

INTERFACE ALIMENTO X ANIMAL X AMBIENTE PARA *Klebsiella pneumoniae* e *Salmonella* spp. EM OSTREÍDEOS: UM PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA

Rosiléia Marinho de Quadros¹, Victoria Camila Miranda Hugen²,
Bruno Pitz da Silva³, Sandra Reginal de Mello⁴, Rafael de Lima Miguel⁵,
Beatriz Valgas Marques⁶, Gabriela Elisa de Oliveira Chaves⁷

Resumo: Os bivalves são reconhecidos como bioindicadores da qualidade da água devido à sua capacidade de concentrar substâncias químicas e contaminantes em seus tecidos, especialmente nas brânquias. Ambientes aquáticos frequentemente recebem efluentes domésticos contendo bactérias como *Klebsiella pneumoniae* e *Salmonella* spp., que podem contaminar esses organismos e, consequentemente, os consumidores, causando infecções graves e apresentando resistência a antibióticos. Este estudo objetivou isolar e identificar *K. pneumoniae* e *Salmonella* spp. em ostreídeos de ambiente natural no litoral sul de Santa Catarina, Brasil. Noventa e duas ostras foram coletadas em Laguna entre março e maio de 2022. As brânquias foram processadas para enriquecimento bacteriano e semeadas em meios de cultura seletivos. A identificação foi confirmada por testes bioquímicos. Os resultados revelaram a presença de *K. pneumoniae* em 36,11% (13/36) das amostras positivas inicialmente e *Salmonella* spp. em 49% (26/53) das amostras positivas inicialmente. A contaminação por essas bactérias sinaliza má qualidade da água, representando um risco à saúde pública na região de Laguna, conhecida pelo

¹ Bióloga e Médica Veterinária; Doutorado em Ciências Veterinária; Universidade do Planalto Catarinense (UNIPLAC); Professora de Parasitologia I e II (UNIPLAC).

² Acadêmica do curso de Biomedicina (UNIPLAC).

³ Biomédico; Mestrando em Bioquímica e Biologia Molecular; Universidade do Planalto Catarinense (UNIPLAC).

⁴ Farmacêutica; Mestra em Ciência Animal (UDESC); Professora de Microbiologia (UNIPLAC).

⁵ Biólogo e Farmacêutico; Mestrado em Ambiente e Saúde; Universidade do Planalto Catarinense (UNIPLAC); Professor de Técnicas Laboratoriais (UNIPLAC).

⁶ Acadêmica do curso de Medicina Veterinária (UDESC).

⁷ Acadêmica do curso de Medicina Veterinária (UDESC).

consumo de organismos aquáticos. Urge a adoção de medidas de saúde pública para mitigar o impacto dessa contaminação.

Palavras-chave: bivalves; bioindicadores; microbiota aquática; contaminação.

Abstract: Bivalves are recognized bioindicators of water quality due to their ability to concentrate chemical substances and contaminants in their tissues, especially in the gills. Aquatic environments frequently receive domestic effluents containing bacteria such as *Klebsiella pneumoniae* and *Salmonella* spp., which can contaminate these organisms and, consequently, consumers, causing severe infections and exhibiting antibiotic resistance. This study aimed to isolate and identify *K. pneumoniae* and *Salmonella* spp. in oysters from a natural environment on the southern coast of Santa Catarina, Brazil. Ninety-two oysters were collected in Laguna between March and May 2022. The gills were processed for bacterial enrichment and plated on selective culture media. Identification was confirmed by biochemical tests. The results revealed the presence of *K. pneumoniae* in 36.11% (13/36) of the initially positive samples and *Salmonella* spp. in 49% (26/53) of the initially positive samples. Contamination by these bacteria indicates poor water quality, posing a public health risk in the Laguna region, known for its consumption of aquatic organisms. Public health measures should be urgently adopted to mitigate the impact of this contamination.

Keywords: bivalves; bioindicators; bacteria; aquatic microbiota; contamination.

