



COMPARAÇÃO ENTRE O PERFIL  
MICROBIOLÓGICO DE OSTRAS  
CULTIVADAS E COMERCIALIZADAS NO  
ESTADO DO PARANÁ E NA REGIÃO  
NORDESTE DO BRASIL: SITUAÇÃO  
ATUAL E RISCOS POTENCIAIS PARA A  
SEGURANÇA ALIMENTAR DOS  
CONSUMIDORES

2020



## **I IDENTIFICAÇÃO**

### **1.1 Concedente**

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

CNPJ/MF

33.654.831/0001-36

### **1.2 Beneficiário**

Nome: Antonio Ostrensky Neto

CPF/MF

613.846.159-20

### **1.3 Finalidade**

Concessão de auxílio financeiro a projeto de natureza de inovação.

### **1.4 Título do projeto**

Comparação entre o perfil microbiológico de ostras cultivadas e comercializadas no estado do Paraná e na região Nordeste do Brasil: situação atual e riscos potenciais para a segurança alimentar dos consumidores

### **1.5 Chamada:**

Universal - MCTI/CNPQ N ° 01/2016

## **2 QUALIFICAÇÃO DO PRINCIPAL PROBLEMA A SER ABORDADO**

O papel do manejo na inter-relação entre produção, ambiente e segurança alimentar são temas de discussão recorrente na produção de animais aquáticos (Northen, 2001). Isto porque, quando se pensa na aquicultura, a questão ambiental (justificadamente ou não) tem sido historicamente explorada pelos seus detratores como uma atividade que representa elevados riscos tanto ao meio ambiente quanto aos consumidores (Ostrensky *et al.*, 2008).

Resíduos excretados pelos organismos aquáticos, contrariamente ao observado em animais terrestres, são de difícil coleta, dissolvendo-se, diluindo-se, permanecendo em suspensão na água de cultivo ou depositando-se no fundo nas áreas de cultivo. A presença destes resíduos contribui para o aumento de matéria orgânica no ambiente, o que pode causar alterações na macro e na microbiota locais (Zhou *et al.*, 2009; Ottinger *et al.*, 2016), redução da qualidade da água (Widdows e Brinsley, 2002; Gaspar *et al.*, 2011) e, conseqüentemente, do desempenho zootécnico e até mesmo da qualidade mercadológica dos animais cultivados (Alves, 2006). Além disso, outros danos ambientais podem decorrer de um manejo incorreto, como, por exemplo, a disseminação de doenças ou a introdução de espécies exóticas invasoras (Grigorakis, 2011).

A denominação de alimento seguro depende não só de como o organismo aquático é cultivado, mas sim, de como toda a cadeia de produção e de distribuição é operada (Al-Busaidi *et al.*, 2016). No caso das ostras, isso inclui também as etapas de depuração (se realizada), o transporte, o processamento, o armazenamento e a distribuição do produto (Mizan *et al.*, 2015;

Zanin et al., 2015). Por isso, a adoção de medidas que visem à manutenção da qualidade do alimento até que esse chegue à mesa do consumidor final são indispensáveis.

O consumo de ostras tem aumentado consideravelmente em todo o mundo nas últimas duas décadas (Serment-Moreno et al., 2015) e, paralelamente, o número de surtos associados ao consumo deste molusco vem aumentando proporcionalmente, sendo a maioria dos casos relatados nos Estados Unidos, Europa, Ásia e Austrália (Laing, 2013). O vírus da hepatite A e os calicivírus são os principais agentes etiológicos associados aos surtos envolvendo ostras, seguido das bactérias do gênero *Vibrio* (*V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *V. vulnificus*, *V. mimicus*, *V. hollisae*), além de *Salmonella* sp., *Shigella* (*S. flexneri*, *S. sonnei*), *Plesiomonas shigelloides* e *Listeria monocytogenes* (Potasman, 2002; Fang et al., 2015). Moluscos bivalves também podem transmitir doenças causadas por protozoários, sendo os principais *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis* e *Toxoplasma gondii* (Robertson, 2007).

Além dos vírus, bactérias e protozoários, as ostras podem veicular biotoxinas (Turner et al., 2012; Turner et al., 2013; Xie et al., 2013). As biotoxinas são formadas por algumas espécies de microalgas nocivas e podem causar vários tipos de intoxicações, entre elas: toxinas paralisantes (PSP), toxinas amnésicas (ASP), neurotoxinas (NSP), toxinas diarréicas (DSP), entre outras (Brasil, 2012).

As ostras se alimentam de plâncton pelo processo de filtração da água. Na presença de micro-organismos patogênicos ou microalgas nocivas na água, estes são retidos e concentrados no trato gastrointestinal dos moluscos. Caso o processamento e preparo das ostras não seja eficiente na remoção (depuração) ou destruição (cozimento) destes micro-organismos ou toxinas, o consumo de ostras pode representar um perigo à saúde pública (Robertson, 2007). Para potencializar esse problema, na maioria das vezes, as ostras cultivadas e comercializadas no Brasil são consumidas cruas.

