



Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos
(PPGCTA)



Elis Regina Gomes Alfama

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA E DE FATORES CLIMÁTICOS NA PRODUÇÃO
DE ALFACES DESTINADAS À ALIMENTAÇÃO ESCOLAR EM PROPRIEDADES
DA AGRICULTURA FAMILIAR NO SUL DO BRASIL**

Porto Alegre

2014

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos
(PPGCTA)

Elis Regina Gomes Alfama

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA E DE FATORES CLIMÁTICOS NA PRODUÇÃO
DE ALFACES DESTINADAS À ALIMENTAÇÃO ESCOLAR EM PROPRIEDADES
DA AGRICULTURA FAMILIAR NO SUL DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Cesar Tondo
Coorientadora: Prof. Dra. Ana Beatriz Almeida de Oliveira

Porto Alegre
2014

CIP - Catalogação na Publicação

Gomes Alfama, Elis Regina

AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA E DE FATORES CLIMÁTICOS
NA PRODUÇÃO DE ALFACES DESTINADAS À ALIMENTAÇÃO
ESCOLAR EM PROPRIEDADES DA AGRICULTURA FAMILIAR NO
SUL DO BRASIL / Elis Regina Gomes Alfama. -- 2014.
65 f.

Orientador: Eduardo Cesar Tondo.

Coorientadora: Ana Beatriz Almeida de Oliveira.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia
de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Alface. 2. Contaminação microbiológica. 3.
Parâmetros climáticos. 4. Agricultura familiar. I.
Tondo, Eduardo Cesar, orient. II. Almeida de
Oliveira, Ana Beatriz, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Elis Regina Gomes Alfama

Nutricionista

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do grau de

MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil.

Aprovada em:

Pela Banca Examinadora:

Homologada em:

Por:

EDUARDO CESAR TONDO
Orientador – PPGCTA/UFRGS

MARCO ANTÔNIO ZACHIA AYUB
Coordenador – Programa de Pós-
Graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos (PPGCTA/UFRGS)

JEVERSON FRAZZON
Banca – PPGCTA/UFRGS

LETICIA SOPEÑA CASARIN
Banca – CNPQ, PPGCTA/UFRGS

VANUSKA LIMA DA SILVA
Banca – CECANE/UFRGS

VITOR MANFROI
Diretor – Instituto de Ciência e
Tecnologia de Alimentos (ICTA/UFRGS)

*Dedico este trabalho aos meus pais, Ignácio (in memoriam) e Maria Celi que sempre me apoiaram, me ensinaram a compartilhar ideias e acima de tudo ter amor ao próximo.
Obrigado por todo o ensinamento.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Professor Eduardo Cesar Tondo pela oportunidade, confiança e contribuição na minha formação e a minha coorientadora Professora Ana Beatriz Almeida de Oliveira pela ajuda, paciência e incentivo para seguir em frente.

À Coomafitt, através do seu Presidente Sr. Roberto que desde o início apoiou o nosso trabalho, ao administrador Charles Lima importante figura junto aos agricultores e ao Bruno, que incansavelmente nos acompanhou em todas as visitas.

Aos produtores rurais que sempre nos receberam com atenção e carinho, possibilitando a realização desse trabalho.

À minha querida família, meu marido Luiz Paulo, meus filhos Vinícius e Germano pelo amor, carinho e compreensão pela minha ausência, que não foram poucas, mas principalmente por estarem sempre ao meu lado nesta caminhada. Ao meu irmão, cunhada e sobrinhos que sempre me apoiaram.

Em especial, à Mariangela Santiago Terra, minha amiga, parceira de todas horas, tua ajuda foi e sempre será um diferencial pra mim, meu muito obrigado por tudo. Também, à Daniela Laranja pela contribuição e por fazer parte dessa caminhada.

Às minhas amigas Rochele de Quadros Rodrigues e Josete Baialardi Silveira pelo apoio, pelo incentivo desde o início deste desafio e pelo carinho em todos os momentos.

À todos os colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, pela ajuda e parceria. À Júnia Cápua e Patrícia Malheiros pela colaboração nesta reta final e em especial às colegas Marcia Loiko e Cheila Minéia D. de Paula, pelos ensinamentos que tornaram possível a realização desse trabalho.

Ao CECANE, em especial a Fernanda Camboim Rockett, que contribuiu muito para desvendar a misteriosa “estatística”, ponto importante no meu trabalho.

Aos meus queridos amigos, pelo incentivo e amizade, que sempre me deram força e coragem para esta conquista.

O meu sincero obrigado, a todos que de uma forma ou de outra, mesmo de longe torceram por mim.

RESUMO

A alface é uma das hortaliças mais consumidas no Brasil. Várias escolas públicas do Estado do Rio Grande do Sul, sul do Brasil, ofertam esse vegetal no cardápio da alimentação escolar, no intuito de oferecer uma alimentação mais equilibrada, rica em nutrientes e fibras. A partir de junho de 2009, quando foi promulgada a Lei nº 11.947, foi determinado que pelo menos 30% dos recursos financeiros da alimentação escolar deveriam ser investidos na aquisição de alimentos produzidos pela agricultura familiar. No entanto, as condições higiênico-sanitárias dessas propriedades, assim como, a qualidade microbiológica de alfaces nelas produzidas, ainda são pouco conhecidas. Com base nisso, o objetivo desse trabalho foi investigar a qualidade microbiológica e os fatores climáticos na produção de alfaces destinadas à alimentação escolar em propriedades da agricultura familiar, no Sul do Brasil. Participaram deste estudo quatro propriedades rurais produtoras de alfaces convencionais destinadas a 159 escolas municipais do Rio Grande do Sul. Durante o período de julho/2013 a abril/2014, cada propriedade foi visitada de 3 a 5 vezes, quando foram coletadas e analisadas amostras de alface, solo, adubo químico e orgânico, água de irrigação e água de lavagem, além da temperatura das águas. Também foram coletados parâmetros climáticos como precipitação, temperatura, radiação solar e umidade relativa. Os resultados demonstraram altas contagens de *Escherichia coli* variando de 3,51 a 5,57 log₁₀ UFC/g (83.3%) em adubos orgânicos, além da presença de *Salmonella* Cerro em uma das amostras, sugerindo falhas no controle do tempo de compostagem. As amostras de solo demonstraram altas contagens de *E. coli*, variando de Não Detectado (ND) a 3,83 log₁₀ UFC/g (7.4%), nos produtores que utilizaram adubos orgânicos. Uma amostra de solo coletada em uma propriedade que utilizava adubo químico demonstrou baixas contagens de *E. coli* e a presença de *S. Cerro*. As amostras de água de irrigação demonstraram contagens de coliformes termotolerantes, variando de ND até 23 NMP/100mL. As maiores contagens foram provenientes de água de açude, enquanto que as menores vieram de água de rio e fonte natural, localizada no alto de uma colina. As amostras de água de lavagem também demonstraram quantidades variadas de coliformes termotolerantes, sendo que as menores contagens foram obtidas em águas oriundas

de poço artesiano e as maiores do mesmo açude das águas de irrigação citadas acima. Nenhuma amostra de água demonstrou *Salmonella* spp ou *E. coli* O157:H7. Dentre as 54 amostras de alface, apenas 08 demonstraram *E. coli*, com contagens de ND a 3,43 log₁₀ UFC/g (14.8%). Apenas uma amostra de alface apresentou *S. Cerro*, a qual foi coletada em propriedade que também apresentou esse sorovar de *Salmonella* em adubo orgânico. De forma geral, a precipitação foi baixa (0,43 a 0,86 mm), a umidade relativa foi alta (82 a 90,2%), a temperatura foi variável (13,3°C a 22,9°C), assim como a radiação solar (10,64 a 670kJm²). As análises estatísticas demonstraram que quando a radiação solar foi alta houve influência significativa nas contagens de coliformes totais nas amostras de alface e solo, as quais apresentaram contagens mais altas. Já as contagens de coliformes termotolerantes nas amostras de água de irrigação apresentaram contagens mais baixas, quando a radiação solar foi alta. Os resultados demonstram a existência de fontes de contaminação microbiológicas ao longo da cadeia produtiva de alface destinada à alimentação escolar do Sul do Brasil. Embora a contaminação das alfaces tenha sido baixa, destaca-se a necessidade de controle do tempo de compostagem de adubos orgânicos, a utilização de água de irrigação de boa qualidade e uso de água de lavagem potável. Além disso, destaca-se a necessidade de higienização adequada desses folhosos, antes de seu consumo, principalmente devido ao público-alvo ser composto por um grande número de crianças.

Palavras-chave: Alface, contaminação microbiológica, parâmetros climáticos, alimentação escolar, agricultura familiar, Sul do Brasil.

ABSTRACT

Lettuce is one of the most consumed vegetables in Brazil. Several state schools in the State of Rio Grande do Sul, Southern Brazil, add this kind of vegetable to the menu of school meals in order to offer a balanced diet rich in nutrients and fiber. Since June 2009, when Law No. 11.947 was enacted, it was determined that at least 30% of school meals funding should be invested in the purchase of food produced by family farmers. However, the hygienic-sanitary conditions of these properties, as well as the microbiological quality of lettuce produced by them are still poorly known. Based on this, the objective of this study was to investigate the microbiological quality and climatic factors on the family-farm-production of lettuce intended for school meals of Southern Brazil. The study included four rural properties which produce conventional lettuces intended for 159 municipal schools of Rio Grande do Sul. During the period from July/2013 to April/2014, each property was visited 3 to 5 times, when samples of lettuce, soil, fertilizers, irrigation water and washing water were collected and analyzed. The temperature of water samples also were measured. Climatic parameters such as rainfall, outside temperature, solar radiation and relative humidity were also collected. The results demonstrated high counts of *Escherichia coli* ranging from 3.51 to 5.57 log₁₀ CFU/g (83.3%) in organic fertilizers, and the presence of *Salmonella* Cerro in a sample, suggesting problems in controlling the composting time. Soil samples demonstrated high counts of *E. coli*, ranging from Not Detected (ND) to 3.83 log₁₀ CFU/ (7.4%) in farms that used organic fertilizer. A soil sample collected in a property that used chemical fertilizer showed lower counts of *E. coli*, but the presence of *S. Cerro*. The irrigation water samples showed thermotolerant coliform counts, ranging from ND to 23 MPN/ 100ml. The highest counts were obtained in dam water samples, while the lowest counts were demonstrated in river samples and in natural water source samples, located in the top of a hill. Samples of the washing water also demonstrated varied amount of thermotolerant coliforms, being that the lowest counts were observed in waters coming from the well and the highest ones from the same irrigation water well mentioned above. No water sample showed *Salmonella* or *E. coli* O157:H7. Only 8 out of the 54 lettuce samples showed *E. coli* with counts of ND to 3.43 log₁₀ CFU/g

(14.8%). Just one sample of lettuce presented *S. Cerro*, which was collected in the property that also showed the same serovar of *Salmonella* in organic fertilizer. In general, the precipitation was low (0.43 to 0.86mm), the relative humidity was high (82 to 90.2%), the outside temperature was variable (13.3°C to 22.9°C), as well as the solar radiation (from 10.64 to 670 MJm²). Statistical analysis showed a significant influence of solar radiation on the total coliform counts on lettuces and soil, because when the former was high, the latter were high too. However, when the solar radiation was high, irrigation water samples demonstrated lower thermotolerant coliforms counts. The results demonstrated the existence of sources of microbiological contamination along the production chain of lettuce destined for school feeding in Southern Brazil. Although contamination of lettuces was low, results demonstrated the need of controlling the composting time of organic fertilizers, the use of irrigation water with good quality and the use of potable washing water. In addition, there is the need of adequate sanitization of leafy greens before its consumption, mainly because the students in schools of Southern Brazil are mostly children.