1 INTRODUÇÃO

Os bivalves de água doce são considerados elementos-chave da fauna de diversos habitats aquáticos, onde as espécies nativas são alvos de conservação aquática em todo o mundo (Geist *et al.*, 2022). As ostras (*Crassostrea* spp. e *Ostrea* spp.) apresentam ampla distribuição geográfica, habitando regiões costeiras, sendo encontradas em costões rochosos ou em bancos submersos. Devido a condição nutricional da sua musculatura, são alimentos apreciados pelo elevado teor proteico, vitamínico e sais minerais (Christo; Absher; Boehs, 2010). Os bivalves em decorrência de serem organismos filtradores, concentram em seus tecidos, sobretudo brânquias, materiais de diversas naturezas desde substâncias químicas a contaminantes e desta forma são considerados bioindicadores da qualidade de água (Strayer *et al.*, 2019). Cada vez mais existe o interesse no uso de bivalves como biofiltros para produtos químicos, metais e patógenos, uma vez que toleram e acumulam contaminantes, podendo ser usados em programas de monitoramento e desta forma sendo sentinelas das mudanças ambientais (Vaughn; Hoellein, 2018).

A microbiota presente no ambiente marinho é decorrente de contaminação externa como os coliformes totais e termotolerantes, provenientes principalmente a partir de efluentes domésticos, constituindo em principais ameaças para o consumo destes organismos (Pereira *et al.*, 2009).

Klebsiella (*K.*) *pneumoniae* e *Salmonella* spp., são bactérias bacilares Gram negativos. *K. pneumoniae* é a segunda bactéria causadora de infecções sanguíneas causadas por enterobactérias (Xu *et al.*, 2018). A espécie é encontrada

na água, solo, plantas e esgoto, sendo propagada através da água, constituindo a bactéria de maior importância dentro do gênero (Chang *et al.*, 2021; Wareth; Neubauer, 2021). Por ser um microrganismo saprófito da microbiota pode desenvolver características oportunistas principalmente para as pessoas imunocomprometidas (Macedo *et al.*, 2020). *K. pneumoniae* como mecanismo para a sua sobrevivência apresentam mutação genética, a qual contribuem para a sua resistência a diversos tipos de antibióticos (Pereira *et al.*, 2020).

De acordo com os dados coletados nos EUA pelo CDC (Centro de Controle de Doenças) entre 2012 e 2017, entre os surtos de doenças transmitidas por alimentos, muitas delas estavam ligadas ao consumo de ostras contaminadas com *Salmonella*, onde foram necessárias internações hospitalares (Tamber *et al.*, 2020).

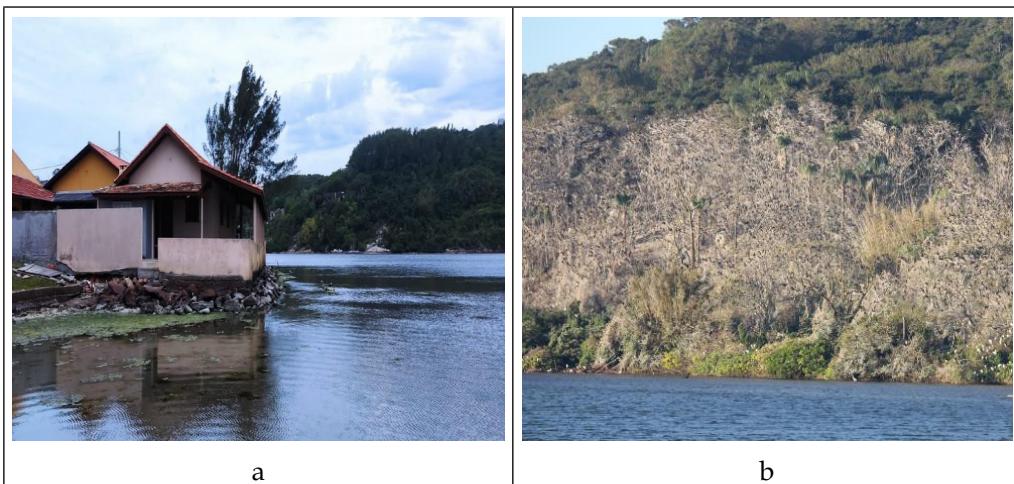
O trabalho teve por objetivo isolar e identificar *K. pneumoniae* e *Salmonella* spp. em ostreídeos de ambiente natural no litoral sul do estado de Santa Catarina, Brasil.

