

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA
FILHO”**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS CÂMPUS
DE JABOTICABAL**

**PERSISTÊNCIA DE CEPAS DE *Escherichia coli* GENÉRICA
E DE STEC NÃO-O157 EM SOLOS AGRICULTÁVEIS**

Taciana Pretti Correa

Nutricionista

2015

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA
FILHO”**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS CÂMPUS
DE JABOTICABAL**

**PERSISTÊNCIA DE CEPAS DE *Escherichia coli* GENÉRICA
E DE STEC NÃO-O157 EM SOLOS AGRICULTÁVEIS**

Taciana Pretti Correa

Orientador: Prof. Dr. José Moacir Marin

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Microbiologia Agropecuária.

2015

Correa, Taciana Pretti

C824p Persistência de cepas de Escherichia coli genérica e de STEC
não O157 em solos agricultáveis / Taciana Pretti Correa. – –
Jaboticabal, 2015

vii, 60 f. : il. ; 28cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015

Orientador: José Moacir Marin

Banca examinadora: Everlon Cid Rigobelo, Davi Rodrigo
Rossato, Patrícia Amoroso de Andrade, Caroline Peters Pigatto de
Nardi

Bibliografia

1. Microbiota do solo. 2. Contaminação. 3. Solo de cultura de
pastagem. 4. Solo de cultura de cana-de-açúcar. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 576.8:631.461

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

TACIANA PRETTI CORREA – Nascida em Jaboticabal, SP, em 31 de dezembro de 1979, filha de Vera Lúcia do Amaral Souza Pretti e João Pretti Filho. Nutricionista, graduada em 2003 pelo Centro Universitário de Araraquara (UNIARA). Em 2007 ingressou no programa de pós-graduação (Mestrado) em Ciências dos Alimentos pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas- UNESP- Campus de Araraquara. Em 2011 ingressou no doutorado pelo programa de Microbiologia Agropecuária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal.

“O essencial é invisível aos olhos.”

Antoine de Saint-Exupéry

**“Aos outros eu dou o direito de ser como são, a mim, dou o dever de ser
melhor a cada dia”**

Chico Xavier

Dedico

A Deus por me guardar, conceder força e fé.....Por sempre colocar em meu caminho pessoas de bem.....Aos meus pais Vera e João, ao meu esposo Rafael e especialmente a minha filha Helena.

AGRADECIMENTOS

A Deus primeiramente por me conceder o dom da vida, por me guiar e iluminar os meus passos.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Moacir Marin, pela oportunidade, confiança e ensinamentos ao longo desses anos de convivência.

Aos meus pais João e Vera , minhas irmãs Taís e Liziane e minhas sobrinhas Catarina e Elis pelo apoio, torcida e companheirismo. Amo Vocês.

Ao meu esposo e companheiro de vida Rafael, pelo apoio, paciência e por nunca me deixar desistir...., sem você esse título não existiria, ele também é seu. Muito obrigada por tudo sempre...amo muito você.

A razão da minha vida, minha filha Helena...pela compreensão apesar de tão pequena de tantas horas abdicadas do nosso convívio, obrigada meu amor por ser minha companheira de vida, por ter me escolhido...Hoje tenho a certeza que não existe nada maior, melhor e mais verdadeiro do que o amor de mãe.... Te Amo, simples assim!

A minha avó Ditinha pelas inúmeras rezas para que tudo desse certo.

A minha sogra Beth, minha mãe Vera e minha cunhada Daniele, por cuidar tão bem da Helena e por serem a mãe dela quando tive que me ausentar.

Ao Prof. Dr. Everlon Cid Rigobelo, pela amizade, paciência, ensinamentos e idéias, por me ceder seu tempo e espaço para que esse doutorado pudesse acontecer. Que Deus abençoe e lhe dê em dobro. Meu muito Obrigada.

Ao grande chefe Assis (Luis Carlos de Assis), pela amizade, respeito, paciência, pelo passo a passo que sempre me auxiliou (e repetiu várias vezes), por ser esse grande Homem e de um coração maior ainda.... foi um inenarrável prazer ter te conhecido, certamente terá minha eterna gratidão. Muito Obrigada por tudo.

Aos amigos que fiz no laboratório: Ana Luiza, Francini, Isabele, Thaís, Jefferson, Gabriela, Ana Carolina, Fernanda, Roberta, Dinalva, Edna e Rosangela pela amizade e incentivo...podemos nos distanciar, mas sempre vou me lembrar de vocês com imenso carinho. Sucesso a todos e nunca desistam.

A uma grande amiga e companheira que muito me ajudou ...a você Joviany, meu muito obrigada por tudo que fez por mim, pela ajuda até altas horas, pelo carinho e torcida, vou sempre torcer por vc, nunca desista. Acabou Jovi...bjs e tudo de bom!!!!

Aos meus amigos Renilda, Ana Paula e Silmar, pelo apoio e torcida, pelos trabalhos que fizeram por mim.

A Marita Vedovelli Cardoso e ao Laboratório de Microbiologia, por ter cedido às linhagens de *E.coli* e na realização da PCR.

A CAPES pela bolsa de estudo concedida.

Ao programa de Pós-Graduação da FCAV/Unesp, pela oportunidade concedida.

À todas as pessoas, que direta ou indiretamente torceram por mim e contribuíram para a realização desta pesquisa.

SUMÁRIO

Página

RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Caracterização do solo	3
2.2 Bactéria do solo	4
2.3 Microcosmo	5
2.4 <i>Escherichia coli</i>	6
2.5 <i>Escherichia coli</i> no solo	7
2.6 <i>Escherichia coli</i> produtora de toxina Shiga like (STEC)	8
2.7 <i>Escherichia coli</i> STEC no solo	10
2.8 <i>Escherichia coli</i> STEC em humanos	11
2.9 <i>Escherichia coli</i> STEC formando biofilme	13
3. OBJETIVOS	16
4. MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1 Coleta do solo	17
4.2 Processamento das amostras de solo	19
4.3 Linhagens de <i>E. coli</i>	21
4.4 Incubação no solo	22
4.5 Persistência de <i>Escherichia coli</i> em solos	24
4.5.1 Tratamentos	24
4.5.2 Inoculação da <i>E. coli</i>	25
4.6 Métodos de contagem	26
4.7 Extração do DNA bacteriano	26
4.8 Detecção de STEC e EPEC através de PCR	27
4.9 Detecção de STEC e EPEC no solo	28
5. RESULTADOS	29
6. DISCUSSÃO	39

7. CONCLUSÕES.....	49
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

PERSISTÊNCIA DE CEPAS DE *Escherichia coli* GENÉRICA E DE STEC NÃO-O157 EM SOLOS AGRICULTÁVEIS

RESUMO- *Escherichia coli* de sorogrupo não- O157 produtora de Shiga toxina é reconhecida como causadora de sérias doenças em seres humanos. Entretanto, as pesquisas relacionadas à persistência das STEC não- O157 em solos agricultáveis são bastante limitadas. No presente estudo foi analisada a sobrevivência de *E.coli* genérica, *E.coli* portadora do gene *eae* e STEC não- O157 portadoras do gene *stx1*, *stx2* e *eae* em dois solos agricultáveis, cultura de cana-de-açúcar e pastagem em duas situações diferentes, solos esterilizados por autoclavação e solo não autoclavado. As linhagens de *E.coli* foram inoculadas nos dois solos em ambas as situações em um sistema de microcosmo, o qual foi avaliado por 60 dias. Os resultados mostraram que todas as linhagens de *E.coli* foram recuperadas em menor número nos solos não autoclavados do que nos solos esterilizados por autoclavação. Também foi verificado que as linhagens STEC não- O157 sobreviveram por um período maior do que a linhagem de *E.coli* genérica no solo sob pastagem não autoclavado, no mínimo por 60 dias. Nós devemos prestar mais atenção ao longo período de sobrevivência das linhagens STEC não- O157 em solos de pastagem devido ao seu alto potencial de risco ao meio ambiente.

PALAVRAS- CHAVE: Microbiota do solo, Contaminação, Solo de cultura de pastagem, Solo de cultura de cana –de- açúcar.

PERSISTENCE OF *Escherichia coli* STRAINS GENERIC AND NON- O157 STEC IN AGRICULTURAL SOIL

ABSTRACT –Shiga toxin producing *Escherichia coli* non- O157 serogroup has been recognized as cause of serious diseases in human. However, research on the persistence of STEC non- O157 in preharvest is limited. In the current study we analysed the survival behavior of generic *E.coli*, *E.coli* carrying *eae* gene and STEC non- O157 strain carrying *stx1*, *stx2* and *eae* gene in two agricultural soils, sugar cane culture and grassland in two different situations autoclaved soil and non- autoclaved soil. The *E.coli* strains were inoculated in both soils in a microcosm system which was analysed for sixty days. Results showed that all *E.coli* strains were recovered in a smaller number in non- autoclaved soils than in the autoclaved soils. Also was verified that the STEC non- O157 strains survived longer than the generic *E.coli* strain in the non autoclaved grassland soil, at least for sixty days. We should pay more attention to the STEC non- O157 serogroup long survival in grassland soil and its potential environmental risk.

KEYWORDS: Soil microbiota, Contamination, Grassland soil, Sugar cane soil.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Latossolo Vermelho-amarelo	4
Figura 2. Mapa de solos da FCAV/UNESP/Jaboticabal	18
Figura 3. Ilustração da medição da Capacidade de Campo/Capacidade de Retenção de Água	20
Figura 4. Sistema de microcosmo	22
Figura 5. Ilustração método diluição em série	23
Figura 6A. Eletroforese de gel de agarose de produtos de DNA amplificados através da reação em cadeia da Polimerase (PCR). O tamanho dos produtos de amplificação foi avaliado utilizando como referencial o marcador de peso molecular 100pb(FERMENTAS). ...	29
Figura 6B. Eletroforese de gel de agarose de produtos de DNA amplificados através da reação em cadeia da Polimerase (PCR). O tamanho dos produtos de amplificação foi avaliado utilizando como referencial o marcador de peso molecular 100pb(FERMENTAS)	30
Figura 7. Valores iniciais de unidade formadora de colônias de bactérias totais presente no solo de cana e pasto	32
Figura 8. Valores médios de número de unidades formadoras de colônias de <i>Escherichia coli</i> portadoras dos genes <i>eae</i> , <i>stx1/stx2</i> , <i>stx1/stx2/eae</i> e não portadoras (genéricas) incubadas em microcosmos de solo de cana-de-açúcar esterilizado por autoclavação e não esterilizado	33

Figura 9. Valores médios de número de unidades formadoras de colônias de *Escherichia coli* portadoras dos genes *eae*, *stx1/stx2*, *stx1/stx2/eae* e não portadoras incubadas em microcosmos de solo de pastagem esterilizado por autoclavação e não esterilizado 34

Figura 10. Valores médios de unidade formadora de colônias de cepas de *Escherichia coli* não portadoras de genes de virulência (genérica) incubadas em microcosmos de solo de cana-de-açúcar esterilizado por autoclavação, cana-de-açúcar não esterilizado, solo de pastagem esterilizado por autoclavação e solo de pastagem não esterilizado . 35

Figura 11. Valores médios de unidade formadora de colônias de cepas de *Escherichia coli* portadoras do gene *eae* incubadas em microcosmos de solo de cana-de-açúcar esterilizado por autoclavação, cana de açúcar não esterilizado, solo de pastagem esterilizado por autoclavação e solo de pastagem não esterilizado 36

Figura 12. Valores médios de unidade formadora de colônias de cepas de *Escherichia coli* portadoras dos genes *stx1/stx2* incubadas em microcosmos de solo de cana-de-açúcar esterilizado por autoclavação, cana-de-açúcar não esterilizado, solo de pastagem esterilizado por autoclavação e solo de pastagem não esterilizado. 37

Figura 13. Valores médios de unidade formadora de colônias de cepas de *Escherichia coli* portadoras do gene *stx1/stx2/eae* incubadas em microcosmos de solo de cana-de-açúcar esterilizado por autoclavação, cana-de-açúcar não esterilizado, solo de pastagem esterilizado por autoclavação e solo de pastagem não esterilizado 38

TABELA**Página**

Tabela 1 Tratamentos utilizados no solo de cana-de-açúcar esterilizado por autoclavação. 24

Tabela 2 Tratamentos utilizados no solo de cana-de-açúcar não esterilizado. 24

Tabela 3 Tratamentos utilizados no solo de pastagem esterilizados por autoclavação. 24

Tabela 4 Tratamentos utilizados no solo de pastagem não esterilizados. ... 25

Tabela 5 Quantidade de Inóculo. 25

1. INTRODUÇÃO

Organismos micro e macroscópicos habitam o solo, formando comunidades na maioria das vezes “invisíveis” e que raramente são mencionadas, mas esses microrganismos realizam atividades muito importantes para a manutenção e sobrevivência das comunidades vegetais e animais. Dentre as atividades de maior importância destaca-se: decomposição da matéria-orgânica, produção de húmus, ciclagem de nutrientes e energia, produção de compostos complexos que contribuem para agregação do solo, controle biológico de pragas e doenças, decomposição de xenobióticos. A biota do solo pode ser dividida em relação ao tamanho dos microrganismos em micro, meso e macrofauna. A densidade de todos os grupos varia muito em função das características de sobrevivência ao solo e climáticas. De modo geral as bactérias representam o grupo mais numeroso.

No Brasil uma grande extensão de terras é utilizada para a cultura da cana de açúcar e para pastagem, principalmente de rebanhos bovinos. De uma forma geral os solos no Brasil apresentam elevada acidez, sendo esta uma característica comum nos solos acima mencionados os quais podem porém se diferenciarem pela quantidade de matéria orgânica presente nos mesmos.

A poluição do solo por metais pesados ou poluentes orgânicos tem sido extensivamente estudada nas últimas décadas. Muitos pesquisadores demonstraram que as comunidades microbianas do solo respondem a presença dos metais pesados e aos poluentes orgânicos. Entretanto nos últimos anos também aumentaram os trabalhos envolvendo a biopoluição do solo por microrganismos patogênicos incluindo bactérias tais como a *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella* spp e *Listeria monocytogenes*.

As cepas de *Escherichia coli* Shigatoxigênica (STEC) são caracterizadas por causar diarreia sanguinolenta, acometendo prevalentemente crianças e idosos em países desenvolvidos. Também podem causar lesões do tipo “attaching-effacing” no intestino grosso e nos casos mais severos, Necrose. Tornou-se notória após dois

grandes surtos em 1982 nos EUA, relacionados ao consumo de hambúrguer mal cozido. Estes surtos foram atribuídos a cepa O157:H7.

A *E. coli* O157:H7 representa um patógeno muito importante o qual normalmente está presente nas fezes dos animais e que tem se mostrado de alta periculosidade para a segurança do meio ambiente e para a saúde humana devido a sua baixa dose de células necessárias para a sua infectividade (em torno de 10 células) e sua alta patogenicidade. Além das rotas tradicionais de transmissão do patógeno existe também a possibilidade de infecção através de produtos vegetais e frutas contaminadas com fezes de animais. Existe um aumento das evidências mostrando que o solo e o esterco animal são os principais agentes que transportam a *E. coli* O157:H7 contaminando os vegetais, frutas e a água. Além do sorotipo O157: H7, o mais importante representante da cepa STEC, nos últimos anos tem sido demonstrada a importância dos sorogrupos não-O157 como responsáveis por doenças em humanos.

No Brasil são poucos os estudos relacionados à eliminação de bactérias STEC não-O157 presentes em solo agrícolas por contaminação oriunda de fezes de animais principalmente de vacas e porcos utilizados como esterco para a adubação orgânica de solos utilizados para o plantio de vegetais. Assim analisar o tempo de sobrevivência em solos torna-se importante devido ao risco que elas representam para seres humanos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Caracterização do Solo

O solo é composto por três fases: sólida (composta por partículas minerais, raízes de plantas, populações de organismos macro e microscópicos e com metabolismo ativo ou dormente e matéria orgânica), líquida (água com elementos dissolvidos) e gasosa (gases da atmosfera com diferentes proporções). A parte sólida geralmente representa aproximadamente 45% do volume total, seguido do espaço poroso (fase líquida e gasosa) que representa cerca de 50% e 5% representado pela matéria orgânica. As três fases podem variar de acordo com o tipo de solo e as condições ambientais (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Oliveira; Jacomine; Camargo (1992) descrevem cinco fatores de formação do solo que interferem direta ou indiretamente na sua estrutura: clima, relevo, seres vivos, material de origem e tempo. Cada solo é o produto do efeito de todos os seus fatores de formação. Ainda de acordo com os autores atributos morfológicos também devem ser levados em conta na classificação como: textura, cor, consistência, estrutura, cerosidade, nódulos e concreções e transição entre horizontes.