Keywords: Lettuce, microbiological contamination, climate parameters, scholar food, family farms, Southern Brazil.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Scatter plots presenting the correlation between total coliforms in soil samples (log10 CFU/g) and total coliforms on lettuce samples (log10 CFU/g).....41
- Figura 2** - Scatter plots presenting the correlation between total coliforms on lettuce samples (log10 CFU/g) and irrigation water temperature (°C).....42
- Figura 3** - Scatter plots presenting the correlation between total coliforms on lettuce samples (log10 CFU/g) and washing water temperature (°C).....43
- Figura 4** - Scatter plots presenting the correlation between the fecal indicators: *E. coli* in fertilizer samples (log10 CFU/g) and total coliforms in fertilizer samples (log10 CFU/g).....44
- Figura 5** - Scatter plots presenting the correlation between total coliforms on lettuce samples (log10 CFU/g) with outside temperature (°C).....45

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Sampling scheme and number of lettuces, soil, chemical and organic fertilizers, washing and irrigation water collected in four familiar farms from July/2013 to April/2014 in Southern Brazil.....46
- Tabela 2** - Description of the mean climatic parameters used (temperature, relative humidity, precipitation and solar radiation) during the seven days prior to and including the sampling day at the family farms in Southern Brazil.....47
- Tabela 3** - Overview of the samples lettuce, soil, fertilizer (organic and chemical), washing water and irrigation water which contain hygiene indicators in farms of Southern Brazil. For pathogens *Salmonella* spp., the results expressed as presence or absence in 25g.....48
- Tabela 4** - Microbiological and temperature results of washing and irrigation water samples collected at family farms in Southern Brazil.....49
- Tabela 5** - Comparison of the mean log₁₀ CFU g/mL of the analyzed lettuce, soil, fertilizer, wash water and irrigation water samples related to low and high solar radiation (MJ/m²) at family farms in Southern Brazil.....50

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 OBJETIVOS.....	16
1.1.1 OBJETIVO GERAL.....	16
1.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 CULTURA DA ALFACE.....	17
2.2 FONTES DE CONTAMINAÇÃO NA CULTURA DE ALFACE.....	18
2.2.1 Solo e adubo.....	18
2.2.2 Águas de irrigação e de lavagem.....	19
2.3 PARÂMETROS CLIMÁTICOS.....	21
2.4 ALIMENTAÇÃO ESCOLAR E AGRICULTURA FAMILIAR.....	22
3 RESULTADOS.....	25
3.1 Artigo 1 - Microbiological contamination and climatic factors on the family-farm-production of lettuces destined for school meals in Southern Brazil.....	26
4 DISCUSSÃO GERAL.....	56
5 CONCLUSÕES.....	60
REFERÊNCIAS.....	62

1 INTRODUÇÃO

A alface (*Lactuca sativa* L.) é um dos vegetais folhosos mais consumidos no Brasil e no mundo, sendo que no nosso país, o cultivar mais consumido é o tipo “Crespa”, representando aproximadamente 65% de participação no mercado (SUINAGA, et al., 2013).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2003), o consumo diário de frutas e vegetais, *per capita*, deve ser de 400g/dia, a fim de prevenir doenças e promover à saúde. Nesse contexto, e no intuito de oferecer uma alimentação equilibrada aos estudantes matriculados nas escolas públicas brasileiras, em 1955, foi criado o Programa Nacional de Alimentação Escolar (PNAE), contribuindo com à formação de hábitos alimentares saudáveis e incentivando o consumo de vegetais e frutas pelos estudantes.

No Brasil, desde 16 de junho de 2009, o Fundo Nacional do Desenvolvimento da Educação (FNDE) determinou, através da Lei nº 11.497, que pelo menos 30% do total dos recursos financeiros repassados aos governos estaduais e municipais para a alimentação escolar, devam ser utilizados na aquisição de gêneros alimentícios oriundos da agricultura familiar (BRASIL, 2009). Cabe ressaltar que, a agricultura familiar é responsável pela produção de 70% dos alimentos consumidos diariamente pela população brasileira (BRASIL, 2012). Entretanto, as condições higiênico-sanitárias e as medidas de controle capazes de prevenir a contaminação dentro das propriedades rurais brasileiras são pouco conhecidas e podem não ser as ideais, pois diversos surtos alimentares têm sido registrados, envolvendo o consumo de frutas e hortaliças (CDC, 2010; OLIVEIRA et al., 2012; RODRIGUES et al., 2014). Ao longo dos anos têm ocorrido um aumento das Doenças Transmitidas por Alimentos

(DTA) envolvendo vegetais crus, sendo que os principais agentes envolvidos são: *Salmonella* spp. e *E. coli* O157:H7. Esses micro-organismos patogênicos são causadores de doenças e podem levar à morte (FORSYTHE, 2013). No Brasil, a legislação exige a ausência de *Salmonella* spp. em alimentos (BRASIL, 2001).

Baseado no fato que as crianças têm sido apontadas como mais vulneráveis às DTA e que hortaliças, como a alface, têm sido amplamente consumidas no Brasil, o controle da contaminação desse vegetal assume grande importância, principalmente no âmbito escolar. Como um exemplo, recentemente, ocorreu um surto em 18 estados americanos, envolvendo pepinos infectados com *Salmonella* Saintpaul, onde 84 pessoas adoeceram e 28% dos doentes foram hospitalizados (CDC, 2013). Da mesma forma, na Europa, diversos micro-organismos patogênicos têm sido veiculados por vegetais, causando importantes surtos alimentares (RUBINO et al., 2011).

Adicionado a isso, os controles empregados na prevenção ou redução da contaminação de alimentos, dentro das escolas brasileiras, podem não ser os ideais. Por exemplo, Oliveira et al. (2013) desenvolveram uma pesquisa junto a 120 escolas públicas municipais e estaduais de Porto Alegre, atendidas pelo PNAE, onde foram analisados diversos alimentos. Conforme esses pesquisadores, em 83% das escolas, as frutas e hortaliças foram higienizadas de forma inadequada, destacando, que mesmo que em baixas contagens, a presença de *E. coli* foi verificada em 42,8% das escolas.

Uma vez que a alface proveniente da agricultura familiar é bastante utilizada no cardápio de escolas da rede pública de muitos municípios do Rio Grande do Sul e que esse vegetal é oferecido para um total de 86.142 estudantes mensalmente, o

presente estudo teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica e os fatores climáticos na produção de alfaces destinadas à alimentação escolar em propriedades de agricultura familiar no Sul do Brasil.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a qualidade microbiológica e os fatores climáticos na produção de alfaces destinadas à alimentação escolar em propriedades da agricultura familiar no Sul do Brasil.

1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar amostras de alface, solo, fertilizantes químicos e orgânicos, água de irrigação e de lavagem, quanto à contagens de Coliformes Totais e Termotolerantes e a presença de *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Escherichia coli* 0157:H7;

- Verificar a temperatura das águas utilizadas para irrigação e lavagem das alfaces quanto à influência na presença de micro-organismos;

-Correlacionar os parâmetros climáticos com as contagens de micro-organismos indicadores e comparar com a presença de patógenos;

- Verificar se as alfaces fornecidas a escolas municipais possuem qualidades higiênico-sanitárias adequadas para o consumo dos escolares;

- Identificar medidas de controle possíveis de serem adotadas pela agricultura familiar e pelas escolas para a produção e consumo de alfaces seguros.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CULTURA DA ALFACE

A alface (*Lactuca sativa* L.) pertence à família das *Asteraceae*, é originária da Europa e da Ásia, sendo utilizada na alimentação desde 500 a.C. Na sua maioria desenvolvem-se em climas amenos, sendo a hortaliça mais consumida no Brasil e no mundo (HENZ & SUINAGA, 2009). Destaca-se pelo consumo *in natura* em saladas, tanto para uso doméstico como comercial (MORETTI & MATTOS, 2006).

Esta hortaliça é uma planta herbácea que pode ser encontrada com folhas lisas ou crespas, do verde amarelado até o verde escuro e também na coloração roxa. No mercado brasileiro, há cinco principais tipos de alface que se diferenciam nas folhas e na formação da cabeça. Encontra-se alface do tipo Americana, Crespa, Lisa, Mimosa e Romana e, no Brasil, as alfaces mais conhecidas são as crespas e as lisas (HENZ & SUINAGA, 2009).

Segundo o IBGE (2006), a produção de alface é 525.602 toneladas/ano, sendo a alface crespa a hortaliça mais consumida no Brasil tendo uma representatividade de 65% de participação no mercado interno. A produção ocorre principalmente próxima aos centros consumidores, nos chamados “cinturões verdes” (HENZ & SUINAGA, 2009; SUINAGA, et al., 2013).

No Brasil, o cultivo da alface, na sua maioria, tem sido em campo aberto (SALA & COSTA, 2012), entretanto, há pelo menos quatro sistemas produtivos que diferem entre si: o cultivo convencional e o orgânico, ambos em campo aberto; o cultivo no sistema hidropônico e no solo com proteção, tendo suas diferenças tanto no manejo da cultura como na pós-colheita (HENZ & SUINAGA, 2009).

2.2 FONTES DE CONTAMINAÇÃO NA CULTURA DA ALFACE

Alguns estudos relatam a importância do controle na produção primária de alface, tendo em vista que a água de irrigação, água de lavagem, solo e adubos podem ser importantes fontes de contaminação (HOLVOET et al., 2014; RODRIGUES et al., 2014). Os micro-organismos patogênicos podem estar presentes em qualquer uma das etapas de produção: na semente, no solo, no adubo orgânico ou inorgânico, na água de irrigação e de lavagem, nos manipuladores e no produto final, que será comercializado e consumido. Sem o controle adequado no campo, em todas as fases de produção, as alfaces podem se tornar importantes veículos de transmissão de intoxicações e infecções alimentares (JOHANNESSEN et al., 2004; ARBOS et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011; MAFFEI et al., 2013; RODRIGUES et al., 2014).

Em vista disso, é importante conhecer a procedência e a qualidade da água de irrigação e água de lavagem. Além disso, verificar se as sementes são certificadas, a qualidade do adubo utilizado, como é feita a manipulação, bem como o armazenamento e o transporte dessas hortaliças (SOON et al., 2012). Rodrigues et al. (2014) identificaram a qualidade dos adubos orgânicos, a qualidade da água de irrigação e a potabilidade da água de lavagem como os principais fatores a serem controlados na produção de alfaces em propriedades orgânicas do Rio Grande do Sul. Esses fatores serão abordados a seguir.

2.2.1 Solo e adubo

O solo é uma importante fonte de nutrientes para as plantas, pois contém substratos que promovem o desenvolvimento do sistema radicular, sendo que na

produção de hortaliças a necessidade é maior de macro nutrientes como: nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e enxofre (AMARO et al., 2007).

Além destes componentes fornecidos pelo solo, o adubo orgânico é outra importante fonte de nutrientes para as hortaliças, porém a utilização implica em uma adequada compostagem, a fim de eliminar os micro-organismos patogênicos, o que diminui o risco de contaminação (JOHANNESSEN, 2005). Estercos de bovinos e suínos, cama de frango e adubação verde são alguns exemplos de adubagem utilizados para fornecer nutrientes, porém necessitam de manejo e tratamento adequados para não prejudicar a qualidade microbiológica final do produto (JOHANNESSEN, 2005; SEDIYAMA et al., 2008). De forma geral, aconselha-se que os adubos orgânicos sejam compostados por no mínimo 90 dias (EMBRAPA, 2003). Por meio de uma compostagem adequada, patógenos como *Salmonella* spp. e *E. coli* podem ser eliminados, o que diminui o risco de contaminação (RODRIGUES et al., 2014).

A utilização do adubo orgânico também melhora a fertilidade e as propriedades físicas dos solos muito argilosos ou arenosos (MORETTI, 2003). É importante destacar que o local ideal para o cultivo de hortaliças deve ter acesso a uma fonte de material orgânico para a produção de adubos e compostos, reduzindo a dependência de adubos químicos (AMARO et al., 2007). Os solos utilizados na produção de hortaliças devem ser avaliados quanto ao potencial de contaminação por micro-organismos ou produtos químicos (MORETTI, 2003).

2.2.2 Águas de irrigação e de lavagem

Segundo o *Statistical Yearbook* (FAO, 2012), a água é o recurso natural mais utilizado pela agricultura, correspondendo a 70% do consumo mundial. A agricultura utiliza basicamente quatro métodos de irrigação: superficial, aspersão, localizada (gotejamento) e subsuperficial (BRASIL, 2011), sendo que para cada método dois ou mais sistemas de irrigação podem ser utilizados, isso dependerá do tipo de solo, clima, cultura, disponibilidade de energia e condições socioeconômicas a que ele se destina (EMBRAPA, 2008).

Os recursos hídricos utilizados na agricultura incluem as águas de rios, riachos, represas, valas ou canais de irrigação, águas subterrâneas e também de poços artesianos. A água de irrigação deve apresentar boa qualidade, isto é, livre de excesso de sais solúveis e de produtos poluentes e baixas contagens de micro-organismos. A utilização de água tratada é rara, pois o alto custo dificultaria a produção desses cultivares (EMBRAPA, 2003).

No Brasil, a água proveniente de rios, represas ou canais de irrigação são normalmente bombeadas e transportadas através de canos que percorrem longa distância, para que possam ser utilizadas nas plantações. Essas águas não recebem tratamento prévio, e podem ser fonte de contaminação, haja visto que frequentemente animais utilizam desta mesma água (EMBRAPA, 2003).

A resolução n.º 357/2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), estabelece que para a irrigação de hortaliças ou de frutas que se desenvolvam rentes ao solo e que são consumidas cruas, sem remoção de casca ou película, não devem ser poluídas por excrementos humanos, necessitando de inspeções sanitárias periódicas, sendo que não deverá ser excedido o limite de 200 coliformes termotolerantes por 100 mililitros de água (BRASIL, 2005). Cabe

ressaltar, no entanto, que diversos estudos mostraram que a água de irrigação é uma importante fonte de contaminação para esses cultivares (NIGHTINGALE et al., 2004; JAY et al, 2007; CDC, 2010; RODRIGUES et al., 2014).