Alguns patógenos associados à esses moluscos podem estar naturalmente presentes nas águas de cultivo, como *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* e *V. cholerae* (não-O1 e não-O139). Outros patógenos são geralmente associados à presença de contaminação fecal nas águas, tais como *V. cholerae* O1 e O139, *Salmonella* sp, *E. coli*, *Shigella* sp, *Campylobacter jejum*, *Yersinia enterocolitica* além do vírus da hepatite A e Norovirus (Fda, 2011).

A maioria das doenças alimentares relacionadas ao consumo de ostras é de curta duração e autolimitada, no entanto, em alguns casos, pode ser fatal, principalmente quando se trata do vírus da hepatite A e *V. vulnificus* infectando pessoas imunodeprimidas (Potasman, 2002). *Salmonella*, uma bactéria Gram-negativa, é uma das principais causas de infecções de origem alimentar em todo o mundo. No sudeste da Ásia e da América, *Salmonella* é uma causa comum de doenças gastrointestinais e é responsável por cerca de 1,4 milhões de casos de infecções que costumam levar à morte a cada ano (Brands et al., 2005; Ponce et al., 2008)

Importante ressaltar que as bactérias sobre as quais a legislação brasileira (Resolução RDC 12, de janeiro de 2001) estabelece limites máximos de contaminação quase sempre não alteram a aparência física do pescado. A razão de suas limitações está relacionada ao fato de serem organismos patogênicos ao homem e não deterioradoras do produto.

Neste projeto, entretanto, foi utilizada uma nova metodologia de análise de micro-organismos presentes nas ostras (um método molecular de última geração), que permitiu a pesquisa e quantificação não só das bactérias exigidas por lei, mas também de outros micro-organismos patogênicos para as ostras e/ou para os consumidores. Desta forma, foi possível o

completo mapeamento dos micro-organismos presentes nas ostras produzidas em diferentes estados e regiões brasileiras, a partir da análise direta das amostras, ou seja, sem a necessidade da utilização de meios de cultivo ou de provas bioquímicas, resultando em uma maior agilidade e acurácia do processo.

O método molecular permite uma detecção rápida e seletiva de micro-organismos em diferentes matrizes, por detectar fragmentos específicos de genes. O principal ponto positivo para justificar a detecção de micro-organismos em alimentos usando técnicas moleculares é a sua alta sensibilidade e especificidade. A sensibilidade depende, não somente das condições de reação, mas principalmente da composição da amostra e do método de extração do DNA (Sheu, 1998).

O avanço biotecnológico tem permitido o desenvolvimento de novas técnicas com a finalidade de diminuir o tempo de detecção, aumentar a sensibilidade e a especificidade de detecção, além de avaliar com mais acurácia a eficiência dos métodos de depuração de patógenos. Sendo assim, os métodos tradicionais têm sido gradativamente substituídos por kits enzimáticos de detecção rápida e ainda pelas técnicas moleculares baseadas na detecção do DNA bacteriano a partir de plataformas específicas em reações de hibridização molecular, precedidas pela amplificação gênica (Correa, 2006).

A proposta do presente projeto foi monitorar a qualidade microbiológica das ostras cultivadas no litoral paranaense e nordestino e fazer um amplo levantamento da qualidade microbiológica das ostras comercializadas em todas as microrregiões do estado do Paraná, sejam elas originadas de cultivos realizados no próprio estado ou provenientes de outros estados.

Mas, além disso, uma parceria entre o Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais e o SEBRAE/AL possibilitou que os resultados obtidos no presente projeto chegassem, na forma de informações de fácil compreensão, ao elo inicial da cadeia de produção e de distribuição de ostras cultivadas: os produtores. Portanto, o produto deste projeto foi utilizado em um manual de boas práticas produtivas e profiláticas, que o Sebrae utiliza nas suas atividades junto ao setor produtivo. Com isso, projeto contribuiu para a melhoria da qualidade higiênico-sanitária das ostras cultivadas no país.

### **3 OBJETIVOS E METAS**

#### **3.1 Objetivos**

##### **3.1.1 Geral**

Identificar e avaliar a microbiota associada a ostras produzidas e comercializadas no estado do Paraná e na região Nordeste do Brasil.

##### **3.1.2 Específicos**

- Identificar os principais locais de comercialização de ostras cultivadas nos estados do Paraná, Sergipe, Alagoas, Paraíba e Rio Grande do Norte;
- Identificar as principais formas de apresentação das ostras comercializadas na área de estudo;
- Identificar e quantificar a microbiota existente nas ostras analisadas;

- Avaliar os efeitos da origem, do local de coleta e da forma de apresentação das ostras analisadas sobre a microbiota identificada e quantificada nesses animais;
- Identificar as bactérias potencialmente patogênicas à saúde do consumidor e estimar se existem riscos aos consumidores dessas ostras.

