

## AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE *Salmonella* NO RIO PINHAL ASSOCIADA A SOLO E FEZES DE SUÍNOS E BOVINOS DE LEITE EM CONCÓRDIA, SC.

Bessa, M.C.<sup>1</sup>; Gugel, L.A.<sup>2</sup>; Biesus, L.L.<sup>3</sup>; Kich, J.D.<sup>4</sup>; Palhares, J.<sup>4</sup>; Curioletti, F.<sup>5</sup>; Coldebella, L.<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Pos-doutoranda-PNPD-CAPEB

<sup>2</sup>Bolsista PIBIC/CNPQ Embrapa Suínos e Aves.

<sup>3</sup>Assistente da Embrapa Suínos e Aves.

<sup>4</sup>Pesquisador da Embrapa Suínos e Aves

[jalusa@cnpa.embrapa.br](mailto:jalusa@cnpa.embrapa.br)

[palhares@cnpa.embrapa.br](mailto:palhares@cnpa.embrapa.br)

<sup>5</sup>Bolsista CNPq da Embrapa Suínos e Aves

<sup>6</sup>Zootecnista

### RESUMO

Os enteropatógenos, como a *Salmonella*, são excretados nas fezes de animais e homem podendo contaminar o solo e água. Para demonstrar esta contaminação, o presente estudo objetivou associar amostras de *Salmonella* isoladas do rio Pinhal com aquelas presentes no solo e fezes de suínos e bovinos de leite de propriedades rurais em Concórdia, SC. A partir da análise microbiológica das amostras verificou-se que 50% das propriedades estudadas (7/14) apresentaram *Salmonella* em suínos e em 29% (4/14) em bovinos de leite. Comprovou-se uma ocorrência maior em suínos, 25,6% do que em bovinos, 15%. Apenas uma propriedade apresentou o patógeno no solo de lavoura. Todos os pontos de coleta no rio apresentaram *Salmonella* em pelo menos uma das amostragens. Duas propriedades foram destacadas pelo fato de apresentarem elevado índice de isolamento de *Salmonella* nos animais e por estarem próximas aos pontos de maior incidência do rio. A aplicação de métodos fenotípicos e genotípicos nas amostras de *Salmonella* será uma importante ferramenta para identificar a fonte de contaminação do rio Pinhal.

**PALAVRAS-CHAVE:** Rio Pinhal, bactéria, impacto ambiental

### ABSTRACT

This study aimed to associate the *Salmonella* present in the Pinhal River with soil and faeces of pigs and dairy cattle from farms in Concordia, SC. From the microbiological analysis of samples found that 50% of farms studied (7/14) had *Salmonella* in pigs and in 29% (4/14) in dairy cattle. Showing a higher occurrence in swine, 25,6% from cattle, 15%. Only one farm showed the pathogen in soil. All collection sites in the river had *Salmonella*. Two properties were highlighted by presenting high levels of *Salmonella* in animals and being near the points of highest incidence of river. Application of phenotypic and genotypic methods in *Salmonella* is an important tool to identify the source of contamination of the Pinhal River.

**KEYWORDS:** Pinhal River, bacteria, environmental impact.

### INTRODUÇÃO

A suinocultura intensiva em regiões produtoras de suínos apresenta grandes problemas ambientais devido à elevada produção de resíduos e ao fato de serem utilizados como biofertilizante na lavoura. A maior parte dos dejetos não é manejada adequadamente e ao utilizarem como biofertilizante poderá levar a contaminação dos recursos hídricos e colocar em risco a sustentabilidade da atividade produtiva (Bohrer, 2003; Assis, 2004).

Sigua *et al.* (2009) detectaram a presença de *E. coli* e *Salmonella* em água do Rio Pinhal, no oeste de Santa Catarina, região de intensa produção suinícola e Berno (2009) verificou neste mesmo rio a presença de sorovares de *Salmonella* resistentes a antimicrobianos utilizados no sistema de produção animal. Este fato é preocupante uma vez que a inclusão de antimicrobianos na ração como promotores de crescimento e/ou seu uso

terapêutico, metafilático ou profilático é amplamente utilizada em nosso meio, podendo contribuir para o aparecimento de cepas resistentes e patogênicas (Carvalho *et al.* 2006).

