INFLUÊNCIA DA URBANIZAÇÃO NA COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA CUTÂNEA DE ANFÍBIOS ANUROS EM DIFERENTES HABITATS

Rafael Augusto da Silva[1], Cristina Pacheco Soares[2].

[1]Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova - 12244-000 - São José dos Campos-SP, Brasil, arafael958@gmail.com[1], cpsoaresunivap.br[2]

Resumo

O estudo teve como objetivo caracterizar a microbiota da pele de duas espécies de anfíbios anuros, *Physalaemus cuvieri* e *Leptodactylus fuscus* em diferentes habitats urbanos, utilizando métodos de coloração de Gram. A coleta de dados ocorreu em São José dos Campos, SP, abrangendo áreas com diferentes níveis de urbanização. As análises mostraram que a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* foi a mais frequente em todas as localidades, sugerindo um impacto da urbanização. Já a diversidade de bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus*, variou conforme o habitat. Concluiu-se que a urbanização e o uso de habitat influencia a composição microbiana da pele dos anfíbios.

Palavras-chave: Microbiota. Habitat. Urbanização.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas

Introdução

Conhecer as diferentes características da biodiversidade urbana é uma importante ferramenta para a conservação em um cenário de discussões globais sobre o papel das cidades na biodiversidade (Piano et al., 2020). Nesse cenário estão os anfíbios, considerados como um dos grupos de vertebrados mais sensíveis às alterações do ambiente, que por sua vez são comuns em áreas urbanas (Chen; Wang; Li, 2020). Essa sensibilidade, deve-se em grande parte pela necessidade de condições específicas para reprodução e termorregulação, o que acaba sendo dificultado pelo avanço da urbanização. Por esta razão, este grupo é considerado um importante bioindicador para responder perguntas de interesse ecológico e de conservação em toda história da ciência (Eterovick; Souza; Sazima, 2020).

A urbanização é uma das manifestações mais diretas das atividades humanas (Rothwell et al., 2015), a qual altera drasticamente as propriedades do sistema biótico e abiótico em diferentes escalas (Grimm et al., 2008). As respostas a urbanização podem ser sentidas intensamente pelos anfíbios, devido as características biológicas intrínsecas do grupo, como pele permeável, ectotermia e ciclo de vida bifásico envolvendo diferentes tipos de hábitat (Alford; Richards, 1999; Haddad; Prado, 2005). Uma das principais consequências da urbanização para os anfíbios é a fragmentação das paisagens, levando a um isolamento dos habitats naturais, dificultando o fluxo de indivíduos entre as áreas pela capacidade de dispersão limitada (Mckinney, 2006; Alberti, 2015). Além disso, a simplificação da vegetação, como supressão das margens e soterramento de brejos, pode prejudicar a sobrevivência de populações inteiras em regiões urbanizadas. Essas alterações tendem a resultar em uma homogeneização das comunidades, pois poucas espécies podem ser aptas a sobreviver distúrbios no ambiente, levando a uma diminuição da riqueza taxonômica, genética e funcional (Mckinney, 2006; Alberti, 2015).

A vulnerabilidade dos anfíbios frente a modificações ambientais deve-se em partes a sua permeabilidade cutânea, a qual permite a livre passagem de elementos disponíveis no ambiente, ficando mais sujeita às infecções por microrganismos (Wells, 2007). Segundo Assis (2012), estudos

sobre a microbiota de anuros revelaram que o hábitat é um componente importante na colonização e composição das comunidades que se estabelecem sobre a pele dos anfíbios, onde fatores externos e internos podem moldá-la ou afetá-la diretamente. No entanto, até onde sabemos, poucos estudos (Zhou, Jin et al., 2023) relataram as potenciais características distintivas da estrutura da comunidade microbiana de hospedeiros animais em ambientes urbanos e entre habitats. Isso é especialmente relevante para os anfíbios, que são espécies indicadoras importantes para avaliar o impacto ecológico da urbanização (Gruzy et al., 2012). O impacto da urbanização na composição das comunidades ecológicas (Callaghan et al., 2021; Zhang et al., 2022) e a estrutura genética (Wei et al., 2021) de populações de anfíbios foram extensivamente estudadas, no entanto o impacto da urbanização na microbiota associada ainda é pouco conhecida.

