenção de milhares de cepas no período de tempo da pesquisa. Porém as estimativas de riqueza e abundância bacteriana cultivada foram estimadas por indivíduo.

A identificação taxonômica dos morfotipos foi realizada por meio de sequenciamento do gene RNAr 16S. A fita molde do DNA (*template*, do inglês) foi obtida diretamente da colônia cultivada utilizando um palito estéril. O material foi transferido e diluído em 20 µL de água estéril, de que foi retirado 1 µL para amplificação do gene (SAMBROOK & RUSSEL, 2000). A amplificação foi executada utilizando-se os iniciadores universais 27F (5' – AGAGTTTGATCCTGGCTCAG – 3') e 1492 R (5' – ACGGCTACCTTGTTACGACTT – 3') (LANE, 1991). Cada reação foi composta por 1 U de *Top Taq Master Mix* (*Qiagen*), que contém tampão com 3mM de MgCl₂ e 400µM de cada dNTP, 0,20 µM de cada iniciador e, aproximadamente, 50 ng de DNA em um volume final de 25µL. O programa de amplificação consistiu em: 3 minutos de desnaturação inicial a 95°C, seguidos de 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 52°C para anelamento e 1:40 minutos a 72°C para extensão e um ciclo final a 72°C por 7 minutos (LANE, 1991). O DNA de *Escherichia coli* foi utilizado como controle positivo da reação e o produto obtido foi purificado usando o *kit GeneJET PCR Purification* (*Thermo Scientific*). As sequências de nucleotídeo foram

analisadas no parque tecnológico da Universidade Católica de Brasília. As sequências obtidas das bactérias isoladas foram editadas no programa *Bioedit* (HALL, 1999) e a classificação foi executada no *Ribosomal Database Program* (RDP), usando as ferramentas *Classifier* e *Sequence match* (COLE *et al.*, 2010).

Para a identificação dos isolados bacterianos que possuem atividade antimicrobiana foi realizado o método do “traço cruzado” (do inglês *cross-streak*), (WILLISTON *et al.*, 1947). Trata-se de um método simples utilizado para a busca de novos antibióticos e a determinação de seus espectros de ação, produzidos por microrganismos capazes de crescer em meio de cultivo sólido. O método tem a vantagem de permitir que diversos testes sejam realizados ao mesmo tempo, uma vez que é possível inocular várias cepas em uma mesma placa. O indicativo da produção de antimicrobianos é o surgimento de zonas de inibição de crescimento das cepas indicadoras. Esse método é bastante eficiente para componente que se difundem no meio de cultivo.

Cada um dos morfotipos bacterianos isolados foi inoculado em um dos lados da placa de Petri 90 x 15 mm, contendo o meio de cultivo sólido R2A (Difco) e incubados à temperatura ambiente média de 22°C, até que toda a região fosse coberta por uma massa de células visíveis a olho nu. Após essa etapa, traços perpendiculares de cepas bacterianas de referência foram feitos no lado oposto da placa e incubadas por 24 horas nas respectivas temperaturas ótimas de crescimento, já determinadas: *Micrococcus luteus* (ATCC 7468) e *Enterobacter aerogenes* (ATCC 113048) foram incubadas a 30°C, enquanto que *Klebsiella pneumoniae subsp. Pneumoniae* (ATCC 4352), *Staphylococcus aureus* (ATCC 14458), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Enterococcus faecalis* (ATCC 10100), *Proteus vulgaris* (ATCC 13315), *Enterobacter aerogenes* (ATCC 113048), *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Salmonella enterica*

subsp. Entérica serovar Enteritidis (CT) (ATCC 13076), *Salmonella enterica subsp. Entérica serovar Typhi* (ATCC 6539), *Aeromonas hydrophila* (IOC/FDA 110-36) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) foram incubadas a 37°C.

As siglas antes da numeração das cepas bacterianas fazem referência à procedência desses microrganismos: ATCC é a sigla para *American Type Culture Collection* (EUA), que caracteriza cepas padrão depositadas em coleções de microrganismos; IOC/FDA é referente às Fundações Oswaldo Cruz e Ataulpho de Paiva (BRA). Todas as cepas de referência usadas nos testes foram cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz / RJ. Passado o tempo de crescimento, o indicativo da produção de antibióticos foi a ausência de crescimento das bactérias testes na região próxima à massa de crescimento do microrganismo produtor. Linhas paralelas foram feitas sobre a placa com um espaçamento de 0,5cm entre as mesmas, para a quantificação do potencial antimicrobiano do antibiótico produzido pelo novo isolado bacteriano (Figura 1).

Figura 1. Traço cruzado. As três imagens superiores não mostram atividade antimicrobiana do isolado em teste; as três placas do meio mostram atividade antimicrobiana pela ausência de crescimento em parte dos traçados de patógenos; as três imagens inferiores mostram os controles do crescimento de patógenos na ausência de bactérias isoladas de *P. boiei*.

Secreção cutânea

Coleta de secreções

Amostras da secreção cutânea dos indivíduos da espécie *P. boiei* foram obtidas após a depleção das glândulas dérmicas, por meio de estimulação elétrica. Para essa finalidade, um aparelho estimulador transcutâneo (GRANT & LAND, 2002) foi utilizado para executar uma tensão elétrica de 6 V durante 2 min na região abdominal, com intervalos de 2 s. Após esta etapa, a secreção da pele era lavada em água Milli-Q até

completar o volume de 40 mL em um tubo de polipropileno de 50 mL, que era imediatamente levado ao freezer para o congelamento e preservação do material a -20°C. A região ventral dos indivíduos foi escolhida para a estimulação elétrica, pois, ao mesmo tempo em que garante a depleção de glândulas ventrais e dorsais, evita o contato do eletrodo com a grande parte das secreções, que são secretadas pelas glândulas dorsais.

Todas as amostras foram secadas em aparelho liofilizador e mantidas a -20°C até o início dos experimentos, ou seja, cerca de sete meses desde a amostragem do último espécime em campo. Foram utilizadas amostras de 106 indivíduos para os bioensaios, agrupados por procedência e sexo. Foram priorizadas amostras de machos adultos, procedentes dos fragmentos florestais. No entanto, devido à escassez de espécimes obtidos nas florestas contínuas, optou-se por fazer agrupamentos com todos os indivíduos nessas duas localidades (Tabela 1).

Tabela 1. Agrupamentos de indivíduos de *P. boiei* para análises de secreções dérmicas.

Fragmento	Sexo	Total de indivíduos
Pimenta	Macho	9
G4	Macho	10
Pantheon	Macho	11
Sidney	Macho	10
Rancho do Mato	Macho	10
Gonzaga	Macho	10
Ditinha	Macho	18
Ditão	Macho	10
PESM-Santa Virgínia	Macho/Fêmea	10
PESM-Cunha	Macho/Fêmea	8

Quantificação das amostras

Para cada agrupamento de amostras de secreção dérmica a quantificação de proteínas foi feita com modificações do método descrito por BRADFORD (1976) com o

reagente Protein Assay Dye Reagent (Biorad). Para cada 10 µl de amostra 200 µl de reagente (diluído 4x) foi utilizado. As leituras foram executadas em aparelho de Elisa com comprimento de onda de 492 nm. Após a determinação das concentrações de proteínas, foram feitas diluições seriadas: 1:1, 1:4, 1:8, 1:20 e 1:50.

Bioensaio

A atividade antimicrobiana da secreção de *P. boiei* foi mensurada a partir de bioensaios realizados para a determinação da capacidade inibitória mínima (CIM) que se refere, neste trabalho, à menor concentração de extrato bruto de secreção necessária para que nenhum crescimento bacteriano seja observado. Os patógenos *Aeromonas hydrophila* (IOC/FDA110-36) e *Escherichia coli* (ATCC 10536) foram cultivados em meio líquido R2A Difco por um período de 14 h em temperatura de 37°C e agitação de 280 rpm. Esse preinóculo foi então diluído 50 vezes e teve seu crescimento monitorado por meio de leituras de densidade óptica, em comprimento de onda de 600 nm, até atingir entre 0,5 e 0,6 de DO, fase log do crescimento populacional. Nessa fase uma segunda diluição foi procedida de acordo com os resultados observados nas curvas de crescimento, de maneira que, o inóculo inicial do bioensaio tivesse 10⁵ UFC/mL.

Foram utilizadas microplacas de ELISA, nas quais se inoculou 50 µl do cultivo do patógeno e 50 µl do extrato bruto da secreção, em cada poço e em triplicata. A diluição de 50 vezes do extrato bruto foi considerada para os bioensaios, onde se utilizou as concentrações: 128 µg/mL, 256 µg/mL, 512 µg/mL e 1.024 µg/mL. Três controles foram feitos para cada experimento e em triplicata: um controle positivo (meio + patógeno) e dois controles negativos (meio estéril e meio + patógeno + ampicilina 100mg/mL). As placas foram incubadas no equipamento para a realização do método ELISA e, portanto, a análise da interação entre a secreção dérmica e os patógenos, por

um período de 12 horas em temperatura de 37°C, com intervalos de leituras da absorbância (600 nm) de 1h.

Purificação

A cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês: *High Performance/Pressure Liquide Chromatography*, HPLC), de fase reversa, permite a separação e purificação de moléculas a partir de um extrato bruto. O cromatograma resultante do processo permitiu a comparação entre os perfis das secreções cutâneas de *P. boiei* submetidas aos bioensaios.

Os extratos brutos das amostras foram ressuspensos em 1mL de água Milli-Q e centrifugados por 5 min a 13.400 rpm. Aliquotas de 200 µL dos sobrenadantes obtidos por amostra foram aplicados em uma coluna C18 de fase reversa *ShimPack ODS*, pré-equilibrada com 5% de acetonitrila (ACN) e 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) em um cromatógrafo de alta eficiência (*Shimadzu*). As amostras foram eluídas e coletadas manualmente em tubos de polipropileno sob um gradiente 5 a 95% de ACN/TFA 0,1% com fluxo de 1 mL/min durante 60 minutos. A absorbância foi observada à 216 e 280 nm com uso do programa *LC Real Time Analysis* e, ao final da eluição, as amostras foram estocadas a -20°C. Cada fração identificada deve ser entendida como uma população de moléculas que são eluídas em uma determinada concentração de ACN.

B. dendrobatidis

As técnicas utilizadas para o cultivo e manutenção do *Bd* foram adaptadas do protocolo descrito por Rollins-Smith e col. (2002). Brevemente, o cultivo inicial do fungo foi realizado em meio Triptona 1% caldo. Seis dias após, 1mL desse cultivo foi inoculado em placa de petri contendo o meio Triptona 1% ágar, sendo incubado por 7 dias entre 21 e 23°C. Para a coleta dos zoósporos, após a semana de crescimento em

placa, o cultivo foi “lavado” com 3mL de meio Triptona caldo e esta suspensão foi imediatamente filtrada em membrana de 0,20µm estéreis (*Spectra Mesh Woven Polymer Macrofiltration*) para a remoção de células adultas. Para a contagem, os zoósporos foram corados em *Trypan blue* 0,4%, na proporção 1:9, visualizados e contados em câmara de *Neubauer*. A concentração foi diluída em meio Triptona caldo até a concentração experimental de $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$.

Metabólitos

Para a extração dos metabólitos de bactérias isoladas da microbiota cutânea de *P. boiei* as cepas isoladas foram inoculadas em 50 mL de meio R2A caldo à temperatura ambiente até que o cultivo atingisse a fase estacionária do crescimento. O monitoramento do crescimento bacteriano foi realizado através da densidade óptica em espectrofotômetro (DO), com comprimento de onda de 595 nm. A fase estacionária das cepas era atingida em tempo e DO diferentes entre as mesmas, mas a sua variação esteve entre 0,6 a 0,9 nm e o tempo entre 24 e 72 hrs. A primeira etapa de purificação do sobrenadante foi realizada por meio da centrifugação do inóculo durante 10 min a 7.500 rpm; a seguir o material líquido era filtrado em membrana com poros de 0,22 µm (*Millex, Millipore*) para a remoção de todas as células, deixando apenas o material produzido pelas bactérias no meio R2A, que foi liofilizado em seguida.

O experimento foi realizado em placas de Elisa de 96 poços. O material liofilizado foi ressuscitado em 1 mL de água ultrapura e testado contra o crescimento de três cepas de *B. dendrobatidis* das seguintes procedências: Brasil (023), Panamá (JEL 423) e Maine (JEL 258). Os poços experimentais continham 50 µL do sobrenadante bacteriano livre de células e 50 µL de zoósporos de *Bd* em meio Triptona caldo na concentração $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$. Os poços do controle positivo continham 50 µL de *Bd* e 50 µL de água. Os controles negativos consistiram em 50 µL de *Bd* morto por

aquecimento (60°C por 10 min) e 50 µL de água. Cada tratamento experimental e controles foram feitos em quadruplicatas. As placas foram incubadas à temperatura ambiente durante 7 dias com leituras diárias em espectrofotômetro, com comprimento de onda de 490 nm. O percentual de crescimento foi dado por: $(1 - (\text{crescimento do inóculo experimental} / \text{crescimento do controle positivo})) * 100$.