2 MATERIAL E MÉTODOS

As ostras no total de 92 foram coletadas entre os meses de março a maio de 2022. O processo de coleta foi de forma manual com auxílio de material cortante na área pedregosa na Ponta da Barra, lagoa do Noca na cidade de Laguna, litoral sul do estado de Santa Catarina, Brasil.

Na Figura 1, estão apresentadas as condições do local de coleta das amostras (a), bem como a concentração de aves (pontos escuros na vegetação) no entorno da lagoa (b).

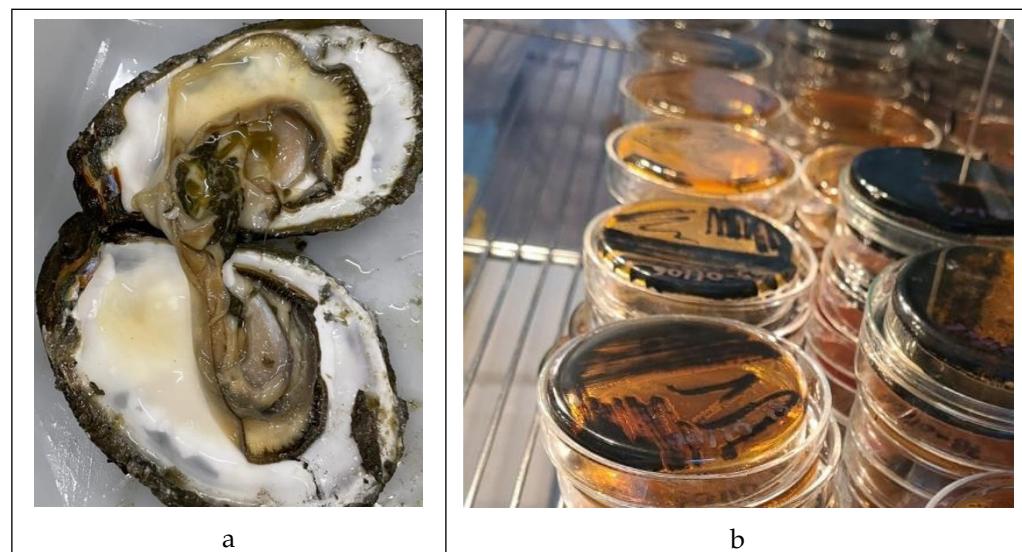
Figura 1 – Local de coleta dos ostreídeos na Lagoa do Noca, Laguna, Santa Catarina, Brasil.



Após retiradas do ambiente natural, estas foram acondicionadas em sacos plásticos sob refrigeração e transportadas em caixas térmicas ao Laboratório de Microbiologia da Universidade do Planalto Catarinense (UNIPLAC) na cidade de Lages, Santa Catarina, por um período máximo de 24 horas. Os bivalves foram lavados com água sanitária e abertos assepticamente com auxílio de uma pinça e as brânquias foram retiradas e inoculadas em tubos de enriquecimento contendo caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) por 24 horas na estufa microbiológica a 37°C. Após a incubação, uma alíquota do líquido enriquecido foi semeada no meio de cultura MacConkey e em ágar *Salmonella – Shigella* (ágar SS) (Figura 2), e incubados a mesma temperatura pelo mesmo tempo.

As bactérias que cresceram no meio foram inoculadas em meio de Rugai com lisina® Laborclin, e também em meios de ureia e citrato, MIO (motilidade, indol e ornitina) e TSI (*triple sugar iron*). Nestes meios foram avaliadas as características bioquímicas para a identificação de *K. pneumoniae* e *Salmonella* spp.