Características dos solos variam consideravelmente de um lugar para outro. Essas variações estabeleceram sistemas de classificação em que o solo é considerado como uma composição de grande número de solos isolados (BRADY, 1989). As principais classes de solos encontrados no Brasil são: Argilosos, Cambissolos, Latossolos, Luvisolos, Neossolos, Planossolos, Plintossolos e Vertissolos (SILVA; SILVA; CAVALCANTI, 2005). O tipo de solo utilizado no presente trabalho está ilustrado na Figura 1.



Figura 1. Latossolo Vermelho-amarelo

Fonte: SILVA; SILVA; CAVALCANTE.,2005.

2.2 Bactérias do Solo

A capacidade das bactérias em se multiplicar é de extrema importância para os solos. Através da multiplicação essas bactérias conseguem ajustar rapidamente suas atividades quanto às mudanças ambientais. Bactérias variam em seu formato, as predominantes nos solos são as em forma de bastões. No solo o número de bactérias é variável, principalmente pelo fato de diversos fatores interferirem no seu crescimento e desenvolvimento (BRADY,1989).

Os procariotos (Bactérias e Arqueias) têm a capacidade de se propagar por quase todos os ambientes do solo, devido principalmente ao seu tamanho e sua capacidade de desenvolverem fases de ociosidade extremamente resistentes. (BRADY; WEIL,2013). Segundo Brady (1989), o número de bactérias presentes no solo é variável devido a diversos fatores que influenciam sua multiplicação, na maioria das vezes encontram-se nos horizontes de superfície pelo fato de serem mais favoráveis as condições de aeração, umidade, temperatura e alimentação.

Esses microrganismos podem ser autotróficos ou heterotróficos, sendo a maioria das bactérias do solo heterotróficas onde sua fonte energia deriva da matéria orgânica. São responsáveis juntamente com os fungos pela degradação geral da matéria orgânica do solo. Participam de quase todas as reações orgânicas que caracterizam um solo saudável, as bactérias são responsáveis pela oxidação do nitrogênio, oxidação do enxofre e fixação do nitrogênio auxiliando na nutrição das plantas (BRADY; WEIL, 2013; BRADY, 1989).

A presença de um microrganismo no solo é estabelecida pelas condições ambientais dominantes e dos limites da sua equipagem genética. A sua permanência depende da rapidez das respostas fisiológicas em relação às condições ambientais. Alguns microrganismos conseguem sobreviver em condições de salinidade, pressão, pH e temperaturas extremas. A capacidade de adaptação dos microrganismos faz com que limitações físicas (aeração, água, adesão, porosidade,...) e limitações químicas (disponibilidade de nutrientes, toxicidade,...) sejam ultrapassadas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

2.3 Microcosmos

Os ecossistemas ao ar livre são muito complexos e difíceis de serem delimitados, os meios científicos de experiência e controle ficam cada vez mais difíceis de serem estudados, com isso muitas pesquisas estão sendo realizadas dentro do próprio laboratório em sistemas denominados microcosmos, onde as condições de campo com limites definidos e cuja manipulação e repetição pode ser feita da maneira que se deseja (ODUM,2001).

Microcosmos ou pequenos mundos autocontidos, sejam em garrafas ou outros recipientes podem simular em versão miniatura a natureza dos ecossistemas, esses recipientes recebem o nome de microecossistema e utiliza o macrosistema (o mundo natural) como base de referência. Dois tipos de microcosmos de laboratório podem ser diferenciados: 1.microecossistema derivados diretamente da natureza

por semeadura múltipla de meios de cultura com amostras ambientais; 2.sistemas construídos adicionando-se espécies de culturas puras ou não contaminadas até que se obtenha as combinações desejadas. O primeiro sistema representa a natureza simplificada para organismos que sobrevivem por longos períodos no limite dos recipientes, do ambiente de luz e temperatura imposto (ODUM; BARRET, 2007). No segundo sistema adicionando componentes previamente isolados e estudados, tem se o estudo da interação entre as espécies (ODUM, 2001). O sistema microcosmos pode sugerir hipóteses e mecanismos que podem ser testados em manipulações de campo a longos prazos (KREBS, 2009).

2.4 *Escherichia coli*

A Enterocacteriaceae é a mais importante família bacteriana. As enterobacteriáceas são microrganismos anaeróbios facultativos, bacilos Gram-negativos, apresentam membrana citoplasmática, espaço periplásmico, peptidoglicano e membrana externa. Sua grande maioria possui filamento flagelar e estrutura capsular conhecidas como antígenos K. Sua membrana externa contém lipopolissacarídeos (LPS), porinas e diferentes tipos de fímbrias. Dentre as espécies, a *Escherichia coli* é uma das mais importantes (TRABULSI et al.,2004).

A *E.coli* é um microrganismo pertencente à microbiota da maioria dos animais e do ser humano. Habitam tipicamente o trato gastrointestinal desde as primeiras horas de vida do recém nascido estabelecendo com seu hospedeiro uma relação de benefícios mútuos, como a síntese de vitamina B e K. A *E.coli* permanece inofensivamente confinada na luz do intestino grosso, entretanto pode vir a causar infecção quando o hospedeiro estiver debilitado, imunossuprimido ou quando as barreiras gastrointestinais forem violadas (NATARO; KAPER, 1998).

As estirpes de *E.coli* são distribuídas em três grupos: comensais, patogênicas intestinais ou diarreio gênicas (DEC) e patogênicas extraintestinais (ExPEC) essa classificação varia de acordo com o seu conjunto de genes de virulência e

propriedades clínicas. (RUSSO; JOHNSON, 2000). As estirpes diarreiogênicas (DEC) são subdivididas em seis categorias: *E.coli* enteropatogênica (EPEC), *E.coli* enteroinvasora (EIEC), *E.coli* enteroagregativa (EAEC), *E.coli* enterotoxigênica (ETEC), *E.coli* difusamente aderente (DAEC), *E.coli* enterohemorrágica (EHEC) ou *E.coli* produtora de toxina Shiga (STEC) (NATARO; KAPER,1998). Segundo Kaper; Nataro; Mobley (2004) as estirpes EPEC, ETEC e EHEC ou STEC além dos seres humanos podem também causar doenças em animais.

2.5 *Escherichia coli* no Solo

A *E.coli* é uma bactéria naturalmente presente em todos os animais de sangue quente, incluindo humanos e quando liberada no ambiente através de material fecal se torna um indicador de contaminação fecal, método muito utilizado para verificação de contaminantes nas águas. Acreditava-se que a *E.coli* não sobrevivia fora do seu habitat primário, entretanto estudos mostram a *E.coli* crescendo em diferentes habitats como água, sedimentos e solo (ISHII; SADOWSKY, 2008).

A preocupação com o ambiente e os recursos hídricos é uma constante, principalmente com a contaminação dos recursos hídricos pelo escoamento de terra adubada com resíduos de animais. Um componente fundamental na avaliação e gestão dos riscos de contaminação da água potável a partir da poluição fecal é a avaliação da persistência ambiental de bactérias indicadoras. Vários trabalhos que avaliaram a presença de *E.coli*, verificaram a persistência em diversos ambiente como: água salgada e doce, sedimentos aquáticos, solos e adubo armanezado. (TOPP et al., 2003).

Os patógenos zoonóticos provenientes do esterco podem invadir o solo através da irrigação com água de esgoto, contaminação através de água de chuva em áreas de estoque de fezes de animais e através da aplicação de esterco (fezes) de animais nos campos de plantações (BRADFORD et al., 2013).

Estudos vêm salientando a capacidade da *E.coli* sobreviver por longos períodos de tempo no meio ambiente tornando capaz de se replicar em água, algas e solos. No solo a *E.coli* enfrenta muitas adversidades no ambiente como altas e baixas temperaturas, salinidade, umidade limitada, baixo teor de matéria orgânica, radiação solar e predação (ISHII; SADOWSKY, 2008). Ainda segundo os autores a adição de nutrientes como o estrume aumentou muito a concentração de *E.coli* no solo. Depois de liberado no solo através dos excrementos dos animais a grande maioria das bactérias presentes morre devido à baixa quantidade de nutrientes e outros fatores ambientais. Entretanto algumas conseguem sobreviver e se ligam ao solo. Essas cepas de *E.coli* podem crescer e manter sua população tempo suficiente para se adaptar ou “naturalizar” no ambiente e dessa maneira se reintroduz no hospedeiro através da água e de alimentos contaminados.

2.6 *Escherichia coli* Produtora de Toxina Shiga Like (STEC)

As *Escherichia coli* produtoras de Shigatoxina se diferem de outras *Escherichia coli* pela produção de um ou dois tipos de toxinas denominadas de toxina Shiga que tem seu mecanismo de ação envolvendo a inibição da síntese protéica nas células alvo (PATON; PATON, 1998). As Shiga toxinas (Stx) pertencem a uma família de proteínas ribossomo-inativas encontradas em algumas bactérias (KUHNERT; BOERLIN; FREY., 2000).

O gene que codifica a toxina é o gene *stx*, esse gene se localiza no genoma dos bacteriófagos ligando-se ao cromossomo da célula hospedeira. A participação dos genes no bacteriófago permite não apenas a capacidade de disseminação entre diferentes cepas, mas possibilita ainda a presença de duas toxinas na mesma bactéria (GOBIUS et al., 2003; FÜRST et al., 2000).

Inicialmente distinguia-se das demais cepas de *E.coli* pelo sorotipo (O157:H7), mas logo outra característica tornou-se fundamental em sua classificação: a produção de uma toxina semelhante a toxina produzida pela *Shigella*

dysenteriae, a shiga-like toxina, também denominada verotoxina. Em *Shigella*, o gene que codifica tal toxina é cromossômico, enquanto que na STEC ele pode ser transmitido por bacteriófagos (ROBINS-BROWNE ; HARTLAND, 2002) .

Paton e Paton. (1998) descreveram a existência de dois grupos principais desta toxina: Stx1 (VT 1) e Stx 2 (VT 2). Curiosamente as células epiteliais do intestino humano são parcialmente resistentes a ação citotóxica de Stx, entretanto a toxina é capaz de atravessar o epitélio intestinal e alcançar células do epitélio de vasos que suprem o intestino, o rim, pâncreas e outras vísceras como cérebro e coração. A série de eventos a partir desta lesão vascular pode resultar em coagulação intravascular, que por sua vez resulta em trombocitopenia, micro angiopatia, anemia hemolítica com hemólise e consequente falência renal, caracterizando a síndrome clássica da HUS (síndrome hemolítica urêmica) (ROBINS-BROWNE; HARTLAND, 2002).

Melton-Celsa e O' Brien. (1998) descrevem que a *Escherichia coli* produtora de Shiga toxina podem produzir duas toxinas a Stx1 e a Stx2. A *E.coli* STEC pode produzir Stx1, Stx2 ou ambas. Essas toxinas são diferentes na sequência de aminoácidos da subunidade B, que dessa forma altera a afinidade pelo receptor celular. As toxinas Shiga possuem algumas características:

- o modo de ação consiste na inibição da síntese protéica em células eucariótica;
- o receptor na célula eucariótica é o glicolípídeo Gb₃ ou Gb₄;
- a estrutura da proteína é constituída de um polipeptídio A e cinco polipeptídios B;
- citotóxica para células Vero, Hela e células endoteliais;
- os aminoácidos idênticos entre Stx1 e Stx2 são de cerca de 55%;
- Stx1 e Stx2 não apresentam reação cruzada;
- Stx2 é mais tóxica para as células endoteliais microvascular renal humana do que a Stx1.

Scheutz et al., 2012, descrevem que existem duas classes de toxina shiga, Stx1 e Stx2, e sete subtipos da toxina Stx2, sendo estes mais comumente associados com quadros de doenças graves. As Shigatoxinas podem atuar também nos enterócitos, a Stx2 é mais frequentemente associada a doenças graves em relação à toxina Stx1. Dentre os sorogrupos de STEC os sorogrupos O26, O103, O111, O145 e O157 são os mais associados a doenças (SCHMIDT, 2010).

2.7 *Escherichia coli* STEC no Solo

Bovinos e pequenos ruminantes são considerados os principais reservatórios naturais de cepas STEC que acometem humanos (BETTELHEIM, 2003). A transmissão ocorre por alimentos contaminados, como carne, leite, queijos não pasteurizados, água, contato pessoal ou pode ser transmitida por animais (CLARKE, 2001).

Descrições sobre a sobrevivência de *E.coli* O157:H7 no solo ou em ambientes relacionados ao solo (esterco) variam de dias a mais de 1 ano (ISLAM et al, 2004; VAN ELSAS et al, 2011; YAO et al, 2013). O desaparecimento da *E. coli* O157:H7 no solo pode ser afetado por fatores bióticos ou abióticos (VAN ELSAS et al, 2011; BRADFORD et al, 2013; YAO et al, 2013). Entre os fatores bióticos foi demonstrado que as comunidades microbianas do solo especialmente as bactérias e os fungos exercem um importante papel na sobrevivência da *E. coli* O157:H7 (YAO et al, 2013). Um declínio na diversidade microbiana coincide com um aumento da sobrevivência das células invasoras de *E. coli* O157:H7 (SEMENOV et al, 2008).

Segundo Van Elsas et al. (2012) existe uma correlação negativa entre a diversidade da microbiota do solo e a sobrevivência do microrganismo invasor. Segundo os autores existe uma diminuição da habilidade de competitividade do microrganismo invasor em relação a comunidades microbianas do solo com alta diversidade e elevado número de células. Conforme os autores avaliaram após 3, 30 e 60 dias depois da invasão a inclinação das curvas de sobrevivência da *E.coli*

O157:H7 se tornam progressivamente mais acentuadas, indicando que a diversidade da população pertencente a microbiota do solo exerce o seu efeito na diminuição da sobrevivência da célula invasora (O157:H7) na porção terminal do experimento em torno do dia 60 após a inoculação da célula invasora. Segundo os mesmos autores esta sobrevivência se torna particularmente afetada em função da presença no solo, em grande número das actinobactérias as quais apresentam a capacidade de produzir metabolitos secundários que regulam o crescimento das diferentes bactérias encontradas no ecossistema do solo, este importante papel das actinobactérias também foi abordado por Kim et al. (2011); Yao et al. (2014) verificaram que outras bactérias Gram negativas tais como Bacteroides, Gammaproteobactérias, Firmicutes e Proteobactérias também suprimem a sobrevivência de uma *E.coli* invasora O157:H7 quando inoculada no solo.

Outros autores têm levantado o papel dos fatores abióticos sobre a sobrevivência de uma *E.coli* O157:H7 inoculada no solo, neste sentido Zhang et al. (2013) examinaram a sobrevivência desta *E. coli* em 12 solos de regiões distintas na China . Os resultados obtidos mostraram que existe uma nítida diferença na sobrevivência de *E.coli* O157:H7 quando inoculada em solo ácido e solo neutro. Em solo ácido a *E.coli* O157:H7 não foi mais detectada após 7 dias da inoculação e em solo neutro foi verificado que o decaimento da sobrevivência da *E.coli* O157:H7 foi muito mais lento e a bactéria pode sobreviver por 38 dias. Wang et al. (2014) confirmaram estes resultados e verificaram que se o solo é ligeiramente alcalino com pH entre 8,4 e 8,6 esta sobrevivência pode ser estendida por 25 dias e a presença de lodo no solo tem um efeito benéfico para esta sobrevida do patógeno invasor a *E.coli* O157:H7.

2.8 *Escherichia coli* STEC em Humanos

A relação entre o homem e o patógeno é muito importante, estes patógenos estão entre os principais agentes de infecções em diversos países. A relação com os animais é de extrema importância ao homem não somente pelas perdas

econômicas, mas também pelo fato desses animais serem um vasto reservatório de patógenos humanos, (TRABULSI et al, 2004).

A *E.coli* O157:H7 tem sido descrita como uma produtora de toxina Shiga-like, com capacidade de produção das toxinas Stx1 e Stx2, sendo considerada o principal patógeno entre as STEC nos Estados Unidos e Europa. Entretanto estudos recentes (MATHUSA et al, 2010) têm reconhecido uma importância crescente dos sorotipos não-O157 incluindo O26, O45, O91, O103, O104, O111, O113, O121 e O145 entre as linhagens STEC ligadas a doenças humanas severas que se manifestam nos Estados Unidos, Europa e partes da América latina. Neste sentido é digno de nota que no Brasil a maioria das infecções por STEC tem sido associada a linhagens não-O157 (IRINO et al, 2007).

Os sintomas clínicos causados por infecção por STEC não-O157 podem ser similares aqueles da STEC O157 na indução de doenças. Linhagens STEC pertencentes aos sorogrupos não-O157 tem sido incriminadas em surtos em grande escala ou em infecções esporádicas através do consumo de produtos frescos (CDC, 2010). Recentemente uma linhagem STEC não-O157, a *E.coli* O104:H2 foi incriminada como a causadora de um grande surto de infecção provocada por alimento fresco (vegetal) na Alemanha (BEUTIN ; MARTIN, 2012), sendo que durante este surto ocorreram mais de 4000 internações hospitalares incluindo 50 mortes (LAING et al, 2012).