Secreções

Os extratos brutos das secreções de 20 indivíduos de *P. boiei*, escolhidos ao acaso, foram ressuspensos em 2 mL de água estéril ultrapura (*HPLC-grade*). As medidas das concentrações de proteínas foram realizadas através de leituras em espectrofotômetro Nanodrop e variaram entre 5,1mg/mL e 0,12 mg/mL. Diluições foram feitas nas amostras com concentrações acima de 0,5 mg/mL para que essa concentração fosse alcançada. Uma filtração em membrana de 0,22 µm foi realizada para a eliminação de possíveis contaminantes. Nove amostras de secreções foram parcialmente purificadas através de cartuchos do tipo *Sep-Pak C18* (WAT 020515 *SepPak® Plus*, Waters Corporation); os peptídeos ligados ao *Sep-Pak* foram eluídos com acetonitrila 70%, 29,9% em água e 0,1% de ácido trifluoroacético e concentrados através da secagem a vácuo. O procedimento realizado através do *Sep-Pak* promove a retirada do sal e outros contaminantes e permite a concentração e purificação parcial da mistura natural de peptídeos. A concentração dos peptídeos recuperados foi determinada através do espectrofotômetro Nanodrop. Para o teste da atividade antimicrobiana das secreções, as mesmas condições e controles utilizados para o teste da atividade antimicrobiana dos metabólitos bacterianos foram empregados.

3. Resultados

Microbiota cutânea

Atividade antimicrobiana bacteriana

A partir de 517 morfotipos bacterianos identificados 483 foram submetidos aos bioensaios. Apenas 34 morfotipos não se mantiveram viáveis para esta etapa da pesquisa, portanto. O bioensaio realizado pelo método do traço cruzado mostrou que, dos 483 morfotipos de colônias bacterianas testados, 84 possuem atividade antimicrobiana contra o crescimento de pelo menos uma das cepas patogênicas utilizadas. As cepas que apresentaram a menor resistência aos antimicrobianos produzidos por bactérias isoladas da pele de *P. boiei* foram *Aeromonas hydrophila* (IOC/FDA 110-36) e *Micrococcus luteus* (ATCC 7468), enquanto que *Escherichia coli* (ATCC 10536) e *Klebsiella pneumoniae subsp. Pneumoniae* (ATCC 4352) apresentaram a maior resistência aos mesmos metabólitos.

Os percentuais de morfotipos com atividade antimicrobiana variaram entre os locais de 5,6 a 64% em relação ao total de morfotipos descritos (Figura 2), mas a maioria deles era presente em todos os indivíduos. O número de morfotipos que apresentou atividade antimicrobiana contra, pelo menos, um dos patógenos testados variou entre 1 e 8 por indivíduo, a saber: no PESM – Santa Virgínia cada indivíduo hospedava em média 2,8 (desvio-padrão = 0,4) morfotipos diferentes de bactérias com atividade antimicrobiana; no PESM – Cunha, em média 4,4 (desvio-padrão = 5,8) morfotipos diferentes com atividade antimicrobiana por indivíduo. No fragmento Benedita foi detectada a média de 5,7 (desvio-padrão = 1,8) morfotipos com atividade antimicrobiana em cada indivíduo; no Gonzaga, 7 morfotipos em média (desvio-padrão = 0) em cada indivíduos apresentaram atividade antimicrobiana; no Ditão, foi observada a média de 6 morfotipos (desvio-padrão = 0) com atividade antimicrobiana por

indivíduo; no fragmento Pantheon a média de 2 morfotipos com atividade antimicrobiana (desvio-padrão = 0) por indivíduo foi observada; no fragmento G4, havia em média 3,3 morfotipos em cada indivíduo (desvio-padrão = 1,1) e no fragmento Pimenta 4,3 (desvio-padrão = 4,1). Nos fragmentos Ditinha, Saad Cachoeira, Fonte da Liberdade, João Leite e Diolga, a média de 3 morfotipos com atividade antimicrobiana (desvio-padrão Ditinha = 0,3; demais = 0) foi detectada para cada indivíduo. Finalmente, nos fragmentos Sidney, Rancho do Mato, Embaúba e Irene a média de apenas 1 morfotipo com atividade antimicrobiana (desvio-padrão = 0) foi detectada por indivíduo.

Figura 2. Percentuais de morfotipos bacterianos com e sem atividade antimicrobiana por local de amostragem.

O número de morfotipos identificados como inibidores também não teve relação com as características abióticas das florestas amostradas, avaliada a partir dos componentes principais obtidos no Capítulo 1 (p -valor $> 0,150$ em todos os casos; Spearman). A riqueza de morfotipos com atividade antimicrobiana não esteve correlacionada ao número de indivíduos capturados em cada local ($p = 0,38$, p -valor = 0,124; Spearman). Porém, foi detectada correlação positiva entre o número de

morfotipos bacterianos isolados e o número de morfotipos com atividade antimicrobiana ($\rho = 0,82$; $p < 0,000$; Spearman). Esse resultado indica que uma maior riqueza de bactérias poderia favorecer uma maior ocorrência de bactérias com atividade antimicrobiana na pele de *P. boiei* (Figura 3).

Figura 3. Correlação entre o número de morfotipos bacterianos e o número de morfotipos bacterianos com atividade antimicrobiana, isolados da microbiota cutânea de *P. boiei*.

Identificação taxonômica e densidade

Os filos Bacteroidetes, Actinobacteria, Firmicutes e Proteobacteria foram identificados para o grupo de bactérias com atividade antimicrobiana, sendo o último o de maior representatividade, dentre os quatro filos. Esses filos corresponderam a 21 gêneros bacterianos com efeito inibitório do crescimento dos patógenos testados, sendo o gênero *Pseudomonas* o mais abundante. A predominância desse gênero ocorreu tanto nas comunidades microbianas dos espécimes procedentes dos fragmentos de São Luís do Paraitinga quanto nas comunidades dos espécimes das unidades do Parque Estadual. *Stenotrophomonas* foi o segundo gênero mais abundante nos fragmentos, representando 14% do total de morfotipos com atividade antimicrobiana, não tendo sido detectado

entre os gêneros bacterianos, com essa propriedade, identificados nos indivíduos capturados nas unidades do Parque Estadual. Nesses locais, os gêneros mais representativos, depois de *Pseudomonas*, foram *Chryseobacterium* e *Pedobacter*, cada um representando 15% do total de gêneros com atividade antimicrobiana, ambos não detectados nos indivíduos procedentes dos fragmentos. Cinco dos oito gêneros procedentes das comunidades das florestas preservadas também foram detectadas nas comunidades procedentes dos fragmentos.

Os gêneros menos representativos para o grupo de bactérias com atividade antimicrobiana foram: *Bacillus*, *Delftia*, *Rhizobium*, *Ochrobactrum*, *Arthrobacter*, *Agrococcus* e *Sphingobacterium*, cada um com 2% do total, nos fragmentos. Os demais gêneros apresentaram percentuais intermediários, entre 3 e 10%, a saber: *Comamonas*, *Variovorax*, *Lysobacter*, *Acinetobacter*, *Kitasatospora*, *Streptomyces*, *Microbacterium* e *Flavobacterium*. Já nas unidades de florestas preservadas os gêneros menos representativos estiveram presentes com 8% do total de bactérias antimicrobianas, foram eles: *Ochrobactrum*, *Cellulomonas*, *Microbacterium*, *Flavobacterium* e *Sphingobacterium* (Figura 4).

Figura 4. Diversidade taxonômica de bactérias com atividade antimicrobiana presentes na microbiota cutânea de espécimes de *P. boiei*, procedentes de fragmentos florestais (barras pretas) e do Parque Estadual Serra do Mar, núcleos de Cunha e Santa Virgínia (barras cinzas). A porcentagem de ocorrência refere-se ao percentual total dos gêneros identificados em cada tipo de floresta.

Os valores de densidade foram estimados para 20 gêneros bacterianos com atividade antimicrobiana, em cada local de amostragem. A partir dessa estimativa foi possível observar que um mesmo gênero bacteriano pode apresentar valores de densidade muito distintos entre populações de *P. boiei*. O gênero *Stenotrophomonas*, por exemplo, apresentou densidade total de 1.211 unidades formadoras de colônia (UFCs) no fragmento Ditão, enquanto que no fragmento Pimenta esse gênero foi representado pelo total de apenas 24 UFCs. Além de apresentar o maior percentual de bactérias produtoras de antimicrobianos, o gênero *Pseudomonas* foi o mais amplamente distribuído entre os locais de amostragem, em dez dos dezesseis locais. Gêneros mais raros foram detectados em indivíduos de uma única localidade, como é o caso de *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Comamonas*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Ochrobactrum*, *Pedobacter*, *Sphingobacterium*, *Variovorax* e *Xanthomonas* (Tabela 2).

Tabela 2. Densidade de colônias por gênero bacteriano com atividade antimicrobiana em cada local de amostragem. Os valores apresentados correspondem aos totais de unidades formadoras de colônias (UFC) correspondentes aos gêneros bacterianos identificados.

Táxons	Localidades															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
<i>Acinetobacter baumannii</i>	9															
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>		84														
<i>Chryseobacterium</i> sp.			37	152												
<i>Delftia acidovorans</i>					109											
<i>Erwinia billingiae</i>						21										
<i>Flavobacterium johnsoniae</i>					109											
<i>Flavobacterium</i> sp.							4									
<i>Lysobacter gummosus</i>								143								
<i>Lysobacter</i> sp.									468							
<i>Microbacterium radiodurans</i>								22								
<i>Microbacterium testaceum</i>				10				11		11	5					
<i>Ochrobactrum anthropi</i>				50												
<i>Pantoea vagans</i>										6	17					
<i>Pedobacter</i> sp.			112													
<i>Pseudomonas</i> cf. <i>synxantha</i>			49													
<i>Pseudomonas mosseli</i>										33						
<i>Pseudomonas parafulva</i>			13													
<i>Pseudomonas poae</i>			22													
<i>Pseudomonas putida</i>	63								93	52	39	94	290			
<i>Pseudomonas</i> sp.		243		70										42		
<i>Pseudoxanthomonas suwonensis</i>									59						495	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		1211				121				37						24
<i>Stenotrophomonas</i> sp.										509						
<i>Streptomyces flavogriseus</i>																25
<i>Streptomyces fulvissimus</i>											3					
<i>Variovorax</i> sp.										60						
<i>Xanthomonas axonopodis</i>	21															
<i>Enterobacter</i>										48						
<i>Sphingobacterium</i>			123													
<i>Comamonas</i>								70								

Legenda: 1-Gonzaga; 2-Ditão; 3-Cunha; 4-Santa Virgínia; 5-Pantheon; 6-Fonte; 7-Irene; 8-Ditinha; 9-G4; 10-Benedita; 11-Diolga; 12-Saad; 13-Sidney; 14-Embaúba; 15-Rancho; 16-Pimenta.

Microbacterium foi o gênero bacteriano com o maior espectro de ação, ou seja, que inibiu o maior número de patógenos: dez de doze cepas patogênicas. Os gêneros *Stenotrophomonas*, *Agrobacterium*, *Sphingobacterium* e *Streptomyces* apresentaram atividade antimicrobiana contra oito de doze cepas padrão utilizadas. *Arthrobacter*, *Comamonas* e *Pedobacter* produziram efeito contra o crescimento de apenas um patógeno cada. Além disso, cada um desses gêneros foi identificado apenas para uma localidade. *Pseudomonas*, que foi o gênero mais frequente dentre os gêneros bacterianos

Secreção cutânea

Secreção cutânea e bioensaios

A concentração de proteínas nas amostras de secreção cutânea de *P. boiei*, variou entre 1,05 mg/mL e 6,68 mg/mL (Tabela 4). *Aeromonas hydrophila* apresentou a maior sensibilidade aos antimicrobianos produzidos por bactérias isoladas da pele de *P. boiei*, enquanto que *Escherichia coli* apresentou a menor sensibilidade aos mesmos antimicrobianos e, por isso, foram escolhidas para o teste com a secreção cutânea.

