

RODRIGO OLIVEIRA MADEIRA

**DIVERSIDADE BACTERIANA E IMPACTO DE UM
COQUETEL DE BACTERIÓFAGOS NO CRESCIMENTO
DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE UM PRODUTO
MINIMAMENTE PROCESSADO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola para obtenção do título *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2016

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

M181d
2016 Madeira, Rodrigo Oliveira, 1991 -
Diversidade bacteriana e impacto de um coquetel de bacteriófagos no crescimento de bactérias isoladas de um produto minimamente processado / Rodrigo Oliveira Madeira. - Viçosa, MG, 2016.
vii, 79f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Sérgio Oliveira de Paula.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.39-44.

I. Bacteriófagos. 2. Bactérias - Crescimento. 3. Alimentos - Microbiologia. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 579.26

RODRIGO OLIVEIRA MADEIRA

**DIVERSIDADE BACTERIANA E IMPACTO DE UM
COQUETEL DE BACTERÍOFAGOS NO CRESCIMENTO
DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE UM PRODUTO
MINIMAMENTE PROCESSADO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola para obtenção do título *Magister Scientiae*.

APROVADO: 07 de outubro de 2016.



Roberto Sousa Dias
(Coorientador)



Leandro Licursi de Oliveira



Sérgio Oliveira de Paula
(Orientador)

Aos meus pais, Marcos e Eliamar,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, acima de tudo e de todos, pela maravilhosa e imerecida graça a mim dispensada.

Aos meus pais, por todo suporte e amor incondicional.

À minha família, por me incentivar e me acompanhar de perto em todos os momentos.

À minha noiva Débora Durso pelo suporte e companheirismo.

À Universidade Federal de Viçosa pela infra-estrutura e acolhimento.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Ao Professor Sérgio, pela orientação, dedicação e acompanhamento.

Aos co-orientadores Roberto e Leandro pelos conselhos e sugestões para melhoria desse trabalho.

À equipe do Laboratório de Imunovirologia Molecular, pelos momentos compartilhados.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	6
2.1. Objetivo Geral.....	6
2.2. Objetivos Específicos	6
3. MATERIAL E MÉTODOS	6
3.1. Amostragem da salada no pote	6
3.2. Isolamento, purificação e estocagem de linhagens bacterianas	7
3.3. Identificação presuntiva em CHROMagar.....	7
3.4. Antibiograma	8
3.4.1. Meio de cultura	8
3.4.2. Preparo do inóculo	8
3.4.3. Inoculação na placa de Petri.....	8
3.4.4. Aplicação dos discos de antibiótico e incubação	9
3.5. Extração de DNA bacteriano	9
3.5.1. Preparo dos agrupamentos de DNA e sequenciamento	10
3.6. Bacteriófagos.....	10
3.6.1. Propagação viral	11
3.6.2. Titulação viral	11
3.6.3. Montagem do coquetel de bacteriófagos.....	11
3.6.4. Purificação do Coquetel de bacteriófagos.....	11
3.7. Curvas de crescimento de densidade óptica.....	12
3.8. Análise estatística.....	12
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
4.1. Isolamento de bactérias a partir dos componentes do RTE	13
4.2. Identificação presuntiva em CHROMagar <i>versus</i> sequenciamento Illumina miseq	13
4.3. Diversidade Microbiana.....	17
4.4. Diagrama de Venn	18
4.5. Antibiograma.....	20

4.6. Curva de crescimento de densidade óptica.....	31
5. CONCLUSÃO.....	38
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
7. MATERIAL SUPLEMENTAR.....	45

RESUMO

MADEIRA, Rodrigo Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2016. **Diversidade bacteriana e impacto de um coquetel de bacteriófagos no crescimento de bactérias isoladas de um produto minimamente processado.** Orientador: Sérgio Oliveira de Paula. Coorientador: Roberto Sousa Dias.

Bacteriófagos também chamados de fagos são vírus que infectam somente células bacterianas. Fagos são divididos em grupos com base no seu ciclo de replicação, o ciclo lítico que causa a lise da bactéria hospedeira com a liberação de múltiplas partículas do fago (vírion), e o ciclo lisogênico onde o DNA do fago é incorporado ao genoma de seu hospedeiro, não resulta na lise do hospedeiro. Fagos líticos apresentam potencial para aplicação na indústria de alimentos como agentes de biocontrole, biopreservativos. Os fagos também foram propostos como alternativas aos antibióticos na agropecuária. Duas características dos fagos que os tornam potenciais ferramentas para biossegurança de alimentos são que eles não apresentam risco para células de eucariotos e possuem alta especificidade de hospedeiro, não interferindo com a microbiota mutualística e comensal. Esse trabalho avaliou diversidade da comunidade bacteriana cultivável de uma salada no pote (*ready-to-eat*/RTE) produzida em Viçosa-MG, o impacto *in vitro* de bacteriófagos de *Escherichia coli* (*E.coli*) e *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) nesses isolados bacterianos, e o perfil de resistência aos antibióticos desses isolados. Para isso foi realizado isolamento de bactérias do RTE, sequenciamento dos isolados pela plataforma Illumina miseq, e curvas de crescimento de densidade óptica dos isolados em contato com diferentes concentrações (MOI) do coquetel de fagos. Foram obtidos 213 isolados bacterianos, foi observado que o coquetel de bacteriófagos montado foi capaz de inibir o crescimento de apenas 2 dos 43 isolados testados. Com os resultados obtidos nesse trabalho foi possível concluir que havia presença de bactérias patogênicas no RTE e que o coquetel de bacteriófagos de *E.coli* e *S. aureus* não foi capaz de reduzir o crescimento de bactérias diferentes das quais esses fagos foram prospectados.

ABSTRACT

MADEIRA, Rodrigo Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2016. **Bacterial diversity and impact of a bacteriophage cocktail on the growth of bacteria isolated from a minimally processed product.** Adviser: Sérgio Oliveira de Paula. Co-adviser: Roberto Sousa Dias.

Bacteriophages, also called phages, are viruses that infect only bacterial cells. Phages are divided into two groups based on their replication cycle, the lytic cycle that causes lysis of the host bacterium with the release of multiple phage particles (virion). And the lysogenic cycle where the phage DNA is incorporated into the genome of its host which in turn does not result in host lysis. Lithic phages present a potential for application in food industry as biocontrol agents and biopreservatives. Phages were also proposed as alternatives to antibiotics in livestock. Two characteristics of the phages that make them potential tools for food biosafety are that they present no risk to eukaryotic cells and have high host specificity, not interfering with the mutualistic and commensal microbiota. This work evaluated the diversity of the bacterial community of a minimally processed salad (ready-to-eat - RTE) produced in Viçosa-MG, the in vitro impact of *Escherichia coli* (*E.coili*) and *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) bacteriophages on these bacterial isolates, and the antibiotic resistance profile of these same isolates. Thereunto, bacterial isolation from the RTE sample, sequencing of the obtained isolates in Illumina miseq platform, and optical density growth curves of these isolates in contact with different concentrations (MOI) of the phage cocktail. A total of 213 bacterial isolates were obtained. It was observed that the bacteriophage cocktail assembled was able to inhibit the growth of only 2 of the 43 isolates tested. With the results achieved in this work it was possible to conclude that there was presence of pathogenic bacteria present in the RTE and that the bacteriophage cocktail of *E.coili* and *S. aureus* was not able to reduce the growth of different bacteria from which these phages were prospected.

1. INTRODUÇÃO

A demanda por frutas e hortaliças frescas tem continuamente aumentado ao longo dos últimos anos em muitas partes do mundo. Esse aumento se dá em parte por causa do aumento da oferta de frutas e hortaliças minimamente processadas. Esse tipo de produto foi desenvolvido na década de 1980 como resposta, principalmente, às mudanças no estilo de vida nos grandes centros urbanos, que demandavam conveniência, praticidade e refeições de rápido preparo. Além disso, a tendência de melhores hábitos alimentares, e a busca por produtos livres de conservantes químicos também impulsionou o crescimento do setor (BEUCHAT, 2002; GHIDELLI, 2015; SANCHÍS, 2016).

No Brasil, em 2013 cerca de 2,2 milhões de hectares foram utilizados para produção de frutas. Foram produzidos 43,6 milhões de toneladas de frutas e é estimado que a indústria brasileira tenha consumido 23,8 milhões de toneladas da produção interna, e, em termos gerais, o consumo médio no país é de 33 kg por habitante ao ano (SEBRAE, 2015).

Os produtos minimamente processados são frutas e vegetais (ou partes dos mesmos) prontos para comer (*ready-to-eat*) ou prontos para usar (*ready-to-use*) (SANCHÍS, 2016), os quais podem ser lavados, sanitizados, descascados, cortados, fatiados, envasados e armazenados sob refrigeração (MORETTI, 2007). Porém são mantidos frescos (para manter as características organolépticas e nutricionais semelhantes ao produto *in natura*). Estes alimentos apresentam qualidade semelhante à do produto fresco, uma vez que contêm tecidos vivos, são naturais e práticos, o que atende às exigências da vida moderna (HERNANDES et al., 2007). Assim, podem ser denominadas também de levemente processados, parcialmente processados, cortados frescos (*fresh-cut*) ou ainda pré-preparados (MORETTI, 2007).

Apesar de suas características nutricionais e funcionais, o consumo de frutas e hortaliças frescas ou minimamente processados está relacionado com surtos de infecções em humanos devido, principalmente, a transmissão de agentes patogênicos aos seres humanos (BEUCHAT, 2002). A contaminação desses produtos por microorganismos patogênicos representam sérios riscos à saúde dos consumidores. Os produtos minimamente processados podem ser contaminados com patógenos ao serem expostos a fontes de contaminação da produção, no campo, ou no ponto de venda, o mercado (AYCICEK, 2005). Essas fontes de contaminação são; solo (esterco, fezes e

micro-organismos do solo), poeira, água e manuseamento pré e pós colheita. As principais fontes de contaminação pós colheita são os “containers” utilizados para o transporte do produto, manipulação/manuseamento, processamento e armazenamento (REDIERS, 2008). A não realização de medidas que visam a descontaminação também faz com que o produto minimamente processado continue contaminado com patógenos humanos (BURNETT, 2001). Além do mais, vegetais e frutas minimamente processados são mais susceptíveis a contaminação, devido ao fato de que descascar, cortar e fatiar o produto causa danos à barreira protetora natural do produto intacto e libera nutrientes, facilitando o crescimento de micro-organismos (RODRIGUES, 2012).

De acordo com a portaria SVS/MS nº 1.271 de 6 de junho de 2014 que define a lista nacional de notificação compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública nos serviços de saúde, públicos e privados, em todo o território nacional, as bactérias *Salmonella* spp., *S. aureus* e *E. coli* mostram-se como os principais agentes etiológicos mais associados aos surtos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

Estratégias para aplicação de biocontrole podem apresentar uma alternativa viável em relação a tratamentos antimicrobianos contra bactérias patogênicas e deteriorantes. Unidades processadoras de alimento normalmente dependem de aditivos químicos e tratamentos físicos, na maioria das vezes baseados em altas temperaturas, para garantir a segurança alimentar. Garantir a biossegurança de produtos minimamente processados e produtos que se assemelham ao produto *in natura* é um desafio para a indústria de alimentos, quando comparada a um produto normalmente processado (SCHARFF, 2011).

Os bacteriófagos são parasitas naturais das bactérias e são ubíquos no meio ambiente (ROHWER, 2002). Os bacteriófagos, também conhecidos como fagos, são vírus que infectam bactérias, mas são incapazes de infectar organismos superiores. Eles estão presentes em todos os ambientes que contêm bactérias, incluindo solo, água doce e salgada, e sedimentos. Eles também estão presentes em animais, incluindo os humanos, onde eles são um componente importante da microbiota intestinal. Eles não apresentam nenhum risco para a saúde de humanos, nem animais e plantas (NELSTROP, 1968; DABROWSKA, 2007). Os bacteriófagos são provavelmente os organismos mais abundantes do nosso planeta (FUHRMAN, 1999).

O uso de bacteriófagos como bactericidas, possui de certa forma uma desvantagem similar aos antibióticos, no sentido que, as bactérias podem se tornar resistentes aos fagos. Entretanto, ao contrário da resistência a antibióticos, a resistência

a fagos raramente é codificada em plasmídeos e, logo, muito mais difícil de ser transferida horizontalmente (LABRIE, 2010). O desenvolvimento da resistência contra bacteriófagos pode ser neutralizado com a utilização simultânea de múltiplos fagos (coquetel de fagos). Logo, essa estratégia pode servir como método para driblar o possível desenvolvimento de resistência contra um dado bacteriófago (KUNISAKI, 2010; CHADHA, 2016).

Os bacteriófagos têm algumas vantagens únicas quando comparados aos antibióticos e conservantes químicos em geral (KUTTER, 1997). Os fagos se replicam somente nas bactérias alvo, evitando um desequilíbrio na microbiota autóctone, diferentemente dos aditivos químicos, que tem um espectro de ação mais amplo. Os fagos se replicam onde a bactéria problema se encontra, logo, estão em maior concentração onde são mais necessários (SMITH, 1982). Além disso, eles se replicam somente enquanto o hospedeiro estiver presente, portanto, os fagos são naturalmente auto limitantes (CONNERTON, 2005).

Diferentemente dos agentes quimioterápicos, os bacteriófagos estão constantemente evoluindo para contornar as defesas de seus hospedeiros. Ainda assim, bactérias que apresentam resistência a fagos são normalmente menos virulentas ou menos aptas (perda de *fitness*) que seus congêneres sensíveis ao fago (SMITH, 1983; LABRIE, 2010). Mesmo que as altas taxas de evolução de ocorrência natural em bacteriófagos não forem suficientes, é também possível produzir fagos, os quais possuem variações em sua molécula receptora, de forma que, possam reconhecer versões mutadas dos receptores presentes nos hospedeiros (POUILLOT, 2010).

Praticamente qualquer estrutura na superfície da célula bacteriana pode ser um receptor para bacteriófagos e o reconhecimento do receptor presente na bactéria pelas proteínas do vírion determina a especificidade e o “host range” (amplitude de hospedeiro) do mesmo (HYMAN, 2010). Essas estruturas podem ser classificadas de acordo com suas características estruturais, e essas podem exercer diversas atividades, inclusive, agir como fatores de virulência (PROFT, 2009; BROWN, 2013). Logo, modificações nos receptores de bacteriófagos presentes na bactéria podem conferir resistência contra o fago para a mesma. Entretanto, essas modificações podem ocasionar em perda de *fitness* e virulência para a bactéria, quando comparadas com seus congêneres sensíveis ao fago (FRIMAN, 2011; LAANTO, 2012).

Alguns fagos T-even e alguns outros fagos com genomas de maior tamanho exibem a capacidade de ocasionar o fenômeno “Lysis from without” mediada por

víriões (LOv), essa capacidade não é muito difundida entre os fagos, sendo que a maioria não é capaz de ocasionar a “Lysis from without” (ABEDON, 1994).

A “Lysis from within” (LI) é a lise bacteriana induzida intracelularmente por proteínas do fago, é o que normalmente acontece ao final do ciclo lítico. Em contrapartida, A LOv não depende da infecção do fago, mas ao invés disso, é diretamente ocasionada por uma adsorção múltipla e simultânea, isto é, vários fagos se adsorvendo de uma só vez em uma única célula (YOUNG, 1992).

O fenômeno de LOv foi mais estudado em fagos T2 e T4 uma consequência da penetração do fago através do envelope celular bacteriano durante a adsorção. Essa penetração, em fagos T4, é afetada pela proteína gp5, a qual, é uma lisozima associada à cauda (ARISAKA, 2003). Quando poucos fagos adsorvem em uma única bactéria, o dano causado pela gp5 é relativamente leve e não causa uma lise bacteriana prematura. Entretanto, quando uma quantidade considerável de fagos adsorve simultaneamente, então pode ocorrer que o dano causado seja o suficiente para causar a lise da célula. Essa ruptura pode acontecer principalmente em “pontos fracos” do envelope bacteriano (TARAHOVSKY, 1994).

Bacteriófagos que possuem um alto *burst size* (isto é, produzem um elevado número de fagos por hospedeiro), e uma elevada virulência em um grande número de linhagens bacterianas, são mais indicados na criação de uma biblioteca de bacteriófagos, que possui por finalidade a fagoterapia. Selecionar fagos que possuem um amplo espectro de hospedeiro diminui a quantidade de fagos necessária na biblioteca, e em um coquetel de fagos aplicado no controle de uma determinada espécie (NILSSON, 2014).

Uma progênie elevada (alto *burst size*) aumenta a probabilidade de que os fagos vão infectar seu hospedeiro, o que é crucial para alcançar uma infecção produtiva, e obter os benefícios que os bacteriófagos têm em relação aos quimioterápicos. Em adição, caso os fagos consigam eliminar o hospedeiro mais rápido do que este é capaz de se replicar (eliminar completamente a população), um alto *burst size* também resulta em um menor risco de seleção de bactérias resistentes ao fago, já que um maior *burst size* resulta em uma maior taxa de colisão entre o fago e o hospedeiro (HYMAN, 2010).

O mercado global de antibióticos foi estimado em 39,6 bilhões de dólares em 2013 e deve chegar a 41,2 bilhões de dólares até 2018 (BCC, 2014). Nas últimas décadas, o aparecimento de micro-organismos multidroga resistentes tem sido uma ameaça crescente a saúde pública mundial. Em grande parte, devido a infecções causadas por bactérias que adquiriram resistência a antibióticos. Por serem resistentes às

drogas normalmente utilizadas, o tratamento de um paciente infectado por uma bactéria multidroga resistente, é mais custoso, difícil ou até mesmo impossível. O impacto em pacientes vulneráveis (crianças, idosos e imunossuprimidos) é maior, resultando em uma infecção prolongada e um aumento da taxa de mortalidade. As bactérias multidroga resistentes representam um problema mundial. Nos Estados Unidos foi estimada uma perda de 34 bilhões de dólares anuais, devido a infecções por micro-organismos multidroga resistentes (WHO, 2014).

Preocupações a respeito do uso de aditivos químicos na produção de alimentos levaram a União Europeia, no ano de 2005, a banir completamente os antibióticos na alimentação de animais como promotores de crescimento, ou qualquer outro objetivo não medicinal. Essa iniciativa teve como objetivo combater o surgimento de bactérias e outros micro-organismos, principalmente os zoonóticos, resistentes aos antibióticos, devido a sua utilização excessiva ou indevida (EU, 2005). Nos Estados Unidos, a “Food and Drug Administration” (FDA) tomou medidas semelhantes, retirando antibióticos da produção de aves (DIBNER, 2005, HSS, 2005). No Brasil o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), também, vem restringindo a utilização de antibióticos, tanto proibindo alguns em específico quanto diminuindo as doses permitidas e aumentando o tempo de carência, dos que ainda são permitidos, na alimentação animal (MAPA, 2006).

O banimento ou uma redução significativa no uso de antibióticos pode reduzir a qualidade, o rendimento, e a segurança microbiológica da produção de alimentos (SULAKVELIDZE, 2005). Da mesma forma, restrições em tratamentos químicos, tais como, o uso de cloro, podem aumentar o risco de contaminação por patógenos bacterianos, em unidades processadoras de alimentos.

Melhorias significativas em biossegurança na produção de alimentos são provavelmente muito caras e difíceis de manter (DAVIES, 2005), logo, existe uma demanda para o desenvolvimento de uma nova estratégia aceitável e rentável para prevenir contaminação e infecção por bactérias patogênicas na produção de alimentos (ATTERBURY, 2006). O tratamento com bacteriófagos é um possível método para alcançar esse objetivo, o qual tem ganhado atenção (SULAKVELIDZE, 2001).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O projeto propõe o estudo da diversidade bacteriana cultivável de um produto minimamente processado produzido na cidade de Viçosa-MG, empregando técnicas de cultivo e isolamento microbiano; e avaliar o impacto do coquetel de bacteriófagos desenvolvido nesse trabalho na cinética do crescimento desses isolados.

2.2. Objetivos Específicos

- Isolar bactérias do produto minimamente processado.
- Identificar presuntivamente esses isolados.
- Avaliar o perfil de resistência a antibióticos dos isolados bacterianos.
- Avaliar o impacto de um coquetel de bacteriófagos, em diferentes MOI, sobre a cinética de crescimento dos isolados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostragem da salada no pote

O presente trabalho avaliou a comunidade microbiana cultivável de uma salada no pote (*ready-to-eat* - RTE) produzida na cidade de Viçosa-MG. A salada RTE foi gentilmente cedida por um produtor da cidade de Viçosa. O RTE era composto de couve (*Brassica oleracea var. viridis*), couve-flor (*Brassica oleracea var. botrytis*), batata inglesa (*Solanum tuberosum*), brócolis (*Brassica oleracea var. itálica*), ovo de codorna (*Coturnix coturnix*), frango cozido desfiado (*Gallus gallus domesticus*) e uma pasta posicionada no fundo do pote. O pote de RTE foi obtido no terceiro dia após sua fabricação e analisado no mesmo dia. Antes da realização da análise microbiológica foi feita uma inspeção visual para analisar frescor, ausência de sinais de deterioração e contaminação física. A amostragem foi realizada primeiramente separando assepticamente cada componente do RTE em frascos esterilizados. Para a identificação das amostras do RTE foram utilizadas as siglas AL para couve, CO para couve-flor, BR para o brócolis, BA para batata, OV para o ovo de codorna e FR para o frango.

3.2. Isolamento, purificação e estocagem de linhagens bacterianas

O isolamento de bactérias do produto foi conduzido a partir dos componentes separados da amostra de RTE. Estas amostras foram misturadas em solução salina autoclavada (NaCl a 0,85%) por meio de agitação em “shaker” (120 rpm) a 25 °C durante 10 min, na proporção 10g do respectivo componente do RTE em 90 mL de solução salina a fim de desagregar células e partículas da matriz dos alimentos.

Em seguida foi utilizada uma alíquota de 100 µL do sobrenadante para a realização de diluições seriadas de 10^{-2} a 10^{-5} , transferindo sucessivamente 100 µL da suspensão de cada diluição para 900 µL de solução salina em microtubos de centrifuga, antecedendo entre uma diluição e outra, uma vigorosa agitação em agitador de tubos (vórtex). De cada diluição, alíquotas de 100 µL foram inoculadas em triplicatas em placas de Petri com meio de cultura ágar Lúria Bertani e homogeneizados com o auxílio de alça de Drigalski. O respectivo meio de cultura apresenta a seguinte constituição.

Meio Luria Bertani (LB): triptona, 10 g; Extrato de Levedura, 5,0 g; cloreto de sódio (NaCl), 10,0 g; água deionizada q.s.p. 1.000 mL. Depois de preparado, o meio teve pH ajustado para 7,0 (com NaOH 5N) a 25 °C e então autoclavado (a 121°C, 1 Kg.cm⁻²) durante 20 minutos (SAMBROOK, 2001).

As placas foram em seguida incubadas em B.O.D. a 37 °C até que o aparecimento de colônias pôde ser detectado (TSAVKELOVA et al., 2007). As colônias morfológicamente distintas (coloração, formato da borda, aparência seca ou gomosa, velocidade de crescimento/tamanho da colônia) foram coletadas e purificadas por meio de estrias inoculadas em meio LB (repetidas por três vezes consecutivas para certificação de colônias isoladas, estriadas e inoculadas novamente neste meio por três vezes para confirmação da pureza do isolado). Em seguida, as linhagens bacterianas purificadas foram criopreservadas para a manutenção de suas características genéticas e viabilidade, sendo para tanto transferidas para meio LB líquido suplementado em 25% de glicerol e armazenadas em ultrafreezer a - 85°C (CATTELAN e GRASSANO, 2007).

3.3. Identificação presuntiva em CHROMagar

O CHROMagar é um meio diferencial que faz uso de substratos cromogênicos que revelam vias metabólicas e enzimas das bactérias testadas. O meio utilizado é da marca CHROMagar™ (Kasvi). O meio foi preparado de acordo com as recomendações do fabricante e tem a seguinte composição: CHROMagar: peptona e de extrato de

levedura, 17g; ágar, 15,0 g; mistura cromogênica, 1,0 g; água deionizada q.s.p. 1.000 mL.

Uma colônia (estriada em LB) recente de cada um dos isolados bacterianos obtidos nesse trabalho foram ativados em caldo Luria Bertani a 37 °C overnight, para que então uma estria composta fosse feita em uma placa de Petri contendo CHROMagar. As placas foram incubadas a 37 °C por 18 a 20 horas e então lidas. Os isolados foram presuntivamente identificados, tendo como base as características morfológicas (cor e tamanho) das colônias de acordo com o fabricante.

3.4. Antibiograma

3.4.1. Meio de cultura

O meio Mueller Hinton é padrão para a realização de antibiogramas, este é apropriado para o crescimento da grande maioria dos microrganismos aeróbicos. O meio utilizado era da marca HiMedia e foi preparado de acordo com as indicações do fabricante. O meio tem a seguinte composição:

Meio Mueller Hinton: Infusão de carne, 2,0 g; hidrolisado ácido de caseína, 17,5 g; amido, 1,5 g; ágar, 17,0 g; água deionizada q.s.p. 1.000 mL.

3.4.2. Preparo do inóculo

Uma colônia de cada isolado foi transferida do meio primário (LB - onde os isolados foram obtidos), para um tubo de ensaio com caldo Brain Heart Infusion (B.H.I), onde foram incubadas a 37 °C por 2 a 5 horas. Depois desse tempo a DO₆₀₀ foi medida (em aparelho espectrofotômetro da marca Bel modelo SF325NM) e ajustada para o valor 0,1 (\pm 0,02). Caso o valor estivesse abaixo do desejado, o tubo voltava para incubadora por mais 1 hora e então a leitura era refeita (quando necessário, o processo era repetido) e a DO₆₀₀ ajustada.

3.4.3. Inoculação na placa de Petri

A suspensão bacteriana anteriormente preparada foi homogeneizada e transferida de forma homogênea para a placa de Petri contendo o meio Mueller Hinton com o auxílio de um “swab” esterilizado, de forma a cobrir toda a superfície da placa. Após a inoculação as placas foram deixadas entreabertas dentro do fluxo laminar por 15 minutos, afim de que toda umidade presente na superfície do ágar fosse absorvida, antes da aplicação dos discos impregnados com antibiótico.

3.4.4. Aplicação dos discos de antibiótico e incubação

Os discos foram aplicados sobre as placas de Petri (contendo o meio Mueller Hinton e o inóculo), com o auxílio de pinças flambadas e resfriadas. Os discos foram pressionados gentilmente sobre a superfície do ágar. O espaço entre os discos não era menor do que 24 mm, a distância da borda da placa era de no mínimo 10 mm e a distância entre o centro de um disco e outro era de pelo menos 30 mm. As placas foram então incubadas em posição inversa (de cabeça para baixo) em uma incubadora B.O.D a 37 °C por 18 a 24 horas.

O diâmetro da zona de inibição foi lido pelo lado de baixo com o auxílio de régua. As zonas de inibição foram avaliadas de acordo com a tabela fornecida pelo fabricante dos discos (Diagnósticos Microbiológicos Especializados - DME).

O teste de susceptibilidade a antibióticos foi realizado de acordo com o fabricante dos discos, e foram utilizados os seguintes (19) discos antimicrobianos: Amoxicilina 30µg (AMC 30), Ampicilina 10µg (AMP 10), Cefalotina 30µg (CFL 30), Ciprofloxacina (CIP05), Clindamicina 200µg (CLI 02), Clorafenicol 30µg (CLO 30), Eritromicina 15µg (ERI 15), Gentamicina 10µg (GEN 10), Oxacilina 100µg (OXA 01), Cefoxitina 30µg (CFO 30), Penicilina 10µg (PEN 10), Rifampicina 500µg (RIF 05), Sulfazotrim (Sulfametoxazol + Trimetoprin) 25µg (SUT 25), Tetraciclina 30µg (TET 30), Vancomicina 30µg (VAN30), Aztreoman 30µg (ATM 30), Ceftazidima 30µg (CAZ 30), Cefepime 30µg (CPM 30), Piperacilina/Tazobactam (PIT 110).

3.5. Extração de DNA bacteriano

O DNA (total – DNA genômico/gDNA) bacteriano foi obtido pela técnica descrita por Pospiech e Neumann (1995), com modificações. Sucintamente, 5 mL de suspensão bacteriana na densidade óptica (DO₆₀₀) igual a 0,7 foi centrifugada a 4000xg por 20 minutos, o sobrenadante descartado e o precipitado suspenso em 500 µL de tampão SET (20 mM Tris, NaCl 75 mM, EDTA 25 mM). À suspensão bacteriana em tampão SET foi adicionada lisozima na concentração final de 1 mg/mL e incubada a 37 °C por 30 minutos. Após o período de incubação foi adicionado SDS e proteinase K nas concentrações finais de 1% e 0,5mg/mL, respectivamente, e incubados novamente por 1 hora a 55°C. Após este período foram adicionados à suspensão bacteriana NaCl na concentração final de 1M e igual volume de clorofórmio, homogeneizado por 30 minutos à temperatura ambiente e então centrifugado por 10 minutos a 4.000xg a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL e a ele adicionado igual

volume de isopropanol. A mistura foi incubada por 2 horas a -20 °C, e após este tempo centrifugado por 10 minutos 12.000xg. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado 2x com etanol 70% gelado (-12 °C). O DNA foi suspenso em 50 µL de água DNase “free”. Após a extração, a concentração de DNA obtido de cada isolado foi mensurada em aparelho nanodrop da marca Thermo Scientific modelo 2000 UV-Vis Spectrophotometer.

3.5.1. Preparo dos agrupamentos de DNA e sequenciamento

Após a extração de DNA, os gDNAs foram separados em sete grupos, um grupo para cada componente da salada no pote (cada isolado é proveniente de um desses componentes). A concentração de DNA dos isolados foi ajustada para 20 ng/µL e então um mix referente a cada componente foi montado. A montagem foi feita adicionando igual volume e concentração de gDNA de todos os isolados de um dado componente do RTE em uma única solução (gDNA/ água DNase “free”). Esses mix contendo os gDNAs de todos os isolados respectivos de cada componente foram sequenciados através da plataforma Miseq-Illumina sequencer pela empresa Argonne (EUA). Para o sequenciamento foram utilizados 500 ng de DNA liofilizado (de cada mix).