Conforme Oliveira et al. (2012), a possível presença de micro-organismos patogênicos, tais como a *E. coli* 0157:H7, em hortaliças irrigadas com água contaminada é crescente, tornando muito importante a avaliação da água de irrigação.

Outro fator importante a ser controlado é o local das plantações, objetivando controlar a influência das inundações na qualidade microbiológica das hortaliças. Em um estudo realizado na Espanha em setembro de 2012, foram analisadas amostras de águas de irrigação, de solo e de alface, após uma inundação e foi detectada a presença de *Salmonella* spp., uma semana após o evento. De dez amostras analisadas (água de irrigação, solo e alface), oito estavam contaminadas com *Salmonella* spp. (CASTRO-IBAÑEZ et al., 2014).

2.3 PARÂMETROS CLIMÁTICOS

Na produção de hortaliças, os fatores climáticos são muito importantes, destacando-se a temperatura, a umidade e a radiação solar. Estes fatores influenciam no ciclo, na qualidade e na produtividade das hortaliças, as quais apresentam um desempenho mais satisfatório em condições de temperaturas mais amenas, com médias entre 18°C a 22°C. Considerando todas as regiões do país, o Brasil tem uma grande diversidade climática, o que possibilita o cultivo de hortaliças com qualidade, durante todo o ano (AMARO et al., 2007).

Na região Sul, nas estações do outono e primavera, quando as temperaturas

estão mais amenas, a produção de hortaliças é favorecida. No entanto, em outras regiões do Brasil, como a região Norte, por exemplo, que possui altas temperaturas e muita umidade, durante praticamente todo o ano, somente hortaliças resistentes ao calor conseguem se desenvolver (AMARO et al., 2007).

Com relação a presença de micro-organismos, alguns estudos relatam que fatores climáticos podem influenciar na presença de micro-organismos indicadores e bactérias patogênicas como por exemplo, *Salmonella*, *E. coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes* (SUSLOW et al., 2003; PARK et al., 2013; CASTRO-IBÁÑEZ et al., 2014; HOLVOET et al., 2014;). Em um estudo realizado por Holvoet et al. (2014), a presença de *E. coli* nas amostras de alface teve uma significativa, porém baixa correlação entre a temperatura externa e a precipitação acumulada. Resultados similares foram encontrados por Park et al. (2013), os quais analisaram os principais impactos das mudanças climáticas (aumento da temperatura e precipitação) sobre as fontes de contaminação e agentes patogênicos de origem alimentar. Os autores concluíram que, ainda que esses fatores como: temperatura, precipitação e concentração de *E. coli* não possam prever a presença de patógenos, poderão fornecer informações sobre os períodos mais críticos de possível contaminação dos produtos e das águas utilizadas.

2.4 ALIMENTAÇÃO ESCOLAR E AGRICULTURA FAMILIAR

O Programa Nacional de Alimentação Escolar (PNAE), criado em 1955, tem como objetivo “contribuir para o crescimento e o desenvolvimento biopsicossocial, a aprendizagem, o rendimento escolar e à formação de hábitos alimentares saudáveis dos alunos” e os recursos financeiros são destinados para alimentação escolar dos

alunos de toda a educação básica, incluindo educação infantil, ensino fundamental, ensino médio de jovens e adultos matriculados em escolas públicas e filantrópicas (PEIXINHO, 2013).

Segundo o Fundo Nacional de Desenvolvimento da Educação (FNDE), em 2012, o programa beneficiou 45 milhões de estudantes da educação básica, sendo que no Rio Grande do Sul foram atendidos 2.412.942 estudantes da rede pública.

De acordo com a Lei nº 11.497, de 16 de junho de 2009, art. 14 “do total dos recursos financeiros repassados pelo FNDE, no âmbito do PNAE, no mínimo 30% (trinta por cento) deverão ser utilizados na aquisição de gêneros alimentícios diretamente da agricultura familiar e do empreendedor familiar rural ou de suas organizações, priorizando-se os assentamentos da reforma agrária, as comunidades tradicionais indígenas e comunidades quilombolas” (BRASIL, 2009).

Dentro deste contexto, os alimentos precisam atender às exigências do controle de qualidade estabelecidas pelas normas a qual é regulamentada. A medida também estimula o desenvolvimento econômico, gerando renda para as comunidades envolvidas (BRASIL, 2006).

Conforme dados da Prefeitura Municipal de Porto Alegre (PMPA), atualmente, há um total de 54.074 estudantes matriculados nas escolas municipais de Porto Alegre. De acordo com os cardápios oferecidos pelo Setor de Nutrição e elaborados por nutricionistas, visando contemplar uma alimentação com os nutrientes necessários para o desenvolvimento e bom desempenho escolar, as hortaliças são inseridas diariamente nos cardápios. Atualmente, são oferecidas 900.000 refeições/mês e a alface está entre as hortaliças mais utilizadas, aparecendo de quatro a seis vezes, num período médio de 20 dias úteis, dentro do mês,

correspondendo a 25% desse consumo (PORTO ALEGRE, 2013a; PORTO ALEGRE, 2013b).

Dentro desta temática e dentre os diversos tipos de produtos cultivados pela agricultura familiar, as hortaliças são amplamente cultivadas e destacam-se por ser de fácil cultivo e possibilitar um retorno econômico rápido. Além disso, nessas pequenas propriedades onde a principal mão-de-obra é a familiar, há a necessidade que esses agricultores adquiram conhecimentos e tecnologias para o cultivo de hortaliças, o que melhora a produtividade (AMARO et al., 2007).

No Brasil, a agricultura familiar é responsável pelo abastecimento do mercado interno com alimentos e matérias-primas e a produção de hortaliças é uma alternativa para a agricultura familiar pela facilidade de adaptação a essa prática e por ocupar pequenas áreas (AMARO et al., 2007).

3 RESULTADOS

Os resultados do presente estudo estão apresentados na forma de artigo científico a ser submetido ao Periódico *Food Control*.

3.1 Artigo 1 - Microbiological contamination and climatic factors on the family-farm-production of lettuces destined for school meals in Southern Brazil

Elsevier Editorial System for Food Control

Microbiological contamination and climatic factors on the family-farm-production of lettuces destined for school meals in Southern Brazil

Elis Regina Gomes Alfama¹; Mariângela Santiago Terra¹; Daniela Comparsi Laranja²; Fernanda Camboim Rockett³; Diego Chemello Müller¹; Ana Beatriz Almeida de Oliveira³; Eduardo César Tondo¹

¹Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICTA/UFRGS). Av. Bento Gonçalves 9.500, prédio 43212, Campus do Vale, Agronomia, CEP: 91501-970, Porto Alegre/RS, Brazil.

²Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente/UFRGS. Rua Sarmiento Leite 500, Sala 150, Centro, CEP: 90050-170, Porto Alegre/RS, Brazil.

³Centro Colaborador em Alimentação e Nutrição do Escolar da Universidade Federal do Rio Grande do Sul CECANE/UFRGS. Rua Ramiro Barcelos, 2400/4º andar, CEP: 90035-003 Porto Alegre/RS, Brazil.

* Corresponding author: Eduardo César Tondo – E-mail: tondo@ufrgs.br – (55 51) 3308-6677

Abstract

Since 2009, students of state schools in Brazil must receive a balanced school meal, and at least 30% of these foods must come from Brazilian family farms. Thus, the aim of this study was to evaluate the microbiological contamination and climatic factors on lettuces destined for school meals produced at family farms in Southern Brazil. In this study, four family farms responsible for providing lettuce for 159 Brazilian state schools were analyzed. The farms were visited 3 to 5 times and a total of 197 samples were collected, including lettuce, soil, fertilizers, irrigation and washing water. The samples were analyzed for total coliforms, *Escherichia coli* and the presence of *Salmonella* spp. and *E. coli* O157:H7. In addition, the climatic parameters on the microbiological contamination were analyzed. The results demonstrated *E. coli* contamination in several samples, ranging from 3.51 to 5.57 log₁₀ CFU/g (83.3%) for organic fertilizer, Not Detected (ND) to 3.83 log₁₀ CFU/g (7.4%) for soil, and ND to 3.43 log₁₀ CFU/g (14.8%) for lettuces. 58.8% of irrigation water samples demonstrated thermotolerant coliforms, ranging from <1.1 to 23 MPN/100mL. *Salmonella* Cerro was detected on three samples (organic fertilizer, soil, and lettuce) and *E. coli* O157: H7 was not found. Statistical analysis demonstrated that higher solar radiation influenced in higher counts of total coliforms on lettuces and in soil samples. However when the solar irradiation were higher, lower counts of total and thermotolerant coliforms were observed in irrigation water samples. The presence of *S. Cerro* and the expressive counts of *E. coli* on lettuces indicate a potential risk in its consumption, highlighting the necessity of sanitization of these leafy greens before consumption in school of Southern Brazil.

Keywords: *Lactuca sativa*; microbiological analysis; family farming; production chain; climatic parameters, Southern Brazil.

1. Introduction

Lettuce (*Lactuca sativa* L.) is one of the most commonly consumed leafy vegetables in Brazil and the variety most consumed is the “Curly” (crespa) lettuce (Suinaga, Boiteux, Cabral, & Rodrigues, 2013).

In Brazil, the family farms are responsible for producing 70% of total foods consumed by Brazilians every day, highlighting as an important productive sector of the country (BRASIL, 2012). Different types of vegetables are widely produced by family farmers and lettuce is one of the most important, being produced most of the time in open fields (Sala & Costa, 2012). This vegetable is present in several meals and diets (PORTO ALEGRE, 2013), promoting healthy and nutritious preparations besides being a food rich in fiber and vitamins (WHO, 2003).

In order to provide a balanced diet to students enrolled in Brazilian state schools, the federal government, in 1955, created the National School Food Program (PNAE), contributing to develop healthier eating habits of students and encouraging the consumption of vegetables and fruits. According to a regulation of PNAE, (law n°.11.497 of 2009), at least 30% of the total financial resources transferred by the National Fund for the Development of Education (FNDE) to school feeding must be used to acquire derived foodstuffs from family farming (BRASIL, 2009). However, few studies have been done evaluating the microbiological quality and hygienic conditions of fruits and vegetables produced in family farms. For example, Arbos, Freitas, Stertz and Carvalho (2010), studying 13 rural farms in the city of Curitiba, Brazil, showed the presence of *Salmonella* spp. in 25% of samples of carrots and in 20% of lettuce samples analyzed. Rodrigues et al. (2014) analyzed 132 samples of manure, field soil, fertilizer, water, workers' hands, equipment, lettuce seedlings and crops in farms producing organic lettuce in Southern Brazil and found several samples contaminated with *E. coli*, being that the highest counts were observed in manure. Additionally, the same study reported that *E. coli* 0157:H7 was found in two samples of irrigation and washing water and *Salmonella* spp. was detected in manure and manured soil of two farms.

Actually, lettuces can be contaminated throughout the chain production mainly by soil, fertilizers, irrigation and washing water (Castro-Ibáñez, Gil, Tudela, & Allende, 2014; Johannessen, Froseth, Solemdal, Jarp, Wasteson, & Rorvik, 2004; Ilic, Rajic,

Britton, Grasso, Wilkens, & Totton, 2012; Rodrigues et al., 2014; Suslow, Garrett & Busta, 2003). According to Johannessen, Froseth, Solemdal, Jarp, Wasteson and Rorvik (2004), as lettuces can be contaminated in several productions steps and are consumed raw, there is a potential risk of foodborne outbreak involvement. Some foodborne outbreaks have been reported involving vegetables in Brazil (BRASIL, 2013; Cruz, Cenci, & Maia, 2006). For example, in Brazil, 110 outbreaks associated with leafy vegetables were reported, from 2000 to 2013 (BRASIL, 2013).

In addition, some studies have reported that climate events or parameters such as flooding, temperature and solar radiation have been identified as factors that may influence to microbiological contamination of fresh vegetables (Castro-Ibáñez, Gil, Tudela, & Allende, 2014; Ceuppens, Hessel, Rodrigues, Bartz, Tondo, & Uyttendaele, 2014; Holvoet, Sampers, Seynnaeye, & Uyttendaele, 2014). For example, a study carried out in Murcia, Spain, showed high levels of coliforms and *E. coli* in water samples (5 and 4 log CFU/100mL, respectively) after a flooding in a vegetable farm, and solar irradiation was important to reduce these contamination (Castro-Ibáñez, Gil, Tudela, & Allende, 2014).

Thus, the aim of this study was to investigate sources of microbiological contamination and climatic factors on lettuces destined for school meals produced at familiar farms in Southern Brazil.

2. Materials and Methods

2.1. Selection of lettuce producing farms

Four family farms producing lettuces located on the rural area of Northern coast of the State of Rio Grande do Sul, Southern Brazil, were investigated in the period from July/2013 to April/2014. Farms were associated with a cooperative of rural farmers and were designated as Farm 1, 2, 3, and 4. Farm 3 participated in the study only in visits carried out in 2013. Background information on the agricultural practices were obtained by visual inspection of the farm during the visits and using a questionnaire applied to the farm owners. Before the sampling, growers signed a Commitment Term for Participation.

