



Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciência e Tecnologia dos Alimentos
Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Rochele de Quadros Rodrigues
(Nutricionista - IPA)

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA E DOS SISTEMAS DE GESTÃO DA
INOCUIDADE DA CADEIA PRODUTIVA DE ALFACE ORGÂNICA NO SUL DO
BRASIL**

Porto Alegre
2013

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)

Rochele de Quadros Rodrigues
(Nutricionista - IPA)

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA E DOS SISTEMAS DE GESTÃO DA
INOCUIDADE DA CADEIA PRODUTIVA DE ALFACE ORGÂNICA NO SUL DO
BRASIL**

Dissertação apresentada ao Curso 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 César Tondo

Porto Alegre
2013

Rochele de Quadros Rodrigues

(Nutricionista - IPA)

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

JEVERSON FRAZZON
Banca – PPGCTA/UFRGS

ANA BEATRIZ ALMEIDA DE
OLIVEIRA
Banca – Nutrição/UFRGS

MARISA R. DE ITAPEMA CARDOSO
Banca – FAVET/UFRGS

VITOR MANFROI
Diretor do Instituto de Ciência e Tecnologia
de Alimentos. ICTA/UFRGS

*Esta etapa da minha vida não teria sido finalizada com sucesso, sem o apoio, a confiança, o respeito e amor de meu amor, Allison. Obrigada por ser meu refúgio, meu alicerce e por acreditar em mim! Obrigada pela certeza de sempre poder contar com o teu apoio e amor. Obrigada por tudo!
A você Allison, dedico este trabalho!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus Jeová pela sabedoria, perspicácia, paciência, força, fé e amor.

Ao professor Eduardo Tondo pela oportunidade, pelo apoio, pela confiança, pela orientação e pelos olhos que precisei no final desta caminhada e ao professor Bender pela oportunidade, pelo apoio, pela coorientação.

Aos produtores Rurais, por aceitarem participar do estudo, pelo apoio e confiança. A equipe da SMIC, em especial a Cláudia Ache e Marcos. Muito obrigada.

Às minhas colegas e amigas Márcia e Cheila, por todo apoio, companheirismo, ensinamentos e carinho. Obrigada pela certeza de sempre poder contar com o apoio de vocês. Obrigada meninas, vocês fazem parte deste trabalho.

À minha bolsista de iniciação científica Cláudia, por me ajudar do início ao fim e por fazer parte desta caminhada. Ao apoio das colegas de iniciação científica Fabiane, Ana e Anelise, muito obrigada meninas.

Aos colegas do laboratório de microbiologia e controle de alimentos, em especial a Letícia e Ana Ritter, por todo o carinho e apoio. A Betina, sempre querida, incentivando, mesmo que de longe, muito obrigada. E a Vera, pelo carinho, atenção, apoio e café, muito café.

À minha querida Daia, pela força, pelo companheirismo e por alegrar minhas manhãs e tardes. Muito obrigada você é muito importante para mim.

À toda equipe da FAENFI/PUCRS, em especial às minhas colegas e amigas Maria Rita, Luisa, Sonia, Alessandra, Raquel, Carol e Ana, que me acompanharam e apoiaram nesta caminhada desde o início do mestrado até o final. Muito obrigada.

Aos meus sobrinhos Franci, Lucas, Davi, Gabi e Manu, por todo carinho e paciência pela ausência da tia. E as minhas irmãs Isabel, Débora e Virginia, obrigada por todo apoio e carinho, amo vocês!

Em especial ao meu amor Alisson. Sou quem sou por você, meu amor! Obrigada pelos olhos que precisei no final desta caminhada e obrigada por acreditar em mim!

O meu mais sincero OBRIGADO á todos que, de fato, contribuíram para que hoje eu estivesse aqui.

“Que todas as vossas coisas se realizem com amor”.
1 Coríntios 16:14

RESUMO

A busca por alimentos saudáveis, seguros e sustentáveis tem levado a um grande aumento do consumo de alimentos orgânicos, em todo o mundo. Embora esses alimentos sejam claramente menos expostos aos perigos químicos, diversos estudos têm demonstrado contaminação microbiológica significativa em produtos como as alfaces orgânicas, as quais são amplamente comercializadas. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a cadeia produtiva de alfaces orgânicas no sul do Brasil, através de análises microbiológicas e dos sistemas de gestão da inocuidade, buscando identificar possíveis medidas de intervenção a partir do ponto de vista da segurança dos alimentos. Três propriedades rurais de alface orgânica foram analisadas, utilizando as ferramentas *Horticultural Assessment Scheme* (HAS) e *Horticulture Safety Management System Diagnosis* (HSMS-DI). Amostras de adubo, solo adubado, mudas de alface, alface, água de irrigação e lavagem foram coletadas ao longo da cadeia produtiva, seguindo a ordem de início do plantio, durante o crescimento e na colheita das alfaces. As análises microbiológicas foram realizadas segundo o protocolo do HAS e normas internacionais. Para avaliação dos sistemas de gestão de segurança dos alimentos a ferramenta de diagnóstico HSMS-DI, com 58 questões, foi aplicada em cada propriedade rural. As Informações obtidas no HAS e HSMS-DI foram combinadas e um diagnóstico de cada propriedade foi elaborado, assim como foram sugeridas medidas de intervenção. Os resultados do HSMS-DI indicaram que as propriedades rurais apresentavam clara organização e forte embasamento quanto à prevenção dos riscos químicos, no entanto estavam operando em um contexto de risco microbiológico moderado a elevado. Os resultados obtidos com o HAS demonstraram contaminação por microrganismos de origem fecal em diversas amostras, além disso, foi detectada a presença de *E. coli* O157:H7 na água de irrigação e lavagem das alfaces, e a presença de *Salmonella* em adubo. Estes resultados demonstraram a existência natural e inerente de fontes de contaminação microbiológica na cadeia de produção de alfaces orgânicas. Contudo, destaca-se a necessidade de maior apoio aos produtores orgânicos, principalmente na implementação de medidas de controle da compostagem dos adubos e na qualidade da água de irrigação e lavagem dessas propriedades.

Palavras-chave: Alface orgânica. Contaminação microbiológica. Sistemas de gestão de segurança na horticultura.

ABSTRACT

The search for healthy, safe and sustainable food has led to a large increase in the consumption of organic foods worldwide. Although these foods are clearly less exposed to chemical hazards, several studies have demonstrated significant microbial contamination in products such as organic lettuces, which are widely marketed. Thus, the aim of this study was to evaluate the production chain of organic lettuce in southern Brazil, through microbiological analyses and safety management systems in order to identify potential measures from the point of view of food safety. Three rural properties of organic lettuce were analyzed using the Horticultural Assessment Scheme (HAS) and the Horticulture and Safety Management System Diagnosis (HSMS-DI) tools. Samples of compost, fertilized soil, lettuce seedlings, lettuce, irrigation and wash water were collected along the production chain, following the beginning of the planting, the growing and the harvesting of lettuce. Microbiological analyzes were performed according to protocol HAS and international standards. For evaluation of the food safety management, the diagnostic tool HSMS-DI, with 58 questions, was administered to each farm. Information collected on HAS and HSMS-DI was combined and a diagnosis of each property was developed, as were suggested intervention measures. The results of the HSMS-DI indicate that the farms had clear and strong organizational foundation for the prevention of chemical risks, however, were operating in a context of moderate to high microbiological risk. The results obtained with the HAS showed contamination by microorganisms of fecal origin in several samples, furthermore, we detected the presence of *E. coli* O157: H7 in irrigation and wash water, and the presence of *Salmonella* in manure. These results demonstrated the existence of inherent and natural sources of microbiological contamination in the production chain of organic lettuces. However, there is a need for greater support for organic producers, especially in the implementation of control measures for fertilizer composting and in the quality of irrigation and wash water of these properties.

Keywords: Chain Lettuce Organic. Horticultural Assessment Scheme. Horticulture Safety Management System.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Timeline and identification of selected Critical Sampling Locations (CSLs) in primary production of organic lettuce in Southern Brazil. To: Start of the planting. T1: three weeks before harvest T2: two weeks before harvest T3: harvest..... **50**
- Figura 2 - Organization characteristics of three organic lettuce farms in Southern Brazil (blue: farm 1, green: farm 2, red: farm 3) analyzed by the diagnostic tool of Kireziova et al. (2013)..... **51**
- Figura 3 - Evaluation of the design of control activities of three organic lettuce farms in Southern Brazil (blue: farm 1, green: farm 2, red: farm 3) analyzed by the diagnostic tool of Kireziova et al. (2013)..... **52**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Description of Critical Sampling Location (CSLs), samples, quantities, periodicity, microbiological parameters, microbiological methodologies, results interpretation and reference methodology.....	53
Tabela 2 -	. Microbial results of samples collected according risk based sampling plan in three organic lettuce farms of Southern Brazil...	54
Tabela 3 -	Results of irrigation water and wash water collected in three organic lettuce farms of Southern Brazil.....	55
Tabela 4 -	Levels attributed to the indicators representing the context factors, core control and core assurance activities in a food safety management system along three lettuce production farms in Southern Brazil, based on the diagnostic questionnaire.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

APHA	American Public Health Association
BHI	Brain Heart Infusion
BPLS	Ágar Verde Brilhante Modificado
°C	Graus Centígrados
cm ²	Centímetro quadrado
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos ou Água
EC	Caldo <i>Escherichia coli</i>
G	Gramas
ICTA	Instituto de Ciência e Tecnologia dos Alimentos - UFRGS
Log	Logaritmo
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MI	Mililitros
mm	Milímetros
ND	Não detectado
OMS	Organização Mundial da Saúde
MAS	Microbial Assessment Scheme
HAS	Horticultural Assessment Scheme
FSMS	Food Safety Management system
HSMS	Horticulture Safety Management system
VEG-I-TRADE	Projeto - Impacto das Mudanças Climáticas e Globalização na segurança dos alimentos vegetais frescos
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RS	Rio Grande do Sul
UFC	Unidade Formadora de Colônia
WHO	World Health Organization
XLD	Ágar Desoxicolato Lisina Xilose

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1.....	14
1	INTRODUÇÃO.....	15
1.2	OBJETIVOS.....	17
1.2.1	Objetivo geral.....	17
1.2.2	Objetivos específicos.....	17
1.3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
1.3.1	Cultura da alface.....	18
1.3.2	Fontes de contaminação na cultura da alface	19
1.3.2.1	<i>Sementes.....</i>	19
1.3.2.2	<i>Água de irrigação.....</i>	20
1.3.2.3	<i>Solo.....</i>	22
1.3.2.4	<i>Manipuladores.....</i>	23
1.3.2.5	<i>Caixas de transportes e embalagens da Alface.....</i>	24
1.4	O PROJETO VEG-I-TRADE.....	24
1.4.1	Ferramenta HAS - Horticultural Assessment Scheme.....	25
1.4.2	Ferramenta de diagnóstico HSMS-DI - Horticulture Safety Management System Diagnostic.....	26
	CAPÍTULO 2.....	28
2	RESULTADOS.....	29
2.1	Artigo 1 - Food Safety Management System Performance and Microbial Distribution in the Production of Organic Lettuce in Southern Brazil.....	29
	CAPÍTULO 3.....	66
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	67
	REFERÊNCIAS.....	71

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

A busca por alimentos saudáveis, seguros e sustentáveis tem levado a um grande aumento do consumo de alimentos orgânicos, os quais não utilizam agrotóxicos, adubos químicos e outras substâncias tóxicas e sintéticas comumente encontrados na agricultura convencional. Um dos principais objetivos da agricultura orgânica é a produção de alimentos ecologicamente sustentáveis, capazes de integrar o homem ao ambiente. Dentre os alimentos orgânicos, as alfaces (*Lactuca sativa* L) têm se destacado, devido a sua facilidade de aquisição e aceitabilidade em diversas faixas etárias e econômicas de uma população. No Brasil, e em diversos países, a alface é uma das hortaliças mais consumidas, tendo grande importância econômica e nutricional.

No entanto, diversos pesquisadores têm demonstrado preocupação com a qualidade microbiológica destes alimentos, pois a contaminação microbiológica de alfaces pode ocorrer em diversas etapas da cadeia produtiva, independente do tipo de cultura, orgânica, hidropônica ou convencional. Em qualquer modo produtivo, as condições sanitárias são muito importantes, uma vez que microrganismos patogênicos têm sido frequentemente encontrados no solo, adubos, na água de irrigação e lavagem.

Dentre as fontes de contaminação de alfaces, a água de irrigação tem recebido destaque, pois na maioria das vezes, a água utilizada na irrigação é proveniente de rios, córregos, lagos ou poços adjacentes às hortas e podem estar contaminadas com bactérias patogênicas, como *Salmonella* spp. e *E. coli* O157:H7. Além disso, muitas vezes, a população consumidora não higieniza adequadamente os produtos orgânicos antes de consumi-los, uma vez que deposita grande confiança nos mesmos.

Conforme alguns estudos, as Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) envolvendo vegetais crus têm aumentado ao longo dos anos, sendo os principais agentes envolvidos a *Salmonella* e *E. coli* O157:H7.

Em virtude deste aumento das DTA envolvendo produtos vegetais frescos, a União Européia elaborou um projeto de pesquisa denominado Veg-i-Trade (VEG-I-TRADE, 2009), o qual tem o objetivo de avaliar a influência das mudanças climáticas e da globalização na segurança de produtos vegetais. Este projeto, do qual o Brasil faz parte através da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), utiliza

uma ferramenta denominada *Horticultural Assessment Scheme* (HAS) para avaliar microbiologicamente a cadeia produtiva de produtos de origem vegetal. O HAS tem o objetivo de fornecer informações microbiológicas de hortifrutigranjeiros e demais amostras da cadeia produtiva desses produtos, sem ter a ambição de realizar amostragens estatisticamente embasadas, as quais seriam praticamente impossíveis em um país com as dimensões do Brasil. Por outro lado, o HAS pode fornecer informações importantes a respeito da cadeia produtiva de vegetais, proporcionando a tomada de decisões que podem contribuir na segurança dos alimentos (HOLVOET, et al. 2011).

Ainda dentro do projeto VEG-I-TRADE, outra ferramenta foi desenvolvida com o objetivo de fornecer informações sobre os sistemas de gestão de segurança de vegetais, em cada propriedade avaliada. Essa ferramenta foi chamada de *Horticulture Safety Management System Diagnosis* (HSMS-DI), e juntamente com o HAS, foi utilizada no presente estudo para avaliar a cadeia produtiva de alface orgânica do sul do Brasil.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar a cadeia produtiva de alface orgânica no sul do Brasil, através de análises microbiológicas e informações sobre os sistemas de gestão da inocuidade desses produtos.

1.2.2 Objetivos específicos

- a) Analisar amostras de alface orgânica, água de irrigação, amostras de solo, mudas de alface, manipuladores, adubo e superfícies que entram em contato com alfaces orgânicas, seguindo a ferramenta HAS;
- b) Investigar as características dos sistemas de gestão de inocuidade implementados na cadeia produtiva de alface orgânica, através do HSMS-DI;
- c) Identificar os principais problemas relativos à inocuidade e propor medidas de controle de segurança dos alimentos, dentro da cadeia produtiva de alface orgânica;

1.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.3.1 Cultura da alface

A alface (*Lactuca sativa* L) é uma das espécies mais antigas cultivadas pelo homem, sendo citada desde 4500 a.C. como planta medicinal, e desde 2500 a.C. como hortaliça. Pertence à família *Asteraceae*, originária de clima temperado. É uma planta herbácea, muito delicada, com caule diminuto, não ramificado, ao qual se prendem as folhas. Estas são grandes, lisas ou crespas, fechadas em forma de cabeça. Sua coloração varia do verde amarelado até o verde escuro, tendo algumas variações de cor nas extremidades (MORETTI; MATTOS, 2006; FILGUEIRA, 2003).

A alface é classificada comercialmente nos seguintes tipos: Americana, Crespa, Lisa, Mimosa e Romana. Desses tipos, o mais consumido é a alface Crespa, sendo a hortaliça folhosa mais consumida do Brasil. Estima-se que seja cultivada em 35 mil hectares, na maioria dos casos, em pequenas propriedades em áreas periurbanas ou nos cinturões verdes dos grandes centros. Seu volume de produção chega a dois milhões de toneladas (EMBRAPA, 2008; COSTA, SALA, 2005).

A alface orgânica é cultivada durante o ano todo, em canteiros de terra adubada com composto orgânico, e de maneira geral, os pés permanecem em contato com o solo durante todo o seu desenvolvimento. Além disso, necessita de um ambiente úmido, o que requer a prática de irrigação durante este período de desenvolvimento. Esta característica da produção favorece o desenvolvimento de microrganismos patogênicos, ressaltando ainda mais a necessidade de avaliar a cadeia produtiva, pois ao longo desta, diversas podem ser as fontes de contaminação por microrganismos patogênicos, uma vez que esses estão frequentemente presentes no solo, na água e nos insumos naturais, como a cama de frango e adubos orgânicos. Com isso, a alface pode ser um veículo transmissor de microrganismos para o homem, podendo ser responsáveis por intoxicações e infecções alimentares (OLIVEIRA, et al., 2012; ITOHAN, et al., 2011; ARBOS, et al., 2010; OLIVEIRA, et al., 2010).

Quando se fala em alface orgânica, a preocupação em relação à contaminação por microrganismos pode ser ainda maior, uma vez que a mesma é sempre consumida crua e a higienização com solução desinfetante, muitas vezes, não

ocorre por que os consumidores não aceitam adicionar um produto químico em um produto orgânico. Além disso, frequentemente o consumidor de produtos orgânicos deposita grande confiança na segurança desses produtos, pensando, erroneamente, que os mesmos não tem perigos biológicos. (ABREU, 2010; SILVA, 2005).

1.3.2 Fontes de contaminação na cultura da alface

A contaminação na alface pode ocorrer em diversas etapas do cultivo ou ter origens diferentes, como por exemplo: sementes, solo, adubos, água de irrigação e lavagem, colheita, armazenamento e distribuição. A seguir, algumas dessas fontes serão abordadas.

1.3.2.1 Sementes

A qualidade da semente é fundamental em uma produção, e uma atenção especial deve ser dada à semente. As sementes devem ser obtidas junto às empresas de sementes ou instituições de pesquisa, utilizando preferencialmente sementes certificadas. A seleção de plantas e frutos mais uniformes e sadios para retirada de sementes é essencial para obtenção de um fruto sadio, já que sementes de baixa qualidade tendem a originar campos desuniformes e problemáticos, com baixo padrão tecnológico e com baixos níveis de produtividade e de qualidade da produção pretendida (NASCIMENTO, 2005).

A qualidade fisiológica das sementes é determinada pela germinação e o vigor, que é o conjunto de características que determinam o potencial fisiológico das sementes em diferentes condições. A qualidade física está relacionada principalmente com a pureza das sementes. Já os contaminantes biológicos das sementes são os insetos e os microrganismos causadores de doenças, tais como as bactérias e fungos (NASCIMENTO, 2005).