Tabela 4. Concentrações de proteínas nas amostras de secreções dérmicas de *P. boiei* por localidade

Local	Concentração total (mg/mL)	Concentração por indivíduo (mg/mL)*
Pantheon	6,68	0,61
Ditinha	4,90	0,55
G4	4,90	0,49
Sidney	4,67	0,47
Rancho do Mato	4,43	0,44
PESM - Cunha	3,07	0,38
Pimenta	2,17	0,24
Gonzaga	2,17	0,22
PESM - Stª Virgínia	1,96	0,20
Ditão	1,05	0,10

* valor da concentração total dividida pelo número de indivíduos

Foi encontrada CIM contra o crescimento de *E. coli* na concentração 512 µg/mL para todos os locais (Figura 5). A CIM não foi determinada nas concentrações testadas contra o crescimento de *A. hydrophila*. Esse padrão foi observado para os extratos de secreção de todas as localidades testadas (CIM > 1.024 µg/mL). Através dos resultados é possível observar que ao mesmo tempo em que *A. hydrophila* foi o patógeno que apresentou maior sensibilidade aos metabólitos bacterianos da microbiota cutânea, esse patógeno não sofreu inibição de seu crescimento mesmo nas concentrações mais altas de extrato bruto das secreções cutâneas de *P. boiei*. Ao contrário, o patógeno *E. coli* o qual foi menos sensível ao efeito dos antimicrobianos produzidos pelas bactérias

isoladas, apresentou menos resistência aos efeitos antibacterianos das secreções cutâneas de *P. boiei*, mesmo que tal efeito tenha sido observado na concentração de 512 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 5. Efeito dos extratos brutos da secreção cutânea de *P. boiei*, procedentes de diferentes locais, contra o crescimento da bactéria *E. coli*, na concentração de 512 $\mu\text{g/mL}$ (A) e *A. hydrophila* nas concentrações 1.024 $\mu\text{g/mL}$ (B) e 512 $\mu\text{g/mL}$ (C).

Para termos uma comparação do potencial antimicrobiano das secreções de *P. boiei* com uma espécie que é tipicamente produtora de peptídeos antimicrobianos, realizamos o mesmo experimento com o extrato bruto da secreção cutânea de *Phyllomedusa distincta*. Nesse experimento a concentração mínima inibitória encontrada foi de 64 µg/mL, suficiente para inibir o crescimento dos patógenos *A. hydrophila* e *E. coli*.

Perfis cromatográficos das secreções cutâneas

Apesar de os bioensaios não terem demonstrado uma expressiva atividade antimicrobiana das secreções dérmicas de *P. boiei*, a observação dos cromatogramas produzidos por HPLC nos permitiu concluir que essas secreções consistem em um complexo de biomoléculas, ainda não explorado. Foram coletadas entre 24 e 41 frações durante as purificações dos extratos brutos das secreções cutânea de *P. boiei* procedentes de 9 remanescentes, as amostras de secreções dos demais fragmentos não foram fracionadas devido ao volume insuficiente de material, após a realização dos bioensaios. As principais frações observadas nos cromatogramas dos extratos brutos dessas secreções foram detectados por volta de 12, 24, 34, 35, 38 e 39 minutos.

As frações de 12, 34, 35, 38 e 39 minutos foram detectadas em todas as amostras, em maior ou menor intensidade. A presença ou ausência das demais frações observadas nos cromatogramas podem indicar diferenças na composição da secreção cutânea de *P. boiei* entre populações, porém, para que esses padrões sejam determinados, são necessárias análises mais profundas, como o perfil de massas moleculares de cada amostra. Apesar de os perfis das secreções serem muito parecidos, é possível observar as diferenças, especialmente entre 18 e 24 minutos e entre 28 e 38 minutos (Figura 6), mas o significado dessas diferenças não foi explorado nesta

pesquisa. As diferenças entre as intensidades das frações correspondem às diferenças nas concentrações das classes de moléculas.

Continuação

Figura 6. Cromatograma de extrato bruto. Obtido por HPLC das secreções cutâneas de espécimes de *P. boiei* procedentes do fragmento Rancho do Mato (A), G4 (B), Pimenta (C), Pimenta (D), Ditão (E), sobreposição de todos os cromatogramas (F). A separação cromatográfica foi monitorada em 216 e 280 nm e a linha preta mostra o gradiente de acetonitrila.

B. dendrobatidis

Metabólitos bacterianos

A atividade antimicrobiana dos isolados bacterianos contra o fungo *Bd* foi testada. Ao total, 18 gêneros apresentaram atividade contra o crescimento de pelo menos uma das cepas JEL423, JEL258 e 023 do fungo quitrídio testadas. Apenas os metabólitos dos gêneros *Cellulomonas*, *Chryseobacterium* e *Sphingobacterium* não apresentaram atividade antimicrobiana contra nenhuma das cepas de *Bd*. Não foi observada diferença nos percentuais de inibição entre as cepas do *Bd* ($H = 1,28$, $gl = 2$, $p\text{-valor} = 0,527$; Kruskal-Wallis). Por exemplo, o metabólito da bactéria do gênero

Pseudomonas inibiu o crescimento das três cepas em 97.8, 97.9 e 98.5%. Já em relação aos gêneros *Comamonas*, *Pedobacter* e *Enterobacter* apenas uma das cepas foi sensível aos respectivos sobrenadantes (Figura 7). Também foram observadas respostas antagônicas para o mesmo gênero, mesmo se considerado o nível de espécie, quando as cepas bacterianas isoladas eram distintas. Por exemplo, *Pseudomonas mosselii*, isolado 904, inibiu 95.8% da cepa *Bd-423*, enquanto que o isolado 907 da mesma espécie bacteriana não produziu nenhum efeito sobre o crescimento da mesma cepa. O mesmo aconteceu para os gêneros identificados pelas espécies: *Delftia acidovorans*, *Microbacterium testaceum*, *Pseudomonas putida*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Pantoea vagans*.

Figura 7. Percentuais de inibição das cepas de *Bd* (423, 258 e 023) pelos metabólitos dos gêneros de bactérias isoladas da microbiota cutânea de *P. boiei*.

Secreções cutâneas

As secreções cutâneas de 29 espécimes foram testadas, individualmente, contra o crescimento do fungo quitrídio. Os indivíduos foram escolhidos ao acaso e tiveram procedências distintas: 7 do fragmento Benedita, 7 do fragmento Pantheon, 2 do fragmento João Leite, 3 do fragmento Irene, 2 de cada um dos fragmentos Saad, Cláudio e Fonte da Liberdade e um de cada um dos fragmentos Ditinha, Sidney, Diolga e Gonzaga. A concentração final de proteínas variou entre 0,03 e 0,53 mg/mL nas amostras de extrato bruto não purificado, que são valores comparáveis às medidas realizadas pelo método de Bradford para os bioensaios com os patógenos bacterianos (Tabela 4), e 0,50 e 0,59 mg/mL nas amostras parcialmente purificadas por *Sep-Pak* (Figura 8). Foram utilizadas as três cepas do fungo *Bd*: JEL 423, JEL 258 e 023. Não houve correlação entre as concentrações de proteínas e os percentuais de inibição observados nos testes das cepas JEL 423 ($p = -0,150$; $p\text{-valor} = 0,438$; Pearson), JEL 258 ($p = -0,005$, $p\text{-valor} = 0,978$; Pearson) e 023 ($p = 0,439$, $p\text{-valor} = 0,032$; Pearson).

Os resultados mostraram efeito inibitório das secreções de *P. boiei* e diferenças nos percentuais de inibição entre as cepas testadas ($H = 14,5$, $gl = 2$, $p\text{-valor} < 0,00$; Kruskal-Wallis.). Nas amostras de extrato bruto a maior média de inibição foi observada para a cepa 023 (47,8 %, desvio-padrão médio = 7%), seguida da cepa JEL 423 (40,8%, desvio-padrão médio = 4,3) e JEL 258 (18,5%, desvio-padrão médio = 3,4), Figura 9. As amostras de peptídeos parcialmente purificadas apresentaram maior eficiência na inibição do crescimento da cepa 023 (92,5%, desvio-padrão médio = 6.4), se comparada ao resultado das amostras não purificadas contra esta mesma cepa. Contra o crescimento da cepa JEL423 essa eficiência foi inferior (34,8%, desvio-padrão médio = 2,7) comparada ao efeito observado para as amostras não purificadas. Um maior percentual médio de inibição também foi observado contra o crescimento da cepa

JEL258 (32,7%, desvio-padrão médio = 6.9%) quando comparado ao percentual médio das amostras não purificadas.

Figura 8. Percentuais de inibição do crescimento do fungo *B. dendrobatidis* (cepas 423, 258 e 023) pela exposição às secreções dérmicas de *P. boiei* parcialmente purificadas (concentração 0,5 mg/mL). Cada local no eixo x corresponde à secreção obtida de um único indivíduo.

Figura 9. Percentuais de inibição do crescimento do fungo *B. dendrobatidis* (cepas 423, 258 e 023) pela exposição às secreções dérmicas de *P. boiei*. Cada valor de concentração no eixo x corresponde à secreção obtida individualmente dos espécimes.

5. Discussão e conclusões

Neste estudo foi constatada a presença de cepas bacterianas com atividade antimicrobiana na microbiota cutânea de *P. boiei*. Houve variação nos percentuais de bactérias antimicrobianas entre as populações de *P. boiei*, no entanto todos os indivíduos analisados apresentaram pelo menos um morfotipo com atividade antimicrobiana. Em trabalho anterior, WOODHAMS e col. (2007), observaram os percentuais de 85 e 62% dos indivíduos que abrigavam, pelo menos, uma bactéria com atividade anti-*Bd* em duas populações de *Rana muscosa*. Na população com o menor percentual, a perda de indivíduos pela quitridiomicose era evidente e, segundo os autores, a baixa presença de bactérias *anti-Bd* favoreceu a disseminação da doença. A extensão desse trabalho foi publicada três anos depois (LAM *et al.*, 2010) e mostrou que a população resistente mantinha um percentual de bactérias antipatógeno similar (80%), a população em declínio se extinguiu e uma terceira população incluída na análise apresentou percentuais similares de bactérias anti-*Bd* (79%) e persistência, apesar da chegada do fungo ao novo local. Assim, o percentual de bactérias com atividade antimicrobiana abrigado por anfíbios de diferentes populações pode ser considerado um preditor importante para a resistência à chegada de novos patógenos.

Embora essa abordagem populacional tenha observado a atividade antimicrobiana apenas contra patógenos bacterianos, se os efeitos *in vitro* acontecem no ambiente natural, a microbiota cutânea de *P. boiei* pode ser considerada como um componente importante na prevenção de doenças infecciosas, uma vez que, todos os indivíduos de suas populações abrigam bactérias capazes de inibir o crescimento de patógenos, um padrão observado para essa espécie. Além disso, para maioria dos locais amostrados *P. boiei* apresentou médias de bactérias antipatógeno superiores aos de outras espécies estudadas (LAM *et al.*, 2010), a saber: *Rana muscosa* (média = 1,6,

desvio = 1,4) e *Rana sierrae* (média = 1,3, desvio = 1,0). No presente trabalho, em 12 de 17 locais os espécimes de *P. boiei* hospedavam três ou mais morfotipos diferentes de bactérias com atividade antimicrobiana. No entanto, com exceção do fragmento Pimenta, os percentuais de bactérias antipatógeno (5.6 – 25%) foram inferiores às espécies: *Atelopus elegans* (40%); e próximos às espécies *Atelopus spurrelli* (26%) e *Atelopus* aff. *Limosus* (19%) (FLECHAS *et al.*, 2012). Embora existam poucas informações sobre esses percentuais, é possível antecipar que a quantidade de bactérias com atividade antimicrobiana abrigada pelos anfíbios varia entre populações de uma mesma espécie e entre espécies. Sob esse ponto de vista, variações na eficiência da microbiota cutânea contra a infecção por agentes patogênicos também devem existir.

A correlação entre a riqueza bacteriana de morfotipos total e a riqueza de morfotipos com atividade antimicrobiana pode representar um indicativo de que espécies que abrigam diversidades mais altas em suas microbiotas cutâneas são mais aptas a resistir a epidemias. Esse resultado corrobora o trabalho de BECKER & HARRIS (2010), que observaram que a redução da microbiota cutânea da espécie de salamandra *Plethodon cinereus* antes da exposição do fungo *Bd* leva a sintomas mais severos que indivíduos desta mesma espécie com a microbiota preservada.