A triagem dos dados de sequências e análise da diversidade microbiana foram realizadas nas plataformas BMP (Brazilian Microbiome Project) (PYLRO et al., 2014) e QUIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) (CAPORASO et al., 2010), e o banco de dados utilizado foi o do Green Genes (DESANTIS et al., 2006).

3.6. Bacteriófagos

Todos os bacteriófagos (líticos), e as bactérias utilizadas na propagação e titulação viral, utilizados nesse trabalho faziam parte da biblioteca de bacteriófagos e bactérias do Laboratório de Imunovirologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa.

Foram utilizados na realização dos experimentos seis bacteriófagos isolados de *Escherichia coli* e 6 bacteriófagos isolados de *Staphylococcus aureus*. Os fagos de *E. coli* utilizados foram estes: Ecophage 5, Ecophage 6, Ecophage 7, Ecophage 8, Ecophage 9 e Ecophage 10. Os fagos de *S. aureus* utilizados foram estes: Aurophage 2, Aurophage 4, Aurophage 6, Aurophage 7, Aurophage 9 e Aurophage 11.

3.6.1. Propagação viral

Culturas bacterianas foram estriadas em ágar LB e incubadas “overnight” a 37 °C. Essas culturas recentes foram cultivadas em 15 mL de meio LB até atingirem DO₆₀₀ igual a 0,7. Foi adicionada a esta suspensão bacteriana uma placa de lise (cortada do ágar) e em seguida incubada por 12 horas, a 37°C. Após o período de incubação foi adicionado igual volume do meio LB esterilizado e incubado novamente nas mesmas condições. Em seguida foi acrescentado clorofórmio 10% (v/v) e NaCl na concentração final de 1M, com o objetivo de romper as células bacterianas e dissociar os fagos dos “debris” celulares. As suspensões foram homogeneizadas e mantidas a 4°C por 1 hora, seguido por centrifugação a 5000xg, por 20 minutos a 4°C, para sedimentação de restos celulares e separação de fases. A fase aquosa foi cuidadosamente recolhida e transferida para tubos esterilizados, sendo armazenados a 4°C. As amostras foram plaqueadas em seguida para avaliação do sucesso da técnica e viabilidade dos fagos (ELLER et al., 2012).

3.6.2. Titulação viral

A titulação dos fagos líticos foi realizada pelo método de dupla camada em ágar (SAMBROOK & RUSSELL, 2001), utilizando as bactérias empregadas no isolamento dos respectivos fagos, em meio LB. As placas foram incubadas a 37 °C e as placas de lise formadas na camada superior foram contadas.

3.6.3. Montagem do coquetel de bacteriófagos

Com o conhecimento do Título da suspensão cada um dos bacteriófagos, um mix contendo todos os bacteriófagos em igual concentração foi montado com o título de $1,0 \times 10^7$ UFP/mL.

3.6.4. Purificação do coquetel de bacteriófagos

Para avaliar o impacto dos bacteriófagos na cinética de crescimento dos isolados testados, foi preciso separar os fagos dos “debris” celulares de seus hospedeiros. Para tal fim foi utilizada cromatografia líquida de alta afinidade. O aparelho cromatógrafo utilizado foi o AKTA Prime da marca GE Healthcare Life Sciences (Pennsylvania, USA).

O coquetel de bacteriófagos passou por um sistema “desalting” (dessalinização), um “anion exchange” (troca aniônica) e por fim outra “desalting”. A aplicação da

amostra no cromatógrafo foi feita de acordo com o fabricante, tanto nos volumes aplicados quanto nos tampões utilizados.

Como controle da purificação e para mostrar que algum possível resíduo de clorofórmio, NaCl ou “debris” celulares do hospedeiro não fosse influenciar nas curvas de crescimento, uma suspensão do hospedeiro de cada fago sem adição do mesmo passou pelos mesmos processos que os fagos passaram (propagação sem adição do fago e purificação em HPLC. Esse controle foi montado utilizando as mesmas proporções da montagem do coquetel de fagos. Esse controle foi um dos tratamentos utilizados na curva de crescimento, e está identificado como controle negativo.

3.7. Curvas de crescimento de densidade óptica

Para avaliar os efeitos de diferentes doses do coquetel de bacteriófago sobre o crescimento dos isolados testados, curvas de crescimento de densidade óptica medida a 600 nm (OD_{600}) foram gerados para cada isolado bacteriano. Uma cultura de cada isolado do RTE foi cultivada até uma DO_{600} de $0,3(\sim 1 \times 10^8 \text{ ufc/mL})$ em LB (PORTER, 2015).

A cultura foi diluída em meio LB a cerca de $1 \times 10^6 \text{ UFC/ml}$, e uma alíquota de $0,10 \mu\text{L}$ foi adicionada a uma placa de 96 poços previamente preparada com $10 \mu\text{L}$ de fagos a concentrações que alcançaram uma multiplicidade de infecção (MOI) de 1, 10, e 100. A DO_{600} foi medida a cada 15 minutos durante 24 horas. Os tratamentos testados foram, Controle do isolado, Controle negativo (previamente explicado), MOI 100, 10 e 1. As curvas foram montadas em placas de 96 poços e lidas em um aparelho Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer da Thermo Scientific™. Todos os testes foram realizados em triplicado e repetidos por duas vezes.

3.8. Análise estatística

Para analisar o efeito dos diferentes MOI do coquetel de bacteriófagos sobre o crescimento dos isolados testados, os dados foram submetidos a análise de variância e as médias foram comparadas por teste Tukey (com intervalo de 95% de confiança). Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo programa GENES.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Isolamento de bactérias a partir dos componentes do RTE

Nesse trabalho foram isoladas bactérias de uma Salada no pote produzida em Viçosa-MG. Foi obtido ao todo 213 isolados bacterianos, sendo 51 isolados provenientes do brócolis, 43 isolados da couve, 22 da batata, 17 da couve-flor, 32 do ovo de codorna, 25 do frango e 23 da pasta.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), parte considerável dos surtos de origem alimentar estão estreitamente associados a eventos de contaminação cruzada envolvendo práticas de higiene deficientes, equipamentos contaminados, contaminação por manipuladores de alimentos, processamento ou armazenamento inadequado. A identificação das fontes da contaminação normalmente não é possível, pois dados precisos são difíceis de serem obtidos dos governos, indústrias e também investigações incompletas (WHO, 2001).

A Resolução-RDC Nº 12, DE 02 DE JANEIRO DE 2001 estipula para hortaliças e legumes a ausência de salmonela sp. e contagem de coliformes não superiores a 2×10^2 UFC/g (BRASIL, 2001).

4.2. Identificação presuntiva em CHROMagar versus sequenciamento Illumina miseq

Todos os 213 isolados obtidos foram presuntivamente identificados através das características morfológicas de suas colônias em CHROMagar. Todos os Microrganismos testados cresceram em placas de Petri contendo CHROMagar, incubadas a 37 °C por 18 a 20 horas. O resultado é mostrado na Tabela 01.

A figura 01 mostra a porcentagem total de todos os isolados do RTE, identificados presuntivamente em CHROMagar. Foi observada uma maior incidência de isolados identificados como *Enterococcus faecalis* (49% - 105 dos 213 isolados). Os isolados identificados como *Klebsiella pneumoniae* e coliformes foram os segundos mais incidentes, representando respectivamente 18% e 17% dos isolados. Apenas três colônias da amostra de couve (AL) apresentaram coloração amarela em meio CHROMagar, que indicam possíveis *Staphylococcus aureus* (os isolados AL04, AL05 e AL06).

Na identificação presuntiva, 105 isolados foram classificados como *E. faecalis*, entretanto, no sequenciamento, a nível de gênero, não houve a incidência de nenhum *Enterococcus*.

Tabela 01: Número de isolados presuntivamente identificados em CHROMagar dos componentes do RTE.

	BR	AL	OV	CO	BA	PA	FR	Total
<i>Enterococcus faecalis</i>	32	26	5	9	10	9	14	105
Coliformes	7	-	2	8	5	8	7	37
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	4	20	-	7	5	-	38
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9	2	-	-	-	-	-	11
* <i>Proteus - Morganella-Providência</i>	1	1	3	-	-	4	2	11
<i>Escherichia coli</i>	-	6	2	-	-	-	2	10
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	3	-	-	-	-	-	3

*Colônias marrom claro podem ser do gênero *Proteus*, *Morganella* ou *Providência*.

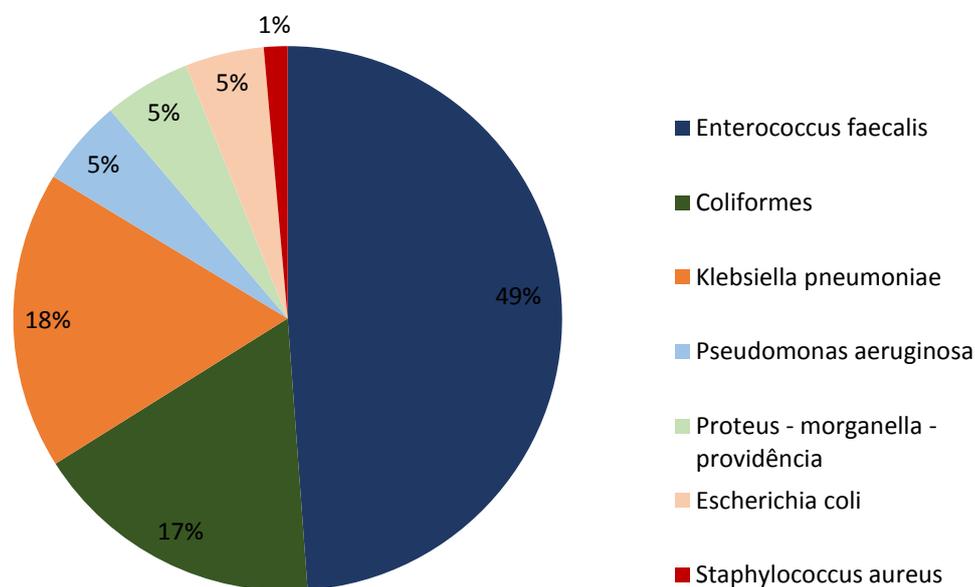


Figura01. Distribuição em porcentagem de todos os isolados obtidos do RTE, identificados em CHROMagar.

Os Coliformes são um grupo de gêneros de bactérias (*Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Hafnia*) que são comumente utilizados como indicadores (de

contaminação fecal recente) de qualidade sanitária de alimentos e de água (GLEESON e GRAY, 2002). Em 2004 nos EUA, *Enterococci* sp. passou a ser utilizado como indicador de qualidade sanitária de praias públicas de água salgada e doce (USA, 2004), por apresentar uma maior correlação com muitos patógenos humanos do que os coliformes (GUANG, 2004).

Os componentes couve-flor, bata, brócolis, frango e ovo de codorna do RTE passam por tratamento térmico, o que pode ser a causa do menor número de colônias diferentes obtidas pelo plaqueamento em CHROMagar, quando comparado com o brócolis e a couve.

De acordo com a identificação em CHROMagar 65% dos isolados foram classificados como pertencentes a família *Enterobacteriaceae*, mas segundo o resultado do sequenciamento (illumina miseq), 47% das “reads” que foram identificadas a nível de família faziam parte dessa família. A família *Enterobacteriaceae* é um grande grupo de bactérias Gram-negativas, que incluem muitos patógenos humanos como: *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Yersinia*, *Klebsiella*, *Shigella*, *Proteus*, *Serratia*, *Enterobacter* e *Citrobacter* (BRENNER, 2005). Todos esses patógenos citados estavam presentes na amostra (tabelas suplementares de 8 a 13).

Um trabalho experimentou 1.478 isolados (*Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella*, *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp., *Escherichia coli*, *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp.) em CHROMagar apenas pela cor e morfologia das colônias, e obteve uma acurácia de 60% (MERLINO, 1996).

Em 2016, a presença de *Escherichia coli* e *Salmonella* sp. foi avaliada na água do rio Lich que fica no Vietnã, e contagens de $5,6 \times 10^7$ e $4,2 \times 10^6$, respectivamente, foram encontradas (FUHRMANN, 2016). No Brasil 62% dos esgotos (que são despejados no rio) não são tratados (SNIS, 2014) e apesar dos riscos de transmissão de uma série de doenças ao consumidor, águas contaminadas, principalmente por esgotos sanitários, têm sido usadas para a irrigação de diferentes espécies vegetais sem qualquer tratamento prévio adequado (EMBRAPA, 2014). Uma possível razão para o filo proteobacteria ser o mais abundante na amostra de RTE, é que ele é o filo mais abundante em vários tipos de solos (MENDES, 2015; NAVARRETE, 2015). Também pela família *Enterobacteriaceae* fazer parte desse filo, e solos para plantação receberem adubo orgânico (MORETTI, 2007) e muitas vezes serem irrigados com água não tratada (EMBRAPA, 2014).

A figura 02 mostra a porcentagem dos isolados presuntivamente identificados em cada componente do RTE. Os componentes couve-flor, bata, frango e ovo de codorna do RTE passam por um tratamento térmico, o que pode ser a causa do menor número de colônias diferentes obtidas pelo plaqueamento em CHROMagar, quando comparado com o brócolis e a couve. A amostra de couve-flor analisada foi a que obteve menor diversidade bacteriana, apresentando somente o gênero *Enterococcus* e bactérias do grupo dos coliformes. A amostra de couve foi a que apresentou maior diversidade bacteriana, e é a única amostra que passou por um tratamento térmico. Microorganismos encontrados nas outras amostras podem ter sido na verdade contaminação cruzada proveniente da couve. O frango, a batata e o ovo passam por um tratamento térmico drástico durante a fabricação do RTE, logo toda ou grande parte da contaminação encontrada nesses componentes provavelmente é proveniente dos outros componentes que entraram em contato com eles e/ou do manipulador, utensílios e água utilizada na unidade processadora.

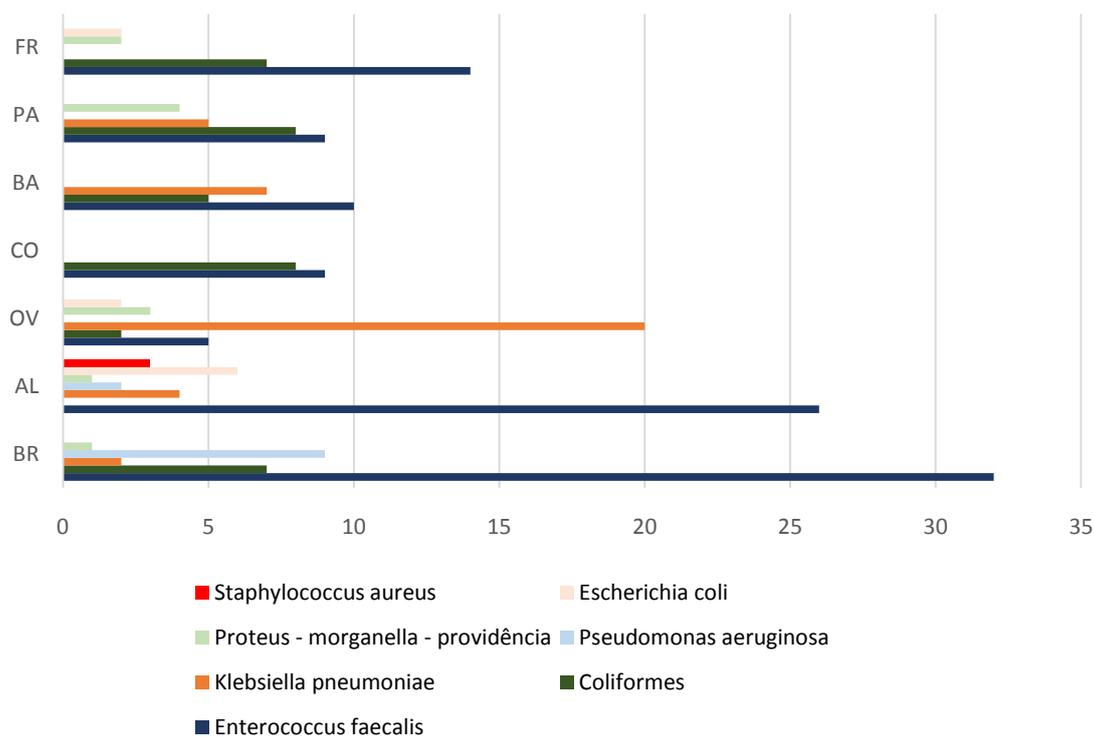


Figura 02. Porcentagem dos isolados de cada componente, identificados presuntivamente em CHROMagar.

4.3. Diversidade Microbiana

Através do sequenciamento de amplicons do gene rRNA 16S foram obtidos dados de sequências gênicas que nos permitiram a análise de diversidade bacteriana cultivável dos componentes do RTE. Ao todo foram obtidas 27735 “reads”, das quais 64 % foram do filo Proteobactéria, 31,5 % do filo Firmicutes, 4,0 % do filo actinobacteria e 0,5 % todos outros filios. Os filios Proteobactéria, Firmicutes e Actinobacteria representam 99,5 % das “reads”, enquanto os outros 12 filios representam apenas 0,5% (Figura 03).

Distribuição das Reads entre os filios

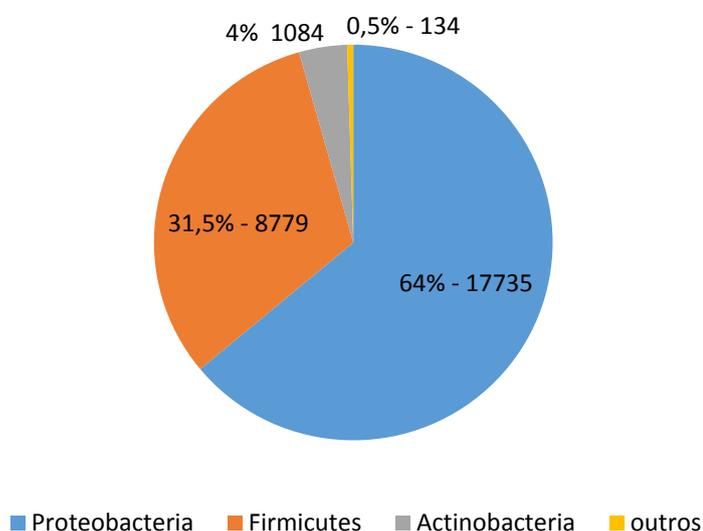
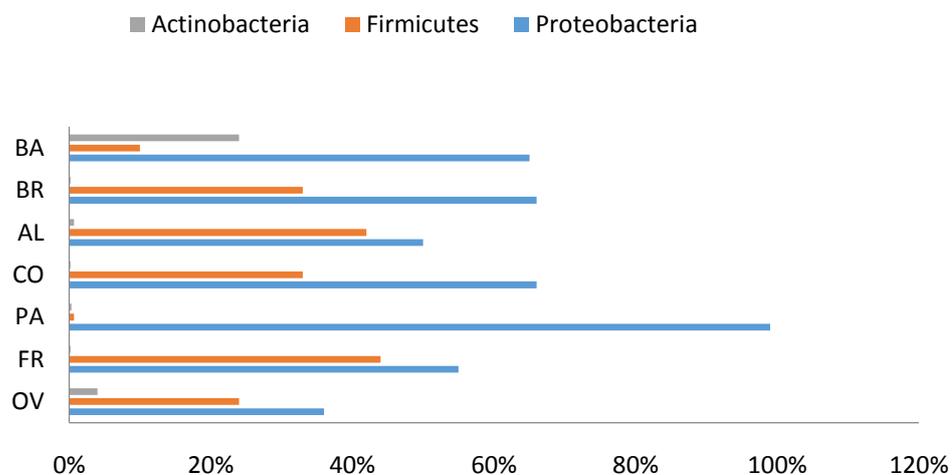


Figura 03. Gráfico de pizza mostrando a proporção dos filios no total de “reads”.

Os filios mais abundantes nas amostras foram os mesmos, entretanto se diferenciaram nos valores de abundância (Figura 04). O filo Proteobacteria apresentou maior abundância em todas as amostras, seguido pelo filo Firmicutes. Na amostra OV houve uma incidência do filo Acidobacteria de 20%, diferente das outras amostras onde a incidência é menor do que 1%. É possível ver a distribuição dos principais Filios entre as amostras na Figura 04.

Filos de maior incidência



	OV	FR	PA	CO	AL	BR	BA
■ Actinobacteria	4%	0,20%	0,30%	0,20%	0,70%	0,20%	24%
■ Firmicutes	24%	44%	0,70%	33%	42%	33%	10%
■ Proteobacteria	36%	55%	99%	66%	50%	66%	65%

Figura 04. Abundância em porcentagem absoluta dos principais Filos do Domínio Bacteria das amostras.

4.4. Diagrama de Venn

Através da comparação das amostras do RTE pelo diagrama de *Venn*, conseguimos observar a ocorrência de grupos compartilhados e específicos por todos os componentes do RTE amostras (Figura 05). Nessa etapa as amostras FR, BA e OV foram agrupadas e analisadas como um único grupo, devido ao tratamento térmico que elas sofrem no preparo do RTE e a semelhança no perfil de filos presentes nessas amostras.

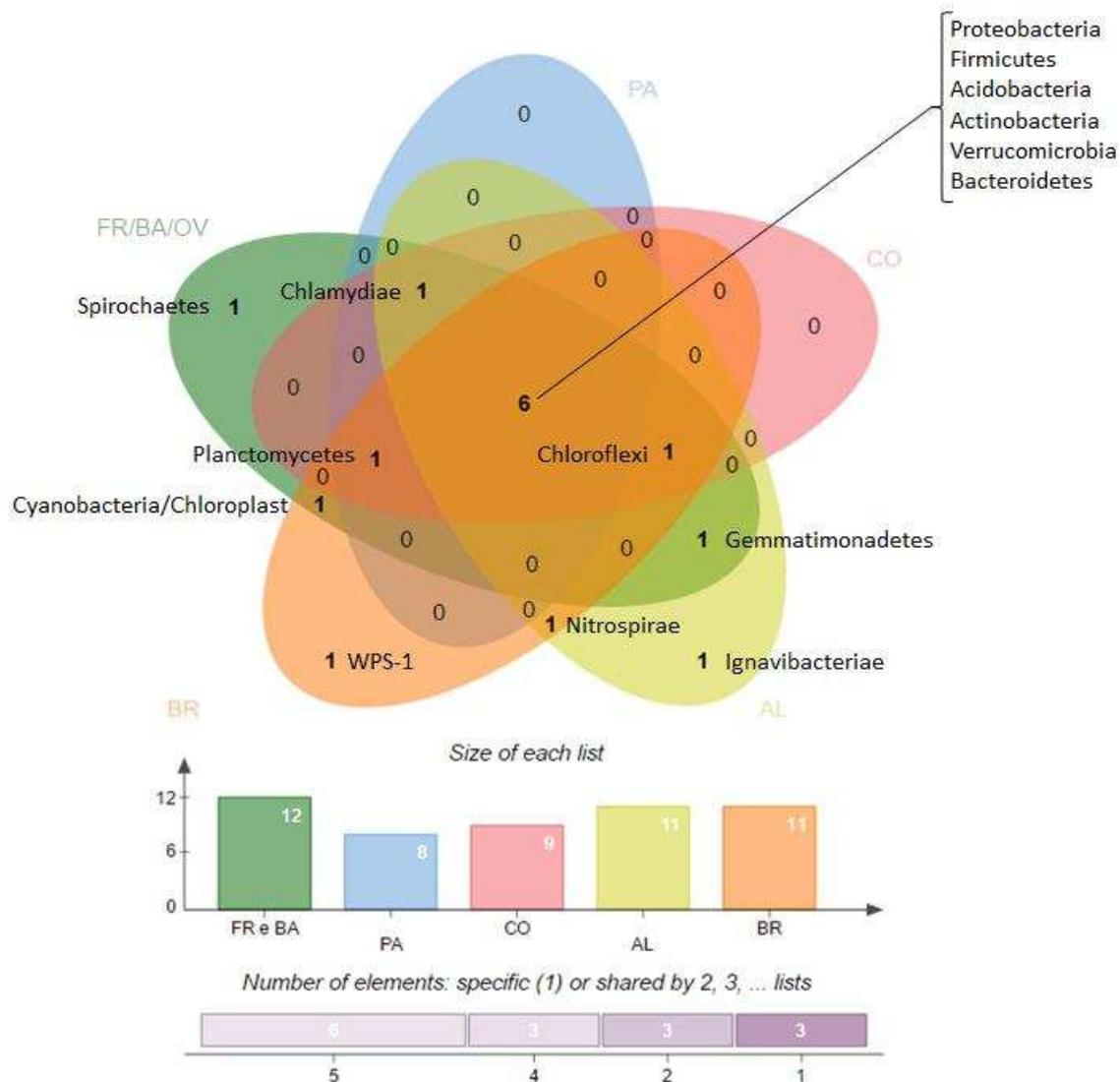


Figura 05. Diagrama de *Venn* mostrando a proporção de filós compartilhados e específicos entre as amostras do RTE. O filo espiroqueta só foi encontrado na amostra FR. O filo WPS-1 só foi encontrado na amostra BR. O filo Ignavibacteriae (Chlorobi) foi encontrado somente na amostra AL. O filo Chlamydiae foi encontrado nas amostras FR e BA, PA, CO e AL. O filo Cyanobacteria/Chloroplast estava presente nas amostras FR e BA BR. O filo Gemmatimonadetes foi encontrado nas amostras FR/BA e AL. O filo Nitrospirae foi encontrado nas amostras AL e BR. Common elements in FR e BA CO AL BR. O filo Planctomycetes foi encontrado nas amostras FR e BA, PA e CO BR. O filo Chloroflexi foi encontrado nas amostras FR e BA, CO, AL e BR. O filo Chlamydiae foi encontrado nas amostras FR/BA, PA, CO e AL. Os filós Proteobacteria, Firmicutes, Acidobacteria, Actinobacteria, Verrucomicrobia, Bacteroidetes foram encontrados em todas as amostras.

4.5. Antibiograma

Para a realização das etapas seguintes a identificação presuntiva em CHROMagar, foram selecionados 43 isolados que representassem as amostras, esses isolados foram selecionados de acordo com a morfologia de suas colônias. Esses isolados bacterianos foram testados contra 19 antibióticos, o resultado é mostrado nas tabelas 2 a 7.

Tabela 02. Resultado do antibiograma realizado com os isolados bacterianos que foram previamente identificadas como *Enterococcus faecalis*.

	CO1	CO10	BA15	BA21	BR03	BR12	FR14	OV19
AMC30	R	R	R	S	R	I	R	I
AMP10	R	R	R	S	S	R	R	R
CFL30	R	R	R	S	R	S	R	S
CIP05	S	S	S	S	I	S	S	I
CLI02	R	R	R	I	S	R	R	R
CLO30	S	S	R	S	S	S	S	S
ERI15	R	R	R	S	S	R	R	R
GEN10	R	S	I	S	S	S	I	S
OXA01	R	R	R	S	R	R	R	R
CFO30	R	R	R	S	R	S	R	S
PEN10	R	R	R	S	S	R	R	R
RIF05	R	R	R	S	R	R	R	R
SUT25	S	S	S	S	S	S	R	S
TET30	S	S	R	R	S	S	S	S
VAN30	R	R	R	S	I	R	R	R
ATM30	S	S	S	R	R	S	S	S
CAZ30	S	S	S	R	R	S	S	S
CPM30	S	S	S	R	S	S	S	S
PIT110	S	S	S	S	S	S	S	S

*I - resistência intermediária.

Tabela 03. Resultado do antibiograma realizado com os isolados bacterianos que foram previamente identificadas como espécies do grupo coliformes.

	CO4	CO16	BA02	FR04	PA18	PA23	BR33	BR39
AMC30	R	R	R	S	R	R	R	R
AMP10	R	R	R	S	R	R	R	R
CFL30	R	R	R	S	R	R	R	R
CIP05	S	S	S	R	S	S	S	S
CLI02	R	R	S	S	R	R	R	R
CLO30	S	S	S	S	S	R	S	S
ERI15	R	R	R	S	R	R	R	R
GEN10	S	S	S	S	I	S	S	S
OXA01	R	R	R	S	R	R	R	R
CFO30	R	R	R	I	R	R	R	R
PEN10	R	R	R	S	R	R	R	R
RIF05	R	R	S	S	R	R	R	R
SUT25	S	S	S	R	R	S	S	S
TET30	S	S	S	S	S	S	S	R
VAN30	R	R	S	S	R	R	R	R
ATM30	S	S	R	R	S	S	S	S
CAZ30	S	S	R	R	S	R	S	S
CPM30	S	S	R	S	S	S	S	S
PIT110	S	S	S	S	S	S	S	S

*I - resistência intermediária.

Tabela 04. Resultado do antibiograma realizado com os isolados bacterianos que foram previamente identificadas como *Escherichia coli*.

	AL07	AL08	AL09	AL11	AL12	FR01
AMC30	R	R	R	R	R	R
AMP10	S	R	R	R	R	R
CFL30	R	R	R	R	R	S
CIP05	S	S	S	S	S	S
CLI02	R	R	R	R	R	R
CLO30	R	R	R	S	R	I
ERI15	S	S	R	R	R	R
GEN10	S	S	S	S	S	S
OXA01	R	R	R	R	R	R
CFO30	I	I	R	I	S	R
PEN10	R	R	R	R	R	R
RIF05	R	R	R	R	R	R
SUT25	S	I	S	S	S	S
TET30	R	R	R	R	R	R
VAN30	R	R	R	R	R	R
ATM30	S	S	S	S	S	S
CAZ30	S	S	S	S	S	S
CPM30	S	S	S	S	S	S
PIT110	S	S	S	S	S	S

*I - resistência intermediária.

Tabela 05. Resultado do antibiograma realizado com os isolados bacterianos que foram previamente identificadas como *Klebsiella pneumoniae*.