Estudos recentes descrevem que a maioria das STEC O157 e O26 (contendo os genes *stx*, *eae* e *EHEC-hlyA*), provenientes de gado de corte, eram patogênicas para os seres humanos (SASAKI et al., 2011). A contaminação da carne pelo patógeno pode acontecer por diversas formas, como: na remoção da pele do animal as bactérias podem ser transferidas para a carcaça e posteriormente contaminarem a carne através das facas utilizadas, dos equipamentos e mão de manipuladores contaminados (THOMAS et al., 2012).

Segundo Gould et al (2013) após análise de dados clínicos disponíveis verificou que as infecções com STEC O 157 geralmente causam uma doença mais intensa do que aquelas produzidas por STEC não-O157, assim pacientes com

infecção por STEC não-O157 foram menos hospitalizados (14%) do que aqueles infectados com O157 (43%).

Pelo acima exposto está claro que ambas as STECs O157 e não-O157 podem causar sérias doenças na espécie humana através do consumo de vegetais e frutas frescas contaminadas com esta bactéria (VAN ELSAS et al, 2011), portanto estudos são necessários para um melhor entendimento dos fatores que favorecem ou dificultam a sobrevivência das STEC no solo das fazendas de produção agrícola. A contaminação destes produtos no campo pode ocorrer de diferentes maneiras uma vez que água, sedimentos e solo são os principais reservatórios no meio ambiente das STEC provenientes das fezes dos animais. Os solos agricultáveis podem ser contaminados com STEC através principalmente da aplicação de esterco (fezes) animal (COOLEY et al, 2007). Neste sentido Ma et al. (2014) analisaram a persistência de linhagens de *E. coli* O157 e não-O157 em solos agricultáveis. Segundo os autores a linhagem de *E. coli* O103 :H2 STEC uma vez inoculada no solo sobreviveu três vezes mais (66 dias) do que uma linhagem O157:H7 inoculada no mesmo tipo de solo (23 dias).

2.9 *Escherichia coli* STEC Formando Biofilme

A *E.coli* é uma bactéria de diferentes apresentações, incluindo bactérias da flora normal de seres humanos e de animais, entretanto possui estirpes patogênicas como a STEC de grande importância médica. A STEC é uma bactéria muito importante, pois pode sobreviver por longos períodos fora do ambiente do seu hospedeiro, como água e solo. Além da STEC O157:H7 outros sorogrupos tem sido identificados e responsabilizados como causadores de diversos surtos em países como Estados Unidos e Alemanha que são: O26, O45, O103, O111, O121, O145 (VOGELEER et al., 2014).

Diversos surtos de intoxicação alimentar foram atribuídas a *Escherichia coli* O157:H7 e *Samonella* ssp. que foram transportadas por alimentos como alface,

couve, rabanete, feijão e agrião. Bactérias foram encontradas em brotos, sendo que provavelmente a contaminação pode ter ocorrido durante o plantio devido a contaminação da semente. Após a germinação da semente contaminada essa cresce e espalha a bactéria para mudas vizinhas (JETER; MATTHYSSE, 2005). Surtos ocorridos na Califórnia com espinafre contaminado por *E.coli* O157:H7 foi atribuído a água de irrigação contaminada (ISHII; SADOWSKY, 2008).

Bactérias não vivem normalmente em suspensão, mas em comunidades denominadas biofilmes. Biofilmes são caracterizados pela presença de diversos microrganismos, como bactérias, fungos, algas e protozoários que se unem numa matriz fechada polimérica extracelular que se liga a uma superfície biótica ou abiótica. A formação do biofilme exige etapas específicas descritas em um processo de quatro etapas: 1.contato inicial, 2. Aderência, 3. Maturação, 4.Dispersão.O primeiro passo na formação do biofilme é a ligação com a superfície, o que depende da atração e repulsão entre a bactéria e a superfície; sendo também influenciado pelas condições ambientais (Temperatura, pH, rugosidade da superfície,...), o segundo passo é influenciado pela presença de estruturas como as adesinas fimbriais; o terceiro passo na formação do biofilme é a maturação, nessa etapa as bactérias continuam a se multiplicar produzindo matrizes extracelulares, nessa terceira etapa o biofilme adquire forma tridimensional; o quarto passo se dá através da separação das bactérias do biofilme e conseguinte dispersão, contribuindo para transmissão da bactéria (VOGELEER et al.,2014).

Estudos realizados por Jeter; Matthyse, (2005) com *E.coli* O157:H7 e *E.coli* K12 sugerem que estirpes patogênicas podem apresentar mais de um mecanismo para a ligação com a superfície da planta. Fink et al. (2012) também utilizando como comparação estudou a interação ,a sobrevivência e a ligação de bactérias com a folha de alface tendo como objetivo a comparação entre a *E.coli* K12 e a *E.coli* O157:H7 patógeno associado a grandes surtos.

Chen et al. (2013), realizaram um estudo com estirpes não O157:H7 (O26, O45, O103, O111, O113, O121,e O145), e O157:H7 avaliando se a presença de dois genótipos inseridos nas *E.coli* não O157:H7 constituíam barreiras na formação do biofilme como fazem em amostras de *E.coli* O157:H7; foi verificado que quando

ambos os genótipos são encontrados, esses não são tão susceptíveis como são em *E.coli* O157:H7. Ainda segundo os autores, bactérias que utilizam o biofilme contam com alguns benefícios que a ajudam a sobreviver. O biofilme auxilia a resistir ao estresse oxidativo, ao tratamento com antibióticos, à fome e à dessecação.

E.coli STEC tem sido observadas em alimentos frescos como alface. As bactérias persistem e crescem no interior do tecido da planta por um mecanismo ainda não completamente descrito. A contaminação também ocorre com a utilização do estrume utilizado no campo que frequentemente através do escoamento da água da chuva acaba contaminando o solo e a água que posteriormente será utilizada para irrigação (VOGELEER et al., 2014).

O número de surtos de gastroenterites causadas por *E.coli* O157:H7 vem aumentando e se atribui ao fato de o consumo de vegetais verdes folhosos, como o alface. É de conhecimento que a bactéria cresce e sobrevive na fitosfera das plantas, mas os mecanismos utilizados por essa bactéria são, na grande maioria, desconhecidos (FINK et al., 2012).

3. OBJETIVOS

3.1 Determinar a prevalência de cepas de *E.coli* genérica, *E.coli* portadora do gene *eae* e STEC não O157 incubadas em solo utilizado na cultura de cana-de-açúcar.

3.2 Determinar a prevalência de cepas de *E.coli* genérica, *E.coli* portadora do gene *eae* e STEC não O157 incubadas em solo utilizado na pastagem de animal bovino.

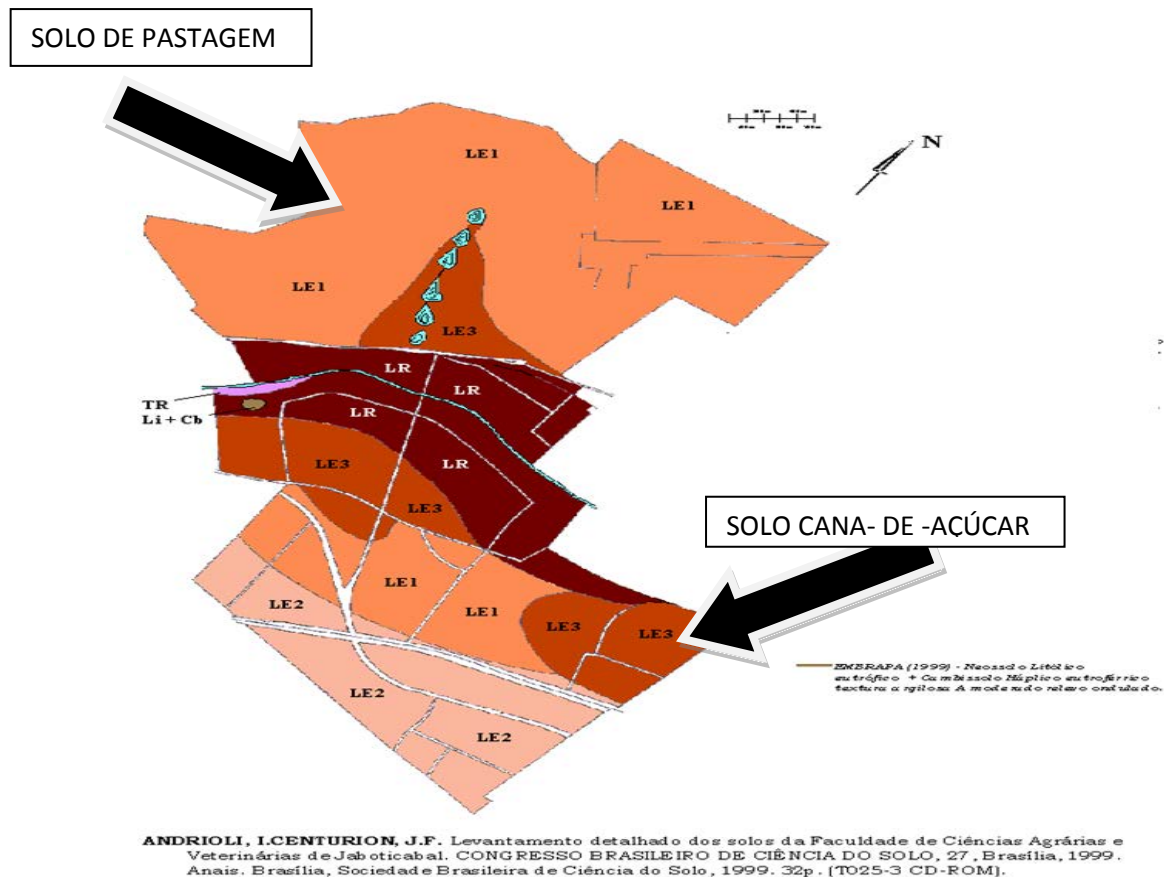
3.3 Avaliar a relação entre as cepas de *E.coli* e a microbiota nativa.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta do Solo

Os solos usados para a realização desse estudo foram coletados em solos sob o cultivo de cana-de-açúcar e em pastagem de bovinos pertencentes à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da UNESP em Jaboticabal. Figura 2.

O solo utilizado para pastagem é definido como Latossolo Vermelho eutrófico típico textura argilosa a moderado caulínítico hipoférrico, relevo suave ondulado. A definição utilizada para o solo de cana-de-açúcar é Latossolo Vermelho eutrófico típico textura muito argilosa a moderado relevo caulínítico oxídico mesoférrico, relevo suave ondulado. Os solos foram coletados com auxílio de um enxadão e coletado na profundidade de 20 centímetros. Antes da coleta o local foi previamente limpo com a retirada do material vegetal e foi coletada uma amostra composta de 10 amostras simples.



LE1- Latossolo Vermelho-Escuro eutrófico A moderado textura argilosa relevo suave ondulado (EUTRUSTOX). EMBRAPA (1999)-Latossolo Vermelho eutrófico típico textura argilosa A moderado caulínítico hipoférrico relevo suave ondulado.

LE 2- Latossolo Vermelho-Escuro distrófico A moderado textura argilosa relevo plano (HAPLUSTOX). EMBRAPA (1999)- Latossolo Vermelho distrófico típico textura argilosa A moderado caulínítico hipoférrico relevo plano.

LE 3- Latossolo Vermelho-Escuro eutrófico A moderado textura muito argilosa relevo suave ondulado (EUTRUSTOX). EMBRAPA (1999)- Latossolo Vermelho eutrófico típico textura muito argilosa A moderado caulínítico oxidíco mesoférrico relevo suave ondulado.

LR- Latossolo Roxo eutrófico A moderado textura muito argilosa relevo suave ondulado e ondulado (EUTRUSTOX). EMBRAPA (1999)- Latossolo Vermelho eutrófico típico textura muito argilosa A moderado caulínítico-oxidíco relevo suave ondulado e ondulado.

TR- Terra Roxa estruturada latossólica eutrófico A moderado textura muito argilosa relevo ondulado (KANDIUSTALF). EMBRAPA (1999)- Nitossolo Vermelho eutrófico latossólico A moderado textura muito argilosa relevo ondulado.

Li+B- Litossolo +Cambissolo eutrófico +Afloramento de rocha (EUTROPEPT). EMBRAPA (1999)- Neossolo Litólico eutrófico+Cambissolo Háplico eutrófico textura argilosa A moderado relevo ondulado.

Figura 2. Mapa de solos da FCAV/UNESP/Jaboticabal

Disponível em : <http://javalí.fcav.unesp.br/Home/departamentos/soloeadubos/mapadesolos.gif>

Acesso em 12/02/2012.

4.2 Processamento das Amostras de Solo.

Após a realização das coletas as amostras foram transportadas para o Laboratório de Microbiologia da FCAV onde os solos foram secos (terra fina seca ao ar (TSFA)), peneirados em peneira de malha de 2mm e toda a matéria vegetal foi retirada. Após a secagem foi determinado à capacidade de retenção de água do solo (CRA), umidade, pH e matéria orgânica segundo descrito por Smith 1991 e Raij et al 1997. Posteriormente foram armazenados em temperatura ambiente até sua utilização.

- Secagem da Amostra de Solo

A secagem das amostras de solo de pastagem e de solo de cana-de-açúcar foi realizada através da secagem ao ar, na sombra em temperatura ambiente (28-30°C). Posteriormente foi passado em peneira de 2mm.

- Capacidade De Retenção de água (CRA)/Capacidade de Campo (CC)

Para a determinação da capacidade de campo foram utilizados os protocolos dos autores acima indicados. Foi utilizado o solo seco ao ar (TSFA), peneirado em peneira de malha de 2mm, o recipiente para determinação da capacidade de campo (peso1) foi pesado, em seguida o solo foi colocado no recipiente, o mesmo foi novamente pesado (peso2). O recipiente foi imerso em um frasco contendo água de modo a alcançar a metade da altura do recipiente, foi esperado até umedecer a superfície do solo no recipiente, aguardou-se alguns minutos após ter se observado a umidade na superfície, o recipiente foi retirado da água e colocado sobre papel absorvente para escorrer a água por 24 horas, tampou-se o recipiente com papel alumínio (para evitar evaporação da água), o recipiente foi novamente pesado após as 24 horas (sem o papel alumínio, peso3) para o calculo de quanto de água o solo reteve (Capacidade de Campo (CC)), onde :100% da capacidade de campo do solo

foi: $\text{Peso2} - (\text{menos}) \text{Peso1 g/solo}$. Para quantidade de água (água retida pelo solo: $\text{peso3} - (\text{menos}) \text{peso2}$). A Figura 3 ilustra uma etapa da Determinação de Campo.



Figura 3: Ilustração da medição da Capacidade de Campo/Capacidade de Retenção de Água.

- pH

A determinação de pH seguiu os protocolos descritos pelos autores acima indicados: foi utilizado 10 gramas de solo seco ao ar (TSFA) peneirado em peneira de malha de 2mm, a esse foi adicionado 25ml H_2O ou solução de CaCl_2 0,01 M; foi esperado 15 minutos até que essa solução molhasse a amostra; a solução após o período de espera foi agitada por 10 minutos em agitador de hélice individual ou mesa giratória; posteriormente a solução ficou em repouso por 30 minutos; foi realizada a leitura sem agitar, introduzindo-se a ponta do eletrodo na parte do solo. Anotou-se o valor.

- Umidade e Matéria Orgânica

A determinação da matéria orgânica foi realizada seguindo os protocolos dos autores acima indicados: para determinação foi utilizado o método em estufa foi pesado o cadinho de porcelana; em seguida foi colocada a amostra do solo, foi pesado o cadinho mais amostra úmida; o cadinho mais a mostra de solo foi colocado

em estufa a 98^o ou 105^oC por 24 horas; após as 24 horas foi retirado da estufa e foi colocado imediatamente em dissecador com sílica indicadora de umidade; após resfriamento, foi pesado o cadinho mais amostra seca. Onde: amostra úmida menos amostra seca vezes 100 dividido pela amostra úmida, foi obtido o percentual de umidade. O peso foi anotado. Posteriormente foi colocado o cadinho mais a amostra seca em estufa “mufla” a 550^oC por 24 horas; após as 24 horas a mufla foi desligada e foi aguardado até essa atingir em torno de 100^oC; foi retirado o cadinho da mufla e foi colocado imediatamente em dissecador com sílica indicadora de umidade. Após resfriamento, foi pesado o cadinho mais amostra queimada;

Onde: cadinho queimado menos peso do cadinho, cadinho mais amostra seca é igual à amostra queimada. Amostra queimada menos amostra seca foi obtido matéria orgânica (MO). MO g/kg= amostra seca menos amostra queimada vezes 1000 dividido pela amostra seca.