A diversidade de gêneros bacterianos com atividade antimicrobiana encontrada sobre a pele de *P. boiei* guarda relação com os gêneros detectados em outras espécies de anfíbios nas quais essas bactérias também produzem compostos que inibem o crescimento de patógenos como o *Bd*. Com exceção do gênero *Agrococcus*, os gêneros bacterianos identificados no presente estudo também ocorrem e produzem antibióticos sobre a pele de anfíbios com pouca relação filogenética e geográfica: *Arthrobacter*, *Pedobacter*, *Bacillus*, *Kitasatospora*, *Streptomyces* e *Pseudomonas* –

presentes na salamandra *Hemidactylium scutatum*; *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Microbacterium*, *Lysobacter*, *Flavobacterium*, *Variovorax*, *Chryseobacterium*, *Pedobacter* e *Pseudomonas* – presentes na salamandra *Plethodon cinereus* (HARRIS *et al.*, 2006; LAUER *et al.*, 2007; LAUER *et al.*, 2008); *Arthrobacter*, *Delftia*, *Pseudomonas*, *Pedobacter*, *Chryseobacterium*, *Flavobacterium* - na espécie *Rana muscosa*; *Pseudomonas* e *Bacillus* - na espécie *Rana sierrae* (LAM *et al.*, 2010); *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Chryseobacterium*, *Comamonas* e *Stenotrophomonas* – nas espécies *Atelopus elegans*, *Atelopus* aff. *limosus* e *Atelopus spurrelli* (FLECHAS *et al.*, 2012).

Apesar do pequeno conjunto de dados disponíveis na literatura, é possível observar que existe uma maior similaridade entre a microbiota cutânea de *P. boiei* e a microbiota de outras espécies de anfíbios no que se refere às bactérias que produzem atividade antimicrobiana do que em relação à toda comunidade hospedada (ver Capítulo 2). Tal resultado reforça a importância da microbiota para a proteção cutânea dos anfíbios e indica que a pele desse grupo de animais é um microambiente favorável à colonização de bactérias que produzem metabólitos com atividade antimicrobiana, fenômeno que independe da espécie do hospedeiro. Uma explicação alternativa é que ocorra uma seleção, devido às características da pele dos anfíbios, que favoreça a permanência desses grupos de bactérias, proporcionando maior proteção aos indivíduos.

Uma maior abundância de UFC, observada no gênero *Pseudomonas*, por exemplo, não está diretamente relacionada a um maior espectro de ação dos antibióticos produzidos, como demonstrado para o gênero *Microbacterium*. Na microbiota cutânea de *P. boiei* existem bactérias produtoras de antimicrobianos comuns e que estão presentes em muitas populações de *P. boiei* e outras bactérias

produtoras de antimicrobianos raras, detectadas em apenas uma localidade, que apresentaram efeito contra o crescimento de um patógeno específico, como é o caso dos gêneros *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Comamonas*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Ochrobactrum*, *Pedobacter*, *Sphingobacterium*, *Variovorax* e *Xanthomonas*. Mesmo assim, é razoável propor que, ainda que ocorram em baixas abundâncias e espectro de ação, os metabólitos de tais gêneros bacterianos atuem como uma barreira de proteção contra microrganismos, uma vez que, os indivíduos normalmente abrigam mais de uma cepa anti-patógeno, podendo haver sinergismos entre os componentes produzidos. Além disso, pode ocorrer a produção de vários metabólitos pela mesma cepa bacteriana (MYERS *et al.*, 2012) e respostas mais específicas aos patógenos encontrados no hábitat de *P. boiei*, pois bactérias se adaptam rapidamente às condições ambientais às quais são expostas, desenvolvendo mecanismos específicos que garantem a permanência de suas populações (DUNNY & WINANS, 1999).

As secreções cutâneas estão entre as principais defesas contra as doenças infecciosas emergentes. A atividade de peptídeos antimicrobianos contra o desenvolvimento do fungo quitrídio *B. dendrobatidis* foi comprovada para muitas espécies de anfíbios, porém, raramente tem sido testada contra patógenos bacterianos. Na presente pesquisa foi constatado que a secreção cutânea do anuro *P. boiei* não apresenta forte atividade antibacteriana contra o patógeno *E. coli*, sendo necessária uma alta concentração (512 µg/mL) para inibir seu crescimento. Contra o patógeno *A. hydrophila* não foi observado nenhum efeito. Apesar de haverem diferenças entre espécies nas concentrações mínimas necessárias para a inibição do crescimento de patógenos, a concentração observada para *P. boiei*, pode ser considerada alta quando comparada às outras espécies de anfíbios para as quais o extrato bruto da secreção também foi testado e nos quais se vê que concentrações inferiores são necessárias. Por

exemplo, *Litoria lesueuri* (25µg/mL), *Litoria genimaculata* (100 µg/mL), *Litoria nannotis* (200 µg/mL) e *Phyllomedusa distincta* (64 µg/mL), espécies que apresentam MICs a partir de 400 µg/mL são consideradas menos potentes do ponto de vista da atividade antimicrobiana de suas secreções cutâneas (WOODHAMS *et al.*, 2006 b). *P. boiei* não pode ser considerada uma espécie tipicamente produtora de antimicrobianos, como é o caso dos membros da família Phyllomedusinae (CALDERON *et al.*, 2011). Isso reforça a importância da atividade antimicrobiana dos metabólitos de bactérias residentes para a proteção contra a infecção por patógenos bacterianos.

Quase nada é conhecido sobre as concentrações de peptídeos antimicrobianos que ocorrem naturalmente em anfíbios saudáveis e ausentes de estresse. Um estudo prévio comparativo constatou que a concentração de proteínas na pele de cinco indivíduos de *P. boiei* é em média 324 µg/mL, enquanto que a concentração final das amostras após a estimulação elétrica está em torno de 520 µg/mL (B. Simas Magalhães, dados não publicados), sendo 800 µg/mL a média da concentração total de proteínas presentes na pele desta espécie. Assim, é possível pensar em atividade antimicrobiana apenas em situações de extremo estresse em que haveria a depleção do conteúdo das glândulas granulares sobre a pele. Nessa condição, a concentração mínima necessária para a eliminação de pelo menos um patógeno conhecido seria atingida (512 µg/mL), o que indicaria a importância ecológica das secreções cutâneas dessa espécie na sua proteção contra bactérias patogênicas.

Para muitas espécies de anfíbios, os testes do potencial antimicrobiano são realizados a partir de peptídeos purificados, porém, na natureza, esses compostos ocorrem em um complexo de moléculas. Esse aspecto afeta a ação da secreção cutânea na defesa contra microrganismos invasores, uma vez que, há evidências de que peptídeos atuando sinergicamente promovem uma defesa mais eficaz, o que confere

vantagem em condições ambientais hostis (ROLLINS-SMITH *et al.*, 2002; MOR *et al.*, 1994). Nesta pesquisa foi utilizado o extrato bruto das secreções de *P. boiei* para um conjunto de amostras e uma purificação parcial dos peptídeos para um conjunto menor. A partir dessa prática foi possível observar que o conjunto de amostras purificadas apresenta um maior efeito contra o crescimento do fungo. Aparentemente, a purificação pode aumentar o efeito antimicrobiano das amostras, mas esse argumento é verdadeiro apenas para duas cepas do fungo *Bd*. Diferenças nas CIMs do extrato de peptídeos cutâneos de uma mesma espécie de anfíbio, necessários para a inibição total do crescimento de diferentes cepas de *Bd*, foram observadas em trabalhos anteriores (WOODHAMS *et al.*, 2006 b).

Na presente pesquisa, foram constatadas diferenças interindividuais na eficiência da secreção cutânea de *P. boiei* contra o crescimento do fungo: enquanto alguns indivíduos tinham secreções que inibiam quase 100% do crescimento do fungo, outros coletados na mesma localidade demonstravam 0% de capacidade de inibição. Essas diferenças poderiam explicar os resultados entre amostras não purificadas e parcialmente purificadas para peptídeos, pois, os indivíduos testados não foram os mesmos para os dois grupos. Outra explicação poderia ser dada pelas diferenças metabólicas e virulência das cepas de *Bd* (RETALLICK & MIERA, 2007; PIOTROWSKI *et al.*, 2004; FISHER *et al.*, 2009) e, portanto, a resposta delas frente à exposição dessas moléculas bioativas.

A secreção cutânea de *P. boiei* atua de maneira mais efetiva contra as cepas do fungo *Bd* do que contra os patógenos bacterianos. Essa afirmação foi posta a partir da observação de que não foi verificado efeito contra *A. hydrophila* e uma concentração alta de extrato bruto foi necessária para a inibição do crescimento de *E. coli*. Resultado semelhante foi observado por ROLLINS-SMITH e col. (2002) cujo os testes para

peptídeos isolados ou combinados não mostraram efeito contra o crescimento de *A. hydrophila*, mas resultados positivos foram observados contra os fungos de anfíbios *B. dendrobatidis* e *Basidiobolus ranarum* sob os mesmos tratamentos. Embora não tenha sido detectada em *P. boiei* (ver capítulo 2), *A. hydrophila* é uma conhecida bactéria oportunista encontrada comumente sobre a pele de anfíbios saudáveis (HIRD *et al.*, 1981).

Embora um estudo seja específico seja necessário, é razoável propor que esse resultado reflita um processo adaptativo da bactéria aos compostos presentes sobre a pele dos anfíbios e, por isso, apresente resistência aos peptídeos antimicrobianos secretados nesse microambiente. Também foi demonstrada a capacidade antibiótica dos metabólitos produzidos pelas bactérias hospedadas contra o crescimento do fungo quitrídio *Bd*. Esses metabólitos, sendo constantemente liberados sobre a pele de *P. boiei*, devem promover uma verdadeira barreira de proteção contra fungos e bactérias patogênicos, como demonstrado nesta pesquisa. Embora a caracterização e quantificação desses metabólitos não tenha sido realizada nesta pesquisa, a presença de diversas cepas com atividade antimicrobiana sobre os indivíduos indica que existe uma grande diversidade de componentes nesse microambiente. Em *P. boiei*, portanto, ambos os componentes, microbiota e secreções cutâneas, apresentam propriedade contra o crescimento do fungo quitrídio, que devem atuar na prevenção contra a infecção de suas populações.

Nesta pesquisa, diferenças importantes entre populações foram observadas em relação à porção da microbiota cutânea com atividade antimicrobiana e à secreção dérmica. Percentuais de morfotipos, a riqueza de gêneros bacterianos, assim como seus espectros de ação variaram entre os locais de procedência dos espécimes de *P. boiei*. Também foram observadas diferenças entre as populações testadas para perfil

das secreções, de acordo com os cromatogramas obtidos por HPLC. Embora existam diferenças entre as populações, os perfis de secreções cutâneas de *P. boiei* mostraram consistência e, de maneira geral, são similares. Isso pode explicar o efeito antifúngico observado nos indivíduos de *P. boiei* procedentes de diferentes locais.

Diferenças na resistência do fungo *Bd* entre populações de anfíbios já foram associadas à eficiência dos peptídeos contra esse patógeno, onde os perfis das secreções não diferiram entre as mesmas (WOODHAMS *et al.*, 2010). Por outro lado, diferenças populacionais na resistência ao fungo quitrídio já foram atribuídas à composição e metabólitos da microbiota cutânea de anfíbios (BECKER *et al.*, 2015). É possível que diferenças populacionais na composição das secreções cutâneas e na estrutura da comunidade microbiana cutânea possam explicar variações na vulnerabilidade ao fungo e outros patógenos. Ao mesmo tempo, deve-se observar a magnitude dessas diferenças, pois, no caso da microbiota cutânea, embora haja diferenças entre populações, a presença de bactérias com atividade antimicrobiana em todos os indivíduos testados talvez seja suficiente para inibir a colonização de microrganismos patogênicos. Além disso, mesmo que todos os indivíduos não sejam protegidos pela presença dessas bactérias, é possível que ainda ocorra a imunidade de grupo na população, que é o efeito indireto da imunização sobre aqueles indivíduos não imunizados, através da diminuição da transmissão do patógeno na população (JOHN & SAMUEL, 2000).

Anfíbios da Floresta Atlântica convivem com o fungo *Bd* há mais de cem anos (RODRIGUEZ *et al.*, 2014) e, certamente, com outros patógenos de igual importância, sem evidências de perdas populacionais em decorrência da quitridiomicose. As defesas da pele desses animais devem explicar tal fenômeno, conforme demonstradas nesta pesquisa. Para o caso de *P. boiei*, uma análise realizada entre laboratórios (Laboratório

de Ecofisiologia e Fisiologia Evolutiva – IB/USP e o Laboratório de Quitridiomicose – Unicamp) e não publicada, mostrou que a ocorrência do *Bd* na maioria das populações de *P. boiei* estudadas é rara. Esse resultado leva à reflexão sobre o que permite a um microrganismo causar epidemias e a representar uma ameaça à sustentabilidade de populações, como é o caso do fungo quitrídio para os anfíbios. Embora essa discussão não tenha a pretensão de explicar tal fenômeno, é importante ressaltar que microrganismos causam doenças desde que sejam capazes de ter acesso ao hospedeiro, aderir e colonizar a superfície de células, invadir tecidos e produzir toxinas ou metabólitos danosos (BLACK, 1999). A patogenicidade de certos microrganismos também depende das condições do hospedeiro, no qual eles só causarão doenças em situações anormais, tais como, injúria em tecidos, estado doentio prévio ou imunossupressão (PARKER, 1998). Populações desses patógenos oportunistas são comumente encontradas na microbiota de organismos saudáveis, porém, quando causam doenças, eles são rapidamente transmitidos para outros hospedeiros ou ao ambiente (MAIDEN & URWIN, 2006).