	AL13	AL14	AL15	BA08	BA12	PA13	PA15	OV01	OV04	BR41
AMC30	S	R	S	S	I	R	R	R	R	R
AMP10	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
CFL30	S	R	S	S	S	R	R	R	R	S
CIP05	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S
CLI02	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
CLO30	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
ERI15	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
GEN10	R	R	R	S	R	R	I	I	S	S
OXA01	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
CFO30	S	I	S	S	S	S	R	S	S	S
PEN10	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
RIF05	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
SUT25	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S
TET30	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S
VAN30	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
ATM30	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CAZ30	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CPM30	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
PIT110	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S

*I - resistência intermediária.

Tabela 06. Resultado do antibiograma realizado com os isolados bacterianos que foram previamente identificadas como *Proteus*, *Morganella* ou *Providência*.

	AL01	AL43	PA09	PA10	BR47	FR25	OV30
AMC30	R	R	R	R	R	R	S
AMP10	R	R	R	R	R	R	S
CFL30	R	R	R	R	S	R	S
CIP05	S	S	R	S	R	S	S
CLI02	R	R	R	R	R	R	S
CLO30	S	S	R	R	R	I	S
ERI15	R	R	R	R	R	R	S
GEN10	R	S	R	S	R	S	R
OXA01	R	R	R	R	R	R	R
CFO30	R	I	R	R	R	R	R
PEN10	R	R	R	R	R	R	S
RIF05	R	R	R	R	R	R	S
SUT25	S	I	I	S	S	S	S
TET30	R	R	I	S	R	R	S
VAN30	R	R	R	R	R	R	R
ATM30	S	S	R	R	S	S	R
CAZ30	S	S	R	R	S	S	R
CPM30	S	S	S	R	S	S	I
PIT110	S	S	S	S	S	S	S

*I - resistência intermediária.

Tabela 07. Resultado do antibiograma realizado com os isolados bacterianos que foram previamente identificadas como *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

	<i>S. aureus</i> AL04	<i>S. aureus</i> AL06	<i>P. aeruginosa</i> AL02	<i>P. aeruginosa</i> AL03
AMC30	R	R	R	R
AMP10	S	S	R	R
CFL30	R	R	R	R
CIP05	S	S	S	S
CLI02	S	S	R	R
CLO30	R	R	S	S
ERI15	S	S	R	R
GEN10	R	E	S	S
OXA01	S	S	R	R
CFO30	S	S	R	R
PEN10	R	R	R	R
RIF05	R	R	R	R
SUT25	I	I	S	S
TET30	S	S	R	R
VAN30	R	R	R	R
ATM30	S	S	S	R
CAZ30	S	S	R	S
CPM30	S	S	S	S
PIT110	S	S	R	S

*I - resistência intermediária.

As Figuras de 06 a 12 mostram a porcentagem de resistência aos antibióticos apresentada pelos 43 isolados testados. Foi observado que os antibióticos Oxacilina (OXA 01), Penicilina (PEN 10), Rifampicina (RIF 05) e Vancomicina foram os menos eficientes, uma vez que 93% dos isolados testados foram resistentes.

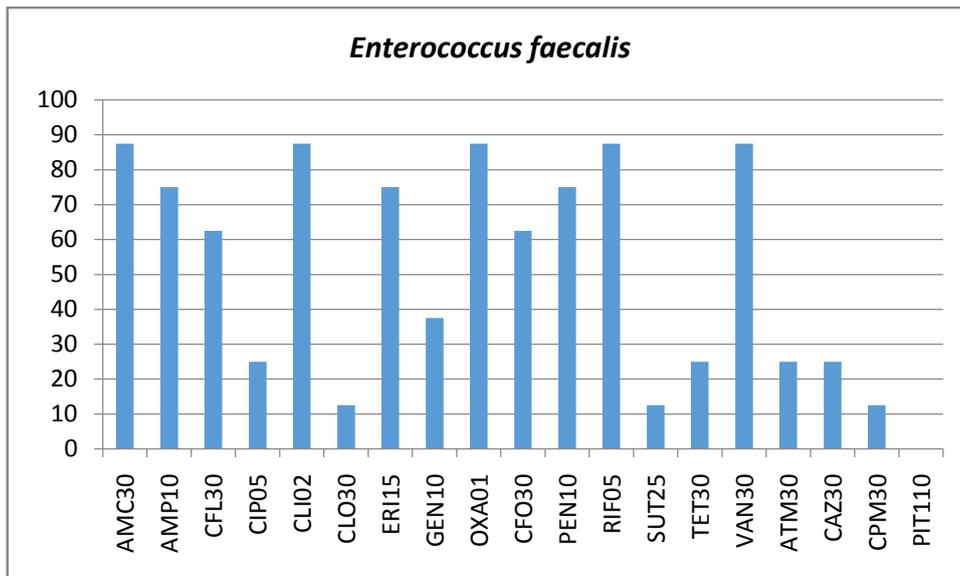


Figura 06. Porcentagem de resistência a antibióticos dos isolados bacterianos presuntivamente identificados como *Enterococcus faecalis* em CHROMAgar.

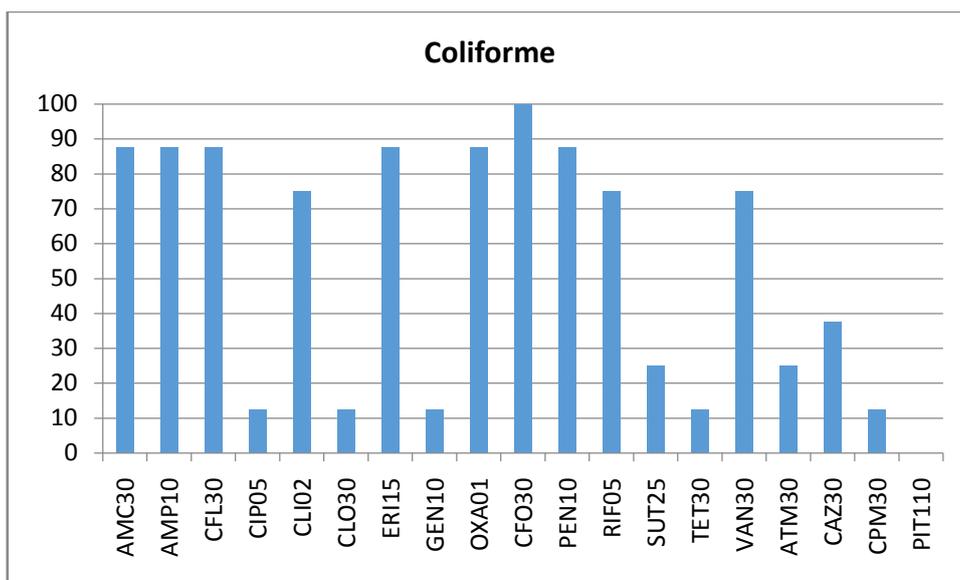


Figura 07. Porcentagem de resistência a antibióticos dos isolados bacterianos presuntivamente identificados como coliformes em CHROMAgar.

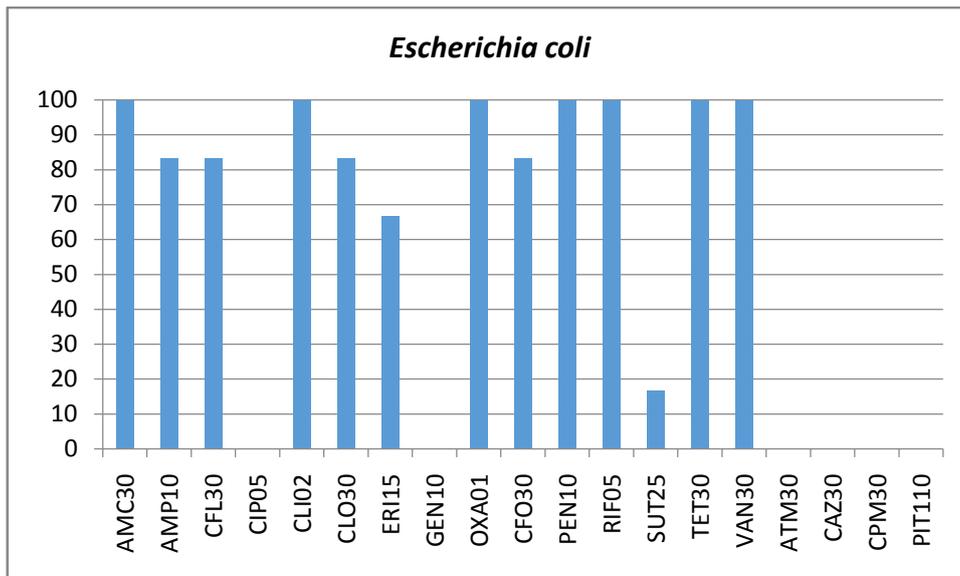


Figura 08. Porcentagem de resistência a antibióticos dos isolados bacterianos presuntivamente identificados como *Escherichia coli* em CHROMAger.

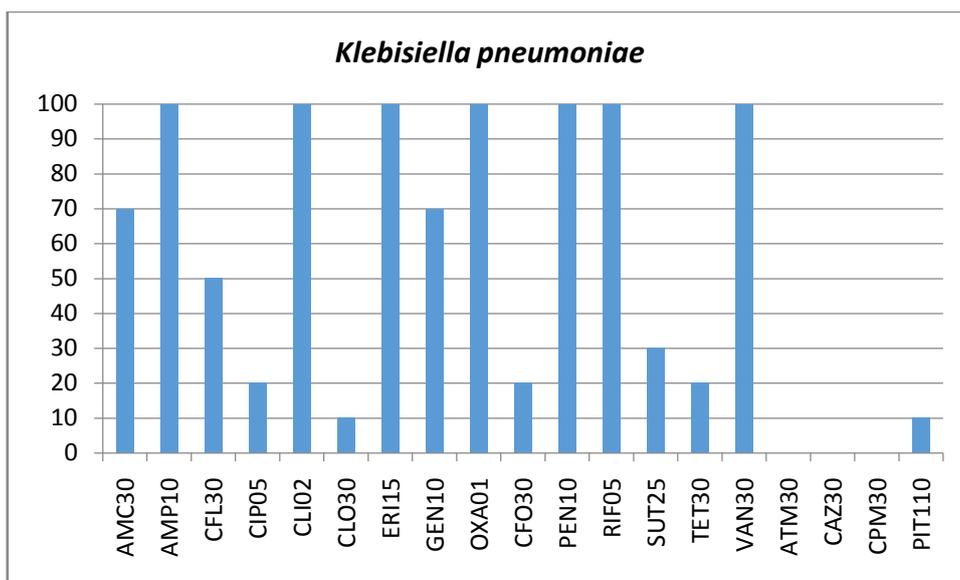


Figura 09. Porcentagem de resistência a antibióticos dos isolados bacterianos presuntivamente identificados como *Klebsiella pneumoniae* em CHROMAger.

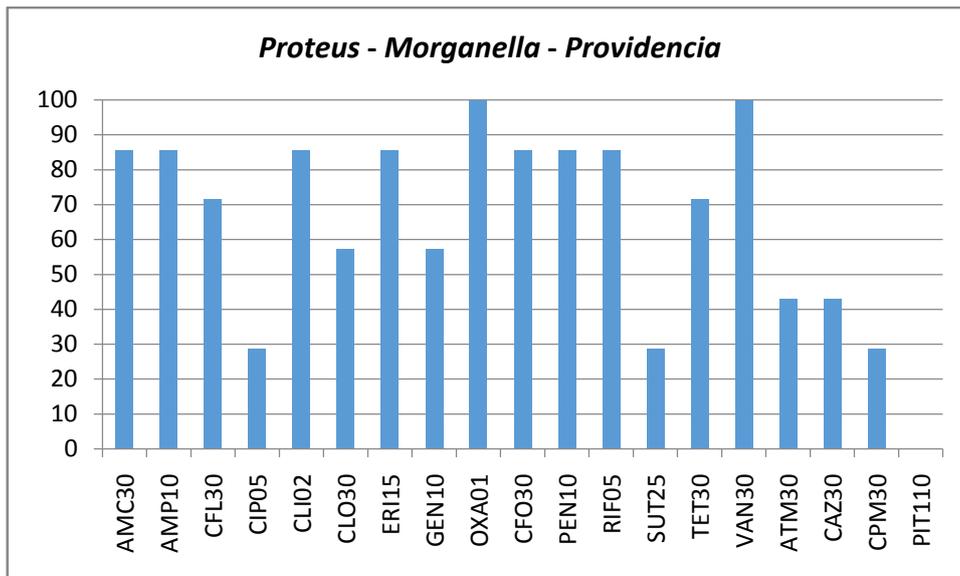


Figura 10. Porcentagem de resistência a antibióticos dos isolados bacterianos presuntivamente identificados como *Proteus - Morganella - Providencia* em CHROMAgar.

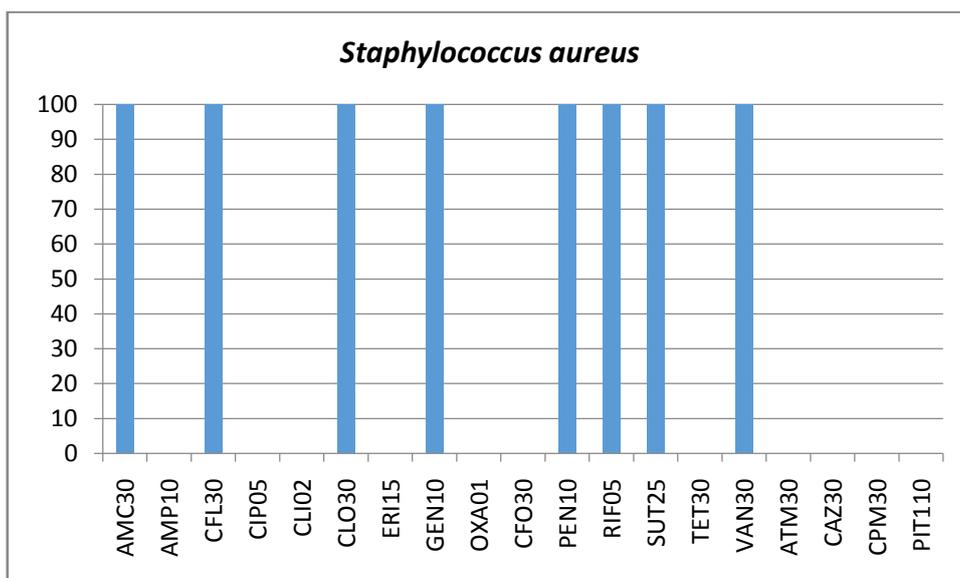


Figura 11. Porcentagem de resistência a antibióticos dos isolados bacterianos presuntivamente identificados como *Staphylococcus aureus* em CHROMAgar.

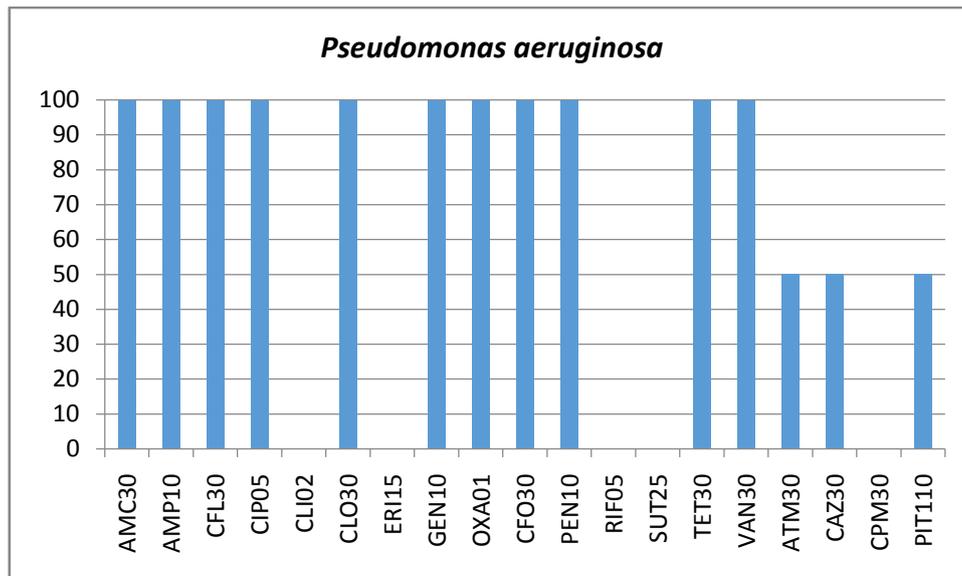


Figura 12. Porcentagem de resistência a antibióticos dos isolados bacterianos presuntivamente identificados como *Pseudomonas aeruginosa* em CHROMAgar.

Nos EUA, aproximadamente 10% das infecções hospitalares tem como agente causador bactérias da espécie *Pseudomonas aeruginosa* (NNIS, 2014). A resistência a antibióticos da classe dos betalactameros está principalmente relacionada a presença do plasmídeo Amp C betalactamase, Metallo betalactamases (MBL) e betalactamase de amplo espectro (WEBL) (MANCHANDA, 2003). Um trabalho avaliou a resistência a antibióticos de 147 isolados hospitalares de *Pseudomonas aeruginosa* e constatou que 40% dos isolados eram resistentes a carbapenema e 18% eram produtores de betalactamases e resistentes a cefoxitina (CFO) (HASHEN, 2016). Nesse trabalho todos isolados de *P. aeruginosa* foram sensíveis aos Clindacimina, eritromicina, rifampicina, sulfazotrim e cefepime e 100% dos isolados foram resistentes a cefoxitina (CFO) (figura 12).

O gênero *Klebsiella* é normalmente resistente a vários antibióticos. Experimentos mostram que plasmídeos são a fonte primária dos genes de resistência a antibióticos (HUDSON et al., 2014). Espécies do gênero capazes de produzir betalactamases de amplo espectro (ESBL) são resistentes a muitos antibióticos. As resistências comumente encontradas são aos aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, tetraciclina, cloranfenicol e trimetoprim/sulfametoxazol (NATHISUWAN, 2001). Infecção por bactérias da família *Enterobacteriaceae* resistentes a Carbapenema (ERC) ou *Enterobacteriaceae* capazes de produzir carbapenemase é um problema de saúde

emergente (LIMBAGO, B. M. et al., 2011). A resistência a carbapenema foi constatada em bactérias da espécie *Klebsiella pneumoniae* em hospitais de 46 estados nos EUA, onde ocorreram seis óbitos devido à infecção por *K. pneumoniae* (ERC) no ano de 2012. Vários mecanismos podem gerar a resistência ao carbapenema em bactérias da família *Enterobacteriaceae*, o mecanismo de resistência mais importante em *Klebsiella pneumoniae* é a produção de uma enzima carbapenemase, *bla_{KPC}*. O gene que codifica a enzima *bla_{KPC}* é encontrado em um elemento móvel do material genético (um transposon, o transposon específico envolvido é chamado Tn4401), o que aumenta o risco de disseminação do gene que codifica a enzima (VASTAG, 2012). A literatura mostra a extensão da prevalência da resistência a carbapenema em isolados de *K. pneumoniae* provenientes de amostras hospitalares, esse trabalho mostra a presença da resistência a outros antibióticos da classe beta-lactâmicos em isolados bacterianos ambientais. Todos os isolados de *K. pneumoniae* foram resistentes a penicilina e 50% foram resistentes a cefalosporina, antibióticos que são betalactâmicos (figura 09).

Normalmente, os antibióticos utilizados para tratar infecções causadas por *E. coli* são as fluoroquinolonas, azitromicina e rifamicina, o último tem uso mais recente (AL-ABRI, 2005). Na Austrália, praticamente não existe (<5%) isolados de *E. coli* provenientes de gado ou da carne de boi já nos mercados resistentes à fluoroquinolonas (DAFF). Um trabalho avaliou a resistência a antibióticos de 1792 isolados de *E. coli*, obtidos de humanos, gados, suínos e frangos. Os antibióticos utilizados foram os seguintes: AMP (ampicilina), GEN (gentamicina), CLO (clorafenicol), AMC (amoxicilina), CFL (cefalotina), CFO (cefotaxima), Ciprofloxacina (CIP), tetraciclina (TET) TIO (ceftiofur), AXO (Ceftriaxona), CAN (Canamicina), estreptomicina (STR), NAL (ácido nalidíxico), sulfonamida (SUL) e Trimetoprim / sulfametoxazole (TMP/SMX). No geral, 934 (54,0%) isolados de *E. coli* dos 1.729 analisados eram resistentes a mais de um antimicrobiano. Como esperado, os fenótipos de resistência mais comuns foram para fármacos mais antigos como tetraciclina (40,9%) (introduzido em 1948), sulfonamida (36,2%) (introduzida em 1936), estreptomicina (34,2%) (introduzida em 1943) e ampicilina 24,1%) (introduzido em 1961). Um número muito menor de isolados foi resistente aos antimicrobianos introduzidos para uso clínico desde 1980, como amoxicilina/ácido clavulânico (5,6%) (introduzido em 1984), ceftriaxona (2,4%) (introduzido em 1984), ceftiofur (2,3%), (Introduzido em 1988) e ciprofloxacina (0,4%) (introduzido em 1987) (TADASSE, 2012). Nessa dissertação nenhum dos isolados de *E. coli* foi resistente a ciprofloxacina (CIP), o que é similar ao encontrado

na literatura (<0,5%) (TADASSE, 2012). Não foi constatada resistência dos isolados de *E. coli* aos antibióticos ATM, CAZ, COM e PIT (figura 08).

Um trabalho avaliou a resistência a antibióticos de 38 isolados de *E. faecalis* e todos os isolados foram susceptíveis à penicilina, vancomicina e tetraciclina, menos de 10% dos isolados foram resistentes a penicilina, 3% dos isolados foram resistentes a eritromicina, 3% foram resistentes a clorafenicol, 5% a Ciprofloxacina (JHONSTON, 2004). Dos isolados de *E. faecalis* testados nesse trabalho, 75% foram resistentes a penicilina e eritromicina, 12,5% foram resistentes a clorafenicol e 25% foram resistentes a ciproflaxina. Todos os isolados de *E. faecalis* foram sensíveis a piperacilina (PIT) (figura 06).

Yang e colaboradores (YANG, 2015) avaliaram a resistência a antibióticos de 88 isolados *Salmonella Stanley* provenientes de vegetais e outros alimentos e obteve um resultado similar ao das *Enterobactereaceas* analisadas nessa dissertação: 22 isolados (25%) foram resistentes a tetraciclina (TET) 15 isolados (17%) foram resistentes a ciproflaxina (CIP).

Os isolados de *Staphylococcus aureus* testados nesse trabalho foram resistentes a AMC, CFL, CLO, GEN, RIF, SUT e VAN. Foram sensíveis a ampicilina, que de acordo com a literatura, trabalhos mostram que até 70% de isolados hospitalares de *S. aureus* são resistentes a AMP. Nenhum isolado foi resistente a ciproflaxina, o que está de acordo com a literatura que diz que *S. aureus* são sensíveis a CIP (ONANUGA, 2011).

Um trabalho avaliou 71 isolados bacterianos identificados como *Proteus* spp., 15 *Providencia* spp. e 1 *Morganella* sp. 86% dos isolados de *Proteus* e *Providencia* foram resistentes a ciproflaxina, o que é similar ao encontrado nessa dissertação, onde 28% dos isolados foram sensíveis a ciproflaxina e sulfazotrim (PERWEEN).

4.6. Curva de crescimento de densidade óptica

Para avaliar os efeitos das diferentes doses do coquetel de bacteriófago sobre o crescimento dos isolados, curvas de crescimento de densidade óptica médias a 600 nm foram geradas para cada um dos 43 isolados testados. Inibição completa foi definida como uma redução de mais de 90% no crescimento bacteriano em contato com o coquetel de fagos por 24 horas comparado com o controle da bactéria. Inibição parcial

foi definida como supressão do crescimento da bactéria entre 10% e 89% e sem inibição menor que 10% (PORTER, 2016).

O coquetel de fagos não apresentou um amplo espectro de ação contra os isolados testados. Apenas os isolados AL04 e AL 05 sofreram inibição completa. Todos os outros isolados não sofreram inibição. Esses isolados foram identificados como *Staphylococcus aureus* pelo plaqueamento em CHROMagar, e foram permissivos e susceptíveis ao coquetel de fagos que contém 5 fagos de *S. aureus*. Isso reforça a identificação do CHROMagar desses isolados.

Os isolados apresentaram três comportamentos bem distintos em resposta ao coquetel de fagos. Uma curva onde a supressão do crescimento aumenta à medida que a concentração dos fagos aumenta (figura 13 – comportamento 1), uma curva onde o fago não altera o crescimento bacteriano (figura 14 – comportamento 2), e uma curva onde os tratamentos MOI 1 e MOI 10 aumentam a contagem final em relação ao controle bactéria (figura 15 – comportamento 3) (Figura suplementar de 2 a 6).

Os comportamentos 1 e 2 são muito bem conhecidos e explicados em livros, mas o comportamento 3 não. É possível que os isolados bacterianos que apresentaram esse comportamento tenham de alguma forma respondido a presença do fago e por isso apresentam crescimento diferente (figura 15 e curvas de crescimento no material suplementar).

Tabela 08. Comportamento dos isolados na curva de crescimento

Comportamento 1	Comportamento 2	Comportamento 3
AL04	AL01	AL09
AL05	AL02	AL12
	AL03	AL15
	AL06	BR03
	AL07	BR12
	AL08	BR33
	AL11	BR39
	AL13	BR45
	AL14	BR47
	BA02	FR01
	BA08	FR04
	BA12	FR14
	BA15	FR25
	BA21	OV01
	BR41	OV04
	CO01	
	CO04	
	CO10	
	CO16	
	OV19	
	PA09	
	PA10	
	PA15	
	PA18	
	PA23	

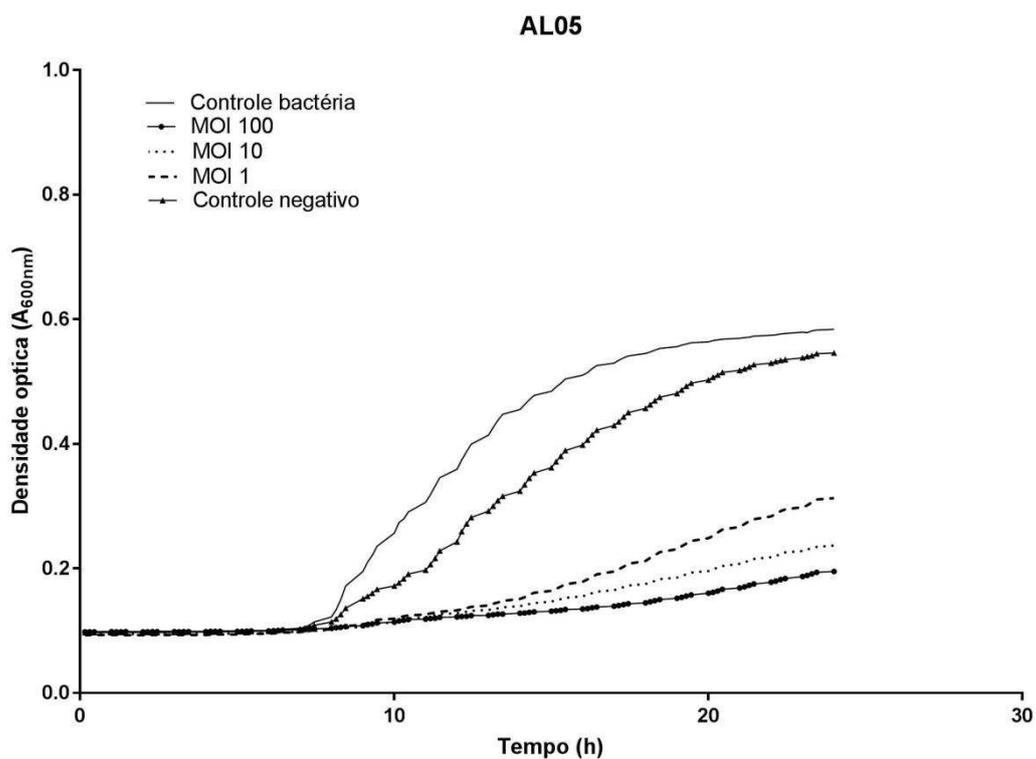
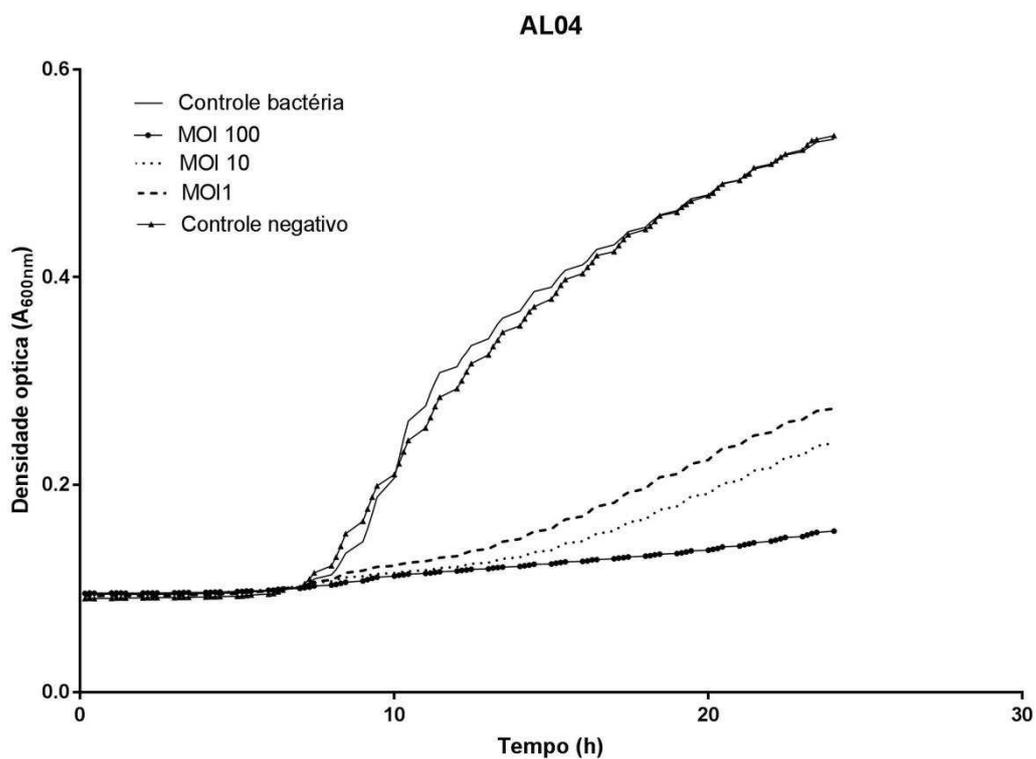


Figura 13. A média de curvas de crescimento de densidade óptica (DO_{600}) dos isolados AL04 e AL05, proveniente da salada no pote produzida em Viçosa-MG, inoculados com diferentes concentrações (MOI) do coquetel de fagos e os controles.