### 3.2 Metas

- Realizar quatro campanhas amostrais em cinco estados do território brasileiro ao longo de 12 meses para avaliação da microbiota presente em ostras produzidas e comercializadas nesses estados.
- Realizar ao menos uma campanha amostral em cada um dos principais centros de comercialização de ostras em 10 microrregiões geográficas (Noroeste, Centro Ocidental, Norte Central, Norte Pioneiro, Centro Oriental, Oeste, Sudoeste, Centro Sul, Sudeste, Metropolitana de Curitiba) do estado do Paraná.
- Analisar amostras de ostras de pelo menos uma área de cultivo por estado da região Nordeste.
- Publicar, em parceria com o SEBRAE-AL, um manual técnico, de fácil leitura e compreensão, para orientar os produtores de ostras a produzir produtos de maior qualidade.

## 4 METODOLOGIA EMPREGADA

### 4.1 Área de estudo

Os estudos foram realizados no estado do Paraná, localizado na região Sul do país e nos estados de Sergipe, Alagoas, Paraíba e Rio Grande do Norte, localizados na região Nordeste.

#### 4.1.1 Estado do Paraná

As ostras (*in natura* e industrializadas) utilizadas nas análises microbiológicas foram provenientes de mercados municipais e peixarias, localizados em diferentes cidades do estado do Paraná.

Para a definição das áreas analisadas no estado, foi adotada a classificação de regiões segundo IPARDES (2012). Portanto, o estado do Paraná foi dividido em dez regiões geográficas: Noroeste, Centro Ocidental, Norte Central, Norte Pioneiro, Centro Oriental, Oeste, Sudoeste, Centro Sul, Sudeste, Metropolitana de Curitiba.

Foram primeiramente realizados contatos telefônicos para identificação dos pontos de venda. Depois, cada uma dessas regiões foi visitada de carro e as ostras adquiridas nos estabelecimentos previamente identificados.

### 4.1.2 Região Nordeste

Foram utilizados 7 cultivos de ostras como pontos amostrais, distribuídos entre os estados de Sergipe (n=2), Alagoas (n=2), Paraíba (n=1) e Rio Grande do Norte (n=2), conforme identificado na Tabela 1.

Tabela 1. Coordenadas geográficas dos pontos de coleta de ostras nos estados de Alagoas, Paraíba, Sergipe e Rio Grande do Norte\*.

Estado	Ponto	Local	Coordenadas
Sergipe	1	Povoado Pontal (Indiaroba)	S 11°29'03,5" O 37°24'56,6"
	2	Rio Parapuca (Brejo Grande)	S 10°31'57,3" O 36°29'22,4"
Alagoas	1	Barra de São Miguel	S 9°50'10,0" O 35°57'20,8"
	2	Passo de Camaragibe	S 91°8'44,2" O 35°25'16,1"
Paraíba	1	Estuário Mamanguape (Marcação)	S 6°47'5,9" O 34°59'44,8"
Rio Grande do Norte	1	Tibau do Sul - Umari	S 06°12'30,1" O 35°08'00,3"
	2	Macau	S 5°08'33,6" O 36°38'21,9"

## 4.2 Amostragem

### 4.2.1 Paraná

Cada amostra de ostra era composta por no mínimo 12 unidades (*in natura*) ou 200 gramas (industrializadas). As amostras foram armazenadas e mantidas em caixas isotérmicas, sob refrigeração (5 a 10°C) até o momento das análises. O intervalo de tempo entre a compra das ostras e o início das análises não excedeu 48 horas, conforme preconiza o *Codex Alimentarius* (1978) e o PNCMB (2013).

As caixas com as amostras foram enviadas por via aérea e/ou rodoviária até o Laboratório de Histologia e Microbiologia (LHM), pertencente ao GIA, localizado na Universidade Federal do Paraná, em Curitiba, Paraná.

### 4.2.2 Região Nordeste

Um técnico deslocou-se, por via aérea, de Curitiba até Aracaju-SE, de onde partiu para visitar cada um dos sete pontos de coleta, totalizando 7 dias ininterruptos de atividades por campanha amostral.

As amostras coletadas foram enviadas por via aérea imediatamente após a coleta, para que o tempo total entre a coleta a campo e a chegada ao laboratório em Curitiba-PR, não fosse superior a 48 horas.

Os materiais e equipamentos para registro de dados e aquisição de amostras biológicas, incluíram:

- Disco de Secchi
- GPS
- Kits de transporte contendo, cada um: 1 caixa de isopor; 1 saco plástico transparente de 60 L; 1 lacre numerado; 1 *datalogger* programado para aferir a temperatura desde a coleta das ostras até a chegada ao laboratório, em Curitiba-PR; gelo gel; e, papelão para

evitar o contato direto das ostras com o gelo gel, o que poderia provocar a mortalidade destes moluscos bivalves.

- Oxímetro
- pHmetro
- Planilhas para as anotações e registros
- Questionário de pesquisa para coleta de dados de campo
- Refratômetro

As caixas com as amostras foram enviadas por via aérea até o Laboratório de Histologia e Microbiologia (LHM).

### 4.3 Mensuração de variáveis abióticas

Durante os procedimentos de coleta, foram realizadas mensurações de variáveis abióticas para a caracterização dos pontos amostrais e das condições ambientais no momento da retirada das ostras da água. Para este procedimento, foram utilizados os equipamentos relacionados na Tabela 2.