4.3 Linhagens de *E.coli*

Quatro linhagens de *E.coli* foram utilizadas para inoculação nos solos. Eram provenientes do Laboratório de Microbiologia da FCAV/UNESP/ Jaboticabal. As linhagens foram assim definidas:

L1: primeira linhagem, definida como cepas não portadoras genes de virulência;

L2: segunda linhagem, definida como cepas portadora do gene de virulência *eae*;

L3: terceira linhagem, definida como cepas portadoras dos genes de virulência *stx1/stx2*;

L4: quarta linhagem, definida como portadoras dos genes de virulência *stx1/stx2* e *eae*.

4.4 Incubação no Solo

Os solos após serem secos e antes de receberem os inóculos foram ao tempo 0 (antes do início do experimento) analisados quanto a presença de *Escherichia coli*. Foram coletados 10g de solo de pastagem e 10g de solo de cana-de-açúcar, levados a agitação em solução contendo Pirofosfato por 30 minutos, posteriormente foram plaqueadas em placas contendo o meio MacConkey Ágar e foram deixadas em estufa a 37° C por 24 h. Não houve crescimento característico de cepas de *E.coli*.

Os solos receberam inóculos bacterianos e foram incubados em um sistema denominado microcosmos. Esse microcosmos tem como objetivo reproduzir as condições do solo no campo, entretanto de forma controlada. Uma porção de 100 gramas de cada solo foram pesados e incubados em recipientes de vidros com tampa de rosca devidamente limpos e secos. Os recipientes de vidros foram mantidos fechados, entretanto permitiam a troca gasosa com o ambiente e foram incubados a temperatura ambiente na ausência de luz. A figura 4 ilustra o sistema microcosmo utilizado.



Figura 4. Sistema de microcosmo.

A persistência das bactérias no solo foi determinada com a realização de contagens de unidades formadoras de colônias (UFC) pelo método da diluição em série e incubados em placas. Os frascos contendo solo obtido de cana-de-açúcar e solo de pastagem receberam 60% da sua Capacidade de Retenção de Água (CRA) contendo uma solução de água esterilizada e concentrações definidas para cada inóculo.

- Diluição em série

Para realização do método de diluição em série utilizou-se 1 frasco Erlenmeyer 250 ml adicionado de 95 ml de solução de pirofosfato 0,1% (p/v), 6 tubos de ensaio 18x180 nm adicionado de 9ml de solução de pirofosfato 0,1% (p/v). Figura 5 ilustra a realização do método de diluição em série.

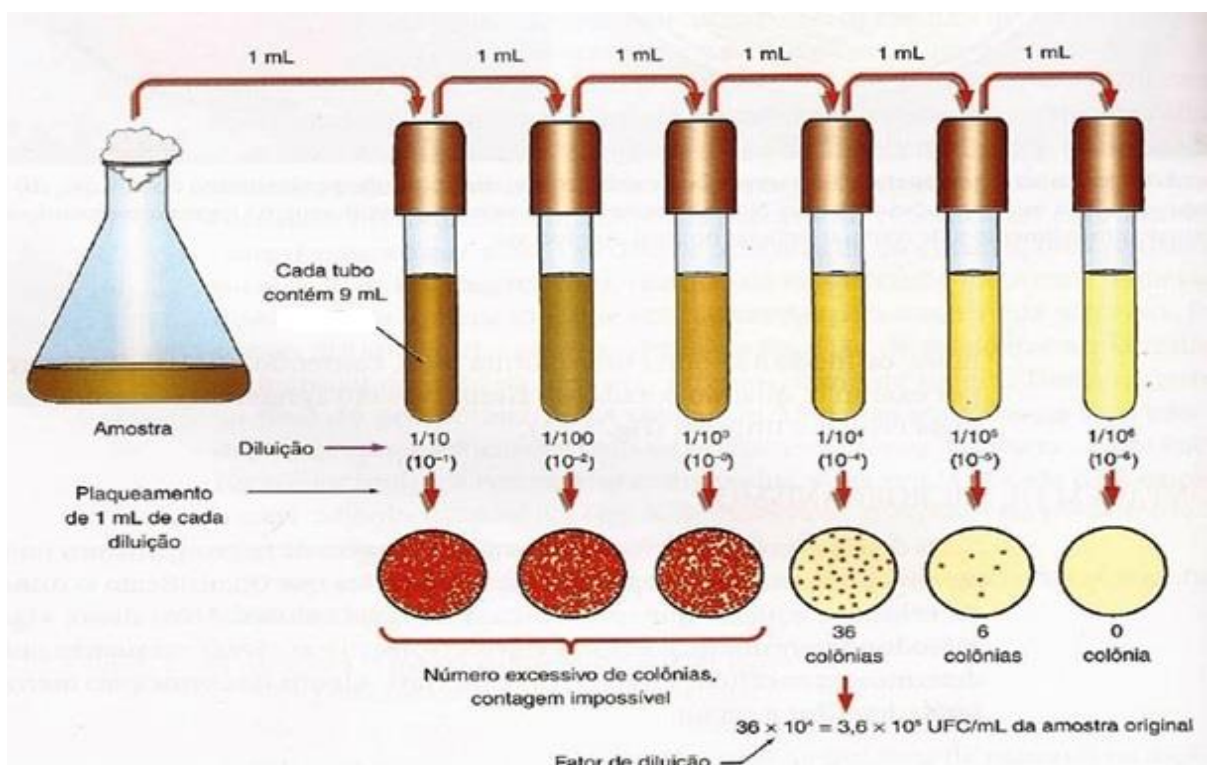


Figura 5: Ilustração do método diluição em série.

Disponível em: http://fitopatologia1.blogspot.com.br/2013_06_01_archive.html
Acesso em 25/04/2015.

4.5 Persistência de *Escherichia coli* em Solos

4.5.1 Tratamentos

Os frascos contendo os solos constituíram os seguintes tratamentos, como segue apresentados nas Figuras

	Solo Cana-de-açúcar
Esterilizado por autoclavagem	Inoculados com bactérias sem fator de virulência (cepa genérica) Tratamento: T1
	Inoculados com bactérias com fator de virulência <i>eae</i> Tratamento: T2
	Inoculados com bactérias com fator de virulência <i>stx1/stx2</i> Tratamento: T3
	Inoculados com bactérias com fator de virulência <i>stx1/stx2/eae</i> Tratamento: T4

Tabela 1: Tratamentos utilizados no solo de cana-de-açúcar esterilizado por autoclavagem.

	Solo Cana-de-açúcar
Não esterilizado	Inoculados com bactérias sem fator de virulência (cepa genérica) Tratamento: T5
	Inoculados com bactérias com fator de virulência <i>eae</i> Tratamento: T6
	Inoculados com bactérias com fator de virulência <i>stx1/stx2</i> Tratamento: T7
	Inoculados com bactérias com fator de virulência <i>stx1/stx2/eae</i> Tratamento: T8

Tabela 2: Tratamentos utilizados no solo de cana-de-açúcar não esterilizado:

	Solo Pastagem
Esterilizado por autoclavagem	Inoculados com bactérias sem fator de virulência (cepa genérica) Tratamento: T9
	Inoculados com bactérias com fator de virulência <i>eae</i> Tratamento: T10
	Inoculados com bactérias com fator de virulência <i>stx1/stx2</i> Tratamento: T11
	Inoculados com bactérias com fator de virulência <i>stx1/stx2/eae</i> Tratamento: T12

Tabela 3: Tratamentos utilizados no solo de pastagem esterilizado por autoclavagem.

	Solo Pastagem
Não esterilizado	Inoculados com bactérias sem fator de virulência (cepa genérica) Tratamento: T13
	Inoculados com bactérias com fator de virulência <i>eae</i> Tratamento: T14
	Inoculados com bactérias com fator de virulência <i>stx1/stx2</i> Tratamento: T15
	Inoculados com bactérias com fator de virulência <i>stx1/stx2/eae</i> Tratamento: T16

Tabela 4: Tratamentos utilizados no solo de pastagem não esterilizado.

4.5.2 Inoculação da *E. coli*

Para a inoculação das bactérias no solo, as cepas de *E.coli* foram cultivadas em placas contendo o meio MacConkey Ágar e foram deixadas em estufa a 37° C por 24 h. Suspensas em água estéril até uma densidade de cerca de 1×10^8 unidades formadoras de colônias (UFC)/ml (assumindo que uma Abs_{630} de 1.1 corresponde a densidade de cerca de 1×10^9 UFC). (Tabela 1)

A densidade celular inicial para cada tratamento foi de cerca de 10^9 UFC de *E.coli*/g de solo. Os solos foram acondicionados em Câmara Incubadora para BOD no escuro e após cada período de incubação 5°, 10°, 15°, 20°, 60° dia foram realizadas as contagens de UFC.

Tabela 5: Quantidade de inóculo utilizada.

BACTÉRIA	QUANTIDADE INOCULADA
Controle sem virulência	68×10^8 UFC/ml
Gene <i>eae</i>	$5,5 \times 10^8$ UFC/ml
Gene <i>stx1/stx2</i>	$4,5 \times 10^8$ UFC/ml
Gene <i>stx1/stx2/eae</i>	$2,5 \times 10^8$ UFC/ml

4.6 Método de Contagem

As contagens foram realizadas no 5º, 10º, 15º, 20º, 60º dia de incubação. Aproximadamente 10 gramas de solo de cada frasco foram retirados e levados a agitação com pirofosfato por 30 minutos. Para a contagem do número de bactérias totais utilizou-se a técnica de diluição seriada, descrita por Wollum (1982), utilizando como meio de cultura para contagem em placa MacConkey Ágar essa técnica consistiu em diluições até a ordem de 10^{-6} e posterior plaqueamento de uma alíquota da diluição pelo método de espalhamento em placa e incubadas a 37°C. Todos os tratamentos foram realizados em triplicata. Populações bacterianas foram expressas numa base de peso seco do solo.

4.7 Extração do DNA Bacteriano

Após o período de incubação das culturas multiplicadas no caldo BHI, foi realizada a extração do DNA através de um protocolo de lise térmica segundo a técnica proposta por Keskimaki et al. (2001) com pequenas modificações.

Nesta técnica, 1 mL da cultura foi transferida para um tubo eppendorf e centrifugada a 15.000 rpm por 2 minutos para a precipitação das células e descarte do sobrenadante. As células precipitadas foram ressuspensas em 1 mL de tampão fosfato salino (PBS) e agitadas em vortex por 30 segundos. A cultura bacteriana foi novamente precipitada por centrifugação e o processo de lavagem repetido, dessa vez com 500 µL de água ultrapura Milli-Q (Millipore Corporation, EUA) estéril. Após essa lavagem, o tubo eppendorf contendo a cultura foi colocado por 10 minutos em água fervente. Após esse período, as células foram precipitadas através de centrifugação a 14.000 rpm durante 2 minutos e do qual foi retirado uma alíquota de 300 µl do sobrenadante (DNA) e transferido para outro tubo eppendorf. Esse material lisado, foi estocado em freezer a -80°C. O produto oriundo dessa

preparação foi utilizado para a realização da PCR de triagem, para a detecção de STEC e EPEC.

Logo após a extração do DNA, todas as amostras foram armazenadas em freezer -80°C, em tubos contendo 750 µL de glicerol e 750µL do caldo BHI com a cultura de bactérias para análises futuras.

4.8 Detecção de STEC e EPEC Através de PCR

A identificação e isolamento bacteriano foram realizados conforme o procedimento do protocolo do Reference Laboratory for *Escherichia coli*, (EcL), da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Montreal (disponível em http://www.apzec.ca/en/APZEC/Protocols/APZEC_PCR_en.aspx).

Para detecção de STEC e EPEC, foi realizada uma PCR de triagem em que foram pesquisados os genes *stx*₁, *stx*₂ e *eae*. Para tal, uma alíquota de DNA (4 µL) foi acrescentada à mistura contendo 0,4 µL de dNTP (10 mM), 2 µL de solução tampão 10X (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 0.8% Nonidet P40), 1.6 µL de 25 mM MgCl₂, 0.8 µL de cada primer 10 pM, e uma unidade de Taq DNA polimerase (Fermentas, Europe). Água MilliQ foi adicionada até completar o volume total de 20µL. Os ciclos consistiram de um estágio inicial a 95°C por 2 minutos, seguidos de 25 ciclos, cada um contendo desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 50°C por 30 segundos, e extensão a 72°C por 30 segundos. O ciclo de extensão final foi a 72°C por 7 minutos.

Após cada PCR, acrescentava-se de 5µL de corante de front (0,25% azul de bromofenol em 50% de glicerol) no produto da reação e foi aplicado marcador molecular de 100 pb DNA Ladder (Invitrogen, EUA) em um gel de agarose a 1,5% contendo brometo de etídio (1µg/mL) em tampão Tris-Borato-EDTA (TEB) e separados por eletroforese (70V/1h). Os produtos de amplificação foram visualizados por exposição do gel em luz UV e fotografado.

4.9 Detecção de STEC e EPEC no Solo

A detecção de STEC e EPEC nos solos analisados foi realizada através da técnica do método de contagem. Para a realização de contagem através desse método foi necessário anteriormente realizar a técnica de diluição seriada garantindo dessa maneira que o número de colônias na placa fosse o desejado. Após plaqueamento foram incubadas a 37^o C por 24 horas para realização da contagem.

O método consiste na contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFC) de bactérias com características e *E.coli*, a contagem foi realizada em triplicata. Posteriormente a contagem, cepas com características foram escolhidas aleatoriamente para detecção por PCR.

5. RESULTADOS

A técnica de PCR foi utilizada inicialmente para comprovar que nos solos analisados, solo de pastagem e solo de cana-de-açúcar no tempo 0 (antes do início do tratamento) não continham *E.coli*, como foi demonstrado pelos marcadores selecionados (Figura 6A); após a incubação das cepas de *E.coli* essas passaram a ser detectadas nos solos através da PCR.(Figura 6B).

Nos ensaios moleculares foram analisados genes determinantes dos fatores de virulência *stx2*, *stx1* e *eae*. Os resultados das análises dos solos por PCR estão indicados na Figura 6 A e Figura 6 B.

A Figura 6 A, apresenta os resultados de uma PCR de triagem onde foi pesquisada a presença do gene *stx2*, para os solos de cana-de-açúcar e solo de pastagem, ambos esterilizados por autoclavagem e não esterilizado para o período antes da inoculação, tempo 0. As amostras bacterianas não apresentaram o gene, os isolados foram negativos para a presença da *E.coli stx2*, indicando portanto que a amostra no tempo 0 não continha cepas de *E.coli*.

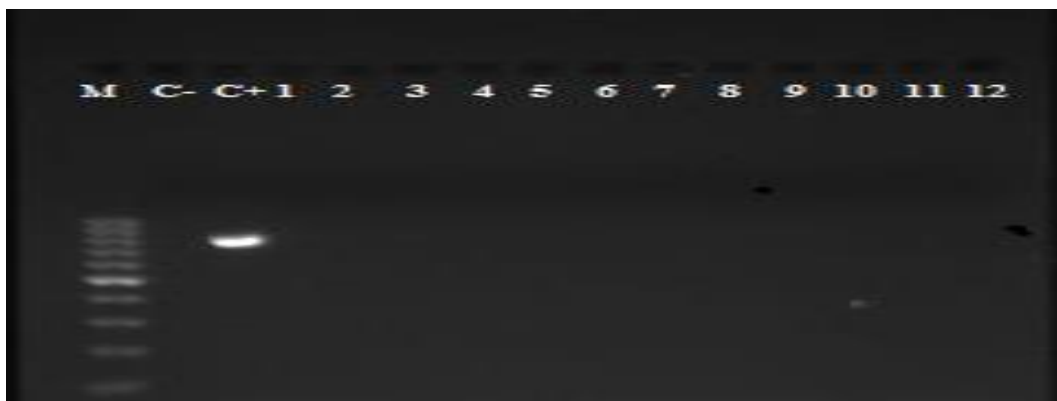


Figura 6 A. Eletroforese de gel de agarose de produtos de DNA amplificados através da reação em cadeia da Polimerase (PCR). O tamanho dos produtos de amplificação foi avaliado utilizando como referencial o marcador de peso molecular 100pb(FERMENTAS).

Canaleta M- Marcador de peso molecular;

Canaleta C⁻- Controle negativo da reação;

Canaleta C⁺- Controle positivo para o gene *stx2* (807pb);

Canaleta 2- Solo de cana esterilizado por autoclavação, tempo 0;

Canaleta 3- Solo de cana não esterilizado, tempo 0;

Canaleta 4- Solo de pasto esterilizado por autoclavação, tempo 0;

Canaleta 5- Solo de pasto não esterilizado, tempo 0.