Figura 2 – Detalhe das brânquias de Ostras (a) e meios de cultura SS com crescimento colonial (b).



3 RESULTADOS

Do total das brânquias de ostras analisadas, houve o crescimento colonial presuntivo de coloração rósea com características mucoides no meio de MacConkey compatíveis para *K. pneumoniae* em 36 amostras e confirmados em 13 (36,11%) através dos métodos bioquímicos, bem como no ágar SS com produção de sulfeto de hidrogênio (H_2S) presuntivo para *Salmonella* spp.

foram registrados em 57,6% (53/92), com a confirmação através de provas bioquímicas de 49% (26/53) das amostras.

4 DISCUSSÃO

Entre os fatores que podem contribuir para flutuações nas concentrações de coliformes na água, estão o aumento da temperatura, quando ocorre um aumento no metabolismo dessas bactérias, acelerando a sua reprodução. Os estuários podem apresentar variações de temperatura muito elevadas, condicionando maiores concentrações de coliformes onde os valores térmicos são maiores, conforme os resultados registrados por Ristori *et al.* (2007); Doi; Oliveira; Barbieri (2015). No período de coleta das amostras a temperatura da água variou entre 18°C a 22°C, temperaturas acima do normal para o período do ano.

K. pneumoniae nas brânquias das ostras analisadas merece atenção, uma vez que pode colocar em risco a saúde do ser humano em consumir organismos aquáticos provenientes de águas contaminadas.

As doenças transmitidas por alimentos, pode ser de forma direta pela ingestão do patógeno ou indireta através de toxinas produzidas por estes microrganismos que, ao serem ingeridos, levam a graves consequências para espécies de níveis tróficos superiores (Vieira *et al.*, 2008).

As ações antropogênicas que fragilizam os ecossistemas de áreas costeiras podem comprometer a sanidade animal, especialmente de aves marinhas, que teoricamente podem servir de vetores de contaminação e desenvolvimento de cepas bacterianas resistentes. Ebert *et al.* (2016), ao estudarem a microbiota cloacal de gaivotas (*Larus dominicanus*) de três ilhas do litoral de Santa Catarina, isolaram *K. pneumoniae*, reforçando essa teoria. Esses resultados sugerem uma interação entre contaminação ambiental e a transmissão de patógenos para aves marinhas e bivalves. As alterações no ecossistema podem causar mudanças em hábitos alimentares, comportamentais e reprodutivos das aves marinhas, assim sendo, esses animais podem ser utilizados no monitoramento ambiental, servindo como bioindicadores da qualidade ambiental, principalmente em áreas costeiras, atuando como sentinelas dos oceanos. É necessário aumentar a conscientização sobre o fato de que as fontes não humanas podem atuar como reservatório desta bactéria (Wareth; Neubauer, 2021).

A avaliação da resistência aos antibióticos por efluentes de estações de tratamento de águas residuais (ETAR) em diferentes áreas de captação de água na Alemanha revelou que a descarga diária de *K. pneumoniae* em efluentes de ETAR teve um impacto maior na produção de alimentos em comparação com os efluentes de ETAR provenientes de hospitais e fontes domésticas (Alexander; Hembach; Schwartz, 2020).

As ostras são capazes de concentrar cerca de três a 62 vezes mais contaminantes em seus tecidos em relação ao ambiente. Dentre os

microrganismos patogênicos, o gênero *Salmonella* spp. merece atenção pela ampla distribuição na natureza, podendo ser difundido no meio aquático através do descarte inadequado de resíduos sólidos de origem humana e/ou animal (Silveira; Sousa; Evangelista-Barreto, 2016).

Os esgotos contêm diversos agentes poluentes que afetam direta e indiretamente ecossistemas e os organismos. Além da diversidade microbiana, os antibióticos liberados no esgoto podem causar mudanças significativas na abundância de genes virulentos (Kijewska *et al.*, 2023).

