

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**ELIMINAÇÃO DE ESCHERICHIA COLI SHIGATOXIGÊNICA  
NÃO-O157 EM COMPOSTAGEM DE ESTERCO BOVINO**

**Vanessa Parpinelli Gonçalves**

**Orientador: Prof. Dr. José Moacir Marin**

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal – UNESP, para obtenção do Título de Doutor em Microbiologia

Jaboticabal - SP

Agosto/2006

## DADOS CURRICULARES DA AUTORA

**VANESSA PARPINELLI GONÇALVES** – nascida em Franca, SP, aos 25 de junho de 1972, é Biomédica graduada pela União das Faculdades Barão de Mauá, Ribeirão Preto, SP, em dezembro de 1996. Realizou curso de especialização em Anatomia Patológica (Citologia Esfoliativa) na União das Faculdades Barão de Mauá, Ribeirão Preto, SP, no ano letivo de 1996 e Pós-Graduação *Latu senso* em Biologia Evolutiva, na Universidade de Franca, SP, no ano letivo de 1997. Participou ativamente dos Projetos Genoma *Xylella fastidiosa* (1999 – 2000), *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *campestris* (1999 -2001), recebendo os seguintes prêmios: “Diploma de Honra ao Mérito em reconhecimento à contribuição à ciência brasileira, participando do programa genoma *Xylella fastidiosa*”, concedido pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; “Diploma de Honra ao Mérito como reconhecimento aos trabalhos realizados no projeto de sequenciamento do genoma *Xylella fastidiosa*”, concedido pela Congregação UNESP-Jaboticabal); “Diploma de Mérito Científico e Tecnológico do Governo do Estado de São Paulo – contribuição ao projeto de seqüenciamento genético da *Xylella fastidiosa*” e, “Medalha de Mérito Científico e Tecnológico do Governo do Estado de São Paulo – contribuição ao projeto de seqüenciamento genético da *Xylella fastidiosa*”. Obteve grau de Mestre em Microbiologia pela Universidade Estadual Paulista UNESP-Jaboticabal em 2003, com o trabalho intitulado “Expressão da proteína recombinante PthA de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* e obtenção de anticorpos para uso em sistemas de detecção”, sob orientação do Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro e co-orientação da profa. Dra. Sônia Marli Zingaretti di Mauro. Em 2004 obteve Licenciatura Plena para Biologia, na Universidade de Franca. Atualmente atua como Biomédica no Laboratório de Patologia Cirúrgica e Citologia da Fundação Civil Casa de Misericórdia de Franca.

*“Para apanhar o sentido oculto de certas palavras, seria preciso que novas idéias e novos conhecimentos viessem dar-lhes a chave, e essas idéias não podiam vir antes de um certo grau de maturidade do espírito humano. A ciência devia contribuir poderosamente para a eclosão e o desenvolvimento dessas idéias; seria preciso, para isso, dar à ciência tempo de progredir.”*

*Allan Kardec*

Agradeço aos meus pais, **Antônio Carlos e Arlete**,  
que com muito orgulho os tenho como exemplo...  
são meus maiores incentivadores e conselheiros...  
meu porto-seguro na vida... e razão de estar aqui...  
sem sombra de dúvidas:  
Amo muito vocês!

Aos meus irmãos **Fabiana e Affonso Celso**,  
como exemplos de conquistas e sabedorias, sendo  
sempre as mãos amigas de todos os momentos...  
Amo muito vocês!

Aos meus sobrinhos **Diego, Pietro, Márcio Roberto**,  
**João Gabriel, Laís e Miguel**,  
que com seus olhinhos angelicais e sorrisos  
inocentes, me fazem revigorar a cada momento ...  
Amo muito vocês!

Ao meu noivo, **Danilo**,  
companheiro e amigo, que me compreende  
e apóia, caminhando sempre ao meu lado...  
Amo muito você!

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade de chegar até aqui.