2.2. Characteristic of the farms

The farms were small rural properties with 2 to 6 hectares of planting area, and its workers were people of the family of the owner's farm. The farming work was carried out by 2 or 3 people, what characterizes this kind of agriculture. All farms produce in open fields, and the conventional lettuce seedlings of Farms 1, 3 and 4 were originated from the same supplier. Farm 2 produced its own lettuce seedling.

The fertilization system diverged among the farms. Chemical fertilizers were used in all farms, but organic fertilizer also were used in Farm 2 and Farm 3, poultry and swine manure were used in Farm 2, while cattle and poultry manure were used in Farm 3. Both farms did not control of the amount of manure used nor the time of composting.

All farms used sprinkler irrigation systems. Farms 1 and 2 used a water pump for irrigation of the plantations from a river near the farms. Farm 3 used natural spring water pumped to irrigate the plantation and for washing the lettuces. Farm 4 used rainwater collected in a small dam inside the property, from where the water was pumped to irrigate the plantations and used as a wash water, as well.

The wash water used by Farms 1 and 2 were of the artesian wells drilled by the Department of Public Service of the Municipality. Farm 3 used a natural water source. The farms did not have a unique system for washing the lettuces, i.e. sometimes, they immerse lettuces in water inside a concrete tank and sometimes the lettuces were washed using a hose in plastic boxes.

2.3. Sampling plan

All farms were visited of 3 to 5 times, except for Farm 3 that was visit 3 times. In each visit, lettuce samples, soil, chemical and organic fertilizer, washing and irrigation water were collected. The amount of collected samples is demonstrated on Table 1. The temperature of the irrigation and washing water samples were also measured in each visit.

2.3.1. Sampling of lettuce, soil, chemical and organic fertilizers

Nine samples of lettuce heads were randomly collected in different points of the plantation. After, lettuce heads were washed in tap water, packaged in sterile

plastic bags, according to procedure performed by producers before delivery of lettuce for schools. The lettuce of Farms 1, 2 and 4 were washed using hoses, while lettuces of Farm 3 in a wash tank. Soil samples were collected from a 30 cm² area around each lettuce planted and each sample consisted of 200 g of soil. Nine 200 g samples of chemical and organic fertilizers were collected directly from packaging. Samples were identified and placed in sterile plastic bags. The nine fertilizer samples were pooled inside 3 plastic bags.

2.3.2. Sampling of irrigation water, wash water and temperature

For the sampling of the irrigation water sources at each farm, three samples of 300 mL each were collected in different points in order to obtain one pooled sample and put in a sterilized plastic bottle. To collect the samples, the bottles were immersed upside down into the water source to a depth of 20-30 cm.

Before the washing water sampling, the taps were disinfected with 70% (v/v) of ethylic alcohol and then opened. After the water flowed for 60s, the water samples were collected directly into a sterile bottle. Water samples were collected at each visit in each producer. The temperature of water samples were measured using a thermometer (Alla France®, Chemillé, France).

All the collected samples were transported by car inside thermal boxes, under refrigeration (7°C), in around 2h, to the Food Microbiology and Control Laboratory of the Institute of Food Science and Technology at ICTA/UFRGS for further analyses.

2.3.3. Microbiological parameters and methods of analysis

Total coliforms and *E. coli* were used as hygienic indicators and *Salmonella* spp. and *E. coli* O157:H7 were considered as enteric pathogens. Total coliforms and *E. coli* were analyzed in samples of lettuce, soil, manure and chemical fertilizer. Samples of 25 g were placed in 225 mL 0.1% (w/v) peptone water and homogenized inside plastic bags using a homogenizer (Stomacher®, Davie, USA), for 30 s. Decimal dilutions were prepared and 1 mL of each of them was placed on (Petrifilm™, United States) plates and incubated to 24 ± 2 h at 37 ± 1°C.

At the laboratory, the three irrigation water bottles collected in different points of each farm were homogenized in a Stomacher® bags for 30 s to obtain one pooled

sample (3 x 300 mL = 1 pool). For wash water, one sample collected in each farm was directly analyzed from the sterile bottles. To determine thermotolerant and total coliforms of irrigation and wash water, the Most Probable Number (MPN) method using the multiple-tube technique, was applied (APHA, 1998).

Samples were analysed for the presence of *Salmonella* spp. according to ISO 6579:2002 (2002). *E. coli* O157:H7 was analysed using the methods described by ISO 16654:2001 (2001). Serological tests were performed using polyvalent serum (Probac do Brasil, São Paulo, Brasil). Moreover, all isolates identified as *Salmonella* and *E. coli* were sent to the reference Laboratory of *Enterobacteriaceae* at the Bacteriology Department of the Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ) in order to be serotyped.

2.3.4. Climatic parameters

The climatic parameters as accumulated temperature, relative humidity, precipitation and solar radiation were obtained in the National Institute of Meteorology automatic weather stations located in a city of Torres, 50 km away from the farms (Table 2). The results of solar radiation (MJ/m^2) were expressed in low (10.64 to 105.36 MJ/m^2) and high (324.79 to 670 MJ/m^2) radiation (Table 5). The average of the climatic parameters of the seven days prior the date of collection, including the day of collection, was calculated (Holvoet et al, 2014).

2.4. Statistical analyses

All analyses were performed with IBM SPSS Statistics version 20 at a significance level of 5% ($p = 0.05$). Descriptive statistics were used for the calculation of general information as the means, minimum, maximum, and standard deviation to describe the dataset. The Pearson correlation coefficient was calculated ($p < 0.05$) between hygienic indicators and lettuce, soil, chemical fertilizer and organic fertilizer, washing and irrigation water samples, as well as the weekly means of the outside temperature, the accumulated precipitation, the relative humidity and the solar radiation. The temperature measurements of irrigation water and washing water samples were additionally included to calculate the correlations. The Student's T-Test was used for the comparison between presence or absence of pathogens and the

above referred parameters. The samples with results below the detection limit were included in the analysis.

3. Results

3.1. Microbiological sampling

In all farms, the presence of total coliforms was detected in the majority of samples analyzed (Table 3). On the lettuce, total coliform counts ranged from ND to 5.75 log₁₀ CFU/g, in soil from 2.17 to 5.45 log₁₀ CFU/g, and in organic fertilizer from 2.47 to 5.67 log₁₀ CFU/g. Total coliforms and *E. coli* were not found in chemical fertilizer samples.

In 8 out of 54 lettuce samples (14.8%) *E. coli* counts were verified, ranging from ND to 3.43 log₁₀ CFU/g. The highest concentration of *E. coli* was identified on a lettuce sample collected at Farm 3 (3.43 log₁₀ CFU/g) in the first visit in July/2013.

E. coli was detected in 4 out of 54 soil samples (7.4%) and counts ranged from ND to 3.83 log₁₀ CFU/g. Twenty-four organic fertilizer (manure) samples were analyzed in Farm 2 and Farm 3, and 20 out of 24 samples (83.3%) were contaminated with *E. coli* with counts of 3.51 to 5.57 log₁₀ CFU/g. The presence of *S. Cerro* was observed in a organic fertilizer sample in Farm 2, where high counts (5.57 log₁₀ CFU/g) of *E. coli* were found. Thirty chemical fertilizer samples were analyzed in Farm 1 and Farm 4 and *E. coli* were not detected.

The results in Table 4 refers to the analyses of irrigation water and washing water samples collected in all visits. *Salmonella* spp. and *E. coli* O157:H7 were not detected. Thermotolerant coliforms were present in 38% (7 out of 18; <1.1 to 23 MPN/100mL) in the washing water and 58% (10 out of 17; <1.1 to 23 MPN/100mL) in the irrigation water samples. Total coliforms were present in 33% (6 out of 18; <1.1 to >23 MPN/100mL) of washing water and 76% (13 out of 17; <1.1 to >23 MPN/100mL) of irrigation water samples. The presence of *E. coli* (results not shown) was demonstrated in an irrigation water sample on Farm 4.

The presence of *S. Cerro* was confirmed in three samples i.e. a soil sample of Farm 1 (collected in the 2th visit), a lettuce sample and an organic fertilizer (manure)

sample collected in Farm 2 at 3th visit and 5th visit, respectively (Table 3). *E. coli* O157:H7 was not found in any analyzed sample.

3.2. Correlation among hygienic indicators

There were no significant correlation between *E. coli* found on soil and fertilizer samples when compared with total coliforms in irrigation and washing water. However, there was a significant, but moderate correlation between *E. coli* found on lettuce with total coliforms in washing water ($r = 0.538$; $p = 0.021$). Additionally, significant correlation between total coliforms on lettuces with total coliforms in soil was found ($r = 0.668$; $p = 0.002$ Fig. 1). A positive correlation between total coliform counts on lettuces with the temperature of irrigation and washing water was observed ($r = 0.725$; $p = 0.001$; Fig. 2 and $r = 0.717$; $p = 0.001$; Fig. 3, respectively).

Total coliforms in soil samples demonstrated a significant correlation with total coliforms of washing water ($r = 0.203$; $p = 0.005$), as well total coliforms of soil were correlated with washing and irrigation water temperatures ($r = 0.680$; $p = 0.002$ and $r = 0.679$; $p = 0.003$, respectively).

There was a significant and strong correlation observed between *E. coli* and total coliforms in fertilizer samples ($r = 0.965$; $p = 0.000$; Fig. 4).

3.3. Correlation between influence of the climatic conditions and microbiological parameters in lettuces

There were no significant correlations between *E. coli* on lettuce, soil, and fertilizer samples with any analyzed climatic parameters (outside temperature $p = 0.147$; $p = 0.344$; $p = 0.964$, respectively; relative humidity $p = 0.935$; $p = 0.279$; $p = 0.599$, respectively; precipitation $p = 0.191$; $p = 0.065$; $p = 0.350$, respectively, and solar radiation $p = 0.255$; $p = 0.706$; $p = 0.832$, respectively).

There was a significant correlation between total coliforms on lettuces and in soil and the outside temperature ($r = 0.715$; $p = 0.001$; $r = 0.682$; $p = 0.002$, respectively). Additionally, it was found a significant correlation between total coliforms on lettuce samples and solar radiation ($r = 0.471$; $p = 0.48$). However, when categorized solar radiation in low and high (Table 2), it was found several significant differences between means when compared with total coliforms of lettuce and soil samples and total and thermotolerant coliforms irrigation water samples (Table 5).

Means log₁₀ CFU/g of total coliforms on lettuce ($p = 0.004$) and soil ($p = 0.011$) samples were compared and showed significant difference between means when compared with categorized solar radiation. Results were also found for log₁₀ CFU/100 mL of total and thermotolerant coliforms in irrigation water samples when compared with categorized solar radiation $p = 0.045$ and $p = 0.006$, respectively.

4. Discussion

4.1. Microbiological quality in lettuce production at family farms

Overall, total coliforms were found in the majority of samples analyzed in this study, and this is an expected result, considering that samples came from open field farms i.e. soil, organic fertilizers, lettuces on fields and irrigation and washing water. Only the chemical fertilizer samples did not present coliforms and *E. coli* what can be explained by the industrial control of suppliers.

Other studies reported similar results concerning total coliform contamination on leafy greens. For example, in a study carried out by Maffei, Silveira, & Catanoz (2013) 65 organic and 65 conventional leafy vegetable samples were analyzed and total coliforms counts, ranging from 2 to 7 log₁₀ CFU/g for organic vegetables and ranging from 1 to 7 log₁₀ CFU/g for conventional vegetables, were found. Rodrigues et al. (2014) found total coliforms on organic lettuces ranging from 3.3 to 4.6 log₁₀ CFU/g. The same authors also reported manure samples with 4.6 to 6.7 log₁₀ CFU/g and manured soil samples with 3.4 to 5.5 log₁₀ CFU/g.

The results of the present study demonstrated that practically 8% of soil samples were contaminated by *E. coli* and one of them presented *S. Cerro*, as well. A study conducted in twenty-one farms in New York State, found *Salmonella* in 13 out of 263 soil samples analyzed (Strawn, Gröhn, Warchocki, Worob, Bihn, & Wiedmanna, 2013). The Arkansas Department of Health (ADH), in august 2012, was notified of gastrointestinal illness outbreaks in two Arkansas state prisons by *Salmonella*, where were identified three serotypes: Anatum, Heidelberg and Cerro and of the latter were isolated from 19 samples (Gicquelasis, et al., 2014).