As doenças estão entre as principais ameaças às populações selvagens de anfíbios e entre elas está a quitridiomicose, cujo o agente tem sido extensivamente detectado em populações de diferentes partes do mundo (OLSON *et al.*, 2013). Nesse cenário, os resultados obtidos na presente pesquisa indicam que tão importante quanto a presença de um patógeno em uma população é a capacidade dos animais de lidarem com esses agentes por meio de seus sistemas de defesa. Por isso, este estudo propõe que ambos os componentes aqui avaliados, microbiota e secreções cutâneas, sejam observados nos estudos futuros que tratem da vulnerabilidade das populações selvagens de anfíbios às doenças infecciosas.

CONCLUSÕES GERAIS

- ❖ A distribuição de densidade e riqueza bacterianas totais associada à pele do anuro *Proceratophrys boiei* não é uniforme, pois, existem variações importantes entre indivíduos e populações. Ao mesmo tempo, existe uma fração de bactérias dominantes que são amplamente distribuídas entre os indivíduos de uma mesma localidade, representando um componente obrigatório para a microbiota cutânea.
- ❖ Diferenças entre indivíduos procedentes de florestas preservadas e aqueles dos fragmentos, em termos da microbiota cutânea, existem apenas quando observada a riqueza de morfotipos bacterianos cultivados, em que se percebe um maior número de morfotipos sobre a pele de animais que habitam as unidades dos Parques Estaduais.
- ❖ Diferenças populacionais, em termos de densidade e riqueza de morfotipos bacterianos, não são explicadas pelas variáveis abióticas analisadas nesta pesquisa, ou seja, aquelas relacionadas aos perfis geográfico, microclimático e físico-químico dos remanescentes. Mesmo assim, abordagens experimentais futuras são necessárias para que esse resultado possa ser confirmado.
- ❖ A microbiota cutânea de *P. boiei* possui pouca relação com as comunidades microbianas dos micro-habitats, ou seja, possui características próprias e independente das comunidades microbianas com as quais mantém contato direto. No entanto, a microbiota cutânea não consiste em um sistema fechado, no qual existe alguma sobreposição com as unidades taxonômicas presentes nos corpos de água e solo, ocupados por essa espécie e, em menor intensidade,

nas matrizes dos fragmentos. Nesse contexto, a hierarquia taxonômica deve ser observada, uma vez que, a sobreposição entre as comunidades aumenta conforme níveis mais altos são considerados.

- ❖ As estruturas das comunidades microbianas de pele, solo, água e matriz de fragmentos são definidas principalmente pelo tipo de microambiente e, em menor intensidade, pelo local de procedência. Porém, a qualidade do hábitat pode ser um determinante dos perfis das comunidades microbianas do solo.
- ❖ A microbiota cutânea de *P. boiei* é composta, principalmente, por famílias bacterianas comumente encontradas nos solos, mesmo que apenas pouca sobreposição com esse substrato tenha sido detectada, no nível de UTOs. Mesmo que altas abundâncias dessas famílias caracterizem a microbiota cutânea de *P. boiei*, diferenças entre locais foram observadas. Essa fração variável entre as comunidades cutâneas de *P. boiei* deve ser considerada em pesquisas futuras, pois uma vez descoberta a natureza de tal variação, a influência do ambiente sobre a microbiota cutânea será compreendida.
- ❖ Embora análises experimentais sejam necessárias, existe relação entre variáveis abióticas e as comunidades dos quatro microambientes analisados, no nível das UTOs. Tais variáveis podem ser consideradas em pesquisas futuras acerca da influência ambiental para a comunidade microbiana hospedada pelos anfíbios.

- ❖ *P. boiei* abriga sobre a sua pele bactérias capazes de inibir o crescimento de patógenos. Essa pode ser considerada uma característica da microbiota cutânea da espécie, uma vez, que todos os indivíduos analisados nesta pesquisa hospedam essas bactérias. No entanto, dadas as variações entre locais nos percentuais e na diversidade de bactérias antipatógeno, é possível que a proteção contra agentes patogênicos, promovida pela microbiota cutânea, varie entre populações.
- ❖ Não existem diferenças nos percentuais de bactérias com atividade antimicrobiana entre populações de *P. boiei* procedentes de florestas preservadas e de fragmentos florestais. Em ambas as condições ambientais indivíduos dessa espécie abrigam bactérias capazes de inibir o crescimento de patógenos.
- ❖ A atividade antimicrobiana da secreção cutânea de *P. boiei* não está entre as mais potentes, conhecidas para outras espécies de anfíbios. Na pele dessa espécie é possível que a atividade antimicrobiana, exercida pela microbiota associada, possua um papel importante e regulador da colonização de microrganismos patogênicos.
- ❖ Mesmo com uma fraca atividade contra patógenos bacterianos, as secreções cutâneas de *P. boiei* possuem um efeito maior contra o crescimento do fungo quitrídio *Batrachochytrium dendrobatidis*. Esse patógeno também é susceptível à atividade antimicrobiana dos metabólitos produzidos por bactérias hospedadas por *P. boiei*. Porém, em ambos os sistemas, variações em tal efeito são observadas para diferentes cepas desse fungo.

- ❖ Secreções e microbiota cutâneas podem desempenhar um importante papel na prevenção de doenças infecciosas em anfíbios de vida selvagem, que estão em constante contato com agentes patogênicos. Estudos sobre a saúde das populações de anfíbios devem observar não apenas a ocorrência de um patógeno no meio natural desses animais, mas os aspectos que fazem das espécies mais ou menos vulneráveis a tais agentes.

RESUMO GERAL / *ABSTRACT*

Resumo Geral

A pele dos anfíbios atua como primeira barreira de proteção contra microorganismos invasores. Além dos componentes mecânicos, essa proteção deve incluir mecanismos bioquímicos e biológicos derivados tanto da comunidade microbiana ali residente quanto da secreção de moléculas bioativas a partir de glândulas dérmicas. Os objetivos gerais deste estudo foram: caracterizar a comunidade microbiana hospedada pela espécie *Proceratophrys boiei* e analisar a sua relação com comunidades microbianas ambientais; avaliar se nessa espécie a microbiota e a secreção cutânea podem ser entendidas como um componente de proteção; avaliar a estabilidade de tais componentes a partir de diferentes populações em fragmentos florestais. Especificamente, as seguintes hipóteses foram testadas: 1. A composição da microbiota ambiental varia entre os fragmentos e micro-habitats de Floresta Atlântica amostrados e tem relação com alguns parâmetros ambientais analisados; 2. A diversidade da microbiota cutânea de *P. boiei* é relacionada à diversidade da microbiota nos ambientes que ocupa. Ademais, em termos de composição, a microbiota cutânea é um subconjunto da microbiota ambiental que ocorre nos seus micro-habitats; 3. A riqueza e abundância de bactérias da microbiota cutânea de *P. boiei* varia entre os diferentes remanescentes de Floresta Atlântica; 4. A riqueza e a abundância de bactérias presente na pele de *P. boiei* com atividade antimicrobiana varia entre populações ou locais de amostragem; 5. Existe efeito antimicrobiano das secreções sobre alguns patógenos e os perfis das secreções cutâneas diferem entre populações de *P. boiei*. Os resultados mostraram que a microbiota cutânea de *P. boiei* apresenta variações entre indivíduos e populações. Além disso, a qualidade do habitat pode ser importante para a composição de bactérias hospedadas. Existe um compartilhamento de bactérias entre a microbiota cutânea de *P. boiei* e os micro-habitats solo e água, ocupados por essa espécie, porém as comunidades dérmicas compõem-se principalmente por bactérias não detectadas nas amostras ambientais analisadas. Foi observada certa estabilidade na estrutura da microbiota cutânea de *P. boiei* quando analisadas populações distintas, mas variações na distribuição de morfotipos bacterianos em uma mesma localidade ocorre. Microbiota cutânea e secreções dérmicas de *P. boiei* podem prevenir infecções na pele, dada a atividade antimicrobiana demonstrada nesta pesquisa. Contudo, variações nos espectros de ação foram observadas em ambos os componentes, assim como, diferenças populacionais nas abundâncias e percentuais de bactérias produtoras de antimicrobianos. O estudo também demonstrou que certas características independem do contexto ambiental ocupado pelas populações, uma evidência de que o microambiente da pele dessa espécie oferece condições e certa estabilidade para a colonização de comunidades bacterianas específicas. A sustentabilidade de populações dessa espécie pode estar relacionada às interações entre hospedeiro, microrganismos e ambiente.

Palavras-chave: *Proceratophrys boiei*. microbiota cutânea. secreção cutânea. atividade antimicrobiana. fragmentos florestais. microambiente.

Abstract

The skin of amphibians acts as first barrier of protection against invading microorganisms. Besides the mechanical components, this protection probably include biochemical and biological mechanisms derived from both the resident microbial community and the secretion of bioactive molecules from dermal glands. The aims of this study were to characterize the microbial community hosted by *Proceratophrys boiei* and analyse its relationship with environmental microbial communities; evaluate whether microbiota and skin secretion of this species can be understood as a protection component; evaluate the stability of these components through different populations in forest fragments. Specifically, the following hypotheses have guided this research: 1. The composition of environmental microbiota varies among microhabitats and fragments of Atlantic Forest and relates to some environmental parameters; 2. The diversity of skin microbiota of *P. boiei* relates to the diversity of microbes in the environment it occupies. Furthermore, in terms of composition, the skin microbiota is a subset of environmental microbes that occurs in its microhabitat; 3. The richness and abundance of bacteria from the skin microbiota of *P. boiei* varies between different remnants of Atlantic Forest; 4. The richness and abundance of bacteria present on the skin *P. boiei* with antimicrobial activity varies between populations or sampling sites; 5. There is antimicrobial activity of the skin secretions against some pathogens and its profiles differ between populations of *P. boiei*. The results showed variations on the microbial skin of *P. boiei* between individuals and populations and the quality of habitats could be important for the composition of hosted community. There is a sharing of bacteria between the skin microbiota of *P. boiei* and the microbial communities of microhabitats soil and water. However, mainly bacteria not detected in environmental samples composes the dermal communities. We observed some stability in the structure of the skin microbiota when analysed different populations, but variations in the distribution of bacterial morphotypes occurs in all sites. Skin microbiota and dermal secretions of *P. boiei* can prevent infection through the skin, according to the antimicrobial activity demonstrated in this study. There were variations in the action spectrum for both components, but population differences were mainly in abundance and percentage of bacteria producing antibiotics. This research showed the importance of the microbiota and skin secretion of *P. boiei* as components of protection and the importance of the environment for the composition of these associated communities. At the same time, we have shown that certain characteristics are independent of the environmental context occupied by the population, evidence that the microenvironment of the skin provides a certain stability for the colonization of specific bacterial communities. The sustainability of populations of this species may relates to interactions between host organisms and the environment.

Keywords: *Proceratophrys boiei*. skin microbiota. skin secretion. antimicrobial activity. forest fragments. microhabitats.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTWIS, R. E. *et al.* Ex situ diet influences the bacterial community associated with the skin of red-eyed tree frogs (*Agalychnis callidryas*). **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e85563, 2014.

ASHCROFT, J. W. *et al.* Antimicrobial properties of two purified skin peptides from the mink frog (*Rana septentrionalis*) against bacteria isolated from the natural habitat. **Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology**, v. 146, n. 3, p. 325-330, 2007.

ASSIS, A. B. de **Análise sobre a microbiota cutânea de anfíbios em fragmentos de floresta atlântica e sua eficácia contra agentes patogênicos**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2011.

ASSIS, A. B., *et al.* (aceito para publicação). Assessing antibacterial potential of componentes of *Phyllomedusa distincta* skin and its associated dermal microbiota. **Journal of Chemical Ecology**.

ATLAS, R. M.; BARTHA, R. **Microbial Ecology: Fundamentals and Applications**. 3. ed. Redwood City, CA: The Benjamin / Cummings Publishing Company Inc., 1993.

AUSTIN, R. M. Cutaneous microbial flora and antibiosis in *Plethodon ventralis*. In: BRUCE, R. C.; JAEGER, R. G.; HOUCK, L. D. (Eds.). **The Biology of Plethodontid Salamanders**. New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow: Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2000. p. 451-462.