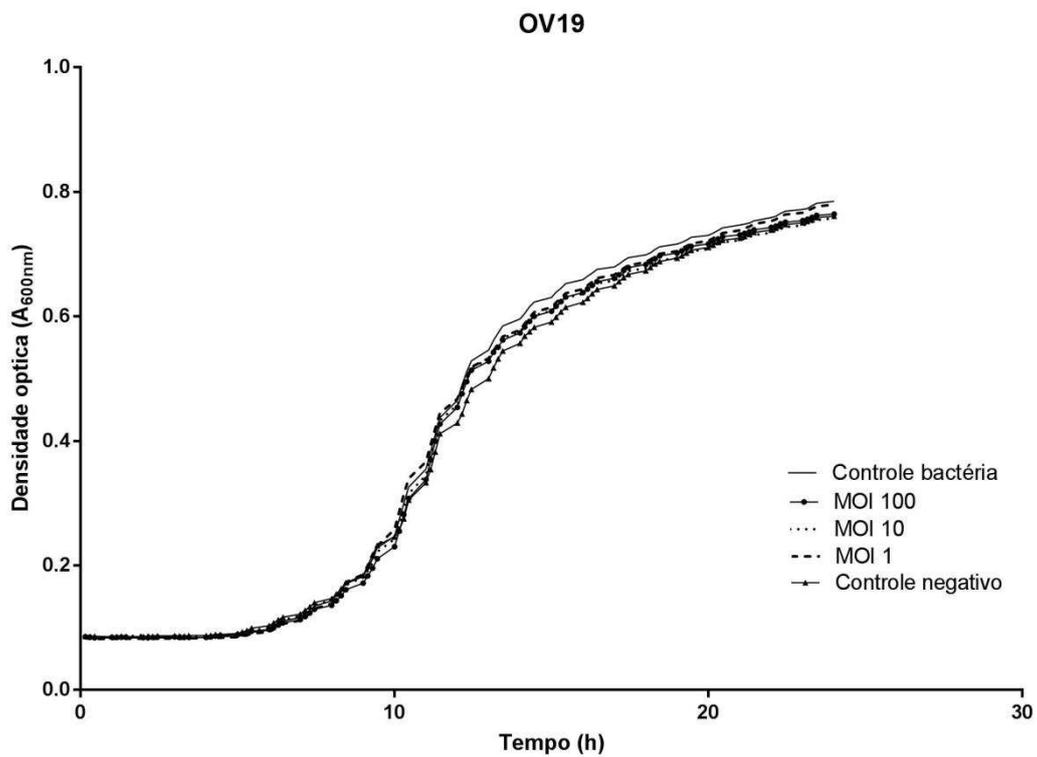
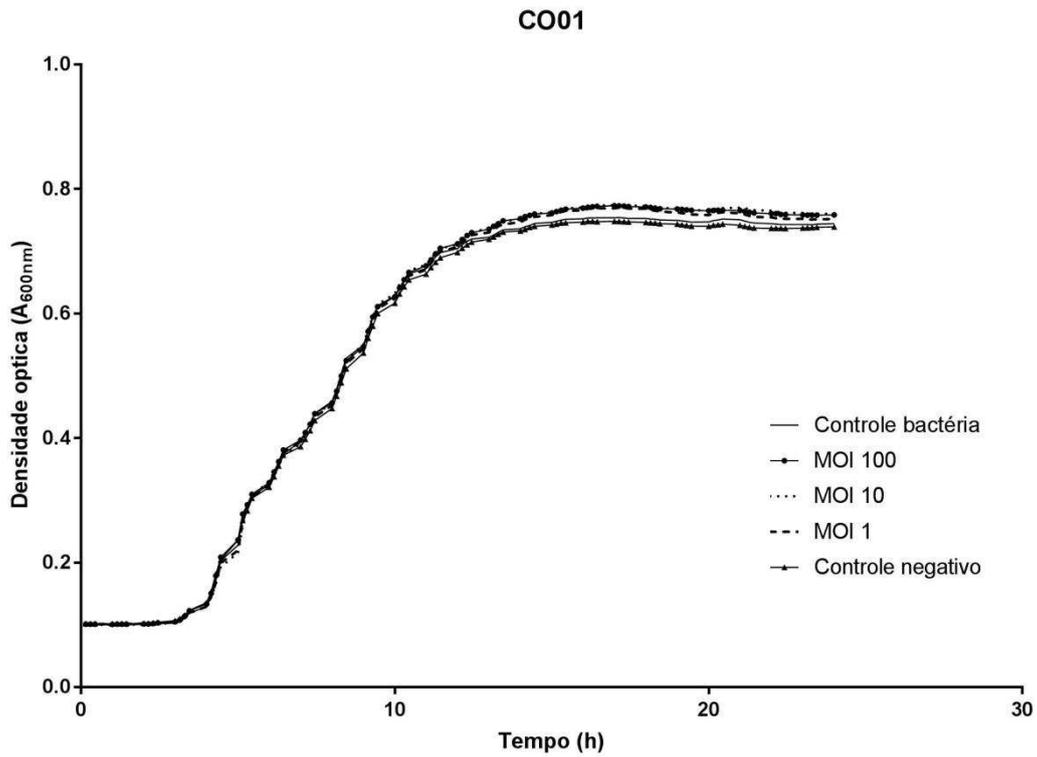


Figura 14. A média de curvas de crescimento de densidade óptica (DO_{600}) dos isolados CO01 e OV19, proveniente da salada no pote produzida em Viçosa-MG, inoculados com diferentes concentrações (MOI) do coquetel de fagos e os controles.

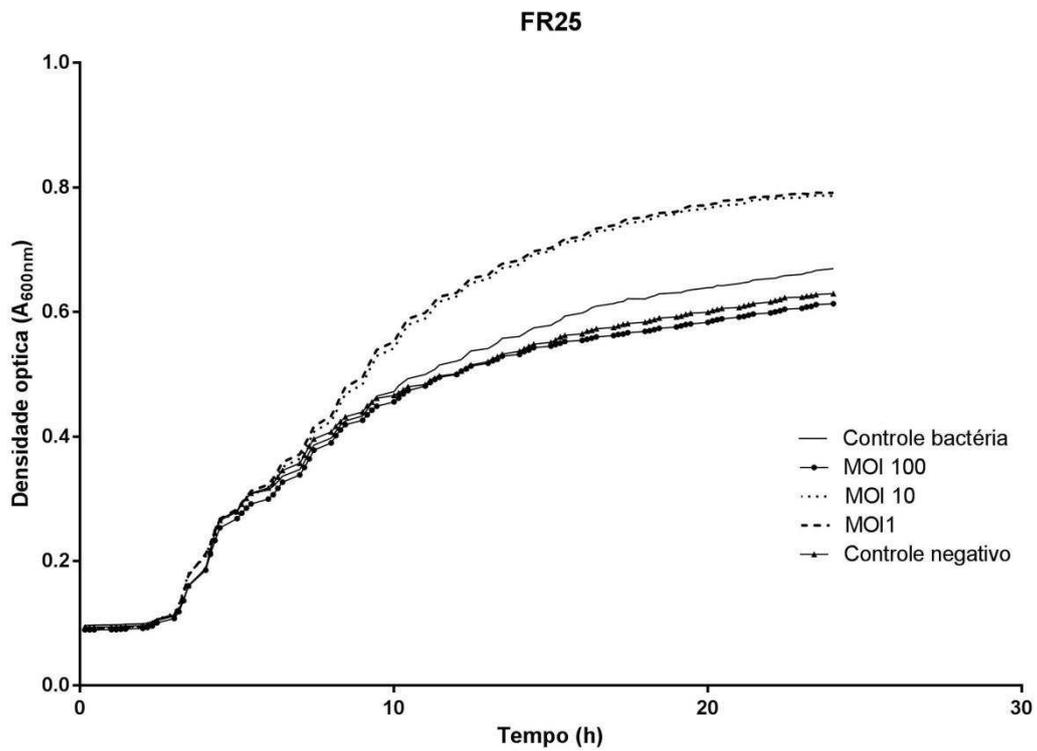
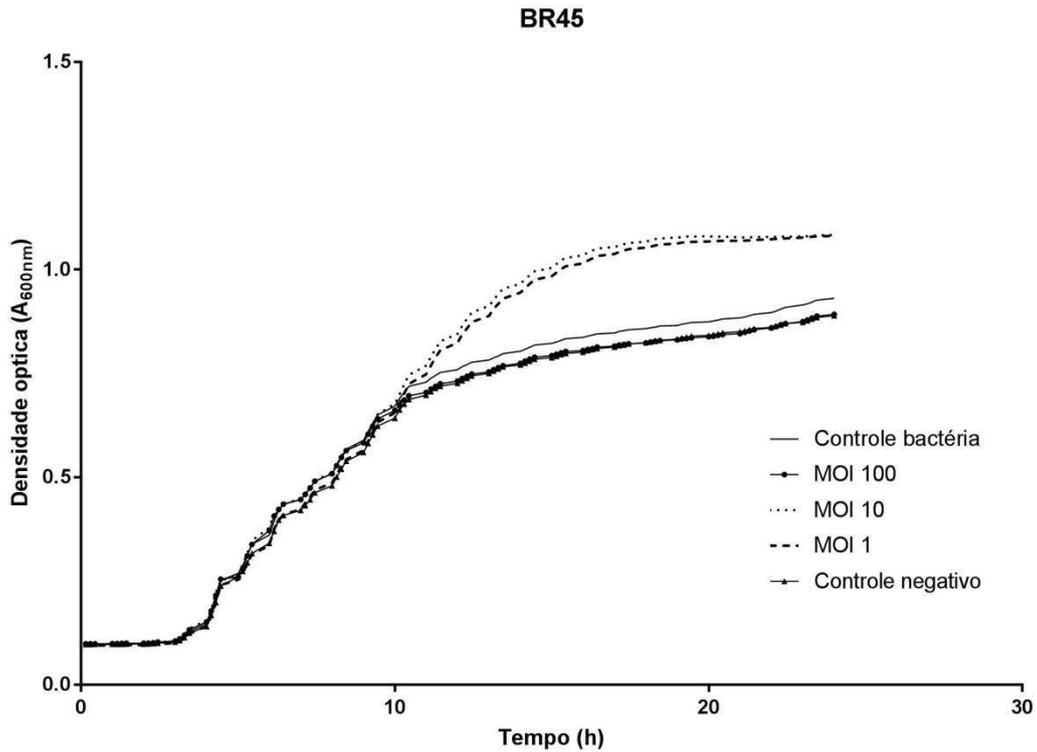


Figura 15. A média de curvas de crescimento de densidade óptica (DO_{600}) dos isolados BR45e FR25, proveniente da salada no pote produzida em Viçosa-MG, inoculados com diferentes concentrações (MOI) do coquetel de fagos e os controles.

Tabela 09. Teste de médias dos tratamentos de concentração viral dos isolados.

Tratamento	Isolado		
	AL04	AL05	BR45
Controle bactéria	0.5329 a	0.58395 a	0.93083 b
MOI 100	0.15527 c	0.195 c	0.892 c
MOI 10	0.24013 b	0.2368 bc	1.0838 a
MOI 1	0.27345 b	0.31287 abc	1.0817 a
Controle negativo	0.53615 a	0.54587 ab	0.88887 c
	CO01	FR25	OV19
Controle bactéria	0.74413 ab	0.66965 b	0.7847 a
MOI 100	0.7584 a	0.61303 c	0.7644 a
MOI 10	0.76003 a	0.78637 a	0.75763 a
MOI 1	0.75163 ab	0.79123 a	0.77953 a
Controle negativo	0.73913 b	0.6293 c	0.7608 a

*Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na vertical não diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

5. CONCLUSÃO

- O coquetel de bacteriófagos não foi eficiente contra os isolados do RTE. Isso reafirma a alta especificidade dos bacteriófagos, ratificando a sua biossegurança. Uma vez que a utilização de bacteriófagos contra bactérias patogênicas é pouco provável de ter algum impacto sobre a comunidade microbiana comensal e mutualística.
- Os resultados do sequenciamento permitiram verificar a presença de micro-organismos patogênicos no RTE, ratificando a literatura que diz que o consumo de vegetais frescos tem sido grande veiculador de patógenos.
- A identificação presuntiva de isolados bacterianos em CHROMagar apresentou baixa acurácia, uma vez que houve grande divergência entre seus resultados e os resultados obtidos através do sequenciamento.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEDON, S. T. Lysis and the interaction between free phages and infected cells. *The Molecular Biology of Bacteriophage T4*. Washington, DC. ASM Press. p. 397-405. 1994.
- AL-ABRI, S. S. et al. "Traveller's diarrhoea". *The Lancet Infectious Diseases*. v. 5 n. 6 p. 349–360. 2005.
- ARISAKA, F. et al. The tail lysozyme complex of bacteriophage T4. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. v. 35 p. 16-21. 2003.
- ATTERBURY, R. J. The age of phage. *Poultry International*. v. 45 p. 18-22. 2006.
- AYCICEK, H. et al. Determination of total aerobic and indicator bacteria on some raw eaten vegetables from wholesalers in Ankara, Turkey. *International Journal Hygiene Environmental Health*. p.197-201. 2005.
- BCC Research. *Antibiotics: Technologies and Global Markets*. Maio 2014. Disponível em <<https://www.reportbuyer.com/product/2158727/antibiotics-technologies-and-global-markets.html>> Acesso em junho de 2015.
- BEUCHAT, L. R. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes and Infection*. v.4 p.413-23. 2002.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução RDC 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. *Diário Oficial da União, Brasília, DF*, 10 jan. 2001.
- BRENNER, D. J. et al. *The Gammaproteobacteria*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2. ed. New York: Springer. p. 1108 -1120. 2005.
- BROWN, S. et al. Wall teichoic acids of gram positive bacteria. GOTTESMAN S. (ed.). *Annual Review of Microbiology*. Palo Alto. v. 67 p. 313–336.2013.
- BURNETT, S. L., BEUCHAT, L. R. Human pathogens associated with raw produce and unpasteurized juices, and difficulties in decontamination. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. v. 27 p. 104-110. 2001.
- CARACIOLO, F. B. et al. Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolates obtained from skin and soft tissue infections of outpatients from a university hospital in Recife -PE, Brazil. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. v. 87 n. 6. p. 857-861. 2012.
- CAPORASO, J. G. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods*. v. 7 n. 5 p. 335-336. 2010.
- CONNERTON, P. L.; CONNERTON I. F. Microbial treatments to reduce pathogens in poultry meat. MEAD G. C. (ed.) *Food safety control in the poultry industry*. 1. ed. Cambridge. p. 414–427.2005.
- CATTELAN, A.J.; GRASSANO, A. Protocolo para análise da qualidade e da eficiência agrônômica de inoculante, estirpes e outras tecnologias relacionadas a bactérias

promotoras do crescimento vegetal. In: CAMPO, R.J.; HUNGRIA, M. Anais da XIII reunião da rede de laboratórios para recomendação, padronização e difusão de tecnologia de inoculantes microbianos de interesse agrícola (RELARE). Londrina, PR: EMBRAPA-CNPQ. p.154-173. 2007.

DABROWSKA, K. et al. Hoc protein regulates the biological effects of T4 phage in mammals, *Archives of Microbiology*. p. 489-498. 2007.

DAFF. Australian Government Department of Agriculture, Fisheries and Forestry (DAFF). Antimicrobial resistance—DAFF (2009). Disponível em < <http://www.daff.gov.au/agriculture-food/food/regulation-safety/antimicrobial-resistance> > Acesso em Dezembro de 2016.

DAVIES, R. H. Pathogen populations on poultry farms. In: MEAD G. (ed.). *Food safety control in the poultry industry*. 1. ed. Cambridge. Woodhead Publishing Ltd. p. 101–135.2005.

DESANTIS, T. Z. et al. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Applied and environmental microbiology*, v. 72 n. 7 p. 5069-5072, 2006.

DIBNER, J.J.; RICHARDS, J. D. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poultry Science*. v.84 p. 634–643. 2005.

European Union. Regulation 1831/2003/EC on additives for use in animal nutrition, replacing Directive 70/524/EEC on additives in feeding-stuffs. Brussels. 2005.

ELLER, M. R. et al. Molecular characterization of a new lytic bacteriophage isolated from cheese whey. *Archives of virology*, v. 157, n.12, p. 2265–2272. 2012.

EMBRAPA. Circular Técnico: Qualidade e segurança sanitária da água para fins de irrigação. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, DF. 2014.

FRIMAN, V. P. et al. High temperature and bacteriophages can indirectly select for bacterial pathogenicity in environmental reservoirs. *PLoS ONE*. v.6 n.3 .2011.

FUHRMANN, S. et al. Microbial contamination along the main open wastewater and storm water channel of Hanoi, Vietnam, and potential health risks for urban farmers. *Science of the Total Environment*. v. 567, p. 1014-1022. 2016.

FUHRMAN, J. A. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature*. v.399 p.541–548. 1999.

GHIDELLI, C.; PÉREZ-GAGO, M. B. Recent advances in modified atmosphere packaging and edible coatings to maintain quality of fresh-cut fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2016.

GLEESON, C.; GRAY, N. *The Coliform Index and Waterborne Disease: Problems of microbial drinking water assessment*. CRC Press. 2002.

GUANG, J. et al. "Comparison of E. coli, enterococci, and fecal coliform as indicators for brackish water quality assessment". *Water Environment Research*. v.76 n.3 p. 245–255. England AJ. 2004.

- HASHEN, H. et al. Carbapenem Susceptibility and Multidrug-Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates in Egypt. *Jundishapur Journal of Microbiology*. v. 9 n. 11. 2016.
- HERNANDES, N. K. et al. Testes sensoriais de aceitação da beterraba vermelha (*Beta vulgaris* ssp. *vulgaris* L.), cv. Early Wonder, minimamente processada e irradiada. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Campinas. v. 27 p. 64-68. 2007.
- HUDSON, C. et al. Resistance Determinants and Mobile Genetic Elements of an NDM-1-Encoding *Klebsiella pneumoniae* Strain. *PLOS ONE*. v. 9 n. 6. 2014.
- HYMAN, P.; ABEDON, S. T. Bacteriophage host range and bacterial resistance. *Advances in Applied Microbiology*. v. 70 p. 217–248. 2010.
- JHONSTON, L. M.; JAYKUS, L. A. Antimicrobial Resistance of *Enterococcus* Species Isolated from Produce. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 70 n. 5 p. 3133-3137. 2004.
- KUTTER, E. Phage therapy: bacteriophages as antibiotics. Evergreen State College, Olympia, WA. 1997. Disponível em <<http://www.evergreen.edu/phage/phagetherapy/phagetherapy.htm>> Acesso em junho de 2015.
- LABRIE, S.J. et al. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Reviews Microbiology*. v.8 p. 317-327. 2010.
- LAANTO, E. et al. Phage-driven loss of virulence in a fish pathogenic bacterium. *PLoS ONE*. v. 7. 2012.
- LIMBAGO, B. M. et al. IMP-Producing Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 49 n. 12 p. 4239–4245. 2011.
- MANCHANDA, V.; SINGH, N. P. Occurrence and detection of AmpC betalactamases among Gram-negative clinical isolates using a modified three-dimensional test at Guru Tegh Bahadur Hospital, Delhi, India. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.; v. 51 n. 2 p. 415–428. 2003.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 65/2006 de 21 de novembro de 2006.
- MENDES, L. W. et al. Land-use system shapes soil bacterial communities in Southeastern Amazon region. *Applied Soil Ecology*. v. 95 p. 151-160. 2015.
- MERLINO, J. et al. Evaluation of CHROMagar Orientation for Differentiation and Presumptive Identification of Gram-Negative Bacilli and *Enterococcus* Species. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*. v. 34 n. 7. 1996.
- MORETTI, C. L. Manual de Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Hortaliças. 2007.
- NATHISUWAN, S. et al. Extended-Spectrum β -Lactamases: Epidemiology, Detection, and Treatment. *Pharmacother*. v. 21 n. 8 p. 920–928. 2001.
- NAVARRETE, A. A. et al. Soil microbiome responses to the short-term effects of Amazonian deforestation. *Molecular Ecology*, v. 24 n. 10 p. 2433-2448. 2015.

NELSTROP, A. E. et al. Studies on phagocytosis: I. Antigen clearance studies in rabbits. *Immunology*. v. 14 p. 325-337. 1968.

NILSSON, A. S. Phage Therapy—Constraints and Possibilities. *Upsala Journal of Medical Sciences*. v. 119 p. 192–198. 2014.

NNIS (National Nosocomial Infections Surveillance). National Nosocomial Infections Surveillance System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *American Journal of Infection Control*. v. 32 n. 8 p. 470–485. 2004.

ONANUGA, A., TEMEDIE, T. C. Multidrug-resistant Intestinal *Staphylococcus aureus* among Self-medicated Healthy Adults in Amassoma, South-South, Nigeria. *Journal of Health, Population and Nutrition*. v. 29 n. 5 p. 446-453. 2011.

PERWEEN, N. et al. Prevalence of Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant *Proteus*, *Providencia* and *Morganella* Species in Burn Wound Infection. *International Journal of Scientific Study*. v. 3 n. 11 p. 154-156. 2016.

PORTER, J. et al. In vitro evaluation of a novel bacteriophage cocktail as a preventative for bovine coliform mastitis. *Journal of Dairy Science*. v. 99 n. 3. 2016.

POUILLOT, F. et al. Genetically engineered virulent phage banks in the detection and control of emergent pathogenic bacteria. *Biosecurity and Bioterrorism: Biodefense Strategy, Practice, and Science*. v. 8 n. 2 p. 155-169. 2010.

PROFT, T., BAKER E. N. Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria – structure, assembly and their role in disease. *Cellular Molecular Life Science*. v. 66 p. 613–635. 2009.

PYLRO, V. S. et al. Data analysis for 16S microbial profiling from different benchtop sequencing platforms. *Journal of microbiological methods*. v. 107 p. 30- 37. 2014.

REDIERS, H. et al. Evaluation of the cold chain of fresh-cut endive from farmer to plate. *Postharvest Biology and Technology*. v. 51 p. 257-262. 2009.

RODRIGUES, S.; FERNANDES, F. A. N. Advances in Fruit Processing Technologies. Contemporary food engineering series. CRCPress. p. 217-234. 2012.

ROHWER, F., EDWARDS R. The Phage Proteomic Tree: a genome based taxonomy for phage. *Journal of Bacteriology*. p. 4529–4535. 2002.

SAINI, V. et al. Herd-level relationship between antimicrobial use and presence or absence of antimicrobial resistance in gram-negative bovine mastitis pathogens on Canadian dairy farms. *Journal of Dairy Science*. v. 63 n. 8 p. 4965-4976. 2013.

SANCHÍS, E. et al. Integration of antimicrobial pectin-based edible coating and active modified atmosphere packaging to preserve the quality and microbial safety of fresh-cut persimmon (*Diospyros kaki* Thunb. cv. Rojo Brillante). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2016.

SAMBROOK, J., FRITCSH, E.F., MANIATIS, T. Molecular cloning: A laboratory manual. 2. ed. New York. Cold Spring Harbor Laboratory. v. 3 p. 3104-3112. 1989.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Molecular cloning: A laboratory manual. 3. ed. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press. v. 3. 2001.

SATSAVKELOVA, E. A. et al. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. *Microbiological Research*. v. 162 n.1 p. 69-76. 2007.

SCHARFF, R., 2011. Health-related costs of foodborne illness in the United States. Produce Safety Project, an Initiative of the Pew Charitable Trusts at Georgetown University. Disponível em <<http://www.producesafetyproject.org/media>>. Acesso em agosto de 2016.

SEBRAE. Agronegócio fruticultura. Boletim de inteligência. SIM. 2015.

SMITH, H. W.; HUGGINS, M. B. Successful treatment of experimental *Escherichia coli* infections in mice using phages: its general superiority over antibiotics. *Journal of General Microbiology*. v.128 p.307–318. 1982.

SMITH, H. W.; HUGGINS, M. B. Effectiveness of phages in treating experimental *Escherichia coli* diarrhea in calves, piglets and lambs. *Journal of General Microbiology*. v. 129 p. 2659–2675. 1983.

SULAKVELIDZE, A., BARROW P. Phage therapy in animals and agribusiness. In: KUTTER E.; SULAKVELIDZE A (ed.). *Bacteriophages: biology and applications*. Boca Raton, FL. CRC Press. p. 335–380. 2005.

SULAKVELIDZE, A. et al. Bacteriophage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v. 45 p. 649–659. 2001.

SUMMERS, W. C. et al. Bacteriophage therapy. *Annual Review of Microbiology*. v. 55: p. 437–451. 2001.

TADESSE D. A. et al. Antimicrobial Drug Resistance in *Escherichia coli* from Humans and Food Animals, United States, 1950–2002. *Emerging Infectious Diseases*. v. 18 n. 5. p. 741-749. 2012.

TARAHOVSKY, Y. S. et al. Lysis of *Escherichia coli* Cells Induced by Bacteriophage T4. *FEMS Microbiology Letters*. v. 122 p. 195-200. 1994.

U.S. Environmental Protection Agency (EPA). "Water Quality Standards for Coastal and Great Lakes Recreation Waters; Final Rule". *Federal Register*. 69(220): 67218–67243. 2004.

U.S. Department of Health and Human Services (HHS). New Animal Drug Application (NADA) 140-828 (Baytril) Docket No. 2000N-1571. 2005.

World Health Organization (WHO). Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications: Preliminary Results and Trends Across Greater Europe. *Journal of Infection*. v. 43 p. 80–84. 2001.

World Health Organization (WHO). Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance. França. 2014.

YANG, X. O. Antimicrobial Resistance and Molecular Typing of Salmonella Stanley Isolated from Humans, Foods, and Environment. *Foodborne Pathogens and Disease* v. 12, n. 12. 2015.

YOUNG, R. Bacteriophage lysis: mechanisms and regulation. *Microbiological Reviews*. v. 56 p.430-481. 1992.

7. MATERIAL SUPLEMENTAR

TABELA SUPLEMENTAR 01. IDENTIFICAÇÃO PRESUNTIVA EM CHROMAGAR DOS ISOLADOS PROVENIENTES DO BRÓCOLIS.

Isolados Brócolis	Gênero/Espécie
BR1	<i>Enterococcus faecalis</i>
BR2	<i>Enterococcus faecalis</i>
BR3	<i>Enterococcus faecalis</i>
BR4	<i>Enterococcus faecalis</i>
BR5	<i>Enterococcus faecalis</i>
BR6	<i>Enterococcus faecalis</i>
BR7	<i>Enterococcus faecalis</i>
BR8	<i>Enterococcus faecalis</i>
BR9	<i>Enterococcus faecalis</i>
BR10	<i>Enterococcus faecalis</i>
BR11	<i>Enterococcus faecalis</i>
BR12	<i>Enterococcus faecalis</i>
BR13	<i>Enterococcus faecalis</i>
BR14	<i>Enterococcus faecalis</i>
BR15	<i>Enterococcus faecalis</i>
BR16	<i>Enterococcus faecalis</i>
BR17	<i>Enterococcus faecalis</i>
BR18	<i>Enterococcus faecalis</i>
BR19	<i>Enterococcus faecalis</i>
BR20	<i>Enterococcus faecalis</i>
BR21	<i>Enterococcus faecalis</i>
BR22	<i>Enterococcus faecalis</i>
BR23	<i>Enterococcus faecalis</i>
BR24	<i>Enterococcus faecalis</i>
BR25	<i>Enterococcus faecalis</i>
BR26	<i>Enterococcus faecalis</i>
BR27	<i>Enterococcus faecalis</i>
BR28	<i>Enterococcus faecalis</i>
BR29	<i>Enterococcus faecalis</i>
BR30	<i>Enterococcus faecalis</i>
BR31	<i>Enterococcus faecalis</i>
BR32	<i>Enterococcus faecalis</i>
BR33	Coliformes
BR34	Coliformes
BR35	Coliformes
BR36	Coliformes
BR37	Coliformes
BR38	Coliformes
BR39	Coliformes
BR40	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

BR41	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
BR42	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
BR43	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
BR44	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
BR45	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
BR46	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
BR47	Proteus - Morganella - Providencia
BR48	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
BR49	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
BR50	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
BR51	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

TABELA SUPLEMENTAR 02. IDENTIFICAÇÃO PRESUNTIVA EM CHROMAGAR DOS ISOLADOS PROVENIENTES DA COUVE.

Isolados Couve	Gênero/Espécie
AL1	Proteus - Morganella - Providencia
AL2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
AL3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
AL4	<i>Staphylococcus aureus</i>
AL5	<i>Staphylococcus aureus</i>
AL6	<i>Staphylococcus aureus</i>
AL7	<i>Escherichia coli</i>
AL8	<i>Escherichia coli</i>
AL9	<i>Escherichia coli</i>
AL10	<i>Escherichia coli</i>
AL11	<i>Escherichia coli</i>
AL12	<i>Escherichia coli</i>
AL13	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
AL14	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
AL15	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
AL16	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
AL17	<i>Enterococcus faecalis</i>
AL18	<i>Enterococcus faecalis</i>
AL19	<i>Enterococcus faecalis</i>
AL20	<i>Enterococcus faecalis</i>
AL21	<i>Enterococcus faecalis</i>
AL22	<i>Enterococcus faecalis</i>
AL23	<i>Enterococcus faecalis</i>
AL24	<i>Enterococcus faecalis</i>
AL25	<i>Enterococcus faecalis</i>
AL26	<i>Enterococcus faecalis</i>
AL27	<i>Enterococcus faecalis</i>
AL28	<i>Enterococcus faecalis</i>

AL29	Enterococcus faecalis
AL30	Enterococcus faecalis
AL31	Enterococcus faecalis
AL32	Enterococcus faecalis
AL33	Enterococcus faecalis
AL34	Enterococcus faecalis
AL35	Enterococcus faecalis
AL36	Enterococcus faecalis
AL37	Enterococcus faecalis
AL38	Enterococcus faecalis
AL39	Enterococcus faecalis
AL40	Enterococcus faecalis
AL41	Enterococcus faecalis
AL42	Enterococcus faecalis
AL43	Proteus - Morganella - Providencia

TABELA SUPLEMENTAR 03. IDENTIFICAÇÃO PRESUNTIVA EM CHROMAGAR DOS ISOLADOS PROVENIENTES DO OVO DE CODORNA.

