



CAPTAR
ciência e ambiente para todos

volume 7 • número 1 • p 79-92

Comparação de duas metodologias para avaliação da sensibilidade de bactérias da pele de anfíbios a drenagem ácida de minas

Antonieta Gabriel^{1*}

Sara Costa²

Isabel Lopes²

A comunidade bacteriana associada à pele dos anfíbios desempenha um papel crucial na capacidade destes organismos tolerarem vários tipos de perturbações ambientais. Deste modo, alterações induzidas na composição da comunidade bacteriana pode influenciar a aptidão dos anfíbios. Neste contexto, o presente trabalho pretendeu comparar a adequabilidade de duas metodologias na determinação da toxicidade de drenagem ácida mineira (DAM) em isolados bacterianos da pele de rã *Pelophylax perezi*. Para tal, a sensibilidade destes isolados bacterianos, recolhidos em três locais distintos, foi testada através de duas metodologias: método de difusão por poços (DP) e de microdiluição (MD). Do total de 73 isolados bacterianos testados, DP permitiu discriminar três categorias de sensibilidade: sensíveis (11%), tolerantes (5,4%) e muito tolerantes (80%); enquanto MD permitiu discriminar quatro categorias de sensibilidade: muito sensíveis (5,5%), sensíveis (11%), tolerantes (23,3%) e muito tolerantes (60,3%). Ambos os métodos categorizaram a maioria dos isolados bacterianos como sendo muito tolerantes a DAM ($\geq 60\%$). Os resultados obtidos sugerem que o método MD é mais adequado e sensível na avaliação da toxicidade de DAM para estes isolados bacterianos, permitindo uma melhor discriminação de categorias de sensibilidade e uma maior proteção em termos de avaliação de risco ecológico para este grupo de organismos.

Palavras-chave

difusão por poços
microdiluição
drenagem ácida
bactérias simbiotes
anfíbios

¹ Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal.

² Departamento de Biologia & CESAM (Centro de Estudos do Ambiente e do Mar), Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal.

* antonietagc@ua.pt



INTRODUÇÃO

A Classe Amphibia é constituída por espécies que, ao contrário das outras classes de vertebrados, não possuem estruturas especializadas (escamas, penas ou pelos) a revestir e proteger-lhes a pele (Pessie 2002). No entanto, a pele dos anfíbios possui um elevado número de glândulas mucosas e serosas produtoras de muco e de várias substâncias químicas (ex. proteínas, polissacarídeos) que lhe servem de proteção (Colombo et al. 2015). Mais ainda, à pele dos anfíbios encontra-se associada uma comunidade bacteriana que, juntamente com o muco e substâncias químicas produzidas pelo anfíbio, representam uma barreira de defesa destes organismos relativamente ao meio envolvente (Colombo et al. 2015). Algumas das principais funções desempenhadas por estas bactérias estão relacionadas com a regulação da homeostasia, controlo de processos fisiológicos e metabólicos e interações com agentes patogénicos (ex. fungo *Batrachochytridium dendrobatidis*)¹ através da libertação de compostos antimicrobianos (Bletz et al. 2013; Larsen and Ramløv 2013). Consequentemente, quando expostas a contaminação química ou outras pressões ambientais, pode verificar-se a perda de diversidade específica² deste grupo de organismos e as suas funções de defesa podem ficar comprometidas, o que pode afetar a resiliência/sensibilidade das populações de anfíbios a perturbações ambientais (Kueneman et al. 2014; Colombo et al. 2015; Longo et al. 2015).

Relativamente aos efeitos provocados por poluição ambiental nas comunidades microbianas, estes estão comumente relacionados com a redução da diversidade específica, resultando na prevalência de poucas espécies muito tolerantes ao poluente em questão (Zhang et al. 2007; Kuang et al. 2013). Por exemplo, ambientes impactados por efluentes mineiros ácidos tendem a possuir uma menor diversidade bacteriana, sendo as comunidades residentes maioritariamente constituídas por espécies acidófilas, bem adaptadas a estas condições (Zhang et al. 2007; Kuang et al. 2013; Méndez-García et al. 2014). Muito embora o presente trabalho esteja relacionado com o microbiota associado à pele de anuros, deve ser realçado aqui que a perda de diversidade, nas comunidades microbianas, pode comprometer o funcionamento de todo o ecossistema (Girvan et al., 2005). As populações naturais microbianas desempenham um papel importante, entre outros, em mecanismos responsáveis pelo equilíbrio dos ecossistemas (como a fotossíntese realizada por cianobactérias), reciclagem de nutrientes, decomposição de matéria orgânica, degradação de diversos compostos químicos e alteração da especiação de metais (Zhang et al. 2007; Jackson et al. 2014). Quando este microbiota se encontra associado a outros organismos pode contribuir para que o hospedeiro consiga tolerar contaminação biológica (ex. agentes patogénicos) e química (por exemplo, algumas bactérias simbiotes, por processos de metilação ou adsorção dos metais às suas estruturas celulares, diminuem a biodisponibilidade destes elementos quer para si próprias quer para os seus hospedeiros) (Ilhan et al. 2004; Jackson et al. 2014; Woodhams et al. 2016). Considerando estes factos, é expectável que quando esta comunidade microbiana é afetada por perturbações ambientais possa ter consequências adversas na aptidão dos seus hospedeiros, sendo portanto importante perceber a sua sensibilidade a perturbações ambientais, nomeadamente poluição química.

¹*Batrachochytridium dendrobatidis* é um fungo de elevada patogenicidade que infecta a pele dos anfíbios levando a declínios massivos de populações destes organismos.

²Diversidade específica corresponde ao número de espécies diferentes constituintes de uma mesma comunidade (Hill 1973).

A sensibilidade de bactérias a substâncias químicas é frequentemente determinada pela definição da concentração mínima de inibição (MIC). Esta unidade de efeito corresponde à concentração mínima de um determinado composto que é capaz de inibir o crescimento de microrganismos em estudo (Mann and Markham 1998; Baquero et al. 2015; Fehlberg et al. 2016). Existem vários métodos para avaliar a sensibilidade de bactérias a agentes antimicrobianos, nomeadamente o E-Teste³, método de difusão em agar, microdiluição e sistemas automatizados, entre outros (Biemer, 1973; Matar et al. 2003). Embora estes métodos estejam já padronizados para determinar a sensibilidade de bactérias a antibióticos, pouco se sabe sobre a sua adequabilidade ao uso em estudos ecotoxicológicos, *id est*, para determinar os efeitos que agentes contaminantes podem provocar no crescimento de bactérias (Jorgensen and Ferraro 2009; Baquero et al. 2015).

Tendo em consideração o acima referido, o presente trabalho pretendeu comparar a adequabilidade de duas metodologias na determinação dos efeitos provocados por poluição química, drenagem ácida mineira (DAM), em isolados bacterianos da pele da espécie de anfíbio *Pelophylax perezi* (Amphibia, Anura). A contaminação por DAM resulta de um processo de oxidação de minerais de sulfito (ex. pirite, FeS₂) (Akcil and Koldas 2006; Kuang et al. 2013; Méndez-García et al. 2014). Este tipo de contaminação encontra-se presente em várias regiões a nível mundial, causando efeitos adversos nos ecossistemas devido à presença de elevadas concentrações de hidrogeniões e de metais (provocando a degradação da qualidade da água, destruição de ecossistemas e elevados níveis de toxicidade) (Kuang et al. 2013; Nieto et al. 2013; Simate and Ndlovu 2014).