Ao Prof. Dr. José Moacir Marin, pela acolhida a mim oferecida, abrindo-me as portas do laboratório e concedendo-me total liberdade de trabalho; pela oportunidade de desenvolver este trabalho, acreditando, confiando e ajudando em meu crescimento profissional e científico... ao senhor só tenho que agradecer!

Ao meu pai, pai herói, pela montagem dos sistemas de compostagem e por todos os conhecimentos que me concedeu.

A Profa. Dra. Márcia Justino Rossini Mutton, pela amizade, conselhos e apoio em momentos difíceis.

Ao Médico Veterinário Antônio Zanetti, pela disposição em ajudar, recebendo-me em sua propriedade para a coleta de materiais.

Ao setor de Jardins da USP-Ribeirão Preto, pela área concedida para a montagem dos sistemas de compostagem.

Ao Prof. Dr. João Martins Pizauro Junior, pela amizade e pela preciosa ajuda em todos os momentos... o senhor sempre foi um dos anjos da guarda em meu caminho!

A todos os amigos do Laboratório de Genética da FORP-USP, pela convivência harmoniosa, pela amizade e pelos bons momentos compartilhados.

A Daniela Rodolpho, pela amizade e pela disposição em ajudar sempre e a qualquer momento.

A Renata Tezza e Karina Dabbas, amigas que sempre compartilharam bons e também difíceis momentos, sempre me ouvindo, aconselhando e acompanhando, mesmo que à distância, amo muito vocês!

Aos Docentes do Programa de Microbiologia Agropecuária, pelos ensinamentos.

Aos amigos, professores, técnicos e funcionários dos Departamentos de Microbiologia e de Tecnologia da UNESP-Jaboticabal.

Ao pessoal da seção de Pós-Graduação, pelos esclarecimentos fornecidos.

A Dra. Maria Heloisa Rached Palermo, pela compreensão, apoio e conselhos, liberando-me do Laboratório de Patologia Cirúrgica e Citologia nos momentos necessários para a conclusão deste projeto.

As amigas do Laboratório de Patologia Cirúrgica e Citologia, Elisângela, Milena, Priscila, Camila e Cláudia, pela força, compreensão, carinho e ajuda.

A CAPES, pela bolsa de Doutorado concedida.

## SUMÁRIO

ABREVIACÕES .....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS .....	xi
RESUMO .....	xiii
ABSTRACT .....	xiv
I. INTRODUÇÃO .....	1
II. REVISÃO DE LITERATURA .....	4
II.1 <i>Escherichia coli</i> .....	4
II.2 Classificação de <i>E. coli</i> .....	6
II.2.1 <i>E. coli</i> enterohemorrágica (EHEC) .....	6
II.2.2 <i>E. coli</i> enterotoxigênica (ETEC) .....	10
II.2.3 <i>E. coli</i> enteropatogênica clássica (EPEC) .....	11
II.2.4 <i>E. coli</i> enteroinvasora (EIEC) .....	11
II.2.5 <i>E. coli</i> enteroagregativa (EAEC ou EaggEC) .....	12
II.2.6 <i>E. coli</i> difusamente aderente (DAEC) .....	12
II.3 Compostagem .....	12
III. OBJETIVO .....	19
IV. MATERIAIS E MÉTODOS .....	20
IV.1 Origem e coleta das amostras .....	20
IV.2 Isolamento e caracterização das amostras de <i>E. coli</i> .....	20
IV.3 Testes bioquímicos .....	21
IV.4 Preparação do DNA bacteriano para amplificação .....	22
IV.5 Amplificação dos fragmentos de DNA através da técnica de PCR .....	23
IV.6 Compostagem .....	24
IV.6.1 Esterco bovino em compostagem sobre o solo em forma de pirâmide.....	27
IV.6.2 Esterco bovino em compostagem em vala .....	31
IV.7 Confirmação da presença de <i>E. coli</i> nos sistemas de compostagem.....	33
V. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	34
V.1 Avaliação da presença de <i>E. coli</i> e STEC não O157 e detecção dos genes <i>stx1</i> e <i>stx2</i> na compostagem .....	34