Tabela 2. Variáveis que foram analisadas nos pontos de coleta de ostras nos estados de Sergipe (SE), Alagoas (AL), Paraíba (PB) e Rio Grande do Norte (RN).

Variável analisada	Unidade	Equipamento
<b>Concentração de oxigênio dissolvido</b>	mg/L	Oxímetro
<b>pH</b>	-	Medidor de pH portátil
<b>Salinidade</b>	-	Salinômetro/Refratômetro
<b>Saturação de oxigênio dissolvido</b>	%	Oxímetro
<b>Temperatura</b>	°C	Oxímetro
<b>Transparência</b>	cm	Disco de Secchi

Todas as variáveis mensuradas, bem como, as condições ambientais observadas no momento da coleta de amostras foram registradas em uma ficha de coleta e, posteriormente, compiladas em uma planilha digital.

### 4.4 Processamento das amostras

Ao chegar ao laboratório, as ostras passaram pelo processo de abertura e retirada da carne e líquido intervalvar. Em seguida, foram colocadas em sacos plásticos estéreis e maceradas para obtenção de uma amostra homogênea. Uma alíquota (200 µL) da amostra foi retirada e inserida em frascos *eppendorf*.

### 4.5 Análises genéticas

Para a extração do DNA total das ostras foi utilizado o kit Invitrogen (Purelink® Genomic DNA). O DNA total extraído das amostras foi quantificado com o kit Qubit ds DNA High-Sensitivity (HS) Assay por fluorometria no equipamento Qubit® 2.0 Fluorometer Invitrogen.

As análises genéticas foram realizadas de acordo com a metodologia proposta por Caporaso *et al.* 2011.

O gene *rRNA 16S* foi amplificado em cada amostra a partir de uma PCR, em um sistema de 10 µL, contendo 5µL de DNA (20 ng/L), 1 µL de primer universal (515 F/806r), 1 µL do primer “adaptador” e 5 µL da enzima KlenTaq DV Readymix. Os níveis de expressão gênica do gene 16S foram analisados em um termociclador (Veriti 96 well Applied Biosystems), com as reações realizadas a 94°C por 3 minutos para a desnaturação inicial do DNA, seguido do processo de amplificação de 25 ciclos a 94°C por 45 segundos para a desnaturação final; 50°C durante 30 segundos para o anelamento; 68°C durante 1 minuto para a extensão inicial e 10 minutos a 72°C para a extensão final. Mantendo após isso, as amostras entre 0 e 4°C.

Para a confirmação da amplificação, as amostras foram testadas em gel de agarose (1%) em tampão Tris/Borato/EDTA 1X (Tris-HCl 0,09M; ácido bórico 0,09M e EDTA 0,002M). No gel, foram aplicados 3 µL da mistura feita com 2 µL de amostra e 2 µL de corante (BlueJuice Gel Loading Buffer 10X). Após esta etapa, foi realizada a corrida eletroforética das amostras no gel (uma hora) em voltagem constante de 70 Volts na presença de tampão TBE 1X. Juntamente com as amostras, foi aplicado no gel, 3µL de marcador de peso molecular 1Kb. O gel foi corado com brometo de etídio (1%) (15 minutos), lavado em água (10 minutos) e visualizado em uma câmara UVP 3UV Transilluminator Imaging System.

O sequenciamento das amostras foi realizado na plataforma Illumina MiSeq de nova geração capaz de gerar informações sobre milhares de pares de bases em uma única corrida. O kit utilizado para o sequenciamento das amostras foi o MiSeq Reagent Kit v2 (500cycle), pair end.

A partir do programa Qiime (Quantitative Insights Into Microbial Ecology), foi feito o processamento de sequências para análise de agrupamentos e estabelecimento de unidades taxonômicas operacionais e comparação com bancos de dados genômicos para estabelecimento de linhagens bacterianas presentes.

## **5 RESULTADOS CONDENSADOS**

### **5.1 Identificação dos pontos de comercialização de ostras cultivadas**

A avaliação microbiológica das ostras ocorreu em quatro estados do Nordeste, a partir da identificação e definição de sete pontos de cultivo de ostras. Estes pontos foram em: Macau e Tibau do Sul, no Rio Grande do Norte; Marcação, na Paraíba; Passo de Camaragibe e Barra de São Miguel, em Alagoas; Brejo Grande e Indiaroba, em Sergipe.

Na região Sul, o foco principal foi no estado do Paraná, para ostras comercializadas in natura ou processadas. Os locais onde foram encontrados pontos de comercialização foram: Região Metropolitana de Curitiba (Curitiba, Guaratuba, Paranaguá, Matinhos), Norte Central Paranaense (Maringá, Campo Mourão), Centro Sul Paranaense (Guarapuava), Sudeste Paranaense (Francisco Beltrão) e Oeste Paranaense (Toledo, Foz do Iguaçu).

## 5.2 Campanhas amostrais

Foram realizadas quatro coletas na região Nordeste, sendo duas no período de seca e duas no período chuvoso. Durante estas campanhas foram coletadas ostras de duas espécies (*Crassostrea gasar* e *Crassostrea rhizophorae*). As ostras permaneceram sob refrigeração até a chegada ao laboratório para análise.