MATERIAL E MÉTODOS

Locais de amostragem

Os isolados bacterianos utilizados no presente trabalho foram obtidos após amostragem do microbioma cutâneo de populações naturais de rã verde, *Pelophylax perezi* (Figura 1).

Foram amostrados dez indivíduos adultos presentes em três ecossistemas aquáticos de características físico-químicas distintas (ver Figura 2a e Tabela I): Salreu (SL), Lagoa das Braças (LB) e Água-forte (TP). O local de referência, LB, foi selecionado pela ausência de contaminação química, TP pela elevada concentração de metais e hidrogeniões, devido a atividade mineira e SL foi escolhido devido à influência de água com elevada salinidade proveniente da Ria de Aveiro (Brito and Pereira 2006; Castilho 2008; Luis 2007; Costa et al. 2016).



FIGURA 1: Adultos de *Pelophylax perezi*: fêmea do lado esquerdo e macho, com calo nupcial visível (assinalado pela seta amarela), do lado direito da fotografia. Créditos: Emanuele Fasola.

³ E-Test® - método utilizado para determinar a Concentração Mínima Inibitória de antibióticos. Consiste em tiras contendo um gradiente predefinido de concentrações de agentes antimicrobianos, antifúngicos e antibacterianos. (BioMérieux, Teste de Sensibilidade aos Antibióticos, Etest®, 1963. [Online]. Disponível: <http://www.biomerieux.pt/produto/etestr>. Consultado a 31 de Maio, 2017)

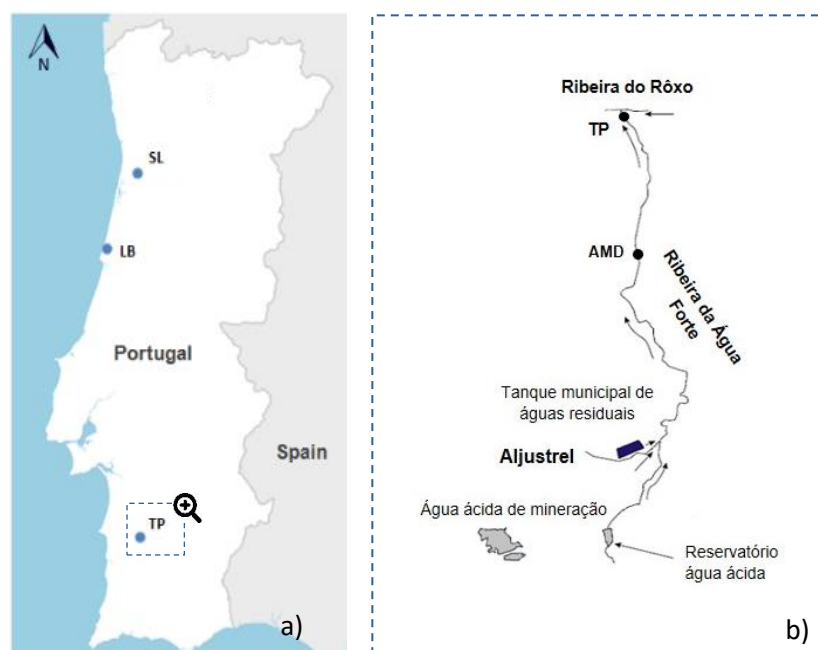


FIGURA 2: a) Identificação dos locais de amostragem dos isolados bacterianos associados à pele de *Pelophylax perezi*. Legenda: SL - Salreu, LB - Lagoa das Braças e TP - Água-forte. Adaptado de Costa et al. (2016). b) Pormenor da área onde foi efetuada a recolha do efluente de drenagem ácida mineira e de amostragem da população de *P. perezi* de TP. Fonte: Maia et al. (2012).

O efluente de drenagem ácida, usado para realização dos testes de sensibilidade com os isolados bacterianos, resulta da drenagem de uma mina, que explora um filão pirítico-cúrpico, localizada nas proximidades de TP (ver Figura 2b). Este efluente escoar em direção a norte e conflui com uma Ribeira não contaminada com metais, a Ribeira do Rôxo. A caracterização físico-química dos locais onde a comunidade de bactérias da pele de anfíbios foi amostrada e do efluente de drenagem ácida foi efetuada por Costa et al. (2016) e encontra-se descrita na Tabela I.

TABELA I: Valores dos parâmetros físico-químicos medidos na coluna de água dos locais de amostragem do microbioma da pele de indivíduos adultos de *Pelophylax perezi*. SST: sólidos suspensos totais; BOD5: carência bioquímica de oxigénio por cinco dias. Fonte: Costa et al. (2016).

Locais de amostragem				
Parâmetros	LB	SL	TP	Efluente DAM
Coordenadas (Lat./Long.)	40°14'32 N/ 8°48'17 W	40°43'57 N/ 8°34'20 W	37°57'31 N/ 8°14'2 W	37°56'31 N/ 8°08'53 W
Oxigénio Dissolvido (mg/l)	5,88	0,60	3,60	9,50
Condutividade (µS/cm)	293,0	5720	2210	4220–4260
pH	8,8	7,7	4,9	2,1
Salinidade	0	3	1	-
Turbidez (FTU)	31	37	73	-
SST (mg/l)	9	13	113	-
BOD ₅ (mg/l)	1,04	26,4	24,0	-
Nitritos (mg/l NO ₂ ⁻)	0,07	0,05	0,01	-
Nitratos (mg/l NO ₃ ⁻)	0,4	0,0	0,3	-
Nitrogénio, Amónia (mg/L NH ₃ -N)	0,27	1,06	5,70	-
Ca ²⁺ (mg/l)	16	328	103	-
Mg ²⁺ (mg/l)	5	96	31	-

Fósforo, Reativo (mg/l PO ₄ ³⁻)	0,04	0,43	0,41	-
Al (µg/l)	75	43	333	26000
As (µg/l)	16	5,4	87	1,3
Cd (µg/l)	0,31	0,05	0,84	310
Cu (µg/l)	5,2	2,1	148	2.800
Cr (µg/l)	2,8	1,0	1,6	-
Fe (µg/l)	5696	2976	48300	17000
Ni (µg/l)	1,80	4,00	16,0	61,0
Pb (µg/l)	0,59	0,95	19	3
Zn (µg/l)	22	9,2	575	15000

Organismo modelo: *Pelophylax perezi*

A rã verde, *Pelophylax perezi* López-Seoane 1885, nativa da Península Ibérica e Sul de França, ocorre em grande abundância em Portugal (Crochet et al. 1995; Egea-Serrano, Tejedo, and Torralva 2011). Esta espécie habita diversos tipos de ecossistemas aquáticos e terrestres ao longo dos seus estádios de vida, desde o ovo a adulto (Ortiz-Santaliestra et al. 2007; Egea-Serrano, Tejedo, and Torralva 2011). Apesar de a Classe Amphibia ser considerada um grupo constituído por organismos muito sensíveis, tem-se observado que *P. perezi* apresenta capacidade de tolerar diferentes tipos de contaminação, nomeadamente agroquímica, água salobra e metais (Egea-Serrano, Tejedo, and Torralva 2011; Ortiz-Santaliestra et al. 2007; Marques et al. 2013). *Pelophylax perezi* foi selecionada como espécie modelo no presente trabalho devido: (1) à sua abundância geográfica em Portugal, sendo também uma espécie autóctone, (2) a sua ubiquidade, sendo fácil de encontrar tanto em ecossistemas prístinos como contaminados, (3) facilidade de captura e manuseamento dos adultos para recolha de amostras de microbioma da pele e (4) escassa informação existente na literatura científica sobre o seu microbioma.