Recentemente, em 2011, na Europa, principalmente na Alemanha, ocorreu um grave surto, envolvendo sementes germinadas de broto de feno grego contaminadas por uma bactéria denominada *E. coli* O104:H4, no qual mais de 3 mil pessoas foram atingidas, das quais 46 morreram (MELLMANN et al 2011). Segundo as investigações realizadas para identificar a possível fonte de contaminação das sementes, foi identificado que a contaminação ocorreu durante o cultivo ou

armazenamento das sementes. As sementes podem conter baixos níveis de bactérias patogênicas, contudo durante o processo de germinação, estes patógenos presentes nas sementes podem rapidamente atingir níveis elevados, devido à combinação de umidade e temperatura e que ao longo do cultivo esta contaminação pode permanecer e causar contaminação do alimento como produto final (VEG-I-TRADE, 2011; WHO, 2011; MELLMANN et al. 2011).

1.3.2.2 Água de irrigação

A agricultura requer a utilização de grande quantidade de água para irrigação, sendo que as fontes habituais de recursos hídricos para a agricultura são as águas superficiais provenientes de rios, riachos, represas e lagos ou desvios destes através de valas e canais de irrigação, bem como águas subterrâneas provenientes de furos ou poços. A qualidade microbiológica da água e o consequente risco de contaminação das culturas variam conforme a fonte de água e as práticas agrícolas utilizadas (OLIVEIRA, et al., 2012; GELTING et al. 2011; JAMES, 2006; GOMBAS et al., 2006; LIMA et al., 2005).

No Brasil são utilizadas como fonte de irrigação águas provenientes de rios, córregos, lagos ou poços adjacentes às hortas, e esta água é transportada através de bombas ou canais desde o rio e riacho até as hortas, sem qualquer tratamento prévio, favorecendo a contaminação dos alimentos (OLIVEIRA; GERMANO, 1992).

Segundo a FAO (2008) a avaliação da qualidade da água de irrigação torna-se muito importante, pois esta é considerada um dos principais veículos de enfermidades diarréicas de natureza infecciosa. As doenças de veiculação hídrica são transmitidas pela rota oral-fecal, através da ingestão de água ou até mesmo alimentos contaminados por microrganismos e enteroparasitas (AMARAL et al., 2003).

O risco da contaminação da água de irrigação na agricultura é alto, pois o fornecimento encontra-se muitas vezes, próximo de fontes de contaminação como pastagens ocupadas por animais, deposição de resíduo orgânico animal no solo, a proximidade de esgotos e fossas, e até mesmo pelo escoamento superficial durante o período de chuva, que é responsável pelo transporte de dejetos indesejáveis para as fontes de água (GELTING et al. 2011; FAYER et al., 2000).

O estudo de Guimarães et al. (2003) constatou a presença de coliformes termotolerantes em todas as 81 amostras de água retiradas de 44 propriedades rurais na cidade de Lavras-MG. O estudo de Lima et al. (2005) demonstrou que a utilização de esgoto apenas decantado gerou maior contaminação nas alfaces, ressaltando que seu uso deve ser evitado na irrigação de hortaliças devido a deficiente qualidade sanitária, pois põe em risco a saúde dos agricultores, manipuladores e consumidores.

Em 2005, na Suécia, um surto que envolveu 120 casos de contaminação por *E. coli* O157:H7 foi associado ao uso de água contaminada de um pequeno riacho. Nos EUA e Canadá, em 2006, ocorreu um surto devido ao consumo de espinafres-baby pré-embalados, que envolveu 205 casos, dos quais 103 foram hospitalizados, 31 desenvolveram síndrome hemolítica urêmica (HUS) e três faleceram. As investigações efetuadas concluíram que entre as potenciais fontes de contaminação encontrava-se a água de irrigação na qual foi detectada a estirpe epidêmica (SANTOS, 2009).

Surtos alimentares envolvendo vegetais folhosos contaminados por água são relatados por diversos estudos no mundo inteiro (OLIVEIRA, et al., 2012; GELTING et al. 2011; BERALDO, FARACHE FILHO 2011; DELAQUIS et al., 2007; BEUCHAT et al., 1996). Bactérias patogênicas tais como a *E. coli* O157 H:7 presentes em resíduos animais são os mais frequentemente associados com surtos de doenças transmitidas pela água, resultante de tratamento inadequado da água utilizada na irrigação e lavagem de frutas e hortaliças (LEVANTESI et al., 2012; OLIVEIRA, et al., 2012; MOYNE et al., 2011).

No Brasil, a resolução n.º 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2005) estabelece que para a irrigação de hortaliças que são consumidas cruas e de plantas frutíferas que se desenvolvem rente ao solo, as águas não devem ser poluídas. Diversos estudos (LEVANTESI et al., 2012; MOYNE et al., 2011; GUILHERME et al., 1999; FRANCO et al., 2007; BISCARO et al., 2008), constataram a presença de coliformes totais em água de irrigação utilizada na cultura de alface. De acordo com estes estudos a água utilizada na irrigação é uma importante fonte de contaminação para as hortaliças (LEVANTESI et al., 2012; MOYNE et al., 2011; GUILHERME et al., 1999; FRANCO et al., 2007; BISCARO et al., 2008).

1.3.2.3 Solo

O solo é o substrato natural para produção agrícola, servindo como meio para o desenvolvimento do sistema radicular das plantas, sendo uma importante fonte de nutrientes minerais para as plantas. Segundo FILGUEIRA (2003) as culturas necessitam encontrar no solo treze ou mais nutrientes em quantidades adequadas. São eles os macronutrientes nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e enxofre e os micronutrientes boro, zinco, molibdênio, cobre, manganês, ferro e cloro.

Os sistemas de adubagem, tais como a cama de frango, esterco bovino e suíno e adubagem vegetal, fornecem nutrientes imprescindíveis que promovem a adubação do solo e a nutrição das plantas. Porém, cuidados no manejo desses resíduos são indispensáveis para que a produção de alimentos não seja prejudicada. Estes compostos devem sofrer adequado tratamento, para que ocorra a sua decomposição, tornando-os adequados ao uso. Esse processo refere-se a compostagem em elevada temperatura e em um período de 100 a 120 dias, tempo necessário para eliminar a maioria dos patógenos (FISCHER-ARNDT et al 2010; JOHANNESSEN, 2005; SEDIYAMA et al., 2008; DURHAM 2003; GLIESSMAN, 2001; PRIMAVESI, 1990).

Os critérios de redução de agentes patogênicos incluem uma temperatura de, pelo menos, 60 °C, durante três dias consecutivos, numa pilha, sendo que esta pilha deve ser revolvida para que ocorra homogeneização e eliminação dos patógenos. Este processo elimina quase todos os microrganismos patogênicos e ainda mantém as populações que são benéficas para a cultura e solo (FISCHER-ARNDT et al 2010; JOHANNESSEN, 2005; JAMES 2006; HUTCHISON et al. 2000). Outro fator que aumenta o risco de contaminação é a contaminação cruzada entre o adubo compostado com excrementos frescos, sugerindo assim maior controle por parte dos produtores (JOHANNESSEN, 2005; JAMES, 2006).

Na produção de vegetais orgânicos, os produtores rurais utilizam uma grande quantidade de adubo tratado como fertilizante. No entanto, os mesmos devem estar atentos para não usar adubo fresco, porque isso aumentaria o risco de contaminação do alimento e ainda este processo tem que ser realizado muito antes da colheita para que haja tempo suficiente para a eliminação do patógeno, caso ainda esteja presente (JAMES, 2006).

Dentre os patógenos que são eliminados na compostagem adequada, destacam-se a *Salmonella* e *E. coli*. Contudo, estes patógenos ainda estão frequentemente envolvidos com surtos envolvendo vegetais (YOSSA, 2010; OLIVEIRA et al., 2012).

Portanto, o principal cuidado a ser considerado na adubação é a inocuidade dos adubos orgânicos através da compostagem por um período e temperatura adequados (YOSSA, 2010; JOHANNESSEN, 2005; DANIEL, 2005; ISLAM et al., 2005; HUTCHISON et al 2000; MILLNER, 2009).

1.3.2.4 Manipuladores

Outra importante fonte de contaminação é causada pela manipulação que ocorre no campo devido a falta de higiene pessoal dos agricultores, uma vez que estes têm contato direto com o alimento durante toda a etapa de produção e colheita. A higiene pessoal exerce forte influência na transmissão de bactérias patogênicas ao alimento (JAMES, 2006; SOARES; CANTOS, 2005).

No campo, diversas são as situações que levam a contaminação do alimento por parte do manipulador, dentre as situações destacam-se a falta de sanitário próximo à lavoura dotado de vaso sanitário e pia de higienização de mãos. Esta deficiência leva a contaminação da plantação com dejetos humanos.

Ainda a falta de cuidados higiênicos durante a produção e/ou manipulação no campo, amplia os riscos de contaminação por diversos microrganismos, tais como *Salmonella spp*, *E. coli*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, que são microrganismos causadores de doenças transmitidas por alimentos (JAMES, 2006; ALVES FILHO, 2003).

Outro fator muito importante é a precariedade das condições higiênico-sanitárias de processamento, armazenamento e na distribuição das hortaliças, que favorece a contaminação de diversos microrganismos, principalmente por *E. coli*. A presença deste microrganismo em alimentos indica contaminação de origem fecal, apontando condições higiênico-sanitárias insatisfatórias. Esta contaminação ocorre principalmente por contato com material fecal ou contatos com superfícies contaminadas (NASCIMENTO; STAMFORD, 2000). Segundo Takayanagui et al. (2000), as sucessivas manipulações aumentam as chances de contaminação.

De acordo com Tondo e Bartz (2012), muitas das infecções alimentares podem ser evitadas com a orientação do manipulador sobre a higiene pessoal, higiene dos utensílios usados na produção e preparo do alimento.

Tondo e Bartz (2012) ressaltam que a falta de cuidados na manipulação e negligência com a higiene pessoal, propiciam a contaminação dos alimentos, visto que muitos manipuladores, apesar de terem recebido capacitação em práticas adequadas de higiene, muitas vezes, não praticam aquilo que aprenderam, justificando a contaminação dos alimentos.

1.3.2.5 Caixas de transportes e embalagens da Alface

O acondicionamento de produtos hortícolas em embalagens adequadas contribui para a redução das perdas, para a melhoria do controle higiênico-sanitário, para maior proteção e integridade e qualidade do produto, para a maior racionalidade e economia no transporte e manuseio de mercadorias e para a melhor apresentação e conservação desses alimentos (MILLING et al., 2005). No entanto, se as embalagens não forem adequadamente higienizadas entre as utilizações, podem contribuir para a contaminação dos vegetais acondicionados.

As caixas de madeira têm sido largamente utilizadas na indústria alimentar devido, essencialmente, à sua estabilidade, ao custo, durabilidade e facilidade de manuseio. No entanto, podem ser consideradas menos seguras, quando comparadas com outros tipos de materiais utilizados na embalagem de alimentos, pois a dificuldade de higienização, a possibilidade de ocorrência de lascas, provenientes do desgaste do material, e a sua elevada porosidade, que absorve e retém muitos microrganismos, podem contaminar os alimentos (MILLING et al., 2005), sendo que a reutilização indiscriminada das embalagens e caixas, contribui ainda mais para a contaminação microbiológica dos alimentos (SEBRAE, 2010).

1.4 O PROJETO VEG-I-TRADE

Produtos vegetais frescos fazem parte de uma dieta equilibrada e seu consumo deve aumentar ainda mais nos próximos anos em virtude da busca pela alimentação saudável. No entanto, devido às doenças transmitidas por estes alimentos, alertas

têm sido atribuídos para o seu consumo. Preocupados com este cenário, a Comunidade Europeia, desenvolveu, através do Projeto Veg-i-Trade, plataformas para a identificação do impacto das mudanças climáticas e a globalização do comércio sobre a segurança dos alimentos vegetais frescos e derivados. O projeto enfoca diversos aspectos relacionado à segurança dos alimentos, destacando a segurança microbiana e de segurança relacionados com os resíduos de agrotóxicos e micotoxinas emergentes (VEG-I-TRADE, 2009).

O projeto Veg-i-Trade ainda, visando um maior panorama da cadeia produtiva de vegetais, desenvolveu ferramentas de avaliação de riscos microbiológicos e de gestão da cadeia produtiva, denominados *Horticultural Assessment Scheme* (HAS) e *Horticulture Safety Management System Diagnostic* (HSMS-DI), respectivamente (VEG-I-TRADE, 2011).

A associação destas duas ferramentas (HAS e HSMS-DI) pode fornecer informações sobre o desempenho da segurança da produção primária, tornando possível identificar os principais problemas de produção e assim propor medidas de segurança (VEG-I-TRADE, 2011).

O projeto Veg-i-Trade conta com a colaboração de 23 parceiros internacionais, os quais são universidades, institutos de pesquisa e grandes indústrias. A Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), através do Instituto de Ciência e Tecnologia dos Alimentos (ICTA) e da Faculdade de Agronomia, é a única instituição de pesquisa brasileira envolvida no Veg-i-Trade.

1.4.1 Ferramenta HAS - Horticultural Assessment Scheme

O HAS é uma ferramenta que se baseia na estrutura e princípios do Sistema de Avaliação Microbiana (MAS) desenvolvido por Jacxsens et al. (2011). O MAS foi utilizado para analisar sistematicamente a qualidade microbiológica de produtos e processos em uma empresa. MAS permite obter uma visão geral em nível de higiene, qualidade e segurança microbiológica de produtos e processos em um serviço de alimentação ou em uma indústria de alimentos. Com base no MAS, uma outra ferramenta foi criada para a obtenção de informações na cadeia produtiva de vegetais frescos e essa ferramenta foi denominada HAS - *Horticultural Assessment Scheme*.

A ferramenta HAS foi desenvolvida na Universidade de Ghent – Bélgica e está sendo utilizada nas investigações do Projeto VEG-I-TRADE para avaliar microbiologicamente a cadeia produtiva de hortifrutigranjeiros, como a da alface. O HAS tem o objetivo de fornecer uma “visão de helicóptero” da cadeia produtiva de hortifrutigranjeiros, sem ter a ambição de realizar amostragens estatisticamente embasadas, as quais seriam praticamente impossíveis quando se avalia a cadeia produtiva de um país como o Brasil. No entanto, a HAS pode fornecer informações importantes a respeito dessas cadeias produtivas, proporcionando tomada de decisões que podem contribuir na segurança de alimentos (VEG-I-TRADE, 2011).

O HAS ainda permite obter de forma sistemática, a dimensão da qualidade, higiene e segurança microbiológica de produtos e processos da cadeia produtiva de vegetais frescos. Neste processo de avaliação microbiológica, locais críticos de amostragem são determinados e estes são analisados durante um período que envolve desde o plantio do alimento até a sua colheita. Neste processo a amostragem é realizada em três intervalos de tempo dentro de três propriedades rurais a fim de obter um perfil microbiano do processo de produção (VEG-I-TRADE, 2010). Os resultados obtidos com este plano de amostragem indicarão o perfil de contaminação dentro da cadeia produtiva primária e identificará os principais problemas de segurança dos alimentos. No entanto, o número de amostras no HAS é limitado para se fazer conclusões sobre qualquer potencial contaminação e prevalências de patógenos na matéria-prima, processo ou produto final. O HAS não tem o objetivo de fazer uma amostragem estatística de triagem sustentada, mas pretende obter uma visão dos principais agentes patogênicos envolvidos na matéria-prima, nas etapas de produção e no produto final.

1.4.2 Ferramenta de diagnóstico HSMS-DI - Horticulture Safety Management System Diagnostic

O comércio global e a complexidade da cadeia produtiva e logística dificultam a obtenção de informações sobre a gestão da segurança dos alimentos de origem vegetal. Além disso, ferramentas como o HAS não fornecem informações sobre os sistemas de gestão da inocuidade implementados na cadeia primária. De acordo com isso, o projeto Veg-i-Trade adotou uma ferramenta denominada *Horticulture Safety Management System Diagnostic* (HSMS-DI), a fim de coletar informações

sobre os Sistemas de Gestão da Segurança dos Alimentos na cadeia de abastecimento de produtos frescos (VEG-I-TRADE, 2011).

A ferramenta de diagnóstico HSMS-DI consiste em um questionário com 58 questões com uma abordagem estruturada e documentada para questionar sobre o estado de segurança e medidas de controles utilizados pelos produtores rurais durante a produção de vegetais frescos. A ferramenta de diagnóstico permite obter o conhecimento dos pontos fortes e fracos das atividades de controle de qualidade para garantir a segurança dos alimentos (VEG-I-TRADE, 2011; JACXSENS et al., 2009).

O HSMS-DI é composto por três partes principais. A primeira parte consiste em um diagnóstico utilizando um conjunto de indicadores que apresentam três níveis de risco com descrições breves para avaliar o nível de risco do contexto sobre os produtos, processos, características organizacionais e características ambientais da cadeia produtiva. Os indicadores de riscos nos níveis 1, 2 e 3 representam, respectivamente, situações que são caracterizadas como baixo, moderado e alto risco. As Partes II e III incluem um diagnóstico das atividades com conjuntos de indicadores que representam, respectivamente, controle e garantia de atividades de gestão da segurança dos alimentos vegetais, com descrições concisas para indicar o nível de atividade que são utilizadas pelas propriedades rurais. Os níveis 1, 2, 3 e 4 representam situações que as propriedades rurais estão operando em nível básico, simples, intermediário ou avançado, respectivamente, quanto aos sistemas de gestão de segurança dos alimentos (OSÉS et al., 2012, VEG-I-TRADE, 2011; LUNING et al. (2008), LUNING et al. (2009) e LUNING et al. (2011).

O HSMS-DI foi elaborado para coletar informações por meio de uma entrevista com a pessoa responsável pela segurança dos alimentos das propriedades rurais. Para cada indicador, os entrevistados tiveram que escolher qual nível de atividade mais se assemelha com sua realidade de produção (LUNING et al., 2009). Quando utilizados juntos, o HAS e o HSMS-DI podem fornecer informações importantes sobre a distribuição microbiológica e sobre os sistemas de gestão e controle da inocuidade de produtos vegetais. Essas informações são suficientes para identificar os principais pontos a serem controlados na produção primária, direcionando estratégias para a segurança dos alimentos.

CAPÍTULO 2

2 RESULTADOS

Os resultados do presente estudo estão apresentados na forma de artigo científico. O subtítulo deste capítulo corresponde ao artigo formatado de acordo com as orientações do *Food Control* onde foi submetido.