Isolados ovo de codorna

OV1	Klebisiella pneumoniae
OV2	Klebisiella pneumoniae
OV3	Klebisiella pneumoniae
OV4	Klebisiella pneumoniae
OV5	Klebisiella pneumoniae
OV6	Klebisiella pneumoniae
OV7	Klebisiella pneumoniae
OV8	Klebisiella pneumoniae
OV9	Klebisiella pneumoniae
OV10	Klebisiella pneumoniae
OV11	Klebisiella pneumoniae
OV12	Klebisiella pneumoniae
OV13	Klebisiella pneumoniae
OV14	Enterococcus faecalis
OV15	Proteus - Morganella - Providencia
OV16	Coliformes
OV17	Coliformes
OV18	Enterococcus faecalis
OV19	Enterococcus faecalis
OV20	Enterococcus faecalis
OV21	Enterococcus faecalis
OV22	Klebisiella pneumoniae
OV23	Klebisiella pneumoniae
OV24	Klebisiella pneumoniae

OV25	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
OV26	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
OV27	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
OV28	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
OV29	<i>Proteus - Morganella - Providencia</i>
OV30	<i>Proteus - Morganella - Providencia</i>
OV31	<i>Escherichia coli</i>
OV32	<i>Escherichia coli</i>

TABELA SUPLEMENTAR 04. IDENTIFICAÇÃO PRESUNTIVA EM CHROMAGAR DOS ISOLADOS PROVENIENTES DA BATATA.

Isolados Batata

BA1	Coliformes
BA2	Coliformes
BA3	Coliformes
BA4	Coliformes
BA5	Coliformes
BA6	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
BA7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
BA8	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
BA9	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
BA10	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
BA11	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
BA12	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
BA13	<i>Enterococcus faecalis</i>
BA14	<i>Enterococcus faecalis</i>
BA15	<i>Enterococcus faecalis</i>
BA16	<i>Enterococcus faecalis</i>
BA17	<i>Enterococcus faecalis</i>
BA18	<i>Enterococcus faecalis</i>
BA19	<i>Enterococcus faecalis</i>
BA20	<i>Enterococcus faecalis</i>
BA21	<i>Enterococcus faecalis</i>
BA22	<i>Enterococcus faecalis</i>

TABELA SUPLEMENTAR 05. IDENTIFICAÇÃO PRESUNTIVA EM CHROMAGAR DOS ISOLADOS PROVENIENTES DA PASTA.

Isolados Pasta

PA1	Coliformes
------------	------------

PA2	Enterococcus faecalis
PA3	Enterococcus faecalis
PA4	Enterococcus faecalis
PA5	Enterococcus faecalis
PA6	Enterococcus faecalis
PA7	Enterococcus faecalis
PA8	Proteus - Morganella - Providencia
PA9	Proteus - Morganella - Providencia
PA10	Proteus - Morganella - Providencia
PA11	Klebsiella pneumoniae
PA12	Klebsiella pneumoniae
PA13	Klebsiella pneumoniae
PA14	Klebsiella pneumoniae
PA15	Klebsiella pneumoniae
PA16	Klebsiella pneumoniae
PA17	Coliformes
PA18	Coliformes
PA19	Coliformes
PA20	Coliformes
PA21	Coliformes
PA22	Coliformes
PA23	Coliformes

TABELA SUPLEMENTAR 06. IDENTIFICAÇÃO PRESUNTIVA EM CHROMAGAR DOS ISOLADOS PROVENIENTES DA COUVE FLOR.

Isolados Couve flor

CO1	Enterococcus faecalis
CO2	Coliforme
CO3	Coliforme
CO4	Coliforme
CO5	Coliforme
CO6	Coliforme
CO7	Enterococcus faecalis
CO8	Enterococcus faecalis
CO9	Enterococcus faecalis
CO10	Enterococcus faecalis
CO11	Enterococcus faecalis
CO12	Enterococcus faecalis
CO13	Enterococcus faecalis
CO14	Coliforme
CO15	Coliforme
CO16	Coliforme
CO17	Enterococcus faecalis

TABELA SUPLEMENTAR 07. IDENTIFICAÇÃO PRESUNTIVA EM CHROMAGAR DOS ISOLADOS PROVENIENTES DO FRANGO.

Isolados do Frango

FR1	Escherichia coli
FR2	Coliformes
FR3	Coliformes
FR4	Coliformes
FR5	Coliformes
FR6	Coliformes
FR7	Coliformes
FR8	Coliformes
FR9	Proteus - Morganella - Providencia
FR10	Enterococcus faecalis
FR11	Enterococcus faecalis
FR12	Enterococcus faecalis
FR13	Enterococcus faecalis
FR14	Enterococcus faecalis
FR15	Enterococcus faecalis
FR16	Enterococcus faecalis
FR17	Enterococcus faecalis
FR18	Enterococcus faecalis
FR19	Enterococcus faecalis
FR20	Enterococcus faecalis
FR21	Enterococcus faecalis
FR22	Enterococcus faecalis
FR23	Enterococcus faecalis
FR24	Escherichia coli
FR25	Proteus - Morganella - Providencia

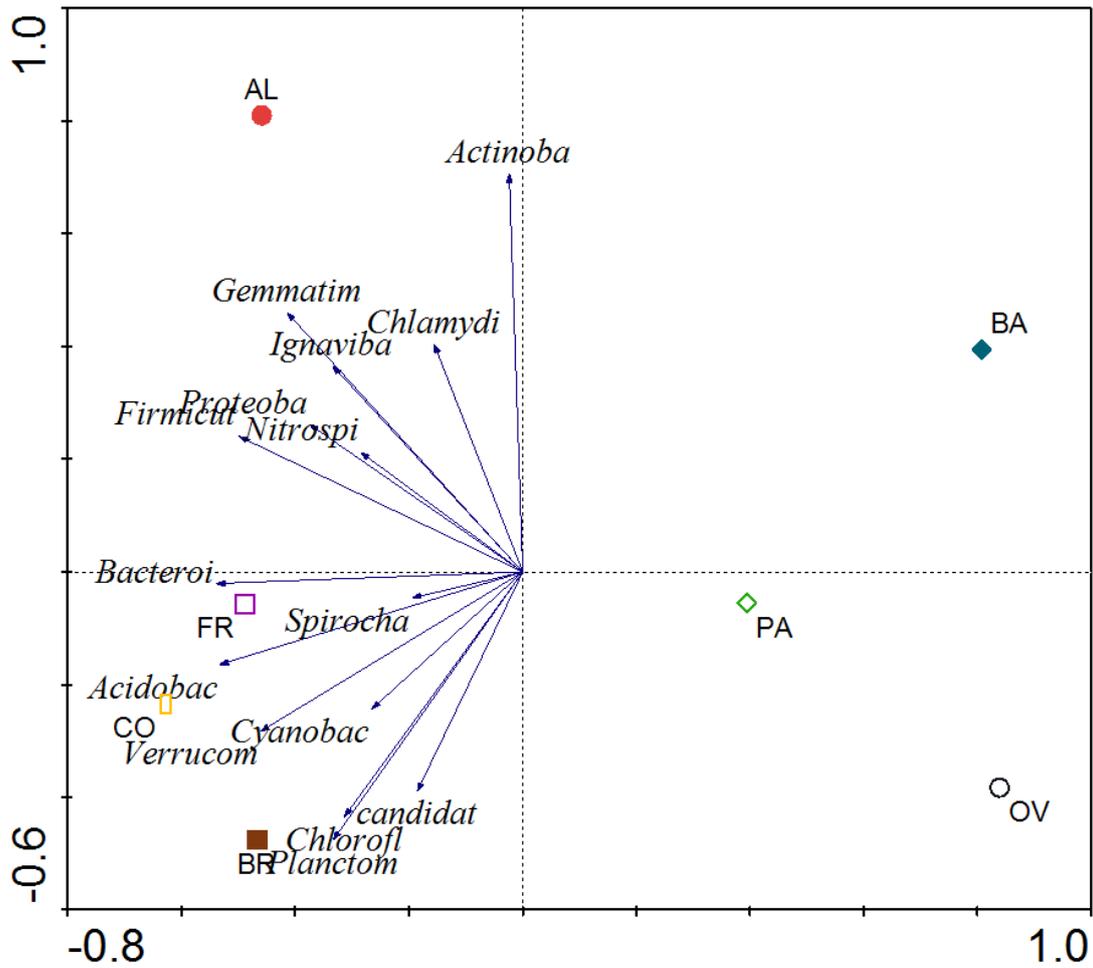


Figura suplementar 01. Análise de Componentes Principais dos pontos amostrais do RTE, baseada na abundância dos filis bacterianos. As Amostras foram marcadas com símbolos e cores diferentes. A direção do vetor indica um aumento para incidência de determinado filo.

TABELA SUPLEMENTAR 08. GÊNEROS ENCONTRADOS NA AMOSTRA FR.

Gênero	Reads	Gênero	Reads
Staphylococcus	2371	Flavisolibacter	2
Aeromonas	1100	Gp1	2
Serratia	653	Hafnia	2
Raoultella	648	Ktedonobacter	2
Pantoea	204	Leclercia	2
Lonsdalea	114	Obesumbacterium	2
Citrobacter	109	Ornithinibacillus	2
Morganella	104	Sporosarcina	2
Erwinia	75	Acidipila	1
Cronobacter	68	Allobacillus	1
Macrococcus	44	Bacillariophyta	1
Bavariococcus	40	Blastopirellula	1
Gibbsiella	39	Budvicia	1
Salinicoccus	39	Caldimonas	1
Nosocomiicoccus	38	Candidatus Procabacter	1
Phaseolibacter	26	Clostridium sensu stricto	1
Salirhabdus	18	Enterobacter	1
Bhargavaea	16	Facklamia	1
Yersinia	13	Ferritrophicum	1
Plesiomonas	12	Flaviumibacter	1
Bacillus	11	Gemmatimonas	1
Viridibacillus	11	Gp17	1
Yokenella	11	Gp2	1
Rahnella	8	Klebsiella	1
Atopococcus	6	Lactobacillus	1
Leminorella	5	Leptonema	1
Trabulsiella	5	Nitratireductor	1
Burkholderia	4	Nitrospira	1
Desemzia	4	Paucisalibacillus	1
Gp3	4	Phenylobacterium	1
Pragia	4	Planococcus	1
Terrimonas	4	Providencia	1
Tolumonas	4	Pseudomonas	1
Vulcanibacillus	4	Pullulanibacillus	1
Abiotrophia	3	Rhizomicrobium	1
Biostraticola	3	Rhodanobacter	1
Escherichia/Shigella	3	Samsonia	1
Gp6	3	Sediminibacterium	1
Jeotgalicoccus	3	Simkania	1
Kluyvera	3	Sphingomonas	1
Pluralibacter	3	Sphingosinicella	1
Salmonella	3	Steroidobacter	1
Alcanivorax	2	Tatumella	1

Catelicoccus	2	Turicibacter	1
Edwardsiella	2	Xanthobacter	1
Falsibacillus	2	Xiphinematobacter	1

TABELA SUPLEMENTAR 09. GÊNEROS ENCONTRADOS NA AMOSTRA PA.

Gênero	Reads	Gênero	Reads
Acinetobacter	1619	Mangrovibacter	2
Enterobacter	290	Isobaculum	2
Lelliottia	266	Paraperlucidibaca	2
Raoultella	175	Staphylococcus	2
Citrobacter	161	Cedecea	2
Kluyvera	67	Gp5	1
Leclercia	60	Subdivision3_genera_incertainae_sedis	1
Klebsiella	49	Candidatus Koribacter	1
Serratia	42	Gp16	1
Erwinia	39	Gallaecimonas	1
Perlucidibaca	36	Maricurvus	1
Obesumbacterium	31	Desulfacinum	1
Pantoea	26	Coxiella	1
Salmonella	25	Tatumella	1
Trabulsiella	21	Bavariicoccus	1
Yokenella	19	Cosenzaea	1
Buttiauxella	17	Rhodotalassium	1
Lonsdalea	12	Salirhabdus	1
Escherichia/Shigella	12	Jeotgalicoccus	1
Hafnia	11	Gemmata	1
Alkanindiges	10	Edwardsiella	1
Phaseolibacter	9	Kosakonia	1
Bacillus	8	Alicyclobacillus	1
Cronobacter	8	Ferruginibacter	1
Gibbsiella	6	Ectothiorhodospinus	1
Pluralibacter	5	Pelagibius	1
Anaerobacillus	4	Simkania	1
Plesiomonas	3	Mucilaginibacter	1
Gp1	2	Conexibacter	1
Samsonia	2	Kitasatospora	1

TABELA SUPLEMENTAR 10. GÊNEROS ENCONTRADOS NA AMOSTRA CO.

Gênero	Reads	Gênero	Reads
Citrobacter	1853	Gallaecimonas	1
Staphylococcus	1652	Eionea	1
Enterobacter	1134	Rhizomicrobium	1
Klebsiella	103	Chlorophyta	1
Salmonella	69	Kosakonia	1
Trabulsiella	66	Plesiomonas	1
Lelliottia	59	Candidatus Scalindua	1
Raoultella	55	Caryophanon	1
Buttiauxella	34	Cerasibacillus	1
Erwinia	22	Bradyrhizobium	1
Leclercia	11	Sphingomonas	1
Vulcanibacillus	7	Turicibacter	1
Viridibacillus	6	Gemmatimonas	1
Gp1	5	Niastella	1
Tatumella	5	Falsibacillus	1
Nosocomiicoccus	5	Tumebacillus	1
Bacillus	5	Verrucomicrobium	1
Kluyvera	5	Pluralibacter	1
Desemzia	5	Saliterribacillus	1
Ktedonobacter	5	Alcanivorax	1
Bhargavaea	5	Dongia	1
Yokenella	4	Cesiribacter	1
Salirhabdus	4	Ruminobacter	1
Subdivision3 generaincertaesis	3	Rummeliibacillus	1
Serratia	3	Sphingorhabdus	1
Burkholderia	3	Ignavibacterium	1
Samsonia	3	Sporosarcina	1
Macrococcus	3	Melissococcus	1
Gp5	2	Derxia	1
Gp2	2	Cronobacter	1
Gp3	2	Planococcaceae_incertae_sedis	1
Gp13	2	Microvirga	1
Atopococcus	2	Leminorella	1
Clostridium sensu stricto	2	Ureibacillus	1
Lactobacillus	2	Pantoea	1
Bavariicoccus	2	Salinicoccus	1
Lysinibacillus	2	Pedobacter	1
Conexibacter	2	Nitrosospira	1
Conexibacter	2	Anaerovorax	1
Edaphobacter	1	Thermodesulforhabdus	1
Candidatus Solibacter	1	Planococcus	1
Candidatus Koribacter	1	Gaiella	1
Bacillariophyta	1	Byssovorax	1

TABELA SUPLEMENTAR 11. GÊNEROS ENCONTRADOS NA AMOSTRA AL.

Gênero	Reads	Gênero	Reads
Exiguobacterium	1348	Terribacillus	2
Serratia	823	Aliidiomarina	2
Enterobacter	606	Edwardsiella	2
Bacillus	504	Bhargavaea	2
Arthrobacter	378	Oceanobacillus	2
Aeromonas	348	Ureibacillus	2
Lysinibacillus	184	Conexibacter	2
Citrobacter	163	Telmatobacter	1
Viridibacillus	145	Candidatus Koribacter	1
Raoultella	127	Subdivision3 generaincertaesis	1
Staphylococcus	113	Spartobacteria genera incertaesis	1
Kluyvera	81	Sunxiuqinia	1
Acinetobacter	77	Desulfovirga	1
Lelliottia	76	Nitrospira	1
Klebsiella	76	Arenimonas	1
Pseudomonas	62	Agaricicola	1
Cronobacter	59	Ignavibacterium	1
Pantoea	47	Alcanivorax	1
Lonsdalea	45	Solibacillus	1
Gibbsiella	43	Paucisalibacillus	1
Erwinia	41	Caldanaerovirga	1
Domibacillus	29	Planomicrobium	1
Leclercia	29	Curvibacter	1
Renibacterium	26	Clostridium sensu stricto	1
Buttiauxella	24	Sulfuritalea	1
Salirhabdus	22	Sideroxydans	1
Anaerobacillus	12	Thioflavococcus	1
Salmonella	10	Falsibacillus	1
Planococcaceae incertaesis	9	Cedecea	1
Plesiomonas	8	Allobacillus	1
Salinicoccus	8	Obesumbacterium	1
Azotobacter	6	Lachnoanaerobaculum	1
Gp1	5	Ignavigranum	1
Azorhizophilus	5	Thalassobacillus	1
Alkalimonas	4	Pseudolabrys	1
Yokenella	4	Sandarakinorhabdus	1
Halalkalibacillus	4	Pandoraea	1
Trabulsiella	4	Acidisoma	1
Bavariicoccus	4	Geothermobacter	1
Isobaculum	4	Saccharococcus	1
Lacticigenium	4	Ktedonobacter	1
Phaseolibacter	4	Constrictibacter	1
Escherichia/Shigella	4	Sporosarcina	1

Azomonas	4	Thermacetogenium	1
Gp3	3	Kurthia	1
Yersinia	3	Nosocomiicoccus	1
Rummeliibacillus	3	Lactobacillus	1
Budvicia	3	Simkania	1
Tatumella	3	Catelicoccus	1
Tolumonas	3	Macrococcus	1
Terrimonas	3	Anaeromyxobacter	1
Rahnella	3	Gaiella	1
Mangrovibacter	3	Acaricomes	1
Gp2	2	Sinosporangium	1
Gp6	2	Rugosimonospora	1
Gemmatimonas	2	Zhihengliuella	1
Pragia	2	Geodermatophilus	1
Pluralibacter	2	Paraeggerthella	1

TABELA SUPLEMENTAR 12. GÊNEROS ENCONTRADOS NA AMOSTRA BR.

Gênero	Reads	Gênero	Reads
Proteus	1244	Gp5	1
Enterobacter	942	Gp7	1
Staphylococcus	668	Bacillariophyta	1
Bacillus	645	Jeotgalicoccus	1
Raoultella	250	Planococcaceae incertae sedis	1
Salmonella	225	Skermanella	1
Klebsiella	188	Nitrospira	1
Serratia	115	Acinetobacter	1
Pantoea	109	Sphingomonas	1
Lysinibacillus	94	Oxalophagus	1
Erwinia	89	Rhodovibrio	1
Citrobacter	85	Alcanivorax	1
Viridibacillus	68	Planctomyces	1
Salinicoccus	50	Hafnia	1
Aeromonas	31	Pullulanibacillus	1
Halalkalibacillus	30	Phaseolibacter	1
Yokenella	28	Ferritrophicum	1
Cosenzaea	26	Rhodoplanes	1
Lelliottia	23	Filobacillus	1
Thalassobacillus	22	Frateuria	1
Macrococcus	19	Cedecea	1
Bavariicoccus	17	Dongia	1
Terribacillus	13	Sideroxydans	1
Leclercia	10	Psychrobacillus	1
Cronobacter	9	Desulfoviregula	1

Salirhabdus	9	Gracilibacillus	1
Oceanobacillus	8	Chitinophaga	1
Solibacillus	7	Desulfobacca	1
Allobacillus	7	Domibacillus	1
Nosocomiicoccus	6	Azotobacter	1
Isobaculum	6	Tatumella	1
Buttiauxella	6	Tumebacillus	1
Granulicatella	6	Solitalea	1
Gp1	5	Planococcus	1
Lactobacillus	5	Terrimonas	1
Exiguobacterium	5	Flaviumibacter	1
Gibbsiella	4	Niastella	1
Gp3	3	Pluralibacter	1
Spartobacteria generaincertaesis	3	Paralactobacillus	1
Bhargavaea	3	Aquicella	1
Lacticigenium	3	Ectothiorhodosinus	1
Gaiella	3	Lonsdalea	1
Gp6	2	Oceanisphaera	1
Trabulsiella	2	Solirubrobacter	1
Burkholderia	2	Conexibacter	1
Anaerobacillus	2	Kofleria	1
Geobacter	2	Streptacidiphilus	1
Ktedonobacter	2	Cellulomonas	1
Rummeliibacillus	2	Arthrobacter	1
Pseudomonas	2	Sinomonas	1
Kluyvera	2	Mycobacterium	1
WPS-1 generaincertaesis	1	Cryptosporangium	1
Gp2	1	Actinomadura	1
Candidatus Solibacter	1		

TABELA SUPLEMENTAR 13. GÊNEROS ENCONTRADOS NA AMOSTRA BA.

Gênero	Reads	Gênero	Reads
Serratia	735	Yersinia	3
Arthrobacter	595	Thalassobacillus	2
Raoultella	269	Halalkalibacillus	2
Citrobacter	266	Gp7	1
Pantoea	164	Bacillariophyta	1
Bacillus	161	Yokenella	1
Exiguobacterium	95	Isobaculum	1
Enterobacter	78	Allobacillus	1
Cronobacter	72	Clostridium sensu stricto	1
Erwinia	54	Geothermobacter	1
Renibacterium	42	Kosakonia	1

Salmonella	39	Neosassa	1
Gibbsiella	16	Mangrovibacter	1
Lonsdalea	15	Escherichia/Shigella	1
Klebsiella	13	Diaphorobacter	1
Salirhabdus	9	Sporosarcina	1
Leclercia	4	Rahnella	1
Domibacillus	4	Fervidicella	1
Phaseolibacter	4	Terribacillus	1
Trabulsiella	4	Lactobacillus	1
Lacticigenium	4	Alcanivorax	1
Anaerobacillus	3	Sorangium	1
Kluyvera	3		