Preparação dos isolados bacterianos

Os isolados bacterianos estudados no presente trabalho foram amostrados na pele de dez indivíduos adultos de *P. perezi* em LB (n=3), TP (n=5) e SL (n=3) (consultar Costa et al. 2016). No laboratório, os isolados foram armazenados a -80°C em meio NB esterilizado (Nutrient Broth, Merck, Germany) com 15% de glicerol (v/v). Todos os isolados bacterianos foram identificados através da sequenciação do gene que codifica para a sub-unidade 16S do rRNA⁴ (Costa et al. 2016). Antes de se dar início aos testes de sensibilidade, todos os isolados (num total de 73, Tabela S-II) foram recuperados em meio sólido R2A (Oxoid, England) e ciclicamente, de 96 a 120 horas, recultivados até atingirem um crescimento estável e não ser detetada qualquer contaminação por outros microrganismos.

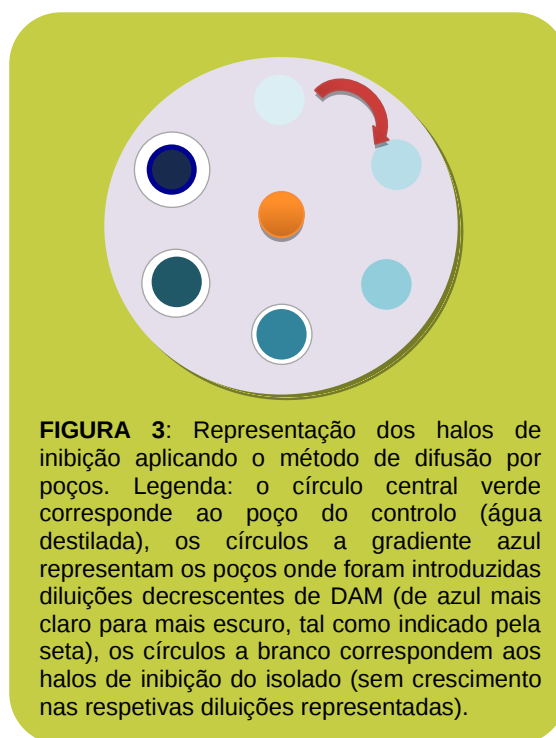
Teste de sensibilidade a DAM: método de difusão por poços

O método de difusão por poços (adaptado de Bauer et al. 1966) foi utilizado para expor os 73 isolados bacterianos a DAM. Para iniciar o teste de sensibilidade, realizou-se uma suspensão de cada isolado em

⁴ A sequenciação do gene que codifica a sub-unidade 16S do rRNA fornece informação filogenética que permite, em alguns casos, a identificação de espécies estabelecendo relações evolutivas entre os isolados em estudo e isolados cujas sequências estão disponíveis em bases de dados públicas (Janda and Abbott 2007).

meio NB líquido estéril. A suspensão foi realizada de forma a obter uma densidade ótica (D.O.) correspondente a $1,5 \times 10^8$ UFC. A D.O. foi medida num espectrofotómetro (UVmini-1240, UV-vis Spectrophotometer, Shimadzu) a 600 nm. Após obter a D.O. referida atrás, 100 µL de cada isolado bacteriano em suspensão foi uniformemente cultivado por espalhamento em meio R2A sólido em caixas de Petri, em triplicado. Posteriormente, cortaram-se asépticamente, 7 poços de 0,38 cm³ no meio R2A sólido, recorrendo a um cilindro metálico. O passo seguinte consistiu em adicionar 6 diluições decrescentes de DAM em cada poço da caixa de Petri. O efluente de drenagem ácida foi previamente esterilizado por filtração (Whatman™ Mixed Cellulose Ester Membrane Filter 0.2 µm) utilizando uma seringa. Após a filtração, foram realizadas as seguintes diluições com água destilada estéril: 100 %, 75 %, 50 %, 25 %, 12,5 % e 6,25 %.

Todos os isolados bacterianos foram expostos a um controlo negativo, constituído por água destilada estéril. Em cada poço de 0,38 cm³ foram introduzidos 50 µL de cada diluição de DAM ou de água destilada estéril. Para cada isolado bacteriano, foram realizadas três réplicas de exposição às diluições de DAM e ao controlo negativo. O teste decorreu no escuro a $23 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 120 horas. No final do ensaio foi medido o halo de inibição (representado na Figura 3) induzido por cada diluição de DAM, por forma a obter a diluição máxima de inibição (DMI) do crescimento de cada isolado bacteriano e categorizar as sensibilidades das bactérias a DAM. Os parâmetros pH e condutividade foram medidos nas diluições do efluente de drenagem ácida utilizando uma sonda multiparamétrica (WTW Multi 3410 SET C 2FD45C). A sensibilidade das bactérias foi categorizada da seguinte forma: (1) Muito sensível, para bactérias cuja DMI é menor que 6,25 % de DAM, (2) Sensível, para bactérias cuja DMI é igual ou superior a 6,25 % mas inferior ou igual a 50 % de DAM, (3) Tolerante, para bactérias cuja DMI é superior a 50 % mas inferior ou igual a 100 % de DAM, (4) Muito tolerante, para bactérias que não apresentaram qualquer tipo de inibição de crescimento mesmo quando exposta a 100 % de DAM.



Teste de sensibilidade a DAM: método de microdiluição

Os 73 isolados bacterianos referidos na subsecção anterior foram também expostos a DAM através do método padronizado de microdiluição em meio de cultura líquido (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012). No presente trabalho, este método foi adaptado para microplacas de 24 poços para se proceder à exposição das bactérias a DAM.

Realizou-se uma suspensão com cada isolado bacteriano em meio LB líquido estéril até obter uma densidade ótica de 1 (a 600 nm) para posteriormente iniciar o teste de sensibilidade ao efluente. Após aferir a D.O. iniciou-se o teste de acordo com o esquema representado na Figura 4. Numa microplaca de 24 poços foram dispostas as seguintes condições de exposição dos isolados bacterianos: (1) um controlo negativo de 2 ml de meio LB e 50 µL de isolado bacteriano em suspensão e (2) diluições de DAM, contendo 2 ml de DAM e 50 µL de isolado bacteriano em suspensão. Todos os tratamentos foram realizados em triplicado.

O efluente em estudo foi esterilizado como descrito na subsecção do método de difusão por poços. Os isolados bacterianos foram expostos às mesmas diluições de DAM testadas no método anterior, no entanto neste método de microdiluição foi utilizado meio LB líquido como meio de diluição em vez de água destilada. O teste decorreu por um período de 96 horas. No final do período de exposição, amostras de 75 µL foram transferidas para microplacas de 96 poços, sob uma câmara de fluxo contínuo para medir as absorvâncias num leitor de microplacas (Jenway, 6505 UV/VIS spectrophotometer, Burlington, USA), a 600 nm. A sensibilidade dos isolados bacterianos foi categorizada de acordo com o respetivo ED₂₀ para crescimento bacteriano, ou seja, a diluição de DAM capaz de induzir 20 % de inibição no crescimento dos isolados bacterianos (considerada como a percentagem limiar que traduz um efeito significativo). Foram estabelecidas quatro categorias: (1) Muito sensível, para isolados bacterianos cujo ED₂₀ é inferior a 6,25 % de DAM, (2) Sensível, para isolados bacterianos cujo ED₂₀ é igual ou superior a 6,25 % de DAM ou igual ou superior à média de todos os ED₂₀ calculados para os isolados bacterianos, (3) Tolerantes, para isolados bacterianos cujo ED₂₀ é superior à média de todos os ED₂₀ calculados para os isolados bacterianos e (4) Muito tolerante, para os isolados que não demonstraram qualquer inibição do crescimento inclusivamente quando expostos a 100 % de DAM.

