UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Salmonella spp. em pontos críticos da cadeia de produção de hortaliças orgânicas no Estado de São Paulo: contribuição para avaliação de risco

Marcelo Belchior Rosendo da Silva

Dissertação para obtenção do Título de Mestre
Orientadora: Profª Drª Bernadette D.G.M. Franco

São Paulo
2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Salmonella spp. em pontos críticos da cadeia de produção de hortaliças orgânicas no Estado de São Paulo: contribuição para avaliação de risco

Marcelo Belchior Rosendo da Silva

Versão corrigida da Dissertação conforme Resolução CoPGr 6018, de 13/10/2011.

Dissertação para obtenção do Título de Mestre
Orientadora: Profª Drª Bernadette D.G.M. Franco

São Paulo
2019

Marcelo Belchior Rosendo da Silva

Salmonella spp. em pontos críticos da cadeia de produção de hortaliças orgânicas no Estado de São Paulo: contribuição para avaliação de risco

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Profª Drª Bernadette D.G.M. Franco
Orientadora/presidente

_____
1º examinador

_____
2º examinador

_____
3º examinador

São Paulo, 04 de Outubro de 2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Assinatura: _____ Data___/___/___

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

S586<

Silva, Marcelo Belchior Rosendo da
Salmonella spp. em pontos críticos da cadeia de produção de hortaliças orgânicas no Estado de São Paulo: contribuição para avaliação de risco / Marcelo Belchior Rosendo da Silva. - São Paulo, 2019.
89 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.
Orientador: Franco, Bernadette Dora Gombossy de Melo

1. Hortaliças orgânicas. 2. Enterobacteriaceae. 3. Salmonella spp. 4. Bacillus thuringiensis. 5. Agentes de controle biológico. I. T. II. Franco, Bernadette Dora Gombossy de Melo , orientador.

AGRADECIMENTOS

À minha família, minha base, apoio e inspiração para seguir em frente. Minha mãe Cleyde e meu irmão Marcos, por terem me motivado a ir em busca dos meus sonhos e enfrentar as adversidades da vida com garra, ética e resistência; Meus sogros Ivone e Milton pelo carinho de sempre; E meu companheiro Diogo, pela paciência, pelos conselhos, por acreditar e me mostrar que sou capaz de ir além.

À Profª Drª Bernadette D.G.M. Franco, pela orientação e oportunidades de aprendizado e desenvolvimento profissional durante o mestrado.

A Profª Drª Mieke Uyttendaele, por ter me recebido na Ghent University e compartilhado seu conhecimento, me orientado em parte desta pesquisa.

À Profª Drª Daniele Fernanda Maffei, pelos ensinamentos, experiências compartilhadas, oportunidades de parcerias e amizade.

Às Professoras Mariza Landgraf, Elaine Martinis e Cynthia Kunigk pela participação no exame de qualificação e sugestões para enriquecimento deste trabalho.

À Profª Drª Evelise Telles, pela oportunidade de participar como monitor PAE na disciplina Higiene e Segurança Alimentar da FMVZ/USP.

À Universidade de São Paulo, que tem possibilitado o meu desenvolvimento científico desde a graduação. Assim como aos professores desta instituição, pelo aprendizado nas aulas e empenho pelo desenvolvimento científico do País.

À equipe do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da FCF/USP, professores, pesquisadores, técnicas e estagiários, pelo auxílio no desenvolvimento dos experimentos, aprendizado e pelos bons momentos compartilhados.

À equipe do Laboratório de Microbiologia e Preservação de Alimentos da Ghent University, professores, técnicos e pesquisadores, pelo acolhimento caloroso, troca de experiências e amizade.

À Meiriellen Dias e Maria Anita Mendes do DEMPSTER-MS Lab, pelo auxílio nas análises de MALDI-TOF MS no Departamento de Engenharia Química da POLI/USP.

Ao Sr. Issao Ishimura da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), pela intermediação com os produtores e apoio técnico sobre a produção de hortaliças orgânicas.

Aos produtores orgânicos, por terem me recebido em suas propriedades e doado gentilmente as amostras para a realização desta pesquisa.

Aos meus amigos, Aline Camargo, Aline Oliveira, Ana Clara, Carlos Tersarotto, Débora Moreira, Diane Tavares, Gabriela Boscariol, Gabriela Zampieri, Marcella Alves, Mariana Coutinho, Mariana Marinho, Marina Carvalho, Pyera Grassi e Tammye Grassi, pela força e amizade de todos estes anos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo 2017/00388-0 e 2018/20120-4), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

– CNPq, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e ao Centro de pesquisa em Alimentos – FoRC, pelas bolsas concedidas e apoios financeiros para participação em eventos científicos.

RESUMO

SILVA, M. B. R. ***Salmonella* spp. em pontos críticos da cadeia de produção de hortaliças orgânicas no Estado de São Paulo: contribuição para avaliação de risco.** 2019. 89f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Dados de vigilância epidemiológica apontam uma crescente associação entre o consumo de hortaliças e surtos de origem alimentar. São inúmeras as fontes de contaminação aos quais os vegetais estão sujeitos ao longo da cadeia produtiva. Estudos sugerem que práticas agrícolas, como o uso de adubo constituído por esterco animal e água de irrigação não tratada, podem aumentar o risco de contaminação por micro-organismos patogênicos. Com as restrições ao uso de pesticidas sintéticos no sistema orgânico de produção agrícola, agentes de controle biológico, como *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) desempenham um importante papel para a garantia da produtividade. No entanto, recentemente, a segurança do uso de *Bt* passou a ser questionada em função da possibilidade de produzir enterotoxinas. Este estudo teve por objetivos levantar dados sobre práticas adotadas no cultivo de hortaliças orgânicas no Estado de São Paulo, Brasil e sobre as características microbiológicas de fertilizantes, água de irrigação, água de lavagem e alfaces nas etapas pré e pós-colheita, assim como avaliar a persistência e interações entre *Bt* e *Salmonella* em hortaliças, visando contribuir para avaliações de risco microbiológico mais adequadas. Na primeira parte do estudo, dez propriedades de cultivo orgânico certificadas foram visitadas para a obtenção de dados sobre práticas adotadas e para a coleta de amostras para análise microbiológica. As amostras foram submetidas à enumeração e identificação (gênero e espécie) de *Enterobacteriaceae*; pesquisa de *Salmonella* spp. por método convencional e qPCR; e enumeração de coliformes totais e *Escherichia coli* nas amostras de água. Na segunda fase da pesquisa, avaliou-se a persistência e as interações entre *Bt* e *Salmonella* Montevideo no pré e pós-colheita de espinafres. Por fim, bactérias epifíticas isoladas de hortaliças foram testadas quanto a capacidade de inibir bactérias do grupo *Bacillus cereus* e cepas de *Salmonella enterica*. As contagens de *Enterobacteriaceae* variaram de <1 a 7,2 ± 0,1 log UFC/g nos fertilizantes, de 4,1 ± 0,3 a 5,6 ± 0,3 log UFC/g nas alfaces coletadas nos canteiros, de 2,9 ± 0,6 a 5,3 ± 0,5 log UFC/g nas alfaces lavadas, de <1 a 3,5 ± 0,1 log UFC/mL nas amostras de água de irrigação e de <1 a 3,0 ± 0,3 log UFC/mL nas amostras de água de lavagem. *Salmonella* não foi isolada por cultivo em placa, mas foi detectada por qPCR em uma amostra de alface orgânica lavada. Utilizando MALDI-TOF MS, 45 espécies pertencentes a 24 gêneros bacterianos foram identificadas na cadeia produtiva de hortaliças orgânicas. *Bt* foi capaz de persistir nas folhas de espinafre nas etapas pré e pós-colheita e afetou a persistência de *Salmonella* durante o cultivo, mas não durante o armazenamento pós-colheita a 12 ºC. Não foi observada tendência de germinação dos esporos de *Bt* após a aplicação nos espinafres, reduzindo assim a possibilidade de multiplicação e produção de enterotoxinas. A bactéria epifítica *Pseudomonas chlororaphis*, isolada de hortaliça, foi capaz de inibir membros do grupo *Bacillus cereus*, incluindo cepas patogênicas e *Bt* em testes *in vitro*, sugerindo uma barreira biológica para o controle da multiplicação destes micro-organismos. Este estudo traz importantes informações sobre a segurança microbiológica de hortaliças orgânicas e de práticas agrícolas, evidenciando a importância de boas práticas para a promoção do alimento seguro. Os resultados constituem uma importante contribuição para o desenvolvimento de modelos de avaliação de risco microbiológico e prevenção de surtos de origem alimentar.

Palavras-chaves: Hortaliças orgânicas, *Enterobacteriaceae*, *Salmonella* spp., *Bacillus thuringiensis*, Agentes de controle biológico

ABSTRACT

SILVA, M. B. R. ***Salmonella* spp. at critical points in organic vegetables production chain in the state of São Paulo: contribution for risk assessment.** 2019. 89p. Dissertation (Master) – Faculty of Pharmaceutical Sciences. University of São Paulo, São Paulo, 2019.

Epidemiological surveillance data indicate a growing association between vegetable consumption and food-borne outbreaks. There are numerous sources of contamination to which plants are subjected throughout the production chain. Studies suggest that agricultural practices such as the use of manure fertilizer and untreated irrigation water may increase the risk of contamination by pathogenic microorganisms. With the restrictions on the use of synthetic pesticides in the organic farming system, biological control agents such as *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), play an important role in ensuring productivity. However, the safety of *Bt* has recently been questioned due to the possibility of producing enterotoxins. This study aimed to gather information about the agricultural practices employed in the organic vegetables production fields and the microbiological characteristics of fertilizer, irrigation water, wash water, and lettuces in pre and post-harvest stages, and to evaluate the persistence and interactions between *Bt* and *Salmonella* on leafy greens, aiming to contribute for more adequate microbiological risk assessments. In the first part of the study, ten certified organic farms were visited to collect data on the farming practices and for collection of samples for microbiological evaluations. The samples were submitted to *Enterobacteriaceae* enumeration and identification (genus and species); *Salmonella* spp. by conventional method and qPCR; and enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* in water samples. In the second part of the study, the persistence and interaction between *Bacillus thuringiensis* subsp Aizawai (*Bt*) and *Salmonella* Montevideo in the pre and post-harvest of spinach were evaluated. Finally, epiphytic bacteria isolated from vegetables were tested for their ability to inhibit growth of *Bacillus cereus* group members and *Salmonella* strains. *Enterobacteriaceae* counts ranged from <1 to 7.2 ± 0.1 log CFU/g in fertilizers, from 4.1 ± 0.3 to 5.6 ± 0.3 log CFU/g in lettuces collected from the fields, from 2.9 ± 0.6 to 5.3 ± 0.5 log CFU/g in washed lettuces, <1 to 3.5 ± 0.1 log CFU/mL in irrigation water and <1 to 3.0 ± 0.3 log CFU/mL in wash water. *Salmonella* was not isolated by plating but it was detected by qPCR in one sample of washed organic lettuce. Using MALDI-TOF MS, 45 species belonging to 24 bacterial genera were identified in the organic vegetable production chain. *Bt* was able to persist on pre and post-harvest of spinach and affected *Salmonella* persistence during cultivation, but not during the storage at 12 ºC. *Bt* spores showed no tendency to germinate during pre-harvest of spinach, thus reducing the probability of growth and production of enterotoxins. The epiphytic bacterium *Pseudomonas chlororaphis* isolated from one vegetable sample was able to inhibit members of the *Bacillus cereus* group, including pathogenic strains and *Bt* in *in vitro* tests, suggesting a biological barrier to control the multiplication of these microorganisms. These studies provide important information about the microbiological safety of organic vegetables and agricultural practices, highlighting the importance of good practices for the promotion of safe food. These data are fundamental for the development of microbiological risk assessment models and prevention of foodborne outbreaks.

Keywords: Organic Vegetables, *Enterobacteriaceae*, *Salmonella* spp., *Bacillus thuringiensis*, Biological Control Agents

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Possíveis vias de contaminação de alface (*lactuca sativa* L.) por enteropatógenos na cadeia produtiva e distribuição **34**

FIGURA 2. Diferenciação entre *B. cereus* (A) e *B. thuringiensis* (B) por microscopia de fase contraste baseado na presença de cristais proteicos (*parasporal crystal*) em cepas de *Bt* durante a esporulação **38**

FIGURA 3. Coleta de amostras de alface nos canteiros de cultivo (A), de água de irrigação (B), de alface lavada e água dos tanques de lavagem (C) e de fertilizante orgânico (D). **42**

FIGURA 4. Espécies identificadas por MALDI-TOF MS (*score* ≥ 2.0) com ocorrência superior a 10% em amostras da cadeia produtiva de hortaliças orgânicas **58**

FIGURA 5. Multiplicação de *Salmonella* Thompson (A), *Salmonella* Typhimurium (B), *Salmonella* Typhimurium *monophasic* (C), *Salmonella* Enteritidis (D), *Salmonella* Montevideo (E) e S*almonella* Senftemberg (F) em BHI a 4 ºC, 7 ºC e 12 ºC **63**

FIGURA 6. Comportamento de *Bacillus cereus* presuntivo e S*almonella* no pré-colheita de espinafre. **64**

FIGURA 7. Multiplicação de *Salmonella* Montevideo e *Bacillus thuringiensis* subsp. Aizawai, separadamente e em co-cultura, em BHI a 12 ºC (A) e 22 ºC (B) **65**

FIGURA 8. Contagens de *Bacillus cereus* presuntivos e *Salmonella* spp. em folhas de espinafre. **68**

FIGURA 9. Contagens de *Bacillus cereus* presuntivos em hortaliças minimamente processadas **69**

FIGURA 10. Multiplicação de *Pseudomonas chlororaphis* e *Bacillus thuringiensis* subsp. Aizawai em caldo BHI a 12 ºC (A) e 22 ºC (B) **70**

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Surtos causados pelo consumo de folhas verdes e brotos contaminados por *Escherichia coli* patogênica e *Salmonella* spp. nos Estados Unidos e Canadá **29**

TABELA 2. Tipos e quantidades das amostras coletadas nas propriedades agrícolas **41**

TABELA 3. Cepas de *Salmonella enterica* e *Bacillus cereus lato sensu* utilizadas nos experimentos .. **46**

TABELA 4. Práticas agrícolas observadas nas propriedades visitadas **52**

TABELA 5. Contagens (log UFC/g ou ml) de *Enterobacteriaceae* (média ± DP)..... **54**

TABELA 6. Coliformes totais e *Escherichia coli* nas amostras de água de irrigação e de lavagem de hortaliças orgânicas (média ± DP (NMP/100 mL))..... **59**

LISTA DE ABREVIATURAS

AOAC – AOAC Internacional: Associação de Comunidades Analíticas (do inglês *AOAC International: Association of Analytical Communities*)

APHA - Associação Americana de Saúde Pública (do inglês *American Public Health Association*)

BCA - Agente de controle biológico (do inglês *Biological Control Agents*)

BHI - Caldo Cérebro Coração (do inglês *Brain Heart Infusion*)

BPA - Boas Práticas Agrícolas

BPH - Boas Práticas de Higiene

BPW - Água peptonada tamponada (do inglês *Buffered Peptone Water)*

BRA - Bactérias resistentes a antibióticos

Bt - Bacillus thuringiensis

CDC - Centro de Controle de Doenças do Estados Unidos (do inglês *Centers for Disease Control and Prevention*)

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

DEC - *Escherichia coli* Diarreiogênicas (do inglês *Diarrheagenic Escherichia coli*)

DP - Desvio Padrão

DTA - Doenças Transmitidas por Alimentos

EFSA - Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (do inglês *European Food Safety Authority*)

ESBL - β-Lactamase de Espectro estendido

EUA - Estados Unidos da América

FAO - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*)

FDA - *Food and Drugs Administration*

ha - *hectare*

HE - Ágar Hektoen Entérico (do inglês *Hektoen Enteric Agar*)

IFOAM - Federação Internacional dos Movimentos da Agricultura Orgânica (do inglês *International Federation of Organic Agriculture Movements: IFOAM - Organics International*)

ISO - Organização Internacional para Padronização (do inglês *International Organization for Standardization*)

LIA - Ágar Lisina Ferro (do inglês *Lysine Iron Agar*)

MALDI-TOF - Ionização Dessorção a Laser Assistida por Matriz – Tempo de Vôo (do inglês *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time-of-Flight*)

MS - Espectrometria de Massas (do inglês *Mass Spectrometry*)

MYP - Ágar Manitol-Gema de ovo-Polimixina (do inglês *Mannitol Yolk Polymyxin Agar*)

n - Número de amostras analisadas

NA - Ágar Nutriente (do inglês *Nutrient Agar*)

NMP - Número Mais Provável

OMS - Organização Mundial de Saúde (do inglês *World Health Organization* – WHO)

ONPG - Ortho-Nitrophenyl-β-galactoside

PHAC - Agência de Saúde Pública do Canadá (do inglês *Public Health Agency of Canada*)

RV - Caldo *Rappaport-Vassiliadis*

SSP - Solução Salina de Peptona

SHU - Síndrome Hemolítico-Urêmica

TSA - Ágar Triptona de Soja (do inglês *Tryptone Soya Agar*)

TSI - Ágar Tríplice Açúcar Ferro (do inglês *Triple Sugar Iron Agar*)

TT - Caldo Tetrationato (do inglês *Tetrathionate Broth)*

UFC - Unidades Formadoras de Colônias

USD - Dólar dos Estados Unidos (do inglês *United States Dollar*)

VRBG - Ágar Vermelho Violeta Bile com Glicose (do inglês *Violet Red Bile Glucose Agar*)

XLD - Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (do inglês *Xylose Lysine Deoxycholate Agar*)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO **21**

2. OBJETIVOS **23**

2.1. OBJETIVOS GERAIS 23
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 23

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **25**

3.1. O MERCADO DE ALIMENTOS ORGÂNICOS 25
3.2. SEGURANÇA MICROBIOLÓGICA DE HORTALIÇAS 27
3.3. CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE HORTALIÇAS DURANTE O CULTIVO NO CAMPO 33
3.4. *BACILLUS THURINGIENSIS* COMO AGENTE DE CONTROLE BIOLÓGICO E SUA RELAÇÃO COM A SEGURANÇA DAS HORTALIÇAS ORGÂNICAS 37

4. MATERIAL E MÉTODOS **41**

4.1. PRÁTICAS ADOTADAS NAS PROPRIEDADES DE CULTIVO ORGÂNICO E AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO MATERIAL COLETADO 41
4.1.1. Coleta das amostras 41
4.1.2. Enumeração e identificação de Enterobacteriaceae 42
4.1.3. Pesquisa e enumeração de coliformes totais e Escherichia coli em água 43
4.1.4. Pesquisa de Salmonella spp 44
4.1.4.1. Método convencional 44
4.1.4.2. Método molecular (*real-time* PCR) 45
4.2. AVALIAÇÃO DA PERSISTÊNCIA DE *BACILLUS THURINGIENSIS* E POSSÍVEIS INTERAÇÕES COM BACTÉRIAS EPIFÍTICAS E *SALMONELLA* SPP. NO PRÉ E PÓS-COLHEITA DE HORTALIÇAS 45
4.2.1. Cepas utilizadas e preparo dos inóculos *45*
4.2.2. Multiplicação das cepas de Salmonella enterica em BHI a 4 ºC, 7 ºC e 12 ºC *46*
4.2.3. Sobrevivência e interações de Salmonella e Bacillus cereus presuntivos (incluindo Bacillus thuringiensis) em espinafre *47*
4.2.3.1. Cultivo do espinafre 47
4.2.3.2. Tratamento das mudas de espinafre com *Bt* e *Salmonella* Montevideo 47
4.2.3.3. Avaliação da persistência de *B. thuringiensis* subsp. Aizawai e *Salmonella* Montevideo no pré-colheita de espinafre 48
4.2.3.4. Sobrevivência de *Bacillus* e *Salmonella* no pós-colheita de espinafre minimamente processado, experimentalmente contaminado, durante armazenamento a 12 ºC 48
4.3. AVALIAÇÃO DAS INTERAÇÕES ENTRE BACTÉRIAS EPIFÍTICAS, *SALMONELLA* E BACTÉRIAS DO GRUPO *BACILLUS CEREUS IN VITRO* 49
4.3.1. Enumeração Bacillus cereus presuntivo e isolamento de bactérias epifíticas de hortaliças *49*
4.3.2. Identificação de bactérias epifíticas com atividade inibitória contra Salmonella spp. e bactérias do grupo Bacillus cereus *50*
4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA 50

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO **51**

5.1. PRÁTICAS ADOTADAS NAS PROPRIEDADES DE CULTIVO ORGÂNICO E AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO MATERIAL COLETADO 51
5.1.1. Enumeração de Enterobacteriaceae *54*
5.1.2. Identificação das espécies bacterianas por MALDI-TOF MS *55*
5.1.3. Enumeração de coliformes totais e Escherichia coli na água de irrigação e na água dos tanques de lavagem das hortaliças *59*
5.1.4. Pesquisa de Salmonella spp. *60*
5.2. AVALIAÇÃO DA PERSISTÊNCIA DE *BACILLUS THURINGIENSIS* E POSSÍVEIS INTERAÇÕES COM BACTÉRIAS EPIFÍTICAS E *SALMONELLA* SPP. NO PRÉ E PÓS-COLHEITA DE HORTALIÇAS 62
5.2.1. Multiplicação das cepas de Salmonella enterica em BHI a 4 ºC, 7 ºC e 12 ºC *62*
5.2.2. Sobrevivência e interações de Salmonella e Bacillus cereus presuntivo (incluindo Bacillus thuringiensis) em espinafre *63*
5.2.3. Identificação de bactérias epifíticas com atividade inibitória contra Salmonella spp. e bactérias do grupo Bacillus cereus *69*

6. CONCLUSÕES **71**

1. INTRODUÇÃO

A ingestão diária de frutas e hortaliças é incentivada pelas agências governamentais e profissionais de saúde em todo o mundo, tendo em vista os benefícios de uma dieta saudável e rica em vegetais para a diminuição do risco de doenças crônicas e promoção da qualidade de vida (CEUPPENS et al., 2014; KIM et al., 2016). Este incentivo alavancou o consumo destes alimentos no Brasil e em diversos outros países ao longo das últimas décadas, desencadeando o fortalecimento/surgimento de novas tendências alimentares, como a busca por hortaliças e frutas orgânicas.

Em paralelo ao aumento na demanda por hortaliças, casos de surtos alimentares causados pelo consumo de vegetais crus têm sido reportados em diversos países nos últimos anos. Além disso, por serem consumidas frequentemente *in natura*, hortaliças são considerados alimentos de elevado risco microbiológico (OSAILI et al., 2018). Na Europa, entre 2007 e 2011, folhas verdes consumidas *in natura* foram o principal alimento associado à doenças transmitidas por alimentos (DTA), sendo *Salmonella* spp. o agente etiológico mais frequente (FRÖHLING et al., 2018). *Salmonella* spp. é o principal causador de DTA no mundo (ZWEIFEL; STEPHAN, 2012) e sua ocorrência em folhas verdes, mesmo em populações baixas, tem sido amplamente relatada na literatura (OLIVEIRA et al., 2011; CEUPPENS et al., 2014; DE QUADROS RODRIGUES et al., 2014; DENIS et al., 2016; NI et al., 2018; MAFFEI et al., 2019).

Os vegetais estão sujeitos à contaminação microbiológica em todas as etapas da produção no campo, assim como na pós-colheita, distribuição, comercialização e preparo para o consumo. Esta contaminação pode ser decorrente do contato do vegetal com solo, fezes de animais, água não tratada, fertilizantes à base de esterco, manipuladores ou por exposição a condições inadequadas de higiene (OLIVEIRA et al., 2010; MISHRA et al., 2017). Embora não seja consenso científico, alguns autores sugerem que certas práticas do cultivo orgânico, como o uso de fertilizantes formulados à base de resíduos animais, podem propiciar uma contaminação microbiológica superior à encontrada em vegetais produzidos no sistema convencional (OLIVEIRA et al., 2010; MAFFEI; SILVEIRA; CATANOZI, 2013; CEUPPENS et al., 2014)

A literatura científica sobre segurança microbiológica de hortaliças orgânicas produzidas no Brasil é bastante limitada, restringindo-se a avaliações das condições higiênico-sanitárias de produtos coletados no campo e no comércio (GOMES NETO et al., 2012; MAFFEI; SILVEIRA; CATANOZI, 2013; BRANDÃO et al., 2014; MACHADO et al., 2018; MERLINI et al., 2018; MAFFEI et al., 2019). Entender o impacto das práticas agrícolas na segurança microbiológica de hortaliças, bem como as possíveis vias de transmissão destes micro-organismos é uma etapa fundamental para a tomada de decisões ligadas à promoção do alimento seguro. A principal forma de garantir a segurança microbiológica na cadeia produtiva de hortaliças ainda é através da implementação de Boas Práticas Agrícolas (BPA) no campo, seguidas de Boas Práticas de Higiene (BPH) nas etapas de processamento

e comercialização, assim como nas residências (DE QUADROS RODRIGUES et al., 2014; MAFFEI et al., 2016). No entanto, outras ferramentas como o uso das interações da microbiota epifítica para controlar a adesão, sobrevivência e multiplicação de patógenos na superfície das hortaliças, podem ser mais bem exploradas e empregadas como estratégia para a garantia de sua segurança.

Tendo em vista as restrições ao uso de fertilizantes e pesticidas sintéticos no sistema orgânico de produção de vegetais, outras medidas de controle fitopatogênico são necessárias para a garantia de uma produção rentável. Embora ainda não seja amplamente empregado no Brasil, o uso de agentes de controle biológico (BCA, do inglês *Biological Control Agent*), constituído de culturas microbianas protetoras, é utilizado para o controle de pragas agrícolas em diversos países (SUNDH; GOETTEL, 2013). *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) é um dos principais BCA utilizados no mundo (LACEY et al., 2015), apresentando alta eficácia no controle de pragas devido à capacidade de produzir várias proteínas com atividade pesticida durante a esporulação (RASIGADE; HOLLANDT; WIRTH, 2018; ZHENG et al., 2018). Ao serem ingeridas, estas proteínas são ativadas e causam danos intestinais e morte de larvas de insetos (FUENTEALBA et al., 2019). Embora *Bt* seja considerado seguro para os consumidores, as cepas podem conter genes responsáveis pela produção de enterotoxinas causadoras de diarreia em humanos (EFSA, 2016).

Os micro-organismos pertencentes ao grupo *Bacillus* apresentam características genéticas, fenotípicas e ecológicas similares, dificultando a distinção das espécies pelos métodos analíticos tradicionais (FIRA et al., 2018; RASIGADE; HOLLANDT; WIRTH, 2018), o que sugere que o número de surtos causados por este BCA pode estar subestimado (ROSENQUIST et al., 2005; FUENTEALBA et al., 2019). Considerando o potencial de cepas de *Bt* produzirem enterotoxinas e a dificuldade de distingui-las de *B. cereus*, estudos de avaliação de risco da presença de *Bt* em hortaliças são necessários e para isso é fundamental entender seu comportamento (sobrevivência, multiplicação e morte) nas hortaliças e sua interação com as bactérias epifíticas e patogênicas nas etapas pré e pós-colheita.

Práticas ou métodos para o controle e inativação da microbiota patogênica humana em vegetais são de extrema importância para o setor agrícola e para a saúde pública. Porém, ainda pouco se sabe sobre possíveis interações entre *Bt* ou outros BCA e patógenos associados a surtos alimentares em plantas e estes dados são extremamente importantes para esclarecer o papel dos BCA na segurança de hortaliças.