As ostras coletadas nas diferentes regiões do estado do Paraná, foram armazenadas em caixas isotérmicas, refrigeradas e transportadas (aéreo ou rodoviário) até o laboratório.

## 5.3 Identificação das formas de apresentação das ostras comercializadas

Foram encontradas várias formas de apresentação das ostras comercializadas. Entre elas podem ser citadas: Ostras in natura (vivas); Ostras minimamente processadas (Inteiras); Ostras ultraprocessadas (cozidas, fatiadas e congeladas (carpaccio), cozidas, com queijo em meia-concha (prontas para gratinar), cozidas, com molho branco em meia-concha).

## 5.4 Identificação e quantificação de bactérias patogênicas em ostras

Nas ostras do Nordeste, foram identificados 106 gêneros de bactérias pertencentes a 103 famílias, 70 ordens, 39 classes e 21 filos. 40 são de bactérias potencialmente patogênicas para os seres humanos e nove são causadoras de Doenças Transmitidas por Alimentos.

Nas ostras avaliadas no estado do Paraná, foram identificados 88 gêneros de bactérias, pertencentes a 80 famílias, 45 ordens, 24 classes e 15 filos. Os gêneros mais prevalentes foram *Vibrio*, *Bacteroides* e *Shewanella*, nas amostras de ostras in natura; *Psychrobacter*, nas amostras de ostras minimamente processadas; *Acinetobacter* e *Psychrobacter*, nas ostras em forma de carpaccio; *Psychrobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Lactobacillus* e *Streptococcus* nas amostras prontas para gratinar e *Acinetobacter* e *Streptococcus* nas ostras com molho branco.

## 5.5 Análise e interpretação de resultados

Os resultados obtidos neste projeto mostraram a importância do sequenciamento genético de nova geração como ferramenta analítica em estudos e programas de monitoramento microbiológico de ostras, possibilitando identificar a diversidade de bactérias existente no organismo das ostras cultivadas.

A composição da microbiota bacteriana em ostras comercializadas no estado do Paraná esteve intrinsecamente associada à forma de apresentação dos produtos. Há evidências

relativamente robustas de que os resultados refletiram, indiretamente, os processos aos quais esses produtos foram submetidos até chegarem aos pontos de comercialização, como, por exemplo, à qualidade da água nos locais de cultivo das ostras e às técnicas empregadas ao longo da cadeia de produção, processamento e distribuição.

## 5.6 Elaboração de textos e publicação dos resultados

Com os resultados do projeto foi elaborada uma tese de doutorado, intitulada como “*Influência de fatores físicos, químicos e biológicos sobre a qualidade sanitária de ostras (Crassostrea spp.) em diferentes regiões do Brasil*”. Foram gerados três artigos científicos: *Metagenomic evaluation of the effects of storage conditions on the bacterial microbiota of oysters Crassostrea gasar (Adanson, 1757)*, *Effects of salinity on the survival and histology of oysters Crassostrea gasar (Adanson, 1757)* e *Metagenomic of the bacterial microbiota associated with cultured oysters (Crassostrea sp.) in estuarine environments*.

## 5.7 Elaboração de relatório final

O relatório final aborda os principais resultados encontrados durante todo o projeto. Foram relatadas as principais bactérias encontradas nas ostras cultivadas e comercializadas em duas regiões do Brasil (Sul e Nordeste). Além disso, é importante destacar que além dos resultados obtidos, este projeto apresentou como grande inovação a utilização de um novo e eficiente método de mapeamento genético molecular da microbiota bacteriana de ostras. Esse método ainda deverá evoluir bastante nos próximos anos, mas já desponta como uma importante ferramenta para se monitorar e garantir a qualidade higiênico-sanitária das ostras cultivadas e comercializadas no Brasil.

## 5.8 Impactos do projeto para avanço do estado da arte na área do conhecimento

O projeto contribuiu para a compreensão da influência que os fatores ambientais exercem nas diferentes fases de produção e de comercialização de ostras. Especificamente em relação à produção, o que se busca é gerar informações que possam levar ao aumento da eficiência produtiva na ostreicultura, e, como consequência, aumentar a qualidade higiênico-sanitária das ostras. Já em relação à fase de comercialização, o trabalho focou na qualidade sanitária das ostras e, como consequência, na saúde dos consumidores. Neste caso, o projeto quantificou micro-organismos patogênicos presentes em ostras, a partir do uso de um método inovador, que possibilitou o completo mapeamento dos micro-organismos presentes nas amostras analisadas.