Farm 2 and 3 demonstrated organic fertilizers with high counts of *E. coli*, indicating inadequacy of the manure control. Corroborating this result and according

to the information obtained from farmers during data collection, the use of organic fertilizers was not adequately controlled in neither of both farms. The use of fertilizers was based on the owner experiences, without any technical support. Because of that, the composting time was not controlled and frequently fresh manure was added on the composted manure. Similar results were demonstrated by Rodrigues et al. (2014) who reported that the fertilizers of 3 farms of Southern Brazil demonstrated high counts of *E. coli*, varying from 3.4 to 5.6 log₁₀ CFU/g. The same authors suggested that fertilizers were the possible responsible for the contamination, because the composting times were not appropriate. They reported that organic manure should be composted at least 90 days, before using.

The results of the present study demonstrated that practically 15% of lettuce samples were contaminated by *E. coli* and one of them presented *S. Cerro*. A study conducted in Spain also showed contamination on the lettuce samples, where *E. coli* was detected on 22.2% (16 samples) of organic and on 12.5% (9 samples) of conventional lettuces (Oliveira, Usall, Vinas, Anguera, Gatius, & Abadias, 2010). In Brazil, another study analyzed 130 samples of different varieties of vegetables produced in São Paulo, Southwest region of Brazil, and found high counts of *E. coli* on 41.5% in the organic and 40.0% on the conventional vegetables (Maffei, Silveira, & Catanoz, 2013). A study in Belgium showed slightly lower counts of *E. coli* in the lettuce samples (5%), but high counts of *E. coli* in soil (37%) and water samples (59%) (Holvoet, Sampers, Seynnaeye, & Uyttendaele, 2014).

Another important vehicle of contamination of vegetable produce is the water used for irrigation and washing, which in this study demonstrated to be contaminated by total and thermotolerant coliforms. According to the Brazilian Regulation (CONAMA resolution 357/2005), irrigation water for vegetables not expected to exceed 2×10^2 CFU/100mL of thermotolerant coliforms (BRASIL, 2005). This study the irrigation water was slightly higher contaminated than the washing water by both kind of microorganisms, what can be explained because the sources of the irrigation waters were a dam, a natural source and a river, while the washing water came from a deep well and from natural sources, as well. In view of this, attention should be given to the frequent presence of thermotolerant coliforms indicating fecal contamination.

Samples of washing water collected in Farms 1 and 2 demonstrated low contamination of thermotolerant and total coliforms, what can be explained because the water came from an artesian well with 90 m depth. Artesian wells are accepted to have better quality of water, because they are protected of superficial contamination and of the access of animals (Richardson, Nichols, Lane, Lake, & Hunter, 2009). On the other hand, the washing water samples used by Farm 3 and 4 (nature source and dam containing rainwater, respectively) were contaminated with total and thermotolerant coliforms, which might be explained by the free access of animals to this dam. Some studies have reported that fresh produce can be contaminated with feces coming from wildlife and domestic animals, with pathogenic bacteria such as *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* (e.g., cattle, swine, poultry and frog) (CDC, 2010; Hanning, Nutt, & Ricke, 2009; Jay et al., 2007; Nightingale, et al., 2004). According to Harris et al. (2003), the contamination of irrigation water by domestic animals (like cattle, dog, and poultry) can be easily avoided, however the contamination by wildlife, like birds, insects and frogs are much more difficult to control. Authors as Jensen, Storm, Forslund, Baggesen and Dalsgaard (2013) and Park et al. (2013) reported that wild animals could be an important vehicle for *E. coli* and *Salmonella* contamination of fresh produce.

Some studies around the world have reported foodborne outbreaks involving leafy vegetables contaminated by water (Beuchat, 1996; Delaquis, Bach, & Dinu, 2007; Itohan, Peters, & Kolo, 2011). Other studies showed the presence of *E. coli* and *E. coli* O157:H7 in fresh vegetables (Beraldo & Filho, 2011; Moyne, Sudarshana, Blessington, Koike, Cahn & Harris, 2011; Park et al., 2013).

Although *E. coli* O157:H7 was not detected in any of the samples analysed in the present study, this food pathogen has been identified by other studies, indicating the need of controlling the vegetable production chain in order to prevent foodborne diseases (Islam, Doyle, Phatak, Millner, & Jiang, 2005; MAFF, 2000; Oliveira, Ritter et al., 2012; Oliveira, Viñas et al., 2012).

In this study, the presence of *S. Cerro* was confirmed in three samples (lettuce, soil and organic fertilizer). Considering the lettuce sample, it is in disagreement with the Brazilian Legislation (BRASIL, 2001), since the presence of this pathogen is unacceptable in foods, because of its serious health hazard.

A study carried out in São Paulo, Brazil, by Oliveira, Souza, Bergamini and Martinis (2011) analyzed 162 minimally processed leafy vegetables samples and found contamination of *Salmonella* spp. in 2 samples of chicories (S. Madelia and S. London). Differently, a study carried out by Maffei, Silveira, & Catanoz (2013) 130 leafy vegetable samples were analyzed, *Salmonella* spp. was not found any samples. Even though some studies have demonstrated the presence of food pathogens on Brazilian vegetables, the percentage of contamination has been frequently low.

4.2. Correlation between indicator microorganisms and pathogens

The correlation between different indicators such as *E. coli*, total and thermotolerant coliforms was not statistical significantly when compared with *S. Cerro* present in irrigation water, and this result can be explained due to the low number of samples contaminated with *Salmonella*. However, a significant correlation was found between *E. coli* on lettuce and total coliforms in washing water samples, suggesting that washing water could be the responsible for lettuce contamination. Study carried out by Holvoet, Sampers, Seynnaeye and Uyttendaele, (2014), found strong correlation between *E. coli* and coliforms, *E. coli* and enterococci, and coliforms and enterococci in irrigation water samples collected in lettuce farms in Belgium. According to these authors, the results indicating a higher probability for the presence of pathogens if higher counts of *E. coli*, enterococci and coliforms were found in water samples.

In a study carried out in Spain, Castro-Ibáñez, Gil, Tudela and Allende (2014) found a positive correlation between the presence of *Salmonella* spp. and counts of coliforms and *E. coli*, but it was not significant for *Enterococcus*. In the same study, after a flooding it was demonstrated a positive and significant correlation between *E. coli* levels in water and *E. coli* levels on lettuces ($R^2 = 0.998$), but *E. coli* levels in the soil counts had a low correlation ($R^2 = 0.655$).

4.3. Influence of the climatic conditions in lettuce culture

In the present study, there were no significant correlations between *E. coli* counts and outside temperatures, relative humidity, precipitation and solar radiation. However, significant correlation were found between total coliforms and outside

temperature, and solar radiation. Other study, carried out in Belgium, found positive and significant correlations between the outside temperature and accumulated precipitation with *E. coli* counts on lettuces (Holvoet, Sampers, Seynnaeye, & Uyttendaele, 2014).

The highest contamination of *E. coli* in the analyzed samples was observed in the period of the year when the outside temperature was lower (July and September, 14.1°C and 13.3°C, respectively) compared with others periods (Dec. 19.9°C and Jan. 22.9°C) and (March 22.3°C and April 15.7°C). Different results were found by Holvoet, Sampers, Seynnaeye and Uyttendaele (2014), that demonstrated the prevalence of *E. coli* and presence of pathogens in water were higher when the outside temperature and water temperature were higher (Holvoet, Sampers, Seynnaeye, & Uyttendaele, 2014). In the present study, total coliforms on lettuce samples were higher when the temperature of the irrigation and washing waters were higher, as well.

Moderate correlations were found between total coliforms on lettuces and in soil when compared with outside temperature. Results showed that at low (13°C to 16°C) and at high (20°C to 23°C) temperatures, the presence of total coliforms was significant. Differently, a study performed by Castro-Ibáñez, Gil, Tudela and Allende (2014) suggested that the significant reduction of coliforms on lettuces may be due to the high outside temperature.

In our study, there was a low correlation between total coliforms on lettuces and solar radiation, but when solar radiation was categorized as high and low, significant differences between means (Table 5) were found. The presence of total coliforms on lettuces and in soil samples were more significant when there were higher solar radiation. These results suggested that solar radiation did not contribute to the reduction of microorganisms on the lettuce samples. However, thermotolerant and total coliforms in the irrigation water samples counts were lower, when the solar radiation was high. Different result were found by Castro-Ibáñez, Gil, Tudela and Allende (2014) who correlated the reduction of microorganisms on lettuces with higher solar radiation, after two weeks of a flooding. These results suggested that the solar radiation could have contributed to the microbial reduction.

5. Conclusion

The presence of *E. coli* was detected in all family farms investigated in Southern Brazil, being that this microorganism was identified on lettuces, soil, but mainly in the organic fertilizers of Farm 2 and 3, where high levels of contamination were found. This result demonstrates the need of a program to inform and educate the farmers of the risks of contamination caused by the use of fresh organic fertilizer (not properly composted) on vegetables.

Irrigation and washing water presented different counts of thermotolerant coliforms, and the presence of animals near irrigation and washing water sources could be the origin of such contamination. This is other important risk factor concerning lettuces for school meals.

Although, *E. coli* O157:H7 has not been found in any of the samples analyzed and the sanitary-hygienic indicators were not correlated statistically with the presence of *S. Cerro*, the presence of *S. Cerro* in three samples (lettuce, soil and organic fertilizer) reinforces the need for preventive measures in the production of lettuces in family farms of Southern Brazil.

In relation to climatic parameters, the results demonstrated reduction of thermotolerant coliforms and total coliforms in the irrigation water when solar radiation was higher. However, although the environmental conditions do not have definitive results regarding for presence of indicator microorganisms or pathogens on lettuces, they are important factors to be considered, once they can provide information about the period of greatest risk of contamination of leafy greens.

The results of the present study highlighted the necessity of controlling on the sources of water used for both irrigation and washing of lettuces. Also, it highlighted the necessity of control the composting time of manure in order to avoid contamination of lettuces by pathogenic bacteria.

In addition, the implementation of Good Agricultural Practices at family farms and the sanitization of leafy greens before the consumption are necessary to reduce the risks of contamination on vegetable in schools.

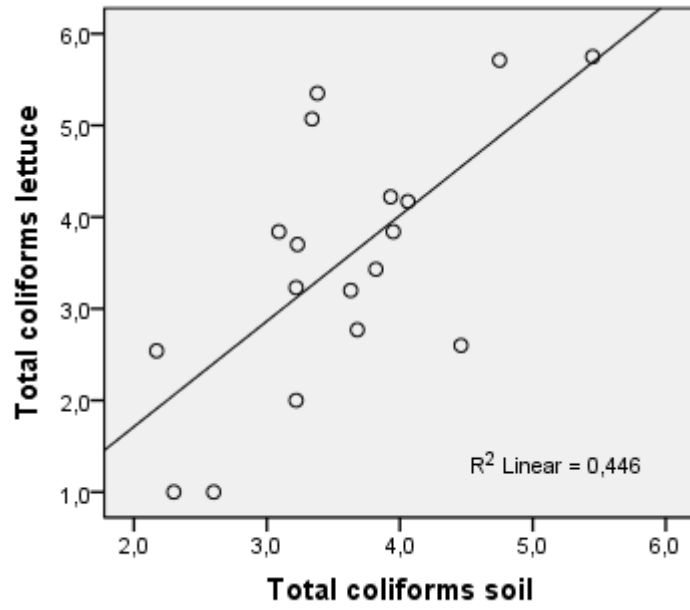


Figure 1: Scatter plots presenting the correlation between total coliforms in soil samples (log10 CFU/g) and total coliforms on lettuce samples (log10 CFU/g).

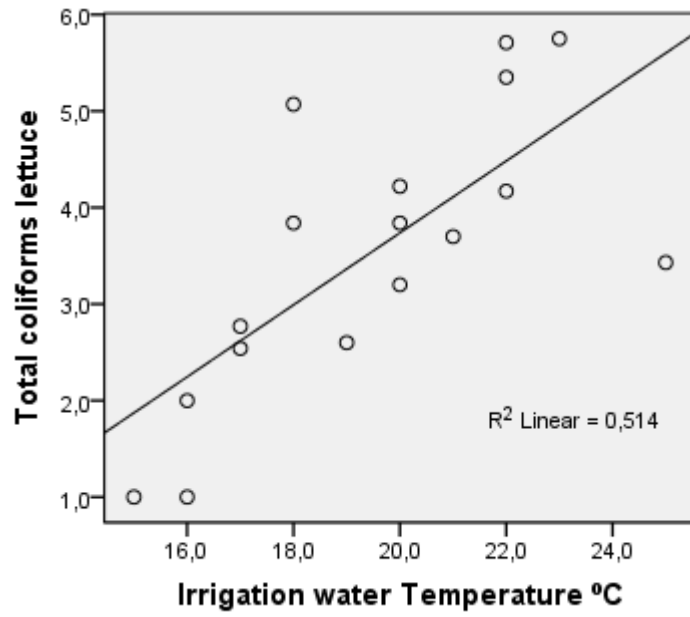


Figure 2. Scatter plots presenting the correlation between total coliforms on lettuce samples (log₁₀ CFU/g) and irrigation water temperature (°C).