Frente às questões apresentadas, nota-se a necessidade de conhecer melhor a realidade da agricultura orgânica brasileira, buscando entender as possíveis vias de contaminação microbiológica e estimar o impacto das práticas de cultivo orgânico na segurança das hortaliças. Além disso, a avaliação do efeito de práticas agrícolas passíveis de serem agregadas ao sistema orgânico de produção, como o uso do BCA, pode contribuir para o desenvolvimento deste setor, bem como subsidiar a elaboração de modelos de avaliação de risco microbiológico e posterior tomada de decisões por órgãos competentes.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Os objetivos principais desse trabalho foram levantar dados microbiológicos da cadeia de produção de hortaliças orgânicas no Estado de São Paulo, avaliar a ocorrência de *Salmonella* spp. em pontos críticos desta cadeia e o efeito do uso de agentes de controle biológico, e contribuir com dados para o desenvolvimento de avaliações quantitativas de risco microbiológico associado ao consumo de hortaliças orgânicas.

2.2. Objetivos específicos

- Conhecer melhor as práticas adotadas na agricultura orgânica do Estado de São Paulo, verificando seu impacto na qualidade e segurança microbiológica das hortaliças produzidas;
- Determinar a ocorrência de *Salmonella* spp. e as populações de *Enterobacteriaceae* em amostras de fertilizantes, hortaliças, água de irrigação e dos tanques de lavagem, coletadas em algumas propriedades certificadas de produção orgânica no Estado de São Paulo;
- Identificar os isolados de *Enterobacteriaceae* obtidos das amostras estudadas;
- Avaliar a persistência de *Bacillus thuringiensis* e *Salmonella* spp. nas hortaliças nas etapas de pré e pós-colheita;
- Determinar possíveis interações entre *Bacillus thuringiensis*, *Salmonella* spp. e bactérias epifíticas isoladas de hortaliças folhosas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. O mercado de alimentos orgânicos

O *boom* populacional iniciado na década de 1940, após a segunda guerra mundial, gerou um aumento na demanda de alimentos, desencadeando mudanças nas formas de produção. A agricultura tradicionalmente isenta de agroquímicos migrou para aquela que emprega novas tecnologias e pesticidas ou fertilizantes químicos sintéticos, visando o aumento da produtividade em um menor tempo de cultivo e melhora da resistência da produção à fatores ambientais, caracterizando então a chamada revolução verde (RANA; PAUL, 2017; CANDIOTTO, 2018).

Embora as pesquisas não sejam conclusivas, o consumo de vegetais produzidos na agricultura convencional passou a ser associado a riscos mais elevados de incidência de doenças crônico-degenerativas, devido ao uso indiscriminado de agroquímicos, resultando em teores residuais acima dos permitidos pela legislação (RANA; PAUL, 2017; ZHANG; YANG, 2017). Além disso, questões ambientais, como degradação do solo, desmatamento desenfreado e contaminação de rios, também são problemas associados a este sistema de cultivo (ROBAČER et al., 2016). Deste modo, métodos alternativos de produção de vegetais, como a agricultura orgânica, vêm ganhando mais força desde então.

O conceito de agricultura orgânica surgiu entre as décadas de 1970 e 1980 como uma consequência do crescimento das preocupações com a conservação ambiental e a saúde da população, associadas ao sistema agroalimentar convencional (SEUFERT; RAMANKUTTY; MAYERHOFER, 2017). A agricultura orgânica é um sistema social e sustentável de produção de alimentos, desenvolvido com base no uso de recursos renováveis. Este sistema de produção visa promover a conservação do planeta, através da manutenção da qualidade da água e da saúde do solo, plantas, animais e humanos. Para isto, são utilizadas técnicas que permitem a manutenção, recuperação, melhoria e harmonia da biodiversidade ecológica, com o uso mínimo de insumos não agrícolas e sintéticos (ISHIMURA, 2004; USDA, 2018). Fertilizantes à base de esterco compostado, controle biológico de pragas, rotação de culturas e cobertura viva do solo com resíduo vegetal ou mesmo plantas alimentícias não convencionais são algumas das práticas empregadas (ROBAČER et al., 2016; USDA, 2018).

Na Assembleia Geral das Nações Unidas de 2015, como parte da agenda 2030, líderes mundiais assinaram o compromisso de 17 metas globais, intituladas “Objetivos de Desenvolvimento Sustentável”. A agricultura orgânica é um sistema sustentável de produção de alimentos que está em concordância com estas metas, com destaque para duas delas, a número 2 – Combate à fome e a 12 – Produção e consumo responsáveis (WILLER; LERNOUD, 2019). Além disso, ao menos em tese, a agricultura orgânica promove o desenvolvimento social nas zonas rurais, através da geração de renda pela agricultura familiar, o que vem sendo estimulado pelo Ministério do Desenvolvimento Agrário

brasileiro desde 2003 (BLANC; KLEDAL, 2012). Estudos realizados em países desenvolvidos mostram que a agricultura orgânica tem papel importante na conservação do ambiente, manutenção de paisagens culturais, desenvolvimento de renda para a agricultura familiar e movimentação da economia rural. No entanto, alguns autores já chamam a atenção para a crescente participação das cadeias de varejo e políticas mercantis do agronegócio neste setor, uma vez que a concentração de terras e maior acesso a tecnologias que contribuam para a produtividade, cenário contrário à realidade do pequeno produtor, podem afetar a manutenção da agricultura familiar, e consequentemente o pilar social da agricultura orgânica (BLANC, 2009).

A agricultura orgânica é regida por um processo de certificação que assegura ao consumidor a legitimidade de uma produção de acordo com normas legais internacionais, ou aquelas estabelecidas pelo país (FAO; WHO, 2007). No Brasil, a certificação é realizada por empresas certificadoras privadas, contratadas pelos próprios agricultores, que desenvolvem atividades de consultoria e auditoria para adequação e fiscalização das práticas agrícolas adotadas nas propriedades. Embora as agências certificadoras sejam uma segurança ao consumidor sobre a legitimidade do produto, alguns críticos questionam o possível conflito de interesse por parte das empresas, uma vez que vetar a comercialização do produto pode custar a perda de um cliente.

Padrões internacionais para a produção de alimentos orgânicos, como os do *Codex Alimentarius* (FAO; WHO, 2007) e as normas da Federação Internacional dos Movimentos da Agricultura Orgânica (IFOAM, 2017), são norteadores das regulamentações nacionais, que facilitam a padronização das normas para a produção de orgânicos a nível mundial, fator essencial para o bom andamento das transações comerciais. Além disso, cada país pode desenvolver regulamentações próprias para assegurar práticas corretas de produção, comercialização e rotulagem. A primeira regulamentação de orgânicos surgiu nos Estados Unidos na década de 1970, enquanto a União Europeia estabeleceu parâmetros conjuntos para os países membros apenas em 1991. Atualmente, muitos países em desenvolvimento também contam com regimentos específicos para este setor agrícola (SEUFERT; RAMANKUTTY; MAYERHOFER, 2017).

No Brasil, o sistema orgânico de produção agropecuária e comercialização é regulamentado pela Lei nº 10.831, de 23 de dezembro de 2003 (BRASIL, 2003) e pelo Decreto nº 6.323, de 27 de dezembro de 2007 (BRASIL, 2007). Embora a instauração de políticas públicas tenha sido importante para o fortalecimento da agricultura orgânica e da agroecologia no Brasil, a falta de investimentos no setor, frente ao recebido pela agricultura convencional – carro chefe do agronegócio brasileiro -, resulta no encarecimento da produção e em dificuldades para a manutenção dos produtores no setor (CANDIOTTO, 2018). No entanto, mesmo com preços superiores aos dos alimentos convencionais, os produtos orgânicos têm grande aceitação pelo consumidor moderno, por serem considerados mais saudáveis, serem produzidos de forma ambientalmente correta e valorizarem a mão de obra local (RANA; PAUL, 2017).

Ainda que represente apenas 1% da área mundial cultivada, a agricultura orgânica vem se destacando como um dos setores do agronegócio que cresce de forma mais acelerada em todo o panorama mundial (SEUFERT; RAMANKUTTY; MAYERHOFER, 2017). Segundo Willer e Lernoud, (2019), a área mundial de cultivo orgânico passou de 11 milhões ha em 1999 para 69,8 milhões de ha em 2017, um crescimento de aproximadamente 535%. A Oceania detém a maior área destinada à produção de orgânicos do mundo (35,9 milhões ha), seguida pela Europa (14,6 milhões ha), América Latina (8 milhões ha), Ásia (6,1 milhões ha), América do Norte (3,2 milhões ha) e África (2,1 milhões ha). A Austrália foi o país com maior área destinada ao cultivo de alimentos orgânicos em 2017, cerca de 35,6 milhões ha, seguida pela Argentina (3,4 milhões ha) e a China (3,0 milhões ha).

Em 2017, a agricultura orgânica mundial envolveu 2,9 milhões de produtores em 181 países, movimentando uma receita de USD 97 bilhões, que corresponde a um aumento de USD 15,5 bilhões em relação a 2015. Dentre os principais arrecadadores no mercado orgânico mundial em 2017, destacam-se os Estados Unidos, com uma receita de USD 45,2 bilhões, a Alemanha (USD 11,3 bilhões) e a França (USD 8,9 bilhões). Na América Latina, cerca de 460 mil produtores certificados atuaram na produção de orgânicos, ocupando uma área de 8 milhões de ha - o equivalente a 11% da área orgânica mundial e 1,1% da área agrícola do continente. Os países da América Latina com maior área de cultivo orgânico em 2017 foram Argentina (3,4 milhões ha), Uruguai (1,9 milhões ha) e Brasil (1,1 milhões ha) (WILLER; LERNOUD, 2019).

Os alimentos orgânicos vêm ganhando cada vez mais espaço no mercado global e representam um segmento com forte potencial de crescimento contínuo para os próximos anos por serem considerados não apenas uma escolha alimentar, mas também um estilo de vida. Este crescente aumento na busca pelos orgânicos ressalta a importância do desenvolvimento e da implementação de medidas de gestão da qualidade que garantam a produção de alimentos seguros em todas as instâncias da cadeia produtiva, respeitando seu caráter social, ambiental e de saúde.

3.2. Segurança microbiológica de hortaliças

Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde – OMS (WHO, 2016), cerca de 600 milhões de pessoas no mundo são vítimas de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), anualmente. Este problema de saúde pública chega a matar 420 mil pessoas por ano no planeta, dos quais quase um terço (aproximadamente 125 mil) são crianças com idade inferior a cinco anos. Em relação aos países europeus, mais de 23 milhões de pessoas adoecem anualmente após consumir alimentos contaminados, resultando em cerca de 5 mil mortes todos os anos (WHO, 2017). No Brasil, entre 2000 e 2018, foram registrados cerca de 13 mil surtos de origem alimentar, totalizando uma exposição de 2,4 milhões de brasileiros, com 247,5 mil doentes e 195 mortes. Destes surtos, 142 foram associados ao consumo de hortaliças (BRASIL, 2018). Acredita-se que este número seja mais elevado,

tendo em vista que as notificações não fazem parte da cultura do brasileiro e que o alimento veiculador ou o micro-organismo responsável não foi identificado em quase metade (46,82%) dos surtos de DTA registrados no país.

O consumo de vegetais é incentivado por agências governamentais e profissionais de saúde em todo o mundo devido as suas propriedades nutricionais e funcionais, como elevado teor de fibras, vitaminas e compostos antioxidantes. Estas características classificam os vegetais como alimentos prioritários na busca de melhor qualidade de vida. No entanto, casos de surtos ocasionados pelo consumo de vegetais crus, como hortaliças folhosas e brotos, têm sido registrados em diversos países nos últimos anos (RODRIGUES; SALAY, 2012; DRISSNER; ZUERCHER, 2014; DE OLIVEIRA ELIAS; NORONHA; TONDO, 2019).

Entre 1996 e 2010, cerca de 23% dos surtos de origem alimentar nos Estados Unidos foram associados ao consumo de vegetais. Brotos e folhas verdes foram os principais alimentos envolvidos nestes casos, causados principalmente por *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes* (JUNG; JANG; MATTHEWS, 2014). A tabela 1 apresenta os surtos alimentares causados pelo consumo de hortaliças folhosas e brotos contaminadas com *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* O157:H7 nos Estados Unidos (2006 – 2019) e Canadá (2014 – 2019), de acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) e a Agência de Saúde Pública do Canadá (PHAC), respectivamente.

O sequenciamento genômico das cepas de *Escherichia coli* O157:H7 isoladas nos surtos do Canadá (Cód. 2, 4 e 6 da Tabela 1) indicou similaridade genética com os isolados dos surtos americanos registrados no mesmo período (Cód. 1, 3 e 5 da Tabela 1), sugerindo que os surtos 1 e 2; 3 e 4; e 5 e 6, respectivamente, apresentaram a mesma fonte de contaminação. Além disso, as cepas de *E. coli* isoladas dos pacientes envolvidos nos surtos 1 e 2 de 2018 também apresentaram similaridade genética com os isolados dos surtos 5 e 6 de 2017.

A identificação das fontes e rotas causadoras dos surtos nos Estados Unidos e Canadá foram baseadas em evidências epidemiológicas, laboratoriais e de rastreamento. Cepas geneticamente idênticas às causadoras dos surtos 1 - 4 e 18 foram isoladas de amostras de água em diferentes locais das fazendas produtoras, indicando assim, a fonte da contaminação. Com base no mesmo princípio de identificação, sementes contaminadas antes do plantio foram apontadas como a fonte provável das cepas de *E. coli* e *Salmonella* envolvidas nos surtos 10, 15 e 20 descritos na Tabela 1. Embora as empresas fornecedoras dos produtos envolvidos nos surtos 8, 9, 11 - 14, 16, 17, 19 e 21 sejam conhecidas, as vias de contaminação não foram identificadas ou divulgadas. Nos surtos 5 - 7 (Tabela 1), as fontes de contaminação não foram identificadas.

A ocorrência de surtos evidencia a importância da rastreabilidade e do controle integrado de toda a cadeia produtiva, tendo em vista que a microbiota presente nas hortaliças está relacionada com a existente no ambiente de produção. Além disso, o cultivo próximo ao solo facilita o acesso de micro-

organismos patogênicos e/ou deteriorantes presentes no ambiente (JOHANNESSEN; LONCAREVIC; KRUSE, 2002).

Tabela 1. Surtos causados pelo consumo de folhas verdes e brotos contaminados por *Escherichia coli* patogênica e *Salmonella* spp. nos Estados Unidos e Canadá

Cód.	Período	País	Agente causador	Alimento veiculador	Nº de casos	Nº de hospitalizações	Nº de mortes	Referência
1	Out -dez / 2018	EUA	*Escherichia coli* O157:H7	Alface romana	62	25 (2 casos de SHU*)	0	(CDC, 2019)
2	Out -Nov / 2018	Canadá	*Escherichia coli* O157:H7	Alface romana	29	10 (2 casos de SHU*)	0	(PHAC, 2019)
3	Mar - Jun / 2018	EUA	*Escherichia coli* O157:H7	Alface romana	210	96 (27 casos de SHU*)	5	(CDC, 2018a)
4	Mar - Abr / 2018	Canadá	*Escherichia coli* O157:H7	Alface romana	8	1	0	(PHAC, 2018a)
5	Nov - Dez / 2017	EUA	*Escherichia coli* O157:H7	Folhas verdes	25	9 (2 casos de SHU*)	1	(CDC, 2018b)
6	Nov - Dez / 2018	Canadá	*Escherichia coli* O157:H7	Alface romana	42	17	1	(PHAC, 2018b)
7	Dez/2017 - Jan/2018	EUA	*Salmonella* Montevideo	Brotos crus	10	0	0	(CDC, 2018c)
8	Mai - Set / 2016	EUA	*Salmonella* Reading e *Salmonella* Abony	Brotos de alfafa	36	7	0	(CDC, 2016a)
9	Jan - Fev / 2016	EUA	*Escherichia coli* O157	Brotos de alfafa	11	2	0	(CDC, 2016b)
10	Nov/2015 - Abr/2016	EUA	*Salmonella* Muenchen e *Salmonella* Kentucky	Brotos de alfafa	26	8	0	(CDC, 2016c)
11	Mai/2014	EUA	*Escherichia coli* O121	Brotos de trevo	19	8	0	(CDC, 2014)

12	Set/2014 - Dez/2014	EUA	*Salmonella* Enteritidis	Brotos de feijão	115	28	0	(CDC, 2015)
13	Out - Nov / 2013	EUA	*Escherichia coli* O157:H7	Saladas prontas para o consumo (com frango)	33	7	0	(CDC, 2013)
14	Out - Nov / 2012	EUA	*Escherichia coli* O157:H7	Espinafre orgânico e salada primavera	33	0	13	(CDC, 2012a)
15	Dez/2011 - Mar/2012	EUA	*Escherichia coli* O26	Brotos crus de trevo	29	7	0	(CDC, 2012b)
16	Out - Nov / 2011	EUA	*Escherichia coli* O157:H7	Alface romana	58	33 (3 casos de SHU*)	0	(CDC, 2012c)
17	Abr - Jun / 2011	EUA	*Salmonella* Enteritidis	Brotos de alfafa e brotos picantes	25	3	0	(CDC, 2011a)
18	Nov/2010 - Fev/2011	EUA	*Salmonella* I 4,[5],12:i:	Brotos de alfafa	140	33	0	(CDC, 2011b)
19	Mar - Jun / 2010	EUA	*Salmonella* Newport	Brotos de alfafa	44	7	0	(CDC, 2010)
20	Fev - Mai / 2009	EUA	*Salmonella* Saintpaul	Brotos de alfafa	235	7	0	(CDC, 2009)
21	Ago - Set / 2006	EUA	*Escherichia coli* O157:H7	Espinafre	199	102 (31 casos de SHU*)	3	(CDC, 2006)

*SHU: Síndrome Hemolítico-Urêmica

Enterobacteriaceae é uma família de bactérias Gram-negativas, anaeróbias facultativas, não formadoras de esporos, que inclui espécies patogênicas e deteriorantes importantes para a segurança e qualidade dos alimentos (TAKAHASHI et al., 2017; OSAILI et al., 2018). Comumente presente em humanos e animais, estas bactérias colonizam o ambiente e a quantidade nas hortaliças pode aumentar quando se emprega fertilizantes orgânicos e/ou água de irrigação não tratada (BEN SAID et al., 2015; VAN HOEK et al., 2015). Em função do uso indiscriminado de antimicrobianos na produção primária,

algumas espécies pertencentes à família *Enterobacteriaceae* podem apresentar resistência a estas drogas (OSAILI et al., 2018; ALONSO et al., 2019).

Osaili et al. (2018) observaram uma contagem média de 6,73 ± 0,26 log UFC/g de *Enterobacteriaceae* em alfaces da variedade americana, adquiridas em mercado local na Jordânia. Dentre as espécies identificadas, *Klebsiella pneumonia* (43,33%), *Enterobacter cloacae* (36,67%) e *Klebsiella oxytoca* (10,00%) foram as mais frequentes. Ssemanda et al. (2017) também pesquisaram *Enterobacteriaceae* em alfaces coletadas no campo e em pontos de comercialização, em Ruanda. Populações médias de 5,55 ± 0,96 log UFC/g foram encontradas em amostras coletadas nas fazendas, enquanto 6,81 ± 0,65 log UFC/g foi a população média obtida nas alfaces coletadas em mercados. Contagens mais elevadas em amostras do mercado em relação às obtidas nas fazendas, observada pelos pesquisadores também em outros vegetais (cenouras, pepinos e tomates), indicam que condições inadequadas pós-colheita aumentam as contagens microbianas no alimento.

A família *Enterobacteriaceae* inclui alguns patógenos de interesse para a segurança dos alimentos, como *Salmonella* spp., um dos principais agentes etiológicos de surtos alimentares no Brasil e no mundo (BRASIL, 2018; FRÖHLING et al., 2018; WHO, 2017) e frequentemente relatado como um contaminante de hortaliças (OLIVEIRA et al., 2011; CEUPPENS et al., 2014; DE QUADROS RODRIGUES et al., 2014; DENIS et al., 2016; NI et al., 2018). O gênero *Salmonella* é constituído por duas espécies, *S. bongori* e *S. enterica* (LAMAS et al., 2018), com mais de 2600 sorotipos identificados (PULIDO-LANDÍNEZ, 2019). A espécie *S. enterica* apresenta seis subespécies, sendo *S. enterica* subsp. Enterica a principal responsável pelos casos de DTA (LAMAS et al., 2018).

Salmonella spp. possui uma grande variedade de hospedeiros, como bovinos, suínos e aves (PULIDO-LANDÍNEZ, 2019), dos quais os dejetos são utilizados como base para a formulação de fertilizantes empregados na produção vegetal. Além disso, é capaz de sobreviver em alimentos com baixa atividade de água, o que inclusive, tem sido relatado como um fator que acentua a resistência térmica do patógeno (PRESTES et al., 2019). Cepas resistentes a antibióticos têm gerado preocupação mundial e aumentado os riscos à saúde pública. Segundo Monte et al. (2019), elementos genéticos móveis são, provavelmente, a chave para a propagação de clones resistentes de *Salmonella*, tendo em vista a sua capacidade de adquirir resistência por transferência vertical ou horizontal ao longo de toda a cadeia produtiva.

A legislação brasileira para padrões microbiológicos em alimentos, RDC Nº 12, de 02 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001), determina que *Salmonella* spp. deve estar ausente em 25 g de hortaliças *in natura*. No entanto, quando presente, a população é baixa, o que dificulta a detecção do patógeno. Na China, Ni et al. (2018) relataram *S.* Enteritidis em duas (4,2%) amostras de vegetais (alface e pepino) comercializados em Xangai, entre março de 2016 e fevereiro de 2017. Denis et al. (2016) investigaram a ocorrência de *Salmonella* spp. em hortaliças folhosas comercializadas em grandes redes de supermercado do Canadá entre os anos de 2009 e 2013, observando que apenas duas

amostras (0,02%) das 11.400 analisadas foram positivas. Marine et al. (2015) observaram *Salmonella* spp. em 2,2% das amostras de vegetais folhosos coletados em fazendas da região do médio atlântico dos Estados Unidos. Oliveira et al. (2010) não detectaram *Salmonella* spp. em 144 amostras de alface orgânica e convencionais cultivas em 36 fazendas na Espanha.

No Brasil, Maffei et al. (2019) detectaram DNA de *Salmonella* em apenas duas amostras de alface orgânica (1%) coletadas em campos de produção no estado de São Paulo. No estudo de Ceuppens et al. (2014), *Salmonella* spp. foi positiva em apenas uma amostra de alface orgânica (2,2%) coletada diretamente nos campos de produção no Rio Grande do Sul. Oliveira et al. (2011) pesquisaram *Salmonella* spp. em hortaliças minimamente processadas adquiridas em pontos de comercialização da cidade de Ribeirão Preto - SP, identificando duas amostras de chicória (1,2%) positivas para *S*. Madelia e *S*. Londres.

Embora não haja consenso, alguns estudos sugerem que a carga microbiana e a incidência de patógenos nas hortaliças orgânicas podem ser superiores àquelas detectas em hortaliças produzidas pelo sistema convencional (GOMES NETO et al., 2012; MAFFEI; SILVEIRA; CATANOZI, 2013; CEUPPENS et al., 2014). Oliveira et al. (2010) compararam a qualidade microbiológica de 72 amostras de alface produzidas pelos sistemas de cultivo orgânico e convencional, na Espanha, observando que as hortaliças orgânicas apresentaram contagens de *Enterobacteriaceae* superiores (5,16 ± 1,01 log UFC/g) às encontradas nas hortaliças convencionais (3,80 ± 1,53 log UFC/g). Além disso, o número de amostras positivas para *Escherichia coli* genérica também foi superior (22,2% na alface orgânica e 12,5% nas alfaces convencionais). Por outro lado, as contagens de aeróbios mesófilos, psicrotróficos, bactérias do ácido láctico, *Pseudomonas* e de bolores e leveduras foram similares nos dois sistemas de cultivo.

Ceuppens et al. (2014) analisaram alfaces orgânicas e convencionais produzidas no Rio Grande do Sul quanto à *Escherichia coli* como indicador de higiene, *Salmonella* spp. e *E. coli* O157:H7, analisando também amostras de fertilizantes, solo, água de irrigação, caixas de transporte e mãos de manipuladores. *E. coli* genérica foi encontrada com maior frequência e quantidade em alfaces orgânicas (3,22 log UFC/g em 23,1% das amostras) que em convencionais (2,27 log UFC/g em 16,7% das amostras). *Salmonella* spp. e *E. coli* O157:H7 foram detectados apenas nas amostras de produção orgânica. *Salmonella* spp. foi detectada em uma amostra de fertilizante, duas de solo, uma de alface e uma de água de irrigação. *E. coli* O157:H7 foi detectada em uma amostra de água de irrigação e uma de água de lavagem.

A contaminação microbiológica de hortaliças com patógenos humanos pode colocar em risco a saúde do consumidor. A identificação de possíveis fontes e rotas de contaminação de micro-organismos patogênicos na cadeia produtiva de hortaliças, bem como a prevenção e o controle destes problemas são de grande importância para a saúde pública. Conhecer a microbiota destes alimentos pode ajudar a entender a influência das práticas agrícolas e das condições de crescimento na

prevalência dos micro-organismos, fornecendo informações úteis para a tomada de decisões em relação à segurança do alimento.