## 5.9 Contribuição do projeto para inovação de produtos, processos ou políticas públicas

Com os avanços na biotecnologia, novas técnicas analíticas têm sido desenvolvidas ou adaptadas para aumentar a eficiência analítica, diminuir o tempo para a detecção de patógenos, aumentar a sensibilidade e a especificidade das análises e avaliar, com mais acurácia, a eficiência dos métodos de depuração de patógenos em ostras. Neste projeto, desenvolveu-se um método para análise microbiológica de ostras a partir da metagenômica. Esse método permite que comunidades microbianas coletadas diretamente do ambiente ou de amostras biológicas sejam completamente caracterizadas sem a necessidade de isolar e cultivar bactérias específicas. Ele baseia-se em bibliotecas de genes 16S rRNA, que são identificadas a partir do sequenciamento de nova geração e permitem o mapeamento completo das bactérias contidas nos bivalves.

## 5.10 Contribuição do projeto para formação de recursos humanos especializados para a academia, educação básica e superior, indústria, setor de serviços e setor público

O projeto serviu de base para a realização de uma tese de doutorado: Influência de fatores físicos, químicos e biológicos sobre a qualidade sanitária de ostras (*Crassostrea* spp.) em diferentes regiões do Brasil, desenvolvida por Aline Horodesky, no Programa de Pós-Graduação em Zoologia/UFPR. Além disso, permitiu o envolvimento e a participação de dois alunos de iniciação científica.

## 5.11 Contribuição do projeto para difusão e transferência do conhecimento

Os resultados do projeto, textos, imagens e vídeos gerados, foram sendo, desde o início, disponibilizados através da página do Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais na internet ([www.gia.org.br](http://www.gia.org.br)). Com nisso, criou-se um canal direto de divulgação com a sociedade, o que permitiu que produtores e mesmo cidadãos comuns entrassem em contato para saber mais sobre o tema e para tirar dúvidas. Além disso, a coordenação do projeto foi procurada pela Aguamar (Associação Guaratubana de Aquicultura) e pelo SEBRAE que buscam alternativas produtivas para os aquicultores da região Sul e Nordeste. O projeto foi apresentado a eles e foi estabelecido um termo de parceria para que os produtores pudessem acompanhar o desenrolar dos trabalhos realizados e as tecnologias geradas com os produtos desenvolvidos. Além disso, foi gerada uma reportagem na revista “#ciência UFPR”, edição 05, volume 04, nº 01,

julho/dezembro 2019, intitulada como “Análise genética é a base de método que ajuda a melhorar a qualidade das ostras produzidas no Brasil”.

### 5.12 Artigos científicos gerados

Horodesky, Aline; Castilho-Westphal, Gisela Geraldine; Cozer, Nathieli; Ostrensky, Antonio; Rossi, Vitor Gomes. Effects of salinity on the survival and histology of oysters *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757). Bioscience Journal, v. 35, p. 586-597, 2018.

Ostrensky, Antonio; Horodesky, Aline; Faoro, Helisson; Balsanelli, Eduardo; Sfeir, Michelle Zibetti Tadra; Cozer, Nathieli; Pie, Marcio Roberto; Dal Pont, Giorgi; Castilho-Westphal, Gisela Geraldine. Metagenomic evaluation of the effects of storage conditions on the bacterial microbiota of oysters *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757). Journal of Applied Microbiology, v. 1, p. 1, 2018.

Horodesky, Aline; Castilho-Westphal, Gisela Geraldine; Faoro, Helisson; Balsanelli, Eduardo; Sfeir, Michele Tadra; Cozer, Nathieli; Pie, Marcio; Ostrensky, Antonio. Metagenomic of the bacterial microbiota associated with cultured oysters (*Crassostrea* sp.) in estuarine environments. Anais da Academia Brasileira de Ciências (Online), 2018.

### 5.13 Livros

Ostrensky, Antonio; Castilho-Westphal, Gisela Geraldine; Zeni, Thayzi de Oliveira; Horodesky, Aline; Giroto, Marcus Fier; Hungria, Diogo Barbalho; Pestana, Debora. Fichas técnicas - Organismos identificados nas ostras cultivadas no Nordeste do Brasil. I. ed. Brasília: Sebrae, 2015. v. 1. 31p.

Ostrensky, Antonio; Castilho-Westphal, Gisela Geraldine; Giroto, Marcus Fier; Horodesky, Aline; Hungria, Diogo Barbalho. Manual de Boas Práticas: Qualidade e Segurança para Bons Negócios. I. ed. Brasília: Sebrae, 2015. v. 1. 33p.

Castilho-Westphal, Gisela Geraldine; Pestana, Debora; Ostrensky, Antonio. Manual de Ostreicultura com Espécies Nativas da Região Nordeste do Brasil Volume II - Sanidade e Profilaxia. I. ed. Brasília: Sebrae, 2016. v. 2. 94p.

Pestana, Debora; Ostrensky, Antonio; Castilho-Westphal, Gisela Geraldine; Giroto, Marcus; Souza, Marina Lima. Rastreabilidade na ostreicultura conceitos, fundamentos e recomendações técnicas. I. ed. Brasília: Sebrae, 2015. v. 1. 133p.

## 5.14 Trabalhos publicados em anais de eventos

Horodesky, Aline; Castilho-Westphal, Gisela Geraldine; Cozer, Nathieli; Ostrensky, Antonio. Efeitos da salinidade sobre a sobrevivência e sobre o tecido de ostras *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757). In: III Encontro de Malacologia do Paraná, 2017, Curitiba. Anais do III Encontro de Malacologia do Paraná, 2017. v. I.