Na lagoa do Noca, várias casas estão situadas ao longo do percurso da água, assim como uma grande variedade de aves, principalmente biguás que se alojam na vegetação que margeia a lagoa, estes constituem também focos importantes de disseminação de microrganismos como *Salmonella* spp. através de suas excretas.

Existe um consenso entre artigos, que demonstra que *Salmonella* spp. não pertence naturalmente ao ambiente aquático, embora esteja isolado da água, peixes e dos produtos derivados da aquicultura. Ainda, a contaminação, por exemplo, em peixes é pouco conhecida, uma vez que parece que os peixes atuam como hospedeiros da bactéria um tempo relativamente curto (Porto *et al.*, 2022; Billah; Rahman, 2024).

Na União Europeia, a produção e comercialização de moluscos bivalves vivos é regida pelo Regulamento (UE) 2017/625 e pelo seu Regulamento de execução (UE) 2019/627. Na Europa, as áreas onde os moluscos bivalves são cultivados, seja em ambiente marinho ou estuarino, devem ser previamente analisadas pelas autoridades veterinárias (Rubini *et al.*, 2018; Mudado *et al.*, 2022). Em se tratando de locais, no Brasil, onde a população tem acesso à busca de alimentos disponíveis no ambiente, este controle sanitário é inexistente, sendo importante alertar aos órgãos competentes locais para que possam fazer um trabalho de sensibilização perante a população em relação ao consumo.

Atualmente no Brasil não existe nenhuma regulamentação legal para a captura de forma extrativista dos moluscos, no entanto, há resoluções nacionais que estabelecem padrões de qualidade, tanto para a água quanto para os bivalves, para que possam ser utilizados pelo homem para consumo, sem agravos à saúde (Sande *et al.*, 2010).

A criação e o consumo de bivalves atingiram nos últimos tempos uma grande parcela do mercado do consumo de peixes em todo o mundo; sendo assim, tanto do ponto de vista da saúde pública, como para reduzir as perdas econômicas, são necessários esforços para a obtenção da melhoria da qualidade destes organismos (Zanella *et al.*, 2017).

Os moluscos com presença de bactérias fecais podem ser prejudiciais ao consumidor, uma vez que cepas isoladas das ostras, podem ser resistentes a antimicrobianos, constituindo importante dado para saúde pública e indicando a circulação de genes resistentes no meio ambiente. Pelo fato da

cidade de Laguna contar com uma grande comunidade de pescadores, que necessitam destes animais, seja para a subsistência ou para o comércio local, as informações sobre a qualidade microbiológica em organismos aquáticos são de extrema importância para alertar a população sobre os riscos do consumo destes animais *in natura*.

5 CONCLUSÃO

Os resultados das análises bacteriológicas acabam gerando preocupações, por conta da importância social e econômica do ecossistema costeiro, visto que a cidade de Laguna, apresenta grande parte da população que sobrevive destes recursos naturais, devido a atividade pesqueira e a carcinicultura. Portanto, novas pesquisas de cunho epidemiológico e moleculares devem ser realizadas para detectar quais as origens destas fontes de contaminação.