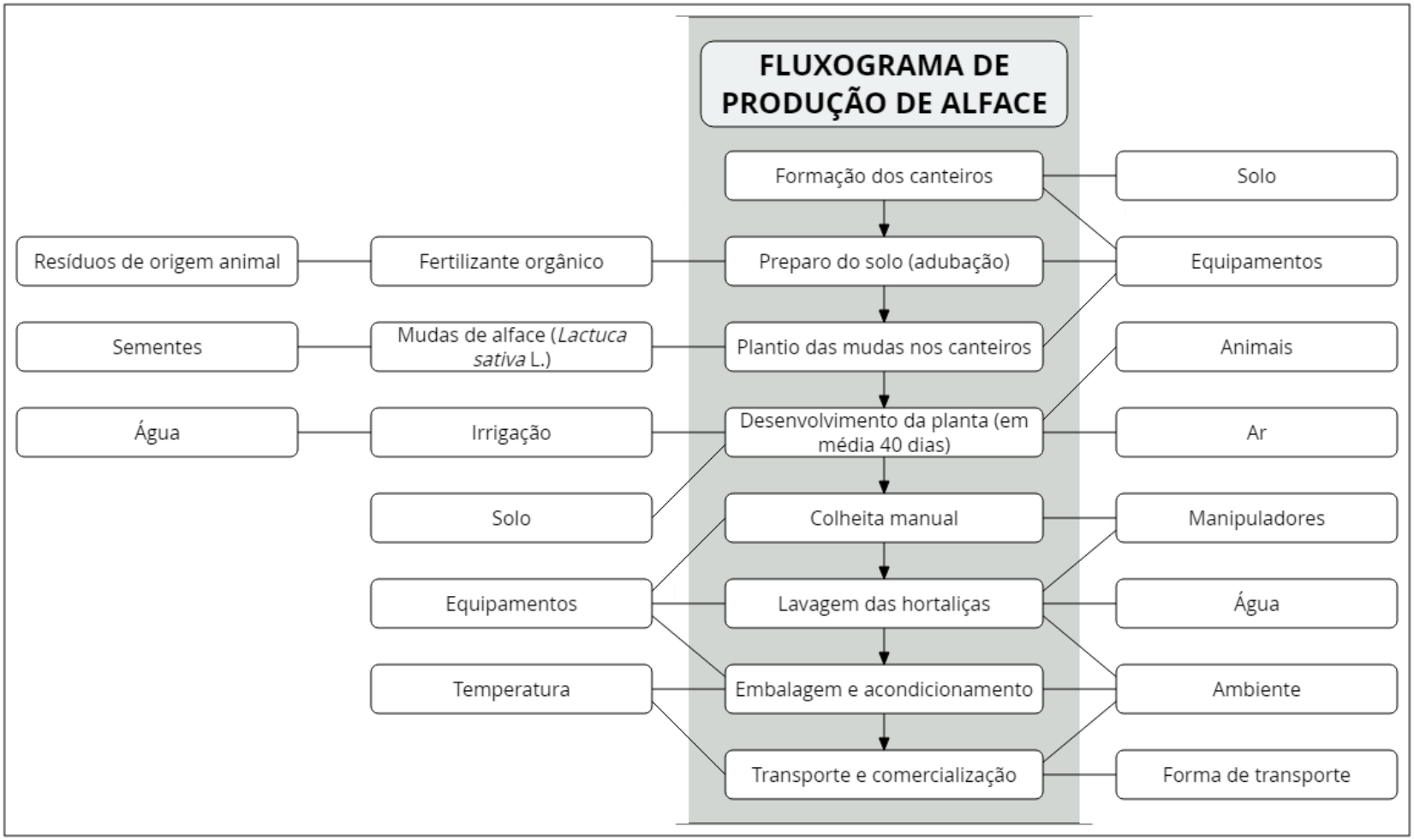
3.3. Contaminação microbiológica de hortaliças durante o cultivo no campo

As hortaliças podem contaminar-se ao longo de toda a cadeia produtiva por diversas fontes, como apresentado na Figura 1. Animais nas áreas de produção, ar, água, fertilizantes à base de esterco, manipuladores, caixas e embalagens de transporte são possíveis vias de contaminação destes alimentos (OLIVEIRA et al., 2010; DRISSNER; ZUERCHER, 2014). A microbiota de produtos frescos é diretamente ligada às características intrínsecas e extrínsecas do produto, assim como às condições pré-colheita (*e.g.* práticas agrícolas e variações climáticas) e pós-colheita (processamento, transporte, armazenamento e manipulação) (FRÖHLING et al., 2018). Deste modo, as fontes e rotas de contaminação de hortaliças podem sofrer variações em função do local de produção e processamento. Combinações desses fatores extrínsecos ao alimento influenciam diretamente no acesso e permanência de patógenos humanos ao produto e, consequentemente, nos riscos à saúde do consumidor (ALEGBELEYE; SINGLETON; SANT'ANA, 2018).

Restringir o acesso de patógenos humanos aos alimentos, do campo até a mesa do consumidor, é de extrema importância, tendo em vista os riscos à saúde e a capacidade limitada de eliminação destes microrganismos pelos métodos sanitizantes tradicionais (JUNG; JANG; MATTHEWS, 2014). Além disso, a sobrevivência de patógenos no solo, água e hortaliças durante o armazenamento é possível, mesmo sob refrigeração. Hsu et al. (2006) observaram que *Salmonella* e *E. coli* O157:H7 podem sobreviver por até 24 dias em orégano, salsinha e alecrim, mesmo armazenados a 4 ºC. Sant'Ana et al. (2012) avaliaram o potencial de crescimento de *Salmonella* e *Listeria monocytogenes* em vegetais prontos para o consumo embalados em atmosfera modificada. As populações de *Salmonella* em rúcula aumentaram em média 2,11 e 4,05 log UFC/g quando armazenadas a 7 e 15 ºC, respectivamente, enquanto as de *Listeria monocytogenes* aumentaram 1,85 e 3,22 log UFC/g, respectivamente, a 7 e 15 ºC.

Condições de estresse ambiental (temperatura inadequada, exposição à luz UV e baixa umidade) e a competição com bactérias epifíticas nativas podem atrapalhar a sobrevivência de patógenos humanos na superfície das plantas. No entanto, enteropatógenos podem aderir a biofilmes heterogêneos produzidos por bactérias não-patogênicas, aumentando a sua persistência nas hortaliças. Além disso, também podem ser internalizados através das raízes, estômatos ou danos no tecido foliar (UYTTENDAELE et al., 2015).

Figura 1. Possíveis vias de contaminação de alface (*Lactuca sativa* L.) por enteropatógenos na cadeia produtiva e distribuição. O quadro cinza indica as etapas de produção da alface e o quadro branco apresenta algumas possíveis vias de contaminação.



Fonte: Autoria própria

O cultivo de hortaliças ocorre próximo ao solo, o que facilita o acesso de micro-organismos patogênicos e deteriorantes (JOHANNESSEN; LONCAREVIC; KRUSE, 2002). O solo é um ambiente comum de bactérias e pode ser um meio favorável para a sobrevivência e multiplicação destes micro-organismos, dependendo da composição, umidade e temperatura (OLAIMAT; HOLLEY, 2012). Patógenos presentes no solo, como *Salmonella* spp., podem ser internalizados pelas plantas ou serem dispersos por partículas de poeira por toda a produção (KUMAR et al., 2017). O uso de fertilizantes orgânicos à base de esterco e resíduos ambientais e agroindustriais para enriquecimento nutricional do solo é comum, sobretudo no sistema de cultivo orgânico, sendo uma fonte de nutrientes de baixo custo. No entanto, quando não tratado adequadamente, pode ser uma fonte relevante de contaminação da produção (OLIVEIRA et al., 2010; ALEGBELEYE; SINGLETON; SANT'ANA, 2018).

A presença de patógenos humanos no esterco pode representar um potencial risco de contaminação dos campos de produção, solo e plantas. Chen et al. (2019) reportaram a presença de *E. coli* O157 e *Salmonella* spp. em 15,4% e 6,6% das amostras de esterco bovino sólido, respectivamente, coletadas em 13 fazendas leiteiras na Califórnia, EUA. As contagens estimadas por qPCR nas amostras positivas foram entre 3,1 e 5,3 log UFC/g para *E. coli* O157:H7 e entre <3 e 5,2 log UFC/g para *Salmonella* spp. Rodriguez-Rivera et al. (2016) detectaram *Salmonella* spp. em 64,2% das amostras de fezes de bovinos coletadas em diferentes ambientes de onze fazendas leiteiras no Texas, EUA, observando que *S*. Newport, *S*. Muenchen e *S*. Typhimurium foram os sorovares mais frequentes.

A redução da carga microbiana ou eliminação de patógenos nos fertilizantes orgânicos pode ser obtida pela compostagem, na qual micro-organismos aeróbios aumentam a temperatura e o pH do composto, e também aumentam o teor de amônia, em consequência da degradação proteica (HEINONEN-TANSKI et al., 2006). No entanto, quando realizada incorretamente, a compostagem pode favorecer a proliferação de micro-organismos e aumentar os riscos de contaminação dos alimentos (VENGLOVSKY; SASAKOVA; PLACHA, 2009; MAFFEI et al., 2016).

A dificuldade de padronização dos métodos de compostagem de fertilizantes no campo e das medidas que previnem sua recontaminação comprometem a segurança microbiológica. Se não forem inativados, os patógenos vindos dos fertilizantes podem sobreviver por longos períodos nos campos de produção, podendo aderir à superfície das folhas ou serem internalizados. Islam et al. (2004) reportaram que *E. coli* O157:H7 persistiu por 154 a 217 dias em solos adubados com compostos orgânicos contaminados com o patógeno. Além disso, a bactéria foi detectada em alface e salsinha cultivadas nestes solos, por até 77 e 177 dias, respectivamente, após o plantio das mudas.

A qualidade da água de irrigação também é considerada um fator de grande importância para a segurança microbiológica das culturas no campo, sendo uma das principais fontes de contaminação de enteropatógenos (JUNG; JANG; MATTHEWS, 2014). No Brasil e em outros países em desenvolvimento, normalmente a água utilizada na irrigação é proveniente de poços ou águas

superficiais, como rios, riachos, lagos ou reservatórios que acumulam água de nascentes. Águas superficiais podem ser contaminadas por águas residuais (tratadas), esgoto, fezes de animais e diversas outras vias. Por não serem submetidas ao tratamento antes de serem aplicadas nos campos de produção, estas águas podem comprometer a segurança microbiológica das hortaliças (UYTTENDAELE et al., 2015). Kisluk and Yaron (2012) mostraram que *S.* Typhimurium persistiu em salsinha por até 48h após irrigação por *spray* com água contaminada com 2,4 log UFC/mL e por até quatro semanas quando a contaminação era de 8,5 log UFC/ml.

No Brasil, a qualidade da água utilizada para irrigação de hortaliças e frutas deve estar de acordo com a Resolução CONAMA n° 357, de 17 de março de 2005 (BRASIL, 2005), que estabelece o limite máximo de 200 coliformes termotolerantes por 100 mL de água. Dependendo das agências certificadoras, a periodicidade destas análises na agricultura orgânica brasileira pode ser semestral ou anual, o que não contribui para um monitoramento eficaz e em tempo real das condições microbiológicas da água de irrigação, tendo em vista que a contaminação ao longo do ano não é homogênea.

O sistema de fornecimento de água requer manutenção constante, devido a possibilidade de formação de biofilme no encanamento. Além disso, o método de irrigação pode influenciar a transferência de contaminação da água para os vegetais. A irrigação por aspersão pode resultar em respingos do solo sobre as folhas, causando a transferência de enteropatógenos (UYTTENDAELE et al., 2015). Segundo Monaghan; Hutchison (2012), respingos de solo contaminado, ocasionados pela chuva ou irrigação, podem transferir patógenos às hortaliças. Quanto maior for a gota de água, maiores as chances de contaminação. Além disso, os autores também observaram que *E. coli* K12 veiculada pela água de irrigação foi capaz de penetrar pelo menos 30 cm no solo em apenas 1h após a aspersão.

A lavagem pós-colheita é uma etapa da cadeia produtiva realizada ainda nas propriedades de cultivo e visa principalmente a retirada das sujidades mais visíveis nos produtos. Esta etapa tem influência direta sobre a qualidade, segurança e vida útil das hortaliças, sendo a redução da população de patógenos e deteriorantes aderidos à superfície das folhas, dependente do tipo e concentração do sanitizante empregado (GIL et al., 2009). A frequência de troca da água e acompanhamento dos níveis de sanitizante nos tanques de lavagem são fatores de extrema importância. Um tanque de lavagem com água de baixa qualidade pode se transformar em um ambiente propício para a multiplicação de micro-organismos pelo acúmulo de matéria orgânica e, consequentemente, causar contaminação cruzada (SSEMANDA et al., 2018).

Como as hortaliças folhosas são geralmente consumidas *in natura*, a sanitização constitui-se como principal etapa de controle microbiano. Fatores como o nível inicial de contaminação, a internalização de bactérias nas células e tecidos das hortaliças, assim como a formação de biofilmes podem limitar a eficiência do sanitizante (OLAIMAT; HOLLEY, 2012). Os derivados à base de cloro são os produtos mais utilizados para a sanitização de vegetais, mas seu uso é controverso pois o cloro livre pode reagir com matéria orgânica e formar compostos carcinogênicos, como trihalometanos e

ácidos haloacéticos (PRAEGER; HERPPICH; HASSENBERG, 2018). Em alguns países, o dióxido de cloro e a radiação ultravioleta vêm sendo empregados para a desinfecção de hortaliças orgânicas nas propriedades e em unidades de beneficiamento, em substituição ao hipoclorito (RODGERS et al., 2004; GIL et al., 2009).

3.4. *Bacillus thuringiensis* como Agente de Controle Biológico e sua relação com a segurança das hortaliças orgânicas

A crescente demanda por alimentos orgânicos impulsiona a busca por técnicas alternativas ao uso de agroquímicos sintéticos na produção agrícola. O controle de pragas é um desafio para garantia da rentabilidade da produção, assim como para a segurança alimentar mundial, por afetar diretamente a produtividade. Neste sentido, o uso de bactérias como Agentes de Controle Biológico (BCA, na sigla em inglês – *Biological Control Agents*) tem recebido cada vez mais atenção. BCA são micro-organismos vivos (ou seus subprodutos) utilizados para controlar a população de outros organismos vivos (*e.g.* ervas daninhas, patógenos de plantas, invertebrados), resultando na proteção da produção (KEVAN; SHIPP, 2017).

Bacillus thuringiensis (*Bt*) é um dos principais BCA utilizados para o controle de pragas na produção agrícola em todo o mundo, representando mais de 50% dos produtos disponíveis no mercado (LACEY et al., 2015). *B. thuringiensis*, juntamente com *B. cereus stricto sensu*, *B. anthracis*, *B. cytotoxicus*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weihenstephanensis* e *B. toyonensis* compõem o grupo *Bacillus cereus lato sensu* (EFSA, 2016). São espécies Gram-positivas, bastonetes, formadoras de esporos, catalase-positivas, aeróbias ou anaeróbias tolerantes e que podem ser encontrados em diferentes ambientes, como solo, água, plantas e trato intestinal (FIRA et al., 2018; HEINI et al., 2018; OSIMANI; AQUILANTI; CLEMENTI, 2018).

Biopesticidas à base de diferentes linhagens de *Bt* são comumente aplicados na produção por aspersão, resultando em uma drástica redução do uso de pesticidas sintéticos. Além disso, culturas geneticamente modificadas para expressarem a patogenicidade do *Bt* também estão disponíveis no mercado (RAYMOND et al., 2009). Este BCA apresenta alta eficácia no manejo de pragas agrícolas, principalmente contra insetos de importância econômica (*e.g.* Lepidoptera e Coleoptera), e também carrapatos, ácaros, nematoides e protozoários, dependendo da subespécie de *Bt* utilizada (O'CALLAGHAN; GLARE, 2012; ARGÔLO-FILHO; LOGUERCIO, 2013; ZHENG et al., 2018).

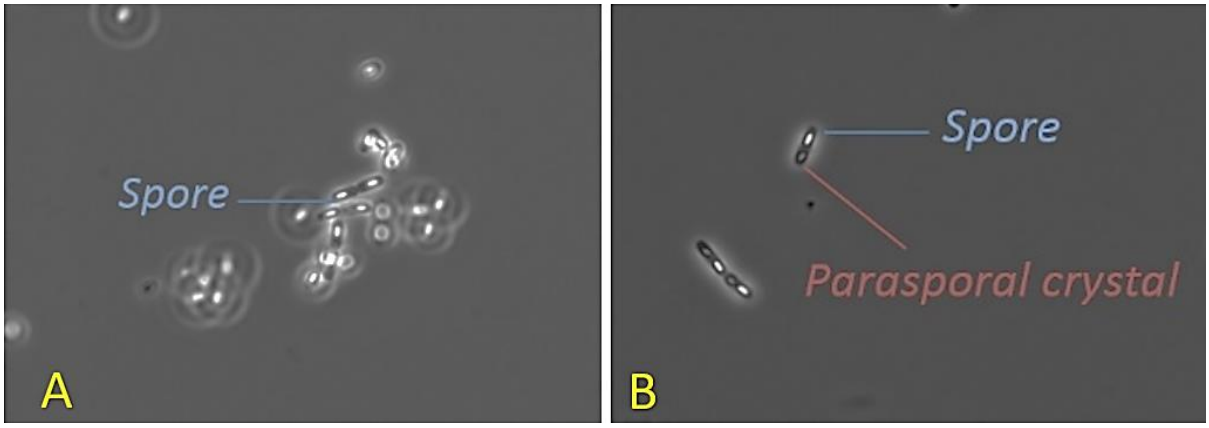
O efeito entomopatogênico do *Bt* deve-se à sua capacidade de produzir diferentes cristais proteicos (*Cry*) durante a esporulação, que expressam δ-endotoxinas com ação pesticida (RAYMOND et al., 2010; RASIGADE; HOLLANDT; WIRTH, 2018). Quando ingeridas pelas larvas dos insetos, as toxinas do *Bt* são ativadas pela ação do pH e proteases intestinais e ligam-se a receptores de células epiteliais nas microvilosidades do intestino médio, causando a morte das larvas por dois mecanismos distintos: lise celular devido a formação de canais iônicos ou poros; ou germinação dos esporos e

multiplicação da bactéria no hospedeiro (RAYMOND et al., 2010; KESHAVAREDDY; KUMAR, 2016).

O efeito do *Bt* é alvo-seletivo, dependendo da subespécie utilizada e da forma presente nas plantas. Em alguns casos, apenas a presença das toxinas já é suficiente para o controle biológico. No entanto, esporos e células viáveis de *Bt* podem ser capazes de expressar ou produzir outros fatores de virulência, como fosfolipases, proteases e enterotoxinas, ampliando os efeitos (RAYMOND et al., 2010). Além disso, outras atividades biológicas paralelas também têm sido descritas na literatura, como a produção de bacteriocinas (thuricin CD), lipopeptídeos (fengicina) e antibióticos (zwittermicina A e thuringiensina) (ZHENG et al., 2018).

Os membros do grupo *Bacillus cereus lato sensu* apresentam elevada similaridade genética, sendo distinguidos especialmente pelos produtos de seus metabolismos secundários (BASSI et al., 2016). Os métodos e técnicas comumente utilizados para identificação de micro-organismos, como testes bioquímicos, sequenciamento da região 16s do RNAr ou MALDI-TOF MS, não são capazes de distinguir as espécies patogênicas das seguras para humanos dentro do grupo (FIRA et al., 2018; RASIGADE; HOLLANDT; WIRTH, 2018). A produção de cristais proteicos durante a esporulação é uma exclusividade do *Bt*, e esta característica é utilizada para diferencia-lo das demais espécies pertencentes ao grupo *Bacillus cereus lato sensu* por microscopia de contraste de fase (Figura 2), conforme recomendado pelo FDA (TALLENT et al., 2001) e EFSA (EFSA, 2016).

Figura 2. Diferenciação entre *B. cereus* (A) e *B. thuringiensis* (B) por microscopia de fase contraste baseado na presença de cristais proteicos (*parasporal crystal*) em cepas de *Bt* durante a esporulação



Fonte: autoria própria

Similaridades genéticas entre *B. thuringiensis* e *B. cereus*, como a presença de genes de toxina comumente associados a cepas enterotóxicas, têm levantado questionamentos na comunidade científica sobre a segurança do *Bt* como BCA (EFSA, 2016). Kyei-Poku et al. (2007) identificaram genes associados à expressão de enterotoxinas diarreicas em isolados de biopesticidas comerciais à base de *Bt* (subespécies Kurstak HD-1, Israelensis, Aizawai e Tenebrionis), com destaque para os complexos de enterotoxinas não hemolítica (*nheA*, *nheB* e *nheC*) e hemolítica (*hblA*, *hblC* e *hblD*), presentes em todos os isolados. Segundo os autores, o complexo *nhe* foi expresso durante septicemia

em larvas de insetos alvo inoculados com *B. thuringiensis* subsp. Kurstaki HD-1. No entanto, a presença destes genes não confirma o risco de intoxicação alimentar por *Bt*, pois não há ainda comprovação da relação entre a exposição à produtos pulverizados com este BCA e o aumento da incidência de gastroenterites.

Bt é aplicado na produção agrícola na forma de esporos, que podem persistir por longos períodos no ambiente, após a pulverização. Os esporos precisam germinar para que os genes responsáveis pela síntese de enterotoxinas sejam expressos. Os métodos de rotina para quantificação de *B. cereus* em alimentos e água, como a ISO 7932.2:2004 (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2004), são presuntivos e não possibilitam a diferenciação entre as espécies do grupo *Bacillus cereus lato sensu*. Deste modo, os parâmetros microbiológicos para *B. cereus* podem ser extrapolados para *Bt*. Não há evidências claras de que concentrações presuntivas de *B. cereus* inferiores a 10^5 UFC/g de alimento causem intoxicação alimentar. Populações reduzidas em alimentos (100 - 1000 UFC/g) podem, portanto, ser toleradas. Entretanto, a dificuldade de distinção entre as espécies do grupo pode estar subestimando a participação de *Bt* em surtos nos quais *B. cereus* foi apontado como o agente causador (EFSA, 2016).

Rosenquist et al., (2005) avaliaram a ocorrência presuntiva de *B. cereus* e estimaram a população de *Bt* em 48.901 amostras de alimentos prontos para consumo, de diferentes categorias (*e.g.* produtos frescos, vegetais, carnes e massas), comercializados na Dinamarca, observando que em 98,7% das amostras analisadas as contagens presuntivas de *B. cereus* eram inferiores a 10^3 UFC/g, em 0,7% as contagens estavam entre 10^3 e 10^4 UFC/g e em 0,5% acima de 10^4 UFC/g (tomates, pepinos e outros vegetais). Dentre 40 cepas presuntivas de *B. cereus* selecionadas aleatoriamente das amostras, 36 apresentaram genes que codificam ao menos um componente do complexo *hbl* (toxina hemolítica) e 27 cepas tinham genes codificadores de *cytK*. Além disso, entre as 40 cepas analisadas, 31 foram classificadas como *Bt* por produzirem cristais proteicos durante a esporulação ou apresentarem genes *cry*. Tais resultados sugerem que *Bt* pode representar uma grande parcela dos microrganismos caracterizados como *B. cereus* presuntivos em alimentos e serem portadores de componentes gênicos envolvidos em doenças diarreicas humanas.

Evidências epidemiológicas também sugerem a participação de *Bt* em surtos de gastroenterite de origem alimentar. Ao investigar um surto em uma instituição de cuidados crônicos no Canadá, Jackson et al. (1995) identificaram cepas de *B. thuringiensis* capazes de produzir enterotoxinas características de *B. cereus* em fezes de indivíduos acometidos pelo surto. Além disso, norovírus também foi detectado em alguns pacientes, dificultando a identificação do patógeno veiculador. Mcintyre et al. (2008) analisaram 155 isolados, previamente caracterizados como *B. cereus*, de 39 surtos de origem alimentar ocorridos no Canadá entre 1991 e 2005, reclassificando 23 isolados como *Bt*, com base na tipagem molecular e fenotípica. Em quatro surtos, essa foi a única espécie do grupo *Bacillus* detectada, reforçando as especulações de subnotificação de *Bt* como veiculador de doenças de origem alimentar.

Um caso ocorrido em 2012 reacendeu as discussões na Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA) sobre a segurança do *Bt*. Três membros de uma família alemã apresentaram quadro clínico de diarreia e náuseas após consumirem salada e macarrão com queijo durante um jantar. Outros membros da família que não ingeriram a salada durante a refeição não apresentaram sintomas, sugerindo que este tenha sido o alimento veiculador do surto. Populações de *Bt* estimadas em 3,0 x 10^4 UFC/g foram encontradas na amostra de salada envolvida no surto e nenhum outro patógeno foi identificado. Análises posteriores em amostras de saladas produzidas pela mesma empresa e adquiridas no mesmo supermercado da amostra do surto, mas nem todas do mesmo lote, apresentaram populações de *Bt* entre 2,5 x 10^4 e 1,5 x 10^5 UFC/g. Os isolados foram identificados como *B. thuringiensis* subsp. Aizawai, mesma espécie aplicada como BCA durante a produção das hortaliças na fazenda produtora das saladas e apresentavam componentes gênicos de c*ytK2*, *nhe* e *hbl* (EFSA, 2016).

As discussões sobre a segurança do *Bt* como BCA dependem de mais estudos de avaliação de risco baseada em dados sobre o comportamento (persistência, morte e multiplicação) de *Bt* e *B. cereus* em hortaliças, nas etapas de pré e pós-colheita. Além disso, informações sobre a taxa de germinação dos esporos após aplicação no campo e condições de multiplicação da bactéria *in vivo* (plantas, alimentos e modelos animais) também são necessárias. Avaliações de risco adequadas são fundamentais para a tomada de decisões referentes ao período de carência após a aplicação, assim como para a escolha de subespécies seguras e doses adequadas de *Bt* para diferentes culturas agrícolas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Práticas adotadas nas propriedades de cultivo orgânico e avaliação microbiológica do material coletado

4.1.1. Coleta das amostras

Dez propriedades de cultivo orgânico certificadas foram visitadas para a coleta de um total de 190 amostras, que compreendiam alfaces, fertilizante e água de irrigação e de lavagem, conforme descrito na Tabela 2. As propriedades, codificadas de A a J, estão localizadas nos municípios de Cotia (propriedades A e G), Ibiúna (B, C, D, E, F e H), Mairinque (I) e São Roque (J), no Estado de São Paulo, Brasil.

Informações referentes às práticas agrícolas empregadas em cada propriedade, relacionadas ao fertilizante orgânico, irrigação e lavagem das hortaliças, também foram obtidas por meio de questionamentos aos produtores e avaliação visual durante as coletas, objetivando subsidiar a discussão dos resultados.

Tabela 2. Tipos e quantidades das amostras coletadas nas propriedades agrícolas

Tipo de amostra	n por fazenda	n total
Alface colhida nos canteiros de cultivo	5	50
Alface lavada na fazenda	5	50
Fertilizante orgânico	3	30
Água de irrigação	3	30
Água dos tanques de lavagem	3	30
Total de amostras analisadas:	19	190

As alfaces foram coletadas pelos próprios produtores de forma aleatória em diferentes pontos dos campos de produção, na presença do mestrando responsável por esta pesquisa. A colheita foi realizada manualmente com o auxílio de uma faca (Figura 3A) e armazenadas individualmente em sacos plásticos esterilizados. A lavagem da alface nas fazendas (Figura 3C) foi realizada de acordo com os procedimentos rotineiros de cada propriedade, por imersão da hortaliça em tanques com água, podendo ou não conter solução sanitizante. Após a imersão, o excesso de água nas hortaliças foi drenado por agitação manual e as amostras foram armazenadas individualmente em sacos plásticos esterilizados. As amostras de água de irrigação foram coletadas com o auxílio de coletores plásticos esterilizados (~250 mL/amostra; Figura 3B), diretamente dos lagos e riachos, próximo as margens e ao ponto de captação de água pelos irrigadores. As amostras de água dos tanques de lavagem foram coletadas por imersão de coletores plásticos esterilizados nos tanques de água, após a realização do procedimento de lavagem das hortaliças analisadas nesta pesquisa (Figura 3C). As amostras de

fertilizantes foram coletadas com auxílio de pás esterilizadas e armazenadas individualmente em sacos de amostragem (Figura 3D). Todas as amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas e transportadas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo – SP, Brasil. Ao chegarem ao laboratório, as amostras foram armazenadas sob refrigeração (7 ºC) até o momento da pesagem. Uma solução de tiossulfato de sódio 0,1% (Synth, Brasil) foi utilizada para neutralizar o cloro livre nas amostras de água de lavagem.

Figura 3. Coleta de amostras de alface nos canteiros de cultivo (A), de água de irrigação (B), de alface lavada e água dos tanques de lavagem (C) e de fertilizante orgânico (D).

Fonte: Autoria própria

4.1.2. Enumeração e identificação de *Enterobacteriaceae*

Porções de 25 g de cada amostra de alface e fertilizante foram homogeneizadas com 225 mL de água peptonada 0,1% (Oxoid, Inglaterra) em um *stomacher* (Biomerieux, França), obtendo-se a diluição 1:10, que foi submetida a novas diluições seriadas em água peptonada 0,1%. Para análise das águas de irrigação e lavagem, 1 mL de cada amostra foi acrescentado a um tubo contendo 9 mL de água peptonada 0,1%, obtendo-se a diluição 1:10, que foi submetida à nova diluição 1:10 em água peptonada 0,1%.