V.2 Variações nas temperaturas dos compostos .....	36
V.3 Sobrevivência de <i>E. coli</i> e STEC não-O157.....	38
VI. CONCLUSÕES .....	42
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	43



## ABREVIACOES

- AAF– plasmídeo que expressa adesina
- A/E – ligação e entumecimento (“attaching-and-effacing”)
- BFP – pilus em forma de feixe (“Bundle-Forming-Pilus”)
- CO<sub>2</sub> – dióxido de carbono
- COOH – carboxila
- DAEC – *Escherichia coli* que adere difusamente
- eae* – gene de ligação e entumecimento (“attaching and effacing”)
- EaggEC – *Escherichia coli* enteroagregativa
- EAST – enterotoxina termo-estável
- EHEC – *Escherichia coli* enterohemorrágica
- EIEC – *Escherichia coli* enteroinvasora
- EPEC – *Escherichia coli* enteropatogênica clássica
- EspA, EspB e EspD – proteínas
- ETEC – *Escherichia coli* enterotoxigênica
- H – antígeno flagelar
- HEp-2 – células de carcinoma epidermóide de laringe humana
- HUS – síndrome hemolítica urêmica
- IAC – Instituto Agronômico
- K – antígeno capsular
- LEE – local de entumecimento no enterócito (“locus of enterocyte effacement” )
- LT – termo-lábeis
- O – antígeno somático
- O<sub>2</sub> – oxigênio
- ORFs – frames abertos de leitura
- PCR – reação de polimerase em cadeia (“Polimerase Chain Reaction”)
- pb – pares de base
- RIPs – ribossomo inativadores (“ribosome-inactivating proteins”)
- ST – termo-estáveis

STEC – *Escherichia coli* Shigatoxigênica

Stx – Shigatoxina

*tir* – gene receptor para a intimina

US EPA – “United State Environmental Protection Agency”

VT – verotoxina

VTEC – *Escherichia coli* Verocitotoxigênica

WHO – “World Health Organization” – Organização Mundial da Saúde

## ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1:</b> Fases de temperatura no processo de compostagem (ALVES, 1996).....	15
<b>Figura 2:</b> Evolução da temperatura no composto em relação ao tempo de compostagem (ALVES, 1996) .....	15
<b>Figura 3.</b> O “monte” de esterco sobre uma cobertura de capim, destacando uma das coletas .....	25
<b>Figura 4.</b> Aparato montado para as coletas e medições de temperaturas .....	26
<b>Figura 5.</b> Área dos sistemas de compostagem completamente cercada para proteção .....	27
<b>Figura 6.</b> Compostagem em forma de pirâmide: esquema representativo das disposições das camadas de capim, serragem e esterco e, das posições dos canos de PVC contendo as fezes contaminadas .....	28
<b>Figura 7</b> Sistema de compostagem em forma de pirâmide; destacando por seta a extremidade do cano de PVR com tela antiáfítica por onde foram feitas as coletas .....	29
<b>Figuras 8.</b> Coletas de amostras do sistema de compostagem em forma de pirâmide, destacando as coletas nas camadas superficial e inferior .....	30
<b>Figura 9.</b> Uma das extremidades dos canos de PVC fechadas com borracha, por onde se fizeram as coletas .....	31
<b>Figura 10.</b> Compostagem enterrada em sistema de vala: esquema representativo das disposições das camadas de capim, serragem e esterco e das posições dos canos de PVC contendo as fezes contaminadas .....	32
<b>Figura 11.</b> Coleta de amostra do sistema de compostagem em vala, destacando uma das coletas .....	33
<b>Figura 12.</b> Perfil eletroforético dos produtos de PCR para os genes <i>stx1</i> e <i>stx2</i> , em gel de agarose 1% em 1 x TBE, na presença de marcador de peso molecular $\Phi$ X174 Hae III-digest (Pharmacia) (linha 1); padrão <i>Stx2 E. coli</i> J2 (linha 2); cepa Es1 para <i>stx2</i> (linha 3); controle (branco) da reação de PCR (linha 4); cepa ET1 (linha 5); cepa da coleta em vala na maior profundidade no oitavo dia de coleta (linha 6); cepa do monte do quarto dia de coleta (linha 7); padrão <i>stx1</i> para <i>E. coli</i> O157:H7 (linha 8); cepa da	

coleta em vala na profundidade intermediária no vigésimo quinto dia de coleta (linha 9);  
 cepa SP do quinto dia de coleta (linha 10).....35