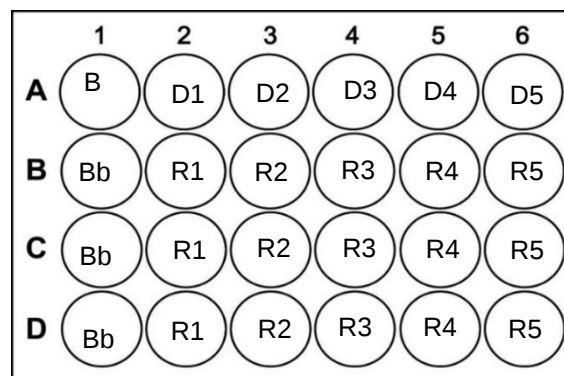


FIGURA 4: Representação esquemática do teste de sensibilidade realizado pelo método de microdiluição numa microplaca de 24 poços. Legenda: B – meio LB, Bb – meio LB com suspensão de bactéria (corresponde ao controlo negativo), D1 - Diluição 1 de DAM (6,25 % de DAM), R1 – réplicas de D1 com suspensão de bactéria, D2 - Diluição 2 de DAM (12,5% de DAM), R2 – réplicas de D2 com suspensão de bactéria, D3 - Diluição 3 de DAM (25 % de DAM), R3 – réplicas de D3 com suspensão de bactéria, D4 - Diluição 4 de DAM (50 % de DAM), R4 – réplicas de D4 com suspensão de bactéria, D5 – Diluição 5 de DAM (75 % de DAM), R5 – réplicas de D5 com suspensão de bactéria - Diluição 6 de DAM (100 % de DAM) que foi colocado noutra microplaca de 24 poços com a mesma metodologia e disposição.

Análise estatística

Os valores das densidades óticas foram ajustados a um modelo logístico para calcular os valores de diluição de DAM que induziram 10, 20 e 50 % (ED₁₀, ED₂₀ e ED₅₀) de inibição do crescimento bacteriano. A comparação do crescimento bacteriano entre os diferentes tratamentos (i.e., diluições de DAM e controlos negativos), para o exemplo dado na Figura 10, foi realizada através de análise de variância e uma via seguida do teste de comparação múltipla Dunnett's para aferir diferenças significativas entre as diluições de

DAM e os respetivos controlos negativos. Os pressupostos da ANOVA foram testados através do teste Kolmogorov-Smirnov para normalidade e Bartlett's para homoscedasticidade de variâncias. A frequência dos isolados por categoria de sensibilidade foi relacionada com os locais de amostragem utilizando tabelas de contingência pelo teste de Chi-quadrado.

RESULTADOS

Parâmetros físico-químicos

Os valores de pH aumentaram ligeiramente e os de condutividade diminuíram com diluições crescentes de DAM. O valor de pH aumentou 0,20 unidades de 5,44 (100 % AMD) para 5,64 (6,25%) e a condutividade diminuiu de 13,47 mS/cm (100%) para 1,14 (6,25 %). Os valores de pH e condutividade dos controlos foram 6,26 e 0,22 mS/cm, respetivamente.

Teste de sensibilidade: método de difusão por poços

Os resultados da sensibilidade dos isolados bacterianos a DAM, obtidos pelo método de difusão por poços, encontram-se representados na Figura 5 e Tabela S-II. A Figura 6 mostra um exemplo de uma caixa de Petri do ensaio realizado em que não foram observados halos de inibição de crescimento bacteriano. Do total de 73 isolados bacterianos testados, nenhum apresentou inibição de crescimento quando exposto a 6,25 % de DAM, não havendo, portanto, nenhum isolado categorizado como muito sensível (MS). No entanto, 10,9 % dos isolados bacterianos apresentaram uma diluição mínima de inibição do crescimento bacteriano (DMI) de 50 % de AMD, sendo considerados sensíveis (S); 5,4 % apresentaram uma DMI compreendida entre 50 e 100 % de DAM, sendo categorizados como tolerantes (T) e 83,5 % não apresentaram inibição no crescimento quando expostos a 100 % de DAM, sendo classificados como muito tolerantes (MT). Quando analisadas as sensibilidades dos isolados bacterianos em função do local onde foram amostrados, obtiveram-se as seguintes distribuições de frequências de categoria de sensibilidade: para o local LB: MT - 72 %, T - 8 %, S - 20 %; para o local SL: MT - 91 %, T - 4,3 %, S - 4,3 %; e para o local TP: MT - 88 %, T - 4,0 %, S - 8,0 %. Observaram-se

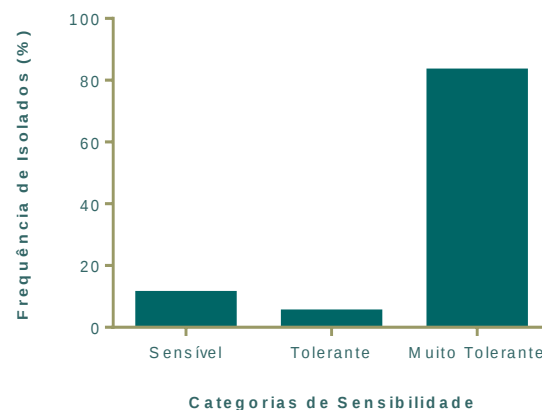


FIGURA 5: Frequência (%) dos isolados bacterianos amostrados nas três populações de *Pelophylax perezii*, discriminados por categorias de sensibilidade ao efluente de drenagem ácida, testados pelo método de difusão por poços.

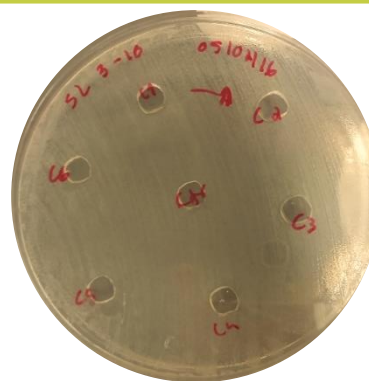
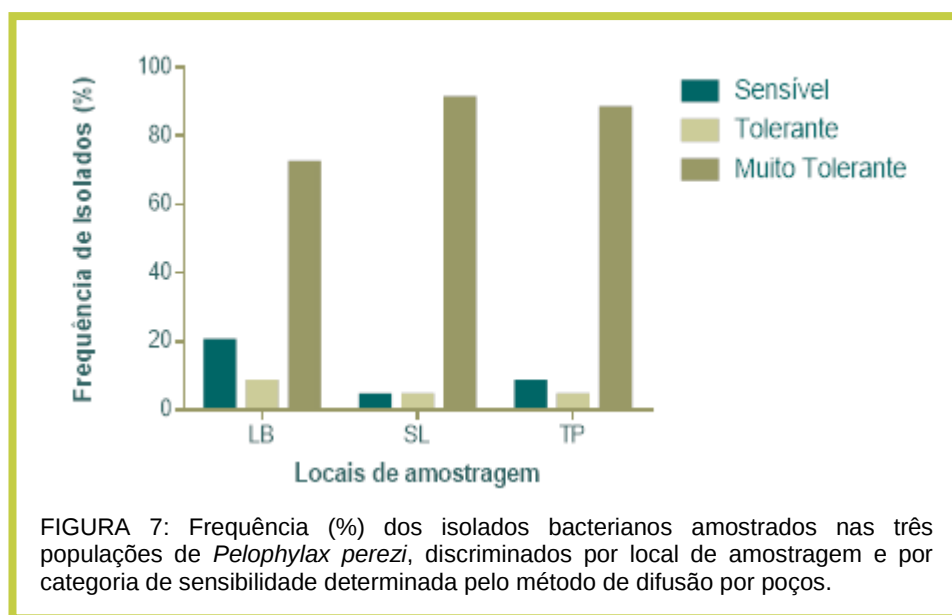


FIGURA 6: Fotografia de um teste de sensibilidade em caixa de Petri correspondendo à exposição da bactéria *Microvirga zambiensis* a controlo negativo e a diluições de drenagem ácida pelo método de difusão por poços. Legenda: Ctr- controlo; C1- 6,25 %; C2-12,5 %; C3- 25 %; C4- 50 %; C5- 75 %; C6-100 % de DAM.