Nesse contexto, este estudo tem como objetivo caracterizar a composição da microbiota de duas espécies de anfíbios anuros de diferentes hábitats através dos metodos de gram e avaliar como sua composição é afetada pelo efeito da urbanização. Ainda, este estudo visa preencher lacunas de conhecimento relacionados à microbiota dos anuros em ambientes urbanos. O estudo permitirá a compreensão dos efeitos da urbanização na diversidade e na uniformidade da microbiota, assim como se a composição da microbiota é diferente entre hábitats distintos.

Metodologia

Área de estudo

Situado entre a Serra do Mar e a Serra da Mantiqueira, o município de São José dos Campos está localizado na região Sudeste do Brasil, no estado de São Paulo, a uma Latitude: 23° 10' 47" Sul, Longitude: 45° 53' 14" Oeste (PMSJC, 2018). Em 2022, a população era de 697.054 habitantes e a densidade demográfica era de 634,03 habitantes por km², possuindo um território de 1.102km² (IBGE 2022). A Prefeitura de São José dos Campos, considera o município dividido em seis regiões urbanas de planejamento, sendo elas: Norte, Sul, Sudeste, Leste, Oeste e Centro (PMSJC, 2018); Tendo 97,5% da população joseense vivendo na zona urbana e apenas 2,5% na zona rural de acordo com o Censo 2010. O clima da cidade é mesotérmico úmido com estação seca no inverno e, segundo a classificação de Koeppen, é caracterizado como Clima subtropical de inverno seco (CWA) (PMSJC, 2018), sendo sua vegetação original e predominante de Mata Atlântica e Cerrado (PMMAC, 2019).

As quatro poças isoladas, ou seja, sem a influência de ambientes lóticos, foram mapeadas e demarcadas por meio de imagens de satélites por meio da plataforma *Google Earth Pro*. As áreas foram escolhidas considerando locais que podem ter a ocorrência das duas espécies de anuros modelo juntas, sendo avaliadas pela disponibilidade de hábitats e recursos hídricos locais.

Para cada ambiente selecionado, foram realizados “buffers” de 500 metros de raio medindo as superfícies presentes no ambiente, considerando dois fatores, superfícies impermeáveis (consistem em estruturas urbanas, como casas, ruas, calçadas e estradas) e superfícies permeáveis (vegetação presente nas proximidades das poças e lagoas), onde foi utilizado o método de Szulkin (2020) para quantificar a urbanização (ou seja, de superfície impermeáveis). As áreas de coleta estão separadas em quatro regiões diferentes da cidade, são elas: Estrada Interlagos (Sul, ~ 1%), Univap (Oeste, ~ 0%), Parque da Cidade (Norte, ~18%) e Vista Verde (Leste, ~75%).

Coleta de dados

As saídas a campo para coleta de dados foram realizadas no período noturno das 18h00 às 22h00, durante o mês de fevereiro de 2024, sendo esses os períodos de maior atividade reprodutiva dos anfíbios anuros.

Foram utilizadas três metodologias para amostragem de anuros (Figura 1-C) (Heyer; Donnelly; Mcdiarmid, 1994), que consistiram em: a) Busca ativa: consiste na procura de anfíbios em troncos, pedras, bromélias e demais refúgios encontrados; b) Transecção por busca auditiva; e c) procura em sítios de reprodução. Todos os espécimes encontrados foram registrados e identificados taxonomicamente por meio de guias de identificação de Anfíbios da Mata Atlântica (Toledo *et al*., 2021), auxiliado com um playback, contendo a vocalização das espécies.

As espécies selecionadas para a coleta de material cutâneo estão distribuídas em dois gêneros, pertencentes a uma família, sendo elas: *Physalaemus cuvieri* (Figura 1-A) (Leptodactylidae) e *Leptodactylus fuscus* (Figura 1-B) (Leptodactylidae).