**Figura 13.** Comportamento da temperatura em diferentes profundidades e temperatura ambiente para a compostagem Sobre o Solo (a); em Vala (b) e no Monte (c). Obs: A linha vertical indica o tempo mínimo necessário para que fossem removidas 100% da presença de *Escherichia coli* apresentando o gene *stx2* .....37

**Tabela 1.** Seqüências de bases e tamanho dos produtos amplificados de iniciadores específicos para Stx, usados em PCR .....23

**Tabela 2.** Sobrevivência de *Escherichia coli* não-O157 e detecção do gene *stx2* nos sistemas de compostagem e no monte.....39

## ELIMINAÇÃO DE ESCHERICHIA COLI SHIGATOXIGÊNICA NÃO-O157 EM COMPOSTAGEM DE ESTERCO BOVINO

### RESUMO

*Escherichia coli* é a bactéria mais comum entre os patógenos entéricos causadores de doenças intestinais. As diferentes classes de *E. coli* causadoras de diarreia são reconhecidas através dos fatores de virulência que elas apresentam. As *E. coli* produtoras de Shiga toxina (STEC), especialmente o sorotipo O157:H7 tem sido associado a diversas doenças no ser humano. Além do sorotipo O157:H7, vários outros sorogrupos não-O157 também estão associados a infecções em humanos. Estas bactérias podem ser recuperadas de muitos animais, mas o gado bovino é reconhecido como o seu mais importante reservatório natural. Para análise da sobrevivência de cepas STEC não-O157 em sistemas de compostagem, inicialmente foram coletadas fezes de três vacas saudáveis que apresentaram *E. coli* portando o gene *stx2*, característico de cepas STEC. Foram montados dois sistemas de compostagem: o primeiro foi realizado em vala de 60cm<sup>3</sup>, no qual *E. coli* apresentando o gene *stx2* foi eliminada após 8, 25 e 30 dias nas temperaturas de 40, 42 e 38 °C, respectivamente; o segundo sistema foi realizado sobre o solo em um monte em forma de pirâmide com 1m<sup>3</sup>, no qual as bactérias foram eliminadas após 4, 4 e 7 dias nas temperaturas de 65, 56 e 52 °C, respectivamente. A temperatura alcançada durante a compostagem e os microrganismos presentes no esterco parecem ser os responsáveis pela eliminação do patógeno nos sistemas de compostagem, o qual pode ser útil para a redução da carga patogênica presente no esterco destinado para aplicações no solo

**Palavras-Chave:** STEC não-O157, gene *stx2*, compostagem

## FATE OF SHIGA TOXIGENIC NON-O157 ESCHERICHIA COLI IN COMPOSTED CATTLE MANURE

### ABSTRACT

*Escherichia coli* is the most common bacteria among the enteric pathogens able to cause intestinal disease. Several classes of diarrhea-causing *E. coli* are recognized on the basis of their virulence factors production. Shiga-like toxigenic *E. coli* (STEC), especially serotype O157:H7, have been associated with many diseases in human beings. Besides serotype O157:H7, many others non-O157 serogroups have also been associated with human infections. These bacterias can be isolated from a range of animals, but cattle is generally recognized as the major natural source. To analyze the survival of non-O157 STEC strains in composting system, first was collected faeces from three healthy cows that contain *E. coli* STEC cells carrying the *stx2* gene. Two composting systems were used: the first one was a cave with 60cm<sup>3</sup> were the *E. coli* STEC cells with *stx2* gene were eliminated after 8, 25 and 30 days at 40, 42 and 38°C, respectively; the second one was a heap pyramid system with 1m<sup>3</sup>, where the cells were eliminated after 4, 4, 7 days at 65, 56 and 52°C, respectively. The reached temperature in the composting systems and the indigenous microorganisms present in the manure seems to contribute to pathogen elimination, what may be a useful means of reducing the pathogen load of manure destined for soil application.