2.1 Artigo 1 - Insights in the Microbiological Contamination in the Production of Organic Lettuce in Southern Brazil

1 Elsevier Editorial System for Food Control

2

3 Insights in the Microbiological Contamination in the Production of Organic Lettuce
4 in Southern Brazil

5 Rochele de Quadros Rodrigues¹, Márcia Regina Loiko¹, Cheila Minéia de Paula¹,
6 Claudia Titze Hessel¹, Liesbeth Jacxsens³, Mieke Uyttendaele³, Renar João
7 Bender², Eduardo César Tondo¹

8

9 ¹ Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos, Instituto de Ciências e Tecnologia de
10 Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICTA/UFRGS). Av. Bento Gonçalves,
11 9500, prédio 43212, Campus do Vale, Agronomia, Cep. 91501-970, Porto Alegre/RS, Brazil.

12 ² Laboratório de Pós-Colheita, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do
13 Sul. Av Bento Gonçalves, 7712. 91540-000 Porto Alegre/RS, Brazil.

14 ³ Department of Food Safety and Food Quality, Laboratory of Food Preservation and Food
15 Microbiology, Faculty of Bioscience Engineering, Ghent University. Coupure Links, 653, 9000,
16 Ghent, Belgium.

17

18 *Corresponding author: E. C. Tondo, e-mail: tondo@ufrgs.br, +5551 3308 6677, Fax: +5551 3308
19 7048

20 Abstract

21 Insights in the microbial contamination in organic lettuce production in Southern
22 Brazil was achieved by following three organic lettuce farms at Porto Alegre, the
23 capital city of Rio Grande do Sul State (Southern Brazil) during their lettuce
24 production. A risk based sampling plan was used three times for each farm
25 resulting in 132 samples, 44 samples per farm distributed over 6 samples of
26 seedlings and their soil, 36 samples of lettuce throughout the different growth
27 periods, 36 samples of soil, 27 samples of irrigation and washing water and 18
28 samples of food contacts materials (hands of the workers and lettuce collection
29 recipients). Enteric bacteria such as coliforms and *E. coli* and the pathogens
30 *Salmonella* spp. and *E. coli* O157:H7 were analysed. *E. coli* O157:H7 was detected
31 in irrigation and wash waters (2 positive samples out of 27 analysed samples).
32 Presence of *Salmonella* spp. was found in 1 sample of 9 samples of manure
33 applied as organic fertilizer. Generic *E. coli* was counted in manure, manured soil
34 and lettuce samples. Along with the microbiological sampling, the performance of
35 the current implemented food safety management systems in these farms were
36 evaluated to gain additional insights in potential factors affecting microbiological
37 contaminations. The combined results of the microbiological sampling and the
38 insights in the food safety management systems reveal that there are different
39 sources of microbial contamination along the production chain of organic lettuce,
40 highlighting the requirement of special control measures on fields, focusing mainly
41 on composting time of organic fertilizers and on the quality of irrigation and wash
42 waters.

43

44 Key words: *Lactuca sativa*, organic production, food safety management systems,
45 Risk based microbiological sampling.

46 Introduction

47 The search for healthy, safe and sustainable food production has increased
48 the consumption of organic fresh produce. These products should be free of
49 pesticide residues and other synthetic substances commonly used in conventional
50 agriculture, such as soluble fertilizers (Aquino & Assis, 2007; Assis & Romeiro,
51 2002). At the same time that organic products grant lower risks related to chemical
52 contamination, several investigations have ended up with concerns with reference
53 to microbiological quality of these foods (Oliveira, Viñas, Usall, Anguera & Abadias,
54 2012; Oliveira et al., 2010; Abreu, Junqueira, Peixoto & Oliveira, 2010; Abadias,
55 Usall, Anguera, Solsona & Viñas, 2008; Lotto, 2008; Delaquis, Bach & Dinu, 2007;
56 Rezende & Farina, 2001). Among organic fresh produce, lettuce (*Lactuca sativa* L)
57 stands out due to its continual availability on the market as well as acceptability
58 indistinctively of age or economic group of the population (Abreu, Junqueira,
59 Peixoto & Oliveira, 2010; Cometti, Matias, Zonta, Mary & Fernandes, 2004). In
60 many countries, including Brazil, lettuce is one of the most consumed vegetables,
61 imparting remarkable economic and nutritional importance (Abreu, Junqueira,
62 Peixoto & Oliveira, 2010; Mocelin & Figueiredo, 2009; WHO, 2008; Mattos, Moretti,
63 Chitarra & Prado, 2007).

64 Lettuce might become a foremost mean of microbiological contamination
65 due to its imbricate leaves, providing conditions to safekeeping and survival of
66 microorganisms. The microbiological contamination of lettuce is likely to occur at
67 several steps of the productive chain, whether it is organic, hydroponic or
68 conventional production system. For that reason the evaluation of the sanitary
69 conditions of each production location is of utmost importance. Pathogenic
70 microorganisms have been frequently detected in soil, fertilizers and irrigation and
71 rinse waters (Olaimat, A. N., Holley, R. A., 2012; Taban & Halkman, 2011; Oliveira
72 et al., 2010; Moretti & Mattos, 2006; Oliveira, Viñas, Usall, Anguera & Abadias,
73 2012; Itohan, Peters & Kolo, 2011; Mocelin & Figueiredo, 2009; Machado, Bueno,
74 Oliveira, & Moura, 2009; WHO, 2008; Ilic, Rajic, Britton, Grasso, Wilkins, Totton,
75 Wilhelm, Waddell & Lejeune, 2012).

76 According to Mogharbel and Masson (2005), the prevention of
77 contamination risks is directly linked to Good Agricultural Practices (GAP), which

78 can be applied from seeding until harvest. At production areas, the irrigation and
79 rinse waters have received critical attention as they might be one of the major
80 sources of microbial contamination. Irrigation and rinse waters might be home of
81 pathogenic bacteria like *Salmonella* spp. and *E. coli* O157:H7. Usually irrigation
82 and rinse waters are used without any previous treatment when obtained from
83 rivers, streams, lakes or wells adjacent to the cropping areas (Ilic, Rajic, Britton,
84 Grasso, Wilkins, Totton, Wilhelm, Waddell & Lejeune, 2012; Olaimat, A. N., Holley,
85 R. A., 2012; Salem, Ouardani, Hassine & Aouni, 2011; Abreu, Junqueira, Peixoto
86 & Oliveira, 2010; Pacheco et al., 2002). Microbiological contamination data in the
87 lettuce production of Brazil is unknown so far. Therefore, the present study
88 objectives were to obtain insights concerning management systems and microbial
89 distribution in the production of organic lettuce in Southern Brazil in order to identify
90 possible intervention measures from the point of view of food safety and hygiene.
91 Three farms were selected as case study and were visited three times during their
92 lettuce production in function of the growth stages in order to gain insight in the
93 variability of the microbiological contaminations for coliforms, generic *E. coli*,
94 pathogenic *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. Along with the risk based
95 microbiological sampling plan, a diagnostic tool was applied to get information on
96 the food safety management systems conducted in the organic lettuce farms and
97 to link potential microbiological problems to control or assurance activities at farm
98 level.

99 2. Material and methods

100 2.1. Characterization of growers of organic lettuce

101 Three growers of organic lettuce participated in this study, hereafter
102 denominated Farm 1, 2 or 3. All the growers were located in the rural area of Porto
103 Alegre, the capital city of the southernmost State in Brazil. All the production units
104 were certified by the Organism of Social Control (OSC) and by the Participative
105 Organization of Organic Compliance (OPAC) of the Southern region of Brazil.
106 Open field production was done. The organic lettuce seedlings were originating
107 from the same supplier. There were clear Good Agricultural Procedures (GAP)
108 implemented at all production units, yet these procedures were neither registered

109 nor written down. No formal food safety management system was implemented in
110 the farms for the duration of the sampling period.

111 The fertilization system diverged in all three farms. In Farm 1 the fertilizer
112 came from poultry manure and in Farm 2 horse manure was the source of fertilizer
113 to the lettuce fields. The grower of Farm 3 prepared his fertilizer by using only
114 vegetable remainings. The composting time of each of these sources of organic
115 matter differed: 180 days, 90 days or 60 days at Farm 1, 2 or 3, respectively.

116 The sprinkler irrigation system at Farm 1 was supplied from collected rain
117 water and from a nearby pond. At Farm 2 a drip irrigation system was in place. The
118 water comes from a well from which it was pumped to a storage tank. At Farm 3
119 the irrigation system was supplied by a pond close to the plantation area from
120 which water was pumped to a storage tank and from there through a hose the
121 water was delivered to the lettuce fields.

122 2.2. Risk based microbiological sampling plan

123 In order to assess the microbial performance of fresh-cut vegetable
124 producers, Holvoet, Jacxsens, Sampers and Uyttendaele (2011) developed a
125 sampling scheme. This sampling scheme was used as a basis to work out the risk
126 based sampling plan for the lettuce production at farm level from initial materials to
127 final crops. In function of the time line of the lettuce production visits and sampled
128 collection was performed. This procedure was followed three times in the three
129 farms in order to gain information on the variability of the present microbiological
130 contaminations.

131 2.2.1. Selected Critical Sampling Locations (CSLs)

132 A CSL is a spot in the production process at which contamination, growth
133 and/or survival of microorganisms may occur (Luning et al., 2011; Holvoet,
134 Jacxsens, Sampers & Uyttendaele, 2011). For organic lettuce, the following 12
135 CSLs were selected (Figure 1). These CSLs were selected based on potential risk
136 factors and sources of microbiological contaminations coming from initial materials,
137 applied water, applied manure and food contact materials being people or
138 recipients.

139 2.2.2 Sampling frequency

140 Each lettuce grower was followed for three lettuce productions during the
141 time period of December 2011 until February 2012. This period was the time
142 required to follow a lettuce crop from the start until its harvest. The timeline of the
143 sampling is given in Table 1.

144 2.2.3. Sampling method

145 2.2.3.1 Water samples

146 For the sampling of the irrigation water sources at each grower a five liter
147 sample was collected in a previously sterilized plastic bottle. The bottle was
148 immersed into the water source to a depth of 20 to 30 centimeters upside down,
149 and filled by turning it sideways and upwards in order to avoid superficial
150 contamination.

151 For the sampling of irrigation water from tap, again a sample of five liters
152 was collected into a previously sterilized plastic bottle. Before each collect, a
153 disinfection of the irrigation water taps was made with ethyl alcohol 70%. After, the
154 taps were open, letting the water flow for 60 seconds and, only then, it was
155 collected directly into the sterile bottle. The irrigation water samples were collected
156 in every of the four visits to each of the three growers.

157 The lettuce plants were washed in tanks with either potable water supplied
158 by the public water service department, or from a well or from a pond, at Farm 1, 2
159 and 3, respectively. After the washing procedure of the harvested lettuces, five
160 liters of residual rinse waters were collected into a previously sterilized plastic
161 bottle. The rinse waters were collected only at the last visit and after the harvesting
162 and washing of the lettuces.

163 All the samples were transported by car in thermal boxes, under
164 refrigeration (7° C) in less than one hour to the Food Microbiology and Food
165 Control Laboratory of the Institute of Food Science and Technology –
166 ICTA/UFRGS for further analyses. At the laboratory, water samples of 100 mL or
167 25 mL were retrieved from the five-liter samples collected at the production fields to
168 be analyzed as described.

169 2.2.3.2. Soil samples

170 Soil samples were collected from a 30 centimeters² area around each
171 sampled lettuce plant. Each soil sample consisted of 200 gram of soil. On every
172 visit to the growers soil samples were collected. At each production area three soil
173 samples were taken and pooled to produce on single soil sample of every grower
174 on every visit. That procedure resulted in a total of nine soil samples analyzed
175 along the production timeline of lettuces.

176 The samples were placed in plastic bags and transported by car to
177 Laboratory for subsequent microbiological analyses.

178 2.2.3.3. Manure samples

179 One single fertilizer sample was retrieved from every production area at the
180 beginning of the production. A 200 g sample was withdrawn from the composting
181 location and placed directly into sterile plastic bags and transported to the
182 Laboratory.

183 2.2.3.4. Sampling of lettuce seedlings

184 Using sterile plastic bags, 500 g of lettuce seedlings were collected before
185 transplant as they were delivered by the supplier. The lettuce seedlings were
186 collected during the first visit to the growers.

187 2.2.3.5. Sampling of lettuce

188 The lettuce plants were severed off just above the ground with a cutting
189 knife previously disinfected with ethyl alcohol 70%. The samples were placed
190 directly into sterile plastic bags. From each producer, in each of the four visits, nine
191 samples of lettuce plants were collected randomly take according to a Z profile in
192 the field.

193 In the last visit, during the harvesting period, nine samples of washed lettuce
194 were collected from each producer. Three washed lettuce heads were placed in a
195 sterile bag, giving rise to a pooled sample. Altogether, three pooled samples of
196 washed lettuce were collected from each producer.

197 All the samples were transported in less than one hour, under refrigeration
198 (7°C) in thermal boxes to the Food Microbiology and Food Control Laboratory at
199 the Institute of Food Science and Technology – ICTA/UFRGS, for further analyses.

200 2.2.3.6. Sampling for detection of contamination of workers' hands

201 To determine the occurrence of contamination of workers' hands, three
202 hand's samples were collected on each farm. The samples to detect contamination
203 of workers' hands were collected by use of sterile swabs only in the last visit,
204 during the harvesting activities. Before the harvest of lettuces in T3, the swabs
205 were moistened in sterile 0.1% peptone water and then rubbed on top of the hands
206 of the workers in three different directions in the area delimited by the wire mold.
207 Thereafter, each swab was placed again into a tube containing 5 mL of 0.1%
208 peptone water and transported under refrigeration (7° C) in thermal boxes to the
209 laboratory for analysis.

210 2.2.3.7. Sampling of transport boxes

211 For the sampling of the lettuce transport boxes an area of 50 cm² was drawn
212 with a previously disinfected wire mold. One sample was collected from each box,
213 amounting three samples from each grower at T3, just before applying the boxes to
214 pack the harvested lettuce. Before the sampling the swabs were moistened in
215 sterile 0.1% peptone water and rubbed in three different directions in the delimited
216 area. After that the swabs were placed in test tubes containing sterile 0.1%
217 peptone water and transported under refrigeration (7° C) in thermal boxes to the
218 laboratory for analysis.

219 2.2.4. Microbiological parameters

220 The analyses and microbiological parameters of each CSL are presented in
221 Table 1. Coliforms, *E. coli* and *Enterococcus spp.* were used as hygiene indicator
222 organisms. Total coliforms were considered as indicators for the sanitary quality of
223 the samples. *Enterococcus* and *E. coli* were considered as fecal contamination
224 indicators of the samples. *E. coli* O157:H7 and *Salmonella spp.* were analyzed as
225 enteric pathogens.

226 2.2.5. Microbiological analyses

227 Microbial analyses were carried out using the standard methodologies
228 described in Table 1.

229 *Salmonella spp.* was determined according to the methodology described in
230 ISO 6579:2002 (ISO, 2002). Characteristic colonies of *Salmonella spp.* were
231 confirmed by biochemical tests (API 30E, BioMerieux). Serological testing was

232 performed using polyvalent serum anti O (Probac do Brasil) and isolates identified
233 as *Salmonella* were sent to the reference Laboratory of *Enterobacteriaceae* at the
234 Bacteriology Department of the Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz
235 (FIOCRUZ) in order to be serotyped.

236 The analyses of total coliforms and *E. coli* were carried out in samples of
237 lettuce tissues, collected soil, fertilizer samples and lettuce seedlings. 10 g of
238 sample were placed in 90 mL 0.1% peptone water. The samples were
239 homogenized in stomacher (Seward) for 30 seconds. Decimal dilutions were
240 prepared and triplicate samples of 1 mL were placed on Petrifilm™ plates and
241 incubated for 24±2 hours at 37±1° C.

242 To determine coliforms and *E. coli* of irrigation waters, the Most Probable
243 Number (MPN) method using the multiple tube technique was applied (Standard
244 Methods for Examination of Water and Wastewater, 1998).

245 To detect *E. coli* O157:H7, the methodology described in ISO 16654:2001 –
246 Detection method, preconized by the International Organization for Standardization
247 (ISO) was used. To confirm dubious colonies, these were sent to the Brazilian
248 reference Laboratory of *Enterobacteriaceae* at the Bacteriology Department of the
249 Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ).

250 To analyze *Enterococci* spp., the method described in the manual of
251 methods of microbiological analysis of water (20th APHA, 1998) was adapted and
252 used. Aliquots of 0.1 mL were spread on M-enterococcus Agar (Himedia, Mumbai,
253 Índia). The confirmation of the typical colonies was made by Gram coloration and
254 biochemical tests such as the catalase test, growth on Bile Esculin Agar at 45° C,
255 growth at the presence of 6.5 % NaCl and PYR Test.

256 2.6. Diagnostic instrument to measure food safety management systems

257 A questionnaire with 69 indicators was applied to gain insight in the level of
258 the food safety management system currently implemented by the farmers. The
259 questionnaire was organized in four major parts. The first part consists of the
260 context diagnosis with a set of indicators and grids (three risk levels), with brief
261 descriptions to assess the risk level of context factors (product and process
262 characteristics, organizational and chain environmental characteristics), in terms of

263 the riskiness they create. Levels 1, 2 and 3 represent respectively situations that
264 were typified as of low, moderate or high risk. The second part and third part of the
265 questionnaire include a diagnosis of control and assurance activities and grids with
266 concise descriptions to indicate an activity level as addressed in the implemented
267 food safety management systems. The levels 1, 2, 3 or 4 represent activities which
268 are operating in a nonexistent, basic-simple, average-common or advanced-
269 sophisticated way respectively. The final set of indicators was given information on
270 the output of the system. Also four levels could be attributed, namely no
271 information of the food safety management system output, low, medium or high
272 output of the system (Osés et al., 2012, Kierezieva et al., 2013).

273 The questionnaire was performed by an interview with the individual
274 responsible for the production at farms. For each indicator, the interviewed in
275 charge had to choose which level was the most representative for the situation of
276 the farm. Each interview took about 2 to 3 hours and was followed by an on-site
277 visit to confirm the assessment (Luning et al., 2009).

278 Mean scores were calculated by using all indicators, respectively, and
279 divided by their total number of indicators.

280 Data were analyzed with Microsoft Office Excel to assemble web diagrams
281 in order to visually illustrate the levels for the separate indicators for context and
282 control activities.

283 3. Results

284 3.1. Results of the microbiological assessment

285 Table 3 presents the results of samples collected at the CSL 1 to 9, from
286 Farms 1, 2 or 3. In Table 4 the results are displayed with regards to irrigation and
287 wash/rinse water samples (CSL 10 to 12). Overall, a total of 132 samples (44
288 samples per company) were taken over the 3 month-period.