As bactérias são importantes não somente como patógenos para animais e humanos, mas também como carreadores e transmissores de genes de resistência. O uso de antibióticos na agricultura animal é considerada um risco potencial para a saúde humana devido a resistência bacteriana (Bicudo e Goyal, 2003).

Métodos de tipificação molecular que apresentam um maior poder discriminatório têm sido usados em associação aos métodos fenotípicos. Essas ferramentas apresentam poder de discriminação suficiente para elucidar a origem e a distribuição de *Salmonella* sp. (Bessa *et al.*, 2007; Gebreyes *et al.*, 2006; Vieira-Pinto *et al.*, 2006).

O presente estudo objetiva associar a presença de *Salmonella* no rio Pinhal com a encontrada no solo e fezes de suínos e bovinos de leite em propriedades rurais que compõem a bacia deste rio.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostragem

No período de janeiro a maio de 2010 foram amostradas 10 pontos da microbacia do rio Pinhal, Concórdia-SC, e 14 propriedades rurais localizadas próximas ao rio. Esta região é caracterizada pela grande concentração de suinocultura e bovinocultura de leite. Foram coletadas, individualmente, fezes do reto de 10% dos animais (suínos e/ou bovinos) presentes em cada instalação. As amostras foram constituídas de pools de 6 animais. As coletas de solo foram realizadas em 10 a 15 pontos diferentes, com profundidade entre 0 a 20 cm, em forma de zig-zag em 13 propriedades que possuíam histórico de adubação orgânica por dejetos de animais. Para a coleta de material da água do rio foram elaboradas buchas de algodão esterilizadas coberta por gaze conforme descrito por Quinn *et al.* (1994) e amarradas ao longo de um cordão de 2,80m, permanecendo por 48h no rio.

### Caracterização fenotípica de *Salmonella* sp.

Todas as amostras foram submetidas ao método de isolamento de *Salmonella* descrito na ISO 6579 adaptado por Michael *et al.* (2003). Posteriormente, as amostras serão enviadas à Fundação Instituto Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro, para sorotipificação.

Para a determinação da suscetibilidade a antimicrobianos será utilizado o teste de difusão em ágar, o qual será conduzido de acordo com as normas dos documentos M100-S15 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2005). Serão testados os seguintes antimicrobianos: ácido nalidíxico, ampicilina, canamicina, cefalotina, Ceftiofur, ceftazidima, cefotaxima, ceftazidima-ácido clavulânico, cefotaxima-ácido clavulânico; ciprofloxacina, cloranfenicol, espectinomicina estreptomomicina, florfenicol, gentamicina, penicilina, tetraciclina, sulfametoxazol; trimetoprima e trimetoprim-sulfametoxazol.

### Caracterização genotípica de *Salmonella* sp.

A extração plasmidial será realizada pelo protocolo proposto por Kado e Liu (1981). O DNA plasmidial será extraído pelo processo de lise alcalina. O plasmídeo de virulência da *S. Typhimurium* LT2 (McClelland *et al.*, 2001) será utilizado como marcadores de peso molecular. A macrorrestrrição do DNA total será preparado de acordo protocolo do PulseNet (CDC). A análise dos fragmentos ocorrerá pela separação dos mesmos em eletroforese de campo pulsado em gel de agarose 1%, num sistema CHEF DR III (BioRad, USA), a 6V/cm e com tampão de corrida 0,5x TBE. Os pulsos programados serão de 2,2 – 63,8s por 18h. Os perfis eletroforéticos gerados por PFGE serão analisados utilizando-se o software BioNumerics (*Applied Maths, Belgium*).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados, parcialmente alcançados, referem-se à presença de *Salmonella* nas fezes dos animais e solo amostrados em cada granja e a localização dessas propriedades em relação aos pontos de coleta no rio (Tabela 1). Em 50% das propriedades estudadas (7/14) foi isolada *Salmonella* em suínos e em 29% (4/14) em bovinos de leite. Apenas uma propriedade apresentou o patógeno em amostras de solo. A maior incidência de amostras

positivas foi observada em suínos, 25%. Nos bovinos o isolamento de *Salmonella* ocorreu em 15 % das amostras.