A coleta de material biológico seguiu o protocolo sugerido por Hyatt et al. (2007) e Lambertini *et al.* (2013), com a aplicação do swab estéril na superfície epidérmica de cada espécime coletado (Figura 1-D). O instrumento escolhido para a coleta dos dados microbiológicos contém uma solução salina, utilizado como conservante para manter as amostras inalteradas por influências externas, além de ser pouco estressante para os animais. Os anuros foram soltos apenas quando todas as capturas de amostras foram finalizadas. O estudo possui as devidas autorizações para o manuseio e coleta das amostras cutâneas, licença SISBIO n° 93362-1.

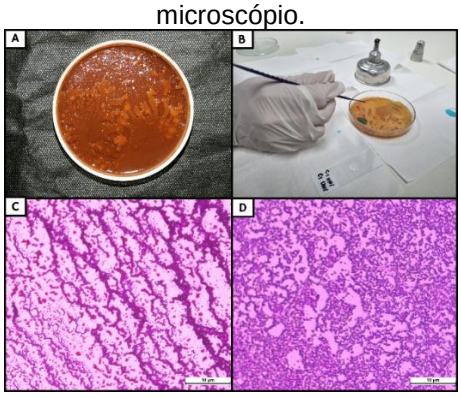
Figura 1: (A) Espécime de *Leptodactylus fuscus; (*B) Espécime de *Physalaemus cuvieri;* (C) Amostragem; (D) Coleta de material biológico.

Fonte: o autor.

Análise das amostras

Para a identificação de bactérias foi realizado o meio de cultura com crescimento generalista, utilizando o Ágar MacConkey, contendo placas incubadas em estufa bacteriológica (Figura 2-A). O Ágar MacConkey é utilizado para o isolamento, cultura e identificação de enterobactérias e microrganismos não fermentadores (Macconkey, 1900). Após o crescimento em placa, os microrganismos são transferidos para uma lâmina e uma pequena gota de água destilada é adicionada ao centro. Após, a lâmina é fixada passando rapidamente pela chama de um bico de Bunsen para a fixação das bactérias (Figura 2-B). Em seguida foi realizado o método de coloração de Gram, uma técnica de coloração bacteriana diferencial usada para diferenciar bactérias em tipos Gram positivos e Gram negativos de acordo com sua composição de parede celular. Após o método, as lâminas foram levadas ao microscópio para categorizar as morfoespécies de bactérias (Figura 2-C e D).

Figura 2: (A) Crescimento da placa; (B) Fixação da lâmina; (C-D) Observação das lâminas em microscópio.



Fonte: o autor.

Resultados

Com base nas análises das amostras obtidas, foi possível verificar as espécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas que ocorrem com mais frequência na microbiota de cada indivíduo. Para *P. cuvieri* e *L. fuscus* as Gram-positivas mais frequentes são *Staphylococcus aureus*. Aparecendo em 3 das 4 localidades para *P. cuvieri* e 2 das 4 localidades para *L. fuscus.* Já as Gram-negativa mais frequentes para *P. cuvieri* e *L. fuscus* foi *Escherichia coli*. Aparecendo em todas as localidades para ambas as espécies, conforme na tabela abaixo:

Tabela 1: Resultado do método de Gram para as espécies *P. cuvieri* e *L. fuscus*

Local	Espécie de anuro	Gram positiva	Gram negativa
Univap	*P. cuvieri*	*Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa*	*Escherichia coli, Streptobacillus moniliformis*
	L. fuscus	*Staphylococcus aureus, Staphylococcus pyogenes*	-
Interlagos	*P. cuvieri*	*Staphylococcus aureus, Staphylococcus pyogenes*	*Escherichia coli*
	L. fuscus	*Staphylococcus aureus*	*Escherichia coli*
Parque da Cidade	*P. cuvieri*	*Pseudomonas aeruginosa*	-
	L. fuscus	*Staphylococcus pyogenes*	*Escherichia coli*
Vista verde	*P. cuvieri*	*Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus pyogenes*	*Escherichia coli*
	L. fuscus	*Bacillus anthracis*	*Escherichia coli*

Fonte: o autor (2024).