289 3.1.1. Contamination of organic manures

290 The manure samples collected at T_0 on all surveyed farms presented *E. coli*
291 counts ranging from 3.43 to 5.65 \log_{10} cfu/g and coliforms counts from 4.63 to 6.78
292 \log_{10} cfu/g. The presence of *Salmonella* spp. was detected only in Farm 2 (Table
293 3). In none of the fertilizer samples *E. coli* O157:H7 was detected.

294 3.1.2. Contamination of manured soil

295 The analyzed manured soil samples contained *E. coli* counts ranging widely
296 from farm to farm. In all farms *E. coli* count started at elevated counts and
297 decreased over time during the sampling period T_0 , T_1 , T_2 and T_3 . For example, in
298 Farm 1 mean *E. coli* decreased from 4.45 (T_0) to 3.36 (T_1), to 2.3 (T_2) to less than
299 1.00 log cfu/g (T_3). On the other hand, counts for coliforms remained barely
300 unaltered over time in the three farms. *Salmonella* spp. was detected in Farm 2 at
301 T_0 and in Farm 1 at T_1 . *E. coli* O157:H7 was not identified in any of the analyzed
302 samples (Table 3).

303 3.1.3. Contamination of seedlings and lettuces

304 Lettuce seedlings were collected at T_0 and presented *E. coli* counts of less
305 than 1.00 log₁₀ cfu/g. Coliform counts ranged from 3.36 to 4.63 log₁₀ cfu/g.
306 *Salmonella* spp. and *E. coli* O157:H7 were not detected (Table 3).

307 The lettuce samples presented *E. coli* counts ranging from less than 1.00 to
308 3.6 log₁₀ cfu/g, no trend over time was observed and contamination variability was
309 detected between farms and time of sampling. For example, in Farm 1, the
310 average counts were less than 1.00 log₁₀ cfu/g at T_1 and 2.6 log₁₀ cfu/g at T_3 . In
311 Farm 2, the counts at T_1 started with 3.49 log₁₀ cfu/g and decreased to less than
312 1.00 log₁₀ cfu/g at T_3 . In Farm 3, the average counts at T_1 were 2.76 log₁₀ cfu/g
313 and decreased to 1.00 log₁₀ cfu/g at T_2 and increased again to 3.15 log₁₀ cfu/g at
314 T_3 . In spite of this, all the lettuce samples from the three producers presented low
315 counts (less than 1.00 log cfu/g) after the final wash with water, indicating that
316 washing was able to reduce the microbial load. *Salmonella* spp. was isolated from
317 a lettuce sample only in Farm 2 at T_1 (Table 3). *E. coli* O157:H7 was not detected
318 in any of the producers at any of the sampling instances.

319 3.1.4. Contamination of irrigation water

320 Irrigation water samples collected in both pond or taps (sprinklers)
321 presented contamination by *E. coli* (from 1.1 to > 23 mpn/ml) and coliforms (from
322 12 to > 23 mpn/ml) at all times. The counts remained similar throughout the
323 sampling period (Table 4). Only in Farm 1 there was a tendency of decreasing *E.*
324 *coli* counts. *Enterococcus* spp. was determined in sprinkler water at T_3 (Table 4).

325 *Salmonella* spp. and *E. coli* O157:H7 were found on Farm 2 at T₃ in irrigation water
326 and irrigation tap water, respectively (Table 4).

327 3.1.5. Contamination of wash/rinse water

328 All of the rinse water samples collected after the washing of the lettuce
329 presented contamination with *E. coli* and total coliforms (Table 4). In Farm 1 in
330 which potable water was used to wash lettuce plants, the counts were low (1.1 and
331 5.1NMP/mL of *E. coli* and total coliforms, respectively). In Farms 2 and 3 the
332 counts were beyond 23 NMP/ml. In these farms the water to prepare lettuce plants
333 for the market was obtained from a well and from a pond, respectively.

334 Contamination by *Salmonella* spp. was not detected in any sample of wash
335 waters collected at all the three farms. Nonetheless, at Farm 3 wash water
336 contamination by *E. coli* O157:H7 was identified (Table 3).

337 3.1.6. Contamination of transport boxes

338 The box samples collected at all three farms have showed relatively low
339 counts of *E. coli* (less than 1.00 log₁₀ cfu/cm²). Total coliforms ranged from 2.10 to
340 3.50 log₁₀ cfu/cm² (Table 3).

341 3.1.7. Microbiological contamination of workers' hands

342 The analysis of samples collected from the workers' hands at the moment of
343 the harvest for the market of lettuce plants (T₃) indicate in all three farms the
344 presence of *E. coli* counts. The counts maintained a pattern of contamination,
345 ranging from less than 1.00 up to 1.9 log₁₀ cfu/hand. Total coliform counts ranged
346 from 1.89 up to 3.33 log₁₀ cfu/hand (Table 3).

347 3.2. Results of the diagnosis of the food safety management system

348 Details of the diagnostic questionnaire are given in Table 4. All three
349 surveyed organic lettuce farms operate in a moderate to high level of risk regarding
350 product and process characteristics. The reason for such outcome is that indicators
351 related to the product & process characteristics scored for the mean 3 (Farm 1 and
352 3) or 2.8 (Farm 2) (high level of risk). The indicators of organization & chain
353 characteristics scored 2.3 (Farm 1) and 2.4 (Farm 2 and 3) (moderate to high level
354 of risk). The risk of the context of the farms was very similar, with the exception of
355 the two indicators, i.e. "technological farm team" and "Variability in the workforce".

356 Farm 1 and Farm 2 counted with the assistance of a professional agronomist,
357 increasing its technological capacity, but Farm 3 counted with the knowledge of the
358 farmers. Farm 2 showed high employee turnover, what was not observed in the
359 other farms.

360 The indicated levels of the control and assurance activities in the food safety
361 management system of the farmers are given in detail in Table 4. The mean score
362 of the design of control activities was 2, indicating that these activities are
363 conducted on a basic level, using historical and common knowledge, but no sector
364 information or information from suppliers was applied, nor tailored to the farm own
365 situation. The results of design of control activities of the three organic farms are in
366 detail illustrated in Figure 3. The profiles were very similar for the three farms,
367 however Farm 1 (blue lines) differs from Farms 2 and 3 on partial physical
368 intervention (washing step) which was conducted at a basic performance level in
369 Farm 1 while in Farms 2 and 3 it was executed based on sector information
370 (performance level 3). While indicator 'analytical methods applied for
371 microbiological analyses of pathogens' was at level 3 for Farm 1, indicating that the
372 farm was working together with accredited laboratories when performing
373 microbiological analyses, the other Farms did not analyse microbiological
374 indicators or pathogens (performance level 1). For the indicators related to hygienic
375 design of the equipments, maintenance program, sanitation program, packaging
376 equipment, water control and corrective actions all the farms were operating at
377 level 1, indicating not conducted, not done in all three farms.

378 It could be expected to have a higher level of control activities in order to
379 address high level of riskiness of their context. However, the observed operation of
380 control activities in farms was very low (mean of 1.1), indicating that the control
381 measures were not implemented or applied in practice. Moreover, assurance
382 activities were not present or were not yet elaborated, indicating that the farms
383 could not demonstrate that they were working correctly (mean score of 1 for
384 assurance activities in table 4).

385 The system output of the current food safety management system in the
386 organic lettuce farms was also low (mean 1 for the three farms, Table 4). The

387 reason for this was that no information of the system output was available: no
388 inspection or audit was performed, no samples (both microbiological and chemical)
389 were taken, so no actual evaluation of their system output could be done.

390 It can be concluded that the organic lettuce farms were having a moderate
391 to high level of risk context, in which a medium to advanced level of food safety
392 management system should be present in order to have a good system output
393 (Osés et al., 2011, Kierezieva et al., 2013). However, the food safety management
394 system was designed and executed at basic to medium level and the system
395 output was low because of lack of information.

396 4. Discussion

397 All three farms analysed were certified and rely on technical support
398 provided by regulation bodies and by a solid organic association. Focus so far was
399 mainly made on the control of chemical hazards, being pesticide residues, as could
400 be derived from the interviews with the farmers. Workers were very compliant,
401 responsive to changes and concerned with reference to possible quality
402 improvements. In spite of this, the diagnostic instrument demonstrated that all
403 farms were operating in a moderate to high microbial risk context.

404 4.1. Organic manure

405 The indicator 'organic manure program' revealed that the farms developed
406 organic fertilizer programs based on common farm knowledge and the capability of
407 the composting process was not known or tested (indicator on level 2 for the three
408 farms, Table 4). Moreover, the instructions for storage, frequency and methods of
409 application derived from the producers' own experience. Manure samples from the
410 three farms showed high contamination with *E. coli* and coliforms. Similar counts
411 were found by other authors in different types of fertilizers (Oliveira, Viñas, Usall,
412 Anguera & Abadias, 2012; Fischer-Arndt, Neuhoff, Tamm & Köpke, 2010; James,
413 2006; Johannessen, 2005; Millner, 2003; MAFF, 2000). Studies have indicated that
414 the composting time and temperature of manure may effectively reduce
415 microorganisms like *E. coli*, *E. coli* O157:H7 and *Salmonella*, routinely determined
416 in fresh compost (Oliveira, Viñas, Usall, Anguera & Abadias, 2012; Fischer-Arndt,
417 Neuhoff, Tamm & Köpke, 2010; James, 2006; Millner, 2003; MAFF, 2000).
418 According to Johannessen (2005), the appropriate composting time to reduce

419 pathogens is about 120 days. As demonstrated in the present study, in Farm 1 the
420 manure was prepared from poultry manure and it was composted by 180 days,
421 suggesting that the contamination was not due to inadequate composting time but
422 it may be provided by the addition of fresh manure to the composted manure. In
423 the opposite, in Farm 2 and 3 horses manure and vegetable remaining were the
424 sources of manure and the composting times of them were 90 and 60 days,
425 respectively, suggesting that the composting time was not sufficient. However, the
426 possibility of the addition of fresh manure and vegetable residues can not be
427 discarded.

428 The Brazilian regulation does not establish specific parameters for *E. coli*
429 and total coliforms in fertilizers, but it determines a maximum limit of 3.0 log mpn/g
430 for thermotolerant coliforms (IN n°46/MAPA, 2011). Based on this regulation, all
431 the fertilizer samples analyzed in the present study were above the limit, indicating
432 that the control of manure was not adequate.

433 The addition of fresh manure containing pathogens may recontaminate the
434 already composted fertilizer and that contamination will spoil vegetables (Oliveira,
435 Viñas, Usall, Anguera & Abadias, 2012; Islam, Doyle, Phatak, Millner & Jiang,
436 2005; MAFF, 2000). Although the presence of *E. coli* O157:H7 was not detected in
437 any of the analyzed fertilizer samples, the presence of this pathogen has been
438 identified in similar studies recommending the need for better control within the
439 agricultural production (Oliveira, Viñas, Usall, Anguera & Abadias, 2012; Islam,
440 Doyle, Phatak, Millner & Jiang, 2005; MAFF, 2000). The presence of *Salmonella*
441 spp. was detected in the manure from Farm 2, which also showed high counts of
442 *E. coli*. This fertilizer was prepared with horse faeces and was composted for a
443 period of 90 days, which may not have been enough for the reduction of
444 pathogens. That contamination indicates high potential of microbiological risk. As
445 shown in the studies of Johannessen (2005) and MAFF (2000), the presence of
446 *Salmonella* represents a serious problem of improperly composted fertilizer, since
447 *Salmonella* is a pathogenic microorganism and food products like lettuce are eaten
448 raw. These studies alert that contamination in the fertilizer may contaminate
449 irrigation water and soil, and that contamination could be a source to spread

450 contamination of lettuce plants. According to Brazilian legislation, fertilizers
451 containing *Salmonella* are improper for use (IN n° 46. MAPA, 2011).

452 4.2. Manured soil

453 Overall, a tendency towards decreasing counts of *E. coli* was observed in
454 the fertilized soil samples throughout the cultivation of organic lettuces. Similar
455 results were demonstrated by Oliveira, Viñas, Usall, Anguera & Abadias (2012).
456 These authors report that microbiological contamination of soil might be reduced
457 due to solar radiation, soil composition, water activity, moisture reduction, redox
458 potential, presence of rhizosphere, changes in soil pH, high temperatures and
459 microbiological competition.

460 The presence of *Salmonella* spp. in the manured soil samples from Farm 2
461 suggests that contamination occurred via manure in view of the fact that
462 *Salmonella* was also detected in the fertilizer itself. At Farm 3 no contamination by
463 *Salmonella* was determined probably as a consequence of the non-use of animal
464 residues as manure.

465 High counts of *E. coli* and the absence of *Salmonella* spp. in lettuce or
466 manure samples have been reported by several studies and such fact has been
467 explained as a possible competition between the two types of microorganisms
468 (Oliveira, Viñas, Usall, Anguera & Abadias, 2012; Neto et al., 2012; Abreu,
469 Junqueira, Peixoto & Oliveira, 2010).

470 4.3 Lettuce seedlings, lettuce during cultivation and washed lettuce

471 *E. coli* counts in lettuce samples during cultivation were very variable and
472 did not show a pattern of contamination among the farms over time according to
473 the risk based sampling plan. Several studies have demonstrated that lettuces may
474 frequently present contamination by microorganisms and/or pathogens due to their
475 natural characteristics and the contact with soil, irrigation water, animals, among
476 others (Levantesi et al., 2012; Oliveira, Viñas, Usall, Anguera & Abadias 2012,
477 Moyne et al., 2011; Fischer, Neuhoff, Tamm & Köpke, 2010; James, 2006; Millner,
478 2003). Lettuce seedlings also may be a source of contamination, especially when
479 they are not treated before use. This could also be derived for the evaluation of the
480 'product and process riskiness' with the diagnostic questionnaire, where a mean

481 level 3 was obtained indicating the lettuce seedlings as a cause of the
482 contamination and that lettuce production was at risk for microbiological
483 contaminations. In the present study, microbiological analyses demonstrated very
484 low contamination in lettuce seedlings even though they were not treated with
485 chemicals or had undergone heat treatments. However, during growth of the
486 lettuce, the lettuce was becoming contaminated due to several risk sources such
487 as fertilized soil (see 4.1.2), irrigation water (see 4.1.4).

488 All the samples of washed lettuce (final products) from the three farms
489 proved to be in accordance to Brazilian legislation which settles on the maximum
490 acceptable *E. coli* count of 10^2 cfu/g. Different results were found by Arbos, Freitas,
491 Stertz & Carvalho (2010) and Santana et al. (2006), where samples of different
492 lettuce crops had *E.coli* counts above those permitted by the Brazilian law. The
493 presence of *E. coli* in vegetables may indicate carelessness during farming,
494 inadequate sanitary conditions and contamination by pathogenic bacteria
495 associated with several foodborne illnesses (Neto et al., 2012; Soriano, Rico, Moltó
496 & Mañes, 2000).

497 In the present study the presence of *E. coli* O157:H7 was not detected in the
498 lettuce plant samples throughout cultivation. However, international references
499 demonstrate the presence of *E. coli* O157:H7 on leafy greens such as lettuce and
500 spinach (Oliveira et al., 2012; Oliveira, Souza, Bergamini & Martinis, 2011; Oliveira
501 et al., 2010; FDA, 2007; Santana et al., 2006; Ackers et al., 1998).

502 There are studies pointing to washing of lettuce plants as an effective
503 measure to reduce in up to one log the microbiological contamination (Oliveira et
504 al., 2012; Bobco et al., 2011). However, if the washing process is done with
505 reutilized water or with standstill water an increase in the microbiological
506 contamination of the final product may occur (Antunes, 2009). According to the
507 diagnostic questionnaire, the washing process was conducted in Farm 2 and 3
508 according to sector guidelines while in Farm 1 only based on common and
509 historical knowledge. The effect of washing on the *E. coli* count of the lettuce can
510 be derived when comparing CSL 6 and 7 in Table 2. For Farm 1 and 3 a 2 log
511 reduction can be seen, while for Farm 2 no effect of washing could be seen due to

512 the low contamination of the lettuce already before washing (< 1 log cfu/g).
513 However, none of the farms had a water control program, as pointed with the
514 diagnostic questionnaire and indicator 'water control' (on level 1, Table 4), clearly
515 making obvious a high risk level if additional control measures are not
516 implemented.

517 4.4. Irrigation and wash water

518 Irrigation water samples collected in both the water sources and the
519 sprinklers of the surveyed farms demonstrated contamination by *E. coli* at all times.
520 The Brazilian Regulation (CONAMA resolution 357 of 2005, Table 1) has
521 established a limit of 2×10^2 cfu/100ml for irrigation water of vegetables. Based on
522 that limit in the present study several water samples were in accordance with the
523 regulation, nevertheless attention should be given to the frequent presence of *E.*
524 *coli* indicating fecal contamination. Furthermore, the variation of the counts among
525 sampling periods also indicates that this limit may be surpassed over the time.

526 The irrigation water analyzed in the present study showed contamination by
527 *E. coli* O157:H7 in Farm 2, where the lettuces were ready for harvest indicating a
528 serious risk of contaminating the final product. Foodborne outbreaks involving leafy
529 vegetables contaminated by water have been reported by several studies around
530 the world (Itohan, Peters & Kolo, 2011; Delaquis, Bach & Dinu, 2007; Beuchat,
531 1996). Pathogenic bacteria such as *E. coli* O157:H7 are most often associated with
532 outbreaks of waterborne diseases, resulting from inadequate treatment of the
533 water used for irrigation and washing of fruits and vegetables (Levantesi et al.,
534 2012; Moyne et al., 2011). It is important to highlight that the *E. coli* O157:H7 was
535 found in irrigation water of Farm 2 and in rinse water of Farm 3 after a flood,
536 suggesting that such events could be important sources of contamination and
537 specific control measures should be planned in order to prevent lettuce final product
538 contamination.

539 The water used in rural areas for washing lettuce intends to remove debris
540 and to reduce contamination of the vegetables. Yet, if the water is contaminated,
541 the contamination of lettuce plants will probably increase as well. In the present
542 study, the wash water from Farm 3 also demonstrated contamination by *E. coli*

543 O157:H7, nevertheless, the lettuce plants washed in this water did not show
544 contamination. It is possible that the contamination of the lettuce by *E. coli* O157:H7
545 was reduced by washing and turned out to be under the detection limit of the
546 method. Based on the fact that, frequently, end users only wash vegetables before
547 consumption and that home washing may not be sufficient to eliminate pathogens,
548 the microbial quality of the wash waters at production sites are obliged to be
549 considered critical for the safety of lettuce plants (Oliveira, Viñas, Usall, Anguera &
550 Abadias, 2012; Moyne et al., 2011; James, 2006).

551 In this context, it may be necessary to consider the implementation of
552 preventive measures on farms and the sanitization of lettuces in the home of
553 consumers or food services, before consumption in order to increase its safety.
554 According to the food services regulation Portaria Estadual of Rio Grande do Sul
555 nº 78 of 2009 (Rio Grande do Sul, 2009), vegetables prepared in food services
556 should be washed and disinfected using 100 to 250 ppm solution of free chlorine
557 for 15 minutes, being rinsed with potable water after that.