**Keywords:** STEC non-O157, *stx2* gene, composting

## I INTRODUÇÃO

Com relação às infecções intestinais, há seis categorias de *E. coli* conhecidas: *E. coli* enteropatogênica clássica (EPEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EaggEC) e *E. coli* que adere difusamente (DAEC).

A *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) apresenta a capacidade de provocar doenças, particularmente em pessoas imunocompetentes, como em crianças novas e pessoas idosas. As principais fontes de infecção são alimentos crus ou insuficientemente aquecidos, de origem animal que estejam contaminados, por exemplo carnes e laticínios. O principal reservatório para EHEC são as fezes de bovino, ovinos e caprinos. Estes microrganismos podem ser disseminados pelos alimentos durante o processamento da carne e dos produtos derivados do leite, se as condições higiênicas forem inadequadas. A maioria dos autores prefere a denominação de *E. coli* Shigatoxigênica ou produtora de toxina “Shiga-like” (STEC) para denominar esta classe bacteriana, sendo a denominação EHEC aplicada especificamente a sorotipos bacterianos que causam doenças em seres humanos, especialmente a colite hemorrágica e a síndrome hemolítica urêmica (SHU/HUS), sendo o mais importante entre os sorotipos EHEC o O157:H7.

Entre as toxinas produzidas por *E. coli*, as Shigatoxinas (STx) ou Verocitotoxinas (VT) são reconhecidas como extremamente importantes e, causam um grande espectro de doenças nos seres humanos que podem variar de uma diarreia branda a doenças severas, tal como colites hemorrágicas. Um grande número de sorogrupos de STEC pode causar doenças em humanos, onde os sorogrupos patogênicos encontrados mais freqüentemente em pacientes infectados com STEC são: O26, O103, O111, O145 e O157, os quais possuem o “locus of enterocyte effacement” (LEE). Um dos genes

situados nos LEE é o *eae* (*E. coli* attaching and effacing), que codifica a intimina, uma proteína presente na parte exterior da membrana envolvida na adesão das bactérias às vilosidades intestinais do hospedeiro. Entretanto, a presença dos LEE não é essencial para a patogênese, porque um número de casos de doenças severas de STEC, incluindo a HUS, podem ser causadas por linhagens que não apresentam LEE .

A produção das Shigatoxinas (Stx) é o critério mais utilizado para a detecção deste grupo de bactérias. As Stxs podem ser classificados por Stx1 (ou VT1) e Stx2 (ou VT2). As linhagens de EHEC podem produzir somente Stx1 ou Stx2 ou mesmo Stx1 e Stx2 simultaneamente, provocando doenças em bovinos e no homem.

Os métodos tradicionais de utilização de esterco animais como fertilizante e a maneira em que são feitos os tratamentos destes, podem trazer sérios danos à saúde humana e ao meio ambiente. O ideal é utilizar métodos que evitem a contaminação de água e solo. Muitos destes problemas são resolvidos com a compostagem, ou seja, a decomposição orgânica das fezes, por microrganismos aeróbios em condições que permitem atingir temperaturas suficientemente elevadas para o crescimento de microrganismos termofílicos, responsáveis pela eliminação de patógenos e sementes de plantas daninhas presentes. Mantendo-se as condições aeróbias ou não, a temperatura parece ser o fator determinante da população microbiana durante a compostagem. Sob condição semi-seca, há produção de dióxido de carbono, água, calor e húmus. Este processo envolve uma população diversificada de microrganismos e apresenta duas fases, iniciando com a fase de degradação (45-65°C) seguida pela fase de cura ou maturação (<45°C) nesta, com a produção de húmus.