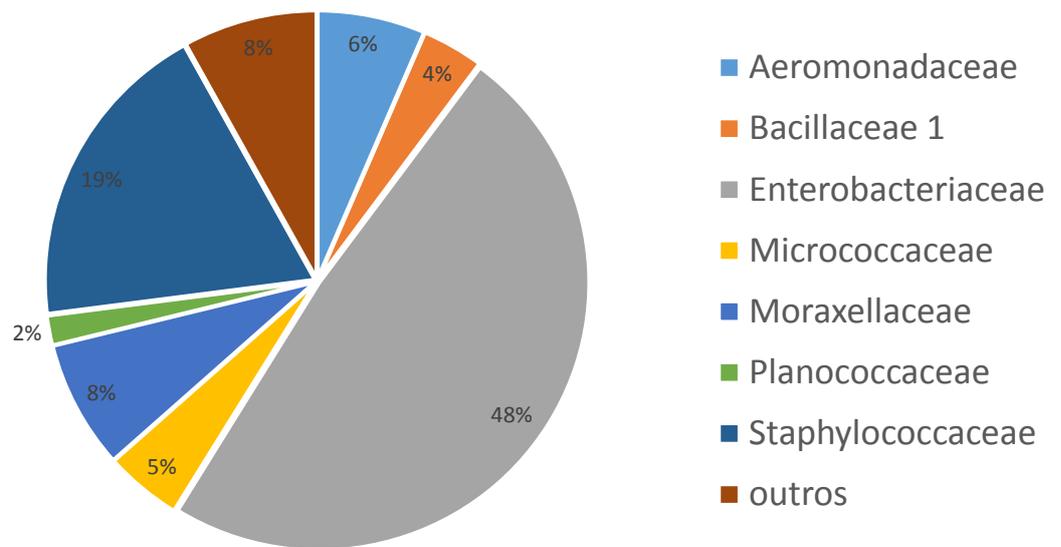
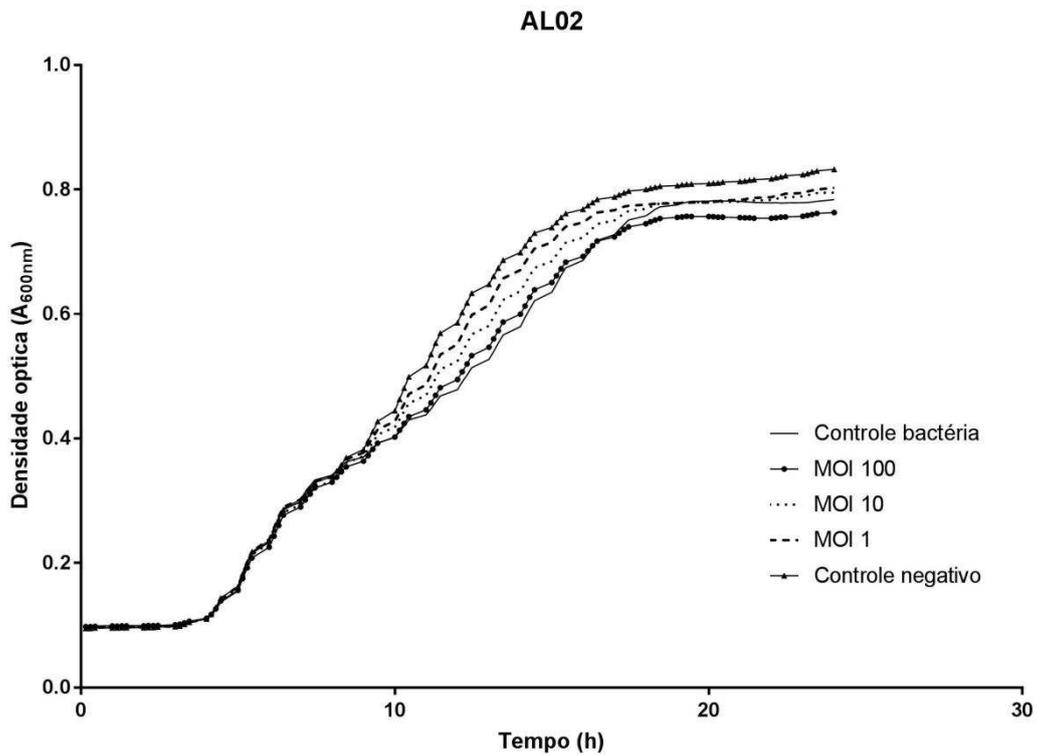
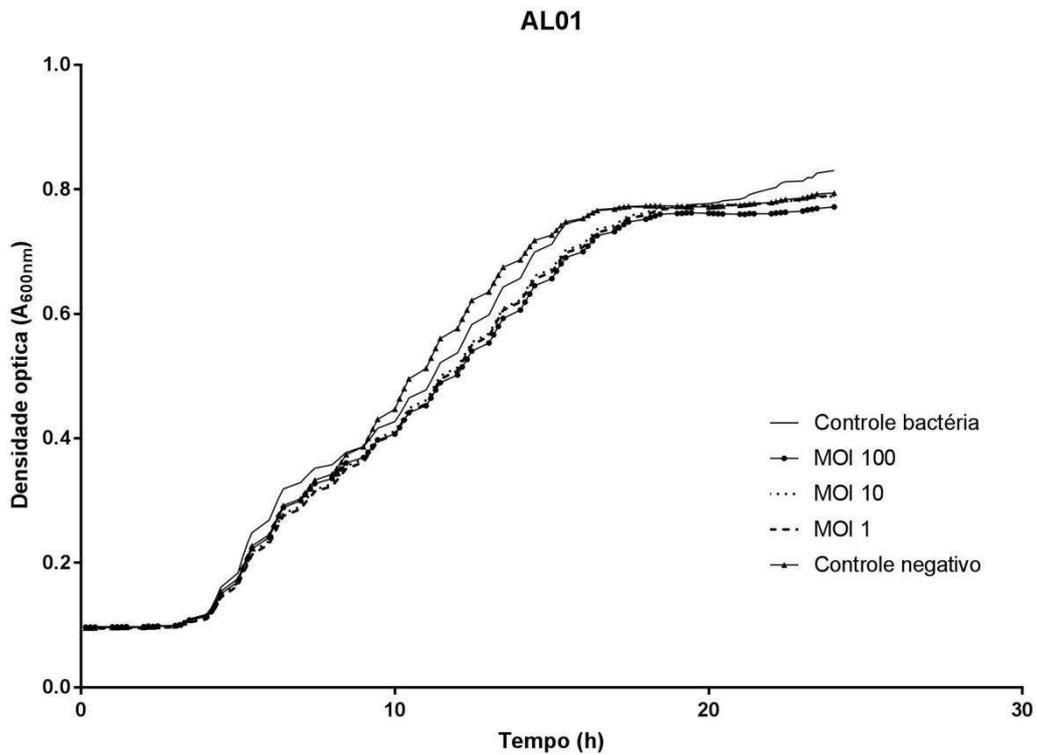
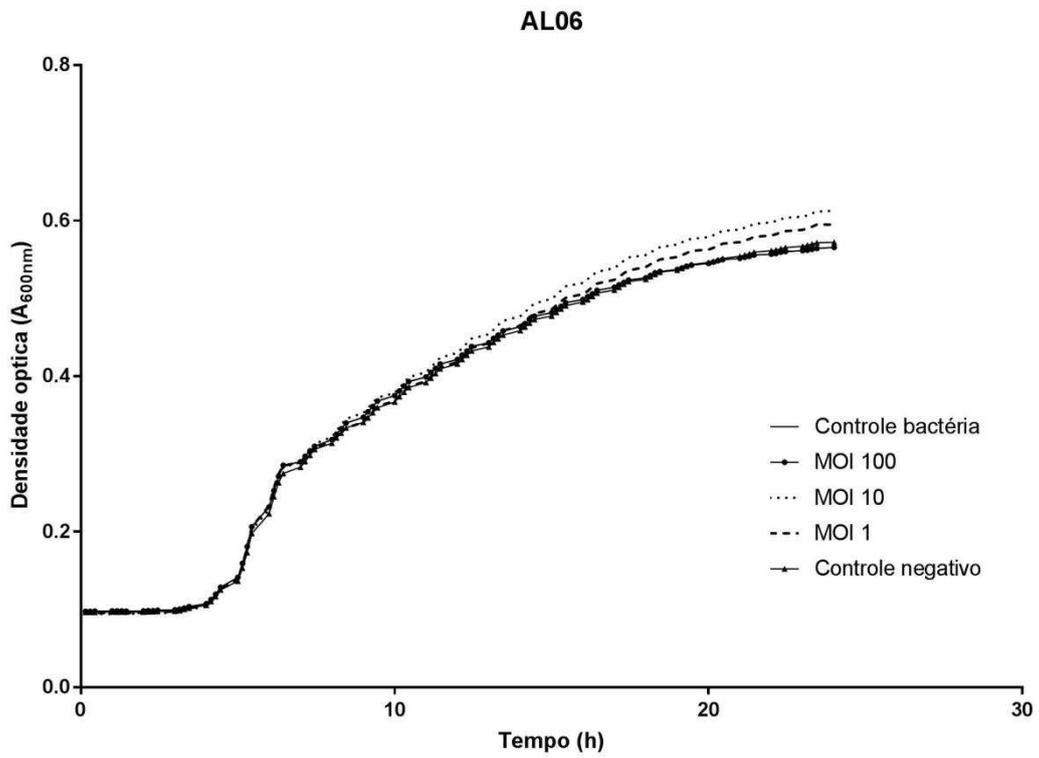
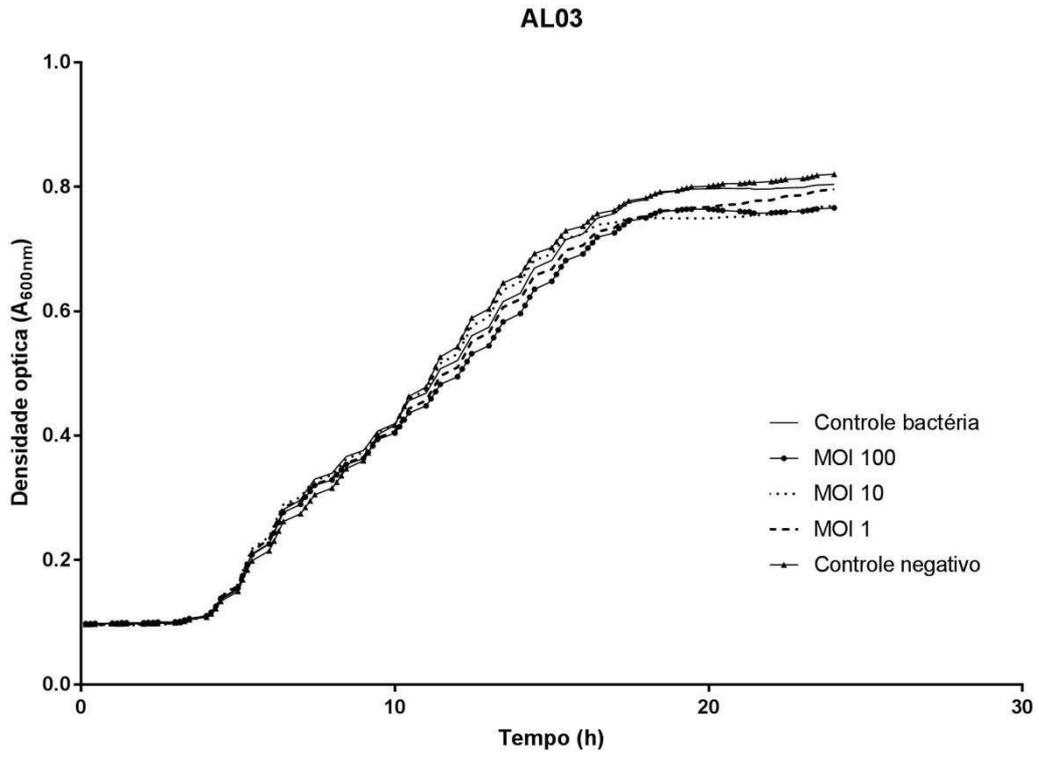
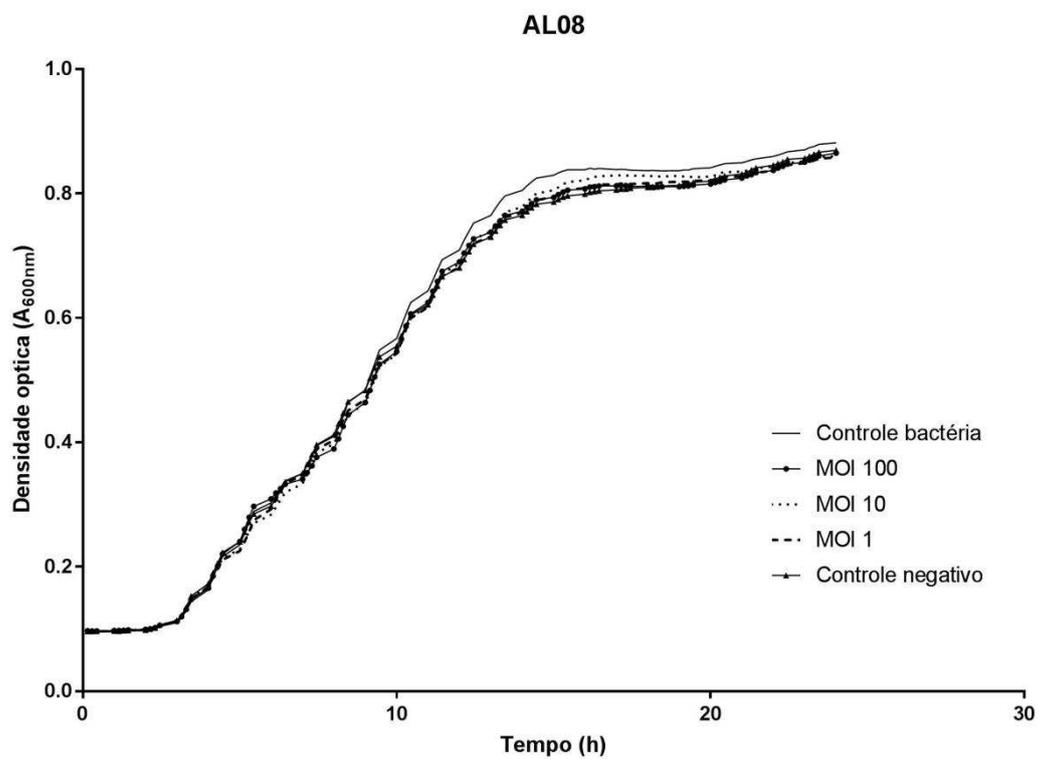
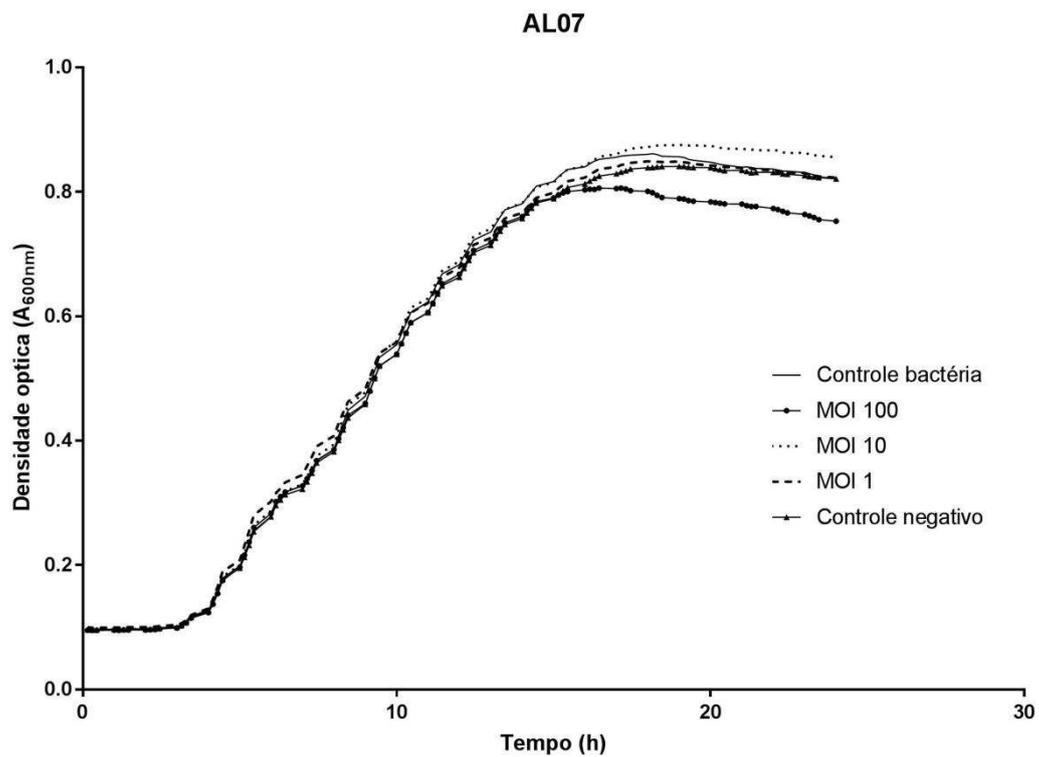


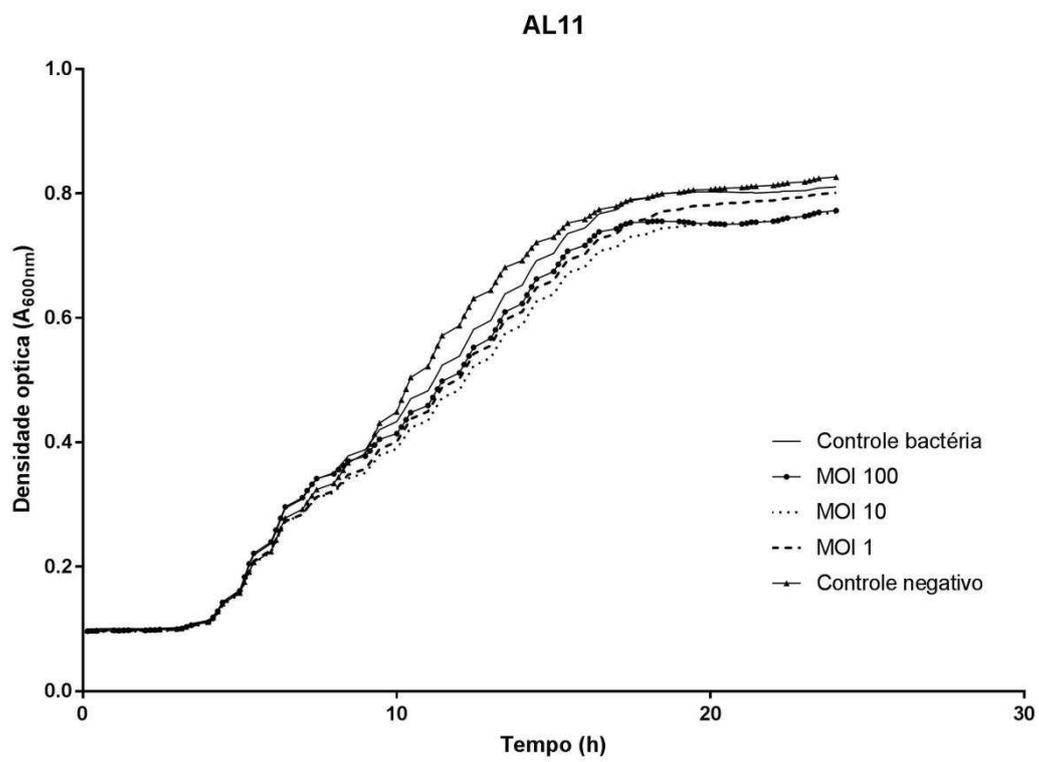
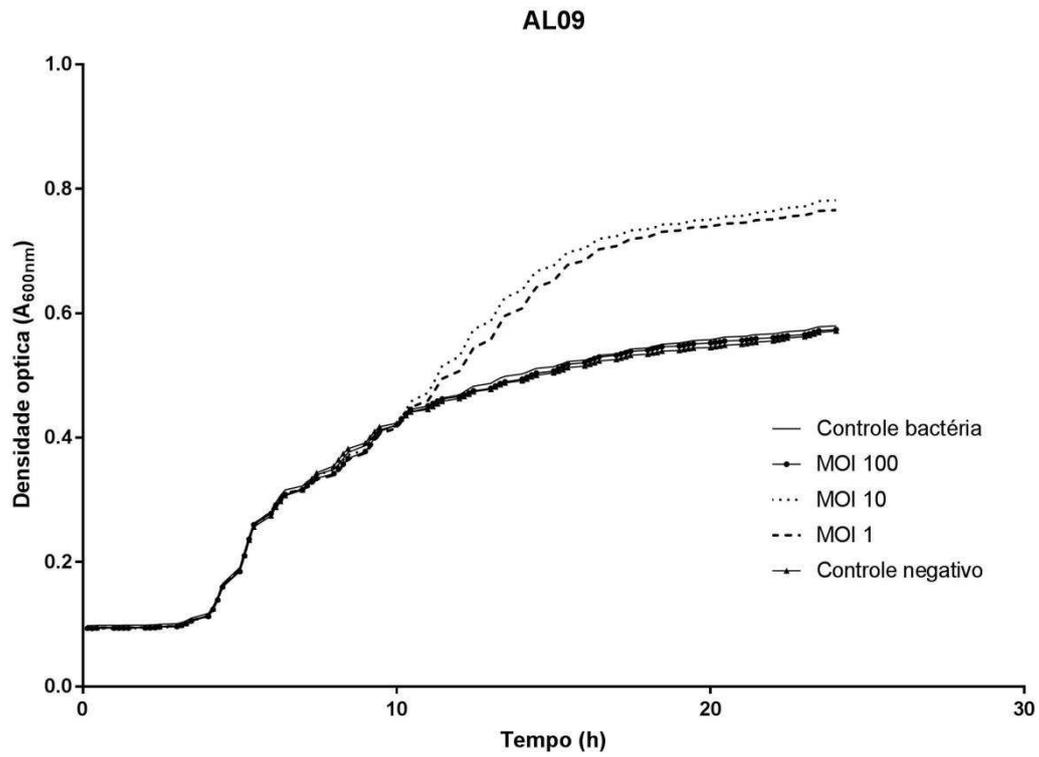
Figura suplementar 02. Abundância em porcentagem absoluta das principais famílias do domínio Bacteria do RTE como todo.

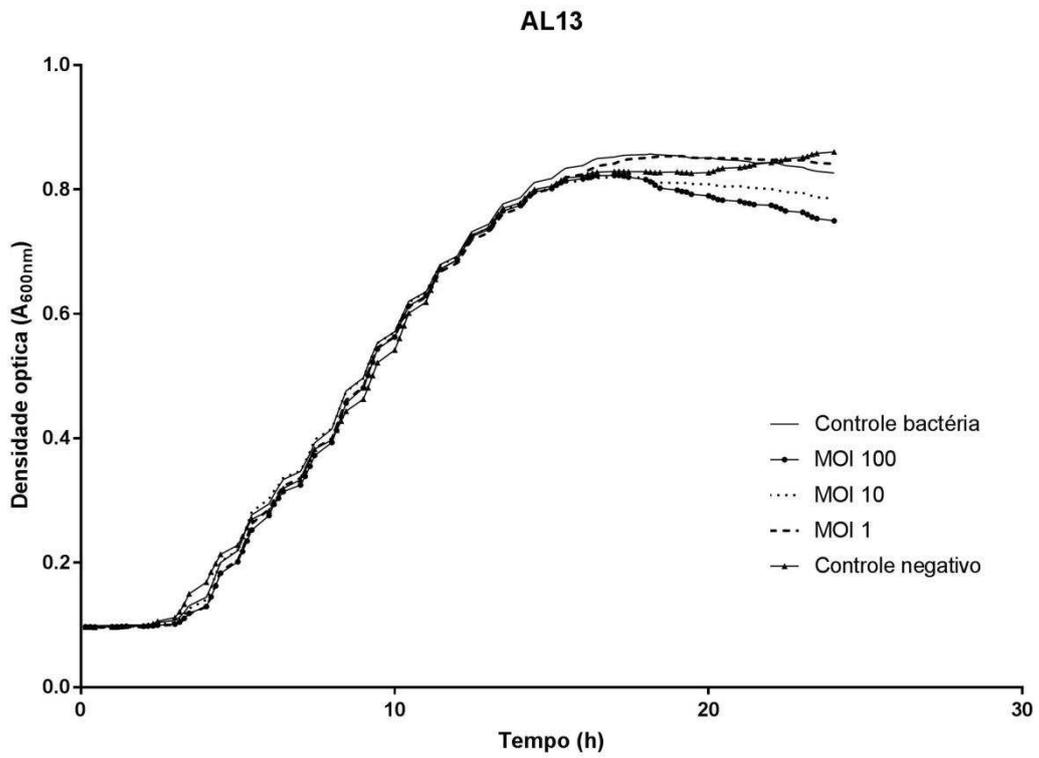
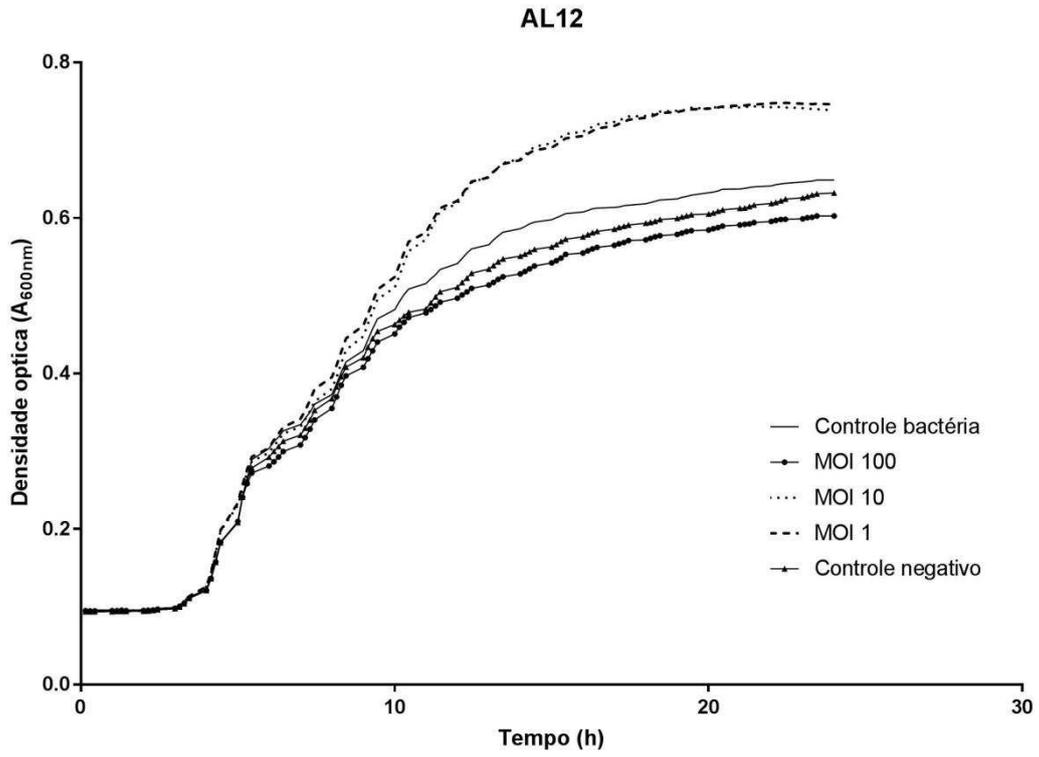
CURVAS DE CRESCIMENTO. As figuras abaixo representam a média de curvas de crescimento de densidade óptica (DO_{600}) dos isolados provenientes da salada no pote produzida em Viçosa-MG, inoculados com diferentes concentrações (MOI) do coquetel de fagos e os controles.

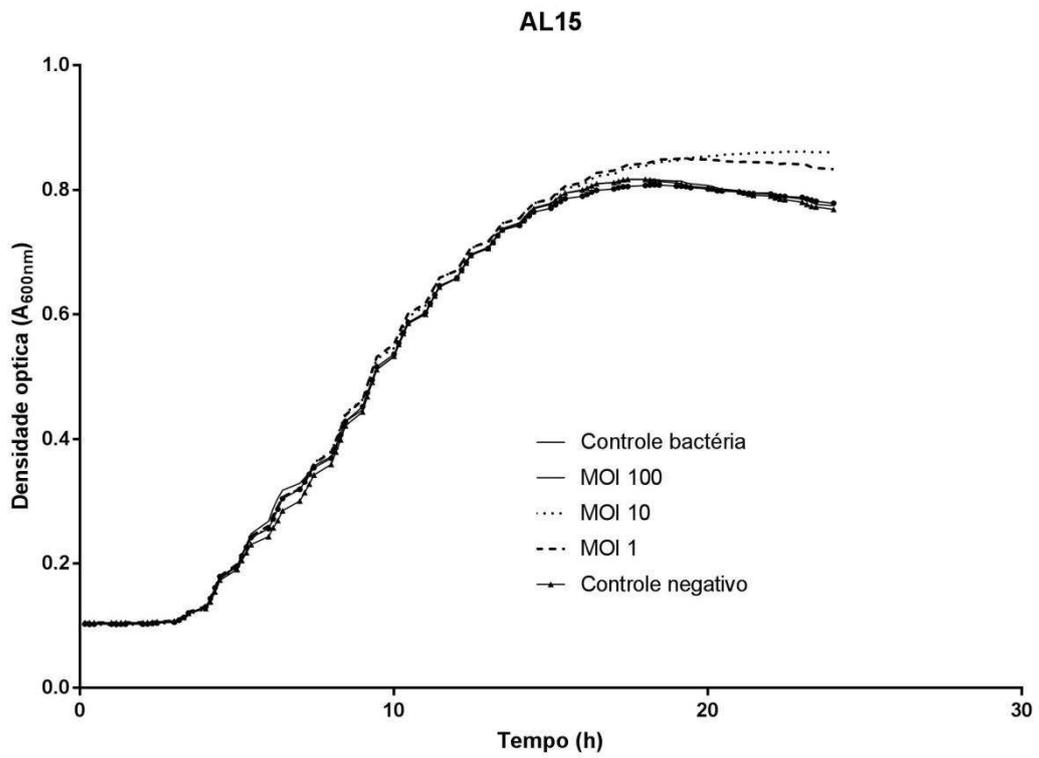
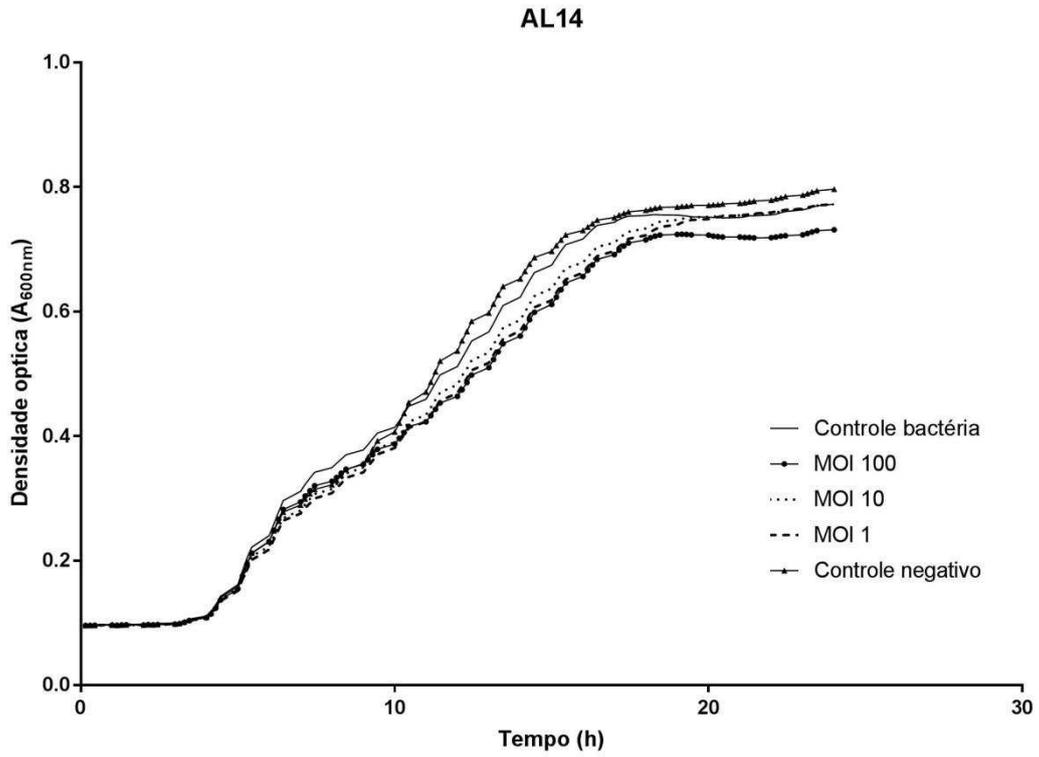


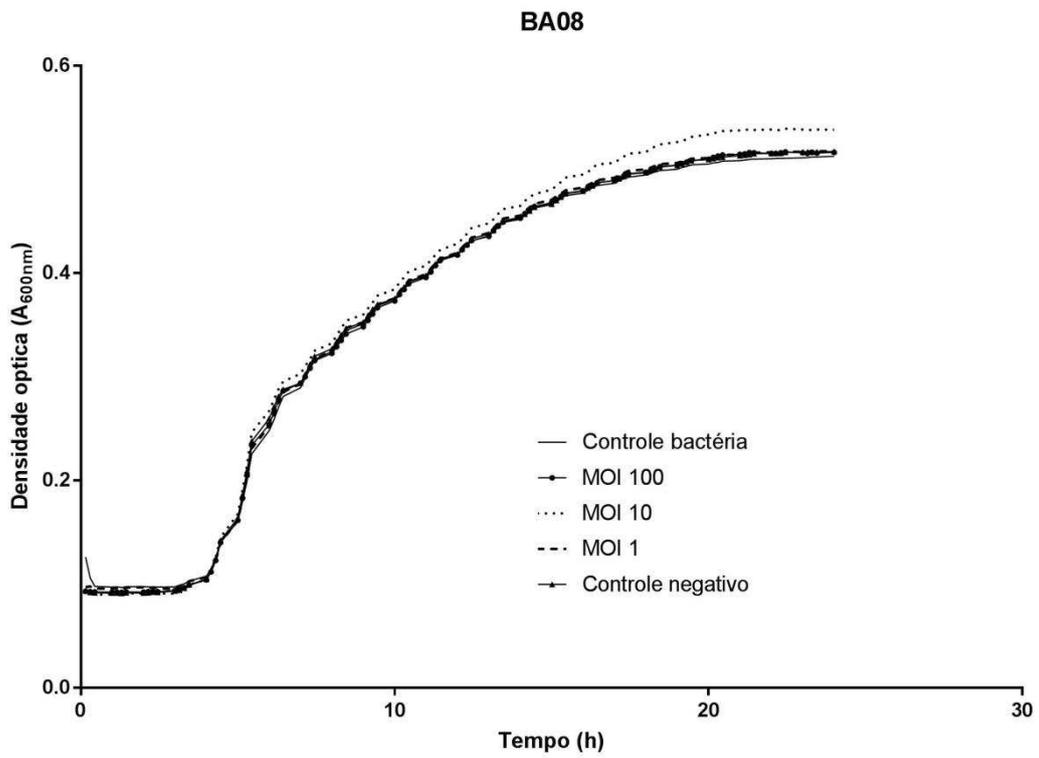
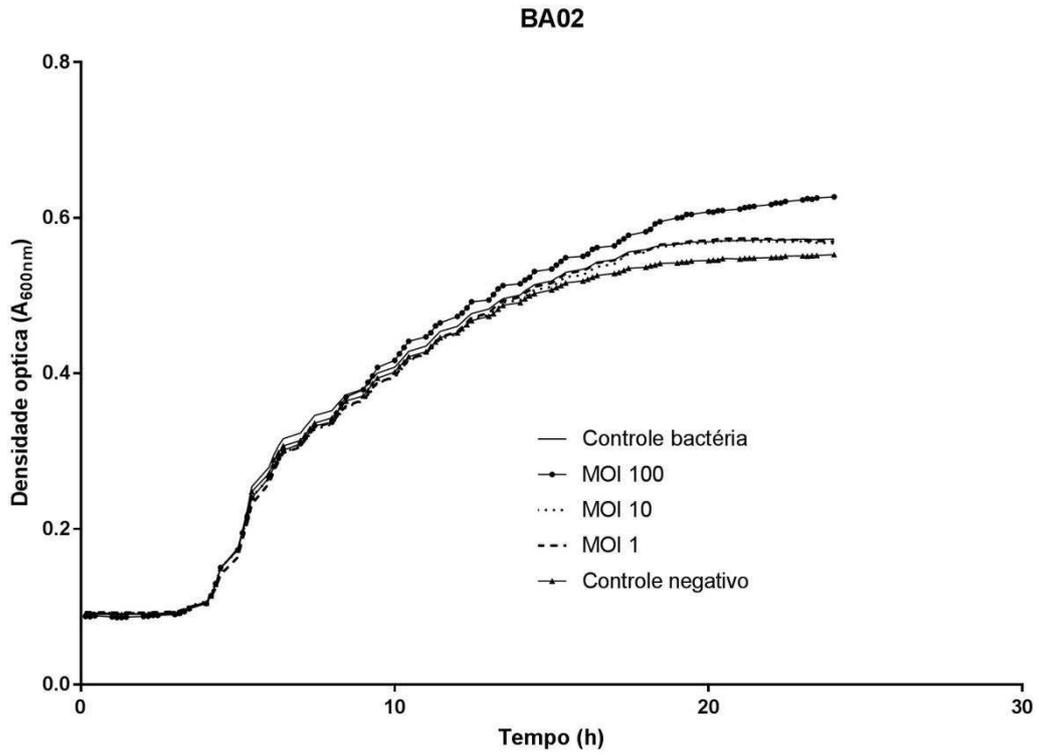