Discussão

As duas espécies de anfíbios anuros usam hábitats distintos, como áreas aquáticas e terrestres, por isso a pele dos anfíbios anuros está em contato direto com o ambiente, não sendo um substrato constante, podendo variar conforme as condições ambientais (Assis et al., 2011), onde os hábitos permitem que o animal entre em contato com um amplo mosaico de comunidades microbianas que ocorrem no hábitat (Bertoluici et al., 2005). Os resultados obtidos revelam uma diversidade de microbiota associada à pele dos anuros *Physalaemus cuvieri* e *Leptodactylus fuscus* em diferentes ambientes urbanos, indicando que a urbanização tem um papel significativo na composição e predominância das espécies bacterianas presentes. Como também a presença dessas espécies em diferentes hábitats implica que a composição da microbiota de cada espécie possa ser moldada pelo uso de hábitat, evidenciando a adaptabilidade e seleção da microbiota às condições ambientais específicas de cada habitat.

Em todas as localidades estudadas, a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* foi a mais frequente em ambas as espécies de anfíbios, sugerindo que ambientes urbanos favorecem a disseminação de bactérias Gram-negativas comumente associadas a fontes de contaminação fecal e ambientes antropizados. Esta prevalência pode ser indicativa de poluição por esgoto e contaminação de corpos d'água devido à urbanização, evidenciando um risco potencial à saúde dos anfíbios, que são especialmente vulneráveis a contaminantes devido à sua pele permeável (Wells, 2007).

Em contraste, a presença de bactérias Gram-positivas variou mais amplamente entre as espécies de sapos e locais de coleta. *Staphylococcus aureus* foi a Gram-positiva predominante em *P. cuvieri*, presente em três das quatro localidades estudadas (Univap, Interlagos e Vista Verde), e em

duas das quatro localidades para *L. fuscus* (Univap e Interlagos). A frequência desta bactéria sugere que *Staphylococcus aureus* pode ter uma relação de maior afinidade com a pele dos anfíbios em ambientes urbanos, ou que possa ser uma espécie resiliente em diferentes níveis de urbanização. A diversidade de bactérias Gram-positivas, incluindo *Staphylococcus pyogenes, Pseudomonas aeruginosa, e Bacillus anthracis,* aponta para uma variação potencial na exposição ambiental e possíveis diferenças na resposta imune entre as duas espécies de anuros.

Ainda, este estudo revela que, em áreas urbanizadas como o Parque da Cidade e Vista Verde, onde há maior grau de impermeabilização e fragmentação de habitats, algumas bactérias como *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus anthracis* foram detectadas, sugerindo que os ambientes mais modificados podem selecionar por uma microbiota mais tolerante a distúrbios ambientais. Em habitats menos urbanizados, como Univap e Interlagos, a presença de espécies como *Staphylococcus aureus* pode indicar uma microbiota mais estável ou menos afetada pelos fatores estressantes urbanos.

Portanto, o estudo reforça que a urbanização e o uso de habitat afeta diretamente a composição microbiana da pele dos anfíbios, favorecendo a presença de certos grupos bacterianos potencialmente que moldam a microbiota a seu favor, servindo como barreira de proteção do sistema imune inato.

Conclusão

Os resultados deste estudo destacam a influência da urbanização e do uso de habitat na composição da microbiota associada à pele de duas espécies de anuros, *Physalaemus cuvieri* e *Leptodactylus fuscus*. A predominância de Escherichia coli como a bactéria Gram-negativa mais frequente sugere que a poluição e a contaminação de habitats aquáticos urbanos são um fator importante na determinação da microbiota de anfíbios. Por outro lado, a variabilidade nas espécies de bactérias Gram-positivas, com destaque para *Staphylococcus aureus*, indica que diferentes níveis de urbanização podem estar associados a diferentes perfis bacterianos, potencialmente afetando a saúde e a resistência dos anfíbios a patógenos ou servindo como uma barreira de proteção para o sistema imune.

Este estudo contribui para a compreensão das complexas interações entre urbanização, habitat e microbiota de anfíbios, ressaltando a importância de abordagens integradas na conservação da biodiversidade urbana. Pesquisas futuras devem focar em como essas comunidades microbianas afetam a saúde dos anfíbios e sua capacidade de adaptação em ambientes cada vez mais urbanizados, além de investigar as possíveis consequências ecológicas da presença de bactérias patogênicas associadas ao aumento da urbanização.