AZEVEDO CALDERON, L. de *et al.* Antimicrobial peptides from *Phyllomedusa* frogs: from biomolecular diversity to potential nanotechnologic medical applications. **Amino Acids**, v.40, p. 29-49, 2011.

BARRA, D.; SIMMACO, M.; BOMANC, H. G. Gene-encoded peptide antibiotics and innate immunity. Do animacules have defence budget? **FEBS Letters**, v. 430, p. 130-134, 1998.

BECKER, C. G. **Desconexão de habitats e o declínio global dos anfíbios**. Campinas: Universidade de Campinas, 2007.

BECKER, M. H. *et al.* Composition of symbiotic bacteria predicts survival in Panamanian golden frogs infected with a lethal fungus. **Proceedings of the Royal Society B**. v. 282, n. 1805, p. 20142881, 2015.

BECKER, M. H. *et al.* The bacterially produced metabolite violacein is associated with survival of amphibians infected with a lethal fungus. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 21, p. 6635-6638, 2009.

BECKER, M. H.; HARRIS, R. N. Cutaneous bacteria of the redback salamander prevent morbidity associated with a lethal disease. **PLoS ONE**, v. 5, n. 6, p. e10957, 2010.

BENNETT, A. F.; SAUNDERS, D. A. Habitat fragmentation and landscape change. In: SODHI, N. S.; EHRLICH, P. R. **Conservation Biology for All**. 2010. Oxford: Oxford University Press, 2010. p. 88-106.

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.

BERTOLUCI, J. 1998. Annual patterns of breeding activity in Atlantic rainforest anurans. **Journal of Herpetology**, v. 32, n. 4, p. 607-611.

BETTIN, C.; GREVEN, H. Bacteria on the skin of *Salamandra salamandra* (L.) (Amphibia, Urodela) with notes on their possible significance. **Zoologischer Anzeiger**, v. 216, p. 267-270, 1986.

BLACK, J. G. **Microbiology: Principles and Explorations**. 4. ed. United States of America: John Wiley & Sons, Inc., 1999.

BLAUSTEIN, A. R.; KIESECKER, J. M. Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations. **Ecology Letters**, v. 5, n. 4, p. 597-608, 2002.

BLETZ, M. C. *et al.* Mitigating amphibian chytridiomycosis with bioaugmentation: characteristics of effective probiotics and strategies for their selection and use. **Ecology Letters**, v.16, p. 807-820, 2013.

BOMAN, H. G. Innate immunity and the normal microflora. **Immunological reviews**, v. 173, p. 5-16. 2000.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BREARLEY, G. *et al.* Wildlife disease prevalence in human-modified landscapes. **Biological Reviews**, v. 88, n. 2, p. 427-442, 2013.

BRIZZI, R.; DELFINO, G.; PELLEGRINI, R. Specialized mucous glands and their possible adaptive role in the males of some species of *Rana* (Amphibia, Anura). **Journal of Morphology**, v. 254, n. 3, p. 328-341, 2002.

BROWER, J. E.; ZAR, J. H. Field & laboratory methods for general ecology. 2. ed. Dubuque, Iowa: Wm. C. Brown Publishers, 1984.

BRUCKER, R. M. *et al.* Amphibian chemical defense: antifungal metabolites of the microsymbiont *Janthinobacterium lividum* on the salamander *Plethodon cinereus*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 34, p. 1422-1429, 2008.

BURKEY, T. V. Metapopulation extinction in fragmented landscapes: using bacteria and protozoa communities as model ecosystems. **The American Naturalist**, v. 150, n. 5, p. 568-591, 2013.

CAREY, C.; COHEN, N.; ROLLINS-SMITH, L. Amphibian declines: an immunological perspective. **Developmental and comparative immunology**, v. 23, n. 6, p. 459-72, 1999.

CARNAVAL, A. C. O. D. Q. *et al.* Amphibian chytrid fungus broadly distributed in the Brazilian Atlantic Rain Forest. **EcoHealth**, v. 3, n. 1, p. 41-48, 2006.

CASTANHO, L. M. **História natural de *Phyllomedusa distincta*, na Mata Atlântica do município de Sete Barras, Estado de São Paulo** (Amphibia, Anura, Hylidae). Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 1994.

CHRISTIN, M. S. *et al.* Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Xenopus laevis* and *Rana pipiens*. **Aquatic Toxicology**, v. 67, n. 1, p. 33-43, 2004.

CLARKE, B. T. The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 72, n. 3, p. 365-379, 1997.

CLARKE, K. R.; WARWICK, R. M. **Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation**. 2. ed. Plymouth, UK: PRIMER-E Ltd, 2001.

COLE, J. R. *et al.* Microbial diversity and phylogeny: Extending from rRNAs to Genomes. In: LIU, W.-T.; JANSSON, J. K. (Eds.). **Environmental Molecular Microbiology**. Norfolk, UK: Caister Academic Press, 2010. p. 1-19.

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**, v. 28, n. 6, p. 1268-74, 2007.

CONLON, J. M.; KOLODZIEJEK, J.; NOWOTNY, N. Antimicrobial peptides from Ranid frogs: taxonomic and phylogenetic markers and a potential source of new therapeutic agents. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1696, n. 1, p. 1-14, 2004.

CRUSE, J. M.; LEWIS, R. E. **Atlas of immunology**. 2. ed. Boca Raton, London, New York, Washington, D.C.: CRC Press LLC, 2004.

CSORDAS, A.; MICHL, H. Isolation and structure of a haemolytic polypeptide from the defensive secretion of European *Bombina* species. **Monatshefte für Chemie**, v. 101, p. 182-189, 1970.

CULP, C. E.; FALKINHAM III J. O., B. L. Identification of the natural bacterial microflora on the skin of eastern newts, bullfrog tadpoles and redback salamanders. **Herpetologica**, v. 63, n. 1, p. 66-71, 2007.

DALE, V. H. et al. Patterns of land-use relating in to faunal biodiversity change in the Central Amazon. **Conservation Biology**, v. 8, n. 4, p. 1027-1036, 1994.

DALE, V. H.; PEARSON, S. M. Quantifying habitat fragmentation due to land use change in Amazonia. In: LAURANCE, W. F.; BIERREGAARD, R. O. (Eds.). **Tropical Forest Remnants. Ecology, Management and Conservation of Fragmented Communities**. Chicago: The University of Chicago Press, 1997. p. 400-409.

DALY, J. W. et al. Absence of tetrodotoxins in a captive-raised riparian frog, *Atelopus varius*. **Science**, v. 35, n. 5, p. 705-709, 1997.

DASZAK, P. Emerging infectious diseases of wildlife: threats to biodiversity and human health. **Science**, v. 287, n. 5452, p. 443-449, 2000.

DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A. A; HYATT, A D. Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. **Acta Tropica**, v. 78, p. 103-116, 2001.

DAVIDSON, C. *et al.* Effects of chytrid and carbaryl exposure on survival, growth and skin peptide defenses in foothill yellow-legged frogs. **Environmental Science and Technology**, v. 41, p. 1771-1776, 2007.

DE PAULA, C. D. **Patologia comparada de infecções selecionadas de anfíbios anuros de vida livre do bioma da Mata Atlântica: estudo prospectivo**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2011.

DIXO, M. **Diversidade de sapos e lagartos de serrapilheira numa paisagem fragmentada do Planalto Atlântico de São Paulo**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2005.

DUCKLOW, H. W.; MITCHELL, R. Bacterial populations and adaptations in the mucus layers on living corals. **Limnology and Oceanography**, v. 24, n. 4, p. 715-725, 1979.

DUDA, T. F.; VANHOYE, D.; NICOLAS, P. Roles of diversifying selection and coordinated evolution in the evolution of amphibian antimicrobial peptides. **Molecular Biology and Evolution**, v. 19, n. 6, p. 858-864, 2002.

DUNNY, G. M.; WINANS, S. C. Cell-cell signaling in bacteria. Washington, D C: ASM Press, 1999.

EATON, A. D. *et al.* **Standard Methods. For Examination of Water and Wastewater**. 8. ed. Washington, DC: American Public Health Association, 1995.

EPSTEIN, P. R.; DOBSON, A.; VANDERMEER, J. Biodiversity and emerging infectious diseases: integrating health and ecosystem monitoring. In: GRIFO, F.; ROSENTHAL, J. (Eds.). **Biodiversity and Human Health**. Washington, D C: Island Press, 1997. p. 60-86.

FEDER, M. E.; BURGGREN, W. W. **Environmental Physiology of the Amphibians**. Chicago: The University of Chicago Press, 1992.

FERNANDES, N.; COELHO, O. G. P. **História e Geografia do Vale do Paraíba**. Neusa Fernandes. Rio de Janeiro: Instituto Histórico e Geográfico de Vassouras, CREA-RJ, Prefeitura de Vassouras, 2013.

FISHER, M. C. *et al.* Proteomic and phenotypic profiling of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* shows that genotype is linked to virulence. **Molecular Ecology**, v. 18, n. 3, p. 415-29, 2009.

FLECHAS, S. V *et al.* Surviving chytridiomycosis: differential anti-*Batrachochytrium dendrobatidis* activity in bacterial isolates from three lowland species of *Atelopus*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. e44832, 2012.

GERRITSEN, J. *et al.* Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics. **Genes & nutrition**, v. 6, p. 209-240, 2011.

GOTELLI, N. J. **Ecologia**. 4. ed. Londrina: Planta, 2009.

GRAFFELMAN, J. calibrate: calibration of scatterplot and biplot axes. **R package** version 1.7.2, 2015.

GRANT, J. B.; LAND, B. Transcutaneous amphibian stimulator (TAS): a device for the collection of amphibian skin secretions. **Herpetological Review**, v. 33, n. 1, p. 38-41, 2002.

HADDAD, C. F. B.; GIOVANELLI, J. G. R.; ALEXANDRINO, J. O aquecimento global e seus efeitos na distribuição e declínio dos anfíbios. In: BUCKERIDGE, M. S. (Org.). **Biologia e Mudanças Climáticas no Brasil**, São Carlos: RIMA, 2008. p. 195-206.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HAMMER Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2001.

HANDELSMAN, J. *et al.* **National Research Council (US) Committee on Metagenomics: Challenges and Functional Applications**. The New Science of Metagenomics: Revealing the Secrets of our Microbial Planet. Washington, D C: National Academies Press (US), 2007.

HARRIS, R. N. *et al.* Amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* is inhibited by the cutaneous bacteria of amphibian species. **EcoHealth**, v. 3, n. 1, p. 53-56, 2006.

HARRIS, R. N. *et al.* Skin microbes on frogs prevent morbidity and mortality caused by a lethal skin fungus. **The ISME journal**, v. 3, p. 818-824, 2009.

HENLE, K. *et al.* Predictors of species sensitivity to fragmentation. **Biodiversity and Conservation**, v. 13, n. 1, p. 207-251, 2004.

HIRD, D. W. *et al.* *Aeromonas hydrophila* in wild-caught frogs and tadpoles (*Rana pipiens*) in Minnesota. **Laboratory Animal Science**, v. 31, n. 2, p. 166-169, 1981.

HOFF, G. L.; FRYE, F. L.; JACOBSON, E. R. **Diseases of Amphibian and Reptiles**. New York: Plenum Press, 1984.

HOULAHAN, J. E. *et al.* Quantitative evidence for global amphibian population declines. **Nature**, v. 404, n. 6779, p. 752-5, 2000.

HUNTER-CEVERA, J. C. The value of microbial diversity. **Current Opinion in Microbiology**, v. 1, n. 3, p. 278-85, 1998.

INSTITUTO FLORESTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO – IF. **Plano de manejo do Parque Estadual Serra do Mar**, 2006. Disponível em: <http://archive.is/www.iflorestal.sp.gov.br>. Acesso: 07/09/2015.

JOHN, J.; SAMUEL, R. Herd immunity and herd effect: new insights and definitions. **European Journal of Epidemiology**, v. 16, n. 7, p. 601-606, 2000.

KENNEDY, A C.; SMITH, K. L. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. **Plant and Soil**, v. 170, n. 1, p. 75-86, 1995.

KERSTERS, K. *et al.* Introduction to the Proteobacteria. In: DWORKIN, M. *et al.* (Eds.). **The Prokaryotes**. A Handbook on the Biology of Bacteria. 3. ed. New York: Springer-Verlag, 2006. p. 3-37.

KONOPKA, A. What is microbial community ecology? **The ISME journal**, v. 3, n. 11, p. 1223-1230, 2009.

KRONKA, F. J. N. (coord) *et al.* **Inventário florestal da vegetação natural do Estado de São Paulo**. São Paulo: Governo do Estado de São Paulo. Secretaria do Meio Ambiente/Instituto Florestal, 2005. 200 p.