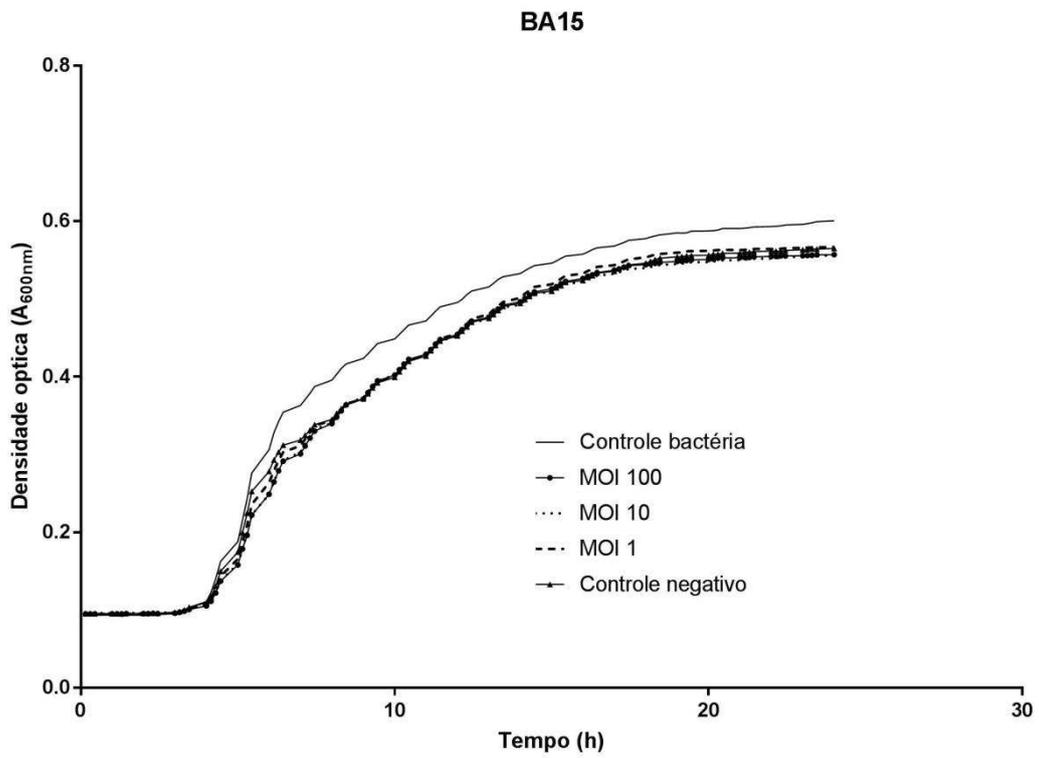
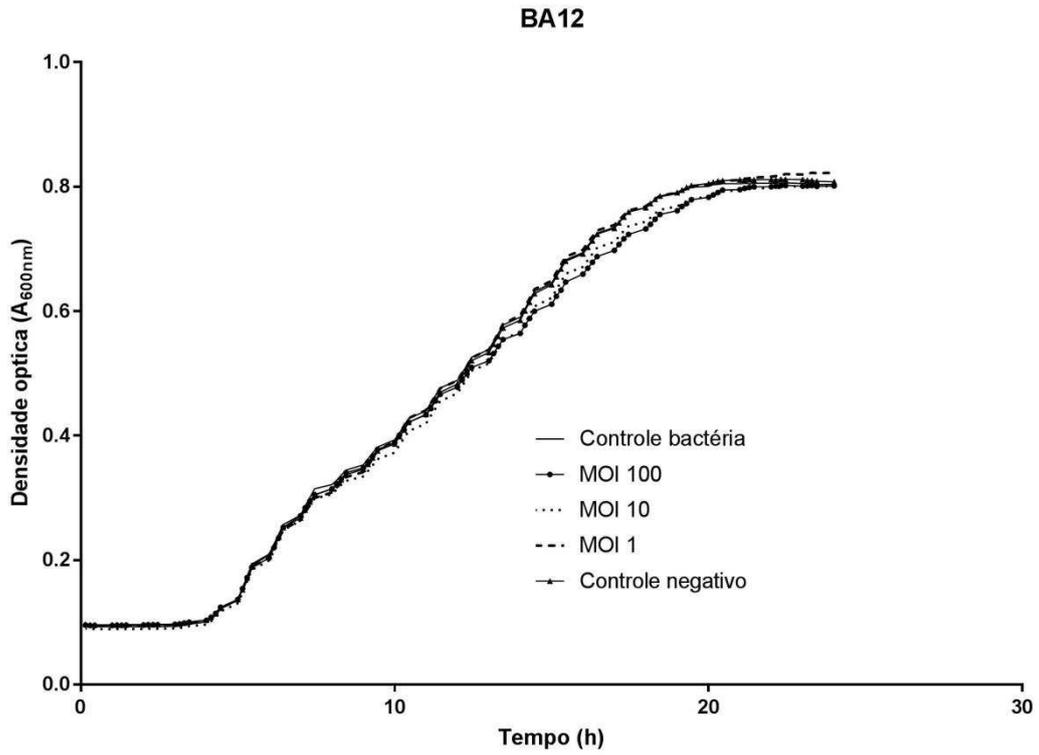


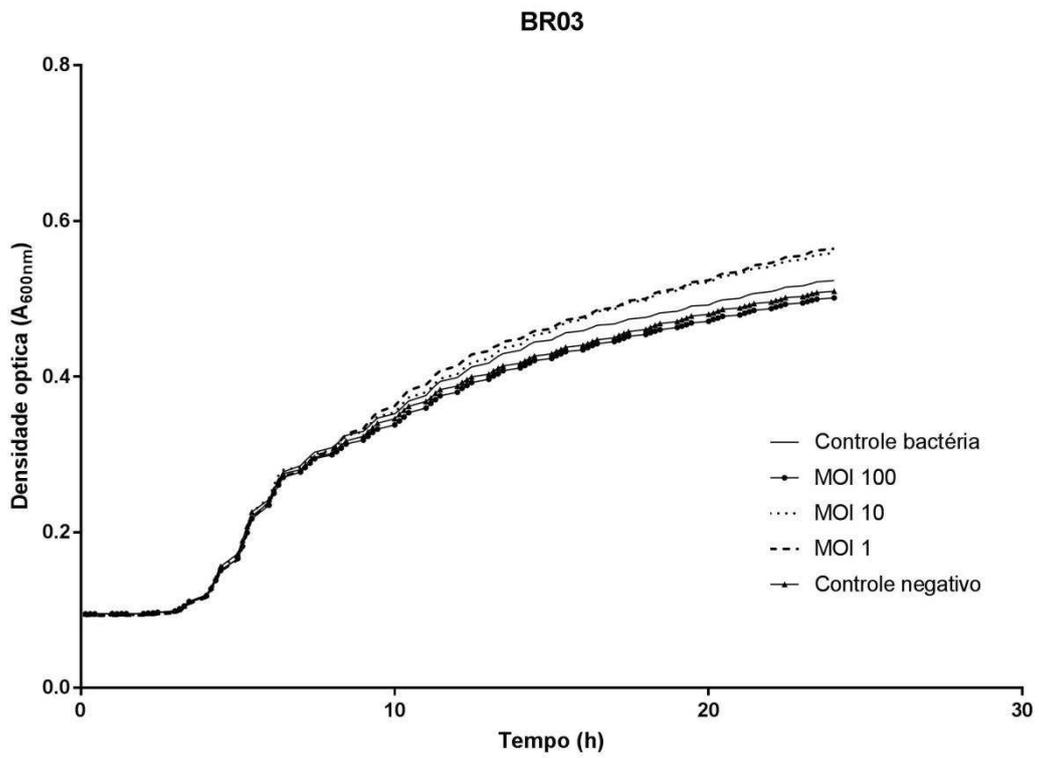
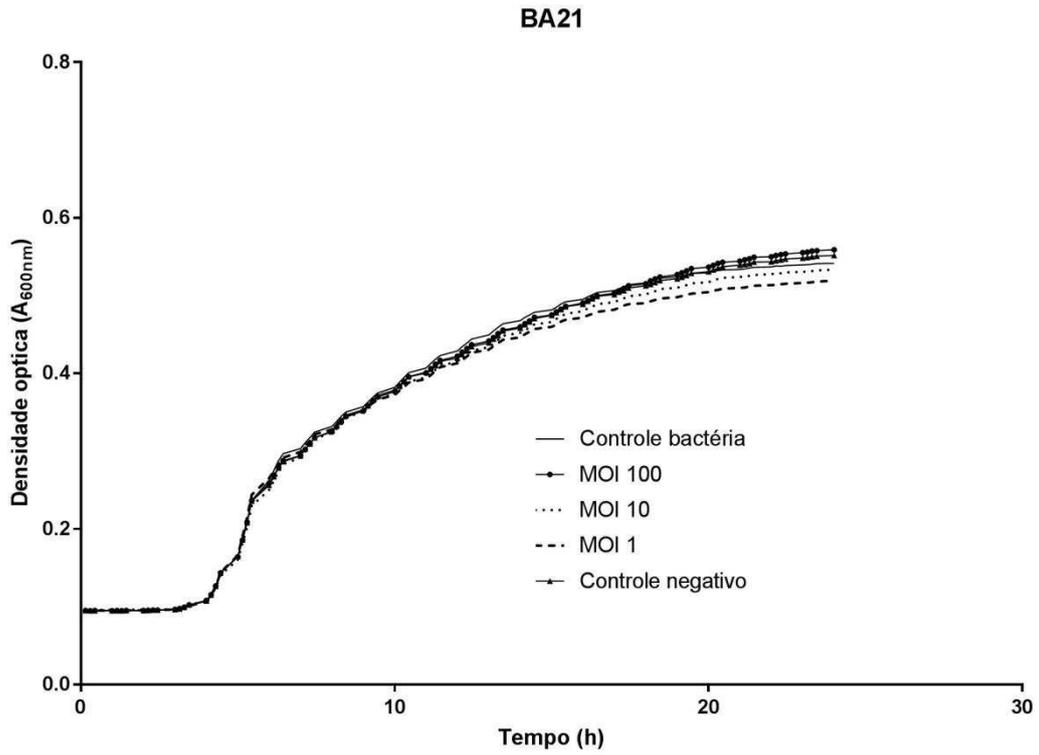


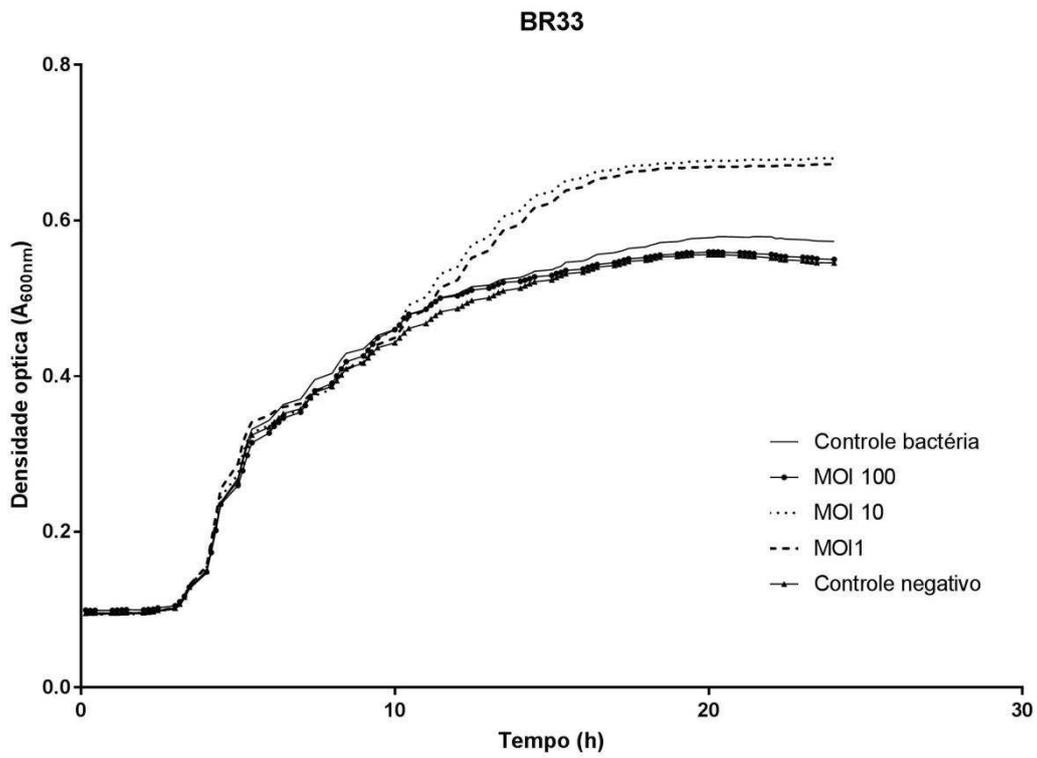
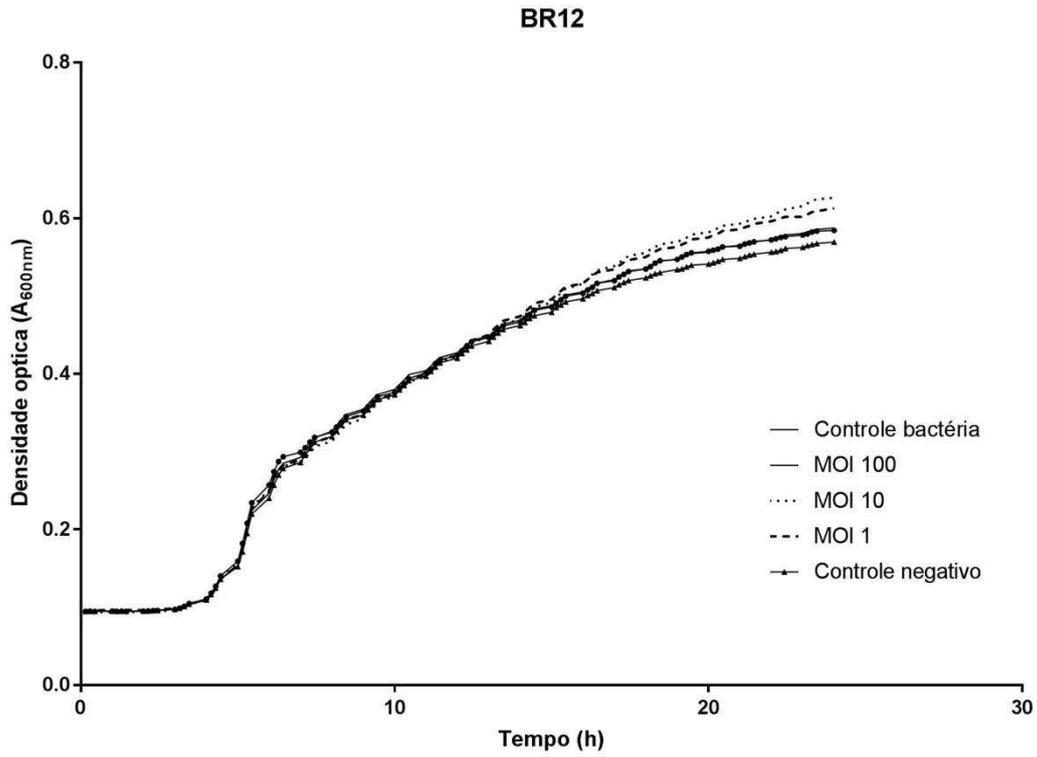


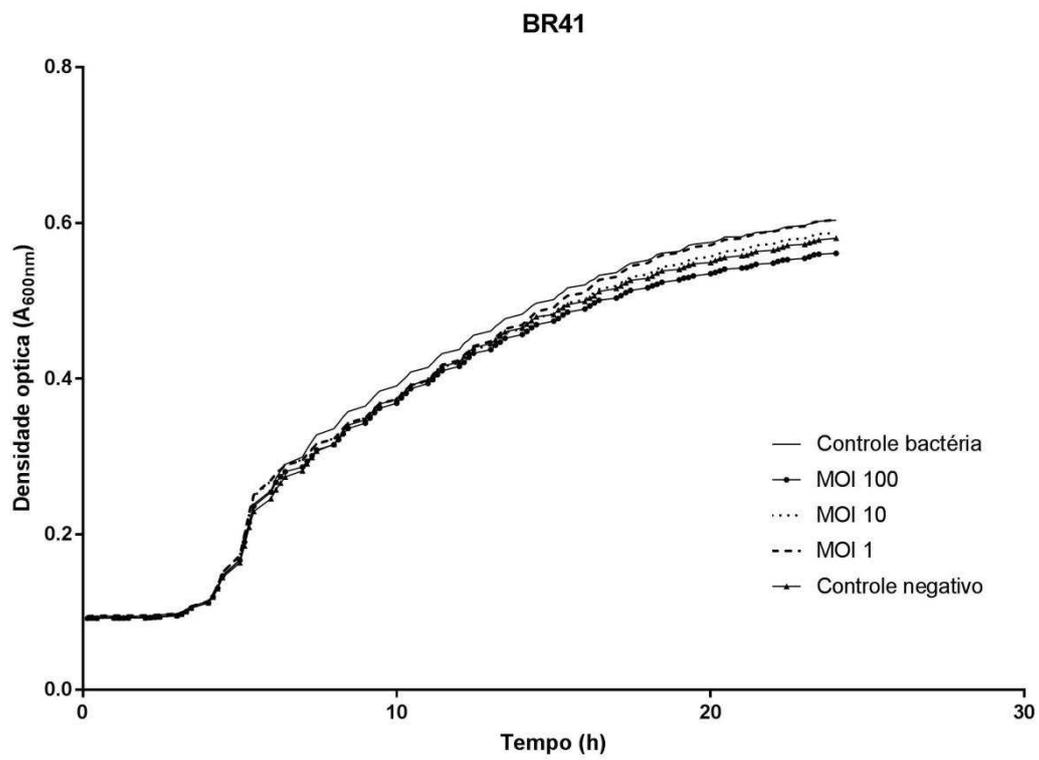
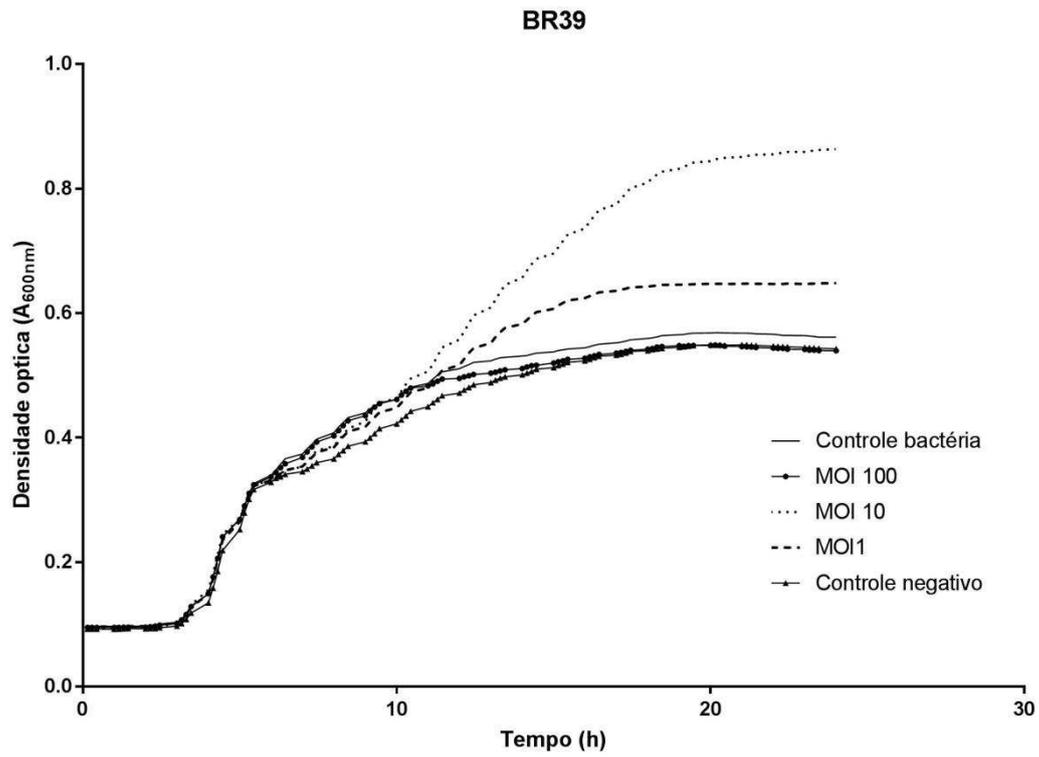




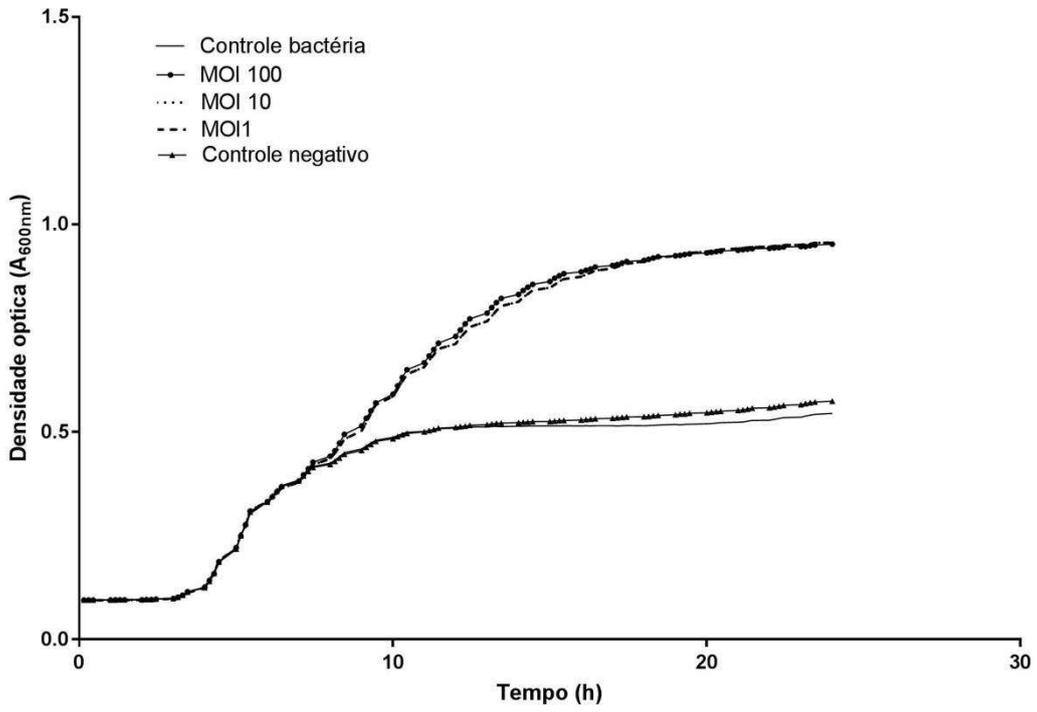




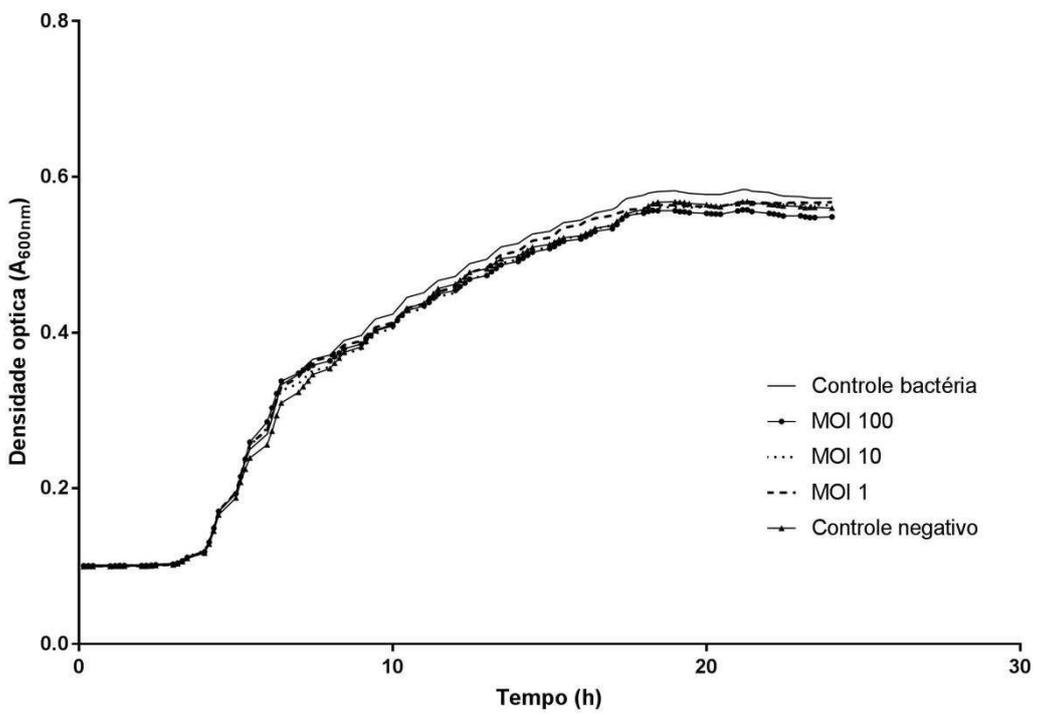


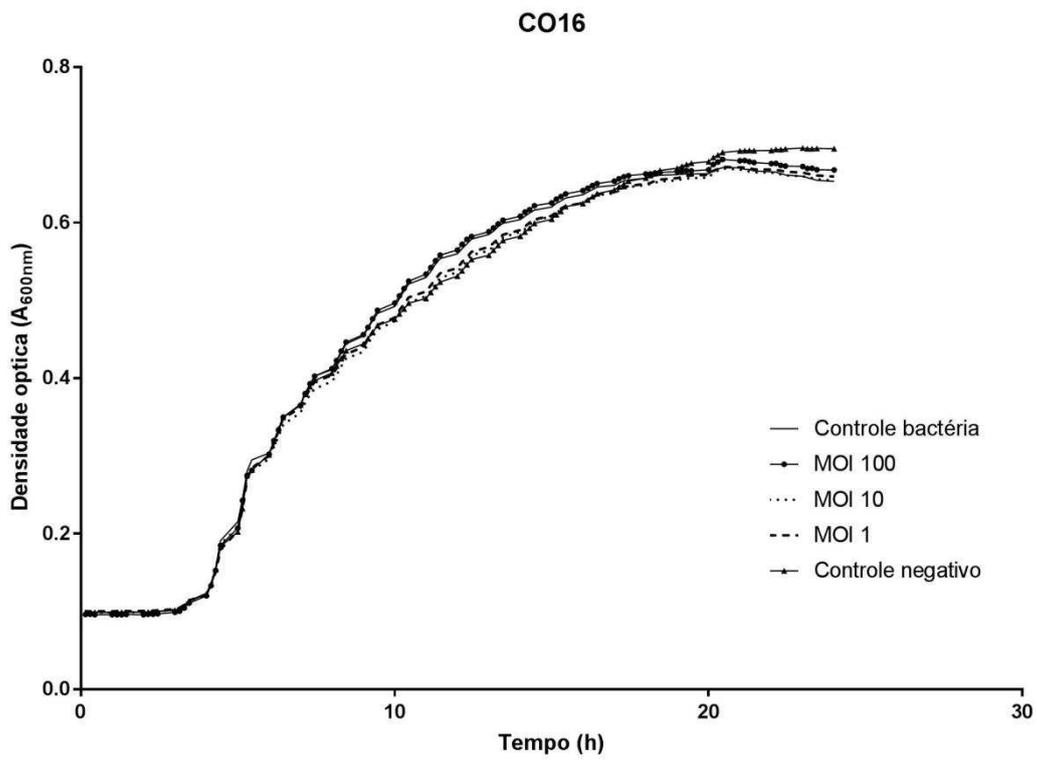
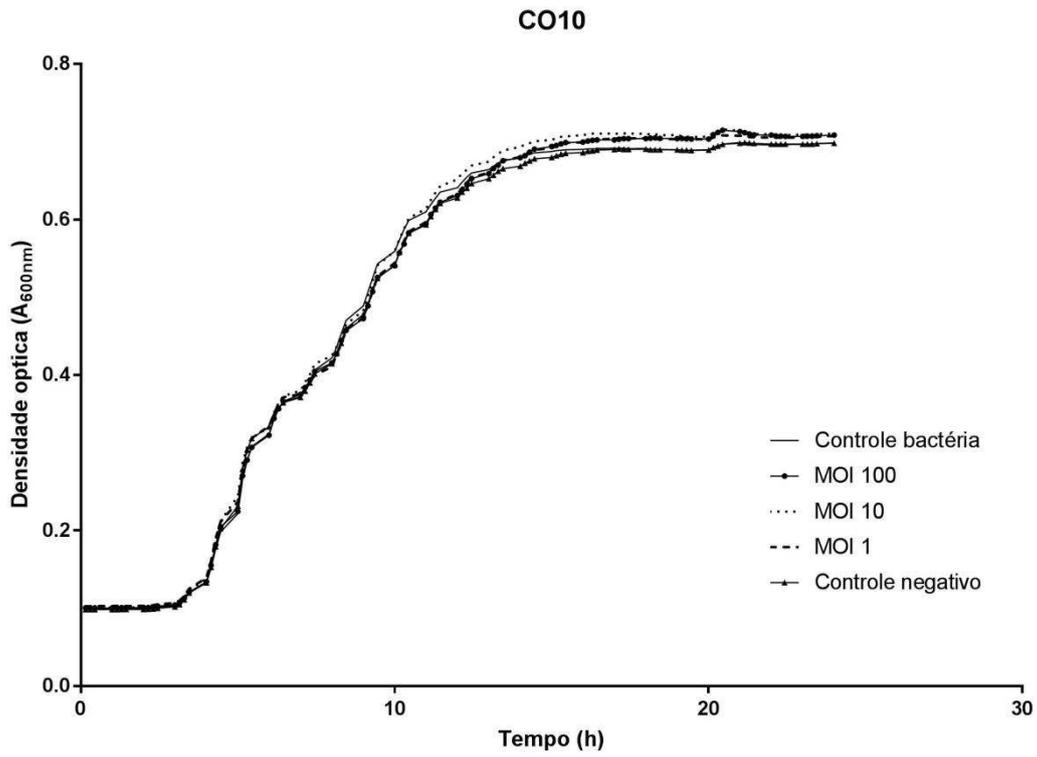