Os resultados obtidos na Figura 6 B, mostram uma PCR de triagem onde foi pesquisada a presença dos genes *eae* e *stx1*. A Figura 6 A, para os solos de cana-de-açúcar e solo de pastagem, ambos esterilizados por autoclavação e não esterilizado para diferentes períodos (tempo, 5,10 e 60 dias). As amostras bacterianas analisadas nas canaletas de 9 a 12 foram positivas para a presença do gene *eae* tempo 5 e 10 dias, as canaletas de 13 e 14 foram negativas para a presença do gene (*E.coli* genérica) tempo 10 dias, as canaletas de 15 e 16 foram positivas para a presença do gene *stx1/stx2,eae* tempo 10 dias, as canaletas de 17 a 20 foram positivas para a presença do gene *eae* tempo 60 dias indicando portanto que a amostra nos diferentes períodos de contagem ainda continham cepas de *E.coli*.

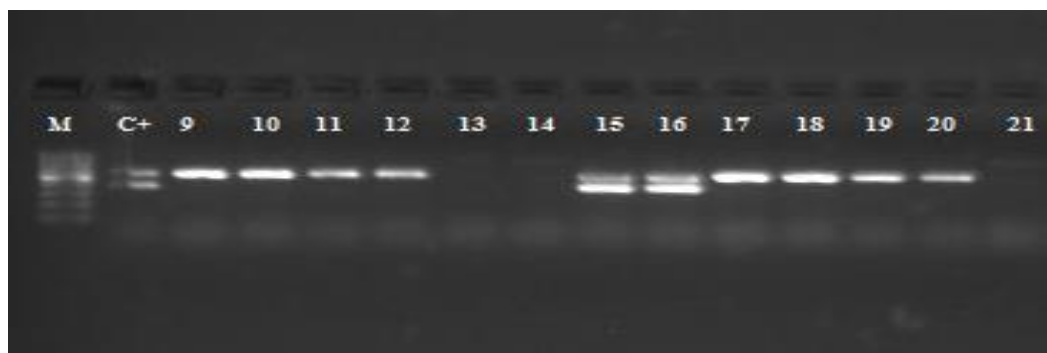


Figura 6B. Eletroforese de gel de agarose de produtos de DNA amplificados através da reação em cadeia da Polimerase (PCR). O tamanho dos produtos de amplificação foi avaliado utilizando como referencial o marcador de peso molecular 100pb(FERMENTAS).

Canaleta C⁺- Controle positivo para *eae* (570pb) e *stx1* (388pb);

Canaleta 9- Solo de cana esterilizado por autoclavação inoculado com cepa *eae*, tempo 5 dias;

Canaleta 10- Solo de cana não esterilizado inoculado com cepa *eae*, tempo 5 dias;

Canaleta 11- Solo de cana esterilizado por autoclavação inoculado com cepa *eae*, tempo 10 dias;

Canaleta 12- Solo de cana não esterilizado inoculado com cepa *eae*, tempo 10 dias;

Canaleta 13- Solo de pasto esterilizado por autoclavação inoculado com cepa de *E.coli* genérica, tempo 10 dias;

Canaleta 14- Solo de pasto não esterilizado, inoculado com cepa de *E.coli* genérica, tempo 10 dias;

Canaleta 15- Solo de pasto esterilizado por autoclavação, inoculado com cepa *stx1/stx2/eae*, tempo 10 dias;

Canaleta 16- Solo de pasto não esterilizado, inoculado com cepa *stx1/stx2/eae*, tempo 10 dias;

Canaleta 17- Solo de cana esterilizado por autoclavação, inoculado com cepa *eae*, tempo 60 dias;

Canaleta 18- Solo de cana não esterilizado, inoculado com cepa *eae*, tempo 60 dias;

Canaleta 19- Solo de pasto esterilizado por autoclavação, inoculado com cepa *eae*, tempo 60 dias;

Canaleta 20- Solo de pasto não esterilizado, inoculado com cepa *eae*, tempo 60 dias.

Neste estudo dois tipos de solos foram analisados, cana-de-açúcar e pastagem, ambos se apresentaram ácidos com pH de 4,05 e 4,69, e valores de porcentagem de MO (matéria orgânica) de 1,9 e 4,1% respectivamente. O exame desses solos antes do início do estudo revelou que nenhum continha quaisquer cepa de *E. coli*. Quatro cepas diferentes de *E. coli* foram inoculadas nos solos testados, duas delas foram caracterizadas como STEC não-O157 como indicado em materiais e métodos, uma caracterizada pela presença do gene *eae*, e a última cepa foi caracterizada como *E. coli* genérica não portadora dos genes de virulência. Para determinar os efeitos adicionais dos microrganismos nativos do solo, nós utilizamos

amostras esterilizadas por autoclavação e amostras não esterilizadas de solos de cana-de-açúcar e pastagem.

O número de bactérias (UFC) presente na microbiota inicial do solo sob cana de açúcar e solo sob pastagem foram muito semelhantes apesar das diferenças apresentadas por cada solo como o valor de pH e a porcentagem de matéria orgânica (Figura 7).

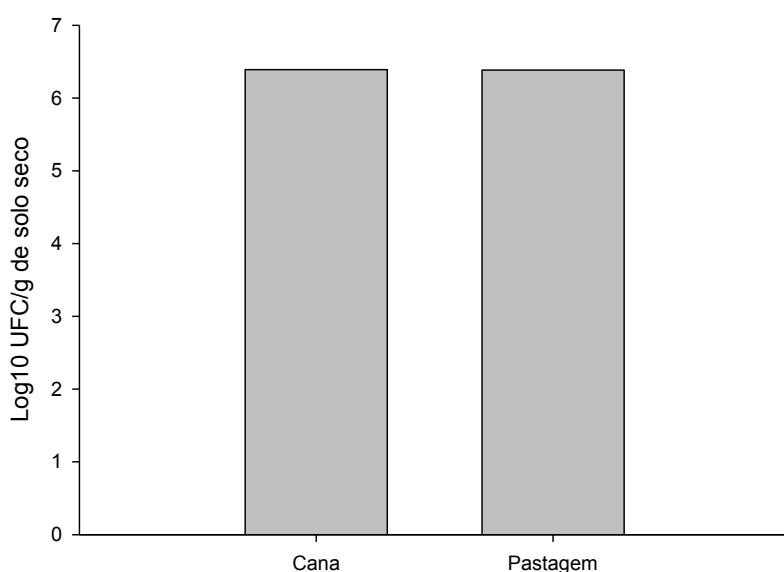


Figura 7. Valores iniciais de unidade formadora de colônias de bactérias totais presente no solo de cana e pasto.

O número de bactérias recuperadas no solo sob cana-de-açúcar nas duas condições, condição de esterilidade por autoclavação do solo e condição de não esterilidade foram semelhantes para os diferentes tempos de incubação. Entretanto, comparando o número de isolados entre as duas condições observa-se um número muito maior de bactérias na condição de esterilidade por autoclavação comparado com a condição de não esterilidade do solo. Provavelmente a presença da microbiota natural do solo dificultou o aumento populacional dos isolados de *E. coli* inoculados no solo (Figura 8).

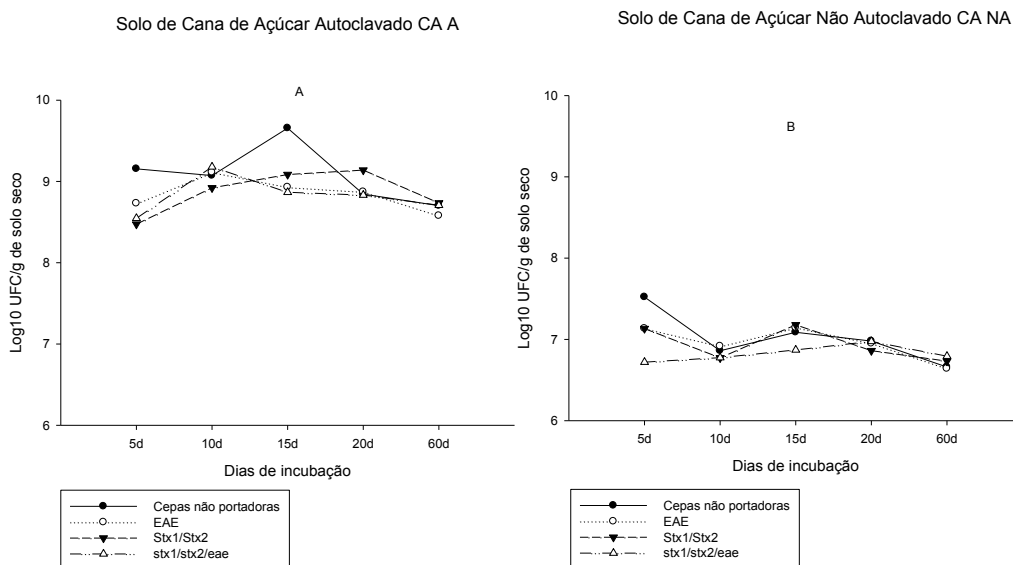


Figura 8. Valores médios de número de unidades formadoras de colônias de *Escherichia coli* portadoras dos genes *eae*, *stx1/stx2*, *stx1/stx2/eae* e não portadoras (genéricas) incubadas em microcosmos de solo de cana de açúcar esterilizado por autoclavação e não esterilizado.

Quando se utilizou o solo sob pastagem o número de bactérias foi muito menor na condição de não esterilidade comparado com a condição de esterilidade, o mesmo comportamento foi observado para o solo sob cana-de-açúcar. Comparando o solo sob cana-de-açúcar com o solo sob pastagem pode-se observar que o comportamento foram semelhantes nas duas condições (de esterilidade e não esterilidade), entretanto no solo sob pastagem pode-se observar uma diferença de comportamento dos isolados em função da persistência dos mesmos.

A análise global do número de isolados bacterianos nos diferentes tipos de solos permitiu verificar que em ambos os solos esterilizados por autoclavação cana e pasto, o número de bactérias sempre aumentou entre o 5º dia da análise e o 10º dia da análise independentemente da presença (*eae*; *stx1/stx2*; *stx1/stx2/eae*) ou ausência (genérica) de fatores de virulência sempre seguida de uma diminuição deste número de bactérias até o 60º dia do experimento (Figura 8 e Figura 9). Quando consideramos os solos não esterilizados por autoclavação o comportamento é um pouco diferente nos dois solos. No solo de cana não autoclavado os isolados

correspondentes a cepa genérica e as cepas portadoras dos genes *eae* e *stx1/stx2* apresentam uma diminuição do número entre 5º e o 10º dia do experimento, seguido por um pequeno aumento no número de bactérias entre o 10º e o 15º dia, apresentando por fim uma queda do número de bactérias entre o 15º dia e o 60º dia do experimento (Figura 8). Enquanto que no solo de pastagem não autoclavado a cepa genérica diminuiu o seu número do 5º ao 60º dia numa queda constante, entretanto, as cepas portadoras dos genes *eae*, *stx1/stx2* e *stx1/stx2/eae* apresentaram uma manutenção ou aumento do número de bactérias entre os dias 5º e 15º do experimento (Figura 9).

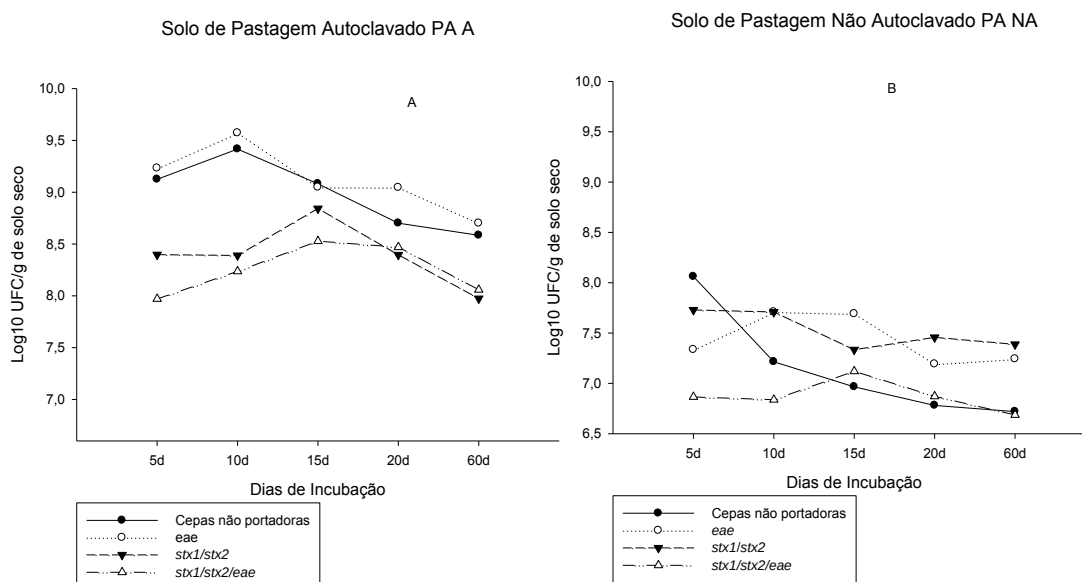


Figura 9. Valores médios de número de unidades formadoras de colônias de *Escherichia coli* portadoras dos genes *eae*, *stx1/stx2*, *stx1/stx2/eae* e não portadoras incubadas em microcosmos de solo de pastagem esterilizado por autoclavagem e não esterilizado.

Ao analisarmos o comportamento das cepas adicionadas ao solo de forma individual foi possível observar que a cepa de *E. coli* genérica apresentou uma queda constante do número de bactérias entre o 5º e o 60º dia de forma acentuada para os dois solos não autoclavados (cana e pastagem) e uma queda mais discreta para os solos esterilizados por autoclavagem, ocorrendo inclusive um pequeno aumento no

número de células entre o 10º e o 15º dia no solo de cana esterilizado por autoclavação (Figura 10).

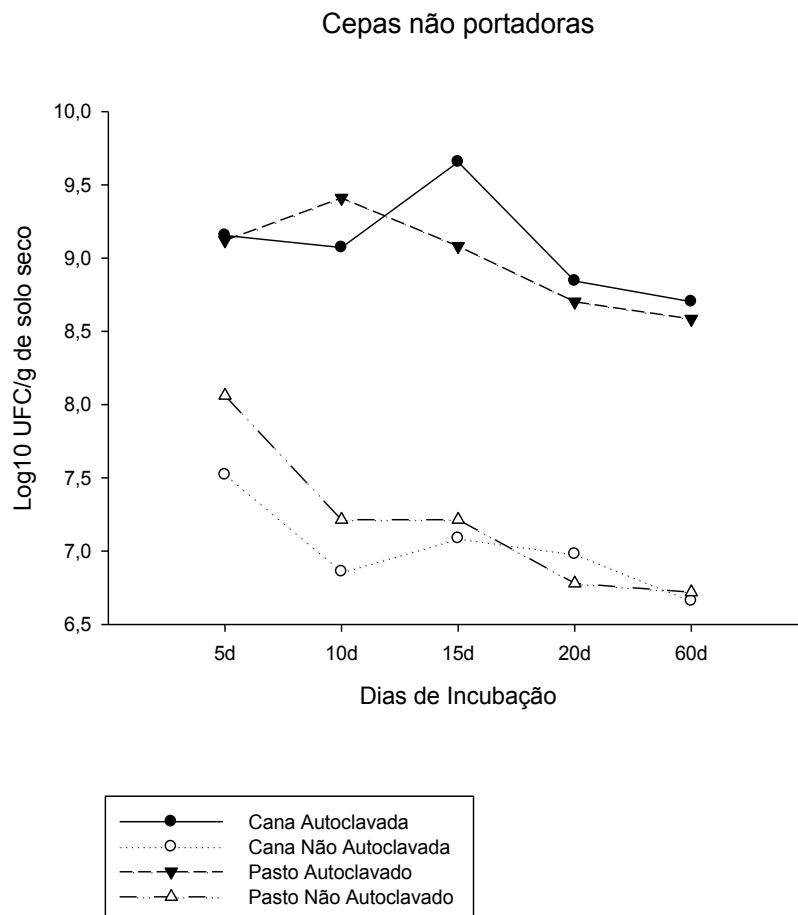


Figura 10. Valores médios de unidade formadora de colônias de cepas de *Escherichia coli* não portadoras de genes de virulência (genérica) incubadas em microcosmos de solo de cana-de-açúcar esterilizado por autoclavação, cana de açúcar não esterilizado, solo de pastagem esterilizado por autoclavação e solo de pastagem não esterilizado.

A cepa portadora do gene *eae* sempre apresentou um aumento do número de células entre o 5º e o 10º dia para os solos esterilizados por autoclavação (cana e pastagem) e para o solo de pastagem não autoclavado exibindo uma diminuição do número de células bacterianas para este período apenas no solo de cana não autoclavado. (Figura 11).