KUENEMAN, J. G. *et al.* The amphibian skin-associated microbiome across species, space and life history stages. **Molecular Ecology**, v. 23, n. 6, p. 1238-1250, 2014.

KÜNG, D. *et al.* Stability of microbiota facilitated by host immune regulation: informing probiotic strategies to manage amphibian disease. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2014.

LAM, B. A. *et al.* Proportion of individuals with anti-*Batrachochytrium dendrobatidis* skin bacteria is associated with population persistence in the frog *Rana muscosa*. **Biological Conservation**, v. 143, n. 2, p. 529-531, 2010.

LAM, B. A.; WALTON, D. B.; HARRIS, R. N. Motile zoospores of *Batrachochytrium dendrobatidis* move away from antifungal metabolites produced by amphibian skin bacteria. **EcoHealth**, v. 8, p. 36-45, 2011.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackenbrandt E, Goodfellow M, editors. **Nucleic acid techniques in Bacterial systematics**. New York: John Wiley and Sons. p. 115-147, 1991.

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

LAUER, A. *et al.* Diversity of cutaneous bacteria with antifungal activity isolated from female four-toed salamanders. **The ISME Journal**, v. 2, n. 2, p. 145-57, 2008.

LEGENDRE, P.; LEGENDRE, L. **Numerical Ecology**. 3. ed. Amsterdam: Elsevier, 2012.

LEONEL, C. **Intervalos: Fundação para a Conservação e Produção Florestal do Estado de São Paulo**. São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente / Fundação Florestal, 2001.

LEY, R. E. *et al.* Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 6, n. 10, p. 776-788, 2008.

LILLYWHITE, H. B. Amphibian mucous glands: comparative evidence for an adaptive role in preventing cutaneous desiccation. **Bulletin of the Ecological Society of America**, v. 552, n. 16, 1974.

LIPS, K. A tale of two lineages: unexpected, long-term persistence of the amphibian-killing fungus in Brazil. **Molecular Ecology**, v. 23, p. 747-749, 2014.

LIPS, K. R. *et al.* Riding the wave: reconciling the roles of disease and climate change in amphibian declines. **PLoS Biology**, v. 6, n. 3, p. 0441-0454, 2008.

LONGCORE, J. E. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. Nov., a chytrid pathogenic to amphibians. **Mycologia**, v. 91, n. 2, p. 219-227, 1999.

LOUDON, A. H. *et al.* Microbial community dynamics and effect of environmental microbial reservoirs on red-backed salamanders (*Plethodon cinereus*). **The ISME Journal**, v. 8, n. 4, p. 830-40, 2014.

LOZUPONE, C. A. *et al.* Quantitative and qualitative beta diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 1576-1585, 2007.

LOZUPONE, C.; KNIGHT, R. UniFrac: A new phylogenetic method for comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 8228-8235, 2005.

MA, L. et al. Soil moisture and land use are major determinants of soil microbial community composition and biomass at a regional scale in northeastern China. **Biogeosciences**, v. 12, n. 8, p. 2585-2596, 2015.

MADIGAN, M. T. *et al.* **Brock Biology of Microorganisms**. 12. ed. San Francisco: Pearson/Benjamin Cummings, 2009.

MADSEN, E. L. Physiological ecology: resource exploitation by microorganisms. In: MADSEN, E. L. (Ed.). **Environmental Microbiology**. Malden, Oxford, Victoria: Blackwell Publishing, 2008. p. 52-105.

MAGURRAN, A. E. **Ecological Diversity and its Measurement**. New Jersey: Princeton University Press, 1988.

MAIDEN, M. C. J.; URWIN, R. Population dynamics of bacterial pathogens. In: SEIFERT, H. S.; DIRITA, V. J. (Eds.). **Evolution of Microbial Pathogens**. Washington: American Society for Microbiology Press, 2006. p. 35-54.

MANGONI, M. L. *et al.* The synthesis of antimicrobial peptides in the skin of *Rana esculenta* is stimulated by microorganisms. **The FASEB Journal**, v. 15, n. 8, p. 1431-1432, 2001.

MCKENZIE, V. J. *et al.* Co-habiting amphibian species harbor unique skin bacterial communities in wild populations. **The ISME Journal**, v. 6, n. 3, p. 588-96, 2012.

METZGER, J. P. Conservation issues in the Brazilian Atlantic Forest. **Biological Conservation**, v. 142, n. 6, p. 1138-1140, 2009.

METZGER, J. P. O que é Ecologia de Paisagens? **Biota Neotropica**, v. 1, n. 1, p. 1-9, 2001.

MEYER, E. A *et al.* Changes in cutaneous microbial abundance with sloughing: possible implications for infection and disease in amphibians. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 101, n. 3, p. 235-42, 2012.

MOR, A.; HANI, K.; NICOLAS, P. The vertebrate peptide antibiotics dermaseptins have overlapping structural features but target specific microorganisms. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 50, p. 31635-31641, 1994.

MORELLATO, P. C.; HADDAD, C. F. B. Introduction: The Brazilian Atlantic Forest. **Biotropica**, v. 32, n. 4b, p. 786-792, 2000.

MOURIÑO, J. L. P. *et al.* Isolamento de *Aeromonas hydrophila* em girinos de rã-touro na metamorfose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 8, p. 1325-1327, 2006.

MULETZ, C. R. *et al.* Soil bioaugmentation with amphibian cutaneous bacteria protects amphibian hosts from infection by *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Biological Conservation**, v. 152, p. 119-126, 2012.

MYERS, J. M. *et al.* Synergistic inhibition of the lethal fungal pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*: the combined effect of symbiotic bacterial metabolites and antimicrobial peptides of the frog *Rana muscosa*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 38, n. 8, p. 958-965, 2012.

MYERS, N. *et al.* Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.

NAVAS, C. A.; OTANI, L. Physiology, environmental change, and anuran conservation. **Phyllomedusa**, v. 6, n. 2, p. 83-103, 2007.

O'DONNELL, A. G.; GOODFELLOW, M.; HAWKSWORTH, D. L. Theoretical and practical aspects of the quantification of biodiversity among microorganisms. In: HAWKSWORTH, D. L. (Ed.). **Biodiversity Measurement and Estimation**. Oxford, England: The Royal Society. Chapman & Hall. Alden Press, 1996. p. 65-74.

ODUM, E. P. **Ecologia**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara S.A., 1988.

OGRAM, A.; FENG, X. Methods of soil microbial community analysis. In: HUST, C. J. *et al.* (Eds.). **Manual of Environmental Microbiology**. Washington: American Society for Microbiology, 1997. p. 422-430.

OLSON, D. H. *et al.* Mapping the Global Emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* the Amphibian Chytrid Fungus. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. 1-13, 2013.

PARKER, M. T. Bacterial as pathogens: historical introduction. In: COLLIER, L.; BALLOWS, A.; SUSSMAN, M. (Eds.). **Microbiology and Microbial Infections**. 9. ed. New York: Oxford University Press, Inc., 1998. p. 1-14.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. E. **Microbiologia**. São Paulo: Mac Graw-Hill Brasil, 1981.

PESSIER, A. P. An Overview of Amphibian Skin Disease. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 11, n. 3, p. 162-174, 2002.

PINTO, L. C.; BRITO, M. C. W. Dinâmica da perda da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira: uma introdução. In: GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I. DE G. (Eds.). **Mata Atlântica: Biodiversidade, Ameaças e Perspectivas**. Belo Horizonte: Fundação SOS Mata Atlântica, 2005. p. 30-37.

PLANTE, A. F.; PARTON, W. J. The dynamics of soil organic matter and nutrient cycling. In: PAUL, E. A. (Ed.). **Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry**. 3. ed. United States of America: Elsevier Academic Press, 2007. p. 471-500.

POUGH, F. H. *et al.* **Herpetology**. New York: Prentice Hall, 1998.

PRADO, G. M.; POMBAL, JR, J. P. Espécies de *Proceratophrys* Miranda-Ribeiro, 1920 com apêndices palpebrais (Anura, Cycloramphidae). **Arquivos de Zoologia**, v. 39, n. 1, p. 1-85, 2008.

QUINN, G. P.; KEOUGH M. K. **Experimental design and data analysis for biologists**. New York: Cambridge University Press, 2002.

RANTALAINEN, M.-L. Sensitivity of soil decomposer communities to habitat fragmentation - an experimental approach. **Jyväskylä Studies in Biological and Environmental Sciences**, p. 1-38, 2004.

REICHENBACH-KLINKE, H.; ELKAN, E. **The Principal Diseases of Lower Vertebrates**. Book II Diseases of Amphibian. London: Academic Press Inc., 1965.

RIBEIRO, M. C. *et al.* The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, v. 142, n. 6, p. 1141-1153, 2009.

RODRIGUES, M. T. The conservation of Brazilian reptiles: challenges for a megadiverse country. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 659-664, 2005.

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

ROLLINS-SMITH, L. A. *et al.* Antimicrobial peptide defenses in amphibian skin. **Integrative and Comparative Biology**, v. 45, n. 1, p. 137- 142, 2005.

ROLLINS-SMITH, L. A. *et al.* Antimicrobial peptide defenses against pathogens associated with global amphibian declines. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 26, p. 63-72, 2002.

ROSENBERG, E. **Microbial Ecology and Infectious Disease**. Washington, D C: ASM Press, 1999.

SALLE, A. J. Effect of environment upon bacteria. In: SALLE, A. J. (Ed.). **Fundamental Principles of Bacteriology**. 5. ed. New York, Toronto, London: McGraw-Hill Book Company, Inc., 1961. p. 232-267.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning, a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000.

SAUNDERS, D. A.; HOBBS, R. J.; MARGULES, C. R. Biological consequences of ecosystem fragmentation: a review. **Conservation Biology**, v. 5, n. 1, p. 18-32, 1991.

SCHLOEGEL, L. M. *et al.* Novel, panzootic and hybrid genotypes of amphibian chytridiomycosis associated with the bullfrog trade. **Molecular Ecology**, v. 21, n. 21, p. 5162-5177, 2012.

SCHLOSS, P. D. *et al.* Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 23, p. 7537-7541, 2009.

SHELFORD, V. E. **Animals Communities in Temperate America**. Chicago: University of Chicago Press, 1913.

SILVA, J. M. C.; CASTELETI, C. H. M. Status of the biodiversity of the Atlantic Forest of Brazil. In: GALINDO-LEA, C.; CÂMARA, I. G. (Eds.). **The Atlantic Forest of South America: Biodiversity Status, Threats, and Outlook**. Washington: Island Press, 2003. p. 43-59.

SIMMACO, M. *et al.* Effect of glucocorticoids on the synthesis of antimicrobial peptides in amphibian skin. **FEBS letters**, v. 416, n. 3, p. 273-275, 1997.

SIMMACO, M.; MIGNOGNA, G.; BARRA, D. Antimicrobial peptides from amphibian skin: What do they tell us? **Biopolymers - Peptide Science Section**, v. 47, p. 435-450, 1998.

SMITH, B.; WILSON, J. B. A consumer's guide to evenness indices. **Oikos**, v. 76, n. 1, p. 70-82, 1996.

SOETAERT, K. shape: Function for plotting graphical shapes, colors. **R package** version 1.4.2, 2014.

SYMONDS, E. P. *et al.* Growth characteristics and enzyme activity in *Batrachochytrium dendrobatidis* isolates. **Mycopathologia**, v. 166, n. 3, p. 143-7, 2008.

TABARELLI, M. **A regeneração da floresta Atlântica Montana**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1997.

TABARELLI, M. *et al.* Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 132-138, 2005.

TABARELLI, M.; VILLANI, J. P.; MANTOVANI, W. Aspectos da sucessão secundária no Parque Estadual da Serra do Mar. **Revista do Instituto Florestal**, v. 5, p. 101-114, 1993.

TOLEDO, R. C.; JARED, C. Cutaneous granular glands and amphibian venoms. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 111 A, n. 1, p. 1-29, 1995.

TURNER, I. M.; CORLETT, R. T. The conservation value of small, isolated fragments of lowland tropical rain forest. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 11, n. 8, p. 330-333, 1996.

TYLER, M.; WASSERSUG, R.; SMITH, B. How frogs and humans interact: influences beyond habitat destruction, epidemics and global warming. **Applied Herpetology**, v. 4, n. 1, p. 1-18, 2007.

VELOSO, H.; FILHO, A. R.; LIMA, J. C. A. **Classificação da Vegetação Brasileira Adaptada a um Sistema Universal**. Rio de Janeiro: IBGE, Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais, 1991.

VIANA, V. M.; PINHEIRO, L. A. F. V. Conservação da biodiversidade em fragmentos florestais. **Série Técnica IPEF**, v.12, n.32, p. 25-42, 1998.