558 Regarding the implementation of preventive measures on lettuce farms, the
559 microbial quality and method of composting manure, source and quality of irrigation
560 waters and washing waters could be considered of utmost importance to avoid
561 microbiological contamination of lettuces. Moreover, attention should be given to
562 the fact that all investigated farms did not display implemented control and
563 assurance activities, suggesting that preventive measures were not in place.

564 5. Final considerations

565 The use of the risk based sampling plan in combination with the diagnostic
566 questionnaire allowed to analyze the microbiological safety in the productive chain
567 of organic lettuce and provide an overview of the organic farms' performance.

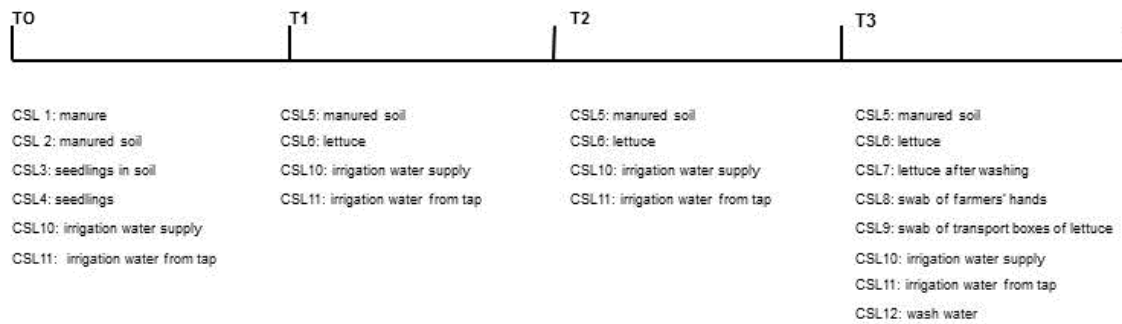
568 The present study concludes that the fertilizer and the water used for
569 irrigation and washing were important bottlenecks to be controlled in the production
570 chain of organic lettuces. The contamination of manures highlighted the need of a
571 fertilizer control program in order to control the composting time and avoid addition
572 of fresh manure to the composted manure. With regards to irrigation and wash
573 waters, the results evidenced the importance of using water from safe sources. It is

574 also essential to emphasize the need for consumer awareness, because organic
575 vegetables may not comprise chemical contamination, nonetheless they might be
576 contaminated with pathogens and, for that reason, sanitization procedures should
577 be used to avoid foodborne illnesses. The present survey indicates the
578 susceptibility of the organic lettuce production chain to microbiological safety
579 issues.

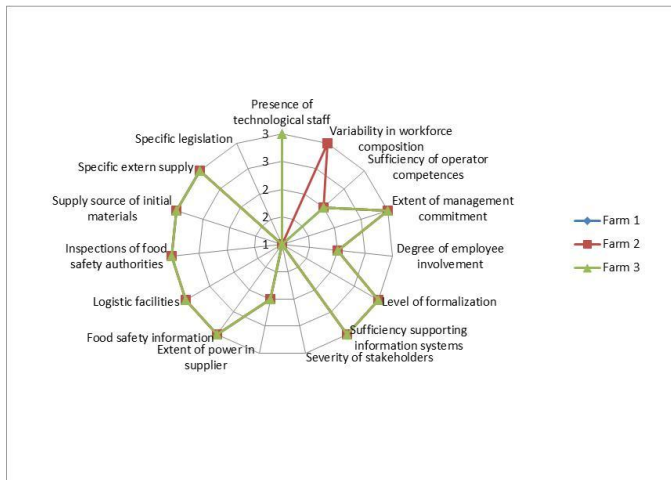
580 Acknowledgements: This research was conducted for the Veg-I-Trade project
581 'Impact of Climate Change and Globalization on Safety of Fresh Produce –
582 Governing a Supply Chain of Uncompromised Food Sovereignty' ([www.veg-i-](http://www.veg-i-trade.org)
583 [trade.org](http://www.veg-i-trade.org)). Veg-I-Trade is funded under the Seventh Framework Program of the
584 European Commission. Our special acknowledgement goes to the personnel of the
585 Laboratory of Food Microbiology and Food Control of ICTA/UFRGS and the
586 Professionals of Ghent University. We also would like to thank to the organic
587 lettuce farmers for their collaboration with this study.

588

589 Figure 1: Timeline and identification of selected Critical Sampling Locations (CSLs) in primary production of organic lettuce in
 590 Southern Brazil. To: Start of the planting. T1: three weeks before harvest T2: two weeks before harvest T3: harvest



591



592

593 Figure 2: Organization characteristics of three organic lettuce farms in Southern Brazil (blue: farm 1,
 594 green: farm 2, red: farm 3) analyzed by the diagnostic tool of Kirezieva et al. (2013). Level 1
 595 indicates low risk level, indicating that measures are not putting pressure on the current food safety
 596 management system. Level 2 indicates moderate risk level, i.e. measures are putting medium
 597 pressure on the food safety management system. Level 3 indicates high risk level, indicating that
 598 the food safety management system should compensate this risk aspect.

599 Legend:

600 Presence of technological staff: qualified employees in food safety;

601 Variability in workforce composition: employee turnover;

602 Sufficiency of operator competences: competency requirements for work in agriculture;

603 Extent of management commitment: food safety policy;

604 Degree of employee involvement: employee engagement in food safety;

605 Level of formalization: formalization of documents, meetings, procedures and work instructions;

606 Sufficiency supporting information systems: information system to support food safety;

607 Severity of stakeholders Requirements of: additional requisites for food safety;

608 Extent of power in supplier relationships: relationship with suppliers of materials and seedlings of
 609 lettuce;

610 Food safety information exchange: exchange of information with suppliers about food safety;

611 Logistic facilities: environmental conditions of logistics facilities until the product reach the customer;

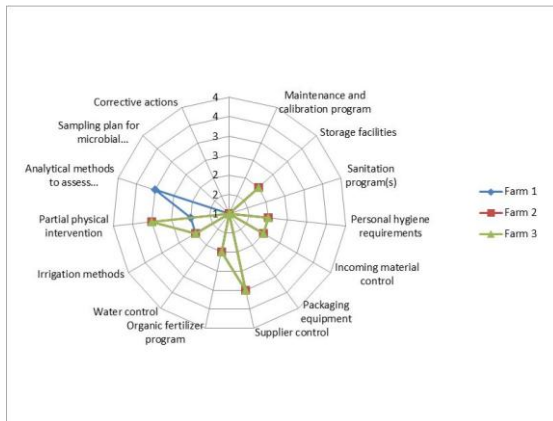
612 Inspections of food safety authorities: inspection of food safety authorities;

613 Supply source of initial materials: variability of suppliers of raw and certified internationally;

614 Specific extern supply: support external and security information (organization or government
 615 affiliated agencies);

616 Specific legislation: specific legislation regarding food safety;

617



618
 619 Figure 3: Evaluation of the design of control activities of three organic lettuce farms in Southern
 620 Brazil (blue: farm 1, green: farm 2, red: farm 3) analyzed by the diagnostic tool of Kireziova et al.
 621 (2013). Level 1 indicates that the item is not appropriate or not done. Level 2 indicates that the
 622 activity is executed at basic level or based on historical knowledge of the farmers. Level 3 indicates
 623 that the activity is executed at generic level, based on sector information or information of suppliers.
 624 Level 4 indicates that the activity is conducted in a more advanced level, tailored to the company
 625 own situation.

626 Legend:

627 Hygienic design of equipment and facilities: Equipment and facilities projects aimed at food safety;

628 Maintenance and calibration program: Maintenance and calibration seeking food safety;

629 Storage facilities: Storage of products at farm;

630 Sanitation program(s): Program sanitization of equipment and installation;

631 Personal hygiene requirements: Requirements for personal hygiene of workers;

632 Incoming material control: Control of planting material used on the farm;

633 Packaging equipment: Use of packaging equipment does not interfere with food safety;

634 Supplier control: Control and vendor selection;

635 Organic fertilizer program: Application of organic manures composted following programs specific
 636 security control;

637 Water control: Control of water used for irrigation;

638 Irrigation method: Application methods of irrigation (drip, sprinkler, or other);

639 Partial physical intervention: Physical intervention for reducing contaminants (eg removal of outer
 640 leaves, spraying water to remove soil);

641 Analytical methods to assess pathogens: Analysis of pathogens;

642 Sampling plan for microbial assessment: Microbiological sampling plan in the farm;

643 Corrective actions: Corrective Action as described or parameters established tolerance or limit
 644 contamination;

Table 1: Description of Critical Sampling Location (CSLs), samples, quantities, periodicity, microbiological parameters, microbiological methodologies, results interpretation and reference methodology.

CSL	Description	Samples	Time	Microbiological Parameters	Methodology	Interpretation of the results*	References
1	Manure	3 samples	T0	<i>E. coli</i> /coliforms	ISO 21528-2:2004 and AOAC (1998)	1.000 NMP/g	MAPA/ IN n°46. (2011)
				<i>E. coli</i> O157:H7	ISO 16654:2001	A/25g	ND
				<i>Salmonella</i> spp.	ISO 6579:2002	A/25g	MAPA/ IN n°46. (2011)
2	Manured soil	3 samples → 3 x 3 pooled	T0	<i>E. coli</i> /coliforms	ISO 21528-2:2004 and AOAC (1998)	1.000 NMP/g	MAPA/ IN n°46. (2011)
				<i>E. coli</i> O157:H7	ISO 16654:2001	A/25g	ND
				<i>Salmonella</i> spp.	ISO 6579:2002	A/25g	MAPA/ IN n°46. (2011)
3	Seedlings in soil	1 sample → 1 x 3 pooled	T0	<i>E. coli</i> /coliforms	ISO 21528-2:2004 and AOAC (1998)	10 ²	RDC n°12 (2001)
				<i>E. coli</i> O157:H7	ISO 16654:2001	A/25g	ND
				<i>Salmonella</i> spp.	ISO 6579:2002	A/25g	RDC n°12 (2001)
4	Seedling	1 sample	T0	<i>E. coli</i> /coliforms	ISO 21528-2:2004 and AOAC (1998)	10 ²	RDC n°12 (2001)
5	Manured soil	3 samples → 3 x 3 pooled	T1	<i>E. coli</i> /coliforms	ISO 21528-2:2004 and AOAC (1998)	10 ²	MAPA/ IN n°46. (2011)
			T2	<i>E. coli</i> O157:H7	ISO 16654:2001	A/25g	ND
			T3	<i>Salmonella</i> spp.	ISO 6579:2002	A/25g	MAPA/ IN n°46. (2011)
6	Lettuce	3 samples → 3 x 3 pooled	T1	<i>E. coli</i> /coliforms	ISO 21528-2:2004 and AOAC (1998)	10 ²	RDC n°12 (2001)
			T2	<i>E. coli</i> O157:H7	ISO 16654:2001	A/25g	ND
			T3	<i>Salmonella</i> spp.	ISO 6579:2002	A/25g	RDC n°12 (2001)
7	lettuce after washing	3 samples → 3 x 3 pooled	T3	<i>E. coli</i> /coliforms	ISO 21528-2:2004 and AOAC (1998)	10 ²	RDC n°12 (2001)
				<i>E. coli</i> O157:H7	ISO 16654:2001	A/25g	ND
				<i>Salmonella</i> spp.	ISO 6579:2002	A/25g	RDC n°12 (2001)
8	swab of farmers' hands	3 x 25 cm ²	T3	<i>E. coli</i> /coliforms	ISO 21528-2:2004 and AOAC (1998)	≤ 0.7 log cfu/25 cm ² (below detection)	Jacxsens. et al. (2010)
9	swab of transport boxes of lettuce	3 x 50 cm ²	T3	<i>E. coli</i> /coliforms	ISO 21528-2:2004 and AOAC (1998)	≤ 0.7 log cfu/25 cm ² (below detection)	Jacxsens. et al. (2010)
10	irrigation water supply	100 ml	T0	<i>E. coli</i> /coliforms	20 TH APHA (1998)	2 x 10 ² cfu/100ml	CONAMA. n°357 de 2005
			T1	Enterococci	20 TH APHA (1998)	A/100ml	Jacxsens. et al. (2010)
			T2	<i>E. coli</i> O157:H7	ISO 16654:2001	A/25ml	ND
			T3	<i>Salmonella</i> spp.	ISO 6579:2002	A/25ml	ND
11	irrigation water from tap	100 ml	T0	<i>E. coli</i> /coliforms	20 TH APHA(1998)	2 x 10 ² cfu/100ml	CONAMA. n°357 de 2005
			T1	Enterococci	20 TH APHA(1998)	A/100ml	Jacxsens. et al. (2010)
			T2	<i>E. coli</i> O157:H7	ISO 16654:2001	A/25ml	ND
			T3	<i>Salmonella</i> spp.	ISO 6579:2002	A/25ml	ND
12	wash water	100 ml	T3	<i>E. coli</i> /coliforms	20 TH APHA (1998)	2 x 10 ² cfu/100ml	CONAMA. n°357 de 2005
				Enterococci	20 TH APHA (1998)	A/100ml	Jacxsens. et al. (2010)
				<i>E. coli</i> O157:H7	ISO 16654:2001	A/25ml	ND
				<i>Salmonella</i> spp.	ISO 6579:2002	A/25ml	ND

*A: absent; ND: not defined by official regulation

648 Table 2. Microbial results of samples collected according risk based sampling plan in three organic lettuce farms of Southern Brazil. Mean and standard deviation expressed as log cfu.g^a or cfu.cm^{2b} for
649 *coli* and coliforms. For the pathogens *Salmonella* and *E. coli* O157:H7 results are expressed as presence or absence in 25g or in 100cm² (boxes) or by hand (worker's hands).

Visit	CSL	Description		Farm 1				Farm 2				Farm 3			
				* <i>E. coli</i>	*Coliforms	** <i>Salmonella</i>	** <i>E. coli</i> O157:H7	* <i>E. coli</i>	*Coliforms	** <i>Salmonella</i>	** <i>E. coli</i> O157:H7	* <i>E. coli</i>	*Coliforms	** <i>Salmonella</i>	** <i>E. coli</i> O157:H7
TO	1	Manure ^a	3	4.32 (± 0.11)	4.63 (± 0.11)	- (0/3)	- (0/3)	5.65 (± 0.50)	6.68 (± 0.09)	+ (1/3)	- (0/3)	3.43 (± 0.41)	4.73 (± 0.05)	- (0/3)	- (0/3)
TO	2	Manured Soil ^a	3	2.10 (± 0.17)	3.45 (± 0.24)	- (0/3)	- (0/3)	4.45 (± 0.09)	5.56 (± 0.46)	+ (1/3)	- (0/3)	2.85 (± 1.09)	4.27 (± 0.08)	- (0/3)	- (0/3)
TO	3	Soil Seedling ^a	1	<1.00	4.36	- (0/1)	- (0/1)	4.54	4.92	- (0/1)	- (0/1)	2.48	3.49	- (0/3)	- (0/3)
TO	4	Seedling ^a	1	<1.00	3.36	- (0/1)	- (0/1)	<1.00	4.63	- (0/1)	- (0/1)	<1.00	4.60	- (0/3)	- (0/3)
T1	5	Manured Soil ^a	3	<1.00	3.93 (± 0.34)	+ (1/3)	- (0/3)	3.36 (± 0.32)	4.32 (± 0.56)	- (0/3)	- (0/3)	2.3**	2.77 (± 0.67)	- (0/3)	- (0/3)
T1	6	Lettuce ^a	3	<1.00	3.78 (± 0.68)	- (0/3)	- (0/3)	3.49 (± 0.31)	3.76 (± 0.59)	+ (1/3)	- (0/3)	2.76 (± 0.39)*	3.37 (± 0.16)	- (0/3)	- (0/3)
T2	5	Manured Soil ^a	3	<1.00	3.93 (± 0.34)	- (0/3)	- (0/3)	2.3**	3.68 (± 0.21)	- (0/3)	- (0/3)	<1.00	3.54 (± 0.12)	- (0/3)	- (0/3)
T2	6	Lettuce ^a	3	2.48**	4.08 (± 1.34)	- (0/3)	- (0/3)	<1.00	3.86 (± 1.42)	- (0/3)	- (0/3)	<1.00	2.50 (± 0.63)	- (0/3)	- (0/3)
T3	5	Manured Soil ^a	3	2.30**	3.36 (± 0.31)	- (0/3)	- (0/3)	<1.00	4.40 (± 0.30)	- (0/3)	- (0/3)	2.3**	3.21 (± 0.23)	- (0/3)	- (0/3)
T3	6	Lettuce ^a	3	3.6 (± 0.21)	3.91 (± 0.95)	- (0/3)	- (0/3)	<1.00	3.89 (± 0.06)	- (0/3)	- (0/3)	3.15**	3.23 (± 0.82)	- (0/3)	- (0/3)
T3	7	Lettuce (final product) ^a	3	<1.00	3.06 (± 0.31)	- (0/3)	- (0/3)	<1.00	3.89 (± 0.06)	- (0/3)	- (0/3)	<1.00	2.82 (± 0.48)	- (0/3)	- (0/3)
T3	8	Workers' Hands ^b	3	<1.00	1.89 (0.58)*	- (0/3)	- (0/3)	<1.00	3.33 (± 0.26)	- (0/3)	- (0/3)	1.9**	2.56 (± 0.94)	- (0/3)	- (0/3)
T3	9	Boxes ^b	3	<1.00	2.10 (± 0.98)	- (0/3)	- (0/3)	<1.00	3.50 (± 0.41)	- (0/3)	- (0/3)	<1.00	2.56 (± 0.94)	- (0/3)	- (0/3)
		Total	35			1/35	0/35			3/35	0/35			0/35	0/35

650 All the values are presented as the mean and standard deviation except for seedling and soil seedlings.

651 * Result of one sample was below the detection limit (<1.00 log).

652 **Results of two samples were below the detection limit (<1.00 log).

653 To: Start of the planting. T1: three weeks before harvest. T2: two weeks before harvest. T3: harvest

654 Table 3. Results of irrigation water and wash water collected in three organic lettuce farms of Southern Brazil. Mean and standard deviation expressed as MPN/ml or *E. coli* and coliforms. For the pathogen
 655 *Salmonella* and *E. coli* O157:H7 results are expressed as presence or absence in 25 ml. For *Enterococcus* spp. results are expressed as presence and absence in 100 ml.