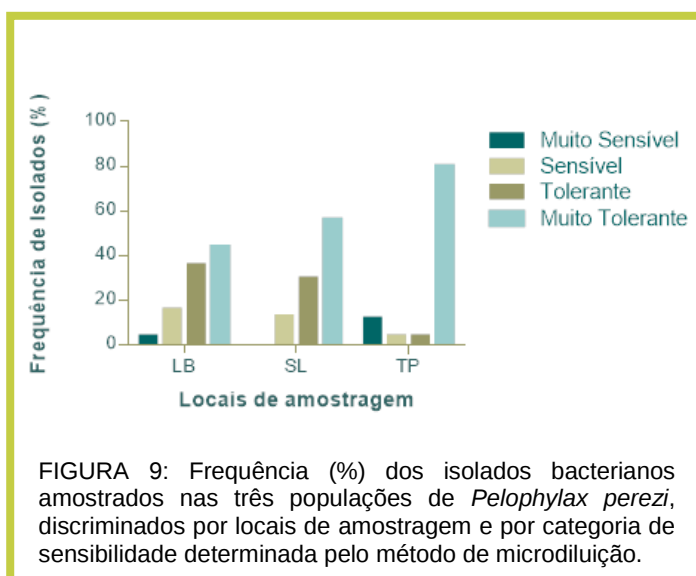
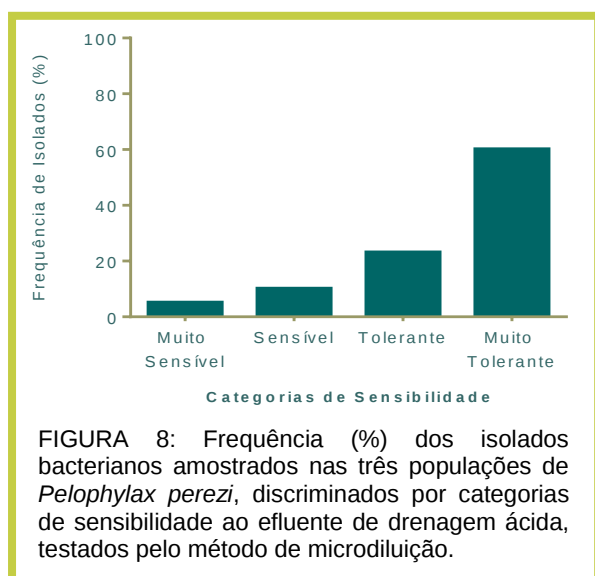
diferenças estatísticas significativas nas frequências de cada categoria de sensibilidade entre as três populações ($p \leq 0.0016$, Figura 7): a categoria S apresentou maior frequência em LB do que em SL e TP.



Teste de sensibilidade: método de microdiluição

Os resultados obtidos por microdiluição estão representados na Figura 8 e Tabela S-II. Do total de 73 isolados bacterianos testados, 5,5 % apresentaram um ED_{20} de 6,25 % de DAM, sendo categorizados como muito sensível (MS); 11 % apresentaram um ED_{20} inferior à média de todos os ED_{20} calculados para os isolados bacterianos (62,4 %) e superior a 6,25 % de DAM, sendo categorizados como sensíveis (S); 23,3 % apresentaram um ED_{20} superior à média de todos os ED_{20} calculados para os isolados bacterianos (62,4 %) mas inferior a 100 % de DAM sendo categorizados como tolerantes (T) e 60,3 % não apresentou qualquer inibição do crescimento quando exposto a 100 % de DAM sendo categorizados como muito tolerantes (MT). Quando analisadas as sensibilidades dos isolados em função do local onde foram amostrados, obtiveram-se as seguintes distribuições de frequências de categoria de sensibilidade: para o local LB: MT – 44 %, T – 36 %, S – 16 %, MS – 4 %; para o local SL: MT – 57 %, T – 30 %, S – 13 %, MS – 0 %; e para o local TP: MT – 80 %, T – 4 %, S – 4 %, MS – 12%. Observaram-se diferenças estatísticas significativas nas frequências de cada categoria de sensibilidade entre as três populações ($p < 0,0001$, Fig. 9): a categoria MT e MS apresentou maior frequência em TP do que em SL e TP e a categoria MS não se observou em SL.

Na Figura 10 estão representados os resultados das densidades óticas obtidas no teste com a bactéria *Microvirga zambiensis*, utilizando o método de microdiluição, permitindo a comparação direta entre os resultados obtidos com o método de difusão por poços para o mesmo isolado bacteriano.

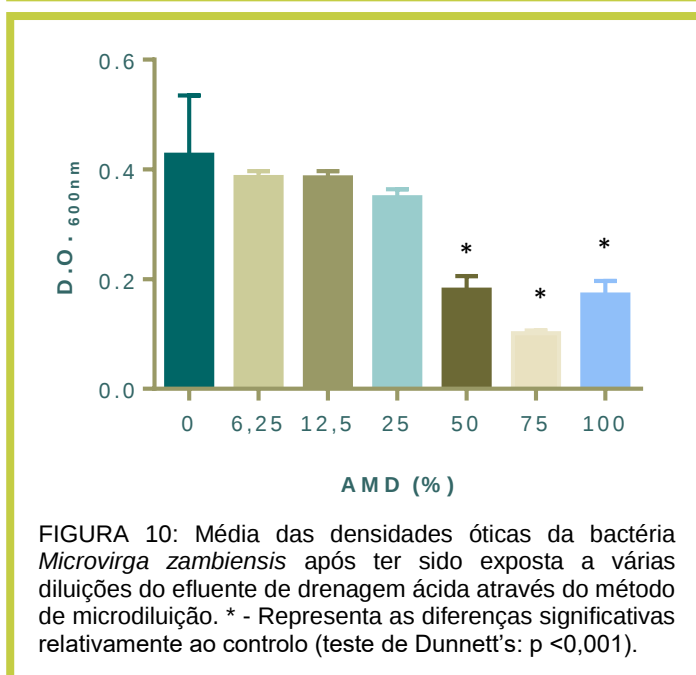


DISCUSSÃO

A sensibilidade de isolados bacterianos, recolhidos da pele de três populações de *P. perezii*, a DAM foi comparada utilizando dois métodos: difusão em agar por poços e microdiluição em meio líquido. Geralmente, o teste mais utilizado para categorizar a sensibilidade de bactérias a antibióticos é o método padronizado de difusão em agar com discos (Jorgensen and Ferraro 2009; Baquero et al. 2015). No presente trabalho, o método de

difusão em agar foi adaptado ao método de difusão por poços dada as semelhanças da metodologia empregue. Este método apenas permitiu discriminar isolados bacterianos S, T ou MT a DAM, não tendo permitido identificar a existência de isolados bacterianos MS a DAM. Este aspeto pode dever-se ao facto do método gerar resultados, usualmente, sob a forma qualitativa na medida em que se traduz a sensibilidade da bactéria como suscetível ou não a determinado agente químico pela presença de um halo de inibição de crescimento, não sendo quantificado o efeito (Jorgensen and Ferraro, 2009).