Horodesky, Aline; Castilho-Westphal, Gisela Geraldine; Cozer, Nathieli; Ostrensky, Antonio. Avaliação de métodos para redução de epibiontes na ostra *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757), durante cultivo. In: III Encontro de Malacologia do Paraná, 2017, Curitiba. Anais do III Encontro de Malacologia do Paraná, 2017. v. I.

Horodesky, Aline; Castilho-Westphal, Gisela Geraldine; Cozer, Nathieli; Pie, Marcio Roberto; Faoro, Helisson; Balsanelli, Eduardo; Sfeir, Michele Tadra; Ostrensky, Antonio. Análise metagenômica da microbiota bacteriana de ostras cultivadas (*Crassostrea* sp.) na região Nordeste do Brasil. In: III Encontro de Malacologia do Paraná, 2017, Curitiba. Anais do III Encontro de Malacologia do Paraná, 2017. v. I.

Castilho-Westphal, Gisela Geraldine; Horodesky, Aline; Ostrensky, Antonio. Histopatologia de ostras nativas (*Crassostrea gasar*) cultivadas na região nordeste do Brasil. In: XIV Encontro Brasileiro de Patologistas de Organismos Aquáticos (XIV ENBRAPOA), 2016, Florianópolis/SC. XIV Encontro Brasileiro de Patologistas de Organismos Aquáticos (XIV ENBRAPOA) - 2016 - Florianópolis/SC, 2016. v. I. p. 086-086.

Horodesky, Aline; Castilho-Westphal, Gisela Geraldine; Zeni, Thayzi de Oliveira; Dal Pont, Giorgi; Ostrensky, Antonio. Comparação entre os métodos de preparo de amostras para identificação de organismos epibiontes associados ao cultivo da ostra mangue *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757). In: II EPRAM Encontro Paranaense de Malacologia, 2015.

## 5.15 Orientações acadêmicas

Aline Horodesky. Influência de fatores físicos, químicos e biológicos sobre o desenvolvimento e sobre a qualidade sanitária de ostras (*Crassostrea* spp.) cultivadas e comercializadas no Brasil. 2017. Zoologia - Universidade Federal do Paraná.

## 5.16 Avaliação sobre o desempenho dos alunos de Iniciação Científica

### 5.16.1 Vilmar Biernaski

Vilmar Biernaski teve uma participação importante no projeto. Foi sua a responsabilidade por organizar e adaptar o laboratório para a realização das análises microbiológicas. O bolsista

era também responsável pelo auxílio no recebimento das amostras, realização das extrações de DNA, PCR e preparação das amostras para o sequenciamento de nova geração. Durante o período do projeto, o aluno pediu desligamento para realizar um estágio voluntário no INPA (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia). Entretanto, enquanto bolsista o aluno se mostrou dedicado ao projeto e às atividades laboratoriais.

#### 5.16.2 César Jun Hironaka

O aluno trabalhou no projeto principalmente durante as análises dos dados gerados após o sequenciamento de DNA das bactérias presentes nas ostras. Durante essa fase, ele acompanhou o processo de bioinformática, a análise dos dados do projeto e sempre esteve em busca de referenciais bibliográficos relacionados ao trabalho. Resumindo, o aluno se mostrou bastante empenhado e dedicado às atividades do projeto.

#### 5.17 Texto para não especialista

Durante a produção comercial, as ostras são inevitavelmente expostas a diversos fatores estressantes (sejam eles de origem física, química ou biológica) característicos do local/ambiente onde são cultivadas. Em alguns casos, os efeitos prejudiciais causados por esses fatores podem ser minimizados ou mesmo evitados. Os resultados obtidos aqui, mostraram como a microbiota presente em ostras pode ser preocupante tanto para o produtor quanto para o consumidor, fazendo com que as bactérias, devam ser consideradas entraves para o desenvolvimento da ostreicultura. O que se buscou foi gerar informações que pudessem levar ao aumento da eficiência produtiva na ostreicultura, e, como consequência, reduzir impactos ambientais associados à atividade. Já em relação à fase de comercialização, o projeto focou na qualidade sanitária das ostras e, como consequência, na saúde dos consumidores. Sintetizando, o projeto realizou a quantificação de micro-organismos patogênicos presentes em ostras, a partir do uso de um método inovador, que possibilitou o completo mapeamento dos micro-organismos presentes nas amostras analisadas.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-BUSAIDI, M. A.; JUKES, D. J.; BOSE, S. Seafood safety and quality: An analysis of the supply chain in the Sultanate of Oman. **Food Control**, v. 59, p. 651-662, 1// 2016. ISSN 0956-7135. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713515300505> >.

ALVES, J. M. C. Segurança alimentar na produção de organismos aquáticos. **Feed & Food – segurança alimentar para a saúde e bem-estar do homem**, v. 1, n. 4, p. 16-26, 2006.