Visit	CSL	Description		Farm 1					Farm 2					Farm 3				
				<i>E. coli</i> MPN/ml	Coliforms MPN/ml	<i>Enterococcus</i> 100ml	<i>Salmonella</i> sp. 25ml	O157:H7 25ml	<i>E. coli</i> MPN/ml	Coliforms MPN/ml	<i>Enterococcus</i> 100ml	<i>Salmonella</i> sp. 25ml	O157:H7 25ml	<i>E. coli</i> MPN/ml	Coliforms MPN/ml	<i>Enterococcus</i> 100ml	<i>Salmonella</i> sp. 25ml	O157:H7 25ml
TO	10	Irrigation Water source	1	>23	>23	Absence	Absence	Absence	16.10	16.10	Absence	Absence	Absence	23	>23	Absence	Absence	Absence
TO	11	Irrigation Water Tap	1	>23	>23	Absence	Absence	Absence	>23	>23	Absence	Absence	Absence	16.1	23	Absence	Absence	Absence
T1	10	Irrigation Water source	1	12.0	23	Absence	Absence	Absence	3.6	>23	Absence	Absence	Absence	>23	>23	Absence	Absence	Absence
T1	11	Irrigation Water Tap	1	12.0	23	Absence	Absence	Absence	1.1	>23	Absence	Absence	Absence	1.1	16.1	Absence	Absence	Absence
T2	10	Irrigation Water source	1	5.1	>23	Absence	Absence	Absence	6.9	9.20	Absence	Absence	Absence	9.2	12	Absence	Absence	Absence
T2	11	Irrigation Water Tap	1	3.6	>23	Absence	Absence	Absence	6.9	12	Absence	Absence	Absence	9.2	16.1	Absence	Absence	Absence
T3	10	Irrigation Water source	1	1.1	23	Absence	Absence	Absence	1.1	23	Absence	Presence	Absence	23	23	Absence	Absence	Absence
T3	11	Irrigation Water Tap	1	6.9	23	Presence	Absence	Absence	>23	>23	Absence	Absence	Presence	>23	>23	Absence	Absence	Absence
T3	12	Wash/rinse water	1	1.1	5.1	Absence	Absence	Absence	>23	>23	Absence	Absence	Absence	>23	>23	Absence	Absence	Presence

656 Table 4: Levels attributed to the indicators representing the context factors, core control and core assurance activities in a food safety
657 management system along three lettuce production farms in Southern Brazil, based on the diagnostic questionnaire

Indicators	Companies		
	Farm 1	Farm 2	Farm 3
I. Context factors (overall)			
Product and process characteristics			
Risk of raw materials microbial	3	3	3
Risk of final product microbial	3	3	3
Production system	3	3	3
Climate conditions	3	3	3
Water supply	3	2	3
Mean product and process	3,0	2,8	3,0
Organization and chain			
Presence of technological staff	1	1	3
Variability in workforce composition	1	3	1
Sufficiency of operator competences	2	2	2
Extent of management commitment	3	3	3
Degree of employee involvement	2	2	2
Level of formalization	3	3	3
Sufficiency supporting information systems	3	3	3
Severity of stakeholders Requirements of	1	1	1
Extent of power in supplier relationships	2	2	2
Food safety information exchange	3	3	3
Logistic facilities	3	3	3
Inspections of food safety authorities	3	3	3
Supply source of initial materials	3	3	3
Specific extern supply	3	3	3
Specific legislation	1	1	1
Mean organisation and chain	2,3	2,4	2,4
II. Control activities design			
Hygienic design of equipment and facilities	1	1	1
Maintenance and calibration program	1	1	1
Storage facilities	2	2	2
Sanitation program(s)	1	1	1
Personal hygiene requirements	2	2	2
Incoming material control	2	2	2
Packaging equipment	1	1	1
Supplier control	3	3	3
Organic fertilizer program	2	2	2
Water control	1	1	1
Irrigation method	2	2	2
Partial physical intervention	2	3	3
Analytical methods to assess pathogens	3	1	1
Sampling plan for microbial assessment	1	1	1
Corrective actions	1	1	1
Mean control activities design	2	2	2
III. Control activities operation			
Actual availability of procedures	1	1	1
The actual of compliance to procedures	2	2	2
Actual hygienic performance of equipment and facilities	1	1	1
Actual storage/cooling capacity	1	1	1
Actual process capability of partial physical intervention	1	1	1
Actual process capability of packaging	1	1	1
Actual performance of analytical equipment	1	1	1
Mean control Activities operation	1,1	1,1	1,1
IV. Assurance activities			
Translation of stakeholder requirements into own HSMS requirements	1	1	1
The systematic use of feedback information to modify HSMS	1	1	1
Validation of preventive measures	1	1	1
Validation of intervention processes	1	1	1
Verification of people related performance	1	1	1
Verification of equipment and methods related performance	1	1	1
Documentation system	1	1	1
Record keeping system	1	1	1
Mean assurance activities	1,0	1,0	1,0
Food safety management system Output			
Food safety Management System evaluation	1	1	1
Seriousness of remarks of remarks	1	1	1
Hygiene related and microbiological food safety	1	1	1
Chemical safety complaints of customers	1	1	1
Typify the visual quality complaints	1	1	1
Product sampling microbiological performance	1	1	1
Judgment criteria microbiological	1	1	1
Non conformities	1	1	1
Mean food safety output	1,0	1,0	1,0

658 6. References:

- 659 Abadias, M., Usall, J., Anguera, M., Solsona, C., & Viñas, I. (2008). Microbiological
660 quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from
661 retail establishments. *International Journal of Food Microbiology*, 123(1-2),
662 121–129. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.013
- 663 Abreu, I. M. de O., Junqueira, A. M. R., Peixoto, J. R., & Oliveira S. A. de. (2010,
664 Maio). Qualidade microbiológica e produtividade de alface sob adubação
665 química e orgânica. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30(1). Disponível em
666 <http://www.scielo.br/pdf/cta/v30s1/18.pdf>
- 667 Ackers, M. L. et al. (1998). An outbreak of Escherichia coli O157:H7 infections
668 associated with leaf lettuce consumption. *The Journal of Infectious Diseases*,
669 177(6), 1588-1593. Disponível em
670 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9607837>
- 671 Amaral, L. A., Filho, A. N., Junior, O. D. R., Ferreira, F. L. A., & Barros, L. S. S.
672 (2003). Água de consumo humano como fator de risco à saúde em
673 propriedades rurais. *Revista Saúde Pública*, 37(4). Disponível em
674 <http://www.scielosp.org/pdf/rsp/v37n4/16787.pdf>
- 675 Antunes, M. A. (2009). *Contaminação, crescimento e inativação de microrganismos*
676 *na cadeia de produção de alface (Lactuca sativa L.) variedade Vitória de*
677 *Santo Antônio* (Tese de Doutorado). Disponível em
678 http://www.dominiopublico.gov.br/pesquisa/DetalheObraForm.do?select_acion=&co_obra=178084.
- 680 Aquino, A. M., & Assis, R. L. (2007). Agricultura orgânica em áreas urbanas e
681 periurbanas com base na agroecologia. *Ambiente & Sociedade*, 10(1), 137-
682 150. Disponível em <http://www.scielo.br/pdf/asoc/v10n1/v10n1a09.pdf>
- 683 Arbos, K. A., Freitas, R. J. S., Stertz, S. C., & Carvalho, L. A. (2010). Segurança
684 alimentar de hortaliças orgânicas: aspectos sanitários e nutricionais. *Ciência e*
685 *Tecnologia de Alimentos*, 30(1). Disponível em
686 <http://www.scielo.br/pdf/cta/v30s1/33.pdf>
- 687 Assis, R. L., & Romeiro, A. R. (2002) Agroecologia e Agricultura Orgânica:
688 controvérsias e tendências. *Desenvolvimento e Meio Ambiente*, 6, 67-80.
689 Disponível em
690 <http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs2/index.php/made/article/viewFile/22129/14493>

- 691 Beraldo, R. M., & Filho, F. A. (2011). Bacteriological quality of irrigation water from
692 vegetable gardens in the municipalities of Araraquara, Boa Esperança do Sul
693 e Ibitinga, SP. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, 22(3). Disponível em
694 <http://200.145.71.150/seer/index.php/alimentos/article/view/1460/1460>
- 695 Beuchat, L. R. (1996). Pathogenic microorganisms associated with fresh produce.
696 *Journal of Food Protection*, 59(2), 204–216. Disponível em
697 [http://www.ingentaconnect.com/content/iafp/jfp/1996/00000059/00000002/art0](http://www.ingentaconnect.com/content/iafp/jfp/1996/00000059/00000002/art00018)
698 [0018](http://www.ingentaconnect.com/content/iafp/jfp/1996/00000059/00000002/art00018)
- 699 Beuchat, L. R. (2002). Ecological factors influencing survival and growth of human
700 pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes and Infection / Institut*
701 *Pasteur*. 4(4), 413-423. Disponível em
702 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11932192>
- 703 Bobco, S. E.; Pierozan, M. K.; Cansian, R. L.; Oliveira, D.; Pinheiro, T. L. F.;
704 Toniazzi, G. (2011). Condições higiênicas de alfaces (*Lactuca sativa*)
705 comercializadas na cidade de Erechim-RS. *Alim. Nutr.*, 22 (2), 301-305.
706 Disponível em [http://serv-](http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/alimentos/article/viewFile/1335/1335)
707 [bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/alimentos/article/viewFile/1335/1335](http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/alimentos/article/viewFile/1335/1335).
- 708 C.D.C Centers for Disease Control and Prevention. (2006). *Surveillance for*
709 *waterborne disease and outbreaks associated with drinking water and water*
710 *not Intended for drinking --- United States, 2003--2004* (Surveillance
711 Summaries). Disponível em
712 <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/ss5512a4.htm>
- 713 C.D.C Centers for Disease Control and Prevention. (2008). *Surveillance for*
714 *waterborne disease and outbreaks associated with recreational water use and*
715 *other aquatic facility-associated health events --- United States, 2005—2006*
716 (Surveillance Summaries). Disponível em
717 <http://www.cdc.gov/mmWR/preview/mmwrhtml/ss5709a1.htm>
- 718 Cometti, N. N., Matias, G. C. S., Zonta, E., Mary, W., & Fernandes, M. S. (2004).
719 Composto nitrogenado e açúcares solúveis em tecidos de alface orgânica,
720 hidropônica e convencional. *Horticultura Brasileira*, 22(4), 748-753. Disponível
721 em <http://www.scielo.br/pdf/hb/v22n4/23188.pdf>
- 722 Delaquis, P., Bach, S., & Dinu, L. D. (2007). Behavior of *Escherichia coli* O157:H7 in
723 leafy vegetables. *Journal of food protection*, 70(8), 1966–1974. Disponível em
724 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17803159>

- 725 F.D.A. The Food and Drug Administration. (2007). FDA Finalizes Report on 2006
726 Spinach Outbreak. Disponível em:
727 [http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/
728 2007/ucm108873.htm](http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/2007/ucm108873.htm).
- 729 Fenlon, D. R., Ogden, I. D., Vinten, A., & Svoboda, I. (2000). The fate of Escherichia
730 coli and E. coli O157 in cattle slurry after application to land. *Society for
731 Applied Microbiology*, 88, 149S–156S. Disponível em
732 <http://europemc.org/abstract/MED/10880190>
- 733 Fischer-Arndt, M., Neuhoff, D., Tamm, L., & Köpke, U., (2010). Effects of weed
734 management practices on enteric pathogen transfer into lettuce (*Lactuca sativa*
735 var. capitata). *Food Control*, 21(7), 1004–1010. doi:
736 10.1016/j.foodcont.2009.12.019
- 737 Franz, E., van Diepeningen, A. D., de Vos, O. J., & van Bruggen, A. H., (2005).
738 Effects of cattle feeding regimen and soil management type on the fate of
739 Escherichia coli O157:H7 and salmonella enterica serovar typhimurium in
740 manure, manure-amended soil, and lettuce. *Applied and Environmental
741 Microbiology*, 71(10), 6165–6174. Disponível em
742 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16204535>
- 743 Freitas, M. B., Brilhante, O. M., Almeida, L. M. (2001). Importância da análise de
744 água para a saúde pública em duas regiões do estado do Rio de Janeiro:
745 enfoque para coliformes fecais, nitrato e alumínio. *Cad. Saúde Pública*, 17(3),
746 651-660. doi: 10.1590/S0102-311X2001000300019
- 747 GONÇALVES, C. S. (2003). *Qualidade de águas superficiais na microbacia
748 hidrográfica do Arroio Lino – Nova Boêmia – Agudo – RS* (Dissertação de
749 Mestrado). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.
- 750 Guimarães, A. M., Alves, E. G. L., Figueiredo, H. C. P., Costa, G. M., Rodrigues, L.
751 dos S. (2003). Frequência de enteroparasitas em amostra de alface (*Lactuca
752 sativa*) Comercializada em Lavras, Minas Gerais. *Revista Soc. Bras. Med.
753 Trop.*, 36(5), 621-623. doi: 10.1590/S0037-86822003000500014
- 754 Hilborn, E. D. et al., (1999). A multistate outbreak of Escherichia coli O157:H7
755 infections associated with consumption of mesclun lettuce. *Archives of Internal
756 Medicine*, 159(15), 1758-1764. Disponível em
757 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10448779>

- 758 Holvoet, K., Jacxsens, L., Sampers, I., & Uyttendaele, M. (2011). Horticultural
759 assessment scheme: insight in prevalence and distribution of microbial
760 contamination to evaluate water management in fresh produce processing
761 industry. IAFP annual meeting, Abstracts. Presented at the IAFP Annual
762 Meeting 2011 (IAFP 2011), International Association for Food Protection
763 (IAFP). Disponível em <http://hdl.handle.net/1854/LU-1870143>.
- 764 Hruday, S. E., & Hruday, E. J. (2007). Published case studies of waterborne disease
765 outbreaks — evidence of a recurrent threat. *Water Environment Research*,
766 79(3), 233-245. doi: 10.2175/106143006X95483
- 767 Ilic, S., Rajic, A., Britton, C., Grasso, E., Wilkens, W., Totton, S., Wilhelm, B.,
768 Waddell, L., LeJeune, J. (2012). A scoping study characterizing prevalence,
769 risk factor and intervention research, published between 1990 and 2010, for
770 microbial hazards in leafy green vegetables. *Food Control*, 23, 7-19.
- 771 Islam, M., Doyle, M. P., Phatak, S. C., Millner, P., & Jiang, X., (2005). Survival of
772 *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on carrots and onions grown in fields
773 treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Food*
774 *Microbiology*, 22(1). doi: 10.1016/j.fm.2004.04.007
- 775 ISO, International Standard, (2002) Microbiology of food and animal feeding stuffs —
776 Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. (Fourth Edition).
- 777 Itohan, A. M., Peters, O., & Kolo, I. (2011). Bacterial contaminants of salad
778 vegetables in Abuja Municipal Area Concl. Nigéria. *Malaysian Journal of*
779 *Microbiology*, 7(2), 111-114. Disponível em
780 <http://web.usm.my/mjm/issues/vol7no2/Short2.pdf>
- 781 Jacxsens. L., Kussaga. J., Luning. P. A., Van der Spiegel. M., Devlieghere. F., &
782 Uyttendaele. M. (2009). A microbial assessment Scheme to measure microbial
783 performance of food safety management systems. *International Journal of*
784 *Food Microbiology*, 134, 113-125. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.02.018
- 785 James, J. (2006). *Microbial hazard identification in fresh fruits and vegetables*.
786 Dublin, Ireland: Wiley-Interscience.
- 787 Jawahar, P., Ringler, C. (2009). Water Quality and Food Safety: a review and
788 discussion of risks. *Journal Water Policy*, 11(6), 680–695. doi:
789 10.2166/wp.2009.037

- 790 Johannessen, G. S. (2005). *Use of manure in production of organic lettuce – risk of*
791 *transmission of pathogenic bacteria and bacteriological quality of the lettuce.*
792 Oslo, Belgic: Norwegian School of Veterinary Science.
- 793 Kirezieva, K., Jacxsens, L., Uyttendaele, M., Van Boekel, M., Luning, P. (2013).
794 Performance assessment of Food Safety Management Systems in the global
795 fresh produce chain, submitted to Food Research International, under revision.
- 796 Kudva, I. T., Blanch, K., & Hovde, C. J., (1998). Analysis of escherichia coli O157:H7
797 survival in ovine or bovine manure and manure slurry. *Applied Environmental*
798 *Microbiology*, 64 (9), 3166– 3174. Disponível em
799 <http://aem.asm.org/content/64/9/3166.short>
- 800 Levantesi, C., Bonadonna, L., Briancesco, R., Grohmann, E., Toze, S., & Tandoi, V.
801 (2012). Salmonella in surface and drinking water: occurrence and water-
802 mediated transmission. *Food Research International*, 45(2), 587–602. doi:
803 10.1016/j.foodres.2011.06.037
- 804 Lotto, M. de C. (2008). *Avaliação da contaminação de Alface (Lactuca sativa) por*
805 *Coliformes Termotolerantes e Escherichia coli em Sistemas de Cultivo*
806 *Orgânico e Convencional* (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal de
807 São Carlos, Araras, SP.
- 808 Luning, P. A., Bango, L., Kussaga, J., Rovira, J., & Marcelis, W. J. (2008).
809 Comprehensive analysis and differentiated assessment of food safety control
810 systems: a diagnostic instrument. *Trends in Food Science & Technology*.
811 19(10), 522-534. doi: 10.1016/j.tifs.2008.03.005
- 812 Luning, P. A., Marcelis, W. J., Rovira, J., Van Boekel, M. A. J. S., Uyttendaele, M., &
813 Jacxsens, L. (2011). A tool to diagnose context riskiness in view of food safety
814 activities and microbiological safety output. *Trends in Food Science &*
815 *Technology*, 22(1), S67-S79. doi: 10.1016/j.tifs.2010.09.009
- 816 Luning, P. A., Marcelis, W. J., Rovira, J., Van der Spiegel, M., Uyttendaele, M., &
817 Jacxsens, L. (2009). Systematic assessment of core assurance activities in a
818 company specific food safety management system. *Trends in Food Science &*
819 *Technology*. 20(6,7), 300-312. doi: 10.1016/j.tifs.2009.03.003
- 820 Machado, S. S., Bueno, P.R.M., Oliveira, M. R. de, & Moura, C. J. de. (2009, Maio).
821 Contribuição à análise de perigos na produção de alface. *Revista Brasileira de*
822 *Produtos Agroindustriais*, 11(2). Disponível em
823 <http://www.deag.ufcg.edu.br/rbpa/rev112/Art11212.pdf>