Relativamente ao método de microdiluição, este permitiu diferenciar as categorias de sensibilidade dos isolados bacterianos a DAM como: MS, S, T e MT. A capacidade de separar mais categorias de sensibilidade dos isolados ao contaminante indica uma maior capacidade de discriminação na quantificação dos efeitos provocados por este tipo de contaminação nas bactérias. Mais ainda, enquanto o método de difusão por poços categorizou a grande maioria dos isolados bacterianos como muito tolerantes (80%), o método de microdiluição permitiu uma maior resolução nesta categorização, tendo identificado 60% dos



isolados como MT, e distribuído os restantes 20% (relativamente ao outro método) por outras categorias de sensibilidade, maioritariamente pelas categorias T e S. No entanto, apesar de não terem sido observadas diferenças significativas relativamente ao crescimento dos isolados em meios de cultura diferentes: R2A e LB, poderão estar associadas limitações referentes a esta diferença de meio nos resultados da sensibilidade dos isolados.

Os resultados obtidos sugerem que o método de microdiluição é mais adequado para determinar a sensibilidade das bactérias a agentes químicos (neste caso DAM), estando em concordância com outros autores (Matar et al. 2003; Jorgensen and Ferraro 2009; Fehlberg et al. 2016). Fehlberg et al. (2016) realizou um estudo comparativo entre diferentes metodologias que testam a sensibilidade de bactérias dos quais: discos de difusão, E-teste®, diluição em agar e microdiluição. Estes autores expuseram 82 isolados bacterianos clínicos de *Burkholderia cepacia* a seis agentes antimicrobianos. Os resultados do teste de difusão com discos, que se encontram em concordância com os resultados referidos no “European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST” (<http://www.eucast.org/>, última visita Fevereiro 2017), permitiram aos autores inferir que este método apresenta menor sensibilidade e reprodutibilidade, em comparação com os outros métodos. Os autores consideram que os critérios associados ao teste para avaliar a suscetibilidade de isolados são pouco rigorosos pelo que a interpretação dos resultados da sensibilidade dos isolados pelo método de difusão por discos, apresentou falsos resultados de sensibilidade aos antibióticos ou a erros elevados associados à sensibilidade dos isolados. Estes autores obtiveram resultados opostos de suscetibilidade de *Burkholderia cepacia* a levofloxavina quando comparando o método de difusão e os outros métodos analisados. Estes resultados relacionam-se diretamente com a dificuldade de reprodutibilidade do método e com a obtenção de resultados contraditórios gerados pela concentração mínima de inibição em comparação com os outros métodos.

No presente trabalho, e em concordância com outros autores (Zgoda and Porter, 2001), o método de difusão por poços, comparativamente ao método de microdiluição, apresentou mais desvantagens de realização, nomeadamente maior frequência de contaminações das placas de teste (provavelmente devido à grande quantidade de material utilizado para realizar o método), mais dispendioso pela quantidade de material empregue e moroso no decorrer de toda a metodologia. Em oposição, o método de microdiluição apresentou mais vantagens, nomeadamente, uma elevada reprodutibilidade, maior facilidade em observar os resultados e quantificar o crescimento diário das bactérias bem como menor dificuldade na execução e em inocular a bactéria de forma uniforme no recipiente de teste. Mais ainda, uma grande vantagem que este método revelou relativamente ao método de difusão por poços foi uma maior sensibilidade em determinar os efeitos tóxicos de DAM, pois conseguiu identificar bactérias muito sensíveis (MS) a DAM. Numa perspetiva de avaliação de risco ecológico, esta característica é fundamental de modo a se poderem estabelecer níveis seguros do efluente para proteção ambiental. No presente caso, a determinação dos efeitos tóxicos provocados por DAM através do uso do método de difusão por poços levaria a uma subproteção da comunidade bacteriana estudada. Isto é, o método de difusão por poços, levaria a concluir que uma diluição de DAM de 6,25% não induziria efeitos no crescimento dos isolados bacterianos recolhidos da pele de *P. perezii*, quando efetivamente o método de microdiluição identifica que o crescimento de algumas bactérias pode ser inibido a concentrações de DAM iguais ou até inferiores a 6,25%. Adicionalmente, outros estudos já efetuados reportaram outras vantagens do método de

microdiluição além da capacidade de traduzir uma resposta quantitativa relativamente ao agente químico a testar: permite obter mais parâmetros relativamente às condições dos isolados como turbidez, taxa de inibição de crescimento, tempo de crescimento, concentração e adequação dos meios e concentrações dos agentes químicos, agitação e temperatura, homogeneização do inóculo por ser mais fácil de garantir um volume específico de suspensão bacteriana (Matar et al. 2003; Jorgensen and Ferraro 2009; Fehlberg et al. 2016).

No entanto, apesar das vantagens apresentadas pelo método de microdiluição também se verificaram algumas dificuldades como a observação de contaminações sem realizar cultura em meio sólido e a homogeneização dos isolados em cultura ser difícil de garantir dada a agregação de alguns isolados no meio. Assim, será necessário estudar outras metodologias capazes de aferir a sensibilidade de bactérias a contaminações com o objetivo de dar resposta aos problemas levantados como por exemplo o processo de pipetar suspensões de bactérias mucilaginosas, levando à dificuldade de homogeneização do inóculo.



CONCLUSÃO

O método de microdiluição revelou ser o mais adequado e sensível para avaliar os efeitos tóxicos de contaminação por metais em bactérias isoladas da pele de populações naturais da espécie de anfíbio *P. perezi*. No entanto, foram identificadas algumas desvantagens na metodologia prática associadas à realização deste método, pelo que é importante o estudo e desenvolvimento de outros métodos (ex. sistemas automatizados, biomarcadores) para avaliar o efeito de contaminação química em bactérias recolhidas no ambiente.

agradecimentos • Este trabalho foi suportado por fundos FEDER no âmbito do programa PT 2020 – Programa Operacional Fatores de Competitividade, pelo CESAM através do programa estratégico CEMUC (UID/AMB/50017/2013), e pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (projeto GENEROSI ref. PTDC/BIA-BIC/3488/2012, IF/00475/2013).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akcil, Ata, and Soner Koldas. 2006. "Acid Mine Drainage (AMD): Causes, Treatment and Case Studies." *Journal of Cleaner Production* 14 (12–13): 1139–45. doi:10.1016/j.jclepro.2004.09.006.
- Baquero, Fernando, Val Lanza, Rafael Cantón, and Teresa M. Coque. 2015. "Public Health Evolutionary Biology of Antimicrobial Resistance: Priorities for Intervention." *Evolutionary Applications* 8 (3): 223–39. doi:10.1111/eva.12235.
- Biemer, James. 1973. "Antimicrobial Susceptibility Testing by the Kirby-Bauer Disc Diffusion Method." *Annals clinical laboratory science*. 3 (2): 135–40.
- Bletz, Molly, Andrew Loudon, Matthew Becker, Sara Bell, Douglas Woodhams, Kevin Minbiole and Reid Harris. 2013. "Mitigating Amphibian Chytridiomycosis with Bioaugmentation: Characteristics of Effective Probiotics and Strategies for Their Selection and Use." Edited by Jean-Michel Gaillard. *Ecology Letters* 16 (6): 807–20. doi:10.1111/ele.12099.
- Brito, Rui, and António Pereira. 2006. "Monitorização Da Colónia Reprodutora de Garça-Vermelha (*Ardea Purpurea*) em Salreu-Ria de Aveiro," Relatório Científico, 23–25.
- Castilho, Ana. 2008. "Lagoas de Quiaios, Contribuição para o seu Conhecimento Geológico e Hidrológico." (Tese de

Doutoramento, , Universidade de Coimbra).