O número de isolados portadores dos gene *eae* foram superiores no solo sob pastagem nas condições de esterilidade por autoclavação e não esterilidade, comparado com o solo sob cana-de-açúcar. Estes resultados sugerem o efeito da matéria orgânica favorecendo as cepas portadoras do gene *eae* (Figura 11).

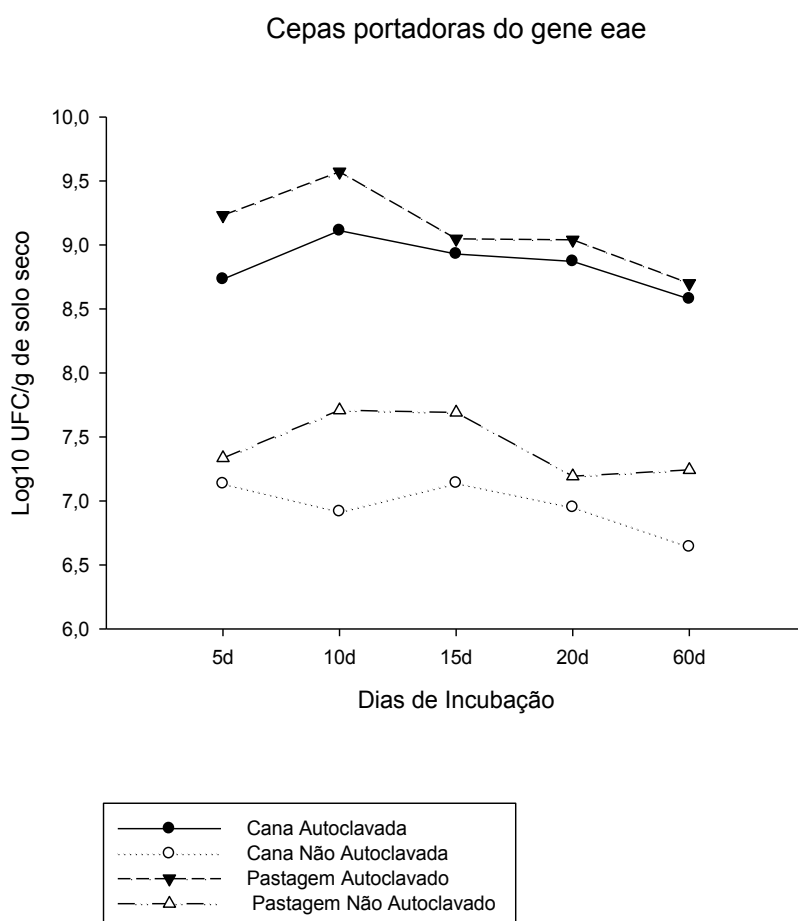


Figura 11. Valores médios de unidade formadora de colônias de cepas de *Escherichia coli* portadoras do gene *eae* incubadas em microcosmos de solo de cana-de-açúcar esterilizado por autoclavação, cana-de-açúcar não esterilizado, solo de pastagem esterilizado por autoclavação e solo de pastagem não esterilizado.

A cepa portadora dos genes *stx1/stx2* apresentou um comportamento de aumento no número de células entre o 5º e o 15º dia nos solos esterilizados por autoclavação (cana e pastagem), sendo que no solo de cana esterilizado por autoclavação este aumento do número de células se manteve até o 20º dia do experimento seguido por uma diminuição no número de células até o 60º dia. Nos

solos não autoclavados o comportamento foi diferente com uma manutenção do número de células entre 5º e o 10º dia no solo de pasto não esterilizado por autoclavação, seguido de uma queda do número de células entre o 10º e o 15º dia e uma recuperação no número de células entre o 15º e o 60º dia, enquanto que no solo de cana não autoclavado após uma pequena recuperação no 15º dia no número que células ocorreu uma queda constante no número de células até o 60º dia (Figura 12).

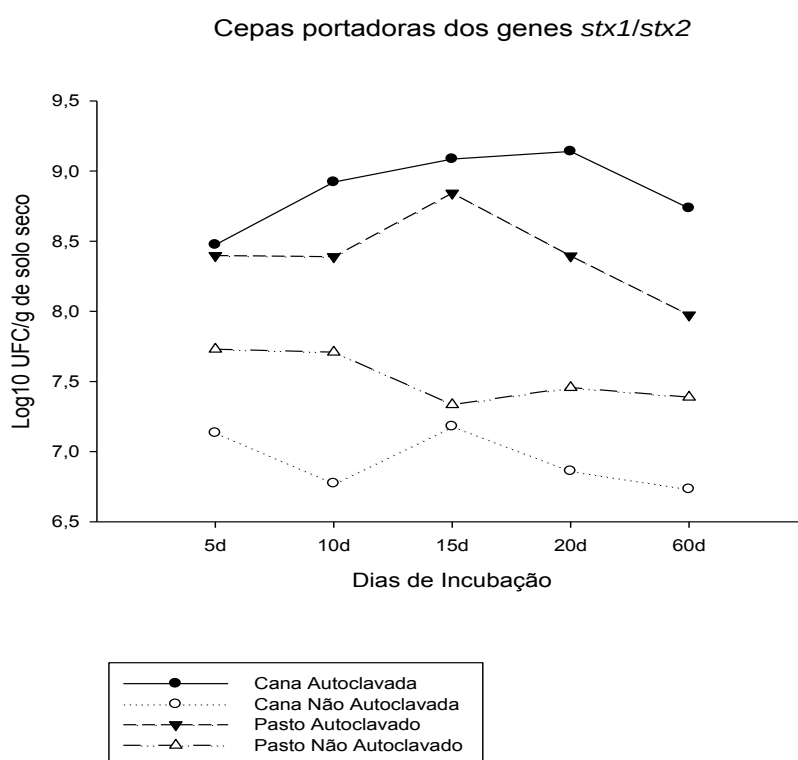


Figura 12. Valores médios de unidade formadora de colônias de cepas de *Escherichia coli* portadoras dos genes *stx1/stx2* incubadas em microcosmos de solo de cana-de-açúcar esterilizado por autoclavação, cana de açúcar não esterilizado, solo de pastagem esterilizado por autoclavação e solo de pastagem não esterilizado.

A cepa portadora dos genes *stx1/stx2/eae* apresentou um comportamento de manutenção ou aumento do número de células bacterianas recuperadas até o 20º dia do experimento nos dois tipos de solos esterilizados por autoclavação (cana e pastagem). Enquanto que nos solos não autoclavados, apesar de partir de um

número menor de células recuperadas foi possível verificar um aumento do número de células até o 15º dia do experimento para o solo de pastagem não autoclavado e até o 20º dia para o solo de cana não autoclavado (Figura 13).

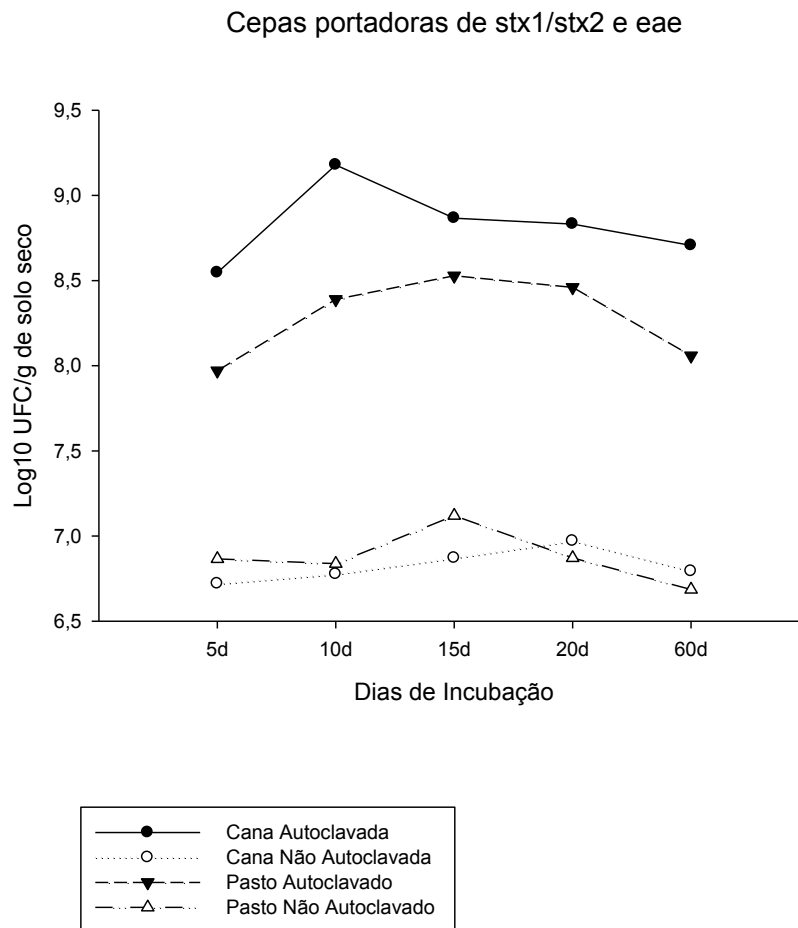


Figura 13. Valores médios de unidade formadora de colônias de cepas de *Escherichia coli* portadoras do gene *stx1/stx2/eae* incubadas em microcosmos de solo de cana-de-açúcar esterilizado por autoclavação, cana de açúcar não esterilizado, solo de pastagem esterilizado por autoclavação e solo de pastagem não esterilizado.

6. DISCUSSÃO

Os ecossistemas naturais mostram uma resistência a invasão por organismos estranhos aquele ecossistema sendo verdadeira a afirmativa que a resistência apresentada pelo ecossistema está diretamente relacionada a diversidade das espécies presentes no ecossistema. Quanto mais rico em diversidade for um ecossistema mais estável ele se apresentara. Assim, existe uma relação inversa entre a diversidade microbiana no solo e a sobrevivência de uma nova espécie invasora adicionada a este solo(VAN ELSAS et al.,2012).

A análise inicial dos solos examinados no presente trabalho, solo de cultivo de cana e solo utilizado como pastagem não apresentou uma diferença significativa entre o número de bactérias determinados em cada um dos solos. Esta mesma análise não permitiu o isolamento de nenhuma colônia de *Escherichia coli* porventura presente no solo. Assim, após a adição inicial dos inóculos bacterianos em cada um dos tipos de solo examinados no sistema de microcosmo a sobrevivência, multiplicação ou morte das células bacterianas recuperadas após os intervalos de tempo examinados são uma indicação da sobrevivência das células de *E.coli* presentes no inóculo original frente as particularidades de cada microcosmo.

Embora as condições de permanência de *E.coli* no solo, no esterco ou na água são consideradas menos favoráveis do que no sistema intestinal, este microrganismo tem sido recuperado destes habitats em prazos que variam de poucos dias até um ano (FUKUSHIMA et al., 1999).

Estudos preliminares indicaram uma curta sobrevivência de bactérias entéricas em solos com baixo pH. Entretanto, deve ser levado em consideração que estes estudos foram realizados com cepas de *E.coli* comensal (genérica) (SJOGREN., 1994) e não com linhagens patogênicas de *E.coli*, como por exemplo a cepa O157:H7 a qual se mostrou significativamente mais tolerante a acidez do que as linhagens não patogênicas (GORDEN ; SAMALL,1993), assim é provavel que o sorotipo O157:H7 apresente alguma vantagem seletiva sobre outros tipos de *E.coli*

em pH ácido. Nesse sentido Zhang et al. (2013) e Wang et al. (2014) verificaram que *E.coli* O157:H7 uma vez inoculada no solo apresentou um declínio no número de células viáveis muito rapidamente quando inoculada em solo ácido (pH 4,57 – 5,14) não sendo mais detectada após 7 dias de incubação do solo, os autores verificaram também que este declínio foi muito menor em solo neutro (pH 6,51 – 7,39) onde as bactérias foram detectadas até o 38º dia de experimento.

Além do pH outro fator abiótico que exerce forte efeito sobre a sobrevivência de células de *E.coli* O157:H7 é a temperatura. Vidovic et al. (2007), verificaram que a inoculação de um solo inoculado com *E.coli* O157:H7 em baixa temperatura a 4°C aumentou a sobrevivência da célula invasora para 390 dias em solos com alto conteúdo de carbono.

A *E.coli* O157:H7 é um foodborne pathogen (patógeno associado a alimentação) o qual pode causar diarreia aquosa e/ou sanguinolenta, colite hemorrágica (HC), síndrome urêmica hemorrágica (HUS) e trombocitopenia purpura trombótica (MEAD et al., 1999) no ser humano, sendo que a dose mínima infectante de *E.coli* O157:H7 para o ser humano é de apenas 10 células bacterianas (GRIFFIN ; TAUXE, 1991). A infecção humana por *E.coli* O157:H7 tem sido associada a várias rotas de transmissão, incluindo a exposição direta a animais infectados (RENNICK et al., 1993), pessoa a pessoa (BELONGIA et al., 1993) e mais tipicamente devido ao consumo de carne moída contaminada não adequadamente cozida (ARMSTRONG et al., 1996). Existe entretanto, uma possibilidade real da infecção por *E.coli* O157:H7 no ser humano se originar de produtos prontos para o consumo como os vegetais minimamente processados ou as frutas, os quais acabam por entrar em contato direto ou indireto com as fezes dos animais, as quais são utilizadas para adubar o solo (FUKUSHIMA et al., 1997).

Segundo Vogeleer et al. (2014), as células de STEC são constantemente eliminadas com as fezes de bovinos, as quais podem naturalmente contaminar os solos de fazendas (áreas de pastagem), ou serem utilizadas como adubo orgânico do solo, podendo vir a contaminar áreas de cultivo de vegetais. Estas células podem sobreviver no solo por um determinado período de tempo e principalmente por meio da irrigação poderiam contaminar vegetais como o alface ou a beterraba.

A maioria dos estudos realizados examinaram principalmente as cepas STEC de O157:H7 em relação a sua sobrevivência no solo, enquanto que a análise da persistência de cepas não- O157 tem recebido menor atenção (TOPP et al., 2003). No entanto, na Europa e nos Estados Unidos o papel das cepas STEC não- O157:H7 (por exemplo, O26:H11, O91:H21, O103:H2 e O145:H28), como causadoras de HC, HUS e outras doenças gastrointestinais estão sendo cada vez mais reconhecidas (MATHUSA et al., 2010). Deve ainda ser lembrado que no Brasil a maioria das infecções humanas por STEC envolvem cepas não- O157 portadoras dos fatores de virulência *stx1* e *eae* (IRINO et al., 2007).

Gould et al. (2013), descreveram que poucas linhagens de STEC não- O157 tem sido associadas a epidemias e que pacientes portadores de infecções por cepas STEC não- O157 são menos hospitalizados do que os pacientes portadores de cepas O157 (14% versus 43%). Também foi verificado que 74% dos isolados STEC não- O157 portavam apenas o gene *stx1*, enquanto que 17% apresentavam o gene *stx2* e somente 9% carregavam os genes *stx1/stx2*.

Pelos motivos acima mencionados foram selecionadas cepas STEC não- O157 de origem bovina para serem inoculadas em dois tipos distintos de solos, solo utilizado para o cultivo de cana de açúcar o qual foi associados a uma menor diversidade microbiana do seu ecossistema e o solo utilizado para pastagem normalmente associado a uma maior diversidade microbiana do seu ecossistema e em duas situações distintas solo esterilizado por autoclavação e solo não autoclavado.

Alguns autores realizaram trabalhos demonstrando que não apenas a diversidade microbiana do ecossistema é importante, mas também a manutenção de determinados grupos de organismos como fungos e actinobactérias os quais possuem a capacidade de produzir uma ampla variedade de metabólitos secundários os quais possuem um papel fundamental na eliminação de espécies invasoras do solo (VAN ELSAS et al, 2012; VIDOVIC et al 2007; YAO et al, 2014), desse modo o processo de esterilização por autoclavação do solo representa um aspecto fundamental na eliminação destas espécies produtoras de metabólitos

secundários com uma consequência direta na sobrevivência de uma espécie invasora em um ecossistema no solo.

Kim et al. (2011), inoculou 3 linhagens diferentes de *E.coli* O157:H7 em um composto comercial previamente autoclavado. Os autores verificaram que o processo de autoclavação eliminou boa parte dos actinomicetos e fungos originalmente presentes no composto, o que diminuiu a capacidade da microbiota do ecossistema selecionado em resistir a bactéria O157 invasoras, aumentando portanto, a viabilidade da O157 no composto.

Devido a esta particularidade, neste trabalho além de dois tipos diferentes de solo, também foi analisado o impacto na sobrevivência das cepas *E.coli* invasoras, do fenômeno de eliminação de espécies selvagens nos microcosmos analisados devido ao aquecimento gerado pela autoclavação. Assim, os inóculos dos diferentes tipos de cepas de *E.coli* foram analisadas sob duas situações diferentes dos solos examinados, solo esterilizado por autoclavação e não autoclavado.