Estudos realizados no sul do Brasil relataram uma ampla distribuição de *Salmonella* ao longo da cadeia de produção de suínos. Bessa *et al.* (2004) encontraram 55,66% de suínos portadores de *Salmonella* abatidos em frigoríficos do Rio Grande do Sul. Posteriormente Schwarz *et al* (2009) relataram a prevalência de 71,6% da mesma região com soroprevalência de 77,8%. KICH *et al* (2005) avaliaram 65 granjas em Santa Catarina, dessas, 98% (64/65) apresentaram animais positivos no teste de ELISA, sendo que a soroprevalência total foi de 57,6%.

A Tabela 2 mostra o número de isolados de *Salmonella* em cada ponto de coleta nas águas do rio Pinhal. A maior ocorrência de *Salmonella* foi observada nos pontos 2, 4, 5 e 6, com cinco isolados em cada ponto. Sendo que no ponto 5 se concentra a produção animal e a área agrícola. Estudos anteriores, no estado de Santa Catarina demonstraram a gravidade do problema causado pelos altos índices de contaminação de águas superficiais decorrentes da suinocultura (Seganfredo e Giroto, 2002).

As propriedades 11 e 12, as quais apresentaram elevado índice de isolamento de *Salmonella*, estão localizadas próximas aos pontos 6 e 5 do rio, respectivamente. Sugerindo, com estes resultados preliminares, que a *Salmonella* presente nos suínos em regiões produtoras pode atingir os recursos hídricos da região.

O segundo passo deste trabalho será a aplicação de métodos de tipificação baseados na caracterização fenotípica e genotípica nas amostras de *Salmonella* para obter um melhor entendimento da epidemiologia do patógeno.

## CONCLUSÕES

Os suínos e bovinos produzidos na microbacia do rio Pinhal excretam *Salmonella* nas fezes podendo contaminar o solo e o rio.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Assis, F. O. **Bacia hidrográfica do rio Quilombo: dejetos de suínos e impactos ambientais**. UFPR, Curitiba, 2004.
- BERNO, L. G. ; KICH, J. D. ; Palhares, J. C. P. ; Biesus, L. L. . Determinação do perfil de sensibilidade e resistência antimicrobiana em amostras de salmonella sp. isoladas do rio pinhal, Concórdia/SC. In: **3ª jornada de Iniciação Científica Embrapa/UnC - JINC**, 2009, Concórdia.
- Bohrer, P.H. **A suinocultura brasileira**. Congresso brasileiro de veterinários especialistas em suínos, 2003, Goiânia. **Anais...** Goiânia: ABRAVES, 2003. p.46-64.
- Bessa, M.C., Costa, M.; Cardoso, M. (2004). Prevalência de *Salmonella* sp. em suínos abatidos em frigoríficos do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 24:80-84.
- Bessa, M.C.; et al. Phenotypic and Genetic Characterization of *Salmonella* enterica subsp. enterica serovar Typhimurium Isolated From Pigs in Rio Grande do Sul, Brazil. **Researche Veterinary Science** (in press 10.1016/j.rvsc.2007.01.006), 2007.
- Bicudo, J.R.; Goyal, S.M. (2003). Pathogens and manure management systems: a review. **Environmental Technology**, 24, 115-130.
- Carvalho, F. C. T. *et al.* Resistência a antimicrobianos de cepas de *Salmonella* isoladas de água, sedimento e camarão de quatro fazendas de carcinicultura do Estado do Ceará. In: Simpósio de Resistência Bacteriana aos Antimicrobianos, 3., 2006, Rio de Janeiro. **Resumos...** p. 43.
- CSLI/NCCLS, Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance standards for antimicrobial testing**; 15 Suplemento Informativo. CLSI/NCCLS documento M100-S15. Wayne, 2005.
- Gebreyes, W.A.; et al. Molecular Epidemiology and Diversity of *Salmonella* serovar Typhimurium in Pigs Using Phenotypic and Genotypic Approaches. **Epidemiology and Infection**, 134:187-198, 2006.
- Kado, C.I.; Liu, S.T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. **Journal of Bacteriology**, 145: 1365-1373, 1981.
- Kich, J. Nelson Mores<sup>2</sup> Itamar Antonio Piffer<sup>3</sup> Arlei Coldebella. Armando Amaral<sup>5</sup> Lucas Ramminger<sup>6</sup> Marisa Cardoso. Fatores associados à soroprevalência de *Salmonella* em rebanhos comerciais de suínos 2005. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.2, p.398-405, mar-abr, 2005
- McClelland, M., *et al.* Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. **Nature**, 213: 852-856, 2001.