A presença de *K. pneumoniae* e *Salmonella* spp. nas amostras de ostras analisadas, gera preocupação e deve ser encarada como um problema de saúde pública. Cabe aos órgãos competentes alertar a população sobre o consumo seguro dos organismos aquáticos na região.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, J.; HEMBACH, N.; SCHWARTZ, T. Evaluation of antibiotic resistance dissemination by wastewater treatment plant efluents with different catchment areas in Germany. *Nature*, v. 10, n. 8952, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65635-4>.
- BILLAH, M. M.; RAHMAN, M. S. *Salmonella* in the environment: A review on ecology, antimicrobial resistance, seafood contaminations, and human health implications. *J. Hazard. Mater. Adv.*, v.13, p. 1-12, 2024.
- CHANG, D.; SHARMA, L.; CRUS, C. S. D.; ZHANG, D. Clinical Epidemiology, Risk Factors, and control strategies of *Klebsiella pneumoniae* infection. *Front. Microbiol*, v. 12, p. 1-9, 2021.
- CHRISTO, S. W.; ABSHER, T.M.; BOEHS, G. Morphology of the larval shell of three oyster species of the genus *Crassostrea* Sacco, 1897 (Bivalvia: Ostreidae). *Braz. J. Biol.*, v. 70, n. 3, p. 645-650, 2010.
- DOI, S. A.; OLIVEIRA, A. J. F. C.; BARBIERI, E. Determinação de coliformes na água e no tecido mole das ostras extraídas em Cananéia, São Paulo, Brasil. *Eng. Sanit. Ambient*, v. 20, n. 1, p. 111-118, 2015.
- EBERT, L. A.; SCHLEMPER, J. C.; PELISSER, M. R.; PEREIRA, B. A.; SILVA, M. A. C.; BRANCO, J. O. Pathogenic bacteria associated with kelp gull *Larus dominicanus* (Charadriiformes, Laridae) on the Coast of Santa Catarina State - Brazil. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, v. 5, n. 5, p. 458-473, 2016.

GEIST, J.; BENEDICT, A.; DOBLER, A. H.; HOESS, R.; HOSS, P. Functional interactions of nonnative aquatic fauna with European freshwater bivalves: implications for management. *Hydrobiologia*. <https://doi.org/10.1007/s10750-022-05121-2>. 2023.

KIJEWSKA, A.; KOROZA, A.; GRUDLEWSKA-BUDA, K.; KIJEWSKI, T.; WIKTORCZYK-KAPISCHKE, N.; ZORENA, K.; SKOWRON, K. Molluscs - A ticking microbial bomb. *Front. Microbiol.*, v. 13, 2022. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1061223>.

MACEDO, L.H.C.; SILVA, M.L.Q.; SILVA, J.H.; CALDAS, F.R.L. Sensibilidade a antibióticos e metais pesados em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* isoladas de diferentes fontes de água do Cariri Cearense, Brasil. *Research, Society and Development*, v. 9, n. 9, p. 1-23, 2020.

MUDADU, A. G.; SPANU, C.; PANTOJA, J. C. F.; SANTOS, M. C.; OLIVEIRA, C. D.; SALZA, S.; PIRAS, G.; UDA, M. T.; VIRGILIO, S.; GIAGNONI, L.; PEREIRA, J. G.; TEDDE, T. Association between *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. food safety criteria in live bivalve molluscs from wholesale and retail markets. *Food Control*, v. 137, p.1-5, 2022.

PEREIRA, M. M. D.; FERREIRA, V. D. M. F.; VALADÃO, R. C.; OLIVEIRA, G. M. D.; ALENCAR, T. A. D.; RIBEIRO, A. L. M. D. S.; SILVA, P. P. D. O.; BARBOSA, C. G. Utilização da análise de coliformes como indicativo de sanidade dos mexilhões *Perna perna* (Linnaeus, 1758) cultivados na ilha Guáiba, Rio de Janeiro. *R. Bras. Ci. Vet.*, v. 16, n. 2, p. 95-99, 2009.

PEREIRA, J. P. M.; SILVA, R. A.S.; AOYAMA, E. A.; LEMOS, L. R. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase: o que fez com que uma bactéria se tornasse super. *ReBIS [Internet]*, v. 2, n.2, p.46-51, 2020.

PORTO, Y. D.; FOGAÇA, F. H. S.; ANDRADE, A. O.; SILVA, L. K. S.; LIMA, J. P.; SILVA, J. L.; VIEIRA, B. S.; NETO, A. C.; FIGUEIREDO, E. E. S.; TASSINARI, W. S. *Salmonella* spp. in Aquaculture: An Exploratory Analysis (Integrative Review) of Microbiological Diagnoses between 2000 and 2020. *Animals*, v. 13, n. 17, p.1-22, 2023.