Topp et al. (2003), descreveram o desaparecimento de duas cepas de *E.coli* genéricas isoladas de dejetos de suíno e inoculadas em solo argiloso após 30 dias de inoculação no solo.

Wang et al. (2014), estudaram a dinâmica de sobrevivência de *E.coli* O157:H7 em 14 solos coletados na China. O tempo de desaparecimento da cepa inoculada foi calculado como o tempo necessário para alcançar o limite de detecção de 100 UFC/g de solo seco. Este tempo variou de 1,4 a 25,8 dias, sendo que o tempo mais longo de desaparecimento foi observado em solo neutro ou alcalino. A bactéria O157:H7 sofreu um rápido declínio nos cinco solos mais ácidos da região sul da China com uma média de sobrevivência de um a três dias. Estes resultados coincidem com os resultados de Zhang et al. (2013), que também examinaram a sobrevivência de *E.coli* O157:H7 em 12 solos da China. Segundo os autores existe uma nítida diferença na sobrevivência em solos ácidos e solos neutros com resultados de 7 dias e 38 dias respectivamente. No presente trabalho os dois solos apresentaram um caráter ácido (cana- 4,05 e pasto- 4,69), o que segundo a literatura acima descrita coincide com o menor tempo de sobrevivência de células STEC.

No presente estudo foi possível observar que em ambos os solos esterilizados cana e pastagem, existe um aumento no número de células de *E.coli* inoculadas entre o 5º e o 10º dia para todas as cepas analisadas e em seguida apresentam em torno do 15º dia um decréscimo nas curvas de sobrevivência, isto esta de acordo com os resultados apresentados por Van Elsas et al. (2012).

Van Elsas et al. (2012) examinou a relação inversa existente entre a diversidade microbiana no solo e a sobrevivência da espécie invasora *E.coli* O157:H7. Para isto os autores inocularam esta bactéria em diferentes microcosmos contendo o mesmo solo, esterilizado por irradiação e não esterilizado, com diferentes comunidades microbianas cultiváveis diferencialmente construídas, assim existiam comunidades com 5, 20 e 100 diferentes linhagens de bactérias do solo. Os autores verificaram que no solo não esterilizado a capacidade de sobrevivência da invasora *E.coli* O157:H7 depende da riqueza de diversidade microbiana das bactérias naturais do solo. Quanto maior a diversidade maior a dificuldade da O157:H7 invasora. Segundo os autores esta limitação depende da produção de metabólitos secundários envolvidos no controle do crescimento da célula invasora, e depende também da competição por nutrientes o que representa um importante mecanismo de limitação da invasão em comunidades microbianas altamente diversificadas. Em relação ao solo esterilizado por irradiação os autores verificaram que a ausência de competição da célula O157:H7 invasora com as comunidades microbianas naturais do solo, permitiu a invasora um bom desenvolvimento inclusive com aumento do número de células invasoras durante um período inicial. Este mesmo efeito foi verificado no presente trabalho em relação aos solos de cana e pastagem esterilizados por autoclavação.

Ma et al. (2013) também indicaram que a sobrevivência de cepas de *E.coli* O157:H7 foi negativamente correlacionada com a diversidade microbiana do solo devido a concorrência entre as comunidades bacterianas nativas e a espécie introduzida por nutrientes e espaço. Assim, a esterilidade dos solos tem um efeito direto na eliminação de diferentes espécies nativas do solo especialmente fungos e actinobactérias o que diminuiu a concorrência entre as comunidades nativas e a espécie invasora. Yao et al. (2013) demonstraram que várias espécies de bactérias

Gram negativas naturais do solo também possuem um grande efeito de supressão sobre a espécie invasora *E.coli* O157:H7. A maioria dos estudos anteriormente apresentados estão focados na persistência da *E.coli* O157:H7 em diferentes tipos de solos e de uma forma geral concluíram que esta persistência é amplamente afetada pelas propriedades do solo, mas além disto é também influenciada pela biologia do solo, incluindo as particularidades das comunidades microbianas nativas. Os potenciais mecanismos envolvidos com a sobrevivência incluem a predação, competição por nutrientes e o antagonismo entre as espécies (MA et al, 2013; SEMENOV et al, 2007). Acredita-se que um solo com um ecossistema com menor nível de diversidade microbiana é mais sensível para a invasão por *E.coli* O157:H7 do que um solo com um nível mais elevado de biodiversidade (VAN ELSAS et al, 2012; VIDOVIC et al, 2007; MA et al, 2014). Isto pode ser comprovado no presente trabalho comparando-se o comportamento das cepas inoculadas em solos de cana não autoclavado com o solo de pastagem não autoclavado, pois no solo de cana não autoclavado após uma queda inicial no 5º dia, as cepas invasoras se recuperaram e aumentaram o seu número até o 15º dia, antes de sofrerem uma queda na sobrevivência. Por outro lado no solo de pastagem não autoclavado as cepas invasoras não conseguiram esta multiplicação bacteriana, sendo o exemplo mais evidente o comportamento da célula de *E.coli* genérica inoculada a qual apresentou uma queda constante na sobrevivência a partir do 5º dia do experimento, resultado este que está de acordo com o trabalho de Topp et al. (2003) o qual descreveu a eliminação de cepas genéricas de *E.coli* em solo argiloso.

Sorogrupos de *E.coli* produtoras de Shiga toxina O157 e não- O157 são conhecidas por causar doenças graves no ser humano (MATHUSA et al, 2010). No entanto, a investigação sobre a persistência de STEC não- O157 em solo é bastante limitado. Ma et al. (2014) estudaram a persistência de três estirpes de STEC não- O157 em solos agrícolas na Califórnia e Arizona nos EUA. O estudo mostrou que as cepas de STEC não- O157 de sorotipos O26:H11 e O103:H2 ambas isoladas de fezes de vaca sobreviveram 2 e 3 vezes, respectivamente, mais do que a estirpe de *E.coli* O157:H7 nos solos testados. Isto significa que as cepas podem persistir no ambiente agrícola por até três meses, o que pode aumentar consideravelmente a oportunidade para o ciclo de recontaminação da bactéria para

o gado e a subsequente transmissão para a cadeia alimentar humana. Os resultados apresentados no presente estudo indicaram que as cepas STEC não- O157 podem persistir no solo por um período no mínimo de 60 dias.

Ibekwe et al.(2014), analisaram a sobrevivência de células de STEC O157 e STEC não- O157 em 32 solos (16 orgânicos e 16 convencionais) originários da Califórnia e do Arizona. Os autores verificaram que o menor tempo de sobrevivência foi observado para a STEC O157:H7 (32,6 dias) enquanto que para as STEC não-O157 o tempo de sobrevivência observado foi maior (56 dias).

A análise do desempenho de cada uma das cepas de *E.coli* inoculadas em cada um dos solos analisados permitiu a verificação de algumas particularidades. A comparação da sobrevivência da cepa genérica de *E.coli* nos solos esterilizados por autoclavação e não autoclavados permite verificar que nos solos esterilizados por autoclavação a destruição de parte dos microrganismos nativos dos solos de cana e pastagem permitiu uma facilitação do estabelecimento da cepa invasora de *E.coli* que não apenas se manteve mas se multiplicou, aumentando o número de células invasoras entre o 10º e o 15º dia do experimento. Por outro lado a diversidade microbiana existente no solo de cana e de pastagem desde o primeiro período de avaliação no 5º dia de experimento exerceu a sua capacidade inibidora do desenvolvimento da célula invasora de *E.coli* competindo por nutrientes e espaço o que provocou uma diminuição do número de células de *E.coli* recuperadas ao longo do experimento o que coincide com os relatos apresentados por outros autores (OVERBEEK et al.,2010; KIM et al.,2011; VAN ELSAS et al., 2012; YAO et al.,2014).

O mesmo tipo de comportamento foi encontrado para o desempenho da cepa de *E.coli* portadora do gene *eae* inoculada nos dois solos analisados, demonstrando a mesma pressão da diversidade microbiana existente no solo.

Por outro lado, a análise do desempenho das cepas de STEC não- O157 portadoras dos genes *stx1/stx2* e *stx1/stx2/eae* mostrou uma outra realidade. Quando analisado o comportamento destas cepas nos solos de cana e pasto esterilizados por autoclavação é possível verificar um aumento do número de células das cepas STEC não- O157 por um período de tempo que varia entre o 5º e o 20º

dia do experimento, para em seguida apresentarem uma queda do número de células a partir do 20º dia até o 60º dia, o que em linhas gerais e num espaço de tempo menor, até o 10º dia do experimento, coincide com o comportamento das cepas de *E.coli* genérica e *E.coli* portadora do gene *eae*. O que reforça os resultados apresentados por outros autores, menor diversidade pela destruição de espécies microbianas nativas pela autoclavação produz um efeito inicial facilitador da instalação de uma cepa invasora de *E.coli* (OVERBEEK et al.,2010; KIM et al.,2011; VAN ELSAS et al., 2012; YAO et al.,2014). Lembrando ainda que como verificado por Ma et al (2014) e Ibekewe et al (2014) as cepas STEC não- O157 no presente trabalho se mantiveram viáveis em um alto número de células por no mínimo 60 dias, tempo limite de observação do presente trabalho, especialmente no solo esterilizado por autoclavação utilizado para a cultura de cana, o qual apresentou uma menor diversidade microbiana quando comparado ao solo de pastagem. A manutenção de um alto número de células STEC não- O157 permite supor a presença deste contaminante no solo por períodos tão longos como aqueles descritos por Franz et al (2008) 54-105 dias; Ingeng et al (2011) 49-84 dias; Duffitt et al (2011) 179 dias para STEC O157:H7 ou por Ma et al (2014) 98 dias; Ibekwe et al (2014) 90 dias para cepas STEC não- O157.

No presente trabalho pode também ser verificado que em relação aos solos não esterilizados por autoclavação de cana e pastagem, as cepas invasoras STEC não-O157 quando comparadas ao desempenho da cepa de *E.coli* genérica, nestes mesmos solos mostrou uma queda da sobrevivência de células muito menos abruptamente que a *E.coli* genérica. O que em última análise significa uma maior permanência e sobrevivência das células STEC não- O157 nestes solos, aumentando muito a possibilidade de recontaminação do gado, no caso de solo utilizado para pastagem. Isto parece confirmar os resultados apresentados por Ingeng et al (2011) os quais indicaram que os solos que entraram em contato com esterco (fezes), bovino apresentaram uma maior quantidade disponível de nutrientes o que seria um agente facilitador para a manutenção de cepas STEC invasoras no solo por um período mais longo de tempo.

Além dos aspectos acima descritos existem outros fatores que merecem ser considerados. Vogeeler et al. (2014) verificaram que as cepas de STEC podem sobreviver no solo e em solos com culturas de alface. As bactérias podem contaminar a litosfera da planta, sobrevivendo por um longo período podendo se tornar um contaminante da cadeia alimentar humana. Segundo os autores existe a hipótese que esta ligação das bactérias ao alface poderia estar relacionada a habilidade das cepas STEC de formar biofilme. Por outro lado, Chen et al. (2013) sugeriu que esta ligação poderia ocorrer através das fibras curli. Um reforço a esta hipótese foi apresentado pelo trabalho de Jeter e Matthyse (2005) os quais verificaram que uma cepa de *E.coli* K12 HB 101 que não apresentava a capacidade de sintetizar a fibra curli, após receber o gene *mboA* através de um plasmídeo, passou a produzir a fibra e adquiriu a habilidade de se ligar a sementes de vegetais.

Biscoia et al., (2013) verificou que linhagens STEC tem a capacidade de expressar diferentes adesinas (fimbrias tipo 1, curli, Agn 43, etc), as quais estão relacionadas com a formação de biofilme. Os autores também verificaram que 28% das linhagens de *E.coli* O157:H7 e 51% das linhagens STEC não- O157 analisadas apresentaram a expressão destas adesinas, o que facilita a ligação e a contaminação de vegetais por estas células bacterianas.

Byppanahalli e Fujioka., (2004) verificaram que o meio ambiente do solo no Hawaii foi caracterizado como permissivo para suportar o crescimento in situ de *E.coli*. Apesar das condições desfavoráveis a bactéria se torna estabelecida como uma população minoritária na microflora do solo. Ishii et al., (2006) descreveram que linhagens idênticas de *E.coli* foram repetidamente isoladas em solos temperados do Minnesota nos EUA. Os autores verificaram que as linhagens de *E.coli* isoladas do solo apresentavam um padrão de restrição de DNA distinto daquele obtidos de células de *E.coli* isolado de fezes de bovino depositadas no solo, o que sugere que as cepas isoladas do solo não tinham sido recentemente depositadas pelos animais. Ishii e Sadowsky., (2008) ampliaram a discussão ao propor que cepas de *E.coli* podem sobreviver, se multiplicar e tornar-se “naturalizada” em comunidades bacterianas em solos tropicais, sub tropicais e temperados, permanecendo nos mesmos por longos períodos de tempo.

Os fatores acima mencionados amplificam a possibilidade de cepas de *E.coli* STEC não- O157 sobreviverem por longos períodos de tempo no solo o que aumenta exponencialmente a possibilidade destas cepas contaminarem o solo e reinfectarem os bovinos ou contaminar os vegetais e serem introduzidos na cadeia alimentar humana, podendo infectar os seres humanos.

O presente trabalho demonstrou a persistência de cepas STEC não- O157 de origem bovina nos solos utilizados para cultura de cana e pastagem para os animais por um período de no mínimo 60 dias, o que representa um tempo bastante extenso o que aumenta a possibilidade de recontaminação do gado ou infecção de seres humanos, o que caracteriza um problema de saúde pública, que necessita ser cuidadosamente analisado para minimizar os riscos de contaminação.

7. CONCLUSÕES

7.1 Foi possível verificar a persistência das cepas de *E.coli* genérica, *E.coli* portadora do gene *eae* e STEC não- O157 portadora dos genes *stx1/stx2/eae*; em maior número de células no solo utilizado pra cultura de cana-de-açúcar esterilizado por autoclavação, e em menor número de células no mesmo solo não autoclavado por um período de 60 dias;

7.2 Foi possível verificar a persistência das cepas de *E.coli* genérica, *E.coli* portadora do gene *eae* e STEC não- O157 portadora dos genes *stx1/stx2/eae* em maior número de células no solo utilizado para pastagem esterilizado por autoclavação, e em menor número de células no mesmo solo não autoclavado por um período de 60 dias;

7.3 Foi possível verificar que nos dois tipos de solos utilizados, na condição de não autoclavação, a microbiota nativa destes solos exercem um forte efeito inibidor no estabelecimento das cepas invasoras inoculadas, diminuindo o número de células de *E.coli* recuperadas ao longo do experimento, porém permitindo a recuperação de células de *E.coli* viáveis após 60 dias de incubação no microcosmo. Também foi verificado que no solo de pastagem não autoclavado, a cepa genérica de *E.coli* apresentou um declínio constante no número de células recuperadas ao longo do experimento enquanto que as cepas de STEC não- O157 inoculadas apresentaram um efeito de estabilização no número de células recuperadas no período de 5º ao 60º dia do experimento.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARMSTRONG, G. L.; HOLLINGSWORTH, J.; MORRIS, J. G. Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 is a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. **Epidemiology Review**, v.18, p. 29-51, 1996.

BELONGIA, E. A.; OSTERHOLM, M. T.; SOLER, J. T.; AMMEND, D.A.; BRAUN, J. E.; MACDONALD, K. L. Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 infection in Minnesota child Day-care facilities. **Jama**, v.269, p. 883-888, 1993.

BEUTIN, L., MARTIN, A. Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O104: H4 infection in Germany causes a paradigm shift with regard to human pathogenicity of STEC strains. **Journal of Food Protection**, v.75, p.408-418. 2012.

BETTELHEIM, K.A. Non-O157 Verotoxin-producing *Escherichia coli*: a problem, paradox, and paradigm. **Exp. Biol. Med**, v.228, p.333-344. 2003.

BISCOIA, F.T.; ABE, C.M. GUTH, B. E. C. Determination of adhesion gene sequences in, and biofilm formation by, O157 and non- O157 shiga toxin- producing *Escherichia coli* strains isolated from different sources. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.2201-2208, 2011.

BRADFORD, S.A., MORALES, V.L., ZHANG, W., HARVEY, R.W., PACKMAN, A.I., MOHANRAN, A., WELTY, C. Transport and fate of microbial pathogens in agricultural settings. **Critical Review in Environment Science Technology**, v.43, p. 775-893. 2013.

BRADY, N.C. **Natureza e Propriedades dos Solos**. 7ªed., Freitas Bastos, Rio de Janeiro. 1989.