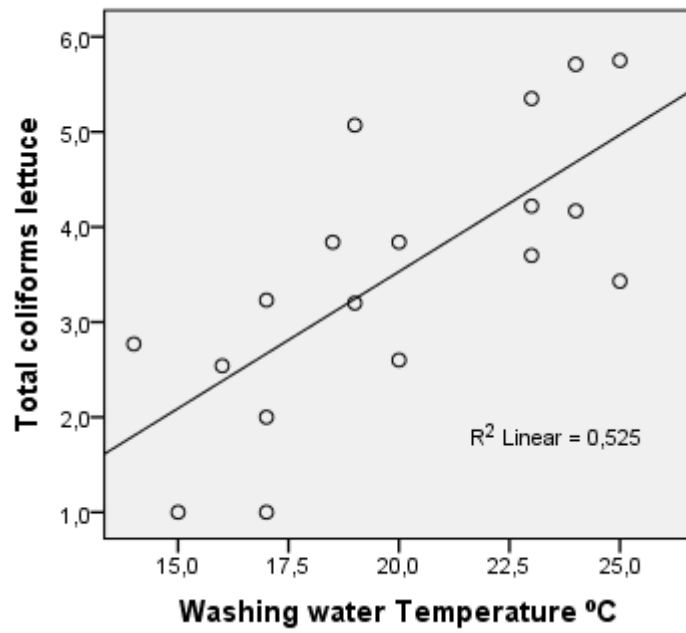


Figure 3. Scatter plots presenting the correlation between total coliforms on lettuce samples (log₁₀ CFU/g) and washing water temperature (°C).

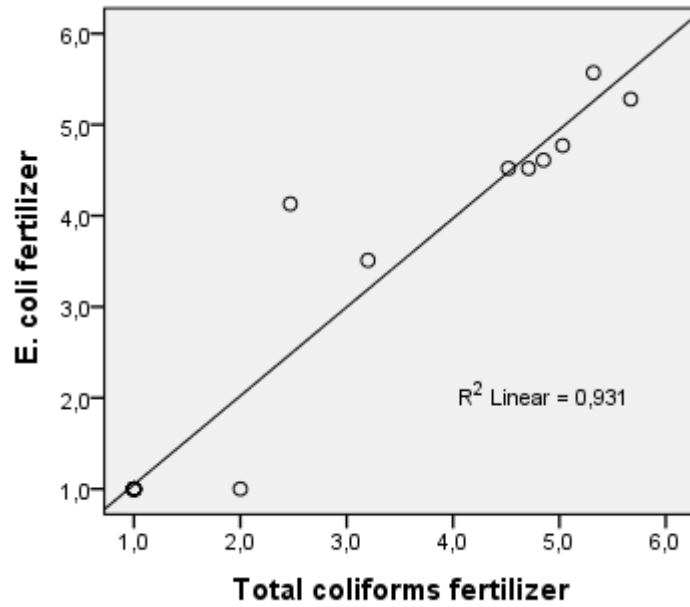


Figure 4. Scatter plots presenting the correlation between the fecal indicators *E. coli* in fertilizer (log10 CFU/g) and total coliforms in fertilizer samples (log10 CFU/g).

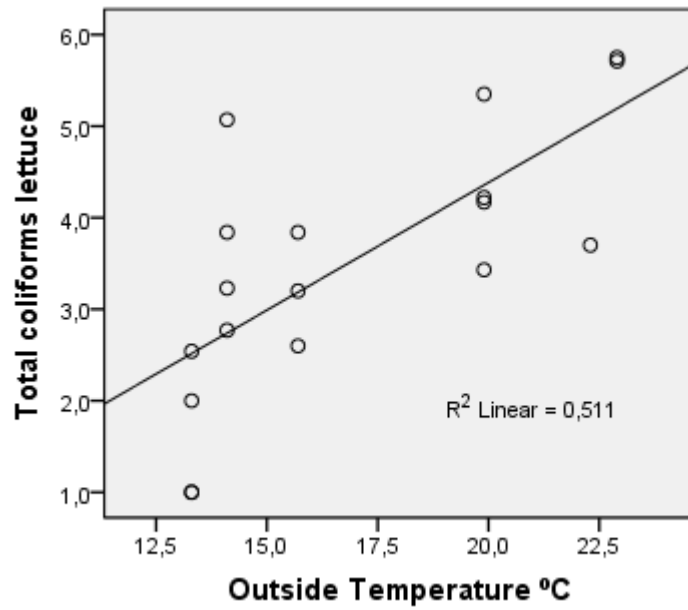


Figure 5. Scatter plots presenting the correlation between total coliforms on lettuce (log₁₀ CFU/g) with outside temperature (°C).

Table 1 - Sampling scheme and number of lettuces, soil, chemical and organic fertilizers, washing and irrigation water collected in four familiar farms from July/2013 to April/2014 in Southern Brazil.

Farm	Sampling visits ^a	Type and amount of samples collected				
		Lettuce	Soil	Fertilizer	Wash Water	Irrigation Water
1	1, 2, 3, 4, 5	15	15	15	5	5
2 ^b	1, 2, 3, 5, 6	15	15	15	5	5
3 ^c	1, 2, 3	9	9	9	3	2
4	1, 2, 3, 4, 6	15	15	15	5	5
	Total	54	54	54	18	17

^a Visit 1=July, 2013; Visit 2=Setp, 2013.; Visit 3=Dec, 2013.; Visit 4=Jan.,2014; Visit 5= March, 2014; Visit 6=April, 2014.

^b Not planted in January, 2014.

^c Not participated in the studies conducted in 2014.

Table 2 - Description of the mean climatic parameters used (temperature, relative humidity, precipitation and solar radiation) during the seven days prior to and including the sampling day at the family farms in Southern Brazil.

Visit ^a	Temperature(°C) ^b	Relative Humidity (%) ^b	Precipitation (mm) ^b	Radiation (MJ/m ²) ^b
1	14,1	90,2	0,71	10,64 ^c
2	13,3	87	0,43	69,21 ^c
3	19,9	83	0,5	670 ^d
4	22,9	83	0,43	326,79 ^d
5	22,3	87	0,86	324,79 ^d
6	15,7	82	0,07	105,36 ^c

^a Visit 1=July, 2013; Visit 2=Setp, 2013.; Visit 3=Dec, 2013.; Visit 4=Jan.,2014; Visit 5= March, 2014; Visit 6=April, 2014.

^bThe available data are from the National Institute of Meteorology (INMET).

^c Low radiation.

^d High radiation.

Table 3 - Overview of the samples lettuce, soil, fertilizer (organic and chemical), washing water and irrigation water which contain hygiene indicators in farms of Southern Brazil. For pathogens *Salmonella* spp., the results expressed as presence or absence in 25 g.

Samples	n	Hygiene Indicators	Minimum	Maximum	<i>Salmonella</i> Cerro
Lettuce	54	<i>E. coli</i>	ND	3.43	(1/54) ^c
		Total coliforms	ND	5.75	(0/54)
Soil	54	<i>E. coli</i>	ND	3.83	(1/54) ^d
		Total coliforms	2.17	5.45	(0/54)
Organic Fertilizer ^a	24	<i>E. coli</i>	3.51	5.57	(1/24) ^e
		Total coliforms	2.47	5.67	(0/24)
Chemical Fertilizer ^b	30	<i>E. coli</i>	ND	ND	(0/30)
		Total coliforms	ND	ND	(0/30)
Wash Water	18	Total coliforms	0.04	1.40	(0/18)
		Thermotolerant	0.04	1.40	(0/18)
Irrigation Water	17	Total coliforms	0.04	1.36	(0/17)
		Thermotolerant	0.04	1.40	(0/17)

ND: Values expressed <100 are below the detection limit of the dilution tested.

All of the values are presented log₁₀ CFU/g/100mL.

^a Results of the organic fertilizer all samples collected.

^b Results of the chemical fertilizer all samples collected.

^{c, d, e} The presence of pathogens detected on 3rd visit, 2nd visit and 5th visit, respectively.

Table 4 - Microbiological and temperature results of washing and irrigation water samples collected at family farms in Southern Brazil.

Farms	Visit	Washing Water (CFU/100mL)			Irrigation Water (CFU/100mL)		
		Total Coliforms	Thermotolerants Coliforms	Temperature	Total Coliforms	Thermotolerants Coliforms	Temperature
1	1	<1.1	<1.1	18.5	>23	16	18
1	2	<1.1	<1.1	16	3.6	3.6	17
1	3	<1.1	<1.1	25	2.2	1.1	25
1	4	<1.1	<1.1	25	3.6	1.1	23
1	6	<1.1	<1.1	20	1.1	1.1	20
2	1	<1.1	<1.1	19	>23	6.9	18
2	2	<1.1	<1.1	15	>23	23	15
2	3	<1.1	<1.1	23	3.6	1.1	22
2	5	23	12	23	16	5.1	21
2	6	<1.1	<1.1	19	6.9	6.9	20
3	1	>23	5.1	17	NC	NC	NC
3	2	2.2	1.1	17	12	9.2	16
3	3	1.1	1.1	23	1.1	1.1	20
4	1	>23	5.1	14	>23	6.9	17
4	2	>23	12	17	<1.1	1.1	16
4	3	>23	2.2	24	<1.1	<1.1	22
4	4	>23	23	24	9.2	9.2	22
4	6	>23	>23	20	9.2	9.2	19

NC: Irrigation water was not collected due to difficult access after raining.

Table 5 - Comparison of the mean (log₁₀ CFU g/mL) of the analyzed lettuce, soil, fertilizer, wash water and irrigation water samples related to low and high solar radiation (MJ/m²) at family farms in Southern Brazil.

	Rad/Cat (MJ/m ²)	Mean	Std. Deviation
Lettuce E.coli	Low	1.28	0.73
	High	1.77	0.86
Lettuce Total Coliforms	Low	2.89 ^a	1.19
	High	4.77 ^a	0.96
Soil E.coli	Low	1.54	1.08
	High	1.28	0.69
Soil Total Coliforms	Low	3.24 ^b	0.66
	High	4.23 ^b	0.74
Fertilizer E.coli	Low	2.79	1.94
	High	2.23	1.90
Fertilizer Total Coliforms	Low	2.74	1.86
	High	2.31	2.03
Wash Water Thermotolerant	Low	0.43	0.52
	High	0.31	0.52
Wash Water Total Coliforms	Low	0.62	0.67
	High	0.49	0.70
Irrigation Water Thermotolerant	Low	0.75 ^c	0.41
	High	0.15 ^c	0.26
Irrigation Water Total Coliforms	Low	0.93 ^d	0.52
	High	0.41 ^d	0.35

Means followed by the same letters differ significantly.

Rad.: Radiation; Cat.: Categorization.

Low radiation: 10.64 – 105.36 (MJ/m²).

High radiation: 324.79 – 670 (MJ/m²).

References

- APHA. (1998). *Standard methods for the examination of water and wastewater* (20th ed.). Washington: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environmental Federation.
- Arbos, K. A., Freitas, R. J. S., Stertz, S. C., & Carvalho, L. A. (2010). Segurança alimentar de hortaliças orgânicas: aspectos sanitários e nutricionais. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30(1), 215-220.
- Beuchat, L. R. (1996). Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. *Journal of Food Protection*, 59(2), 204-216.
- Beraldo, R. M., & Filho, F. A. (2011). Bacteriological quality of irrigation water from vegetable gardens in the municipalities of Araraquara, Boa Esperança do Sul e Ibitinga, SP. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, 22(3), 345-350.
- BRASIL. (1986). Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução CONAMA Nº 20, de 18 de junho de 1986. Brasília. DF.
- BRASIL. (2001) Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Poder Executivo, Brasília, DF: Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Sec. 1.
- BRASIL. (2005). Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução CONAMA 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*. Brasília. DF.
- BRASIL. (2009). Lei nº 11947 de 16 de junho de 2009. Dispõe sobre o atendimento da alimentação escolar e do Programa Dinheiro Direto na Escola aos alunos da educação básica. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 16 de jun. 2009. http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2009/Lei/L11947.htm.
- BRASIL. (2012). Ministério do Desenvolvimento Agrário. Plano Safra da Agricultura Familiar 2012/2013. http://www.mda.gov.br/planosafra/arquivos/view/Cartilha_Plano_Safra.pdf.
- BRASIL. (2013) Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos: Abril 2013.
- BRASIL. (2014). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) (2014). http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home/page&page=rede_estacoes_automatograf