Para a enumeração de *Enterobacteriaceae*, alíquotas de 1 mL de cada diluição foram transferidas (*pour plate*) em duplicata para placas de petri, adicionando-se ágar Vermelho Violeta Bile

com Glicose (VRBG; Kasvi, EUA) com sobrecamada, conforme metodologia APHA 9.62:2015 (KORNACKI; GURTLER; STAWICK, 2015), com adaptações. As placas foram incubadas invertidas a 37 ºC por 24h a 48h. As colônias típicas foram contadas, sendo os resultados expressos em log UFC/g ou log UFC/mL.

Para identificação das cepas de *Enterobacteriaceae*, alíquotas de 100 μL de cada diluição das amostras foram transferidas (*spread plate*) em duplicata, para placas contendo ágar VRBG. As placas foram incubadas invertidas a 37 ºC/24 h – 48 h e colônias típicas foram selecionadas e purificadas através de isolamento em placas contendo ágar Brain Heart Infusion (BHI; Difco®, EUA). As colônias foram submetidas à identificação do gênero e espécie através da técnica de Espectrometria de Massas por Ionização Dessorção à Laser Assistida por Matriz (MALDI-TOF MS) (Bruker Daltonics, Alemanha) com o software Biotyper 3.1 database (Bruker Daltonics, Alemanha), conforme protocolo descrito por ALVES et al., (2016), com modificações. Esta etapa do projeto foi desenvolvida no Laboratório de Espectrometria de Massas - Dempster MS Lab, do Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da USP.

Para a extração das proteínas e peptídeos necessários para a identificação por MALDI-TOF MS, as colônias em teste foram transferidas individualmente para microtubos (Axygen, EUA) contendo 100 μL de água ultrapura e adicionou-se 300 μL de etanol PA. Os microtubos foram agitados em vortex e centrifugados a 12.446 x *g* por 2 min. O sobrenadante foi removido e o líquido residual dos tubos foi evaporado a temperatura ambiente. O *pellet* resultante foi ressuspendido em 30 μL de ácido fórmico 70% (Sigma, Alemanha) e em seguida acrescido de 30 μL de acetonitrila PA (Sigma, Alemanha). Os microtubos foram novamente agitados em vortex e centrifugados a 12.446 x *g* por 2 min, obtendo-se o sobrenadante com as proteínas e peptídeos de interesse. Para a realização das análises por MALDI-TOF-MS, transferiu-se 0,5 μL de cada sobrenadante teste para um *spot* da placa do equipamento e, após a secagem a temperatura ambiente, adicionou-se 0,5 μL de uma solução saturada de ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico em acetonitrila com 0,1% de ácido trifluoroacético para realização da ionização das amostras e posterior identificação.

Devido a restrições de uso do MALDI-TOF MS, esta etapa do projeto foi realizada apenas com as amostras provenientes das propriedades F, G, H, I e J.

4.1.3. Pesquisa e enumeração de coliformes totais e *Escherichia coli* em água

A análise de coliformes totais e *Escherichia coli* nas amostras de água de irrigação e de lavagem das hortaliças foi realizada de forma qualitativa e quantitativa simultaneamente. Para isso, foi utilizado o método do substrato cromogênico AOAC 991.15 (AOAC, 2007), empregando-se o sistema Colitag™ (Neogen Corporation, EUA), de acordo com instruções do fabricante.

Porções de 100 mL de cada amostra de água foram homogeneizadas com o conteúdo de uma ampola Colitag™ e agitadas até completa dissolução. Em seguida, as amostras foram subdivididas em

10 porções de 10 mL e incubadas à 37 ºC/24 h. Após a incubação, os tubos que apresentaram coloração amarela foram considerados positivos para coliformes totais, enquanto aqueles que apresentaram fluorescência quando expostos à luz ultravioleta (λ = 366 nm; Merck, Alemanha), foram considerados positivos para *E. coli*. Os tubos positivos foram contados e confrontados com a tabela de conversão de Número Mais Provável (NMP) para teste com 10 alíquotas (RICE et al., 2012) e os resultados foram expressos em NMP/100 mL de água.

4.1.4. Pesquisa de *Salmonella* spp.

A pesquisa de *Salmonella* spp. foi realizada pelo método convencional de cultivo (presença/ausência em 25 g ou 100 mL) e por método molecular quantitativo (log UFC/g ou mL), utilizando *Real Time* PCR (qPCR).

4.1.4.1. Método convencional

A detecção de *Salmonella* spp. nas amostras de alface e fertilizantes foi realizada empregando-se a metodologia ISO 6579:2002 (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2007), com modificações. As amostras de água de irrigação e de lavagem das hortaliças foram analisadas empregando-se a metodologia ISO 19250:2010 (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2010), com modificações. Os dois métodos diferem apenas na forma de preparo das amostras para o pré-enriquecimento. Segundo a ISO 6579:2002, 25 g das amostras sólidas (alface ou fertilizante) devem ser homogeneizadas com 225 mL de Água Peptonada Tamponada (BPW; Kasvi, Itália), enquanto a ISO 19250:2010, determina que 100 mL das amostras de água devem ser diluídas em 100 mL de BPW preparado em concentração dupla. Após a homogeneização, as amostras foram incubadas a 37 ºC por 24 h.

Para a realização do enriquecimento seletivo, alíquotas de 0,1 mL e 1 mL das amostras pré-enriquecidas foram transferidas para dois tubos, um deles contendo 10 mL de Caldo Rappaport-Vassilidis (RV; Difco, EUA) e o outro contendo 10 mL de Caldo Tetrationato Base (TT; Difco, EUA). Os tubos com caldo RV foram incubados a 41,5 °C/24 h e os com caldo TT a 37 ºC/24 h.

Após o enriquecimento seletivo, os caldos foram estriados na superfície de placas com Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD; Kasvi, Itália) e com Agar Hektoen Entérico (HE; Difco, EUA), separadamente, e incubadas invertidas a 37 °C/24 h. Colônias suspeitas de *Salmonella* spp. nestas placas foram selecionadas e submetidas a confirmação bioquímica através do teste de crescimento em Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI; Difco, EUA) e em Ágar Lisina Ferro (LIA; Difco, EUA), assim como em caldo O-Nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (ONPG; Colitag™). Tubos com reação típica foram submetidos à prova de soro-aglutinação em lâmina com soro polivalente para *Salmonella* spp. (Probac, Brasil), sendo os resultados expressos como presença ou ausência de *Salmonella* spp. em 100 mL de água ou em 25 g de alface ou fertilizante.

4.1.4.2. Método molecular (*real-time* PCR)

O método cultivo-independente qPCR foi empregado para a pesquisa e quantificação estimada/equivalente de *Salmonella* spp. nas amostras de alface e de água pré-enriquecidas, de acordo com metodologia empregada por MAFFEI et al., (2019) e Martinez et al., (2015). Este método foi selecionado por apresentar maior sensibilidade do que a metodologia convencional.

O DNA bacteriano foi extraído de 1 mL das amostras pré-enriquecidas utilizadas no método convencional (item 4.1.4.1.), empregando-se o kit comercial *mericon* DNA Bacteria (QIAGEN, Alemanha), conforme instruções do fabricante. A concentração do DNA extraído foi determinada no espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, EUA) e a pureza foi calculada determinando-se a razão entre as absorbâncias medidas a 260 nm e a 280 nm. As amostras que apresentaram valores superiores a 1.8 foram consideradas adequadas para o *real-time* PCR.

A detecção de *Salmonella* spp. foi realizada utilizando o kit *mericon Salmonella* spp. (QIAGEN, Alemanha) no equipamento 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Singapura) com o software v2.3. O programa de amplificação constituiu de uma etapa a 95 °C durante 5 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C durante 15 s, 60 °C durante 1 min e 72 °C durante 10 s. Todas as amplificações incluíram controle positivo, negativo e interno, além de terem sido analisadas em duplicata. Os valores do limiar de detecção (*cycle threshold* - *Ct*) foram definidos automaticamente pelo software do equipamento.

O kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN, Alemanha) foi empregado para a extração do DNA genômico de cepas de *S. enterica* serovar Typhimurium str. 14028S, conforme instruções do fabricante. Considerando o tamanho médio do genoma da *Salmonella* em 4.964.097 pares de base (GENBANK BLASTN, 2017), calculou-se a concentração do DNA necessária para construção de uma curva analítica que variou de 10^7 a 10^1 cópias do genoma do patógeno. A quantificação estimada das populações enriquecidas se deu através da interpolação dos valores do *Ct* obtidos nas amostras, com os valores de *Ct* de cada diluição da curva analítica, os resultados equivalentes estimados foram expressos em log UFC/g ou log UFC/mL.

4.2. Avaliação da persistência de *Bacillus thuringiensis* e possíveis interações com bactérias epifíticas e *Salmonella* spp. no pré e pós-colheita de hortaliças

4.2.1. Cepas utilizadas e preparo dos inóculos

Este estudo foi desenvolvido utilizando seis cepas de *S. enterica* e quatro cepas pertencentes ao grupo *Bacillus cereus lato sensu* (Tabela 3), da coleção de culturas da Unidade de Pesquisa em Microbiologia e Preservação de Alimentos (FMFP) da Universidade de Ghent, Bélgica. As culturas foram mantidas em tubos com ágar BHI (Oxoid, Inglaterra) inclinado à 4 ± 1 ºC.

Tabela 3. Cepas de *Salmonella enterica* e *Bacillus cereus lato sensu* utilizadas nos experimentos

Cepas	**Código**
Salmonella enterica Thompson	RM1987
Salmonella enterica Typhimurium	ATCC SL 1344
Salmonella enterica Typhimurium monophasic	S1006
Salmonella enterica Senftenberg	ATCC 43845
Salmonella enterica Montevideo	ATCC BAA 710
Salmonella enterica Enteritidis	ATCC BAA 1045
Bacillus cereus – diarrheal toxin producer	BC710
Bacillus cereus – Type strain	ATCC 14579
Bacillus thuringiensis – Type Strain	ATCC 10792
Bacillus thuringiensis subsp. Aizawai (*Bt*)	XenTari®

Para cada experimento, as cepas foram transferidas individualmente para tubos contendo 9 mL de caldo BHI e encubadas por 24h a 37 ºC e 30 ºC para *Salmonella* e *Bacillus*, respectivamente. Após este período, alíquotas de 100 μL de cada cultura foram transferidas individualmente para novos tubos contendo 9 mL de caldo BHI e submetidos a incubação novamente, nas mesmas condições. A absorbância das culturas em caldo BHI foi determinada em triplicata (100 μL) por espectrofotometria (λ = 650 nm), utilizando microplacas de 96 poços. Os resultados foram convertidos para UFC/mL utilizando a equação:

$$C = \frac{A - 0.1533}{3\text{x}10^{-10}}$$

onde C é a concentração celular estimada das culturas (UFC/mL) e A é a absorbância média da triplicata.

Alíquotas de cada suspensão bacteriana foram centrifugadas individualmente a 2900 x *g* por 5 min e o sobrenadante foi descartado. Os *pellets* foram lavados com uma Solução Salina Peptonada (SSP; 0,85% NaCl e 0,10% peptona; Oxoid, Inglaterra) e a concentração final do inóculo desejada para cada experimento foi ajustada por diluições em SSP.

4.2.2. Multiplicação das cepas de *S. enterica* em BHI a 4 ºC, 7 ºC e 12 ºC

As cepas de *Salmonella* foram inoculadas separadamente (~1 log UFC/mL), em triplicata, em microplacas de 12 poços contendo caldo BHI e incubadas à 4 ± 1 °C, 7 ± 1 °C e 12 ± 1 °C. Nos dias 0, 5, 9 e 14, as culturas foram semeadas em ágar XLD (Oxoid, Inglaterra) e incubadas a 37 ºC/24h. Colônias típicas foram contadas e os resultados expressos em log UFC/mL ± desvio padrão.

4.2.3. Sobrevivência e interações de *Salmonella* e *Bacillus cereus* presuntivos (incluindo *Bacillus thuringiensis*) em espinafre

4.2.3.1. Cultivo do espinafre

Devido à disponibilidade da Unidade de Pesquisa em Microbiologia e Preservação de Alimentos da Universidade de Ghent, Bélgica, os estudos foram desenvolvidos com espinafre, representando o modelo "hortaliças". Sementes de espinafre (*Spinacea oleracea* L.; Maxeda DIY B.V., Holanda) foram semeadas em bandejas para germinação contendo solo orgânico (Maxeda DIY B.V., Holanda), e foram mantidas à temperatura (15 ºC) e luminosidade ambientes. O solo foi mantido úmido por irrigação a cada dois dias. Após 15 dias, as sementes germinadas foram transferidas para vasos (40cmx13cmx16cm; 10 sementes por vaso) contendo aproximadamente 2,2 kg de solo orgânico.

Os vasos com as sementes de espinafre germinadas foram transferidos para uma câmara de crescimento vegetal com condições controladas (Mammoth Lite 90, Holanda), com um fotoperíodo de 12h, utilizando-se uma lâmpada de 250 W (Sonlight Agro, Holanda). A cada dois dias, as plantas foram irrigadas cuidadosamente, com o auxílio de uma pipeta, para evitar respingos de solo sobre as folhas. A temperatura (22 ± 2 ºC) e a umidade relativa (60 ± 15%) do interior da câmara de crescimento durante o cultivo das plantas foram monitoradas com o *Data logger* EL-USB-2-LCD+ (Lascar Electronics Ltd., Inglaterra).

4.2.3.2. Tratamento das mudas de espinafre com *B. thuringiensis* e *S.* Montevideo

B. thuringiensis subsp. Aizawai (Biopesticida comercial XenTari®) foi o Agente de Controle Biológico (BCA) selecionado para o estudo. Após seis semanas de cultivo em vasos (item 4.2.3.1.), 54 mudas de espinafre foram transferidas para uma cabine de biossegurança e pulverizadas (0,5 mL/planta) com *S.* Montevideo e/ou *B. thuringiensis* subsp. Aizawai (células vegetativas e esporos), de acordo com seis cenários (10 plantas por cenário):

1) Pulverizadas com água destilada estéril (controle);
2) Pulverizadas com *S.* Montevideo (3 log UFC/g);
3) Pulverizadas com células vegetativas de *B. thuringiensis* subsp. Aizawai (6 log UFC/g)
4) Pulverizadas com esporos de *B. thuringiensis* subsp. Aizawai (8 log UFC/g)
5) Pulverizadas com uma mistura de células vegetativas de *B. thuringiensis* subsp. Aizawai (6 log UFC/g) e *S.* Montevideo (3 log UFC/g);
6) Pulverizadas com uma mistura de esporos de *B. thuringiensis* subsp. Aizawai (8 log UFC/g) e *S.* Montevideo (3 log UFC/g).

Após a pulverização, as amostras permaneceram na cabine de biossegurança por 1 h, para secagem do inóculo. Em seguida, retornaram para a câmara de crescimento, mantendo-se as mesmas condições de cultivo descritas no item 4.2.3.1. até a finalização dos experimentos.

4.2.3.3. Avaliação da persistência de *B. thuringiensis* subsp. Aizawai e *S.* Montevideo no pré-colheita de espinafre

Nos dias 0, 5 e 10 de cultivo pós-tratamento (item 4.2.3.2.), três plantas de cada cenário de inoculação foram colhidas e transferidas separadamente para sacos de amostragem com filtro (Bioreba, Suíça). As amostras foram pesadas, diluídas 1:10 em SSP e homogeneizadas com o auxílio de um homogeneizador manual (Bioreba, Suíça). Em seguida, as amostras foram submetidas a diluições decimais em SSP e semeadas (*spread-plate*) em ágar XLD e ágar Mannitol Yolk Polymyxin (MYP; Oxoid, Inglaterra), suplementado com Egg Yolk emulsion (10% v/v; Oxoid, Inglaterra) e Polymyxin B (100.000 U/L; Oxoid, Inglaterra), em duplicata. As placas foram incubadas invertidas a 37 ºC e 30 ºC/24 h para enumeração de *Salmonella* spp. e *Bacillus cereus* presuntivos (incluindo *Bt*), respectivamente. Para enumeração presuntiva de esporos de *B. cereus* presuntivos (incluindo esporos de *Bt*), as amostras foram submetidas a aquecimento (80 ºC/10 min) antes de serem semeadas em MYP.

Adicionalmente, amostras de 10 g de solo orgânico e de sementes, utilizadas no cultivo dos espinafres, foram submetidas a diluições decimais em SSP e semeadas em ágar MYP, em duplicata, para enumeração de *B. cereus* presuntivos (incluindo *Bt*). Após a contagem de colônias típicas em cada meio de cultura, os resultados foram expressos em log UFC/g ± desvio padrão.

4.2.3.4. Sobrevivência de *Bacillus* e *Salmonella* no pós-colheita de espinafre minimamente processado, experimentalmente contaminado, durante armazenamento a 12 ºC

Pacotes de espinafre minimamente processado (pré-lavado e embalado em atmosfera modificada) foram adquiridos em supermercados da cidade de Ghent, Bélgica, e imediatamente transportados ao laboratório em caixas isotérmicas. O conteúdo de diferentes pacotes de espinafre foi misturado em um saco estéril, removendo-se em seguida oito porções de 500g. As porções de 500 g cada foram acondicionadas em sacos plásticos com lacre do tipo *zip lock* (30x40cm) e pulverizadas (10 μL/g) de acordo com oito cenários:

1) Pulverizadas com água destilada estéril (controle);
2) Pulverizadas com *S*. Montevideo (~ 3 log UFC/g);
3) Pulverizadas com *B. cereus** BC710 (~ 4 log UFC/g);
4) Pulverizadas com *B. thuringiensis** type strain (~ 4 log UFC/g);
5) Pulverizadas com *B. thuringiensis** subsp. Aizawai (~ 4 log UFC/g);

6) Pulverizadas com *B. cereus** BC710 (~ 5 log UFC/g) e *S.* Montevideo (~ 3 log UFC/g);
7) Pulverizadas com *B. thuringiensis** type strain (~ 5 log UFC/g) e *S.* Montevideo (~ 3 log UFC/g);
8) Pulverizadas com *B. thuringiensis** subsp. Aizawai (~ 5 log UFC/g) e *S.* Montevideo (~ 3 log UFC/g);

*Os inóculos de *B. cereus* e *B. thuringiensis* foram preparados com células viáveis

Após a contaminação experimental, os sacos contendo as amostras foram fechados e deixados a temperatura ambiente por uma hora para possibilitar a adesão das bactérias às folhas. Em seguida, os sacos foram acondicionados em uma caixa plástica e armazenados em um refrigerador a 12 ± 1 ºC. Diariamente, até o quinto dia de armazenamento, três porções de 25g de folhas de espinafre foram removidas de cada saco, transferidas individualmente para sacos de *stomacher e* homogeneizadas com SSP (1:10) em *stomacher* por 1 mim. Foram preparadas novas diluições decimais seriadas e alíquotas de 100 µL de cada diluição foram semeadas (*spread-plate*), em duplicata, em placas com ágar XLD e MYP e incubadas a 37 ºC e 30 ºC por 24 h, para enumeração de *Salmonella* spp. e *Bacillus cereus* presuntivos (incluindo *Bt*), respectivamente. Os resultados foram expressos em log UFC/g de amostra ± desvio padrão.

4.3. Avaliação das interações entre bactérias epifíticas, *Salmonella* e bactérias do grupo *Bacillus cereus in vitro*

4.3.1. Enumeração de *Bacillus cereus* presuntivo e isolamento de bactérias epifíticas de hortaliças

Seis amostras de hortaliças minimamente processadas (espinafre, rúcula e alface) foram adquiridas em supermercados da cidade de Ghent, Bélgica, e imediatamente transportadas para o laboratório em caixas isotérmicas. Porções de 25g de cada amostra foram pesadas, acondicionadas em sacos de *stomacher*, homogeneizadas com SSP (1:10) em *stomacher* por 1 min e submetidas à novas diluições decimais seriadas.

Para a enumeração de *Bacillus cereus* presuntivos, alíquotas de 100 µL de cada diluição foram semeadas em ágar MYP e incubadas a 30 ºC por 24h. Colônias típicas em cada placa foram contadas e os resultados foram expressos como log UFC/g.

Para o isolamento de bactérias epifíticas, alíquotas de 100 µL de cada diluição foram semeadas (*spread-plate*) em ágar VRBG e incubadas a 37 ºC por 48h, objetivando favorecer as bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. Trinta colônias foram selecionadas (cinco por amostra), semeadas em placas de Ágar Triptona de Soja (TSA; Oxoid, Inglaterra) e incubadas a 37 ºC/24h. Colônias isoladas foram selecionadas, transferidas individualmente para microtubos contendo

caldo BHI e glicerol 30% (v/v) e incubadas a 37 ºC/24h. Posteriormente, as culturas foram mantidas a -80 ºC.

4.3.2. Identificação de bactérias epifíticas com atividade inibitória contra *Salmonella* spp. e bactérias do grupo *Bacillus cereus*

A atividade inibitória dos 30 isolados de bactérias epifíticas (item 4.3.1.) contra cepas de *Salmonella* e/ou *Bacillus* foi investigada de acordo com metodologia descrita por Lopez-Velasco et al. (2012), com adaptações. Para isso, as culturas das cepas de *Salmonella* e *Bacillus* listadas na Tabela 3 foram inoculadas (~ 6 log UFC/mL) individualmente e em placas de Ágar Nutriente (NA; Oxoid, Inglaterra). Em seguida, 10 μL das culturas das bactérias epifíticas em teste, obtidas em caldo BHI à 37 ºC/24h, foram inoculadas em triplicata em pontos previamente demarcados nas placas de NA. Após completa absorção dos inóculos, as placas foram incubadas invertidas a 22 ºC/24h, observando-se a presença de halos de inibição em volta dos pontos onde as bactérias epifíticas foram inoculadas. Os halos de inibição foram medidos e aqueles com diâmetro superior a 5 mm foram considerados indicativos de ação inibitória. As cepas com possível ação inibitória foram submetidas à identificação por MALDI-TOF MS no Laboratório Nacional de Referência Sciensano, em Bruxelas, Bélgica. Em seguida, as cepas identificadas foram submetidas a novos testes de co-cultivo com as cepas de *Salmonella* e/ou *Bacillus* em caldo BHI para confirmação da atividade inibitória. Os inóculos foram preparados conforme descrito no item 4.2.1. (~3 log UFC/mL, para cada bactéria) e transferidos para microplacas com 12 poços, em triplicata, individualmente ou em combinações. As microplacas foram incubadas a 12 ºC e 22 ºC e o crescimento de cada bactéria testada foi avaliado diariamente por até 5 dias, através de semeadura no ágar seletivo apropriado.

4.4. Análise estatística

As contagens microbianas (UFC/g ou UFC/mL) foram convertidas para $\log_{10}$. Posteriormente, os dados foram submetidos a análise estatística com intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$), com auxílio do *software* Minitab® Statistical versão 18.1.

O teste *t student* foi empregado para avaliar diferenças significantes ($p < 0,05$) entre as contagens de *Enterobacteriaceae* obtidas nas amostras de alface colhidas diretamente dos canteiros de produção e após a etapa de lavagem nas propriedades, bem como para avaliar o efeito do co-cultivo de *S.* Montevideo e *Pseudomonas chlororaphis* com *Bacillus thuringiensis* em caldo BHI.

ANOVA seguida por teste de Tukey foram aplicados para determinar diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre as contagens de *Enterobacteriaceae* nas amostras de fertilizante orgânico e água de irrigação, relacionadas a diferentes práticas agrícolas adotadas nas propriedades de cultivo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Práticas adotadas nas propriedades de cultivo orgânico e avaliação microbiológica do material coletado

A Tabela 4 apresenta um compilado das práticas agrícolas empregadas nas dez unidades produtoras de hortaliças orgânicas, visitadas entre março/2017 e julho/2018. Nas propriedades H e I foram utilizados fertilizantes orgânicos comerciais já compostados e nas demais propriedades a compostagem era feita no local. O período médio de compostagem variou de 15 a 20 dias, independente do volume e composição do material. Na propriedade D, não foi relatado um método padronizado para a realização da compostagem, ficando a cargo do produtor a determinação do ponto ideal para finalização do processo e aplicação no campo. Cama de frango foi um ingrediente comum na formulação do fertilizante de todas as propriedades visitadas, sendo o único componente de origem animal utilizado nas propriedades A, D, G, H e I. Outros tipos de esterco também eram utilizados: bovino, nas propriedades C, E, F e J; e equino, na propriedade E. Na propriedade B, utilizava-se também resíduos da agroindústria de pescado como ingrediente no fertilizante.

Os fertilizantes orgânicos à base de esterco constituem uma excelente fonte de nutrientes para plantas, além de contribuir para a melhoria das características físicas, químicas e biológicas do solo. A compostagem deste material deve ser feita corretamente, pois se os enteropatógenos eventualmente presentes não são inativados, podem sobreviver no composto, que pode contaminar e persistir nas hortaliças. Segundo Gurtler et al. (2018), o tamanho da pilha de compostagem e o seu manejo (controle da aeração, umidade e temperatura) devem ser corretamente planejados, para a inativação de vírus, parasitas e bactérias patogênicas no fertilizante.

A composição e a carga microbiana inicial dos ingredientes são fatores que influenciam a efetividade da compostagem (AIRAKSINEN; HEINONEN-TANSKI; HEISKANEN, 2001; ALEGBELEYE; SINGLETON; SANT'ANA, 2018). Frangos e bovinos são hospedeiros conhecidos de *Salmonella* spp., o que evidencia a importância da compostagem para inativação deste patógeno (WHO, 2018). Segundo Jung; Jang; Matthews (2014), o uso de subprodutos de peixes como ingrediente de fertilizantes orgânicos vem aumentando. Dessa forma, pesquisas para o aprimoramento do processo de produção e inativação dos patógenos são fundamentais para a melhoria da segurança microbiológica das hortaliças cultivadas com esses fertilizantes.

Tabela 4. Práticas agrícolas observadas nas propriedades visitadas

Práticas agrícolas	Propriedades									
	A	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**	**I**	**J**
Realiza compostagem do fertilizante?	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	NA[1]	NA[1]	Sim
Tempo de compostagem do fertilizante (dias):	20	15	20	NA[1]	15	20	20	NA[1]	NA[1]	15
Resíduos de origem animal presentes no fertilizante:	Frango	Pescado e Frango	Bovino e Frango	Frango	Bovino, equino e Frango	Bovino e Frango	Frango	Frango	Frango	Frango e Bovino
Forma de armazenagem do fertilizante:	Sacos	Sacos	Barris	Empilhado no chão sob lona	Empilhado no chão sob lona	Sacos	Sacos	Empilhado no chão sob lona	Sacos	Empilhado no chão sob lona
Presença de animais, exceto aves, nos campos de produção?	Sim	Não	Não	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Não	Não
Pecuária próxima à produção?	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Não
Origem da água de irrigação:	Riacho	Lago	Lago	Lago	Lago	Lago	Lago	Riacho	Lago	Lago
Efetua tratamento da água de irrigação?	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Sistema de irrigação empregado:	Aspersão	Aspersão	Aspersão	Aspersão	Aspersão	Aspersão	Aspersão	Aspersão	Aspersão	Aspersão
Origem da água de lavagem das hortaliças:	Poço	Poço	Poço	Poço	Lago	Poço	Poço	Poço	Poço	Poço
Realiza pré-lavagem das hortaliças?	Sim	Não	Não	Sim	Não	Não	Sim	Não	Sim	Não
Utiliza sanitizantes na lavagem?	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
Controla o tempo de imersão das hortaliças no sanitizante?	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Possui ambiente específico para a lavagem das hortaliças?	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não	Sim	Não

[1]NA: Não se aplica

As formas de armazenamento do fertilizante compostado preparado variaram, utilizando-se sacos de ráfia (propriedades A, B, F, G e I), barris fechados (propriedade C) ou empilhados no solo com a proteção de uma lona (propriedades D, E, H e J). O armazenamento inadequado de fertilizantes compostados pode resultar em recontaminação do produto pronto. Além disso, fluidos liberados durante o processo de compostagem podem conter enteropatógenos, que serão fontes de contaminação para o solo e para a produção, principalmente se estiverem próximos aos canteiros de cultivo das hortaliças.