- Michael, G.B.; Simoneti, R.; Costa, M.; Cardoso, M. (2003). Comparison of different selective enrichment steps to isolate *Salmonella* sp. From feces of finishing swine. *Braz. J. Microbiol.*, 34, 138-142.
- Quinn, P.J. *et al.* **Clinical Veterinary Microbiology**. London, 1994, 648p.
- Schwarz, P. *et al.* (2009). *Salmonella* entérica isolamento e soroprevalência em suínos abatidos no Rio Grande do Sul. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.61(5), p.1028-1034.
- Seganfredo, M.A.; Giroto, A.F. Viabilidade econômica dos dejetos, em unidades terminadoras de suínos. Comunicado Técnico 301, Embrapa/CNPISA, 2002.
- Sigua, G.C.; Palhares, C.P.; Kich, J.D.; Mulinari, M.R.; Mattei, R.M.; Klein, J.B. Microbiological quality assessment of watershed associated with animal-based agriculture in Santa Catarina, Brazil. **Water Air Soil Pollut**, Published online: 04 November 2009.
- Vieira-Pinto, M.; et al. Unveiling Contamination Sources and Dissemination Routes of *Salmonella* sp. in Pigs at a Portuguese Slaughterhouse Through Macrorestriction Profiling by Pulsed-Field Electrophoresis. **International Journal of Food Microbiology**, 110:77-84, 2006.

**Tabela 1.** Presença de *Salmonella* nos animais analisados em cada granja e a sua localização em relação aos pontos do rio

Granja	Suínos (n/pool)	%	Bovinos (n/pool)	%	Solo	%	Ponto no rio
1	3/6	50	0/5	0	1/2	50	8
2	1/5	20	NC	-	NC	-	5
3	0/1	0	1/5	20	0/3	0	8
4	1/5	20	1/5	20	0/3	0	7
5	1/5	20	4/5	80	0/2	0	3
6	1/5	20	0/5	0	0/2	0	3
7	0/6	0	0/5	0	0/2	0	3
8	0/5	0	0/5	0	0/2	0	3
9	0/7	0	0/4	0	0/2	0	7
10	0/5	0	0/5	0	0/2	0	6
11	12/18	66,7	0/1	0	0/2	0	6
12	5/6	83,3	2/3	66,7	0/1	0	5
13	0/10	0	NC	-	0/2	0	5
14	0/11	0	0/5	0	0/2	0	5
<b>Total</b>	<b>24/95</b>	<b>25,6</b>	<b>8/53</b>	<b>15</b>	<b>1/27</b>	<b>3,7</b>	

**Tabela 2.** Número de isolados de *Salmonella*, distribuídos de acordo com os diferentes pontos de coleta, nas amostras de água do rio Pinhal no período de janeiro a maio de 2010.

Data da amostragem	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	Total isolados
06/1/2010	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	7
13/1/2010	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	3
03/2/2010	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	4
10/2/2010	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	3
03/3/2010	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	3
09/3/2010	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	4
07/4/2010	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	3
14/4/2010	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1
05/5/2010	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	2
26/5/2010	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	2
<b>Total</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>32</b>