- Castro-Ibáñez I., Gil, M. I., Tudela, J.A., & Allende, A. (2014). Microbial safety considerations of flooding in primary production of leafy greens: A case study. *Food Research International*.
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention. (2010). Multistate outbreak of human *Salmonella typhimurium* infections associated with aquatic frogs—United States, 2009. *MMWR*. 2010. Rep. 58:1433 – 1436.
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention. Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks, United States. (2012). Annual Report. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2014. <http://www.cdc.gov/foodsafety/pdfs/foodborne-disease-outbreaks-annual-report-2012-508c.pdf>. Access in 31 agt 2014.
- Ceuppens, S., Hessel, C.T., Rodrigues, R.Q., Bartz, S., Tondo, E.C., & Uyttendaele, M. (2014). Microbiological quality and safety assessment of lettuce production in Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, 181, 67-76.
- Cummings, K. J., Warnick, L. D., Elton, M., Rodriguez-Rivera, L. D., Siler, J. D., Wright, E. M., Grohn, Y. T., & Wiedmann, M. (2010). *Salmonella enterica* serotype Cerro among dairy cattle in New York: An Emerging Pathogen? *Foodborne Pathogens and Disease*, v.7, n.6.
- Delaquis, P., Bach, S., & Dinu, L. D. (2007). Behavior of *Escherichia coli* O157:H7 in leafy vegetables. *Journal of Food Protection*, 70(8), 1966-1974.
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), (2008). Comunicado Técnico 53. Instruções práticas para produção de composto orgânico em pequenas propriedades. Brasília. D.F.
- Gicquelais, R. E., Morris, J.F., Matthews, H. S., Stewart Matthews, H., Gladden L., Safi, H., Grayson, C., et al. (2014). Multiple-Serotype *Salmonella* Outbreaks in Two State Prisons — Arkansas, August 2012. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, v. 63(8).
- Golberg, D., Kroupitski Y., Belausov E., Pinto R., & Sela S. (2011). *Salmonella Typhimurium* internalization is variable in leafy vegetables and fresh herbs. *International Journal of Food Microbiology*, 145, 250–257.
- Hanning I.B., Nutt J.D., & Ricke S.C. (2009). Salmonellosis outbreaks in the United States due to fresh produce: sources and potential intervention measures. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6, 635–648.
- Harris, L. J., Farber, J. N., Beuchat, L. R., Parish, M. E., Suslow, T. V., Garrett, E. H., & Busta F. F. (2003). Outbreaks associated with fresh produce: incidence, growth, and survival of pathogens in fresh and fresh-cut produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food*, 2(1), 78–141.

- Harwood, V.J., Levine, A.D., Scott, T.M., Chivukula, V., Lukasik, J., Farrah, S.R., & Rose, J.B. (2005). Validity of the indicator organism paradigm for pathogen reduction in reclaimed water and public health protection. *Applied Environmental Microbiology*, 71, 3163–3170.
- Holvoet K., Sampers I., Seynnaeye M., & Uyttendaele M. (2014). 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*, 171, 21–31.
- Ilic, S., Rajic, A., Britton, C., Grasso, E., Wilkens, W., & Totton, S. (2012). A scoping study characterizing prevalence, risk factor and intervention research, published between 1990 and 2010, for microbial hazards in leafy green vegetables. *Food Control*, 23(1), 7-19.
- Ingham, S.C., Losinski, J.A., Andrews, M.P., Breuer, J.E., Breuer, J.R., Wood, T.M., & Wright, T.H. (2004). *Escherichia coli* contamination of vegetables grown in soils fertilized with noncomposted bovine manure: garden-scale studies. *Applied Environmental Microbiology*, 70, 6420–6427.
- Islam, M., Doyle, M. P., Phatak, S. C., Millner, P., & Jiang, X. (2005). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on carrots and onions grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Food Microbiology*, 22(1), 63-70.
- ISO, British Standard. (2001). *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of Escherichia coli* O157. Incorporating Corrigendum No. 1.
- ISO, International Standard. (2002). *Microbiology of food and animal feeding stuffs: Horizontal method for the detection of Salmonella spp* (4th ed.).
- Itohan, A. M., Peters, O., & Kolo, I. (2011). Bacterial contaminants of salad vegetables in Abuja Municipal Area Concl. Nigéria. *Malaysian Journal of Microbiology*, 7(2), 111-114.
- Jay M.T., Cooley M., Carychao D., Wiscomb G.W., Sweitzer R.A., Crawford- Miksza L., Farrar J.A., Lau D.K., et. al., (2007). *Escherichia coli* O157:H7 in feral swine near spinach fields and cattle, central California coast. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 13, No. 12, 1908–1911.
- Jensen A.N., Storm C., Forslund A., Baggesen D. L., & Dalsgaard A. (2013). *Escherichia coli* Contamination of Lettuce Grown in Soils Amended with Animal Slurry. *Journal of Food Protection*, Vol. 76, No. 7, 1137–1144.
- Johannessen, G. S., Froseth, R. B., Solemdal, L., Jarp, J., Wasteson, Y., & Rorvik, L. M. (2004). Influence of bovine manure as fertilizer on the bacteriological quality of organic iceberg lettuce. *Journal of Applied Microbiology*, 96 (4), 787-794.

- MAFF. *The Ministry of Agriculture Fisheries and Food. (2000). A study of on-farm manure applications to agricultural land and an assessment of the risks of pathogen transfer into the food chain* (Project Number FS2526).
- Maffei, D. F., Silveira, N. F. de A., & Catanoz, M. da P. L. M. (2013). Microbiological quality of organic and conventional vegetables sold in Brazil. *Food Control* 29, 226–230.
- Moyne, A. L., Sudarshana, M. R., Blessington, T., Koike, S. T., Cahn, M. D., & Harris, L. J. (2011). Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in field-inoculated lettuce. *Food Microbiology*, 28(8), 1417-1425.
- Nightingale, K. K., Schukken Y. H., Nightingale E. D., Fortes, E. D., Ho, A. J., Her, Z., Grohn P. L., et al. (2004). Ecology and transmission of *Listeria monocytogenes* infecting ruminants and in the farm environment. *Applied and environmental microbiology*. 4458–4467.
- Oliveira, A. B. A., Ritter, A. C., Tondo, E. C., & Cardoso, M. R. de I. (2012). Comparison of different washing and disinfection protocols used by food services in Southern Brazil for lettuce (*Lactuca sativa*). *Food and Nutrition Sciences*, 3, 28-33.
- Oliveira, M. A., Souza, V. M., Bergamini, A. M. M., & Martinis, E. C. P. (2011). Microbiological quality of ready-to-eat minimally processed vegetables consumed in Brazil. *Food Control*, 22(8), 1400-1403.
- Oliveira, M., Usall, J., Vinas, I., Anguera, M., Gatiús, F., & Abadias, M. (2010). Microbiological quality of fresh lettuce from organic and conventional production. *Food Microbiology*, 27, 679-684.
- Oliveira, M., Viñas, I., Usall, J., Anguera, M., & Abadias, M. (2012). Presence and survival of *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce leaves and in soil treated with contaminated compost and irrigation water. *International Journal of Food Microbiology*, 156(2), 133-140.
- Park S., Navratil S., Gregory A., Bauer A., Srinath I., Jun M., Szonyi B., et al., (2013). Generic *Escherichia coli* Contamination of Spinach at the Preharvest Stage: Effects of Farm Management and Environmental Factors. *Applied and Environmental Microbiology*, 79 (14). 4347–4358.
- PORTO ALEGRE. Prefeitura Municipal de Porto Alegre. Secretaria Municipal de Educação e Desporto. Setor de Nutrição- 2013. Disponível em: <http://websmed.portoalegre.rs.gov.br/escolas/nutricao/> Acesso em: 17 de maio de 2013.
- Richardson, H. Y., Nichols, G., Lane, C., Lake, I. R., & Hunter, P. R. (2009). Microbiological surveillance of private water supplies in England: The impact of

environmental and climate factors on water quality. *Water Research*, 43(8), 2159-2168.

Rodrigues, R. Q., Loiko, M. R., Paula, C. M. D., Hessel, C. T., Jacxsens L., Uyttendaele, M., Bender, R. J., Tondo, E. C. (2014). Microbiological contamination linked to implementation of good agricultural practices in the production of organic lettuce in Southern Brazil. *Food Control*, 42, 152-164.

Sala F.C., & Costa C.P. (2012). Retrospectiva e tendência da alfacicultura brasileira. *Horticultura Brasileira*, v. 30, n.2, p.187-194.

Savichtcheva, O., & Okabe, S. (2006). Alternative indicators of fecal pollution: Relations with pathogens and conventional indicators, current methodologies for direct pathogen monitoring and future application perspectives. *Water Research*, 40(13), 2463–2476.

Suinaga, F. A., Boiteux L. S., Cabral, A. S., & Rodrigues, C. da S. (2013). Comunicado Técnico 88: Efeitos do calor e fontes tolerância ao florescimento precoce em variedades de alface do tipo americana. EMBRAPA. Brasília, DF. http://www.cnph.embrapa.br/paginas/serie_documentos/publicacoes2013/cot_88.pdf.

Suslow, T. V., Oria, M. P., Beuchat, L. R., Garrett, E. H., Parish, M. E., Harris, L. J., et al.(2003). Production practices as risk factors in microbial food safety of fresh and fresh-cut produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2(1), 38-77.

Strawn, L. K., Gröhn, Y. T., Warchocki, S., Worobo, R. W., Bihn, E. A., & Wiedmanna, M. (2013). Risk factors associated with *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* contamination of produce fields. *Applied and Environmental Microbiology*, v.79, n.24, 7618–7627.

WHO (2013). Fruit and Vegetable Promotion Initiative/A Meeting Report/25 27/08/03. Disponível em: http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/f&v_promotion_initiative_report.pdf. Access in 23 julho 2013.

4 DISCUSSÃO GERAL

A alface faz parte do cardápio de muitas escolas, em vários municípios do Rio Grande do Sul (PORTO ALEGRE, 2013a; PORTO ALEGRE, 2013b). No entanto, as condições higiênico-sanitárias dessas hortaliças, o manejo da plantação, os cuidados com a utilização de adubo químico e orgânico e o tipo de água utilizada na irrigação e na lavagem, são pouco conhecidas. Além disso, os vegetais frescos frequentemente estão envolvidos com surtos de DTA (RUBINO et al., 2011; CDC, 2013), demonstrando a importância de seu controle microbiológico.

Os resultados desse trabalho são de grande importância no que diz respeito a qualidade higiênico-sanitária das alfaces consumidas por mais de 86.000 estudantes das escolas da rede pública do Rio Grande do Sul. A qualidade microbiológica das algumas amostras analisadas de solo, alface e adubo orgânico apresentaram contagens elevadas de *E. coli*, demonstrando que as condições de higiene não estavam totalmente satisfatórias na produção em nível de campo. Fator relevante, é que todas as propriedades utilizavam o cultivo dessa hortaliça em campo aberto, o que pode ter facilitado o contato com animais domésticos e silvestres, possivelmente contribuindo com a contaminação por bactérias patogênicas, como a *S. Cerro* encontrada em três amostras analisadas.

Na avaliação da contaminação microbiológica da qualidade das águas de irrigação, 10 de 17 amostras estavam contaminadas com coliformes termotolerantes. As propriedades rurais que tiveram mais contaminação utilizavam água de rio ou de açude abastecido pela água da chuva e não tinham controle ao acesso de animais domésticos ou silvestres. Isso também pode ter contribuído para a presença de *S. Cerro* em uma amostra de alface e sinaliza a possibilidade de demais

contaminações patogênicas. Fato curioso é que em uma das propriedades onde foi detectada a presença de *S. Cerro* no solo, não havia a presença de animais domésticos, como gado, galinhas e porcos, próximo da área de plantação. No entanto, Harris et al. (2003) relata que a presença de animais silvestres como pássaros, por exemplo, é de difícil controle no acesso às plantações e podem ser outro veículo de contaminação.

Além disso, observou-se nesse trabalho que outro importante risco de contaminação na produção de alface foi a utilização de esterco como adubo orgânico nas plantações, sendo que os dois produtores que utilizavam esse tipo de adubo, não faziam o controle do tempo de compostagem. O fato sugere que a presença de *S. Cerro* em duas amostras (adubo orgânico e alface) na mesma propriedade, podem ter sido contaminadas em algum momento pelo uso inadequado deste adubo ou animais. Esses dados corroboram com estudo realizado por Rodrigues et al. (2014), realizado em propriedades produtoras de alface orgânica do sul do Brasil, onde foi detectada a presença de *Salmonella* spp. em uma amostra de solo adubado com esterco. Esses autores relataram que o mesmo pode ter sido a fonte dessa contaminação.

A água utilizada na propriedade rural onde foi encontrada a *S. Cerro* foi proveniente de um rio, acumulada num açude e bombeada e distribuída por aspersão para a irrigação das hortaliças, onde o acesso de animais domésticos e silvestres também era livre, podendo colocar em risco a produção de vegetais. Isso reforça a necessidade de controlar a qualidade da água e o adubo orgânico utilizado nas plantações de hortaliças, assim como o acesso de animais às plantações.