BRADY,N.C.,WEIL,R.R. **Elementos da Natureza e Propriedades dos Solos**. 3ª ed., Bookman, Porto Alegre.2013.

BYAPPANAHALLI, M.; FUJIOKA, R. Indigenous soil bacteria and low moisture may limit but allow faecal bacteria to multiply and become a minor population in tropical soils. **Water Science and Tecnology**, v.50, p.27-32, 2004.

CDC. Investigation update: multistate outbreak of human *E. coli* O145 infections linked to shredded romaine lettuce from a single processing facility. **CDC**; 2010. 2012.

CLARKE,S.C. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* - an emerging problem? **Diagnostic Microbiology & Infectious Disease**, v.41,p.93-98. 2001.

CHEN,C-Y., HOFMANN,C.S., COTTRELL, B. J., STROBAUGH JR, T.P., PAOLI, G.C., NGUYEN, L-H., YAN, X., UHLICH, G.A. Phenotypic and Genotypic Characterization of Biofilm Forming Capabilities in Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains. **POLS One**,v.8, e 84863, 2013.

COOLEY, M., CARYCHAO, D., CRAWFORD-MIKSZA, L., JAY, M.T., MYERS, C., ROSE, C. Incidence and tracking of *Escherichia coli* O157:H7 in a major produce production region in California. **PLOS One**, v.2,p.1159 . 2007.

DE BOER, T.E., TAS, N., BRASTER, M., TEMMINGHOFF, E., ROLING, W., ROELOFS, D. The influence of long-term copper contaminated agricultural soil at different pH levels on microbial communities and springtail transcriptional regulation. **Environmental Science Technology**, v.46,p. 60-68. 2012.

DING, N., HAYAT, T., WANG, H., LIU, X., XU, J. Responses of microbial community in rhizosphere soils when ryegrass was subjected to stress from PCBs. **Journal of Soils Sediments**, v.11,p.1355-1362. 2011.

DOYLE, M.P., ERICKSON, M.C. Summer meeting 2007-the problems with fresh produce an overview. **Journal of Applied Microbiology**, v.105, p.317-330. 2008.

DUFFITT, A. D.; REBER, R. T.; WHIPPLE, A.; CHAURET, C. Gene expression during survival of *Escherichia coli* O157:H7 in soil and water. **International Journal of Microbiology**. DOI:10.1155/2011/340506.

FRANZ, E.; SEMENOV, A.V.; TERMORSHUIZEN, A. J.; DE VOS, O. J.; BOKHORAL, J. G.; VAN BRUGGEN, A. H. C. Manure-amended soil characteristics affecting the survival of *E.coli* O157:H7 in 36 Dutch soils. **Environmental Microbiology**, v.10, p. 313-327, 2008.

FINK,R.C., BLACK,E.P., HOU, Z., SUGAWARA,M., SADOWSKY, M.J., DIEZ-GONZALES, F. Transcriptional Responses of *Escherichia coli* K-12 and O157:H7 Associated with Lettuce Leaves. **Applied and Environmental Microbiology**. v.78, n.6, p. 1752-1764. 2012.

FUKUSHIMA, H., HOSHINA, K., GOMYODA, M. Long-term survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O111 and O157 in bovine feces. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p. 5177-5181. 1999.

FUKUSHIMA, H.; HASHIZUME, T.; KITANI, T. The massive outbreak of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 infections by food poisoning among the elementary school children in Sakai Japan, in proceedings of the 3rd international symposium and workshop on Shiga toxin (Vero toxin)-producing *Escherichia coli* infection.1997.

FÜRST, S.; SCHEEF, J.; BIELASZEWSKA, M. RÜSSMAN, H.; SCHIMIDT, H.; KARCH, H. Identification and Characterization of *Escherichia coli* strains O157 and non-O157 serogroups containing three distinct Shiga toxin genes. **Journal of Medical Microbiology**, Washington, v.49, p.383-386, 2000.

GOBIUS, K. S.; HIGGS, G. M.; DESMARCHELIER, P.M. Presence of Activatable Shiga Toxin Genotype (stx2d) in Shiga Toxigenic *Escherichia coli* from Livestock Sources. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.41, n.8, p.3777-3783, 2003.

GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. J. The epidemiology of infection caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E.coli* and the associated hemolytic uremic syndrome. **Epidemiology Reviews**, v.13, p.60-98, 1991.

GORDEN, J.; SMALL, P.L.C. Acid resistance in enteric bacteria. **Infection and Immunity**, v.61, p. 364-367, 1993.

GOULD, L. H.; MODY, R. K.; ONG, K.L.; CLOGHER, P.; CONQUIST, A.B.; GARMAN, K. N.; LATHROP, S.; MEDUS, C.; SPINA, N.L.; WEBB, T. H.; WHITE, P. L.; WYMORE, K.; GIERKE, R. E.; MAHON, B. E.; GRIFFIN, P.M. Increased recognition of non- O157 Shiga toxin producing *Escherichia coli* infections in the United States during 2000-2010: Epidemiologic features and comparison with *E.coli* O157 infections. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.10, p.453-459, 2013.

IBEKWE, A. M.; MA, J.; CROWLEY, D. E.; YANG, C. H.; JOHNSON, A. M.; PETROSSIAN, T. C.; LUM, P.Y. Topological data analysis of *Escherichia coli* O157:H7 and non- O157 survival in soils. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.4, article 122, 2014.

IRINO, K., VAZ, T.M.T., MEDEIROS, M.I.C., KATO, M.A.A.F., GOMES, T.A.T., VIEIRA, M.A.A., GUTH, B.E.C. Serotype diversity as a drawback in the surveillance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v.56, p. 565-567. 2007.

ISHII, S.; KSOLL, W. B.; HICKS, R.E.; SADOWSKY, M. J. Presence and growth of naturalized *Escherichia coli* in Temperate soils from Lake Superior Watersheds. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p. 612-621, 2006.

ISHII, S., SADOWSKY, M.J. *Escherichia coli* in the Environment: Implications for Water Quality and Human Health. **Microbes Environ**, v.23, n.2, p.101-108. 2008.

ISLAM, M., DOYLE, M.P., PHATAK, S.C., MILLNER, P., JIANG, X. Persistence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on leaf lettuce and parsley grown in fields treated with contaminated manure compost or irrigation water. **Journal of Food Protection**, v.67, p. 1365-1370. 2004.

JENSEN, A.N., DALSGAARD, A., STOCKMARR, A., NIELSEN, E.M., BAGGESEN, D.L. Survival and transmission of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in an outdoor organic pig farming environment. **Applied Environmental Microbiology**, v. 72, p.1833-1842. 2006.

JETER, C., MATTHYSSE, A.G. Characterization of the Binding of Diarrheagenic Strains of *E.coli* to Plant Surface and the Role of Curli in the Interaction of the Bacteria with Alfafa Sprouts. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. V.18, n.11, p.1235-1242. 2005.

KAPER, J.B., NATARO, J.P., MOBLEY, H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews** 2004, v.2, p.123-140, 2004.

KESKIMAKI, M.; MATTILA, L.; PELTOLA, H.; SIITONEN, A. EPEC, EAC and STEC in stool specimens: Prevalence and molecular epidemiology of isolates. **Diagnostic Microbiology Infectious Disease**, v.40, p.151-156, 2001.

KIM, J., MILLER, C.M., SHEPHERD JR, M.W., LIU, X., JIANG, X. Impact of indigenous microorganisms on *Escherichia coli* O157:H7 growth in cured compost. **Bioresource Technology**, v.102, p.9619-9625. 2011.

KONEMAN, E.W., ALLEN, S.D., DOWELL JR, V.R., SOMMERS, H.M. **Diagnostico Microbiologico**. Texto e atlas colorido. 2a Ed Editora Panamericana , p.61-132. 1997.

KUHNERT, P.; BOERLIN, P.; FREY, J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. **FEMS Microbiology Reviews**, v.24, p.107-117,2000.

KREBS, C.J. **Ecology: The Experimental Analysis of Distribution and Abundance**. 6^a ed., ed. Benjamin Cummings. São Francisco -California.2009.

LAING, C.R., ZHANG, Y., GILMOUR, M.W., ALLEN, V., JOHNSON, R., THOMAS, J.E., et al. A comparison of Shiga-toxin 2 bacteriophage from classical enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotypes and the German *E.coli* O104:H4 outbreak strain. **PLOS One**; v.7: e37362. 2012.

MA, J., IBEKWE, A.M., CROWLEY, D.E., YANG, C.H. Persistence of *Escherichia coli* O157 and non-O157 strains in agricultural soils. **Science of the Total Environment**, v.490,p. 822-829. 2014.

MA, J.; IBEKEWE, A.M.; YANG, C.H.; CROWLEY, D. E. Influence of bacterial communities based on 454-pyrosequencing in the survival of *Escherichia coli* O157:H7 in soils. **FEMS Microbiology Ecology**, v.84. p. 542-554, 2013.

MATHUSA, E.C., CHEN, Y., ENACHE, E., HONTZ, L., Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods. **Journal of Food Protection**, v.73,p. 1721-1736. et al, 2010.

MELTON-CELSA, A. R.; O'BRIEN, A.D. Structure, Biology and Relative Toxicity of Shiga Toxin Family Members for Cells and Animals. In: KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. (Ed.). *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E.coli* Strains. Washington, D.C.: **ASM Press**, p.122-124. 1998.

MOREIRA,F.M.S.,SIQUEIRA,J.O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2ªed.,ed. UFLA, Lavras.2006.

NATARO, J.P.;KAPER,J.B.Diarrheagenic *Escherichia coli*. A comprehensive review of the pathogenesis,epidemiology, diagnosis and clinical aspects of diarrhoeagenic *E.coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, p.142-201,1998.

ODUM,E.P. **Fundamentos de Ecologia**. 6ªed., Fundação Caloustre Gulbenkian. Lisboa.2001.

ODUM,E.P.,BARRET,G.W. **Fundamentos de Ecologia**. 5ª ed., ed. Thomson Learning.,São Paulo.2007.

OGDEN, I.D., FENLON, D.R., VINTEN, A.J.A., LEWIS, D. The fate of *Escherichia coli* O157:H7 in soil and its potential to contaminate drinking water. **International Journal of Food Microbiology**, v.66,p. 111-117. 2001.

OLIVEIRA,J.B.,JACOMINE,P.K.T.,CAMARGO,M.N. Classes Gerais de Solos do Brasil Guia auxiliar para seu reconhecimento. **Funep**.Jaboticabal. 1992.

ONGENG, D.; MUYANJA, C.; GEERAERD, A. H.; SPRINGAEL, D.; RYCKEBOER, J. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in manure and manure-amended soil under tropical climatic conditions in Sub-Saharan Africa. **Journal of applied Microbiology**, v.110, p.1007-1022, 2011.

OVERBEEK, L.S.; FRANZ, E.; SEMENOV, A. V.; DE VOS, O. V.; VAN BRUGGEN, A.H.C. The effect of the native bacterial community structure on the predictability of *E.coli* O157:H7 survival in manure-amended soil. **Letters in Applied Microbiology**, v.50, p.425-430, 2010.

PATON, J.C., PATON, A.W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, p.450-479. 1998.

RAIJ, B. VAN; QUAGGIO, J.A.; CANTARELLA, H.; FERREIRA, M.E.; LOPES, A.S. & BATAGLIA, O.C. Análise química do solo para fins de fertilidade. Campinas, **Fundação Cargill**, 170p. 1987.

RENEWICK, S. A.; WILSON, J. B.; CLARKE, R.C. Evidence of direct transmission of *Escherichia coli* O157:H7 infection between calves and a human. **Journal Infection Disease**, v.168. p. 792-793, 1993.

ROBINS-BROWNE, R.M., HARTLAND, E.L. *Escherichia coli* as a cause of diarrhea. **Journal of Gastroenterology Hepatology**, v.17, p.467-475. 2002.

RUSO, T. A.; JOHNSON, J. R. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. **Journal of Infectious Diseases**, v.181, p.1753-1754, 2000.

SASAKI, Y.; TSUJIYAMA, Y.; KUSUKAWA, M.; MURAKAMI, M.; KATAYAMA, S.; YAMADA, Y. Prevalence and characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 and O26 in beef farms. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.150, n.1-2, p. 140-145, 2011.

SCHEUTZ, F.; TEEL, L.D.; BEUTIN, L.; PIÉRARD, D.; BUVENS, G.; KARCH, H.; MELLMANN, A.; CAPRIOLI, A.; TOZZOLI, R.; MORABITO, S.; STROCKBINE, N. A.; MELTON-CELSEA, A. R.; SANCHEZ, M.; PERSSON, S.; O'BRIEN, A.D. Multicenter

evaluation of a Sequence-Based Protocol for Subtyping Shiga Toxins and Standardizing Stx Nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*, v.50, n.9, p.2951,2012.

SCHMIDT, M. A. LEeways: tales of EPEC, ATEC and EHEC. **Cellular Microbiology**, v.12, n.11, p.1544-1552, 2010.

SEMENOV, A.V., FRANZ, E., VAN OVERBEEK, L., TERMORSHUIZEN, A.J., VAN BRUGGEN, A. Estimating the stability of *Escherichia coli* O157: H7 survival in manure-amended soils with different management histories. **Environmental Microbiology**, v.10,p. 1450-1459. 2008.

SILVA, F.H.B.B, SILVA, M.S.L., CAVALCANTI, A.C. DESCRIÇÃO DAS PRINCIPAIS CLASSES DE SOLO. **Embrapa**.2005.

SJOGREN, R.E. Prolonged survival of an environmental *Escherichia coli* in laboratory soil microcosms. **Water, Air and Soil Pollution**, v.75, p. 389-403, 1994.

SMITH, M. Report on the expert consultation on revision of FAO guidelines for prediction of crop water requirements. Rome, Italy: **Food and Agriculture Organization**, 45p. 1991.

THOMAS, K. M.; McCAM, M. S.; COLLERY, M. M.; LOGAN, A.; WHYTE, P.; McDOWELL, D. A.; DUFFY, G. Tracking verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157, O26, O111, O103 and O145 in Irish cattle. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 153, n. 3, p. 288-296, 2012.

TRABULSI,L.R.; ALTERTHUM,F.; GOMPERTZ,O.F.; CANDEIAS, J.A. N. **Microbiologia**. ed. Atheneu., Rio de Janeiro., 2004.

TOPP,E.,WELSH, M., TIEN,Y-C., DANG,A., LAZAROVITS,G., CONN, K., ZHU,H. Strain-dependent variability in growth and survival of *Escherichia coli* in agricultural soil. **FEMS Microbiology Ecology**, v.44,p.303-308.2003.

VAN ELSAS, J.D., CHIURAZZIA, M., MALLONA, C.A., ELHOTTOVA, D., KRISTUFEKB, V., SALLES, J.F. Microbial diversity determines the invasion of soil by a bacterial pathogen. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**, v.109,p.1159-1164. 2012.

VAN ELSAS, J, D., SEMENOV, A.V., COSTA, R., TREVORS, I.T. Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects. **ISME Journal**, v.5,p.173-183. 2011.

VOGELEER, P., TREMBLAY, Y. D.N., MAFU, A.A., JACQUES, M., HAREL, J. Life on the outside: role of biofilms in environmental persistence of Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. **Frontiers in Microbiology**. v.5, 2014.

VIDOVIC, S.;BLOCK, H. C.; KORBER, D. R. Effect of soil composition, temperature, indigenous microflora, and environmental conditions on the survival of *Escherichia coli* O157:H7. **Canadian Journal of Microbiology**, v.53, p.822-829, 2007.

WANG, H., IBEKWE, A.M., MA, J., WU, L., LOU, J., WU, Z., LIU, R., XU, J., YATES, S.R. A glimpse of *Escherichia coli* O157: H7 survival in soils from eastern China. **Science of the Total Environment**, v.476-477,p.49-56. 2014.

WOLLUM, A.G. Cultural methods for soil microorganisms. In: Page, A.L.; Miller, R.H. & Keeney, D.R. (Ed.). Methods of soil analysis. Madison : **Soil Science Society of America**. p.781- 802, 1982.

YAO, Z., WEI, G., WANG, H., WU, L., WU, J., XU, J. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in soils from vegetable fields with different cultivation patterns. **Applied and Environmental Microbiology**, v.79,p. 1755-1756. 2013.

YAO, Z., WANG, H., WU, L., WU, J., BROOKES, P.C., XU, J. Interaction between the microbial community and invading *Escherichia coli* O157:H7 in soils from vegetable fields. **Applied and Environmental Microbiology**, v.80,p.70-76. 2014.

ZHANG, T., WANG, H., WU, L., LOU, J., WU, J., BROOKES, P.C., XU, J. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in soils from Jiangsu Province, China. **PLOS ONE** ,v. 8,p.e81178. 2013.