O acesso de animais, como cachorros, gatos e coelhos, à área de produção foi registrado em quatro propriedades (A, D, G e H), assim como também a instauração de pecuária (criação de equinos, suínos ou frango) em áreas próximas ou no acesso aos canteiros de cultivo em 4 propriedades (D, G, H e I). Animais podem ser portadores de enteropatógenos, sendo essencial que os campos de cultivo sejam protegidos de forma a evitar o seu acesso à produção (JUNG; JANG; MATTHEWS, 2014). Como métodos de proteção podem ser dispendiosos para o pequeno produtor, é comum o uso de animais domésticos, como cachorros para evitar a presença de coelhos nos campos de produção. Esta prática pode contribuir para a redução dos danos econômicos nas propriedades, mas por outro lado, pode elevar os riscos microbiológicos. Além disso, atividades pecuárias próximo aos campos de produção podem representar uma fonte de contaminação, através de manipuladores, utensílios ou transmissão pela água e pelo ar.

A origem da água de irrigação também variou nas propriedades visitadas. Em duas (A e H), a água era captada diretamente dos riachos que cortam as propriedades, enquanto nas demais, a captação era feita em lagos construídos para represar águas de nascentes da região. Nenhuma propriedade realizava o tratamento da água antes da aplicação nos campos de produção e todas utilizavam o sistema de aspersão para irrigação, acionado apenas quando a necessidade era notada pelo produtor. O método de irrigação pode influenciar na transferência de contaminação para as culturas. Ao contrário da irrigação por gotejamento, a aspersão pode resultar em respingos do solo sobre as folhas e, consequentemente, transferência de enteropatógenos às hortaliças. Além disso, independentemente do método utilizado, a manutenção do sistema de fornecimento de água é fundamental, tendo em vista a possibilidade de formação de biofilmes e adesão de patógenos à estes (UYTTENDAELE et al., 2015).

Na propriedade E, a água para a lavagem das hortaliças era coletada no mesmo lago utilizado para irrigação, sem tratamento prévio. Assim como na propriedade I, não se empregava agentes sanitizantes no procedimento de lavagem. Nas demais propriedades, utilizava-se águas subterrâneas (poços artesanais) e agentes sanitizantes para a lavagem das hortaliças. No entanto, apenas na propriedade A foi constatado um controle e padronização do tempo de imersão das hortaliças na solução (15 min). Nas propriedades A, D, G e I, havia uma etapa de pré-lavagem das hortaliças (imersão em tanque com água) previamente à lavagem com solução sanitizante. Esta etapa auxilia na redução de matéria orgânica aderida às hortaliças e, com isso, preserva a degradação dos agentes

sanitizantes nos tanques de lavagem e garante maior eficiência do processo. Em seis propriedades (A, B, C, D, F e I) havia um local específico e protegido de intempéries para a realização da lavagem das hortaliças e armazenamento (a temperatura ambiente), mas em nenhuma propriedade havia controle da concentração de cloro livre na água de lavagem. Além de contribuir para a redução da carga microbiológica nos produtos, a aplicação de agentes sanitizantes na lavagem objetiva principalmente a desinfecção da água, evitando a contaminação cruzada no processo (GIL et al., 2009). Maffei et al., (2017) mostraram que o uso adequado de sanitizantes nos tanques de lavagem de hortaliças reduz os riscos de persistência de *Salmonella,* observando que concentrações acima de 10 mg/L são necessárias para reduzir os riscos de doenças decorrentes de contaminação cruzada.

5.1.1. Enumeração de *Enterobacteriaceae*

As contagens de *Enterobacteriaceae* estão apresentadas na Tabela 5. Nas amostras de fertilizantes, as populações variaram entre <1 log UFC/g e 7,2 ± 0,1 log UFC/g. Esta grande variação pode estar relacionada com a falta de padronização do método de compostagem e com a variabilidade dos ingredientes utilizados nas diferentes propriedades. Segundo Larney; Hao, (2007), a qualidade microbiológica do composto depende do tempo de compostagem, temperatura do ambiente, frequência de rotação da matéria orgânica, contaminação inicial dos ingredientes utilizados e exposição do fertilizante durante e após o processo de compostagem à outras vias de contaminação. As contagens obtidas não apresentaram relação clara com a forma de armazenamento dos fertilizantes (sacos de ráfia, barris ou empilhados no solo), tipo de esterco utilizado na formulação ou tempo de compostagem declarado pelos produtores (p<0,05; ANOVA seguida de Tukey).

Tabela 5. Contagens (log UFC/g ou mL) de *Enterobacteriaceae* (Média ± DP)

Propriedade	Fertilizante	Alface do solo	Alface lavada	Água de irrigação	Água de lavagem
A	4,2 ± 1,5	4,8 ± 0,7 [a]	2,9 ± 0,6 [b]	2,3 ± 0,1	<1
B	4,3	4,3 ± 0,6 [a]	4,0 ± 0,7 [a]	2,2	<1
C	6,4 ± 0,6	4,1 ± 0,3 [a]	3,2 ± 0,9 [a]	<1	<1
D	4,9 ± 0,1	4,6 ± 0,4 [a]	3,1 ± 0,1 [b]	3,5 ± 0,1	<1
E	4,0 ± 2,6	4,2 ± 0,3 [a]	4,5 ± 0,5 [a]	2,0	2,0 ± 0,1
F	<1	4,9 ± 0,9 [a]	5,3 ± 0,5 [a]	2,2 ± 0,1	<1
G	7,2 ± 0,1	5,6 ± 0,3 [a]	4,4 ± 1,0 [a]	1,9 ± 0,1	<1
H	6,2 ± 0,6	5,4 ± 0,1 [a]	5,3 ± 0,4 [a]	2,0 ± 0,4	<1
I	5,1	5,3 ± 0,3 [a]	4,8 ± 0,5 [a]	2,2 ± 0,6	3,0 ± 0,3
J	3,0 ± 0,1	5,4 ± 0,2 [a]	3,2 ± 0,6[b]	2,3 ± 0,2	<1

Letras diferentes nas linhas, representam diferenças estatisticamente significantes entre as contagens de *Enterobacteriaceae* nas amostras de alface do solo e lavada (p<0,05; teste *t student*)

As alfaces coletadas diretamente do solo apresentaram contagens entre 4,1 ± 0,3 e 5,6 ± 0,3 log UFC/g, enquanto as contagens obtidas nas alfaces lavadas variaram entre 2,9 ± 0,6 a 5,3 ± 0,5 log UFC/g. Estes valores estão de acordo com os encontrados por OLIVEIRA et al., (2010) em alfaces das variedades americana e romana produzidas sob o sistema orgânico na Espanha (5,2 ± 1,1 log UFC/g). As contagens de *Enterobacteriaceae* obtidas neste estudo também estão de acordo com as encontradas por MAFFEI et al., (2016) em vegetais folhosos antes da lavagem (5,2 ± 0,5 log UFC/g) e similares às encontradas nas amostras submetidas à lavagem e sanitização com produtos à base de cloro (4,1 ± 1,2 log UFC/g), em dez unidades de processamento mínimo de vegetais, localizadas no Estado de São Paulo. Além disso, os resultados obtidos neste estudo são inferiores aos reportados por Osaili et al., (2018) em alface americana convencional minimamente processada (6,7 ± 0,3 log UFC/g) na Jordania. Mesmo sendo semelhantes ou inferiores às obtidas por esses autores, as contagens observadas neste estudo podem ser consideradas preocupantes, devido à possibilidade de presença de enteropatógenos ou patógenos oportunistas.

A água de irrigação apresentou contagens de *Enterobacteriaceae* entre <1 log UFC/mL e 3,5 ± 0,1 log UFC/mL. No entanto, não foi possível estabelecer uma relação entre as contagens nas amostras de água de irrigação com a origem da água (lago ou riacho), pois não ouve diferença significativa ($p < 0,05$; ANOVA seguida de Tukey) entre as amostras. Apenas a água dos tanques de lavagem das propriedades E e I apresentaram contagens de *Enterobacteriaceae* (2,0 ± 0,1 log UFC/mL e 3,0 ± 0,3 log UFC/mL, respectivamente). Na propriedade E, a água de lavagem era coletada na mesma fonte utilizada para a irrigação (lago), sem tratamento prévio e sem emprego de sanitizantes no processo. A lavagem das hortaliças resultou em reduções significativas ($p < 0,05$; teste *t student*) de *Enterobacteriaceae* (>1 log UFC/g) em três das dez propriedades analisadas (A, D e J), ressaltando a importância desta prática e do uso de agentes sanitizantes para a promoção da qualidade microbiológica do produto.

Embora a lavagem apenas com água possa provocar uma redução da carga microbiana em hortaliças, esta redução nem sempre é suficiente para que o alimento seja classificado como seguro. O uso de agentes sanitizantes é a forma mais eficaz de garantir a segurança microbiológica de hortaliças (OSAILI et al., 2018). Gomes Neto et al., (2012) avaliaram o efeito da lavagem sobre a população de bactérias aeróbias mesófilas em alface americana orgânica comercializada na cidade de João Pessoa, constatando que enquanto a lavagem realizada apenas com água destilada reduziu a contagem em 0,8 log UFC/g, o hipoclorito de sódio (100 mg/L) resultou em redução de 5,6 log UFC/g.

5.1.2. Identificação das espécies bacterianas por MALDI-TOF MS

Dentre os 413 isolados bacterianos obtidos de amostras de água, alfaces e fertilizantes orgânicos, 256 (57%) puderam ser identificados quanto ao gênero e espécie (*score* ≥ 2.0) utilizando-se o banco de dados Biotyper 3.1. Esta taxa de identificação foi superior a relatada por Fröhling et al.,

(2018), que identificaram 46% das bactérias isoladas de etapas do processamento pós-colheita de endívia, utilizando o banco de dados SARAMIS™ (BioMérieux Deutschland GmbH, Alemanha).

MALDI-TOF MS é amplamente utilizado para a identificação de espécies patogênicas clinicamente relevantes em todo o mundo e vem sendo cada vez mais aplicado em análises microbiológicas de alimentos (DE KOSTER, 2016). Nos últimos anos, tem crescido o número de estudos demonstrando a aplicação do MALDI-TOF MS como uma ferramenta discriminatória de triagem, assim como para a identificação de gênero e espécies deteriorantes e patogênicas na cadeia alimentar (BÖHME et al., 2012; HAUSDORF et al., 2013; QUINTELA-BALUJA et al., 2013; JADHAV et al., 2015; MIRANDA et al., 2017; FRÖHLING et al., 2018; EL-JENI et al., 2019; YU et al., 2019). Os espectros bacterianos obtidos pelo MALDI-TOF são identificados por comparação a um banco espectral, o que torna o sucesso da análise diretamente dependente do banco de dados utilizado. Espécies frequentemente isoladas possuem perfis proteômicos já compilados e, consequentemente, maiores chances de identificação (HA et al., 2019). Poucos estudos explanaram a composição de espécies bacterianas em pontos da cadeia produtiva de hortaliças por espectrometria de massas, resultando em menor cobertura dos bancos de dados e, consequentemente, menores taxas de identificação com grau de confiabilidade para a determinação de espécies. Outros fatores como o meio de cultura utilizado para isolamento, o tempo de incubação e o método de extração também influenciam a sensibilidade para a diferenciação na classificação taxonômica das cepas analisadas (HAUSDORF et al., 2013; DE KOSTER, 2016). Neste estudo, diversas combinações de meios de cultura e técnicas de extração foram previamente testadas e padronizadas para a obtenção de uma maior taxa de identificação.

Os isolados identificados neste este estudo compreenderam 45 espécies e 24 gêneros (Figura 4). Embora ágar VRBG tenha sido utilizado para favorecer o crescimento de *Enterobacteriaceae* na etapa de isolamento, outras famílias, em menor frequência, também puderam ser identificadas neste estudo (*e.g. Aeromonadaceae*, *Pseudomonadaceae* e *Microccaceae*). Não foram identificadas espécies patogênicas tipicamente associadas à Doenças Transmitidas por Alimentos. No entanto, muitas isolados identificados são deteriorantes típicos de vegetais e alguns, patógenos oportunistas.

Enterobacter cloacae foi a principal espécie identificada nas amostras de alface lavada nas propriedades (27%), enquanto *Enterobacter asburiae* predominou dentre os isolados das amostras de alface colhida nos canteiros de cultivo (39%), água dos tanques de lavagem (62%) e fertilizante orgânico compostado (23%). *Escherichia hermannii* e *Ochrobactrum intermedium* também foram predominantes nas amostras de fertilizante (23% cada). Já nas amostras de água de irrigação, *Morganella morganii* foi a principal espécie identificada, estando presente em 50% das amostras analisadas.

Bactérias identificadas neste estudo também foram relatadas por outros pesquisadores em hortaliças e pontos da cadeia produtiva, indicando que sua incidência é comum nestes produtos. O gênero *Enterobacter* também foi identificado por Richter et al., (2019) como sendo o mais frequente

entre isolados obtidos de um mix de amostras de espinafre, alface, pepino, tomate e vagem, adquiridas em Gauteng, Africa do Sul. *E. cloacae*, *E. asburiae*, *E. cowanii* e *E. ludwigii* foram as espécies identificadas pelos autores, utilizando MALDI-TOF MS. Comumente relacionado à deterioração de alimentos, *Enterobacter* spp. também têm sido associado à infecções do trato urinário, respiratório e intestinal, especialmente em pacientes com sistema imunológico debilitado e dentro do ambiente hospitalar (KUS; BURROWS, 2007).

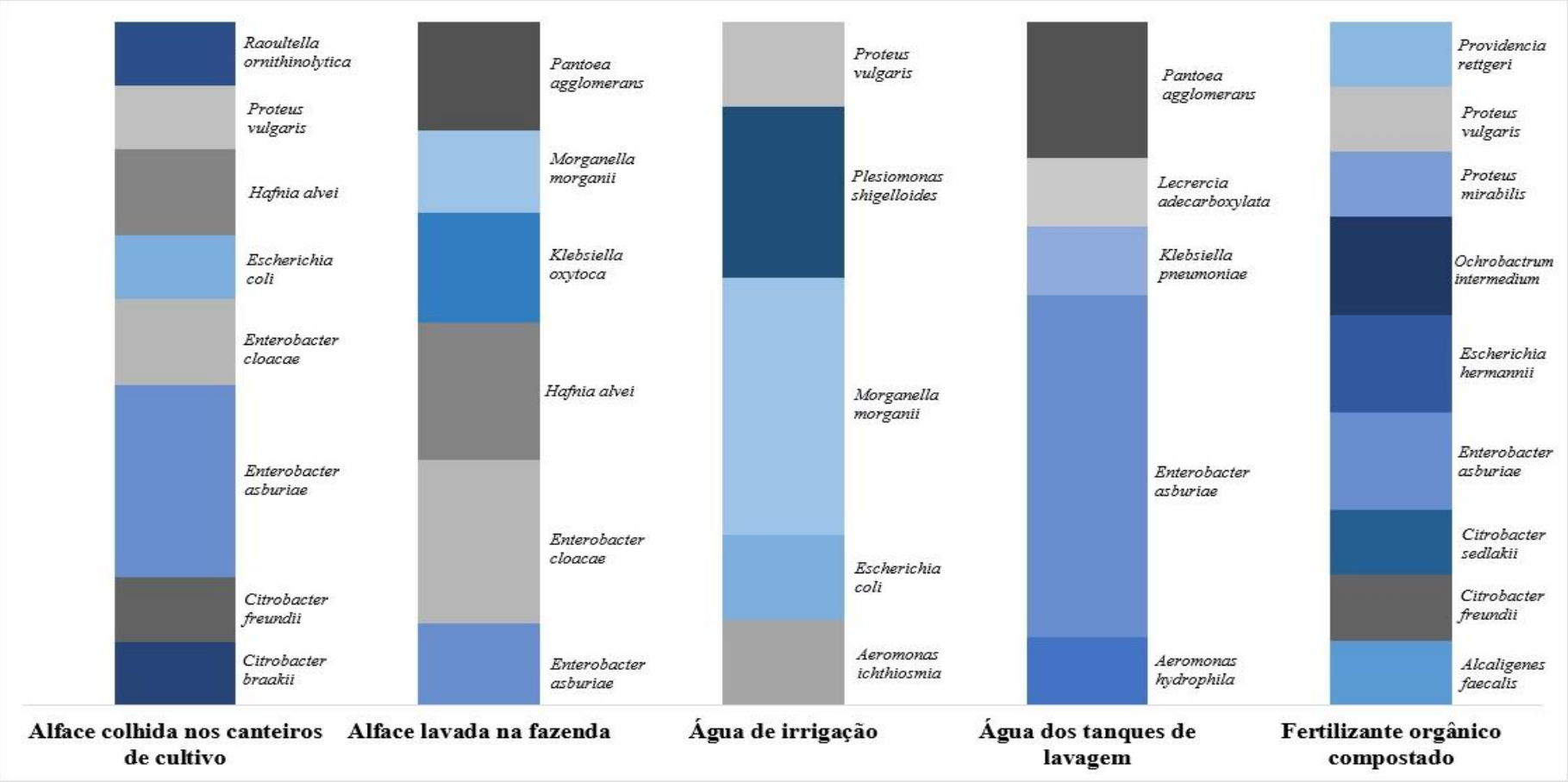
Osaili et al., (2018) identificaram *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter clocae* e *Klebsiella oxytoca* como as principais espécies encontradas em amostras de alface americana na Jordânia. Estas espécies também estavam presentes nas amostras de alface lavada no presente estudo: *K. pneumoniae* foi detectada em 9% das amostras analisadas e *E. clocae* e *K. oxytoca* em 27% e 18%, respectivamente. Utilizando MALDI-TOF MS, Hausdorf et al., (2013) detectaram *Pantoea agglomerans*, *Raoutella* sp., *Acinetobacter* sp., *Aeromonas* sp. e *Comamonas* sp. em amostras de espinafre antes e após a lavagem e em água dos tanques de lavagem das hortaliças em uma planta de processamento de espinafre em Brandenburg, Alemanha.

Mcmahon; Wilson (2001) detectaram a presença de *Aeromonas caviae* em alfaces orgânicas comercializadas na Irlanda do Norte. Algumas espécies de *Aeromonas* têm sido descritas como patógenos oportunistas, tais como *A. hydrophila* que foi associada a infecções gastrointestinais em humanos e *A. caviae* que possui a capacidade de expressar fatores de virulência. Neste estudo, embora em baixa frequência, observou-se a presença de *A. hydrophila* em alface lavada (9% das amostras) e água de irrigação (8% das amostras), enquanto *A. caviae* foi isolada em 4% das alfaces coletadas diretamente do solo. A associação de *Aeromonas* a doenças gastrointestinais ainda não está bem esclarecida, mas alguns estudos detectaram cepas de *Aeromonas* spp. em fezes de pacientes com diarreia (SCHUETZ, 2019). Como não é um patógeno comumente pesquisado em laboratórios clínicos, os relatos de prevalência ainda são baixos. A técnica MALDI-TOF MS apresentou desempenho excelente para a identificação rápida de patógenos emergentes como *Aeromonas*, em comparação aos métodos tradicionais de cultura, que são dispendiosos e demorados (DONOHUE et al., 2006).

Escherichia coli é um micro-organismo indicador de condições higiênicas na cadeia produtiva de hortaliças e sua presença está associada à contaminação fecal. Neste estudo, *E. coli* estava presente em 13% das amostras de alface do solo e 9% das de alface lavada, e também em 17% das amostras de água de irrigação e 8% das amostras de fertilizantes compostados. Tais resultados reforçam a necessidade de tratamento na água de irrigação, assim como maior controle dos parâmetros da lavagem das hortaliças e da compostagem dos fertilizantes.

Segundo Hö; Tetens e Schwaiger, (2018), produtos de origem vegetal são potenciais veiculadores de Bactérias Resistentes a Antibióticos (BRA), principalmente *Enterobacteriaceae* produtoras de β-Lactamase de Espectro Estendido (ESBL). As possíveis rotas de acesso destas bactérias às hortaliças são a água de irrigação, solo e fertilizantes orgânicos empregados na cadeia

Figura 4. Espécies identificadas por MALDI-TOF MS (*Score* ≥ 2.0) com ocorrência superior a 10% em amostras da cadeia produtiva de hortaliças orgânicas



Outras espécies identificadas (ocorrência inferior a 10%) nas amostras de alface colhida nos canteiros de cultivo[1], alface lavada na fazenda[2], água de irrigação[3] e fertilizante orgânico[4]: *Acinetobacter baumannii*[4], *Acinetobacter calcoaceticus*[1], *Acinetobacter pittii*[1], *Aeromonas caviae*[1], *Aeromonas hydrophila*[2,3], *Citrobacter amalonaticus*[4], *Citrobacter freundii*[2], *Comamonas aquática*[1], *Cronobacter sakazakii*[4], *Edwardsiella tarda*[1], *Enterobacter aerogenes*[4], *Enterobacter cloacae*[3,4], *Enterobacter Kobei*[4], *Escherichia coli*[2,4], *Klebsiella oxytoca*[1,3], *Klebsiella pneumoniae*[2,3,4], *Klebsiella variicola*[3], *Kluyvera intermedia*[1], *Lecrercia adecarboxylata*[1,2], *Morganella morganii*[1,4], *Micrococcus luteus*[1], *Ochrobactrum tritici*[1,4], *Pantoea agglomerans*[1], *Pantoea ananatis*[2], *Proteus mirabilis*[1], *Proteus vulgaris*[2], *Providencia alcalifaciens*[1,2], *Providencia rettgeri*[1,2,3], *Providencia stuartii*[4], *Pseudomonas chlororaphis*[2], *Pseudomonas putida*[1], *Raoultella ornithinolytica*[2], *Serratia fonticola*[1,3], *Serratia marcescens*[2,3], *Serratia ureilytica*[1,2] e *Yokenella regensburgei*[3].

produtiva. No entanto, avaliações quantitativas de risco relacionado ao consumo de vegetais contaminados por BRA são escassos na literatura. Segundo RICHTER et al., (2019), 17,4% dos isolados de *Enterobacteriaceae* obtidos de vegetais comercializados na África do Sul foram produtores de ESBL e resistentes a enzimas AmpC, com domínio de *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter asburiae* e *Klebsiella pneumoniae*. Estas espécies também foram detectadas na presente pesquisa em diferentes pontos da cadeia produtiva de hortaliças orgânicas.

5.1.3. Enumeração de coliformes totais e *Escherichia coli* na água de irrigação e na água dos tanques de lavagem das hortaliças

A Tabela 6 apresenta as contagens de coliformes totais e *Escherichia coli* obtidas nas águas de irrigação e dos tanques de lavagem das hortaliças. Os resultados foram calculados com base na tabela de Número Mais Provável (RICE et al., 2012) para combinações de tubos positivos e negativos na inoculação de 10 alíquotas de 10 mL de amostra por tubo.

Tabela 6. Coliformes totais e *Escherichia coli* nas amostras de água de irrigação e de lavagem de hortaliças orgânicas (Média ± DP (NMP/100 mL))

Propriedade	Água de irrigação		Água de lavagem	
	Coliformes totais	***E. coli***	**Coliformes totais**	***E. coli***
A	>23,0	23,0	<1,1	<1,1
B	>23,0	5,1 ± 2,9	<1,1	<1,1
C	>23,0	7,1 ± 0,18	<1,1	<1,1
D	>23,0	>23,0	<1,1	<1,1
E	>23,0	2,3 ± 1,2	>23,0	2,3 ± 1,2
F	>23,0	>23,0	<1,1	<1,1
G	>23,0	>23,0	<1,1	<1,1
H	>23,0	>23,0	5,2 ± 1,6	1,1
I	>23,0	>23,0	>23,0	<1,1
J	>23,0	>23,0	<1,1	<1,1

Todas amostras de água de irrigação coletadas diretamente dos pontos de captação nas propriedades (lagos ou riachos) apresentaram contaminação por coliformes totais e *E. coli*. Em todas as amostras de água de irrigação analisadas, as contagens de coliformes totais ultrapassaram o limite superior de contagem do método empregado (> 23 NMP/100 mL). As contagens de *E. coli* na água de irrigação também foram superiores a esse limite em seis propriedades (A, F, G, H, I e J).

A contaminação de águas superficiais utilizadas para a irrigação tem sido relatada como uma das principais fontes de contaminação microbiológica de hortaliças no campo, juntamente com os fertilizantes orgânicos (MAFFEI et al., 2019). A presença de *E. coli* na água é um indicativo de contaminação fecal e ressalta a importância da implementação de medidas de tratamento antes da aplicação nos campos de produção. Surtos ocasionados pelo consumo de hortaliças contaminadas por

enteropatógenos tiveram a origem da contaminação associada a fontes de água nas unidades produtoras, evidenciando ainda mais os riscos à saúde do consumidor (CDC, 2011b, 2019).

A incidência de *E. coli* no presente estudo foi similar aos resultados apresentados por De Quadros Rodrigues et al., (2014) no Rio Grande do Sul, Brasil. Segundo os autores, todas as amostras analisadas da água de irrigação utilizada em unidades produtoras de alface orgânico apresentaram contagens de coliformes totais variando de 12 a > 23 NMP/100mL e *E. coli* variando entre de 1,1 a >23 NMP/100mL. Além disso, *E. coli* O157:H7 foi identificada em uma das propriedades estudadas. Decol et al., (2017) também detectaram *E. coli* em 84,8% das amostras de água de irrigação coletadas no Rio Grande do Sul, Brasil. Na Bélgica, Holvoet et al., (2014) relataram presença de *E. coli* em 59,2% das amostras de água utilizada para finalidade semelhante. No México, Canizalez-Roman et al., (2019) reportaram que 47% das 472 amostras de água utilizada para a irrigação de culturas agrícolas apresentavam contagens estimadas de coliformes fecais superiores aos limites mexicanos (≥ 1104 UFC/mL) e que 43,6% apresentavam contaminação por *E. coli*, incluindo cepas diarreiogênicas (DEC) em 14% das amostras. Dentre as cepas DEC isoladas, 70% foram resistentes a antibióticos. Os dados apresentados evidenciam que a água de irrigação pode ser uma importante via de transmissão de enteropatógenos para hortaliças.

Em sete das dez propriedades avaliadas, os resultados de coliformes totais e *E. coli* nas amostras de água de lavagem ficaram abaixo do limite mínimo de contagem. Nestas propriedades, a água de lavagem provém de poços artesianos, e agentes sanitizantes à base de cloro são empregados. As contagens de *E. coli* nas propriedades E e H foram 2,3 ± 1,2 NMP/100mL e 1,1 ± 0,0 NMP/100mL, respectivamente. Na propriedade E não se emprega sanitizantes nos tanques de lavagem e utiliza-se água de lago sem tratamento prévio. Na propriedade H, a água de lavagem era proveniente de poços e recebia tratamento com sanitizante à base de cloro, o que sugere um uso incorreto deste sanitizante, assim como a necessidade de implementação de parâmetros de controle. A incidência de *E.coli* em amostras de água de tanques de lavagem de alface orgânica também foi relatada por De Quadros Rodrigues et al., (2014), no Rio Grande do Sul, Brasil. As contagens de coliformes totais nas amostras coletadas em três propriedades variaram entre 5,1 e >23,0 NMP/100 mL e de *E. coli* entre 1,1 e >23,0 NMP/100 mL, tendo sido detectado *E. coli* O157:H7 na água do tanque de uma propriedade.