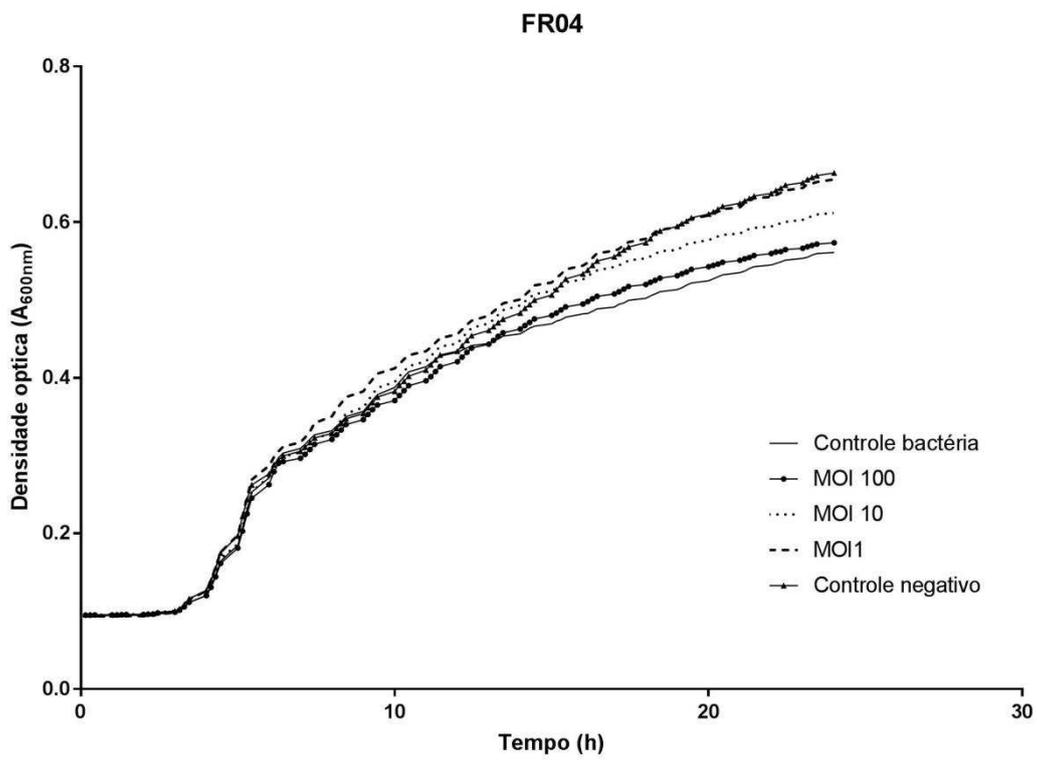
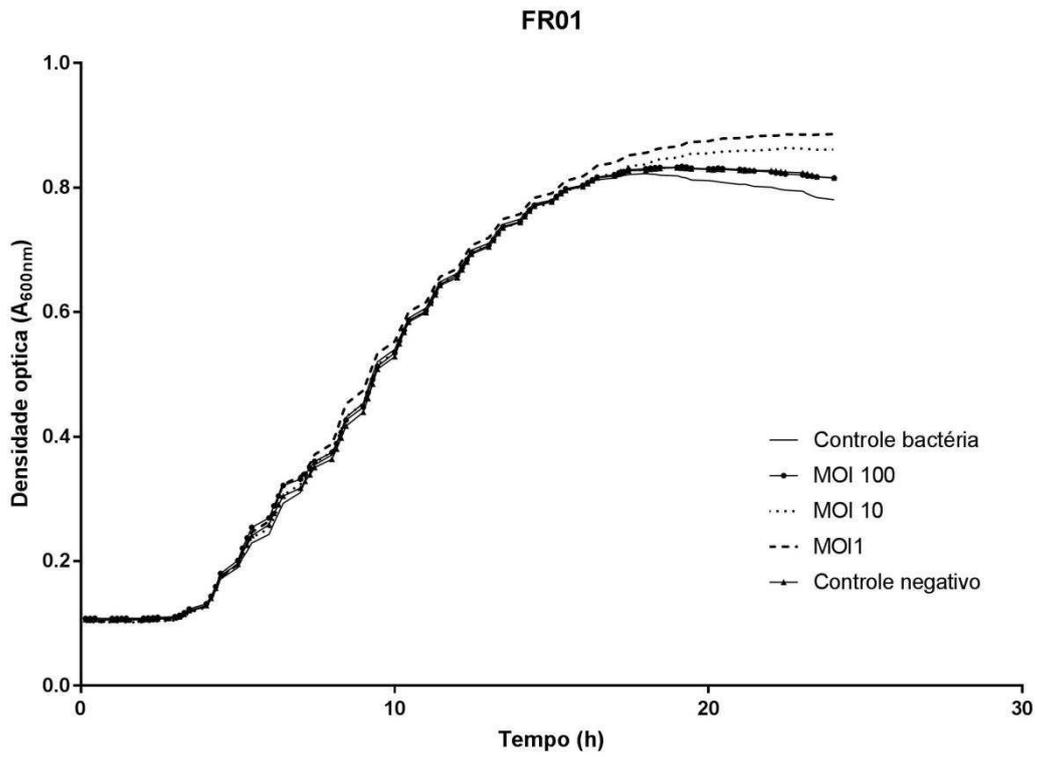
BR47

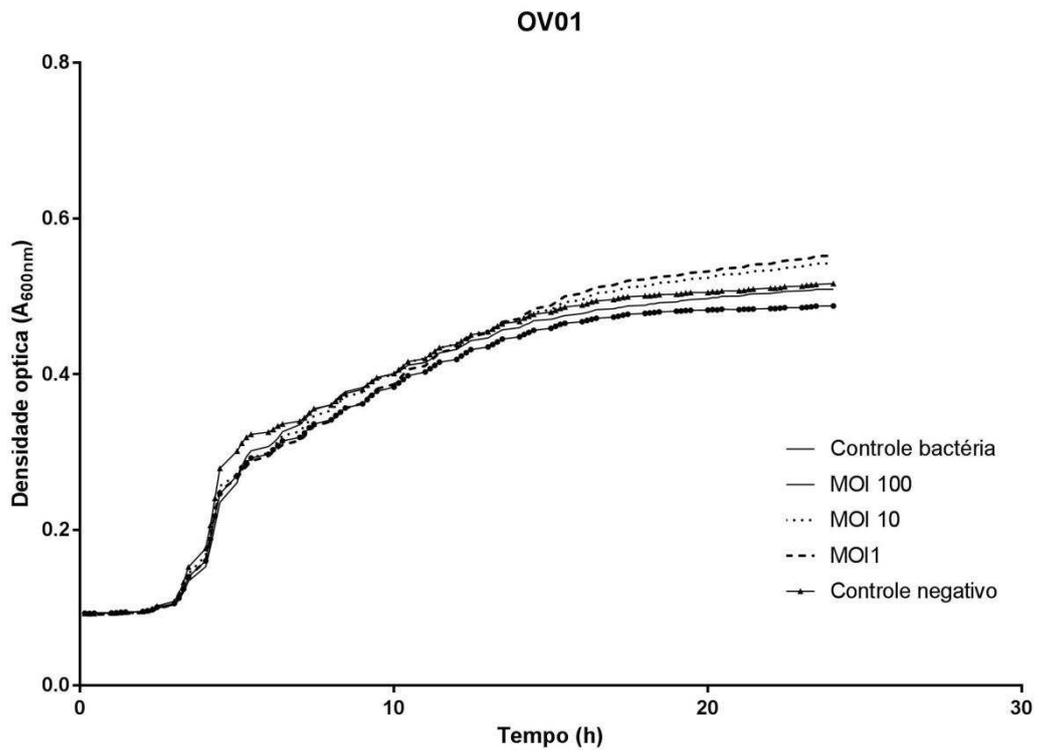
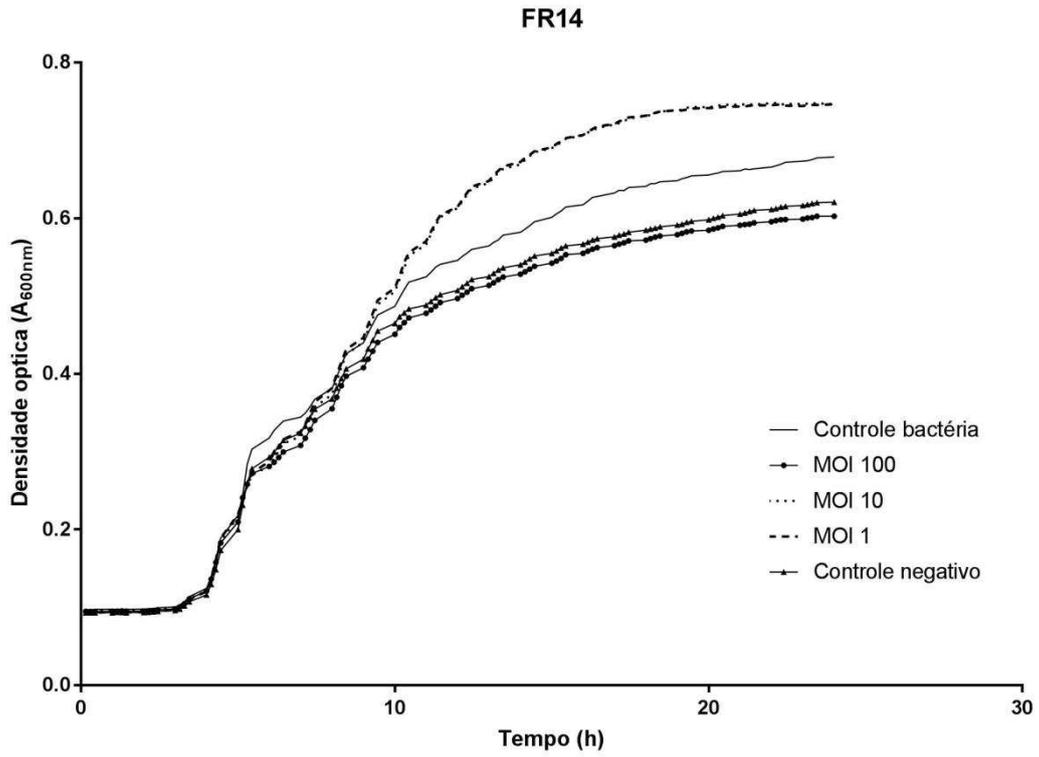


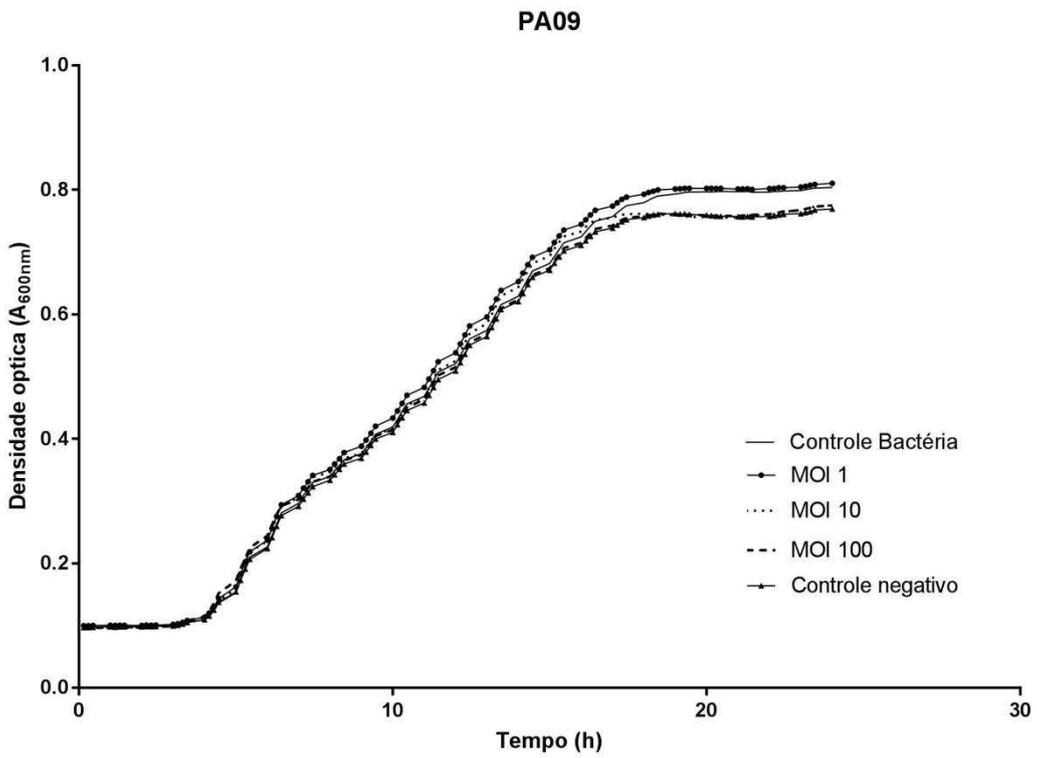
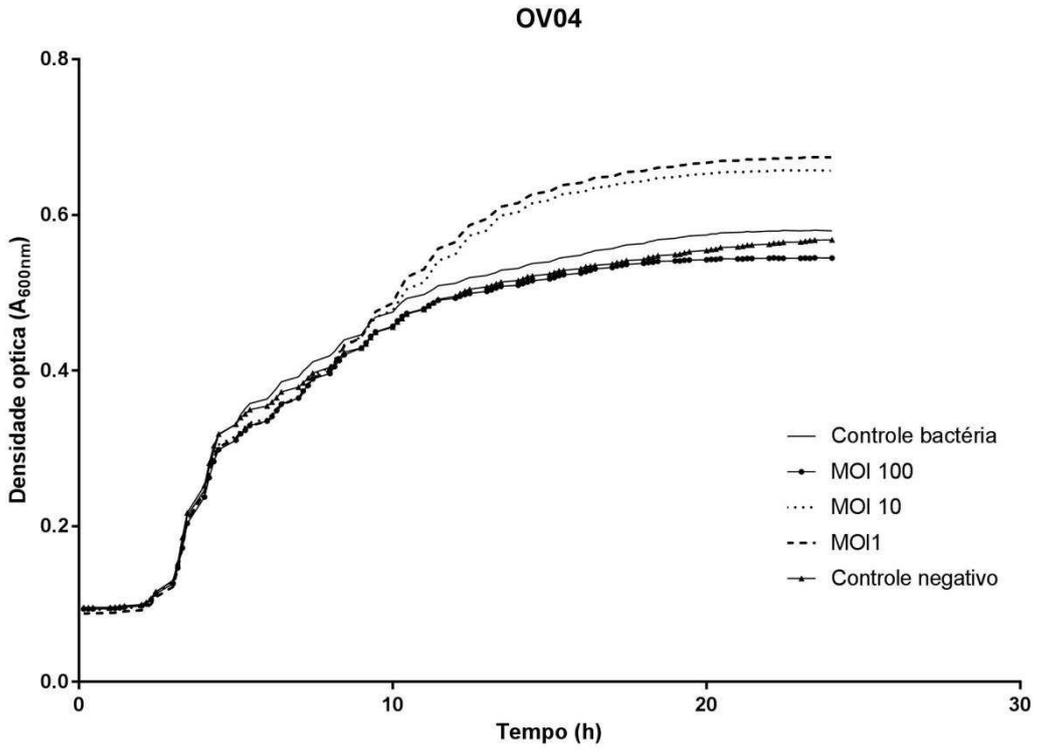
CO04

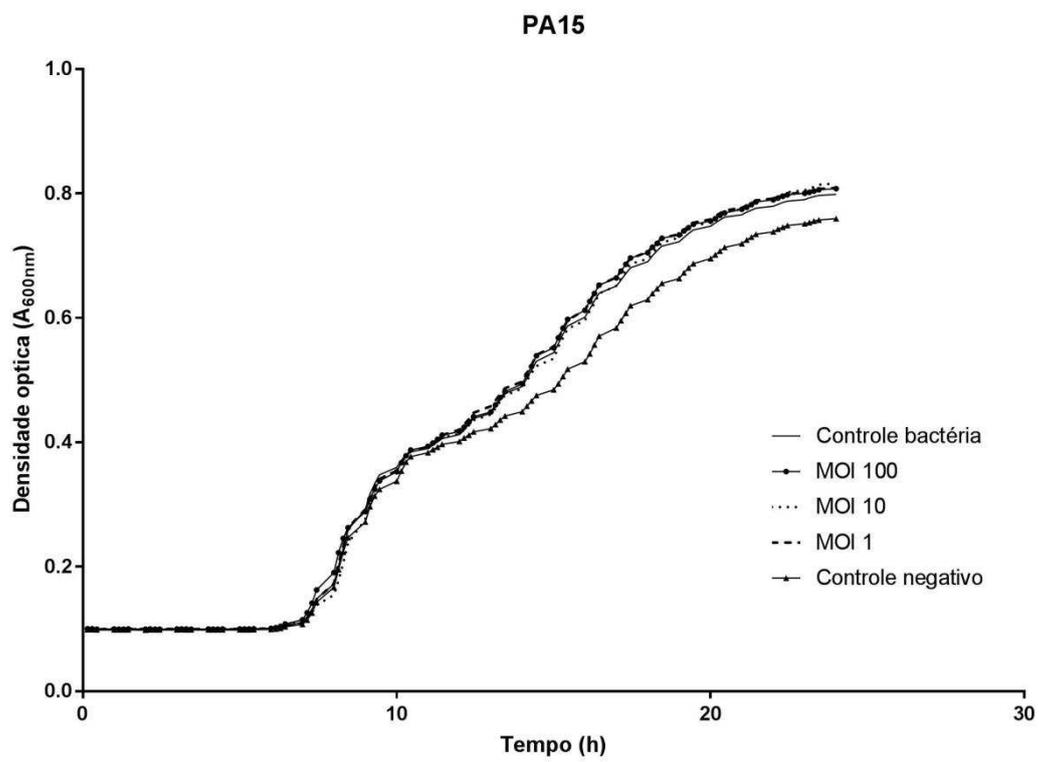
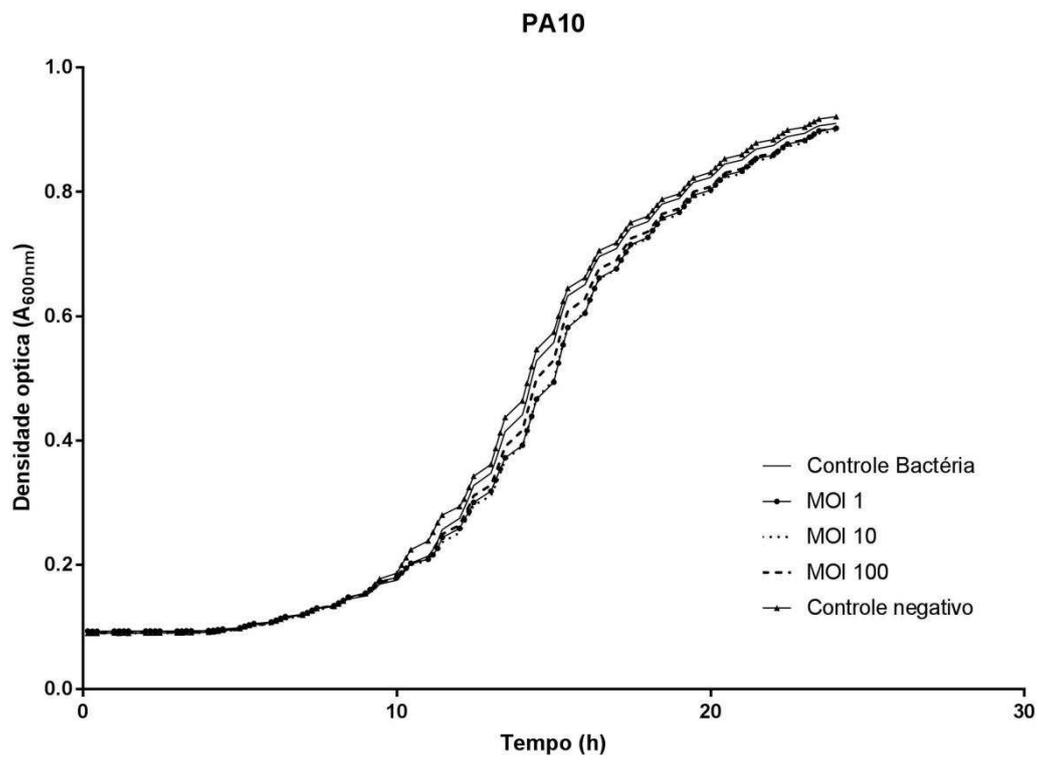












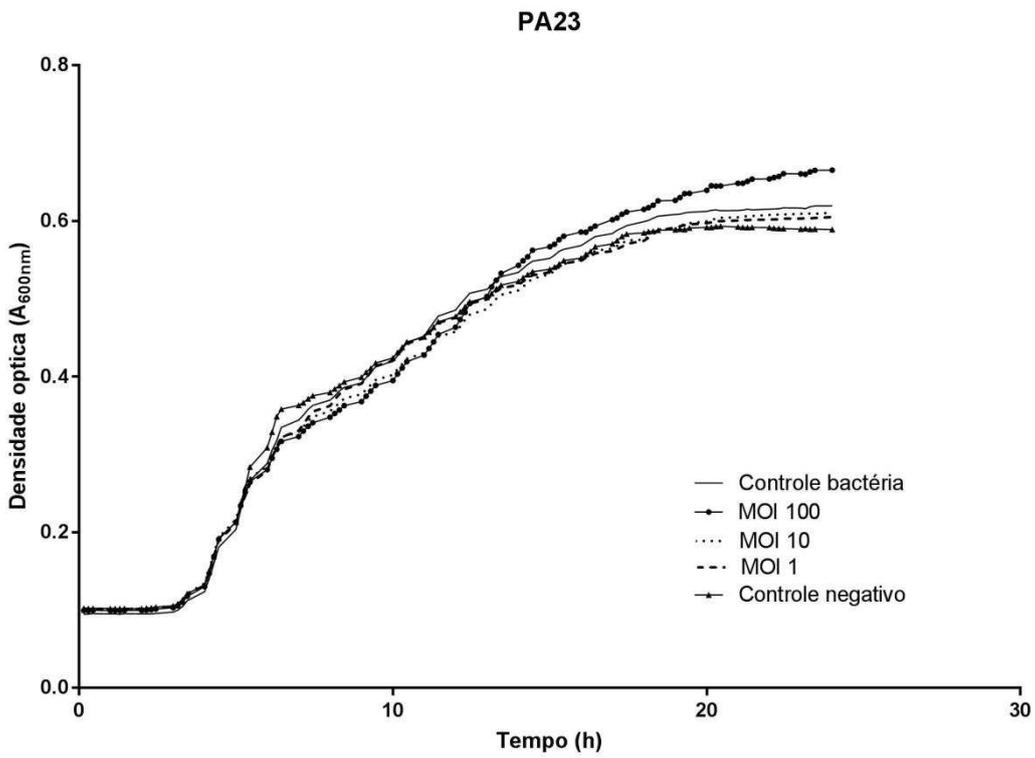
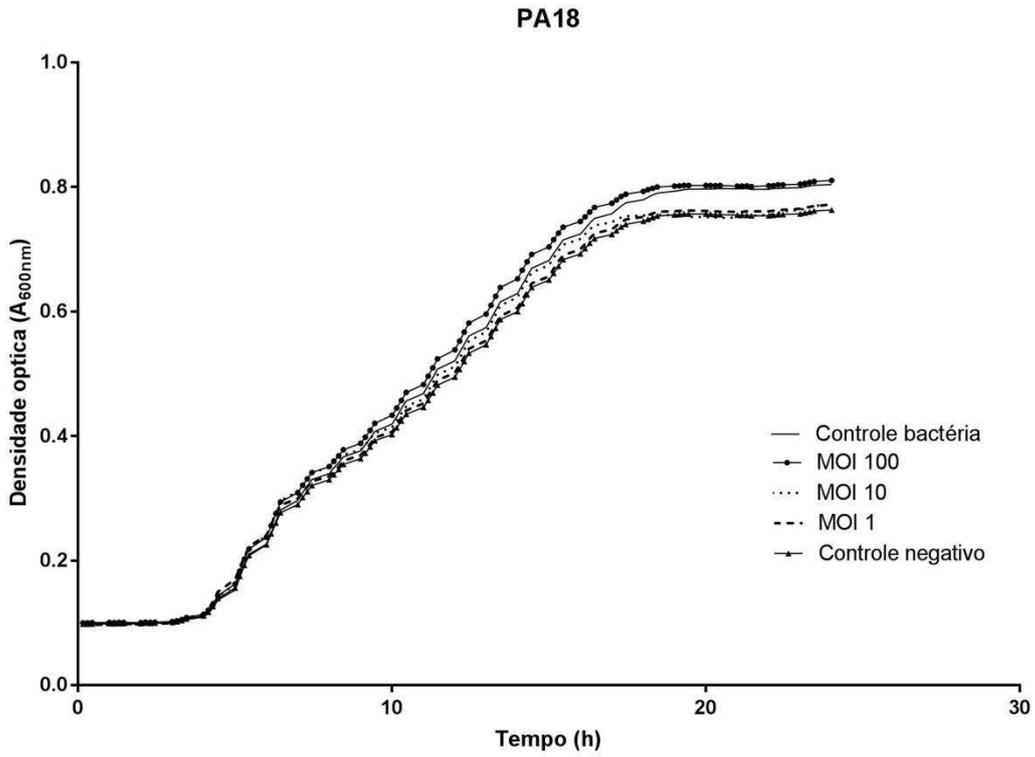


Tabela 14. Teste de médias entre os tratamentos de diferentes concentrações virais dos isolados.

Isolados	Tratamentos				
	CB	MOI 100	MOI 10	MOI 1	CN
AL01	0.8303 a	0.7716 a	0.7888 a	0.7896 a	0.7941 a
AL02	0.7837 bc	0.7630 c	0.7949 b	0.8029 b	0.8324 a
AL03	0.8040 ab	0.7662 b	0.7692 b	0.7962 ab	0.8202 a
AL04	0.5329 a	0.1553 c	0.2401 b	0.2735 b	0.5362 a
AL05	0.5840 a	0.1950 b	0.2368 b	0.3129 ab	0.5459 a
AL06	0.5654 b	0.5654 b	0.6126 a	0.5948 ab	0.5719 b
AL07	0.8213 a	0.7527 b	0.8556 a	0.8228 a	0.8209 a
AL08	0.8812 a	0.8647 a	0.8602 a	0.8582 a	0.8693 a
AL09	0.5796 b	0.5738 b	0.7815 a	0.7658 a	0.5714 b
AL11	0.8105 ab	0.7723 b	0.7691 b	0.8011 ab	0.8266 a
AL12	0.6488 b	0.6026 b	0.7384 a	0.7461 a	0.6321 b
AL13	0.8264 ab	0.7496 c	0.7856 bc	0.8411 a	0.8602 a
AL14	0.7723 ab	0.7312 b	0.7722 ab	0.7725 ab	0.7965 a
AL15	0.7744 b	0.7785 b	0.8603 a	0.8332 a	0.7685 b
BA02	0.5728 b	0.6270 a	0.5672 b	0.5697 b	0.5527 b
BA08	0.5124 a	0.5163 a	0.5382 a	0.5176 a	0.5172 a
BA12	0.8038 a	0.8012 a	0.8006 a	0.8223 a	0.8079 a
BA15	0.6005 a	0.5571 a	0.5560 a	0.5668 a	0.5649 a
BA21	0.5415 a	0.5591 a	0.5332 a	0.5191 a	0.5515 a
BR03	0.5234 a	0.5013 a	0.5590 a	0.5644 a	0.5098 a
BR12	0.5873 b	0.5842 b	0.6262 a	0.6125 a	0.5693 b
BR33	0.5732 b	0.5501 c	0.6797 a	0.6725 a	0.5455 c
BR39	0.5614 c	0.5395 d	0.8633 a	0.6480 b	0.5425 d
BR41	0.6037 a	0.5610 b	0.5872 ab	0.6042 a	0.5806 ab
BR45	0.9308 b	0.8920 c	1.0838 a	1.0817 a	0.8889 c
BR47	0.5446 b	0.9522 a	0.9561 a	0.9561 a	0.5741 b
CO01	0.7441 ab	0.7584 a	0.7600 a	0.7516 ab	0.7391 b
CO04	0.5725 a	0.5486 b	0.5635 ab	0.5675 a	0.5598 ab
CO10	0.6985 a	0.7086 a	0.7104 a	0.7072 a	0.6982 a
CO16	0.6529 b	0.6677 b	0.6539 b	0.6592 b	0.6950 a

FR01	0.7805 b	0.8156 b	0.8613 a	0.8859 a	0.8160 b
FR04	0.5612 d	0.5735 cd	0.6117 bc	0.6549 ab	0.6631 a
FR14	0.6786 b	0.6026 c	0.7466 a	0.7462 a	0.6205 c
FR25	0.6697 b	0.6130 c	0.7864 a	0.7912 a	0.6293 c
OV01	0.5091 bc	0.4878 c	0.5425 ab	0.5522 a	0.5165 abc
OV04	0.5796 b	0.5447 c	0.6569 a	0.6742 a	0.5681 bc
OV19	0.7847 a	0.7644 a	0.7576 a	0.7795 a	0.7608 a
PA09	0.8040 a	0.8105 a	0.7754 b	0.7751 b	0.7692 b
PA10	0.9100 a	0.9022 a	0.8983 a	0.9022 a	0.9210 a
PA15	0.7986 ab	0.8076 a	0.8163 a	0.8087 a	0.7593 b
PA18	0.8040 a	0.8105 a	0.7723 b	0.7716 b	0.7630 b
PA23	0.6194 ab	0.6653 a	0.6105 ab	0.6049 b	0.5888 b

*Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na horizontal não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.