Também foi avaliado no presente estudo, a influência dos fatores climáticos na presença de micro-organismos indicadores e bactérias patogênicas na produção de alfaces, tendo em vista que alguns autores tem demonstrado que fatores climáticos podem influenciar na presença de micro-organismos em vegetais (SUSLOW et al, 2003; PARK et al, 2013; CASTRO-IBAÑEZ et al., 2014; HOLVOET et al, 2014). Durante o período em que foram coletas as amostras, houve pouca variação de umidade relativa e precipitação, porém houve variação de temperatura e radiação solar, tendo em vista que as coletas foram realizadas em diferentes estações do ano. No período que foram realizadas as coletas, a umidade relativa estava alta, entre 82% e 90,2%, ao contrário da precipitação que se manteve baixa, entre 0,07mm e 0,86mm e não foi registrada nenhuma ocorrência de inundações na região onde foram realizadas as coletas. Estatisticamente os parâmetros climáticos não demonstraram correlação com a presença de microrganismos indicadores ou com a presença de *S. Cerro*. Estudo realizado por Castro-Ibañez et al. (2014), analisaram amostras de água de irrigação coletadas uma semana após uma inundação, demonstrando altas contagens de coliformes totais e *E. coli* (entre 5 e 4 log UFC/g, respectivamente). Esses resultados indicaram um nível elevado de contaminação, após a referida inundação e correlação entre elas. Em outro estudo, Rodrigues et al. (2014) encontraram, após uma inundação, nas propriedades 2 e 3, a presença de *E. coli* O157:H7 em duas amostras de água de irrigação e de água de lavagem das alfaces.

Quanto a radiação solar, ocorreu diferenças entre as médias nas amostras com contagens de coliformes totais de alface e de solo, demonstrando que com a radiação solar alta, a presença de coliformes totais foi maior, resultado contrário e

positivo ocorreu com a água de irrigação, quando a radiação solar foi alta, a contagem de coliformes totais e termotolerantes foi menor.

5 CONCLUSÕES

Conforme os resultados obtidos no presente estudo, é possível concluir que:

- As contagens variadas de *E. coli* e a presença de *S. Cerro* em 3 amostras de adubo orgânico, solo e alface provavelmente ocorreu devido à falha na compostagem do adubo orgânico e à presença de animais silvestres ou domésticos, o que foi observado nas propriedades avaliadas.
- As águas utilizadas tanto para irrigação como para lavagem das alfaces apresentaram contagens variadas de coliformes termo-tolerantes, sugerindo que a contaminação possa ter ocorrido por animais silvestres ou domésticos, tendo em vista o livre acesso às fontes de água.
- As temperaturas das águas de irrigação e lavagem, demonstraram que mesmo não reduzindo as contagens de coliformes totais, não influenciaram, estatisticamente, na presença de *S. Cerro*.
- Dentre os parâmetros climáticos analisados, a categorização da radiação solar classificada como alta demonstrou correlação significativa com as baixas contagens de micro-organismos indicadores nas águas de irrigação. Contudo, não foi possível comparar estatisticamente os parâmetros climáticos com a presença de *S. Cerro*.
- Dentre as 54 amostras de alface analisadas, oito apresentaram contaminação por *E. coli* e uma das amostras apresentou também a presença de *S. Cerro*, demonstrando que as condições higiênico-sanitárias dessas amostras não estavam adequadas.

- Sugerem-se as seguintes medidas de controle a serem adotadas pela agricultura familiar: 1) Controle do tempo de compostagem do adubo orgânico utilizado nas plantações; 2) Utilização de fontes seguras de água de irrigação e lavagem; 3) Controle dos animais próximo as fontes de água, tanto de irrigação quanto de lavagem; 4) Implementação de Boas Práticas Agrícolas.
- Sugerem-se as seguintes medidas de controle a serem adotadas pelas escolas: Higienização das alfaces, conforme Portaria nº 78 de 30 janeiro de 2009 do Estado do Rio Grande do Sul, para posterior consumo.

REFERÊNCIAS

- AMARO, G. B. et al. **Informe Técnico 47**. Recomendações técnicas para o cultivo de hortaliças em agricultura familiar. EMBRAPA. Brasília, DF, jan. 2007. Disponível em: http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPH-2009/33346/1/ct_47.pdf. Acesso em 30 out 2014.
- ARBOS, K.A. et al. Segurança alimentar de hortaliças orgânicas: aspectos sanitários e nutricionais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, 30(Supl.1): 215-220, maio 2010.
- BRASIL. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução CONAMA N° 357, de 17 de março de 2005. Publicado no **Diário Oficial da União** de 18 de março de 2005. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>. Acesso em 22 set 2014.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução e RDC n° 12 de 02 janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Poder Executivo, Brasília, DF: Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Sec. 1:45 e 53.
- BRASIL. Portaria Interministerial N° 1.010 de 8 de maio de 2006. Institui as diretrizes para a Promoção da Alimentação Saudável nas Escolas de educação infantil, fundamental e nível médio das redes públicas e privadas, em âmbito nacional. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF. Disponível em: <http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2006/GM/GM-1010.htm>. Acesso em 22 set 2014.
- BRASIL. **Lei nº 11947 de 16 de junho de 2009**. Dispõe sobre o atendimento da alimentação escolar e do Programa Dinheiro Direto na Escola aos alunos da educação básica. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 16 de jun. 2009. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2009/Lei/L11947.htm. Acesso em 20 set 2014.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2011). Seleção dos Sistemas de Irrigação para Hortaliças. Informe Técnico 98. EMBRAPA. Brasília, DF. Disponível em: http://www.cnph.embrapa.br/paginas/bbeletronica/2011/ct/ct_98.pdf. Acesso em 05 set 2014.
- BRASIL. Ministério do Desenvolvimento Agrário (2012). **Plano Safra da Agricultura Familiar 2012/2013**. Disponível em: http://www.mda.gov.br/plano-safra/arquivos/view/Cartilha_Plano_Safra.pdf. Acesso em 22 agosto 2014.
- CASTRO-IBÁÑEZ et al. Microbial safety considerations of flooding in primary production of leafy greens: A case study. **Food Research International**. (2014).
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (2010). Multistate Outbreak of *Salmonella* Saintpaul Infections Linked to Imported Cucumbers.

Disponível em: <http://www.cdc.gov/salmonella/saintpaul-04-13/index.html>. Acesso em 20 agosto 2014.

CENTER FOR SCIENCE IN THE PUBLIC INTEREST. Outbreack Alert! 2001-2010. A Review of Foodborne Illness in America. Mar. 2013. Disponível em: http://cspinet.org/new/pdf/outbreak_alert_2013_final.pdf. Acesso em 18 agosto 2014.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA.(EMBRAPA). **Produção de Mudas de Hortaliças em Ambiente Protegido**. Documentos 72. 2003. Acesso em 18 agosto 2014.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. (EMBRAPA). **Embrapa Milho e Sorgo: Sistemas de Produção**, 1. 2º ed., 2008. Disponível em: http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho_2ed/imetodos.htm. Acesso em 30 jul 2014.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Statistical Yearbook**. World Food and Agriculture. Rome, 2012. p. 290. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/018/i3107e/i3107e00.htm>. Acesso em 20 set 2014.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança dos Alimentos**. 2ª ed. Artmed, Porto Alegre, 2013.

HARRIS et al. Outbreaks Associated with Fresh Produce: Incidence, Growth, and Survival of Pathogens in Fresh and Fresh-Cut Produce. *Comprehensive reviews in food science and food safety*—v. 2, (2003).

HENZ, G.P; SUINAGA F. **Comunicado Técnico 75: Tipos de Alface Cultivados no Brasil**. EMBRAPA. Brasília, DF, nov. 2009. Disponível em: http://www.cnph.embrapa.br/paginas/serie_documentos/publicacoes2009/cot_75.pdf. Acesso em 17 jul 2014.

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**, 171, 21-31. (2014).

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo Agropecuário 2006: Brasil, Grandes Regiões e Unidades da Federação**. Rio de Janeiro. RJ. p.370-371 http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/51/agro_2006.pdf . Acesso em 17 jul 2014.

JAY et al. Escherichia coli O157:H7 in Feral Swine near Spinach Fields and Cattle, Central California Coast. **Emerging Infectious Diseases**. v.13, n.12, Dec. 2007.

JOHANNESSEN et al. Influence of bovine manure as fertilizer on the bacteriological quality of organic iceberg lettuce. **Journal of Applied Microbiology**, 96(4), 787-794, 2014.

JOHANNESSEN, G. S. Use manure in production of organic lettuce – risk of transmission of pathogenic bacteria and bacteriological quality of the lettuce. Oslo, Belgic: Norwegian School of Veterinary Science, 2005.

MAFFEI, D. F. et al. Microbiological quality of organic and conventional vegetables sold in Brazil. **Food Control** 29, 226 – 230, 2013.

MORETTI C. L. Boas práticas agrícolas para a produção de hortaliças. **Horticultura Brasileira**, v. 21, n. 2, jul. 2003.

MORETTI, C.L.; MATTOS, L.M. **Informe Técnico nº 36**:Processamento mínimo de alface crespa. EMBRAPA. Brasília, DF, dez. 2006. Disponível em: http://www.cnph.embrapa.br/paginas/serie_documentos/publicacoes2006/cot_75.pdf. Acesso em 13 jul. 2014.

NIGHTINGALE et al. Ecology and Transmission of *Listeria monocytogenes* Infecting Ruminants and in the Farm Environment. **Applied and environmental microbiology**, Aug. 2004, p. 4458–4467, 2004.

OLIVEIRA, M. A., SOUZA, V. M., BERGAMINI, A. M. M., & MARTINIS, E. C. P. Microbiological quality of ready-to-eat minimally processed vegetables consumed in Brazil. **Food Control**, 22(8), 1400 e 1403, 2011.

OLIVEIRA, M. et al. Presence and survival of *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce leaves and in soil treated with contaminated compost and irrigation water. **International Journal of Food Microbiology**. p.133-140, 2012.

OLIVEIRA, A.B.A. et al. Avaliação da presença de microrganismos indicadores higiênico-sanitários em alimentos servidos em escolas públicas de Porto Alegre, Brasil. **Ciência Saúde Coletiva** v.18, n.4. Rio de Janeiro. RJ. 2013.

PARK S., et al. Generic *Escherichia coli* Contamination of Spinach at the Preharvest Stage: Effects of Farm Management and Environmental Factors. **Applied and Environmental Microbiology**. p. 4347–4358, 2013.

PEIXINHO, Albaneide Maria Lima. The trajectory of the Brazilian School Nutrition Program between 2003 and 2010: report of the national manager. **Ciência Saúde Coletiva**, 18(4), p.909-916, 2013.

PORTO ALEGREa. Prefeitura Municipal de Porto Alegre. Disponível em: <http://www2.portoalegre.rs.gov.br/smed/> Acesso em: 17 de maio de 2013.

PORTO ALEGREb. Prefeitura Municipal de Porto Alegre. Secretaria Municipal de Educação e Desporto. **Setor de Nutrição- 2013**. Disponível em: <http://websmed.portoalegre.rs.gov.br/escolas/nutricao/> Acesso em: 17 de maio de 2013.

RIO GRANDE DO SUL. SECRETARIA DA SAÚDE. **Portaria nº 78**, de jan. de 2009. Aprova a lista de verificação em Boas Práticas para Serviços de Alimentação, aprova Normas para Curso de Capacitação em Boas Práticas para Serviços de Alimentação e dá outras providências. 1 f.

RODRIGUES, R. Q. et al. Microbiological contamination linked to implementation of good agricultural practices in the production of organic lettuce in Southern Brazil. **Food Control**, 42, p.152-164, 2014.

RUBINO, S.; CAPPUCINELLI P.; KELVIN, D.J. *Escherichia coli* (STEC) serotype O104 outbreak causing haemolytic syndrome (HUS) in Germany and France. **J Infect Dev Ctries** 5(6): p.437-440, 2011.

SALA F.C.; COSTA C.P. Retrospectiva e tendência da alfaceicultura brasileira. **Horticultura Brasileira** v. 30, n.2, p.187-194, abr.- jun.2012.

SEDIYAMA, Maria A. N. et al. Fermentação de esterco de suínos para o uso como adubo orgânico. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.12, n.6, p.638-644, 2008.

SOON, J.M. et al. Field application of farm-food safety risk assessment (FRAMP) tool for small and medium fresh produce farms. **Food Chemistry**, 136 p.1603-1609, 2012.

SUINAGA, F.A. et al. **Comunicado Técnico 88**: Efeitos do calor e fontes tolerância ao florescimento precoce em variedades de alface do tipo americana. EMBRAPA. Brasília, DF, mar. 2013. Disponível em: http://www.cnph.embrapa.br/paginas/serie_documentos/publicacoes2013/cot_88.pdf. Acesso em 22 ago. 2014.

SUSLOW et al. Production Practices as Risk Factors in Microbial Food Safety of Fresh and Fresh-Cut Produce. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, v. 2, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Fruit and Vegetable Promotion Initiative/ A Meeting Report/25-27/08/03**. Disponível em: http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/f&v_promotion_initiative_report.pdf. Acesso em 17 jul. 2014.