Esses resultados indicam que é necessário avaliar a qualidade microbiológica da água em tempo real, o que requer metodologias analíticas de fácil manuseio, baixo custo e adequadas ao ambiente agrícola para o controle do nível de cloro livre nos tanques de lavagem. Também vale ressaltar que a aplicação de agentes sanitizantes na lavagem pode conferir maior rentabilidade às propriedades, pelo aumento da qualidade e vida útil das hortaliças produzidas. Este argumento pode ser utilizado para melhorar o engajamento de produtores na promoção da segurança de sua produção.

5.1.4. Pesquisa de *Salmonella* spp.

Salmonella spp. não foi detectada em nenhuma das amostras de alface, fertilizante ou água quando analisadas pelas metodologias ISO 6579:2002 e ISO 19250:2010, respectivamente (ausência em 25 g ou 100 mL). Tais resultados colocam as hortaliças em acordo com os padrões exigidos pela legislação brasileira atualmente vigente (BRASIL, 2001), que estabelece ausência deste patógeno em 25g de produto. No entanto, quando as amostras foram analisadas pelo método de cultivo-independente qPCR, detectou-se DNA de *Salmonella* spp. em uma amostra pré-enriquecida de alface lavada, com população estimada de 1,1 log UFC/g. Deve ser ressaltado que a quantificação de *Salmonella* não expressa as populações reais nas amostras de produto, embora possibilitem a comparação dos resultados obtidos para outras amostras na mesma etapa de pré-enriquecimento.

A amostra de alface positiva para DNA de *Salmonella* spp. foi coletada na propriedade B, onde as alfaces não são pré-lavadas mas utiliza-se produto à base de cloro para a sanitização. O tempo de imersão da hortaliça na solução sanitizante não é padronizado, podendo ser inferior a um minuto. A concentração do princípio ativo no tanque de lavagem também não é controlada, sendo portanto, um procedimento ineficaz para o controle de enteropatógenos que possam estar presentes no vegetal. Na propriedade B, há um ambiente reservado para a lavagem das hortaliças, com funcionários adequadamente paramentados, o que poderia garantir uma maior segurança ao alimento, se não fosse a ausência das Boas Práticas de Higiene. Nessa propriedade, usava-se resíduos da agroindústria de pescado e cama de frango na formulação do fertilizante, que era compostado por 15 dias antes do uso e armazenado em sacos de ráfia. Embora a utilização destes ingredientes possa sugerir uma relação com a positividade do patógeno em uma das amostras, isto não pode ser assegurado em função da baixa ocorrência de *Salmonella* spp. nas amostras analisadas.

A amostra de alface lavada positiva para *Salmonella* spp. apresentou contagens de *Enterobacteriaceae* de 4,0 ± 0,7 log UFC/g, valor próximo aos obtidos nas contagens de fertilizante (4,3 ± 0,0 log UFC/g) e alface do solo (4,3 ± 0,6 log UFC/g) desta mesma propriedade, indicando a ineficiência no processo de lavagem das hortaliças.

A incidência de *Salmonella* spp. em hortaliças e vegetais frescos relatada na literatura é geralmente baixa ou ausente. Utilizando metodologias convencionais de cultivo-dependente, Gomes Neto et al., (2012) não detectaram nenhuma positividade para *Salmonella* spp. ao analisar 180 amostras de alface americana orgânicas, convencionais e hidropônicas, comercializadas na cidade de João Pessoa, Brasil. Também De Quadros Rodrigues et al., (2014) avaliaram *Salmonella* spp. em água de irrigação e lavagem e alface orgânica coletadas no Rio Grande do Sul, observando ausência nas amostras de água, mas positividade em uma amostra de alface analisada duas semanas antes da data de colheita. Ao analisar pontos da cadeia produtiva de alface no Rio Grande do Sul, Ceuppens et al., (2014) identificaram o patógeno em uma amostra de alface (1,85%) e uma de água de irrigação (2,08%). No Estado de São Paulo, Maffei et al., (2019) identificaram DNA de *Salmonella* em apenas duas amostras de alface orgânica (1%) analisadas, com populações estimadas entre 1,0 e 1,2 log UFC/g de amostra pré-enriquecida.

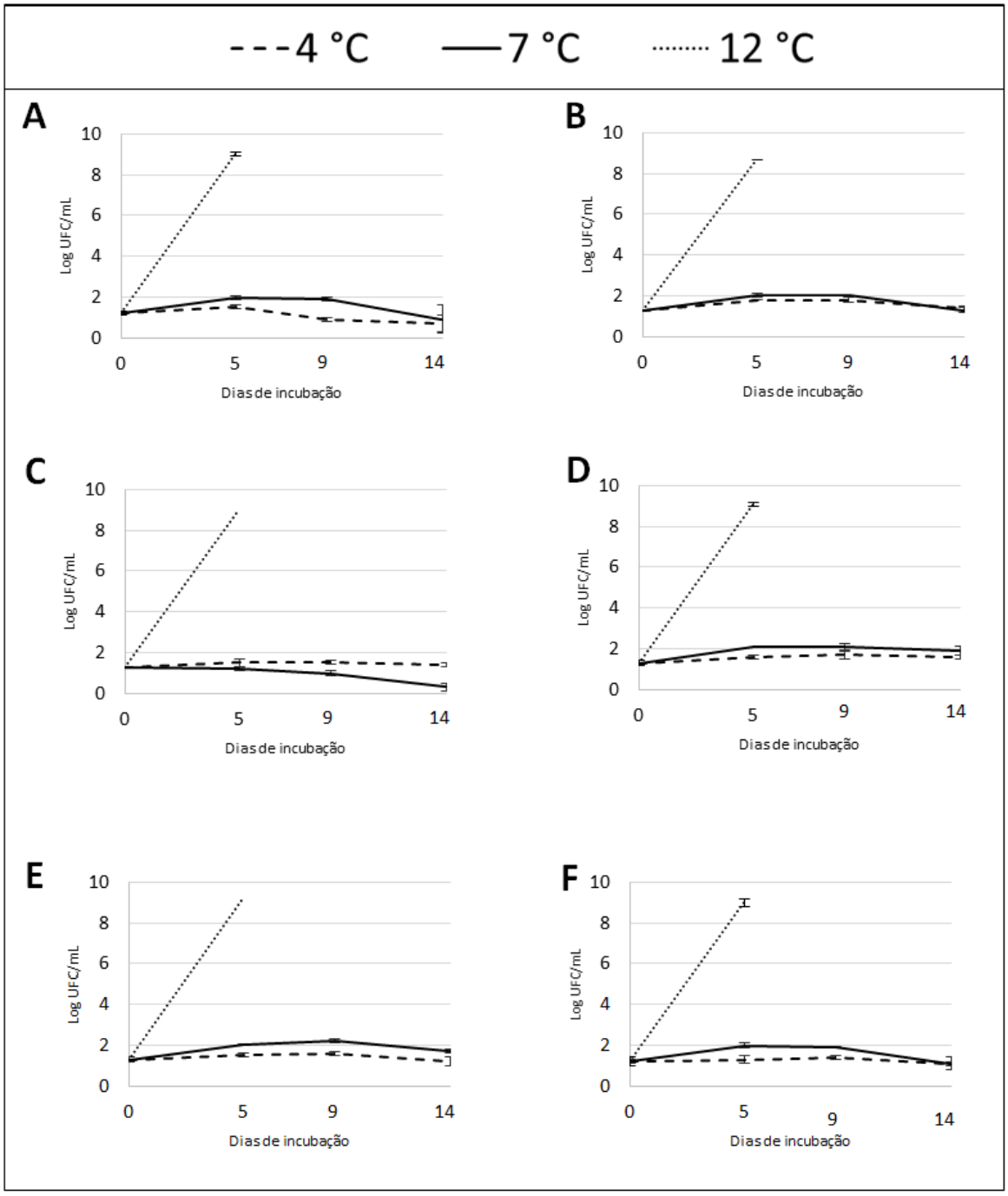
Mesmo que a incidência de *Salmonella* spp. em alface seja baixa, como observado neste estudo e nas pesquisas citadas anteriormente, é preciso considerar que uma única alface contaminada com *Salmonella* spp. pode transmitir o patógeno para um lote inteiro de produção durante a etapa de lavagem, quando fatores como tempo de imersão e concentração do princípio ativo sanitizante não forem adequados. Um outro fator de risco é contaminação cruzada nas residências e outros locais de preparação e consumo, quando esta hortaliça contaminada é armazenada próximo a outros alimentos, disseminando a contaminação.

5.2. Avaliação da persistência de *Bacillus thuringiensis* nas hortaliças e possíveis interações com bactérias epifíticas e *Salmonella* spp. presentes

5.2.1. Multiplicação das cepas de *S. enterica* em BHI a 4 ºC, 7 ºC e 12 ºC

A multiplicação das cepas de *S. enterica* em caldo BHI a 4 ºC, 7 ºC e 12 ºC é apresentada na Figura 5. Observou-se que apenas *S.* Typhimurium e *S.* Montevideo foram capazes de se multiplicar a 4 ºC e 7 ºC, apresentando um aumento médio de apenas 0,5 e 0,9 log UFC/mL, respectivamente, no 9º dia de incubação. Em contrapartida, todas as cepas testadas multiplicaram-se bem a 12 ºC, atingindo contagens acima de 8,5 log UFC/mL no 5º dia. De acordo com a ISO 10976-1:2019 (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2019), que descreve as diretrizes para a realização de testes de desafio, algumas associações consideram que houve multiplicação relevante quando o aumento populacional é superior a 0,5 log, enquanto outras requerem que o aumento seja superior a 1,0 log. Deste modo, é possível concluir que o potencial de multiplicação a 4 °C é insignificante, mas que a 7 ± 1 °C é possível que algumas cepas se multipliquem, embora muito lentamente. Estes resultados corroboram os resultados anteriormente relatados por Morey e Singh, (2012).

Figura 5. Multiplicação de *S.* Thompson (A), *S.* Typhimurium (B), *S.* Typhimurium *monophasic* (C), *S.* Enteritidis (D), *S.* Montevideo (E) e *S.* Senftemberg (F) em BHI a 4 ºC, 7ºC e 12 ºC

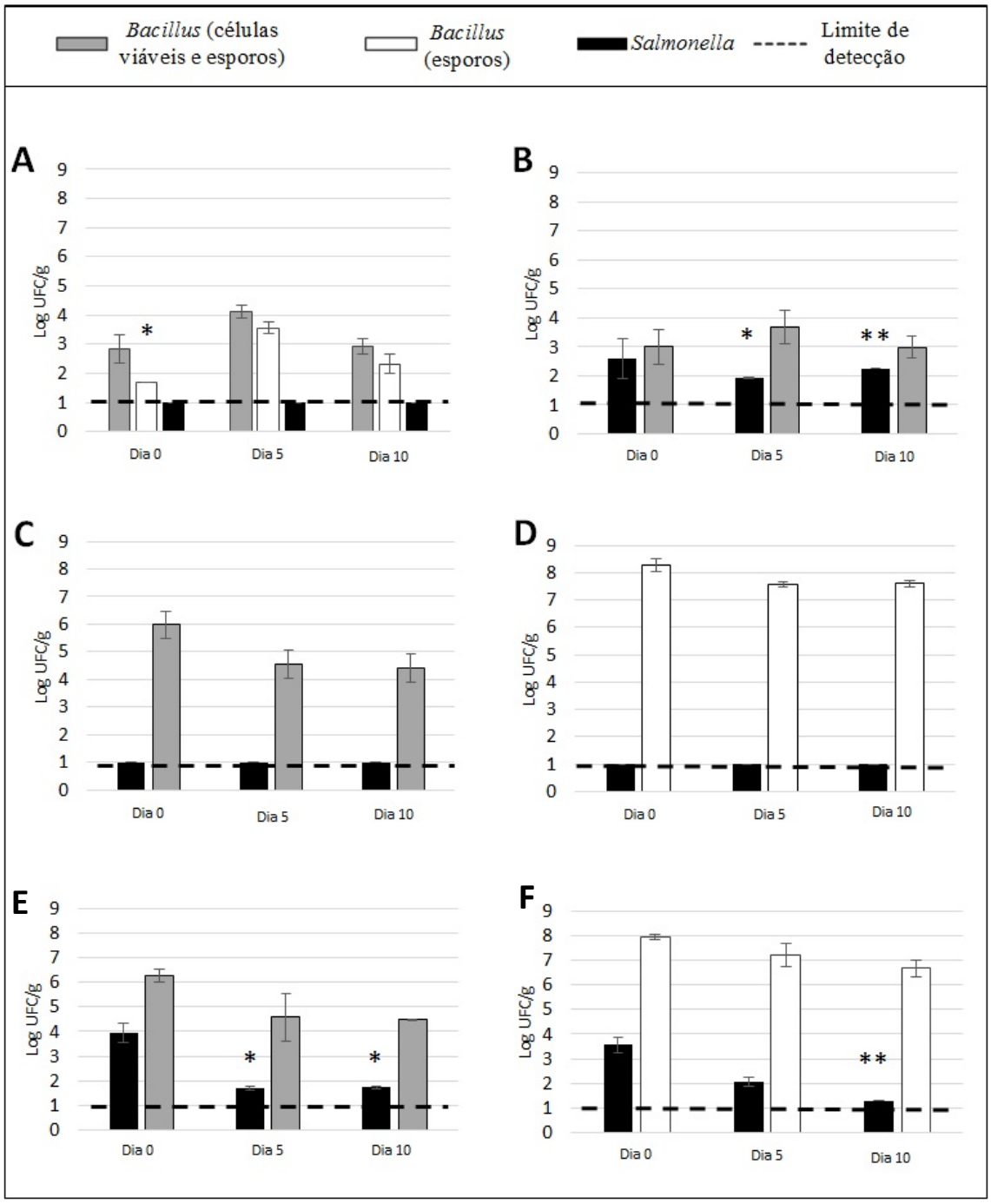


5.2.2. Sobrevivência e interações de *Salmonella* e *Bacillus cereus* presuntivo (incluindo *Bacillus thuringiensis*) em espinafre

O comportamento de *Salmonella* e *Bacillus cereus presuntivo (incluindo Bt)* em espinafres cultivados a 22 ± 2 ºC e 60 ± 15% de umidade relativa, inoculados separadamente e em co-cultura, é apresentado na Figura 6. Quando as plantas foram inoculadas apenas com *S.* Montevideo, as populações do patógeno apresentaram uma redução média de 0,4 log UFC/g, 10 dias após a

inoculação (Figura 6B). Quando *S.* Montevideo foi co-inoculada com células vegetativas (Figura 6E) e esporos (Figura 6F) de *Bacillus thuringiensis* subsp. Aizawai, as reduções médias do patógeno foram de 2,2 e 2,3 log UFC/g, respectivamente.

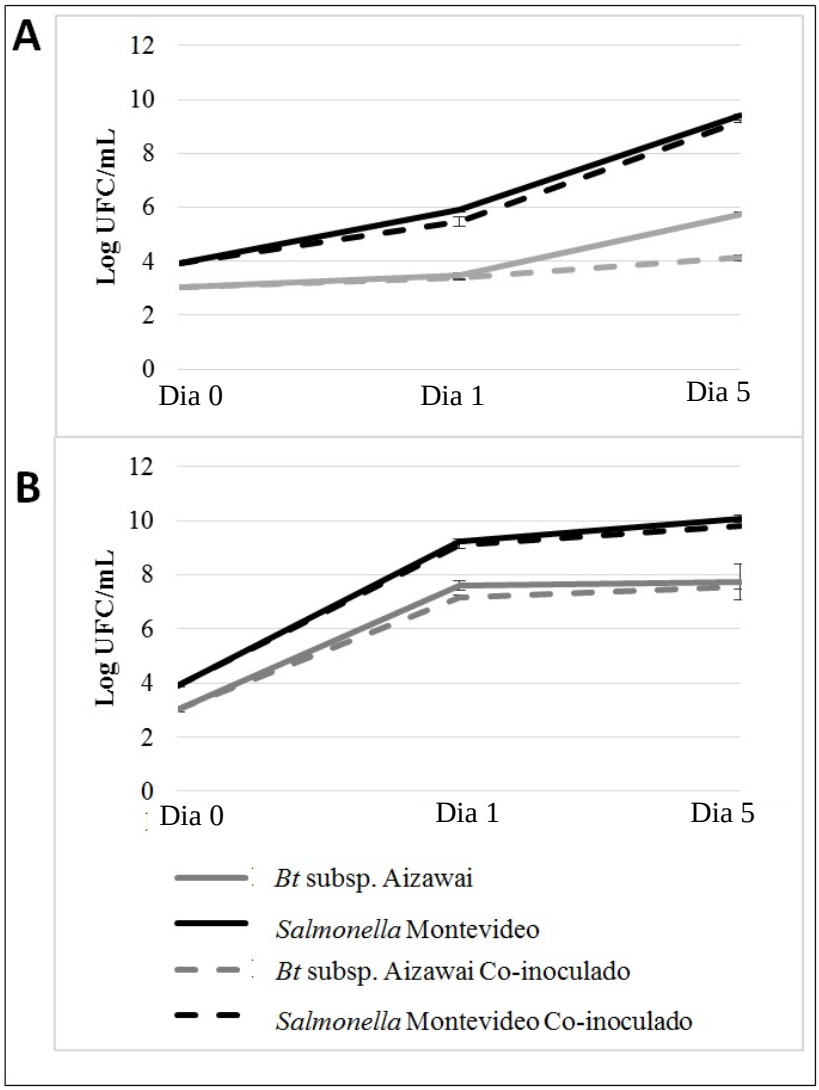
Figura 6. Comportamento de *Bacillus cereus* presuntivo e *Salmonella* no pré-colheita de espinafre pulverizado com água destilada estéril (A), com *S.* Montevideo (B), com células vegetativas de *B. thuringiensis* subsp. Aizawai (C), com esporos de *B. thuringiensis* subsp. Aizawai (D), com células vegetativas de *B. thuringiensis* subsp. Aizawai e *S.* Montevideo (E) e com esporos de *B. thuringiensis* subsp. Aizawai e *S.* Montevideo (F).



*Uma e **duas amostras com contagens < 1 Log UFC/g

A Figura 7, relativa à multiplicação de *S.* Montevideo e *Bacillus thuringiensis* subsp. Aizawai em BHI a 12 ºC (A) e 22 ºC (B), mostra que não houve redução da população de *Salmonella* na presença de *Bt* quando em co-cultura em caldo BHI nas temperaturas testadas ($p<0,05$; teste *t student*), sugerindo que fatores relacionados à adesão de *S*. Montevideo às folhas de espinafre podem ter desempenhado um papel importante na redução das contagens apresentadas na Figura 6.

Figura 7. Multiplicação de *Salmonella* Montevideo e *Bacillus thuringiensis* subsp. Aizawai, separadamente e em co-cultura, em BHI a 12 ºC (A) e 22 ºC (B)



Em um estudo similar realizado por Li; Uyttendaele, (2018) em folhas de manjericão durante o cultivo, observou-se persistência de cepas de *S.* Typhimurium e *S.* Thompson por 3 dias após a inoculação, com reduções de 3 e 4 log UFC/folha, respectivamente. Segundo os autores do estudo, a redução observada pode estar associada à internalização de *Salmonella* nos tecidos foliares ou à baixas taxas de adesão das células bacterianas às folhas. Além disso, sabe-se que o estresse ambiental e as condições de cultivo de vegetais, como luz ultravioleta, temperatura e dessecação, podem influenciar na adesão e persistência de *Salmonella* na superfície das plantas (ERICKSON et

al., 2019). López-Gálvez; Gil; Allende, (2018), observaram que plantas de alface cultivadas em UR de 60% e 85% apresentaram reduções de *S.* Typhimurium estimadas em 2 e 1 log UFC/g, respectivamente, sete dias após a inoculação, indicando que quanto mais baixa UR, menor a persistência do patógeno. No presente estudo, as plantas foram cultivas sob UR de 60 ± 15%, o que pode ter influenciado a persistência de *Salmonella* e causado redução do número de plantas onde a bactéria pôde ser detectada (Figura 6B).

A microbiota natural das plantas também pode influenciar a adesão e persistência de patógenos na superfície das folhas. Lopez-Velasco et al., (2012) avaliaram 1512 isolados epifíticos de folhas de espinafre e identificaram 23 espécies com potencial inibitório de *E. coli* O157:H7. Os autores observaram que na presença de *Erwinia persicina* houve uma redução estimada em 1,8 log UFC/g nas contagens de *E. coli* O157:H7, quando co-inoculados em folhas de espinafre. Os autores também verificaram que 6 isolados eram capazes de favorecer a multiplicação do patógeno. Markland et al., (2015) relataram que a aplicação de *Bacillus subtilis* UD1022 em raízes de alface e espinafre desencadeou o fechamento dos estômatos das plantas. Este efeito reduziu a adesão e persistência de *Listeria innocua* nas folhas de alface, três dias após a inoculação. Avci; Çağri-Mehmetoğlu; Arslan, (2017) observaram que alguns compostos produzidos *in vitro* por *Bacillus subtilis* ZBP4 isolados do solo apresentaram efeito antimicrobiano contra patógenos Gram negativos (*S.* Typhimurium, *S.* Enteritidis e *E.* coli O157:H7) e Gram positivos (*Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*).

As contagens de células vegetativas e esporos de *Bacillus cereus* presuntivos inoculados nas folhas de espinafres estão apresentadas nas Figuras 6C e 6D, respectivamente. Os resultados indicaram que a redução média das contagens de esporos nas plantas foi de apenas 0,6 log UFC/g, 10 dias após a inoculação, enquanto as células vegetativas apresentaram redução de 1,6 log UFC/g no mesmo período. Os resultados indicam que as populações de esporos de *Bacillus thuringiensis* subsp. Aizawai permaneceram quase inalteradas nas folhas de espinafre durante pelo menos 10 dias após a inoculação (Figuras 6D e 6F). Além disso, as populações de esporos foram menos impactadas pelos fatores ambientais de cultivo que as populações de células vegetativas (Figura 6C e 6E). Esses dados são relevantes, considerando que *Bt* é aplicado em culturas agrícolas na forma de esporos, e não existem regulamentações que definam o período de carência para a colheita (EFSA, 2016).

Fatores ambientais, como radiação ultravioleta e chuva, também podem influenciar a sobrevivência de micro-organismos (esporos e células vegetativas) nas plantas. O fato de *Bacillus cereus* ser capaz de formar biofilmes em superfícies de alimentos e instalações (RYU; BEUCHAT, 2005), e de biofilmes constituídos por esporos serem mais resistentes que células vegetativas, principalmente em função do caráter hidrofóbico e da presença de apêndices na superfície dos esporos (PAGEDAR; SINGH, 2012), podem ser a razão da persistência dos esporos ser maior do que a das células vegetativas na superfície de espinafres durante o cultivo.

Outros fatores, como a contaminação bacteriana do ambiente de produção, o sistema de cultivo (estufa ou campo aberto) e a formação de biofilmes, podem influenciar o acesso e a persistência das bactérias nas plantas. No presente estudo, as contagens médias de *Bacillus cereus* presuntivos (incluindo *Bt*) nas amostras de solo orgânico utilizadas para o cultivo de espinafre foram 3,9 ± 0,1 log UFC/g, mas não foi possível fazer contagens nas sementes utilizadas para o plantio das amostras (<1 log UFC/g). Esses dados estão de acordo com Bassi et al., (2016), que consideram que bactérias do grupo *Bacillus cereus*, incluindo *Bacillus thuringiensis* e seus esporos, podem ser facilmente encontradas no ambiente (*e.g.* solo, água e plantas), podendo fazer parte da microbiota natural de hortaliças.

Considerando que os experimentos com espinafre foram desenvolvidos sob condições controladas de cultivo e que as plantas tiveram influência mínima de fatores ambientais, mais experimentos em cultivo aberto são recomendados para avaliar a persistência do *Bt* no campo. Entretanto, há evidências da persistência de esporos de *Bt* em folhas de pinheiro e no solo de florestas plantadas por até seis e doze meses após a inoculação, respectivamente (KONECKA et al., 2014), o que sugere a capacidade dos esporos também persistirem durante o cultivo de hortaliças a céu aberto.

Com relação aos testes pós-colheita, quando *Salmonella* e células vegetativas de *Bacillus cereus* presuntivos foram inoculadas separadamente ou em co-cultura, observou-se que ambos foram capazes de sobreviver nas folhas de espinafre por até 5 dias a 12 ± 1 °C (Figura 8). Apesar de não ter apresentado multiplicação como em BHI (Item 5.2.1.), *Salmonella* persistiu nas folhas durante todo o período em teste. Resultados similares também foram observados por Sant'ana et al., (2012), que reportaram que *S.* Typhimurium, *S.* Typhi, *S.* Enterica, *S.* Infantis e *S.* Concord, quando co-inoculados, foram capazes de persistir em folhas de espinafre embaladas em atmosfera modificada e armazenadas por 6 dias a 7 °C e 15 °C. Embora não houvesse multiplicação a 7 °C, foi observado um aumento médio de 1,7 log UFC/g nas amostras armazenadas a 15 °C.

A estabilidade das contagens de *Bacillus cereus* presuntivos durante o armazenamento a 12 ºC indica que não houve germinação de esporos ou multiplicação celular neste período (Figuras 8C, 8D e 8E). Contagens de *Bacillus cereus* presuntivos próximas a 5 log UFC/g foram identificadas na amostra controle (Figura 8A), indicando que este micro-organismo pode estar presente como parte da microbiota epifítica natural das hortaliças. Por outro lado, foi observado que as populações de *Bacillus cereus* presuntivos de outras hortaliças minimamente processadas estudadas, variaram de <1 log UFC/g a 3,7 log UFC/g, dependendo do lote analisado (Figura 9). Resultados semelhantes foram encontrados em estudos realizados em Portugal por TANGO et al., (2014), que relataram contagens de *Bacillus cereus* presuntivo em amostras de espinafre orgânico entre 2.47 a 4.11 log UFC/g. Também SANTOS et al., (2012) obtiveram contagens de *B. cereus* presuntivo entre <2,0 e 3,2 log UFC/g em amostras de hortaliças. Contagens superiores a 10^5 UFC/g são preocupantes, devido à possibilidade de produção de enterotoxinas em níveis que podem ser um risco aos consumidores (EFSA, 2016).

Figura 8. Contagens de *Bacillus cereus* presuntivos e *Salmonella* spp. no pós-colheita de espinafre pulverizado com água destilada estéril como controle (A), com *Salmonella* Montevideo (B), com *Bacillus cereus* BC710 (C), com *Bacillus thuringiensis* ATCC 10792 (D), com *Bacillus thuringiensis* subsp. Aizawai (E), com *Bacillus cereus* BC710 e *Salmonella Montevideo* (F), com *Bacillus thuringiensis* ATCC 10792 e *Salmonella* Montevideo (G) e com *Bacillus thuringiensis* subsp. Aizawai e *Salmonella* Montevideo (H)e armazenado a 12 ºC. Cada ponto representa a média das triplicatas e as barras indicam o desvio padrão.