VIANA, V. M.; TABANEZ, A. A. J.; BATISTA, J. L. F. Dynamics and restoration of forest fragments in the Brazilian Atlantic Moist forest. In: LAURANCE, W. F.; BIERREGAARD, R. O. (Eds.). **Tropical Forest Remnants: Ecology, Management and Conservation of Fragmented Communities**. Chicago: University of Chicago Press, 1997. p. 351-365.

WALKE, J. B. *et al.* Social immunity in amphibians: Evidence for vertical transmission of innate defenses. **Biotropica**, v. 43, n. 4, p. 396-400, 2011.

WALTHER, G.-R. *et al.* Ecological responses to recent climate change. **Nature**, v. 416, n. 6879, p. 389-395, 2002.

WANG, Q. *et al.* Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 16, p. 5261-5267, 2007.

WEINBAUER, M.; RASSOULZADEGAN, F. REVIEW: Extinction of microbes: evidence and potential consequences. **Endangered Species Research**, v. 3, p. 205-215, 2007.

WELDON, C. *et al.* Origin of the amphibian chytrid fungus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 12, p. 2100-5, 2004.

WELLS, K. D. **The Ecology and Behavior of Amphibian**. Chicago: The University of Chicago Press, 2007.

WELLS, K. D. The social behaviour of anuran amphibians. **Animal Behaviour**, v. 25, p. 666-693, 1977.

WHITE JR., J. F.; TORRES, M. S. **Defensive Mutualism in Microbial Symbiosis**. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group, 2009.

WIED-NEUWIED, M. A. P. Verzeichnis der Amphibien, welche im zweiten Bande 1269 der Naturgeschichte Brasiliens von Prinx Max von Wied Beschrieben. **Isis von Oken**, v. 14, p. 661-673, 1824.

WILLISTON, E. H.; ZIA-WALRATH, P.; YOUMANS, G. P. Plate methods for testing antibiotic activity of Actinomycetes against virulent human type tubercle Bacilli. **Journal of Bacteriology**, v. 54, n. 5, p. 563-568, 1947.

WOODHAMS, D. C. *et al.* Adaptations of skin peptide defences and possible response to the amphibian chytrid fungus in populations of Australian green-eyed treefrogs, *Litoria genimaculata*. **Diversity and Distributions**, v. 16, n. 4, p. 703-712, 2010.

WOODHAMS, D. C. *et al.* Predicted disease susceptibility in a Panamanian amphibian assemblage based on skin peptide defenses. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 42, n. 2, p. 207-18, 2006a.

WOODHAMS, D. C. *et al.* Population trends associated with skin peptide defenses against chytridiomycosis in Australian frogs. **Oecologia**, v. 146, n. 4, p. 531-40, 2006b.

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

XU, J. Metagenomics and ecosystems biology: Conceptual frameworks, tools and methods. In: MARCO, D. (Ed.). **Metagenomics: Theory, Methods and Applications**. Norfolk, UK: Caister Academic Press, 2010. p. 1-13.

YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n. 1, p. 27-55, 2003.

YUE, J.C.; CLAYTON, M. K. A similarity measure based on species proportions. **Communications in Statistics-Theory and Methods**, v. 34, p. 2123-2131, 2005.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, p. 389-395, 2002.

ZASLOFF, M. Mysteries that still remain. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1788, p. 1693-1694, 2009.

ZILLI, J. É. *et al.* Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 20, n. 3, p. 391-411, 2003.

ZINA, J. *et al.* Taxocenose de anuros de uma mata semidecídua do interior do Estado de São Paulo e comparações com outras taxocenoses do estado, sudeste do Brasil. **Biota Neotropica**, v. 7, n. 2, p. 49-57, 2007.

ANEXOS

Continuação

Densidade média de UFC

Morfotipos

Figura 1. Densidade de colônias (UFCs) por morfotipo para cada local amostrado: A, PESM – Santa Virgínia; B, PESM – Cunha; C, Benedita; D, Ditinha; E, G4; F, Gonzaga; G, Ditão; H, Pimenta; I, Fonte; J, Cachoeira; K, Sidney; L, Embaúba; M, Irene; N, João; O, Diolga; P, Pantheon.

Tabela 1. Composição de filos bacterianos em diferentes espécies de anfíbios.

Espécie de anfíbio	Proteobacteria	Bacteroidetes	Firmicutes	Actinobacteria	Cyanobacteria	Acidobacteria
<i>Agalychnis callidryas</i>	X	X	X	X		
<i>Ambystoma tigrinum</i>	X	X	X	X	X	
<i>Anaxyrus boreas</i>	X	X	X	X	X	
<i>Atelopus aff. limosus</i>	X	X				
<i>Atelopus elegans</i>	X	X				
<i>Atelopus spurrelli</i>	X	X				
<i>Hemidactylium scutatum</i>	X	X	X	X		
<i>Lithobates catesbeianus</i>	X	X	X	X	X	X
<i>Lithobates pipiens</i>	X	X	X	X	X	X
<i>Plethodon cinereus</i>	X	X	X	X		
<i>Proceratophrys boiei</i>	X					
<i>Pseudacris regilla</i>	X	X	X	X	X	
<i>Pseudacris triseriata</i>	X	X	X	X	X	X
<i>Rana muscosa</i>	X	X	X	X		
<i>Rana catesbeiana</i>	X		X	X		
<i>Taricha torosa</i>	X	X	X	X	X	X
<i>Notophthalmus viridescens</i>	X					

Refs.: Culp *et al.* , 2007; Woodhams *et al.* , 2007; Lauer *et al.* , 2007; Lauer *et al.* , 2008; Lam *et al.* , 2010; McKenzie *et al.* , 2012; Flechas *et al.* , 2012; Antwis *et al.* , 2014; Kueneman *et al.* , 2014

SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE
INSTITUTO FLORESTAL

Rua do Horto, 931 – CEP 02377-000 – S. Paulo, SP - Brasil - Fone: (0xx11) 2231-8555 www.iflorestal.sp.gov.br

PROCESSO SMA Nº. : 260108 - 006.357/ 2011
INTERESSADO : Ananda Brito de Assis
ASSUNTO : Encaminha o projeto de pesquisa: “Efeitos da Fragmentação Florestal sobre a Microbiota Cutânea e Secreção Dérmica de anuros da Floresta Atlântica”
EQUIPE : Ananda Brito de Assis
VIGÊNCIA : Julho de 2012 a Julho de 2014

UNIDADE e RESPONSÁVEL	ENDEREÇO DA UNIDADE DE CONSERVAÇÃO	OBSERVAÇÕES
		atividades de ensino, sejam na forma mini-cursos, palestras, apostilas, folhetos, painéis explicativos, para os diferentes grupos que atuam no Parque, a exemplo de outros pesquisadores; <ul style="list-style-type: none"> Relatórios parciais e final encaminhados à COTEC devem também ser remetidos à administração do Parque Estadual da Serra do Mar – Núcleo Picinguaba, para serem juntados ao acervo da Unidade.
Parque Estadual da Serra do Mar – Núcleo Santa Virgínia Ao responsável pela Unidade	Rodovia Oswaldo Cruz - Km 78 Barro Branco – São Luís do Paraitinga - SP Tel.: (12) 3671-9266 9781-9015 Fax: (12) 3671-9159 nucleosv@ig.com.br pesm.santavirignia@fflorestal.sp.gov.br	<ul style="list-style-type: none"> Agendamento prévio; Relatórios parciais e final encaminhados à COTEC devem também ser remetidos à administração do Parque Estadual da Serra do Mar – Núcleo Santa Virgínia, para serem juntados ao acervo da Unidade.
Parque Estadual da Serra do Mar – Núcleo São Sebastião Ao responsável pela Unidade	Praça. Simeão Faustino, 17 Juquery - São Sebastião - SP CEP 11600-000 Tel.: (12) 3863-1707 pesm.saosebastiao@fflorestal.sp.gov.br	<ul style="list-style-type: none"> Informar a administração as datas de coleta e apresentar os resultados; Apresentar as autorizações para a coleta de animais; Relatórios parciais e final encaminhados à COTEC devem também ser remetidos à administração do Parque Estadual da Serra do Mar – Núcleo São Sebastião, para serem juntados ao acervo da Unidade.
Parque Estadual da Serra do Mar - Núcleo Cunha/ Indaíá Ao responsável pela Unidade	Estrada Municipal do Paraibuna, km 20 Paraibuna – Cunha – SP CEP 12530-000 Tel.: (12) 3111-2353 Fax: (12) 3111-1818 pesm.cunha@fflorestal.sp.gov.br	<ul style="list-style-type: none"> Agendar as visitas com antecedência mínima de 10 dias; Trazer nas vistas à Unidade de Conservação gêneros alimentícios e roupa de cama e banho; Enviar para a Unidade de Conservação cópia dos trabalhos produzidos; Qualquer tipo de apoio da Unidade de Conservação à pesquisa deverá ser solicitado ao responsável pela Unidade de Conservação com um prazo mínimo de 15 dias, sendo que este apoio estará condicionado às possibilidades de atendimento; Apresentar uma palestra, em data antecipadamente acordada com o responsável pela Unidade de Conservação, sobre o projeto desenvolvido. Esta palestra estará inserida no programa de Educação Ambiental da Unidade de Conservação; Por ocasião das visitas à Unidade de Conservação apresentar a devida licença do IBAMA para coletas; Relatórios parciais e final encaminhados à COTEC devem também ser remetidos à administração do Parque Estadual da Serra do Mar – Núcleo Cunha/Indaíá, para serem juntados ao acervo da

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 28226-1	Data da Emissão: 26/04/2011 11:19
Dados do titular	
Nome: Ananda Brito de Assis	CPF: 053.613.574-64
Título do Projeto: Microbiotas Cutâneas e Secções Dérmicas de Anfíbios em Fragmentos de Floresta Atlântica.	
Nome da Instituição: REITORIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	CNPJ: 63.025.530/0001-04

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta e transporte de material biológico	08/2011	12/2015
De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto.			

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA nº 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
7	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	SAO LUIS DO PARAITINGA	SP	SÃO Paulo	Fora de UC
2	NATIVIDADE DA SERRA	SP	SÃO Paulo	Fora de UC
3	MOGI DAS CRUZES	SP	SÃO Paulo	Fora de UC
4	PARAIBUNA	SP	SÃO Paulo	Fora de UC
5	LAGOINHA	SP	SÃO Paulo	Fora de UC
6	CUNHA	SP	SÃO Paulo	Fora de UC
7	SALESOPOLIS	SP	SÃO Paulo	Fora de UC
8	BIRITIBA-MIRIM	SP	SÃO Paulo	Fora de UC
9	EMBU	SP	SÃO Paulo	Fora de UC
10	ILHABELA	SP	SÃO Paulo	Fora de UC
11	PIEDADE	SP	SÃO Paulo	Fora de UC
12	CAPAO BONITO	SP	SÃO Paulo	Fora de UC

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Amphibia
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Amphibia
3	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Amphibia (*Qtde: 40)

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 49532193

Página 1/3

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 28226-1	Data da Emissão: 26/04/2011 11:19
Dados do titular	
Nome: Ananda Brito de Assis	CPF: 053.613.574-64
Título do Projeto: Microbiotas Cutâneas e Secreções Dérmicas de Anfíbios em Fragmentos de Floresta Atlântica.	
Nome da Instituição : REITORIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	CNPJ: 63.025.530/0001-04

* Qtde. de indivíduos por espécie/localidade/unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Anfíbios)	Secreção
2	Método de captura/coleta (Anfíbios)	Captura manual

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	REITORIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	coleção

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 49532193

Página 2/3

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 28226-1	Data da Emissão: 26/04/2011 11:19
Dados do titular	
Nome: Ananda Brito de Assis	CPF: 053.613.574-64
Título do Projeto: Microbiotas Cutâneas e Secreções Dérmicas de Anfíbios em Fragmentos de Floresta Atlântica.	
Nome da Instituição: REITORIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	CNPJ: 63.025.530/0001-04

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 49532193

Página 3/3

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

OF. CEUA/IB/028/2011
Ref. 2011.1.537.41.4

São Paulo, 22 de junho de 2011.

Prezado Senhor

Dirijo-me a V. Sa. para informar que a Comissão de Ética em Uso de Animais do IB (CEUA), em reunião realizada no dia 21/06/2011, **APROVOU** o Projeto “Comunidades microbianas de pele e secreções dérmicas de anfíbios em diferentes fragmentos de floresta atlântica” – **Protocolo 129/2011**, de sua responsabilidade (Colaboradora: Camila Nascimento Amorim de Almeida).

Atenciosamente.

Prof. Dra. Mariz Vainzof

Coordenadora da Comissão de Ética no
Uso de Animais do IB (CEUA)

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. CARLOS ARTURO NAVAS IANNINI

Departamento de Fisiologia do IBUSP.