Colombo, Bruno , Thibault Scalvenzi, Sarah Benlamara, and Nicolas Pollet. 2015. "Microbiota and Mucosal Immunity in Amphibians." *Frontiers in Immunology* 6: 1–15. doi:10.3389/fimmu.2015.00111.

Costa, Sara, Isabel Lopes, Diogo Neves Proença, Rui Ribeiro, and Paula V. Morais. 2016. "Diversity of Cutaneous Microbiome of *Pelophylax perezi* Populations Inhabiting Different Environments." *Science of The Total Environment* 572 : 995–1004. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.07.230.

Crochet, Pierre-André, Alain Dubois, Annemarie Ohler, and Heinz Tunner. 1995. "Rana (Pelophylax) Ridibunda Pallas, 1771, Rana (Pelophylax) Perezi Seoane, 1885 and Their Associated Klepton (Amphibia, Anura): Morphological Diagnoses and Description of a New Taxon." *Bulletin Du Muséum National d'Histoire Naturelle* 17 (1–2): 11–30.

Egea-Serrano, Andrés, Miguel Tejedo, and Mar Torralva. 2011. "Behavioral Responses of the Iberian Waterfrog, *Pelophylax perezi* (Seoane, 1885), to Three Nitrogenous Compounds in Laboratory Conditions." *Ecotoxicology* 20 (6): 1246–57. doi:10.1007/s10646-011-0673-6.

Fehlberg, Lorena , Adriana Nicoletti, Ana Ramos, Fernanda Rodrigues-Costa, Adriana Matos, Raquel Girardello, Elizabeth Marques, and Ana Gales. 2016. "In Vitro Susceptibility of *Burkholderia Cepacia* Complex Isolates: Comparison of Disk Diffusion, Etest®, Agar Dilution, and Broth Microdilution Methods." *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2016.08.015.

Girvan, S., C. Campbell, K. Killham, J. Prosser, and L. Glover. 2005. "Bacterial Diversity Promotes Community Stability and Functional Resilience after Perturbation." *Environmental Microbiology* 7 (3): 301–13. doi:10.1111/j.1462-2920.2004.00695.x.

Hill, Oliver. 1973. "Diversity and Evenness: A Unifying Notation and Its Consequences." *Ecology* 54 (2): 427–32. doi:10.2307/1934352.

Ilhan, Semra, Macit Nourbakhsh, Serpil Kiliçarslan and Huseyin Ozdag,. 2004. "Removal of Chromium, Lead and Copper Ions from Industrial Waste Waters by *Staphylococcus Saprophyticus*." *Turkish Electronic Journal, of Biotechnology* 2): 50–57.

Jackson, Togwell , Sophia Vlaar, Nien Nguyen, Gary Leppard, and Turlough Finan. 2014. "Effects of Bioavailable Heavy Metal Species, Arsenic, and Acid Drainage from Mine Tailings on a Microbial Community Sampled Along a Pollution Gradient in a Freshwater Ecosystem." *Geomicrobiology Journal* 32 (8): 724–50. doi:10.1080/01490451.2014.969412.

Janda, Michael and Sharon Abbott. 2007. "16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls." *Journal of Clinical Microbiology* 45 (9): 2761–64. doi:10.1128/JCM.01228-07.

Jorgensen, James and Mary Ferraro. 2009. "Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices." *Medical Microbiology* 7750: 1749–55. doi:10.1086/647952.

Kuang, Jia-Liang, Li-Nan Huang, Lin-Xing Chen, Zheng-Shuang Hua, Sheng-Jin Li, Min Hu, Jin-Tian Li, and Wen-Sheng Shu. 2013. "Contemporary Environmental Variation Determines Microbial Diversity Patterns in Acid Mine Drainage." *The ISME Journal* 7 (5). Nature Publishing Group: 1038–50. doi:10.1038/ismej.2012.139.

Kueneman, Jordan , Laura Parfrey, Douglas Woodhams, Holly Archer, Rob Knight and Valerie McKenzie. 2014. "The Amphibian Skin-Associated Microbiome across Species, Space and Life History Stages." *Molecular Ecology* 23 (6): 1238–50. doi:10.1111/mec.12510.

Larsen, Hviid and Hans Ramløv. 2013. "Role of Cutaneous Surface Fluid in Frog Osmoregulation." *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology* 165 (3): 365–70. doi:10.1016/j.cbpa.2013.04.005.

Longo, Ana , Anna Savage, Ian Hewson and Kelly Zamudio. 2015. "Seasonal and Ontogenetic Variation of Skin Microbial Communities and Relationships to Natural Disease Dynamics in Declining Amphibians." *Royal Society Open Science* 2: 140377.

Luis, Ana. 2007. "Efeito Da Drenagem Ácida Nos Cursos de Água Da Envolvente Á Zona Mineira de Aljustre." (Dissertação de Mestrado, Universidade de Aveiro),, oai:ria.ua.pt:10773/2709.

Maia, Flávia, Cláudia Pinto, João Waerenborgh, Mário Gonçalves, Cátia Prazeres, Ondina Carreira and Susana Sério. 2012. "Metal Partitioning in Sediments and Mineralogical Controls on the Acid Mine Drainage in Ribeira Da Água Forte (Aljustrel, Iberian Pyrite Belt, Southern Portugal)." *Applied Geochemistry* 27 (6): 1063–80. doi:10.1016/j.apgeochem.2012.02.036.

Mann, Jacinta, and Julie Markham. 1998. "A New Method for Determining the Minimum Inhibitory Concentration of Essential Oils." *Journal of Applied Microbiology* 84 (4): 538–44. doi:10.1046/j.1365-2672.1998.00379.x.

Marques, Sérgio , Sandra Chaves, Fernando Gonçalves and Ruth Pereira. 2013. "Evaluation of Growth, Biochemical and Bioaccumulation Parameters in *Pelophylax perezi* Tadpoles, Following an in-Situ Acute Exposure to Three Different Effluent Ponds from a Uranium Mine." *Science of the Total Environment* 445–446. : 321–28. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.12.080.

Matar, Madonna, Luis Ostrosky-Zeichner, Victor Paetznick, Jose Rodriguez, Enuo Chen and John Rex. 2003. "Correlation between E-Test, Disk Diffusion, and Microdilution Methods for Antifungal Susceptibility Testing of

Fluconazole and Voriconazole." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 23 (5): 1647–1651. doi:10.1128/AAC.47.5.

Méndez-García, Celia, Victoria Mesa, Richard Sprenger, Michael Richter, María Díez, Jennifer Solano, Rafael Bargiela, et al. 2014. "Microbial Stratification in Low pH Oxidic and Suboxic Macroscopic Growths along an Acid Mine Drainage." *The ISME Journal* 8 (6): 1259–74. doi:10.1038/ismej.2013.242.