Referências

ALBERTI, Marina. **Eco-evolutionary dynamics in an urbanizing planet.** Trends in ecology & evolution, v. 30, n. 2, p. 114-126, 2015.

ALFORD, Ross A.; RICHARDS, Stephen J. **Declínio global de anfíbios: um problema em ecologia aplicada.** Revista anual de Ecologia e Sistemática , v. 30, n. 1, pág. 133-165, 1999.

ASSIS, AB de. **Microbiota, secreções cutâneas e microclima: consequências para os anfíbios.** Revista da Biologia, v. 8, p. 45-48, 2012.

CALLAGHAN, Corey T. et al. **A urbanização tem um impacto negativo na diversidade das rãs às escalas continental, regional e local.** Ecologia Básica e Aplicada , v. 54, p. 64-74, 2021.

CHEN, Jian; WANG, Lingjun; LI, Yuanyuan. **Research on the impact of multi-dimensional urbanization on China's carbon emissions under the background of COP21**. Journal of Environmental Management, v. 273, p. 111123, 2020.

ETEROVICK, Paula Cabral; DE SOUZA, Adriano Marques; SAZIMA, Ivan**. Anuran Amphibians from the Serra do Cipó.** Gráfion Estúdio Editorial, Brazil, 2020.

GRIMM, Nancy B. et al. **Global change and the ecology of cities.** science, v. 319, n. 5864, p. 756-760, 2008.

GUZY, Jacquelyn C. et al. **Urbanization interferes with the use of amphibians as indicators of ecological integrity of wetlands.** Journal of Applied Ecology, v. 49, n. 4, p. 941-952, 2012.

HADDAD, Célio FB; PRADO, Cynthia PA. **Modos reprodutivos em anuros e sua diversidade inesperada na Mata Atlântica do Brasil.** Biociências , v. 55, n. 3, pág. 207-217, 2005.

HEYER, W. R.; DONNELLY, M. A.; MCDIARMID, R. W. **Measuring and monitoring biological diversity: standard methods for amphibians.** 1. ed. Londres: Smithsonian Books, 1994.

MACCONKEY, A.T. **NOTE ON A NEW MEDIUM FOR THE GROWTH AND DIFFERENTIATION OF THE BACILLUS COLI COMMUNIS AND THE BACILLUS TYPHI ABDOMINALIS.** The lancet, v. 156, n. 4010, p. 20, 1900.

MCKINNEY, Michael L. **Urbanization as a major cause of biotic homogenization.** Biological conservation, v. 127, n. 3, p. 247-260, 2006.

TOLEDO, L. F. et al. 2021. **Anfíbios da Mata Atlântica. Aplicativo de celular.** Econaturae, Consultoria, Pesquisa e Educação Ambiental. Versão 1.0.0.

PIANO, Elena et al. **Urbanization drives cross-taxon declines in abundance and diversity at multiple spatial scales.** Global change biology, v. 26, n. 3, p. 1196-1211, 2020.

PMSJC, 2018. **Censo de 2010, população por região, grupos etários.** Disponível em: https://www.sjc.sp.gov.br/servicos/governanca/sao-jose-em-dados/populacao/. Acesso em: 22 maio.2024.

PMSJC, 2010. **Organização territorial das áreas urbana, rural e dos distritos.** Disponível em: https://www.sjc.sp.gov.br/servicos/governanca/sao-jose-em-dados/mapa/. Acesso em: 10 abr.2024.

SZULKIN, M et al. **Urban Evolutionary Biology.** Ed., Washington, Smithsonian Institution Press. 2020.

WELLS, K.D. **The Ecology and Behavior of Amphibians.** (The University of Chicago Press: Chicago, IL.). Pristimantis calcaratus, p. 451-515, 2007.

ZHANG, Lei et al. **Direct and indirect impacts of urbanization on vegetation growth across the world's cities.** Science advances, v. 8, n. 27, p. eabo0095, 2022.