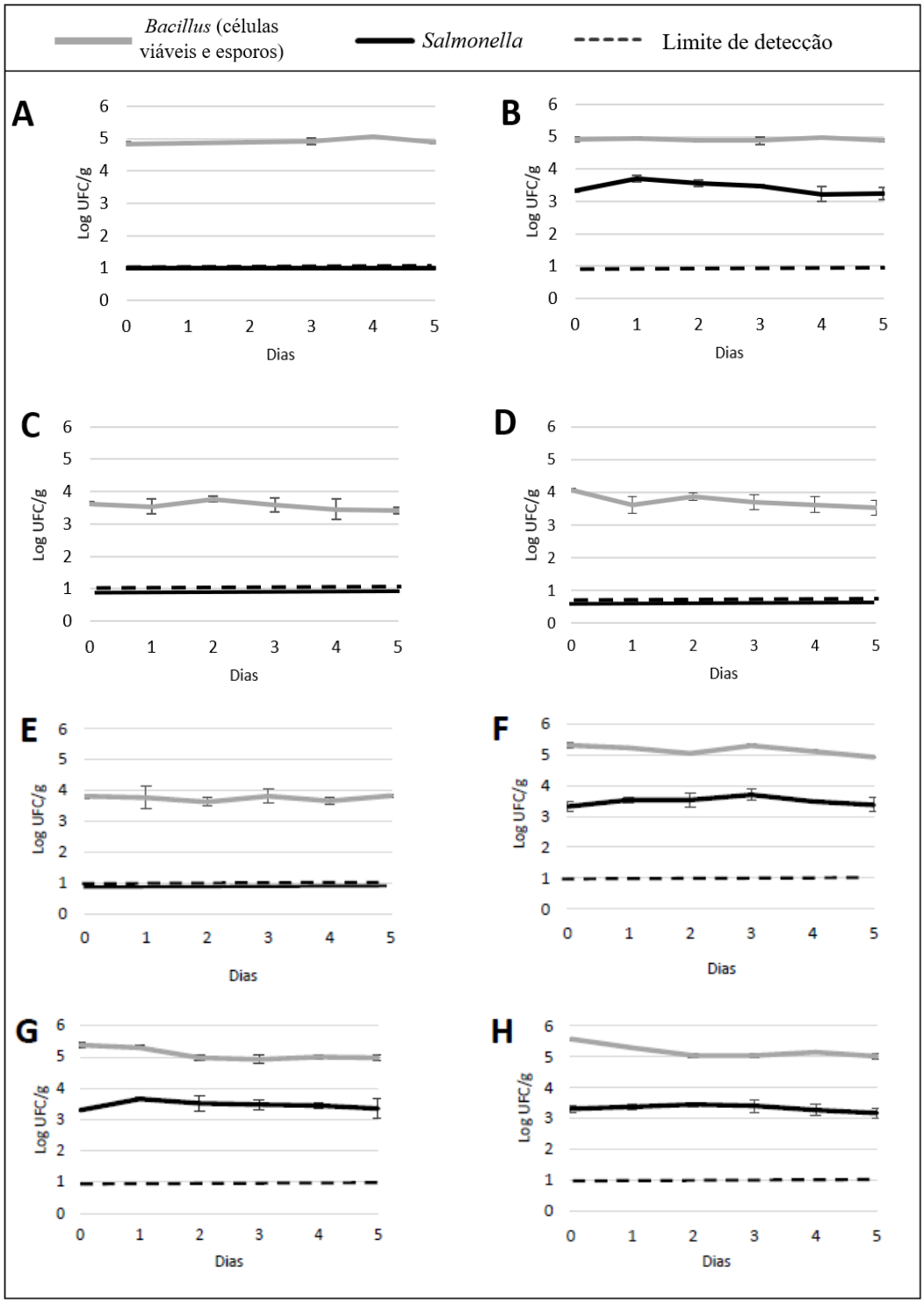
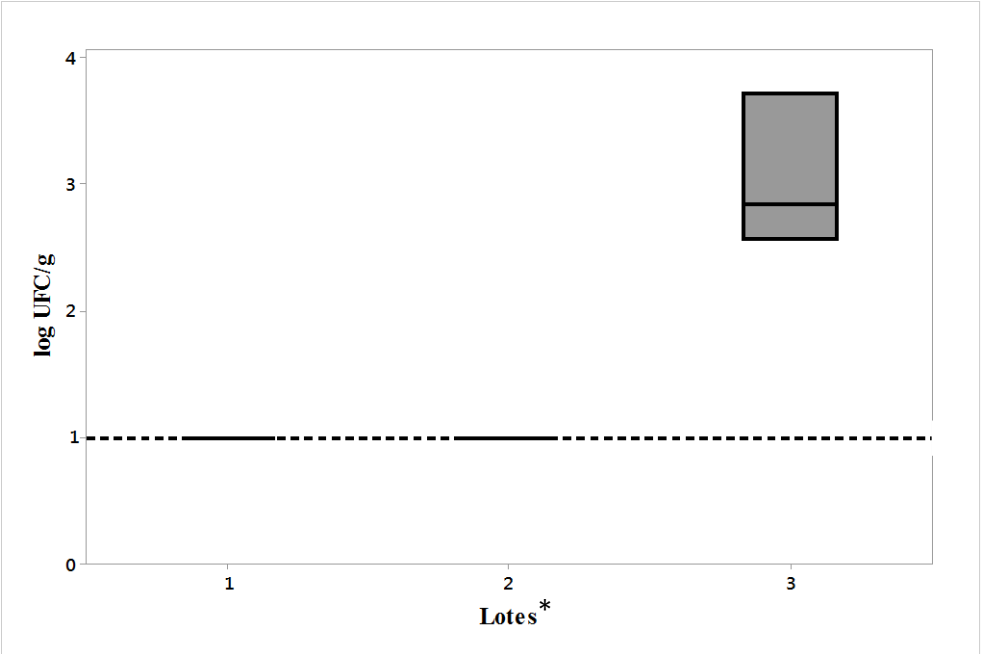


Figura 9. Contagens de *Bacillus cereus* presuntivos em hortaliças minimamente processadas



*Cada lote é composto por três amostras de hortaliças minimamente processadas analisadas em duplicata. Os lotes não são compostos, necessariamente, por hortaliças da mesma variedade ou marca, tendo sido adquiridos para análise em datas diferentes.

5.2.3. Identificação de bactérias epifíticas com atividade inibitória contra *Salmonella* spp. e bactérias do grupo *Bacillus cereus*

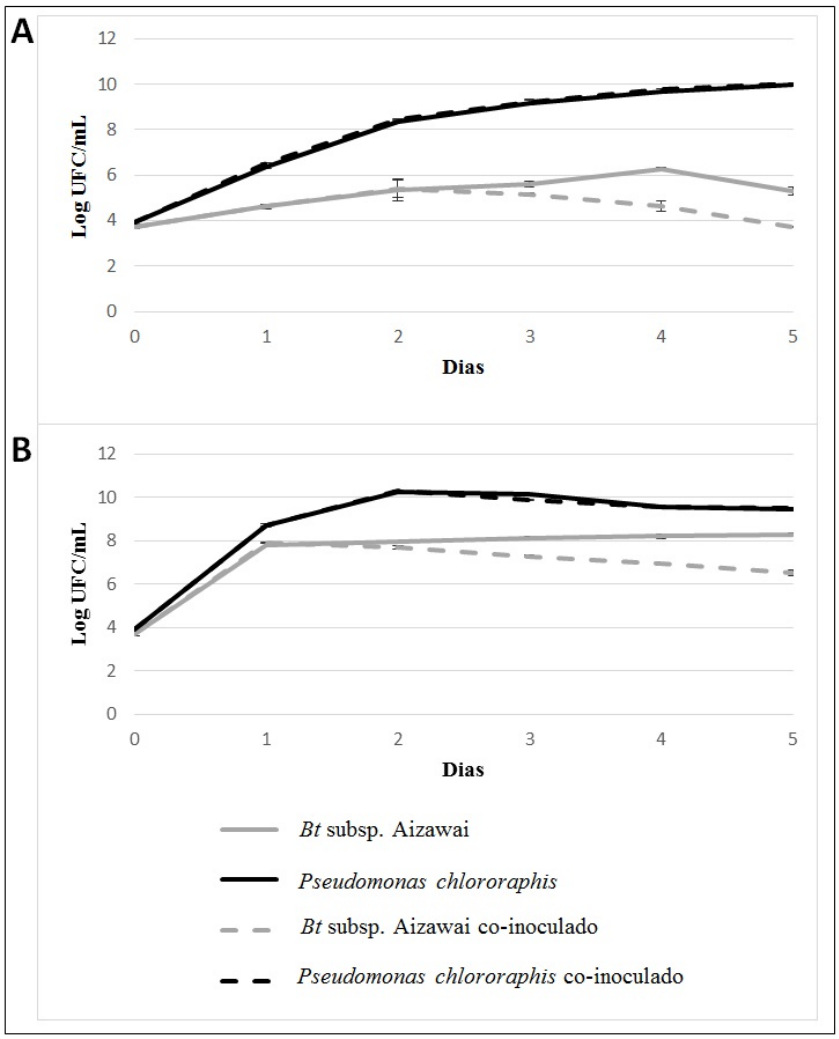
Nenhum isolado epifítico apresentou capacidade de inibir as cepas de *S. enterica* testadas. Entretanto, um isolado, identificado como *Pseudomonas chlororaphis* por MALDI-TOF MS, foi capaz de inibir *Bacillus cereus* BC710 (produtora de toxina diarreica), *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Bacillus thuringiensis* ATCC 10792 e *Bacillus thuringiensis* subsp Aizawai.

Pseudomonas chlororaphis é um BCA classificado como seguro à humanos pela União Europeia e que, assim como o *Bt*, apresenta atividade inseticida conhecida (ANDERSON et al., 2018). O efeito inibitório de *P. chlororaphis* frente a *Bacillus thuringiensis* subsp. Aizawai em caldo BHI a 12 ºC e 22 ºC pode ser visto na Figura 10. Os resultados mostraram que, após cinco dias na presença de *P. chlororaphis* a 12 ºC e 22 ºC, houve redução significativa nas populações de *Bt* ($p<0,05$; teste *t student*), da ordem de 1,6 e 1,7 log UFC/mL em média, respectivamente, em comparação com culturas puras cultivadas nas mesmas condições. As contagens de *P. chlororaphis* não foram influenciadas pelo *Bt* ($p<0,05$; teste *t student*).

Deve-se notar que, quando em co-cultura, *Bt* estava na forma de células vegetativas. Quando utilizado como BCA, *Bt* é aplicado sobre as culturas na forma de esporos, e portanto as interações com *P. chlororaphis* nos testes em plantas podem ser diferentes do observado em caldo BHI. Apesar desta limitação, este é o primeiro relato de interações entre *Bt* e *P. chlororaphis*, sendo necessário que a ação inibitória seja melhor explorada. Essa combinação de bactérias pode ser aplicada para o controle

da germinação e subsequente multiplicação de membros do grupo *Bacillus cereus*, evitando que alcancem populações que ofereçam riscos de toxi-infecções alimentares.

Figura 10. Multiplicação de *Pseudomonas chlororaphis* e *Bacillus thuringiensis* subsp. Aizawai em caldo BHI a 12 ºC (A) e 22 ºC (B)



6. CONCLUSÕES

Este estudo possibilitou um melhor entendimento das práticas agrícolas adotadas em propriedades orgânicas no Estado de São Paulo, Brasil, e a sua influência na qualidade e segurança das hortaliças nelas produzidas. O estudo gerou também dados inovadores sobre a persistência e interações de *Bacillus thuringiensis* subsp. Aizawai (*Bt*), utilizado com Agente de Controle Biológico em plantações, com *Salmonella* e a microbiota epifítica nas etapas de pré e pós-colheita de hortaliças.

As contagens observadas de *Enterobacteriaceae* na cadeia produtiva foram consideradas elevadas, e a presença de *E. coli* nas amostras de água de irrigação e de DNA de *Salmonella* em uma amostra de alface lavada sugere que pode haver algum risco para o consumidor. O estudo ressalta a importância da implementação de Boas Práticas Agrícolas no campo, seguida de Boas Práticas de Higiene nas etapas de processamento e comercialização, necessárias para garantir a segurança microbiológica destes vegetais. Os resultados evidenciaram a necessidade de desenvolvimento de tecnologias de fácil acesso e manuseio para monitoramento do processo de compostagem e da avaliação da qualidade da água, que auxiliariam os produtores a reduzir a contaminação microbiana da produção.

Embora o *Bt* tenha um longo histórico de uso seguro como agente de controle biológico (BCA) no campo, com comprovada atividade inseticida e nenhum impacto ambiental adverso, existe a possibilidade de produção de enterotoxinas, merecendo mais atenção da comunidade científica. A dificuldade de distinguir *Bt* como um agente de biocontrole de cepas patogênicas humanas de *Bacillus cereus* destaca a importância do uso adequado deste BCA em culturas e enfatiza a necessidade de métodos analíticos adequados para identificação.

Os dados obtidos neste estudo poderão contribuir para a melhoria dos modelos de avaliação de risco microbiológico associados a hortaliças orgânicas, devido à incorporação de dados mais completos das práticas agrícolas durante sua produção.

REFERÊNCIAS

AIRAKSINEN, S.; HEINONEN-TANSKI, H.; HEISKANEN, M.-L. Quality of different bedding materials and their influence on the compostability of horse manure. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 21, n. 3, p. 125–130, 1 mar. 2001. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0737080601701086. Acesso em: 2 ago. 2019.

ALEGBELEYE, O. O.; SINGLETON, I.; SANT'ANA, A. S. Sources and contamination routes of microbial pathogens to fresh produce during field cultivation: A review. **Food Microbiology**, v. 73, p. 177–208, 1 ago. 2018. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002017310158#bib65. Acesso em: 16 jul. 2019.

ALONSO, V. P. et al. *Klebsiella pneumonia* carbapenemase (KPC), methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), and vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. (VRE) in the food production chain and biofilm formation on abiotic surfaces. **Current Opinion in Food Science**, v. 26, p. 79–86, 1 abr. 2019. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214799319300189?via%3Dihub. Acesso em: 13 jul. 2019.

ALVES, L. A. C. et al. Identification of microorganisms in biofluids of individuals with periodontitis and chronic kidney disease using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 30, n. 10, p. 1228–1232, 30 maio 2016. Disponível em: http://doi.wiley.com/10.1002/rcm.7555. Acesso em: 1 ago. 2019.

ANDERSON, J. A. et al. Safety of *Pseudomonas chlororaphis* as a gene source for genetically modified crops. **Transgenic research**, v. 27, n. 1, p. 103–113, 2018. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29427161. Acesso em: 24 maio. 2019.

AOAC. Official Method 991.15 Total Coliforms and *Escherichia coli* in Water - Defined Substrate Technology (Colilert) Method. **Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL**, 18th Edition, Revision 2 [s.l: s.n.], 2007. Disponível em: https://123.idexx.com/resource-library/water/water-reg-article5I-v2.pdf. Acesso em: 28 ago. 2019.

ARGÔLO-FILHO, R. C.; LOGUERCIO, L. L. *Bacillus thuringiensis* Is an Environmental Pathogen and Host-Specificity Has Developed as an Adaptation to Human-Generated Ecological Niches. **Insects**, v. 5, n. 1, p. 62–91, 24 dez. 2013. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26462580. Acesso em: 28 jul. 2019.

AVCI, A.; ÇAĞRI-MEHMETOĞLU, A.; ARSLAN, D. Production of antimicrobial substances by a novel *Bacillus* strain inhibiting *Salmonella* Typhimurium. **LWT**, v. 80, p. 265–270, 1 jul. 2017. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643817301317#bib27. Acesso em: 18 nov. 2018.

BASSI, D. et al. Transcriptome analysis of *Bacillus thuringiensis* spore life, germination and cell outgrowth in a

vegetable-based food model. **Food Microbiology**, v. 55, p. 73–85, 1 maio 2016. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002015002129#bib43. Acesso em: 12 nov. 2018.

BEN SAID, L. et al. Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* in vegetables, soil and water of the farm environment in Tunisia. **International Journal of Food Microbiology**, v. 203, p. 86–92, 16 jun. 2015. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160515001129. Acesso em: 4 jul. 2019.

BLANC, J. Family farmers and major retail chains in the Brazilian organic sector: Assessing new development pathways. A case study in a peri-urban district of São Paulo. **Journal of Rural Studies**, v. 25, n. 3, p. 322–332, 1 jul. 2009. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0743016709000035. Acesso em: 10 jul. 2019.

BLANC, J.; KLEDAL, P. R. The Brazilian organic food sector: Prospects and constraints of facilitating the inclusion of smallholders. **Journal of Rural Studies**, v. 28, n. 1, p. 142–154, 1 jan. 2012. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0743016711000921. Acesso em: 4 jul. 2019.

BÖHME, K. et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from Italian dairy products by MALDI-TOF mass fingerprinting. **ELECTROPHORESIS**, v. 33, n. 15, p. 2355–2364, 1 ago. 2012. Disponível em: http://doi.wiley.com/10.1002/elps.201100480. Acesso em: 4 ago. 2019.

BRANDÃO, M. L. L. et al. Assessment of Microbiological Contamination of Fresh, Minimally Processed, and Ready-to-Eat Lettuces (*Lactuca sativa*), Rio de Janeiro State, Brazil. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 5, p. M961–M966, 1 maio 2014. Disponível em: http://doi.wiley.com/10.1111/1750-3841.12459. Acesso em: 22 ago. 2019.

BRASIL. **Resolução RDC Nº12, de 02 de Janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. [s.l: s.n.]. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b. Acesso em: 11 jul. 2019.

BRASIL. **Lei Nº 10.831, de 23 de dezembro de 2003. Dispõe sobre a Agricultura orgânica e dá outras providências.** Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/2003/L10.831.htm. Acesso em: 10 jul. 2019.

BRASIL. **Resolução Nº 357, de 17 de Março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.** Disponível em: http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459. Acesso em: 7 jul. 2019.

BRASIL. **Decreto Nº 6.323, de 27 de dezembro de 2007. Regulamenta a Lei no 10.831, de 23 de dezembro de 2003, que dispõe sobre a agricultura orgânica, e dá outras providências.** Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2007/decreto/d6323.htm. Acesso em: 10 jul. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Situação epidemiológica - doenças transmitidas por alimentos**. [s.l: s.n.]. Disponível em: http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/doencas-transmitidas-por-alimentos. Acesso em: 07 out. 2018.

CANDIOTTO, L. Z. P. Organic products policy in Brazil. **Land Use Policy**, v. 71, p. 422–430, 1 fev. 2018. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S026483771730176X. Acesso em: 4 jul. 2019.

CANIZALEZ-ROMAN, A. et al. Detection of antimicrobial-resistance diarrheagenic *Escherichia coli* strains in surface water used to irrigate food products in the northwest of Mexico. **International Journal of Food Microbiology**, v. 304, p. 1–10, 2 set. 2019. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160518308377. Acesso em: 5 ago. 2019.

CDC. **Multistate Outbreak of *E. coli* O157:H7 Infections Linked to Fresh Spinach (FINAL UPDATE)**. Disponível em: https://www.cdc.gov/ecoli/2006/spinach-10-2006.html. Acesso em: 16 jul. 2019.

CDC. **Multistate Outbreak of *Salmonella* Saintpaul Infections Linked to Raw Alfalfa Sprouts (FINAL UPDATE)**. Disponível em: https://www.cdc.gov/salmonella/2009/raw-alfalfa-sprouts-5-8-2009.html. Acesso em: 16 jul. 2019.

CDC. **Multistate Outbreak of Human *Salmonella* Newport Infections Linked to Raw Alfalfa Sprouts (Final Update)**. Disponível em: https://www.cdc.gov/salmonella/2010/newport-alfalfa-sprout-6-29-10.html. Acesso em: 16 jul. 2019.

CDC. **Multistate Outbreak of Human *Salmonella* Enteritidis Infections Linked to Alfalfa Sprouts and Spicy Sprouts (Final update)**. Disponível em: https://www.cdc.gov/salmonella/2011/alfalfa-spicy-sprouts-7-6-2011.html. Acesso em: 16 jul. 2019a.

CDC. **Multistate Outbreak of Human *Salmonella* I 4,[5],12:i:- Infections Linked to Alfalfa Sprouts (Final Update)**. Disponível em: https://www.cdc.gov/salmonella/2010/alfalfa-sprouts-2-10-11.html. Acesso em: 16 jul. 2019b.

CDC. **Multistate Outbreak of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 Infections Linked to Organic Spinach and Spring Mix Blend (Final Update) | Multistate Outbreak Linked to Organic Spinach and Spring Mix Blend | *E. coli* | CDC**. Disponível em: https://www.cdc.gov/ecoli/2012/O157H7-11-12/index.html. Acesso em: 16 jul. 2019a.

CDC. **Multistate Outbreak of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* O26 Infections Linked to Raw Clover Sprouts at Jimmy John's Restaurants (Final Update)**. Disponível em: https://www.cdc.gov/ecoli/2012/O26-02-12/index.html. Acesso em: 16 jul. 2019b.

CDC. **Multistate outbreak of *E. coli* O157:H7 infections linked to romaine lettuce**. Disponível em: https://www.cdc.gov/ecoli/2011/romaine-lettace-3-23-12.html. Acesso em: 10 jul. 2019c.

CDC. **Multistate Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 Infections Linked to Ready-to-Eat Salads (Final Update)**. Disponível em: https://www.cdc.gov/ecoli/2013/O157H7-11-13/index.html. Acesso em: 16 jul. 2019.

CDC. **Multistate Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O121 Infections Linked to Raw Clover Sprouts (Final Update)**. Disponível em: https://www.cdc.gov/ecoli/2014/o121-05-14/index.html. Acesso em: 16 jul. 2019.

CDC. **Multistate Outbreak of *Salmonella* Enteritidis Infections Linked to Bean Sprouts (Final Update)**. Disponível em: https://www.cdc.gov/salmonella/enteritidis-11-14/index.html. Acesso em: 16 jul. 2019.

CDC. **Multistate outbreak of *Salmonella* Reading and *Salmonella* Abony infections linked to alfalfa sprouts (Final Update)**. Disponível em: https://www.cdc.gov/salmonella/reading-08-16/index.html. Acesso em: 10 jul. 2019a.

CDC. **Multistate Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 Infections Linked to Alfalfa Sprouts Produced by Jack & The Green Sprouts (Final Update)**. Disponível em: https://www.cdc.gov/ecoli/2016/o157-02-16/index.html. Acesso em: 16 jul. 2019b.

CDC. **Multistate outbreak of *Salmonella* Muenchen infections linked to alfalfa sprouts from one contaminated seed lot (Final update)**. Disponível em: https://www.cdc.gov/salmonella/muenchen-02-16/index.html. Acesso em: 10 jul. 2019c.

CDC. **Multistate Outbreak of *E. coli* O157:H7 Infections Linked to Romaine Lettuce (Final Update)**. Disponível em: https://www.cdc.gov/ecoli/2018/o157h7-04-18/index.html. Acesso em: 11 jul. 2019a.

CDC. **Multistate Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 Infections Linked to Leafy Greens (Final Update)**. Disponível em: https://www.cdc.gov/ecoli/2017/o157h7-12-17/index.html. Acesso em: 10 jul. 2019b.

CDC. **Multistate outbreak of *Salmonella* Montevideo infections linked to raw sprouts (Final update)**. Disponível em: https://www.cdc.gov/salmonella/montevideo-01-18/index.html. Acesso em: 10 jul. 2019c.

CDC. **Outbreak of *E. coli* Infections Linked to Romaine Lettuce - Final Update**. Disponível em:

https://www.cdc.gov/ecoli/2018/o157h7-11-18/index.html. Acesso em: 11 jul. 2019.

CEUPPENS, S. et al. Microbiological quality and safety assessment of lettuce production in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 181, p. 67–76, 2014. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.025. Acesso em: 14 nov. 2018.

CHEN, Z. et al. Prevalence of *Escherichia coli* O157 and *Salmonella* spp. in solid bovine manure in California using real- time quantitative PCR. **Letters in Applied Microbiology**, v. 69, n. 1, p. lam.13156, 2 maio 2019. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/lam.13156. Acesso em: 15 jul. 2019.

DE KOSTER, C. G. MALDI-TOF MS identification and tracking of food spoilers and food-borne pathogens. **Current Opinion in Food Science**, v. 10, p. 76–84, 1 ago. 2016. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214799316301242?via%3Dihub. Acesso em: 3 ago. 2019.

DE OLIVEIRA ELIAS, S.; NORONHA, T. B.; TONDO, E. C. *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 prevalence and levels on lettuce: A systematic review and meta-analysis. **Food Microbiology**, v. 84, p. 103217, 1 dez. 2019. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002018306610. Acesso em: 12 jul. 2019.

DE QUADROS RODRIGUES, R. et al. Microbiological contamination linked to implementation of good agricultural practices in the production of organic lettuce in Southern Brazil. **Food Control**, v. 42, p. 152–164, 1 ago. 2014. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713514000589. Acesso em: 24 maio. 2019.

DECOL, L. T. et al. Microbial quality of irrigation water used in leafy green production in Southern Brazil and its relationship with produce safety. **Food Microbiology**, v. 65, p. 105–113, 1 ago. 2017. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002016308164. Acesso em: 4 jul. 2019.

DENIS, N. et al. Prevalence and trends of bacterial contamination in fresh fruits and vegetables sold at retail in Canada. **Food Control**, v. 67, p. 225–234, 1 set. 2016. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713516300937. Acesso em: 14 nov. 2018.

DONOHUE, M. J. et al. The development of a matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry-based method for the protein fingerprinting and identification of *Aeromonas* species using whole cells. **Journal of Microbiological Methods**, v. 65, n. 3, p. 380–389, 1 jun. 2006. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701205002630. Acesso em: 6 ago. 2019.

DRISSNER, D.; ZUERCHER, U. Safety of Food and Beverages: Fruits and Vegetables. **Encyclopedia of Food Safety**, p. 253–259, 1 jan. 2014. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123786128002808?via%3Dihub. Acesso em: 4 jul.

2019.

EFSA. Risks for public health related to the presence of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. including *Bacillus thuringiensis* in foodstuffs. **EFSA Journal**, v. 14, n. 7, jul. 2016. Disponível em: http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2016.4524. Acesso em: 14 maio. 2019.

EL-JENI, R. et al. Rapid genus identification of selected lactic acid bacteria isolated from *Mugil cephalis* and *Oreochromis niloticus* organs using MALDI-TOF. **Annals of Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 1–15, 21 jan. 2019. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/s13213-018-1357-8. Acesso em: 4 ago. 2019.

ERICKSON, M. C. et al. Pre-harvest internalization and surface survival of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 sprayed onto different lettuce cultivars under field and growth chamber conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 291, p. 197–204, 16 fev. 2019. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160518303726. Acesso em: 24 maio. 2019.

FAO; WHO. **Codex Alimentarius - Organically Produced Foods**. 3. ed. [s.l: s.n.]

FIRA, D. et al. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. **Journal of Biotechnology**, v. 285, p. 44–55, 10 nov. 2018. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165618305844. Acesso em: 9 nov. 2018.

FRÖHLING, A. et al. Screening of microbial communities associated with endive lettuce during postharvest processing on industrial scale. **Heliyon**, v. 4, n. 7, p. e00671, 1 jul. 2018. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844018303220#bib4. Acesso em: 14 nov. 2018.

FUENTEALBA, A. et al. Comparing the efficacy of various aerial spraying scenarios using *Bacillus thuringiensis* to protect trees from spruce budworm defoliation. **Forest Ecology and Management**, v. 432, p. 1013–1021, 15 jan. 2019. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378112718304225?via%3Dihub. Acesso em: 22 maio. 2019.