Nieto, José, Aguasanta Sarmiento, Carlos Canovas, Manuel Ollas and Carlos Ayora. 2013. "Acid Mine Drainage in the Iberian Pyrite Belt: 1. Hydrochemical Characteristics and Pollutant Load of the Tinto and Odiel Rivers." *Environmental Science and Pollution Research* 20 (11): 7509–19. doi:10.1007/s11356-013-1634-9.

Ortiz-Santaliestra, Manuel, Adolfo Marco, Fernández-Benítez and Miguel Lizana. 2007. "Effects of Ammonium Nitrate Exposure and Water Acidification on the Dwarf Newt: The Protective Effect of Oviposition Behaviour on Embryonic Survival." *Aquatic Toxicology* 85 (4): 251–57. doi:10.1016/j.aquatox.2007.09.008.

Pessie, Allan. 2002. "An Overview of Amphibian Skin Disease." *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* 11 (3): 162–74. doi:10.1053/saep.2002.123980.

Simate, Geoffrey and Sehliselo Ndlovu. 2014. "Acid Mine Drainage: Challenges and Opportunities." *Journal of Environmental Chemical Engineering* 2 (3): 1785–1803. doi:10.1016/j.jece.2014.07.021.

Woodhams, Douglas, Molly Bletz, Jordan Kueneman and Valerie McKenzie. 2016. "Managing Amphibian Disease with Skin Microbiota." *Trends in Microbiology* 24 (3): 161–64. doi:10.1016/j.tim.2015.12.010.

Zhang, Han-Bo, Ming-Xia Yang, Wen Shi, Yue Zheng, Tao Sha, and Zhi-Wei Zhao. 2007. "Bacterial Diversity in Mine Tailings Compared by Cultivation and Cultivation-Independent Methods and Their Resistance to Lead and Cadmium." *Microbial Ecology* 54 (4): 705–12. doi:10.1007/s00248-007-9229-y.

DADOS SUPLEMENTARES

TABELA S-II: Identificação dos isolados bacterianos (e respetivo código de acesso GenBank) por categorias de sensibilidade a DAM, determinadas por dois métodos de exposição: DP-método de difusão em agar por poços; MD-método de microdiluição. MS-muito sensível; S-sensível; T-tolerante; MT-muito tolerante; *-não foi possível realizar o método; ^a- não foi possível identificar o isolado.

LB			SL			TP		
Isolado	Categoria		Isolado	Categoria		Isolado	Categoria	
	DP	MD		DP	MD		DP	MD
<i>Frigoribacterium faeni</i> (KT720416)	MT	S	<i>Sphingomonas glacialis</i> (KT720404)	MT	T	<i>Microbacterium testaceum</i> (KT720437)	MT	T
<i>Azohydromonas lata</i> (KT720381)	MT	MT	<i>Microvirga zambiensis</i> (KT72040)	MT	S	<i>Cellulomonas fimi</i> (KT720438)	S	MT
<i>Microbacterium testaceum</i> (KT720419)	S	T	<i>Bacillus vietnamensis</i> (KT720427)	MT	MT	<i>Bacillus aerophilus</i> (KT720445)	MT	MS
<i>Microbacterium lacus</i> (KT720423)	MT	S	SL12-11 ^a	MT	MT	<i>Bacillus safensis</i> (KT720446)	MT	MS
<i>Geodermatophilus obscurus</i> (KT720421)	S	MS	<i>Paenibacillus pabuli</i> (KT720428)	MT	T	<i>Bacillus simplex</i> (KT720447)	S	MS
<i>Exiguobacterium undae</i> (KT720415)	MT	MT	<i>Sphingomonas faeni</i> (KT720392)	MT	T	<i>Janibacter terrae</i> (KT720449)	MT	S
<i>Erwinia toletana</i> (KT720377)	MT	MT	<i>Paenibacillus aryabhattai</i> (KT720429)	T	MT	<i>Cellulomonas composti</i> (KT720435)	MT	MT
<i>Acinetobacter beijerinckii</i> (KT720378)	MT	MT	<i>Bacillus vietnamensis</i> (D88522)	MT	MT	TP10-11 ^a	MT	MT
<i>Rhizobium rosettiformans</i> (KT720380)	MT	T	<i>Bacillus aerophilus</i> (KT720430)	MT	MT	TP10-13 ^a	MT	MT
<i>Aquabacterium parvum</i> (KT720382)	MT	MT	<i>Moraxella osloensis</i> (KT720395)	MT	MT	TP10-7 ^a	MT	MT
<i>Azorhizobium doebereinerae</i> (KT720376)	T	MT	<i>Bacillus mycoides</i> (KT720431)	MT	MT	<i>Ensifer adhaerens</i> (KT720406)	MT	MT
<i>Piscinibacter aquaticus</i> (KT720383)	MT	T	<i>Micrococcus antarcticus</i> (KT720432)	MT	T	<i>Microbacterium testaceum</i> (KT720440)	MT	MT
<i>Staphylococcus warneri</i> (KT720418)	T	T	<i>Paracoccus marinus</i> (KT720397)	MT	T	<i>Sphingomonas cynarae</i> (KT720407)	MT	MT
<i>Sphingomonas faeni</i> (KT720385)	MT	T	<i>Deinococcus grandis</i> (KT720433)	MT	MT	TP11-3 ^a	MT	MT
<i>Piscinibacter aquaticus</i> (KT720386)	S	MT	<i>Rhizobium rosettiformans</i> (KT720398)	MT	MT	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (KT720442)	MT	MT
<i>Nocardioides furvisabuli</i> (KT720420)	S	MT	<i>Arthrobacter oxydans</i> (KT720434)	MT	MT	<i>Mycobacterium frederiksbergense</i> (KT720444)	MT	MT
<i>Roseomonas stagni</i> (KT720387)	MT	T	SL3-4 ^a	MT	T	<i>Pseudomonas koreensis</i> (KT720408)	MT	MT
<i>Nocardioides alpinus</i> (KT720422)	MT	MT	<i>Massilia aerilata</i> (KT720403)	MT	MT	<i>Brevundimonas nasdae</i> (KT720409)	MT	MT
<i>Lapillicoccus jejuensis</i> (KT720425)	MT	T	SL3-6 ^a	MT	T	<i>Brevundimonas nasdae</i> (KT720410)	MT	MT
<i>Brevundimonas nasdae</i> (KT720390)	MT	MT	<i>Brevundimonas bullata</i> (KT720405)	MT	MT	<i>Pseudomonas syringae</i> (KT720412)	MT	MT
<i>Porphyrobacter tepidarius</i> (KT720378)	MT	S	<i>Flavobacterium tegetincola</i> (KT720399)	S	MT	<i>Moraxella osloensis</i> (KT720413)	MT	MT
<i>Bosea lathyri</i> (KT720384)	MT	S	<i>Aquabacterium parvum</i> (KT720394)	MT	S	TP3-1 ^a	MT	MT
<i>Microbacterium lacus</i> (KT720424)	MT	T	<i>Methylobacterium marchantiae</i> (KT720396)	MT	S	<i>Hydrothalea flava</i> (KT720414)	MT	MT
<i>Microbacterium lacus</i> (KT720426)	MT	T				<i>Micrococcus luteus</i> (KT720448)	MT	MT
LB7-10	MT	*				<i>Leifsonia shinshuensis</i> (KT720443)	MT	MT
LB 13-12	a	a						