RISTORI, C. A.; IARIA, S. T.; GELLI, D. S.; RIVERA, I. N. G. Pathogenic bacteria associated with oysters (*Crassostrea brasiliiana*) and estuarine water along the south coast of Brazil. *Int. J. of Environ. Health Res.*, v. 17, n. 4, p. 259-269, 2007.

RUBINI, S.; GALLETI, G.; D'INCAU, M.; GOVONI, G.; BOSCHETTI, L.; BERARDELLI, C.; BARBIERI, S.; MERIALDI, G.; FORMAGLIO, A.; GUIDI, E.; BERGAMI, M.; PIVA, S.; SERRAINO, A.; GIACOMETTI, F. Occurrence of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* in bivalve molluscs and associations with *Escherichia coli* in molluscs and faecal coliforms in seawater. *Food Control*, v. 84, p. 429-443, 2018.

SANDE, D.; MELO, T. A.; OLIVEIRA, G. S. A.; BARRETO, L.; TALBOT, T.; BOEHS, G.; ANDRIOLI, J. L. Prospecção de moluscos bivalves no estudo da poluição dos rios Cachoeira e Santana em Ilhéus, Bahia, Brasil. *Braz. j. vet. res. anim. sci.*, v. 47, n. 3, p. 190-196, 2010.

SILVEIRA, C. S.; SOUSA, O. V.; EVANGELISTA-BARRETO, N. S. Propagation of antimicrobial resistant *Salmonella* spp. in bivalve mollusks from estuary areas of Bahia, Brazil. *Rev. Caatinga*, v. 2, p. 450-457, 2016.

STRAYER, D. L.J.; GEIST, J.; HAAG, W. R.; JACKSON, J. K.; NEW-BOLD, J. D. Essay: making the most of recent advances in freshwater mussel propagation and restoration. *Conservation Science and Practice*. <https://doi.org/10.1111/csp2.53>. 2019.

TAMBER, S.; MONTGOMERY, A.; ELORANTA, K.; BUENAVENTURA, E. Enumeration and Survival of *Salmonella enterica* in Live Oyster Shellstock Harvested from Canadian Waters. *J. Food Prot.*, v. 83, N. 1, p.6-12, 2020.

VAUGHN, C. C.; HOELLEIN, T. J. Bivalve Impacts in Freshwater and Marine Ecosystems. Annu. *Rev. Ecol. Evol. Syst.*, v. 49, p. 183-208, 2018.

VIEIRA, R.H.S.F.; ATAYDE, M.A.; CARVALHO, E.M.R.; CARVALHO, F.C.T.; FONTELES FILHO, A. A. Contaminação fecal da ostra *Crassostrea rhizophorae* e da água de cultivo do estuário do Rio Pacoti (Eusébio, Estado do Ceará): Isolamento e identificação de *Escherichia coli* e sua susceptibilidade a diferentes antimicrobianos. *Braz. j. vet. res. anim. sci.*, v. 45, n. 3, p. 180-189, 2008.

WARETH, G.; NEUBAUER, H. The Animal-foods-environment interface of *Klebsiella pneumoniae* in Germany: an observational study on pathogenicity, resistance development and the current situation. *Vet. Res.*, v, 52, n.16, p. 1-14, 2021.

XU, M.; FU, Y.; KONG, H.; CHEN, X.; CHEN, Y.; LI, L.; YANG, Q. Bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae*: prevalence of blaKPC, virulence factors and their impacts on clinical outcome. *BMC Infectious Diseases*. v. 18, n. 358, p. 1-9, 2018.

ZANELLA, C.; MOSCA, F.; MARIANI, F.; FRANCI, G.; FOLLIERO, V.; GALDIERO, M.; TISCAR, P. G.; GALDIERO, M. Microbial Diseases of Bivalve Mollusks: Infections, Immunology and Antimicrobial Defense. *Mar. Drugs*, v,15, p. 1-36, 2017.