Estudos laboratoriais mostraram que dependendo das condições, *E. coli* pode sobreviver por muitos meses nas fezes de animais experimentalmente inoculados. A principal forma de desinfecção durante a compostagem baseia-se nas relações de tempo-temperatura para a destruição do patógeno, embora microrganismos antagônicos possam também participar do processo. O teste padrão da evolução da temperatura na compostagem pode ser dividido em quatro diferentes fases: mesofílica, termofílica, resfriamento e maturação. Após a mistura do material composto a



temperatura aumenta rapidamente, alcançando uma máxima dentro de 9 dias, após, ela declina gradualmente ao nível ambiental em aproximadamente 30 dias.

Contaminação cruzada na produção de esterco ou o esterco inapropriadamente composto usado para a melhoria do solo, podem ser uma fonte de contaminação de patógenos. Competições com microrganismos do solo e as condições ambientais adversas podem influenciar na sobrevivência do patógeno, mas existem poucas informações a respeito do decréscimo de células de *E. coli* Shigatoxigênica não-O157 em esterco de gado bovino composto.

## II REVISÃO DE LITERATURA

As diarréias são as maiores causas de morbidade e mortalidade infantil em países em desenvolvimento onde a precariedade dos recursos sanitários é grande, principalmente em favelas, sendo responsáveis por mais de 50% dos óbitos (GIRON *et al.*, 1991; SABRÁ, 2002). Os principais agentes das infecções intestinais são encontrados na família *Enterobacteriaceae*, principalmente os gêneros: *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Yersinia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia* e *Morganella* (MURRAY *et al.*, 2000; TRABULSI *et al.*, 2002). Os membros desta família têm merecido atenção especial por estarem entre os patógenos mais freqüentemente isolados em microbiologia clínica. São bastonetes Gram-negativos, anaeróbios facultativos ou aeróbios, possuem uma complexa estrutura antigênica e são produtores de toxinas e fatores de virulência (MURRAY *et al.*, 2000; TRABULSI *et al.*, 2002).

### II. 1 *Escherichia coli*

Ao gênero *Escherichia* pertencem as espécies *E. blattae*, *E. coli*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* e *E. vulneris*, mas, a única de maior importância prática é a *E. coli*, que compreende um grande número de grupos e tipos sorológicos diferentes, com características de virulência distintas, o que a torna tão versátil em sua patogenicidade (TRABULSI *et al.*, 2002).

A bactéria *E. coli* foi isolada pela primeira vez em 1885, pelo bacteriologista alemão Theodor Escherich, no cólon do intestino de um homem (o que explica o “*coli*”). Por muito tempo foi denominada de *Bacterium coli* mas, acabou ganhando o nome de seu descobridor (KONEMAN *et al.*, 1997). Uma outra grande descoberta

feita por Dr. Escherich foi demonstrar que certas linhagens da bactéria eram responsáveis por diarreia infantil e gastroenterites, um grande feito científico para a época e, que é válida ainda nos dias de hoje. A bactéria ficou extremamente popular no meio científico, pois conseguia-se cultivá-la em meios de cultura que variavam de simples a complexos, em presença e/ou ausência de oxigênio, o que a classificou como bactéria anaeróbia facultativa (KONEMAN *et al.*, 1997). As *E. coli* são bastonetes Gram-negativos e estão associados a infecções intestinais, meningites, infecções alimentares, infecções urinárias, pneumonias nosocomiais entre tantas outras patologias (SILVA, 1999). São fermentadores de glicose, lactose (exceto EIEC), sacarose, sorbitol e dulcitol e reduzem nitrato a nitrito, são oxidase(-), possuem atividade de descarboxilase e produzem indol a partir da desaminação de triptofano (TRABULSI *et al.*, 2002); portanto é fundamental o emprego de testes bioquímicos para as corretas identificações e diferenciações entre os gêneros pertencentes à família *Enterobacteriaceae* (SILVA, 1999); apesar de não haver testes bioquímicos específicos que diferenciem *E. coli* presente em amostras fecais normais das que causam diarreia (EPEC, ETEC, EIEC, EHEC e EAEC), o que somente pode ser feito através de provas sorológicas com a caracterização dos antígenos somático (O), flagelar (H) e capsular (K) (SILVA, 1999; TRABULSI *et al.*, 2002).