GENBANK BLASTN. **BLAST: Basic Local Alignment Search Tool**. Disponível em: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi. Acesso em: 31 jul. 2019.

GIL, M. I. et al. Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: Problems and solutions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 134, n. 1–2, p. 37–45, 31 ago. 2009. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016816050900289X. Acesso em: 4 jul. 2019.

GOMES NETO, N. J. et al. Bacterial counts and the occurrence of parasites in lettuce (*Lactuca sativa*) from different cropping systems in Brazil. **Food Control**, v. 28, n. 1, p. 47–51, 1 nov. 2012. Disponível em:

https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095671351200206X. Acesso em: 4 jul. 2019.

GURTLER, J. B. et al. Composting To Inactivate Foodborne Pathogens for Crop Soil Application: A Review. **Journal of Food Protection**, v. 81, n. 11, p. 1821–1837, 15 nov. 2018. Disponível em: http://jfoodprotection.org/doi/10.4315/0362-028X.JFP-18-217. Acesso em: 1 ago. 2019.

HA, S.-M. et al. Application of the Whole Genome-Based Bacterial Identification System, TrueBac ID, Using Clinical Isolates That Were Not Identified With Three Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) Systems. **Annals of Laboratory Medicine**, v. 39, n. 6, p. 530, 1 nov. 2019. Disponível em: https://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.3343/alm.2019.39.6.530. Acesso em: 3 ago. 2019.

HAUSDORF, L. et al. Characterization of the cultivable microbial community in a spinach-processing plant using MALDI-TOF MS. **Food Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 406–411, 1 jun. 2013. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002012002328. Acesso em: 3 ago. 2019.

HEINI, N. et al. Characterization of *Bacillus cereus* group isolates from powdered food products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 283, p. 59–64, 20 out. 2018. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016816051830326X#bb0165. Acesso em: 9 nov. 2018.

HEINONEN-TANSKI, H. et al. Methods to reduce pathogen microorganisms in manure. **Livestock Science**, v. 102, n. 3, p. 248–255, 1 jul. 2006. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1871141306001065. Acesso em: 4 jul. 2019.

HOLVOET, K. et al. Relationships among hygiene indicators and enteric pathogens in irrigation water, soil and lettuce and the impact of climatic conditions on contamination in the lettuce primary production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 171, p. 21–31, 3 fev. 2014. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160513005187. Acesso em: 5 ago. 2019.

HÖLZEL, C. S.; TETENS, J. L.; SCHWAIGER, K. Unraveling the Role of Vegetables in Spreading Antimicrobial-Resistant Bacteria: A Need for Quantitative Risk Assessment. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 15, n. 11, p. 671–688, 2018. Disponível em: www.who.int. Acesso em: 4 ago. 2019.

HSU, W.-Y.; SIMONNE, A.; JITAREERAT, P. Fates of Seeded *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* on Selected Fresh Culinary Herbs during Refrigerated Storage. **Journal of Food Protection**. [s.l: s.n.]. Disponível em: https://jfoodprotection.org/doi/pdf/10.4315/0362-028X-69.8.1997. Acesso em: 13 jul. 2019.

IFOAM. **The IFOAM NORMS for Organic Production and Processing** (IFOAM-Organics International, Ed.). [s.l.] International Federation of Organic Agriculture Movements (IFOAM), 2017. . Disponível em: https://www.ifoam.bio/sites/default/files/ifoam_norms_july_2014_t.pdf. Acesso em: 8 jul. 2019.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 6579:2002/Amd 1:2007 - Detection of Salmonella spp. in animal faeces and in environmental samples from the primary production stage**. [s.l: s.n.]. Disponível em: https://www.iso.org/standard/42109.html. Acesso em: 1 ago. 2019.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO/FDIS 7932.2:2004(E). Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of presumptive Bacillus cereus — Colony-count technique at 30 °C**. 2004. Disponível em: https://www.iso.org/standard/38219.html. Acesso em: 2 ago 2019

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 19250:2010 - Water quality - Detection of Salmonella spp.** Disponível em: https://www.iso.org/standard/43448.html. Acesso em: 1 ago. 2019.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 20976-1:2019 - Microbiology of the food chain - Requirements and guidelines for conducting challenge tests of food and feed products -- Part 1: Challenge tests to study growth potential, lag time and maximum growth rate**. Disponível em: https://www.iso.org/standard/69673.html. Acesso em: 3 ago. 2019.

ISLAM, M. et al. Persistence of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in Soil and on Leaf Lettuce and Parsley Grown in Fields Treated with Contaminated Manure Composts or Irrigation Water**. Journal of Food Protection**. [s.l: s.n.]. Disponível em: http://jfoodprotection.org/doi/pdf/10.4315/0362-028X-67.7.1365. Acesso em: 14 nov. 2018.

JACKSON, S. G. et al. *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolated in a gastroenteritis outbreak investigation. **Letters in Applied Microbiology**, v. 21, n. 2, p. 103–105, 1 ago. 1995. Disponível em: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1472-765X.1995.tb01017.x. Acesso em: 28 jul. 2019.

JADHAV, S. et al. Rapid identification and source-tracking of *Listeria monocytogenes* using MALDI-TOF mass spectrometry. **International Journal of Food Microbiology**, v. 202, p. 1–9, 2 jun. 2015. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160515000999. Acesso em: 4 ago. 2019.

JOHANNESSEN, G. S.; LONCAREVIC, S.; KRUSE, H. Bacteriological analysis of fresh produce in Norway. **International Journal of Food Microbiology**, v. 77, n. 3, p. 199–204, 25 ago. 2002. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016816050200051X. Acesso em: 14 nov. 2018.

JUNG, Y.; JANG, H.; MATTHEWS, K. R. Effect of the food production chain from farm practices to vegetable processing on outbreak incidence. **Microbial biotechnology**, v. 7, p. 517–527, 2014. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4265071/pdf/mbt20007-0517.pdf. Acesso em: 13 jul. 2019.

KESHAVAREDDY, G.; KUMAR, A. R. V. *Bacillus thuringiensis*. **Ecofriendly Pest Management for Food Security**, p. 443–473, 1 jan. 2016. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128032657000142. Acesso em: 24 jul. 2019.

KEVAN, P. G.; SHIPP, L. Biological Control as Biotechnological Amelioration and Ecosystem Intensification in Managed Ecosystems. **Reference Module in Life Sciences**, 1 jan. 2017. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128096338092463. Acesso em: 24 jul. 2019.

KIM, M. J. et al. Nutritional value, bioactive compounds and health benefits of lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 49, p. 19–34, 1 jun. 2016. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889157516300230. Acesso em: 24 maio. 2019.

KISLUK, G.; YARON, S. Presence and Persistence of *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium in the Phyllosphere and Rhizosphere of Spray-Irrigated Parsley. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 11, p. 4030–4036, 2012. Disponível em: http://aem.asm.org/. Acesso em: 18 jul. 2019.

KONECKA, E. et al. Persistence of the spores of *B. thuringiensis* subsp. kurstaki from Foray bioinsecticide in gleysol soil and on leaves. **Science of The Total Environment**, v. 472, p. 296–301, 15 fev. 2014. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969713013600. Acesso em: 24 maio. 2019.

KORNACKI, J. L.; GURTLER, J. B.; STAWICK, B. A. 9. *Enterobacteriaceae*, Coliforms, and *Escherichia coli* as Quality and Safety Indicators. In: **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. [s.l.] American Public Health Association, 2015.

KUMAR, G. D. et al. Airborne soil particulates as vehicles for *Salmonella* contamination of tomatoes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 243, p. 90–95, 21 fev. 2017. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160516306547. Acesso em: 22 jul. 2019.

KUS, J. V.; BURROWS, L. Infections due to *Citrobacter* and *Enterobacter*. In: **Reference Module in Biomedical Sciences 2014**. [s.l.] Elsevier, p. 1–12. 2007. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128012383050893?via%3Dihub.. Acesso em 1 Jul 2019.

KYEI-POKU, G. et al. Detection of *Bacillus cereus* virulence factors in commercial products of *Bacillus thuringiensis* and expression of diarrheal enterotoxins in a target insect. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 12, p. 1283–1290, dez. 2007. Disponível em: http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/W07-106. Acesso em: 26 jul. 2019.

LACEY, L. A. et al. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 132, p. 1–41, 1 nov. 2015. Disponível em:

https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022201115001342. Acesso em: 13 nov. 2018.

LAMAS, A. et al. A comprehensive review of non-enterica subspecies of *Salmonella enterica*. **Microbiological Research**, v. 206, p. 60–73, 1 jan. 2018. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501317304159?via%3Dihub. Acesso em: 14 nov. 2018.

LARNEY, F. J.; HAO, X. A review of composting as a management alternative for beef cattle feedlot manure in southern Alberta, Canada. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 17, p. 3221–3227, 1 dez. 2007. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852406003099. Acesso em: 4 jul. 2019.

LI, D.; UYTTENDAELE, M. Potential of Human Norovirus Surrogates and *Salmonella enterica* Contamination of Pre-harvest Basil (*Ocimum basilicum*) via Leaf Surface and Plant Substrate. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1728, 30 jul. 2018. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30105013. Acesso em: 24 maio. 2019.

LÓPEZ-GÁLVEZ, F.; GIL, M. I.; ALLENDE, A. Impact of relative humidity, inoculum carrier and size, and native microbiota on *Salmonella* ser. Typhimurium survival in baby lettuce. **Food Microbiology**, v. 70, p. 155–161, 1 abr. 2018. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002017305427. Acesso em: 24 maio. 2019.

LOPEZ-VELASCO, G. et al. Characterization of interactions between *Escherichia coli* O157:H7 with epiphytic bacteria in vitro and on spinach leaf surfaces. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, n. 3, p. 351–357, 15 fev. 2012. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016816051100688X?via%3Dihub. Acesso em: 7 jun. 2019.

MACHADO, E. R. et al. Frequency of Enteroparasites and Bacteria in the Leafy Vegetables Sold in Brazilian Public Wholesale Markets. **Journal of Food Protection**, v. 81, n. 4, p. 542–548, 7 abr. 2018. Disponível em: http://jfoodprotection.org/doi/10.4315/0362-028X.JFP-17-358. Acesso em: 22 ago. 2019.

MAFFEI, D. F. et al. Microbiology of organic and conventionally grown fresh produce. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 99–105, 1 dez. 2016. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1517838216310383. Acesso em: 14 nov. 2018.

MAFFEI, D. F. et al. Quantitative assessment of the impact of cross-contamination during the washing step of ready-to-eat leafy greens on the risk of illness caused by *Salmonella*. **Food Research International**, v. 92, p. 106–112, 1 fev. 2017. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996916306081?via%3Dihub. Acesso em: 5 ago. 2019.

MAFFEI, D. F. et al. Assessing the relationship between organic farming practices and microbiological characteristics of organic lettuce varieties (*Lactuca sativa* L.) grown in Sao Paulo, Brazil. **Journal of Applied**

Microbiology, v. 127, n. 1, p. 237–247, 3 jul. 2019. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jam.14281. Acesso em: 2 jul. 2019.

MAFFEI, D. F.; SILVEIRA, N. F. de A.; CATANOZI, M. da P. L. M. Microbiological quality of organic and conventional vegetables sold in Brazil. **Food Control**, v. 29, n. 1, p. 226–230, 1 jan. 2013. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713512003428. Acesso em: 12 jul. 2019.

MARINE, S. C. et al. The Growing Season, but Not the Farming System, Is a Food Safety Risk Determinant for Leafy Greens in the Mid-Atlantic Region of the United States. **Applied and environmental microbiology**, v. 81, n. 7, p. 2395–2407, 2015. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1128. Acesso em: 12 jul. 2019.

MARKLAND, S. M. et al. Application of Bacillus subtilis to the Roots of Leafy Greens, in the Presence of *Listeria innocua* and *Salmonella* Newport, Induces Closure of Stomata. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 12, n. 10, p. 828–835, out. 2015. Disponível em: https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/fpd.2015.1952?rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed&url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&journalCode=fpd. Acesso em: 6 ago. 2019.

MARTINEZ, R. C. R. et al. Bacteriocin production and inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Lactobacillus sakei* subsp. sakei 2a in a potentially synbiotic cheese spread. Food Microbiology, v. 48, p. 143-142, 2015. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.12.010. Acesso em: 07 out. 2019.

MCINTYRE, L. et al. Identification of *Bacillus cereus* group species associated with food poisoning outbreaks in British Columbia, Canada. **Applied and environmental microbiology**, v. 74, n. 23, p. 7451–3, dez. 2008. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18849447. Acesso em: 29 jul. 2019.

MCMAHON, M. A. S.; WILSON, I. G. The occurrence of enteric pathogens and *Aeromonas* species in organic vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, v. 70, n. 1–2, p. 155–162, 22 out. 2001. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160501005359. Acesso em: 4 jul. 2019.

MERLINI, V. V. et al. Microbiological Quality of Organic and Conventional Leafy Vegetables. **Journal of Food Quality**, v. 2018, p. 7, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1155/2018/4908316. Acesso em: 22 ago. 2019.

MIRANDA, N. et al. The Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) identification versus biochemical tests: a study with enterobacteria from a dairy cattle environment. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 132–138, 2017. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.07.0251517-8382/. Acesso em: 3 ago. 2019.

MISHRA, A. et al. Development of growth and survival models for *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* during non-isothermal time-temperature profiles in leafy greens. **Food Control**, v. 71, p. 32–41, 1 jan. 2017.

Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713516303164. Acesso em: 14 nov. 2018.

MONAGHAN, J. M.; HUTCHISON, M. L. Distribution and decline of human pathogenic bacteria in soil after application in irrigation water and the potential for soil-splash-mediated dispersal onto fresh produce. **Journal of Applied Microbiology**, v. 112, n. 5, p. 1007–1019, 1 maio 2012. Disponível em: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2012.05269.x. Acesso em: 22 jul. 2019.

MONTE, D. F. et al. Current insights on high priority antibiotic-resistant *Salmonella enterica* in food and foodstuffs: a review. **Current Opinion in Food Science**, v. 26, p. 35–46, 1 abr. 2019. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214799319300128?via%3Dihub. Acesso em: 13 jul. 2019.

MOREY, A.; SINGH, M. Low-Temperature Survival of *Salmonella* spp. in a Model Food System with Natural Microflora. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 9, n. 3, p. 218–223, 1 mar. 2012. Disponível em: http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/fpd.2011.1016. Acesso em: 7 jun. 2019.

NI, P. et al. Prevalence and characterization of *Salmonella* serovars isolated from farm products in Shanghai. **Food Control**, v. 85, p. 269–275, 1 mar. 2018. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713517304899. Acesso em: 14 nov. 2018.

O'CALLAGHAN, M.; GLARE, T. R. Bioassay of bacterial entomopathogens against insect larvae. **Manual of Techniques in Invertebrate Pathology**, p. 101–127, 1 jan. 2012. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012386899200004X. Acesso em: 24 jul. 2019.

OLAIMAT, A. N.; HOLLEY, R. A. Factors influencing the microbial safety of fresh produce: A review. **Food Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 1–19, 1 out. 2012. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002012000986. Acesso em: 14 nov. 2018.

OLIVEIRA, M. A. de et al. Microbiological quality of ready-to-eat minimally processed vegetables consumed in Brazil. **Food Control**, v. 22, n. 8, p. 1400–1403, 1 ago. 2011. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095671351100079X. Acesso em: 14 nov. 2018.

OLIVEIRA, M. et al. Microbiological quality of fresh lettuce from organic and conventional production. **Food Microbiology**, v. 27, n. 5, p. 679–684, 1 ago. 2010. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S074000201000050X. Acesso em: 14 nov. 2018.

OSAILI, T. M. et al. Decontamination and survival of *Enterobacteriaceae* on shredded iceberg lettuce during storage. **Food Microbiology**, v. 73, p. 129–136, 1 ago. 2018. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002017305713. Acesso em: 14 nov. 2018.

OSIMANI, A.; AQUILANTI, L.; CLEMENTI, F. *Bacillus cereus* foodborne outbreaks in mass catering. **International Journal of Hospitality Management**, v. 72, p. 145–153, 1 jun. 2018. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278431917304486. Acesso em: 12 nov. 2018.

PAGEDAR, A.; SINGH, J. Influence of physiological cell stages on biofilm formation by *Bacillus cereus* of dairy origin. **International Dairy Journal**, v. 23, n. 1, p. 30–35, 1 mar. 2012. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694611002524. Acesso em: 26 jun. 2019.

PHAC. **Public Health Notice – Outbreak of *E. coli* infections linked to romaine lettuce**. Disponível em: https://www.canada.ca/en/public-health/services/public-health-notices/2017/public-health-notice-outbreak-e-coli-infections-linked-romaine-lettuce.html. Acesso em: 10 jul. 2019a.

PHAC. **Public Health Notice – Outbreak of *E. coli* infections linked to romaine lettuce**. Disponível em: https://www.canada.ca/en/public-health/services/public-health-notices/2018/public-health-notice-outbreak-e-coli-infections-linked-romaine-lettuce.html. Acesso em: 11 jul. 2019b.

PHAC. **Public Health Notice - Outbreak of *E. coli* infections linked to romaine lettuce**. Disponível em: https://www.canada.ca/en/public-health/services/public-health-notices/2018/outbreak-ecoli-infections-linked-romaine-lettuce.html. Acesso em: 11 jul. 2019.

PRAEGER, U.; HERPPICH, W. B.; HASSENBERG, K. Aqueous chlorine dioxide treatment of horticultural produce: Effects on microbial safety and produce quality–A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 2, p. 318–333, 22 jan. 2018. Disponível em: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408398.2016.1169157. Acesso em: 22 jul. 2019.

PRESTES, F. S. et al. Impact of peanut roasting on *Salmonella* spp. survival. **LWT - Food Science and Technology**, v. 108, p. 168–173, 1 jul. 2019. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643819302117. Acesso em: 13 jul. 2019.

PULIDO-LANDÍNEZ, M. Food safety - *Salmonella* update in broilers. **Animal Feed Science and Technology**, v. 250, p. 53–58, 1 abr. 2019. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840118302086. Acesso em: 12 jul. 2019.

QUINTELA-BALUJA, M. et al. Characterization of different food-isolated *Enterococcus* strains by MALDI-TOF mass fingerprinting. **Electrophoresis**, v. 34, n. 15, p. 2240–2250, 1 ago. 2013. Disponível em: http://doi.wiley.com/10.1002/elps.201200699. Acesso em: 4 ago. 2019.

RANA, J.; PAUL, J. Consumer behavior and purchase intention for organic food: A review and research agenda. **Journal of Retailing and Consumer Services**, v. 38, p. 157–165, 1 set. 2017. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969698917301078. Acesso em: 8 jul. 2019.

RASIGADE, J.-P.; HOLLANDT, F.; WIRTH, T. Genes under positive selection in the core genome of pathogenic *Bacillus cereus* group members. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 65, p. 55–64, 1 nov. 2018. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134818304866#bb0415. Acesso em: 9 nov. 2018.

RAYMOND, B. et al. A mid-gut microbiota is not required for the pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* to diamondback moth larvae. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 10, p. 2556–2563, 1 out. 2009. Disponível em: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1462-2920.2009.01980.x. Acesso em: 26 jul. 2019.

RAYMOND, B. et al. *Bacillus thuringiensis:* an impotent pathogen? **Trends in Microbiology**, v. 18, n. 5, p. 189–194, 1 maio 2010. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0966842X10000235. Acesso em: 26 jul. 2019.

RICE, E. W. et al. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 22. ed. [s.l: s.n.]

RICHTER, L. et al. Occurrence, Identification, and Antimicrobial Resistance Profiles of Extended-Spectrum and AmpC β-Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* from Fresh Vegetables Retailed in Gauteng Province, South Africa. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 16, n. 6, p. 421–427, 3 jun. 2019. Disponível em: https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/fpd.2018.2558. Acesso em: 4 ago. 2019.

ROBAČER, M. et al. Cover crops in organic field vegetable production. **Scientia Horticulturae**, v. 208, p. 104–110, 29 ago. 2016. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304423815303514. Acesso em: 4 jul. 2019.

RODGERS, S. L. et al. A Comparison of Different Chemical Sanitizers for Inactivating *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in Solution and on Apples, Lettuce, Strawberries, and Cantaloupe. **Journal of Food Protection**. [s.l: s.n.]. Disponível em: http://jfoodprotection.org/doi/pdf/10.4315/0362-028X-67.4.721. Acesso em: 14 nov. 2018.

RODRIGUES, K. R. M.; SALAY, E. Food safety control practices in in-house and outsourced foodservices and fresh vegetable suppliers. **Food Control**, v. 25, n. 2, p. 767–772, 1 jun. 2012. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713511005020. Acesso em: 14 nov. 2018.

RODRIGUEZ-RIVERA, L. D. et al. *Salmonella* Prevalence and Antimicrobial Susceptibility Among Dairy Farm Environmental Samples Collected in Texas. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 13, n. 4, p. 205–211, 13 abr. 2016. Disponível em: http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/fpd.2015.2037. Acesso em: 15 jul. 2019.

ROSENQUIST, H. et al. Occurrence and significance of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* in ready-to-eat food. **FEMS Microbiology Letters**, v. 250, n. 1, p. 129–136, 1 set. 2005. Disponível em:

https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1016/j.femsle.2005.06.054. Acesso em: 22 maio. 2019.

RYU, J.-H.; BEUCHAT, L. R. Biofilm Formation and Sporulation by *Bacillus cereus* on a Stainless Steel Surface and Subsequent Resistance of Vegetative Cells and Spores to Chlorine, Chlorine Dioxide, and a Peroxyacetic Acid–Based Sanitizer. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 12, p. 2614–2622, 1 dez. 2005. Disponível em: http://jfoodprotection.org/doi/abs/10.4315/0362-028X-68.12.2614. Acesso em: 26 jun. 2019.

SANT'ANA, A. S. et al. Growth potential of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in nine types of ready-to-eat vegetables stored at variable temperature conditions during shelf-life. **International Journal of Food Microbiology**, v. 157, n. 1, p. 52–58, 15 jun. 2012. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160512001985#t0005. Acesso em: 24 maio. 2019.

SANTOS, M. I. et al. Evaluation of minimally processed salads commercialized in Portugal. **Food Control**, v. 23, n. 1, p. 275–281, 1 jan. 2012. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713511002519#bib17. Acesso em: 6 ago. 2019.

SCHUETZ, A. N. Emerging agents of gastroenteritis: *Aeromonas*, *Plesiomonas*, and the diarrheagenic pathotypes of *Escherichia coli*. **Seminars in Diagnostic Pathology**, v. 36, n. 3, p. 187–192, 1 maio 2019. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740257019300449#bib0014. Acesso em: 6 ago. 2019.

SEUFERT, V.; RAMANKUTTY, N.; MAYERHOFER, T. What is this thing called organic? – How organic farming is codified in regulations. **Food Policy**, v. 68, p. 10–20, 1 abr. 2017. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306919216300690. Acesso em: 13 nov. 2018.

SSEMANDA, J. N. et al. Indicator microorganisms in fresh vegetables from "farm to fork" in Rwanda. **Food Control**, v. 75, p. 126–133, 1 maio 2017. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713516307216. Acesso em: 4 jul. 2019.

SSEMANDA, J. N. et al. Reduction of microbial counts during kitchen scale washing and sanitization of salad vegetables. **Food Control**, v. 85, p. 495–503, 1 mar. 2018. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713517304747. Acesso em: 24 out. 2018.

SUNDH, I.; GOETTEL, M. S. Regulating biocontrol agents: a historical perspective and a critical examination comparing microbial and macrobial agents. **BioControl**, v. 58, n. 5, p. 575–593, 8 out. 2013. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/s10526-012-9498-3. Acesso em: 3 jul. 2019.

TAKAHASHI, H. et al. Development of quantitative real-time PCR for detection and enumeration of *Enterobacteriaceae*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 246, p. 92–97, 4 abr. 2017. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160516306638. Acesso em: 4 jul. 2019.

TALLENT, S. M. et al. **BAM: *Bacillus cereus* | FDA**. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-bacillus-cereus>. Acesso em: 25 jun. 2019.

TANGO, C. N. et al. Bacteriological Quality of Vegetables from Organic and Conventional Production in Different Areas of Korea. **Journal of Food Protection**, v. 77, n. 8, p. 1411–1417, 2014. Disponível em: https://jfoodprotection.org/doi/pdf/10.4315/0362-028X.JFP-13-514. Acesso em: 6 ago. 2019.

USDA. **Organic Production/Organic Food: Information Access Tools**. Disponível em: https://www.nal.usda.gov/afsic/organic-productionorganic-food-information-access-tools. Acesso em: 10 jul. 2019.

UYTTENDAELE, M. et al. Microbial Hazards in Irrigation Water: Standards, Norms, and Testing to Manage Use of Water in Fresh Produce Primary Production. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 14, n. 4, p. 336–356, 1 jul. 2015. Disponível em: http://doi.wiley.com/10.1111/1541-4337.12133. Acesso em: 18 jul. 2019.

VAN HOEK, A. H. A. M. et al. Prevalence and characterization of ESBL- and AmpC-producing *Enterobacteriaceae* on retail vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, v. 204, p. 1–8, 2 jul. 2015. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160515001531. Acesso em: 11 jul. 2019.

VENGLOVSKY, J.; SASAKOVA, N.; PLACHA, I. Pathogens and antibiotic residues in animal manures and hygienic and ecological risks related to subsequent land application. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 22, p. 5386–5391, 1 nov. 2009. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852409003460. Acesso em: 14 nov. 2018.

WHO. ***Salmonella* (non-typhoidal)**. Disponível em: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal). Acesso em: 1 ago. 2019.

WHO. WHO's first ever global estimates of foodborn diseases find children under 5 account for almost one third of deaths. **Saudi Medical Journal**, v. 37, n. 1, p. 109–110, 2016. Disponível em: http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/foodborne-disease-estimates/en/. Acesso em: 10 jul. 2019.

WHO. **The burden of foodborne diseases in the WHO European Region**. [s.l: s.n.]. Disponível em: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0005/402989/50607-WHO-Food-Safety-publicationV4_Web.pdf?ua=1. Acesso em: 10 jul. 2019.

WILLER, H.; LERNOUD, J. **The world of organic agriculture. Statistics and emerging trends 2019**. 20. ed. Frick: Research Institute of Organic Agriculture (FiBL), Frick, and IFOAM - Organics International, Bonn,

2019.

YU, Z. et al. Assessment of food microbiological indicators applied on poultry carcasses by culture combined MALDI-TOF MS identification and 16S rRNA amplicon sequencing. **Food Microbiology**, v. 82, p. 53–61, 1 set. 2019. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002018306336. Acesso em: 3 ago. 2019.

ZHANG, J.; YANG, H. Effects of potential organic compatible sanitisers on organic and conventional fresh-cut lettuce (*Lactuca sativa* Var. *Crispa* L). **Food Control**, v. 72, p. 20–26, 1 fev. 2017. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713516303930?via%3Dihub. Acesso em: 8 jul. 2019.

ZHENG, D. et al. *Bacillus thuringiensis* produces the lipopeptide thumolycin to antagonize microbes and nematodes. **Microbiological Research**, v. 215, p. 22–28, 1 out. 2018. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501317312296. Acesso em: 12 nov. 2018.

ZWEIFEL, C.; STEPHAN, R. Spices and herbs as source of *Salmonella*-related foodborne diseases. 2012. Disponível em: http://www.sciencedirect.com. Acesso em: 13 nov. 2018.