BRANDS, D. A. et al. Prevalence of Salmonella spp. in oysters in the United States. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 2, p. 893-897, 2005. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-13544273851&partnerID=40&md5=5096c48be2e0f8ec76bb519946fe9c3e> >.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Interministerial nº 07, 08/05/2012. 2012.

CORREA, A. A. Estudo sobre a dinâmica de depuração de ostras de cultivo (*Crassostrea gigas*) artificialmente contaminadas com *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium. **Dissertação de Mestrado UFSC**, 2006.

FANG, T. et al. Mathematical modeling of growth of Salmonella spp. and spoilage microorganisms in raw oysters. **Food Control**, v. 53, p. 140-146, 7// 2015. ISSN 0956-7135. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713515000390> >.

FDA, F. A. D. A. Fish and fishery products hazards and controls guidance. 2011.

GASPAR, M. B. et al. 10.08 - Restoring Coastal Ecosystems from Fisheries and Aquaculture Impacts A2 - Wolanski, Eric. In: MCLUSKY, D. (Ed.). **Treatise on Estuarine and Coastal Science**. Waltham: Academic Press, 2011. p.165-187. ISBN 978-0-08-087885-0.

GRIGORAKIS, K. R., G. Aquaculture effects on environmental and public welfare – The case of Mediterranean mariculture. **Chemosphere**, v. 85, n. 6, p. 899-919, 2011.

LAING, I. Oysters – Shellfish Farming☆. In: (Ed.). **Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences**: Elsevier, 2013. ISBN 978-0-12-409548-9.

MIZAN, M. F. R.; JAHID, I. K.; HA, S.-D. Microbial biofilms in seafood: A food-hygiene challenge. **Food Microbiology**, v. 49, p. 41-55, 8// 2015. ISSN 0740-0020. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002015000131> >.

NORTHEN, J. R. Using farm assurance schemes to signal food safety to multiple food retailers in the U. K. . **International Food and Agribusiness Management Review**, v. 4, p. 37-50, 2001.

OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; SOTO, D. **Aquicultura no Brasil: o desafio é crescer**. Brasília: Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação - FAO, 2008. 276 p ISBN 978-85-60930-00-5+--.

OTTINGER, M.; CLAUSS, K.; KUENZER, C. Aquaculture: Relevance, distribution, impacts and spatial assessments – A review. **Ocean & Coastal Management**, v. 119, p. 244-266, 1// 2016. ISSN 0964-5691. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964569115300508> >.

PONCE, E. et al. Prevalence and characterization of Salmonella enterica serovar Weltevreden from imported seafood. **Food Microbiology**, v. 25, n. 1, p. 29-35, 2008. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-35748968455&partnerID=40&md5=c0024c6a981fb708362f3fcfe725b936> >.

POTASMAN, I. P., A.; ODEH, M. Infectious outbreaks associated with bivalve shellfish consumption: a worldwide perspective. **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, p. 921-928, 2002.

ROBERTSON, L. J. The potential for marine bivalve shellfish to act as transmission vehicles for outbreaks of protozoan infections in humans: A review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 3, p. 201-216, 2007.

SERMENT-MORENO, V. et al. Monte Carlo analysis of the product handling and high-pressure treatment effects on the Vibrio vulnificus risk to raw oysters consumers. **Journal of Food Engineering**, v. 144, p. 86-92, 1// 2015. ISSN 0260-8774. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877414003148> >.

SHEU, P. M. B., K.; STAHL, U. Detection of pathogenic and spoilage micro-organism in food with the polymerase chain reaction. **Food Microbiology**, v. 1513-31, 1998.

TURNER, A. D. et al. Investigations into matrix components affecting the performance of the official bioassay reference method for quantitation of paralytic shellfish poisoning toxins in oysters. **Toxicon**, v. 59, n. 2, p. 215-230, 2// 2012. ISSN 0041-0101. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004101011100362X> >.

TURNER, A. D. et al. Feasibility studies into the production of gamma-irradiated oyster tissue reference materials for paralytic shellfish poisoning toxins. **Toxicon**, v. 72, p. 35-42, 9/15/ 2013. ISSN 0041-0101. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010113002225> >.

WIDDOWS, J.; BRINSLEY, M. Impact of biotic and abiotic processes on sediment dynamics and the consequences to the structure and functioning of the intertidal zone. **Journal of Sea Research**, v. 48, n. 2, p. 143-156, 10// 2002. ISSN 1385-1101. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138511010200148X> >.

XIE, W. et al. Accumulation and depuration of paralytic shellfish poisoning toxins in the oyster Ostrea rivularis Gould – Chitosan facilitates the toxin depuration. **Food Control**, v. 30, n. 2, p. 446-452, 4// 2013. ISSN 0956-7135. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713512004318> >.

ZANIN, L. M. et al. Seafood safety: Knowledge, attitudes, self-reported practices and risk perceptions of seafood workers. **Food Research International**, v. 67, p. 19-24, 1// 2015. ISSN 0963-9969. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996914006590> >.

ZHOU, Q. et al. Role and functions of beneficial microorganisms in sustainable aquaculture. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 16, p. 3780-3786, 8// 2009. ISSN 0960-8524. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852408010973> >.