- 824 MAFF, The Ministry of Agriculture Fisheries and Food. (2000). *A study of on-farm*
825 *manure applications to agricultural land and an assessment of the risks of*
826 *pathogen transfer into the food chain.* (Project Number FS2526) Disponível
827 em <http://www.safeproduce.eu/Pics/FS2526.pdf>
- 828 Mattos, L. M., Moretti, C. L., Chitarra, A. B., & Prado, M. E. T. (2007). Qualidade de
829 Alface Crespa Minimamente Processada Armazenada Sob Refrigeração em
830 Dois Sistemas de Embalagem. *Horticultura Brasileira*, 25(4), 504-508. doi:
831 10.1590/S0102-05362007000400003
- 832 Millner, P, (2003). Composting: Improving On a Time-Tested Technique. *Agricultural*
833 *Research*, 51(8). Disponível em
834 <http://www.ars.usda.gov/is/AR/archive/aug03/time0803.pdf>
- 835 Mocelin, A. F. B., & Figueiredo, P. M. S. (2009). Avaliação microbiológica e
836 parasitológica das alfaces comercializadas em São Luiz – MA. *Revista de*
837 *Investigação Biomédica do Uniceuma*, (1), 97-107. Disponível em:
838 https://www.extranet.ceuma.br/sitenovo/Revistas/artigos/investigacao_biomedica/investigacao_biomedica1/artigo9.pdf
839
- 840 Mogharbel, A. D. I., & Masson, M. L. (2005, Março). Perigos associados ao consumo
841 da alface, (*Lactuca sativa*), in natura. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, 16(1).
842 Disponível em [http://serv-](http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/alimentos/article/viewFile/105/118)
843 [bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/alimentos/article/viewFile/105/118](http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/alimentos/article/viewFile/105/118)
- 844 Moretti, C. L., & Mattos, L. M. (2006). Processamento mínimo de alface crespa
845 (Comunicado Técnico No. 36). Brasília, DF. Base de dados da EMBRAPA.
846 Disponível em:
847 <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/779836/1/cot36.pdf>
- 848 Moyne, M. et al., (2011). Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in field-inoculated lettuce.
849 *Food Microbiology*, 28(8). doi: 10.1016/j.fm.2011.02.001
- 850 Neto, N. J. G. et al., (2012). Bacterial counts and the occurrence of parasites in
851 lettuce (*Lactuca sativa*) from different cropping systems in Brazil. *Food*
852 *Control*, 28(1), 47–51. doi: 10.1016/j.foodcont.2012.04.033
- 853 Nicholson, F. A., Groves, S. J., & Chambers, B. J. (2004). Pathogen survival during
854 livestock manure storage and following land application. *Bioresource*
855 *Technology*, 96(2), 135–143. doi: 10.1016/j.biortech.2004.02.030

- 856 Olaimat, A. N., Holley, R. A. (2012) Factors influencing the microbial safety of fresh
857 produce: a review. *Journal of Food Protection*, 32 (1), 1-19.
858 Doi:10.1016/j.fm.2012.04.16
- 859 OLIVEIRA, A. B. A. ; Ritter. A. C. ; Tondo, E. C. ; Cardoso, M. R. de I. (2012).
860 Comparison of Different Washing and Disinfection Protocols Used by Food
861 Services in Southern Brazil for Lettuce (*Lactuca sativa*). *International Journal*
862 *of Food Sciences and Nutrition (Online)*, 3, 28-32.
- 863 Oliveira, C. A. F. de, & Germano, P. M. L. (1992). Estudo da ocorrência de
864 enteroparasitas em hortaliças comercializadas na região metropolitana de São
865 Paulo, SP, Brasil. I - Pesquisa de helmintos. *Revista Saúde Pública*, 26(5),
866 332-335.
- 867 Oliveira, M. A., Souza, V. M., Bergamini, A. M. M., & Martinis, E. C. P. (2011).
868 Microbiological quality of ready-to-eat minimally processed vegetables
869 consumed in Brazil. *Food Control*, 22(8), 1400-1403. doi:
870 10.1016/j.foodcont.2011.02.020
- 871 Oliveira, M., Usall, J., Viñas, I., Anguera, M., Gatiús, F., & Abadías, M. (2010).
872 Microbiological quality of fresh lettuce from organic and conventional
873 production. *Food Microbiology*, 27(5), 679–684. doi: 10.1016/j.fm.2010.03.008
- 874 Oliveira, M., Viñas, I., Usall, J., Anguera, M., & Abadías, M. (2012). Presence and
875 survival of *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce leaves and in soil treated with
876 contaminated compost and irrigation water. *International Journal of Food*
877 *Microbiology*, 156(2), 133–140. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.014
- 878 Osés, S. M., Luning P. A., Jacxsens, L., Santillana, S., Jaime, I., & Rovira, J. (2012).
879 Microbial performance of food safety management systems implemented in
880 the lamb production chain. *Journal of Food Protection*, 75(1), 95-103.
881 doi:10.4315/0362-028X.JFP- 11-263.
- 882 Pacheco, M. A. S. R., Fonseca, Y. S. K., Dias, H. G. G., Cândido, V. L. P., Gomes, A.
883 H. S., Armelin, I. M., & Bernardes, R. (2002). Condições higiênico-sanitárias
884 de verduras e legumes comercializados no CEAGESP de Sorocaba - SP.
885 *Higiene Alimentar*. 16(101), 50-51.
- 886 Rezende, C. L., & Farina, E. M. M. Q. (2001, Dezembro). *Assimetria informacional no*
887 *mercado de alimentos orgânicos*. Artigo apresentado no Segundo Seminário
888 Brasileiro da Nova Economia Institucional, Campinas, SP. Disponível em
889 <http://www1.fia.com.br/portalfia/default.aspx?idpagina=927>

- 890 RIO GRANDE DO SUL. Secretaria da Saúde. Portaria n. 78, de 30 jan. 2009. Aprova
891 a Lista de Verificação em Boas Práticas para Serviços de Alimentação, aprova
892 Normas para Cursos de Capacitação em Boas Práticas para Serviços de
893 Alimentação e dá outras providências. 1 f.
- 894 Salem, I. B., Ouardani, I., Hassine, M., & Aouni, M. (2011). Bacteriological and
895 physico-chemical assessment of wastewater in different region of Tunisia:
896 impact on human health. *BMC Research Notes*, 4(144). doi: 10.1016/S0168-
897 1605(00)00288-9
- 898 Salem, I. B., Ourdani, I., Hassine, M., & Aouni, M. (2001). Bacteriological and
899 physico-chemical assessment of wastewater in different region of Tunisia:
900 impact on human health. *BMC Research Notes*, 4(1), 144. doi: 10.1186/1756-
901 0500-4-144
- 902 Santana, L. R. R., Carvalho, R. D. S., Leite, C. C., Alcântara, L. M., Oliveira, T. W. S.,
903 & Rodrigues, B. M. (2006). Qualidade física, microbiológica e parasitológica
904 de alfaces (*Lactuca sativa*) de diferentes sistema de cultivo. *Ciência e*
905 *Tecnologia de Alimentos*, 26(2). Disponível em
906 <http://www.scielo.br/pdf/cta/v26n2/30171.pdf>.
- 907 Soriano, J. M., Rico, H., Moltó, J. C., & Mañes, J. (2000). Assessment of the
908 microbiological quality and wash treatments of lettuce served in University
909 restaurants. *International Journal of Food Microbiology*, 58(1,2), 123-128. doi:
910 10.1016/S0168-1605(00)00288-9
- 911 Souto, R. A. (2005). *Avaliação Sanitária da água de irrigação e de Alfaces (Lactuca*
912 *sativa) produzidas no Município de Lagoa Seca, Paraíba* (Dissertação de
913 Mestrado não publicada). Universidade Federal da Paraíba, Areia, PB.
- 914 Taban, B. M., & Halkman, A. K. (2011). Do leafy green vegetables and their ready-to-
915 eat [RTE] salads carry a risk of foodborne pathogens? *Anaerobe*, 17(6), 286-
916 287. doi: 10.1016/j.anaerobe.2011.04.004
- 917 Uyttendaele, M., Jacxsens, L., De Loy-Hendrickx, A., Devlieghere, F., & Debevere, J.
918 (2010). *Microbiologische richtwaarden en wettelijke microbiologische criteria*.
919 Belgium: Laboratory of food Microbiology and Food Preservation, Department
920 of Food Safety and Food Quality, Ghent University, ISBN 978-90-5989-385-6.
- 921 Varallo, A. C. T., Souza, J. M., Rezende, S. S. R., & Souza, C. F. (2011). Avaliação
922 da qualidade sanitária da alface (*Lactuca sativa*, L.) irrigada com água de

- 923 reúso comparada com amostras comercializadas. *Revista Ambiente & Água*,
924 6(2), 295-304. doi:10.4136/ambi-agua.201
- 925 WHO, World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United
926 Nations. (2008) Microbiological risk assessment series: *Microbiological*
927 *hazards in fresh fruits and vegetables* (Pre-publication version). Disponível
928 em: http://www.fao.org/ag/agn/agns/files/FFV_2007_Final.pdf
- 929 Wießner, S., Thiel, B., Krämer, J., & Köpke, U. (2009). Hygienic quality of head
930 lettuce: effects of organic and mineral fertilizers. *Food Control*, 20(10), 881–
931 886. doi: 10.1016/j.foodcont.2008.11.009

CAPÍTULO 3

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização da ferramenta HAS, combinada com o HSMS-DI, permitiu analisar a cadeia produtiva de alface orgânica quanto à distribuição microbiológica e sistemas de gestão da inocuidade. Essas ferramentas possibilitaram uma visão geral do desempenho de propriedades rurais orgânicas do sul do Brasil, indicando prováveis melhorias a serem implementadas em pontos que demonstraram desempenho insuficiente ou que tenham apresentado maior risco dentro do contexto da segurança dos alimentos.

Ao longo da cadeia produtiva de alfaces orgânicas, diversas são as fontes de contaminação microbiológica, conforme demonstrado pela avaliação das ferramentas HAS e HSMS-DI.

Na avaliação pelo HSMS-DI da “matéria-prima” o escore médio obtido pelas propriedades avaliadas foi três, classificando-as como de alto risco. Esta classificação está relacionada com as características das mudas de alface utilizadas nas três propriedades rurais, as quais não eram tratadas quimicamente ou termicamente, tornando o produto vulnerável à contaminação. No entanto, as análises do HAS demonstraram baixas contagens de microrganismos e ausência de patógenos nas mudas de alface. Contudo, diversos surtos envolvendo sementes de vegetais contaminadas foram relatados no mundo inteiro (MELLMANN et al. 2011), salientando a importância de alguma medida de controle aplicável às sementes ou mudas de alface orgânico. O fato das mudas analisadas não terem demonstrado contaminação microbiológica expressiva não quer dizer que essa nunca ocorra, sendo necessária a implementação de medidas de controle como o tratamento físico das sementes, controle e certificação dos fornecedores, objetivando principalmente o controle do armazenamento, germinação e transporte.

A avaliação do HSMS-DI quanto à contaminação microbiológica do produto final demonstrou um escore médio de três, classificando-o como de alto risco em todas as propriedades rurais analisadas. Este resultado foi atribuído devido às características do produto “alface”, o qual apresenta folhas imbricadas e de superfície irregular, favorecendo a permanência e desenvolvimento de microrganismos (ROLIM; TORRES, 1992). Ainda, a alface por não apresentar propriedades protetoras em sua superfície e por ser um alimento que será consumido cru, demonstra ser um produto de alto risco se medidas de segurança

não forem tomadas. Medidas estas que incluem cuidados desde a plantação até a mesa do consumidor. No presente estudo, uma das medidas realizadas pelos produtores foi a retirada de folhas externas e estragadas da superfície e, posteriormente, as alfaces foram lavadas com água para a retirada de sujidades visíveis. Este procedimento se realizado com água de fonte segura pode ajudar a diminuir a contaminação conforme demonstrado no resultado do HAS, pois todas as amostras de alface (produto final), nas três propriedades rurais, demonstraram estar de acordo com a legislação brasileira, que estabelece uma contagem de *E. coli* de até 10^2 UFC/g. Resultados diferentes foram encontrados por Arbos et al. (2010), e Santana et al. (2006), onde amostras de alface de diferentes tipos de cultivos apresentaram contagens de *E. coli* acima do permitido pela legislação brasileira. A presença de *E. coli* em vegetais indica negligência durante o cultivo, condições de higiene insatisfatórias e provável contaminação por bactérias patogênicas associadas a diversas DTA (GOMES NETO et al., 2012; SORIANO et al., 2000).

Estudos indicam que a lavagem das alfaces reduz a contaminação microbiológica em aproximadamente 1 ciclo logaritmo, no entanto se a lavagem for realizada com água de má qualidade microbiológica, pode ocorrer o aumento das contagens microbiológicas do produto final (ANTUNES 2009; PARISH et al., 2003).

A avaliação contaminação microbiológica do “sistema de cultivo” das propriedades analisadas demonstrou um escore médio de três, classificando-a como de alto risco, pois as mesmas apresentavam um sistema de cultivo em campo aberto e as alfaces eram plantadas em canteiros rentes ao solo. A plantação em campo aberto pode favorecer a contaminação do alimento, uma vez que diversas situações problemáticas podem ocorrer, dentre elas: a presença de aves, animais silvestres e domésticos, entre outros. Em todas as propriedades rurais analisadas havia a presença de animais como cães, gatos e animais silvestres na plantação.

As “condições climáticas” também foram avaliadas neste estudo e o escore médio foi três, classificando todas as propriedades como de alto risco. Esta classificação ocorreu por que as propriedades encontrava-se em zona climática tropical, o que permite oscilações de temperatura. A falta de controle da temperatura ao longo do cultivo favorece o desenvolvimento de microrganismos, pois em condições controladas, tal como estufas climatizadas, o risco é menor. Durante as coletas de amostras do HAS, as condições climáticas foram bastante estáveis, demonstrando temperaturas próximas a 37°C e sem precipitação ao longo de toda

avaliação. Apenas na última semana de avaliação das propriedades (T3) ocorreu uma forte chuva (precipitação de 33,2 mm), a qual foi responsável por uma enchente nas propriedades rurais 2 e 3 e esta pode ter propiciado o isolamento da *E. coli* O157 H:7 na água de irrigação e lavagem das alfaces. Pesquisas têm demonstrado que alterações climáticas podem influenciar diretamente no desenvolvimento de microrganismos. Oliveira et al. (2012) avaliando a presença de microrganismos patogênicos na água de irrigação, solo e em alfaces sugeriram que altas temperaturas que ocorrem no verão podem influenciar nas contagens de microrganismos patogênicos. Estes autores relataram que a contaminação microbiológica do solo pode diminuir devido à radiação solar, à umidade e às temperaturas elevadas. A presença de temperaturas elevadas e a baixa umidade no período das coletas das amostras do presente estudo podem ter contribuído para a redução das contagens de *E. coli*.

Na avaliação da contaminação microbiológica da “fonte de água” o escore médio foi três (alto risco) para as propriedades rurais 1 e 3, que utilizavam fonte não controlada de água (açude). Já na propriedade rural 2, o escore médio foi 2 (moderado risco) pois a fonte de água era de poço escavado. A origem da água utilizada para irrigação é primordial para se obter um produto seguro. O escore de alto risco das fontes de água foi confirmado pelos resultados encontrados no HAS, que apresentou altas contaminações nas águas avaliadas, inclusive a presença de patógenos com *Salmonella* e *E. coli* O157 H:7. A presença de *E. coli* O157 H:7 foi encontrada na água de irrigação da propriedade rural 2, após a enchente, conforme relatado anteriormente, onde as alfaces já estavam prontas para a colheita, demonstrando alto risco de contaminação do produto final. Surtos alimentares envolvendo vegetais folhosos contaminados por água foram relatados por diversos estudos no mundo (BERALDO, FARACHE FILHO, 2011; DELAQUIS et al., 2007; BEUCHAT et al., 1996). Bactérias patogênicas, como por exemplo, a *E. coli* O157H:7, presentes em resíduos animais são as mais frequentemente associadas com surtos de doenças transmitidas pela água contaminada e imprópria para irrigação (LEVANTESI et al., 2012).

No presente estudo a água de lavagem da propriedade rural 3 também apresentou contaminação por *E. coli* O157:H7, contudo, as alfaces lavadas nessa água não apresentaram contaminação por este patógeno. É possível que a lavagem das alfaces tenha reduzido este patógeno e por isso tenha ficado abaixo do limite de

detecção do método utilizado. Mesmo assim, a qualidade da água utilizada para a lavagem deve ser considerada como um ponto crítico da cadeia de produção de alface (OLIVEIRA; et al. 2012; MOYNE et al, 2011;. JAMES, 2006). Neste contexto é necessário considerar como medida de controle a higienização destas alfaces antes do seu consumo, a fim de promover a redução do número de microrganismos patogênicos. De acordo com a Portaria Estadual do Rio Grande do Sul nº 78 de 2009 (RIO GRANDE DO SUL, 2009), este processo compreende a lavagem da alface com água potável e posterior desinfecção com solução contendo 100 a 250ppm de cloro livre, durante 15 minutos. Em seguida deve ser realizado o enxágue com água potável. O resultado da avaliação do HSMS-DI demonstrou que o produto e o processo estavam vulneráveis a contaminação microbiológica. Esta vulnerabilidade no risco de contaminação está intimamente relacionada com as características da cadeia produtiva de alface orgânica, uma vez que estas favorecem o desenvolvimento de microrganismos patogênicos. Segundo LUNINING et al. (2011), JACXSENS et al. (2011), and OSES et al. (2012), o contexto de alto risco, demonstra falha no sistema de segurança dos alimentos implementado na cadeia. A partir deste diagnóstico é possível propor medidas de controle para os pontos falhos, implantando-as e implementando-as, desde o início da cadeia até o momento do consumo (JACXSENS et al., 2011; OSES et al., 2012).

O presente estudo identificou o adubo, as águas de irrigação e lavagem como as principais fontes de contaminação dentro da cadeia produtiva de alfaces orgânicos. A contaminação do adubo indicou a necessidade de maior controle no tempo de compostagem associadas às Boas Práticas Agrícolas. Quanto às águas de irrigação e lavagem, salienta-se a necessidade da utilização de água de fonte segura para a irrigação e água potável e corrente para a lavagem das alfaces após colheita. Salienta-se ainda, a necessidade de conscientização do consumidor de produtos orgânicos, a fim de que seja realizada a higienização dos mesmos antes do consumo. Este estudo indicou que embora os produtos orgânicos sejam muito menos susceptíveis a contaminação por perigos químicos, a contaminação de perigos biológicos pode ocorrer.

REFERÊNCIAS

- ABREU, Ingergleice Machado de Oliveira et al. Qualidade microbiológica e produtividade de alface sob adubação química e orgânica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 1, p.108-118, 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cta/v30s1/18.pdf>>. Acesso em: 31 jul. 2011.
- ALVES FILHO, Manuel. Pesquisas investigam riscos e benefícios de alimentos e nutrientes. **Jornal da Unicamp**, Campinas, p.6-7, 2003.
- AMARAL, Iluiz Augusto do et al. Água de consumo humano como fator de risco à saúde em propriedades rurais. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 37, n. 4, p.510-514, 2003. Disponível em: <<http://www.scielosp.org/pdf/rsp/v37n4/16787.pdf>>. Acesso em: 31 jul. 2011.
- ANTUNES, Maria Aparecida. **Contaminação, crescimento e inativação de microrganismos na cadeia de produção de alface (Lactuca sativa L.) variedade Vitória de Santo Antão**. 2009. 199 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009. Disponível em: <http://www.tede.ufv.br/tesesimplificado/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=2537>. Acesso em: 31 jul. 2011.
- AOAC INTERNATIONAL. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 20 ed. Gaithersburg, 1998.
- ARBOS, Kettelin Aparecida et al. Segurança alimentar de hortaliças orgânicas: aspectos sanitários e nutricionais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 1, p.215-220, 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cta/v30s1/33.pdf>>. Acesso em: 31 jul. 2011.
- BERALDO, Rosa Maria; FARACHE FILHO, Adalberto. Bacteriological quality of irrigation water from vegetable gardens in the municipalities of Araraquara, Boa Esperança do Sul e Ibitinga, SP. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, Araraquara, v. 22, n. 3, p.345-350, 2011. Disponível em: <<http://200.145.71.150/seer/index.php/alimentos/article/view/1460/1460>>. Acesso em: 31 jul. 2011.
- BEUCHAT, Larry R.. Pathogenic Microorganisms Associated with Fresh Produce. **Journal Of Food Protection**, v. 59, n. 2, p.204-216, 1996.
- BISCARO, G. A. et al. Aspectos Sanitários do Cultivo da Alface Americana Irrigada com Águas Receptoras de Efluentes Urbanos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, p.295-301, 2008.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n. 46**, de 6 out. 2011. Estabelece o Regulamento Técnico para os Sistemas Orgânicos de Produção Animal e Vegetal, bem como as listas de Substâncias Permitidas para uso nos Sistemas Orgânicos de Produção Animal e Vegetal. 32 f.

Disponível em: <

http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Desenvolvimento_Sustentavel/Organicos/Produtos%20Fitossanit%C3%A1rios/Home/IN_46_Prod_Animal_e_Vegetal_Organic-a-revoga_IN_64.pdf> . Acesso em: 24 jan.2012

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC n.12**, de 12 jan. 2001. Aprova o Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. 68p.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução n. 357**, de 17 mar. 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. 29f.

CONAMA, Conselho Nacional do Meio Ambiente, Ministério do Meio Ambiente **Resolução No. 357**. 2005. Disponível em <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>.

COSTA, C. P.; SALA, F. C.. A evolução da alfacicultura brasileira. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 1, p.158-159, 2005.

DANIEL, G.. **Controle da poluição proveniente dos dejetos da suinocultura, reaproveitamento e valoração dos subprodutos**. 2005. 59 f. Trabalho Conclusão Curso (Graduação) - PUC, Curitiba, 2005.

DELAQUIS, Pascal; BACH, Susan; DINU, Laura-dorina. Behavior of Escherichia coli O157:H7 in leafy vegetables. **Journal Of Food Protection**, v. 70, n. 8, p.1966-1974, 2007

DURHAM, Sharon. Improving On a Time-Tested Technique. **Agricultural Research**, v. 51, n. 8, p.20-21, 2003. Disponível em: <<http://www.ars.usda.gov/is/AR/archive/aug03/time0803.pdf>>. Acesso em: 31 jul. 2011.

EMBRAPA. Embrapa Hortaliças: Hortaliças em Números, 2008. Disponível em: <http://www.cnph.embrapa.br/paginas/hortaliças_em_numeros/producao_hortaliças_2008.xls>. Acesso em: 31 de julho de 2011.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Meeting Report**. Itália, 2008. Disponível em: <http://typo3.fao.org/fileadmin/templ_ates/agns/pdf/jemra/FFV_2007_Final.pdf> . Acesso em: 31 de julho de 2011.

FAYER, R. et al. Epidemiology of Cryptosporidium: transmission, detection and identification. **Internacional Journal For Parasitology**, Londres, v. 30, n. , p.1305, 2000.

FILGUEIRA, Fernando Antonio Reis. **Novo Manual de Olericultura: Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 2. ed. Viçosa: Ufv, 2003. 421 p.

FISCHER-ARNDT, Meike et al. Effects of weed management practices on enteric pathogen transfer into lettuce (*Lactuca sativa* var. capitata). **Food Control**, v. 21, n. 7, p.1004-1010, 2010.

FRANCO, Renato A. M.; HERNANDEZ, Fernando B. T.; VANZELA, Luiz S.. Utilização dos parâmetros coliformes totais e fecais e oxigênio dissolvido na avaliação da qualidade de água para irrigação na microbacia do córrego três barras, marinópolis, sp. in: congresso brasileiro de engenharia agrícola, 36., 2007, Bonito. **Anais...** . Bonito: Sbea, 2007. p. 1 - 4. Disponível em: <http://www.agr.feis.unesp.br/pdf/conbea2007_coliformes_tres_barras.pdf>. Acesso em: 31 jul. 2011.

GELTING, Richard J. et al. Irrigation water issues potentially related to the 2006 multistate *E. coli* O157:H7 outbreak associated with spinach. **Agricultural Water Management**, Atlanta, v. 98, n. 9, p.1395-1402, 2011.

GLIESSMAN, Stephen R. Agroecologia: processos ecológicos em agricultura sustentável. 2.ed. p. 653. Porto Alegre: UFRGS, 2001.

GOMBAS D. et al. **Commodity Specific Food Safety Guidelines for the Lettuce and Leafy Greens Supply Chain**. FDA, Alexandria, 1a. ed., pag. 1 – 39, abril 2006. Disponível em: < <http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodSafety/Product-SpecificInformation/FruitsVegetablesJuices/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/UCM169008.pdf> >. Acesso em: 31 de julho de 2011.

GOMES NETO, Nelson Justino et al. Bacterial counts and the occurrence of parasites in lettuce (*Lactuca sativa*) from different cropping systems in Brazil. **Food Control**, v. 28, n. 1, p.47-51, 2012. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S095671351200206X/1-s2.0-S095671351200206X-main.pdf?_tid=681dce52-654c-11e2-ae13-00000aacb360&acdnat=1358939141_02f6c01f12f22c0c86899d218c0f162a>. Acesso em: 31 jul. 2012.

GUILHERME, Ana Lucia Falavigna et al. Prevalência de enteroparasitas em horticultores e hortaliças da Feira do Produtor de Maringá, Paraná. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 32, n. 4, p.405-411, 1999.

GUIMARÃES, Antônio Marcos et al. Frequência de enteroparasitas em amostras de alface (*Lactuca sativa*) comercializadas em Lavras, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 36, n. 6, p.621-623, 2003.

HOLVOET, Kevin et al. Horticultural assessment scheme: insight in prevalence and distribution of microbial contamination to evaluate water management in fresh produce processing industry. In: IAFP ANNUAL MEETING, 1., 2011, Milwaukee. **Anais...** . Milwaukee: International Association For Food Protection, 2011. p. 1 - 2. Disponível em: <<https://biblio.ugent.be/record/1870143>>. Acesso em: 31 jul. 2011.

HUTCHISON, M. L. et al. A study on farm manure applications to agricultural land and an assessment of the risks of pathogen transfer into the food chain. **A Report To: The Ministry of Agriculture Fisheries and Food**, Reino Unido, p.1-209, 2000.

ITOHAN, Aboh Mercy; PETERS, Oladosu; KOLO, Ibrahim. Bacterial contaminants of salad vegetables in Abuja Municipal Area Council, Nigeria. **Malaysian Journal Of Microbiology**, Nigéria, v. 7, n. 2, p.111-114, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160509001251>>. Acesso em: 31 jul. 2011.

ISLAM, Mahbud. et al. Persistence of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 in soil and on leaf lettuce and parsley grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. **Journal Of Food Protection**, v. 67, n. 7, p.1365-1370, 2004. Disponível em: <10.1016/j.fm.2004.04.007>. Acesso em: 31 jul. 2011.

ISLAM, Mahbub et al. Survival of Escherichia coli O157:H7 in soil and on carrots. **Food Microbiology**. v. 22, p.63-70, 2005. Disponível em: <<http://www.ask-force.org/web/Organic/Islam-Survival-ColiO157H7-2005.pdf>>. Acesso em: 31 jul. 2011.

JACXSENS, L. et al. A Microbial Assessment Scheme to measure microbial performance of Food Safety Management Systems. **International Journal Of Food Microbiology**. v. 134, n. 1-2, p.113-125, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160509001251>>. Acesso em: 31 jul. 2011.

JACXSENS, L. et al. Tools for the performance assessment and improvement of food safety management systems. **Trends In Food Science & Technology**, v. 22, p.80-89, 2011. Disponível em: < http://ac.els-cdn.com/S0924224411000367/1-s2.0-S0924224411000367-main.pdf?_tid=18ba2fb8-660f-11e2-a494-00000aacb362&acdnat=1359022760_08947e1a186d090d5cbebf53ecbac89a >. Acesso em: 3 jan. 2012.

JAMES, Jennylynd. **Microbial Hazard Identification in Fresh Fruits and Vegetables**. New Jersey: Wiley-interscience, 2006. 312 p.

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

LEVANTESI, Caterina et al. Salmonella in surface and drinking water: Occurrence and water-mediated transmission. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p.587-602, 2012.

LIMA, Suzana M. S. et al. Qualidade sanitária e produção de alface irrigada com esgoto doméstico tratado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 9, n. , p.21-25, 2005.

LUNING, P.a. et al. A tool to diagnose context riskiness in view of food safety activities and microbiological safety output. **Trends In Food Science & Technology**, v. 22, p.67-79, 2011. Disponível em: < http://ac.els-cdn.com/S09242244110002037/1-s2.0-S09242244110002037-main.pdf?_tid=f959bdc8-660e-11e2-ad9e-00000aacb35d&acdnat=1359022707_75f838e620775461a915410d84fae984>. Acesso em: 3 jan. 2012.

LUNING, P.a. et al. Comprehensive analysis and differentiated assessment of food safety control systems: a diagnostic instrument. **Trends In Food Science & Technology**, Ss, v. 19, n. , p.522-534, 2008. Disponível em: <Comprehensive analysis and differentiated assessment of food safety control systems: a diagnostic instrument>. Acesso em: 31 jul. 2011.

LUNING, P.a. et al. Systematic assessment of core assurance activities in a company specific food safety management system. **Trends In Food Science & Technology**, v. 20, n. 6, p.300-312, 2009. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0924224409001216/1-s2.0-S0924224409001216-main.pdf?_tid=e57ef85c-6570-11e2-8f47-00000aab0f26&acdnat=1358954813_1ceba9cef63ce3cd9ce97469c6ed91fc>. Acesso em: 31 jul. 2011.

MATTOS, Leonora M et al. Qualidade de alface crespa minimamente processada armazenada sob refrigeração em dois sistemas de embalagem. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 4, p.21-25, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-05362007000400003>. Acesso em: 31 jul. 2011.

MELLMANN, A. et al. Prospective Genomic Characterization of the German Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 Outbreak by Rapid Next Generation Sequencing Technology. **PLoS ONE** 6(7): e22751. 2011. doi:10.1371/journal.pone.0022751. Acesso em: 28 dez. 2012.

MILLING, A. et al. The use of wood in practice - a hygienic risk? **Holz Als Roh- Und Werkstoff**, Alemanha, v. 63, p.463-472, 2005. Disponível em: <<http://www.wilms.com/Hygiene/Presse/theuseofwoodinprakticeahygienicrisk.pdf>>. Acesso em: 31 jul. 2011.

MILLNER, P.D. Manure Management. In: Sapers, G., Solomon, E. Matthews, K. **The Produce Contamination Problem: causes and solutions**. Burlington: Elsevier Press, 2009. p. 79-104.

MORETTI, Celso Luiz; MATTOS, Leonora Mansur. Processamento mínimo de alface crespa. **Comunicado Técnico**, Brasília, v. 36, p.1-7, 2006. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/779836/1/cot36.pdf>>. Acesso em: 31 jul. 2011.

MOYNE, Anne-Laure et al. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in field-inoculated lettuce. **Food Microbiology**, v. 28, n. 8, p.1417-1425, 2011.

NASCIMENTO, Micheline Rodrigues do; STAMFORD, Ânia Lúcia Montenegro. Incidência de *Escherichia coli* O157: H7 em alimentos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, n. 70, p.32-35, 2000. Disponível em: <<http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=260035&indexSearch=ID>>. Acesso em: 31 jul. 2011.

NASCIMENTO, Warley M; STAMFORD, Tânia Lúcia Montenegro. Produção de Sementes de Hortaliças Para a Agricultura Familiar. **Circular Técnica 35**, Brasília, p.1-16, 2005. Disponível em:

<<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/778169/1/ct35.pdf>>. Acesso em: 31 jul. 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, v. 156, n. 2, p.133-140, 2012.

OLIVEIRA, M. et al. Microbiological quality of fresh lettuce from organic and conventional production. **Food Microbiology**, v. 27, n. 5, p. 679–684, 2010. doi: 10.1016/j.fm.2010.03.008

OLIVEIRA, Carlos Augusto Fernandes de; GERMANO, Pedro Manuel Leal. Estudo da ocorrência de enteroparasitas em hortaliças comercializadas na região metropolitana de São Paulo, SP, Brasil, I - Pesquisa de helmintos. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 26, n. 4, p.283-289, 1992.

OSÉS, S. M. et al. Microbial performance of food safety management systems implemented in the lamb production chain. **Journal Of Food Protection**, v. 75, n. 1, p.95-103, 2012. Disponível em: <10.4315/0362-028X.JFP- 11-263>. Acesso em: 31 jun. 2012.

PARISH, M. E. et al. Methods to Reduce/ Eliminate Pathogens from Fresh and Fresh-Cut Produce. **You Have Free Access To This Content Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety**, v. 2, n. 1, p.161-173, 2003. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00033.x/pdf>>. Acesso em: 31 jul. 2011

PRIMAVESI, Ana M. **Manejo Ecológico dos Solos**. São Paulo: Nobel, 2002, 549 p.

REINO UNIDO. International Standard. **ISO 21528-2**. 15 ago. 2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs: Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae: Part 2: Colony-count method. 20f.

REINO UNIDO. International Standard. **ISO 16654**. 01 maio 2001. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection of Escherichia coli O157. 23f.

RIO GRANDE DO SUL. Secretaria da Saúde. **Portaria n. 78**, de 30 jan. 2009. Aprova a Lista de Verificação em Boas Práticas para Serviços de Alimentação, aprova Normas para Cursos de Capacitação em Boas Práticas para Serviços de Alimentação e dá outras providências. 1 f.

ROLIM. Henriqueta Merçon Vieira; TORRES, Maria Célia Lopes. **Ocorrência de coliformes fecais e Escherichia coli em alface comercializada em Goiânia**. Anais da Escola de Agronomia e Veterinária da Goiás, Goiás, v.21, n.1, p.47-53, 1992

SANTANA, Ligia Regina R. de et al. Qualidade física, microbiológica e parasitológica de alfaces (*Lactuca sativa*) de diferentes sistemas de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p.264-269, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cta/v26n2/30171.pdf>>. Acesso em: 31 jul. 2011

SANTOS, Isabel. Contaminação dos produtos vegetais pela água. **Sequali**, Lisboa, n. 7, p.11-13, 2009. Disponível em: <<http://www.infoqualidade.net/SEQUALI/PDF-Sequali-07/Page%2011-13.pdf>>. Acesso em: 31 jul. 2011.

SEBRAE. **Diagnóstico da cadeia produtiva de hortaliças na região metropolitana de Belém (PA)**: Parte I: aspectos teórico-metodológicos e abordagem geral da cadeia produtiva de hortaliças na região metropolitana de Belém (PA). Belém, Sebrae, 2010.

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

SILVA, N., NETO, R.C., JUNQUEIRA, V.C.A. & SILVEIRA, N.F.A. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica da Água**. São Paulo: Varela, 2005.

SOARES, Bolivar; CANTOS, Geny Aparecida. Qualidade parasitológica e condições higiênico-sanitárias de hortaliças comercializadas na cidade de Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 8, n. 4, p.377-384, 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.org/pdf/rbepid/v8n4/04.pdf>>. Acesso em: 31 jul. 2011.

SORIANO, J.m. et al. Assessment of the microbiological quality and wash treatments of lettuce served in University restaurants. **International Journal Of Food Microbiology**, v. 58, n. 1, p.123-128, 2000. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0168160500002889/1-s2.0-S0168160500002889-main.pdf?_tid=308f18e6-654d-11e2-a2c9-00000aacb35d&acdnat=1358939477_d97c5c15e39bdaf71340d16d5e6ed7dd>. Acesso em: 31 jul. 2011.

SUÍÇA. International Standard. **ISO 6579**. 4 ed. 15 jul. 2002. Microbiology of food and animal feeding stuffs: horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. 34f.

TAKAYANAGUI, Osvaldo M. et al. Fiscalização de hortas produtoras de verduras do município de Ribeirão Preto, SP. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Campina Grande, v. 33, n. 2, p.169-174, 2000.

TONDO, Eduardo César & BARTZ, Sabrina. **Microbiologia e sistemas de gestão da segurança de alimentos**. Porto Alegre: Sulina, 2012. 263 p.

VEG-I-TRADE. **Project: Impact of Climate Change and Globalization on Safety of Freshproduce**: governing a supply chain of uncompromised food sovereignty, 2009. Disponível em: <<http://www.veg-i-trade.org/index.php>> Acesso em 20 de jul. de 2011.

VEG-I-TRADE. **Ferramenta de avaliação microbiológica**: safe food for a changing world. Horticultural Assessment Scheme (HAS). Training. Oslo. 2011

VEG-I-TRADE. **Ferramenta de diagnóstico de gestão**: self Assessment of Horticulture Safety Management System (HSMS) and context. Primary Production. 2011.

VEG-I-TRADE. **Project: EHEC outbreak in Germany**: Veg-I-Trade informs. Fact sheet on EHEC outbreak in Germany, 2011. Disponível em: <http://www.veg-i-trade.org/assets/EHEC_VegiTrade_7_june.pdf> Acesso em 25 de julho de 2011.

WHO. **Outbreaks of E. coli O104:H4 infection**: update 30, 2011. Disponível em: <http://www.euro.who.int/en/what-we-do/health-topics/emergencies/international-health-regulations/news/news/2011/07/outbreaks-of-e.-coli-o104h4-infection-update-30>. Acesso em: 31 de julho de 2011.

YOSSA, Nadine et al. Antimicrobial activity of essential oils against Escherichia coli O157:H7 in organic soil. **Food Control**, v. 21, n. , p.1458-1465, 2010. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0956713510001349/1-s2.0-S0956713510001349-main.pdf?_tid=7fc556a2-661d-11e2-a4ee-00000aab0f6b&acdnt=1359028945_b6c606140d45199b7477554c86daf0e2>. Acesso em: 31 jul. 2011.