O amplo e indiscriminado uso de antibióticos tem criado bastonetes Gram-negativos altamente resistentes, com aquisição de resistência múltipla através da transmissão de plasmídeos de resistência e, conseqüentemente, o surgimento de superinfecções. Os antimicrobianos são substâncias químicas (naturais, sintéticas ou semi-sintéticas) que podem inibir o crescimento ou destruir microrganismos. Os antimicrobianos estão entre as drogas mais utilizadas em terapêutica, podendo ser classificados segundo sua origem (naturais, sintéticas ou semi-sintéticas), efeito antimicrobiano (bacteriostático ou bactericida), espectro de atividade (amplo, intermediário ou reduzido) e mecanismo de ação (inibição da síntese da parede celular ou alteração da permeabilidade celular) (SILVA, 1999).

## II. 2 Classificações de *E. coli*

São classificadas em seis categorias de acordo com sua patogenicidade: *E. coli* enterohemorrágica (EHEC); *E. coli* enterotoxigênica (ETEC); *E. coli* enteropatogênica clássica (EPEC); *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EaggEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC) (LEVINE, 1987; NATARO & KAPER, 1998; KUHNERT et al., 2000).

### II.2.1 *E. coli* enterohemorrágica (EHEC)

A classe EHEC também é conhecida por STEC (“Shiga Toxin Producing *E. coli*”) ou VTEC (“Vero Toxin Producing *E. coli*”) e está associada à doença em humanos e animais (KUHNERT et al., 2000). As Shigatoxinas (Stx) ou Verocitotoxinas (VT) pertencem à uma grande família de proteínas ribossomo-inativadoras (ribosome-inactivating proteins - RIPs) encontradas em uma grande variedade de plantas e em algumas bactérias (EHEC), que possuem atividade enzimática (KUHNERT et al., 2000).

KONOWALCHUC *et al.* em 1977 observaram pela primeira vez que VTEC produzia uma potente enterotoxina termolábil capaz de causar efeito citotóxico em células Vero (células de rim de macaco verde africano), então denominaram-na de verotoxina (VTEC). Em 1983, O'BRIEN & LA VECK observaram que a atividade VTEC podia ser neutralizada por anticorpos específicos para a toxina Shiga, uma toxina extracelular de *Shigella dysenteriae* e, passaram a referi-la como toxina “Shiga-like” (SLTEC) ou simplesmente STEC.

Múltiplos fatores de virulência contribuem para a patogenicidade da EHEC e, inclui-se a produção de Stx na habilidade do patógeno em causar lesões nas microvilosidades da parede intestinal do hospedeiro (KARMALI, 1989, KUHNERT et al., 2000). As *E. coli* Stxs são classificadas em dois tipos, *E. coli* Stx tipo 1 (Stx1 ou VT1) e *E. coli* Stx tipo 2 (Stx2 ou VT2), que apesar de ser extremamente similar à Stx1 no modo de ação, na estrutura e nas características bioquímicas, a Stx2 difere

na capacidade de provocar doenças (SCOTLAND *et al.*, 1985). Geralmente a Stx no epitélio intestinal de bovinos não causa citotoxicidade. As Stxs são proteínas que apresentam uma subunidade A (30-35 kDa) e cinco subunidades B (entre 7 e 11kDa) (STROCKBINE *et al.*, 1988). A subunidade A inibe a síntese protéica de células eucarióticas e as subunidades B são responsáveis pela ligação da toxina aos receptores celulares (STROCKBINE *et al.*, 1988).

Infecções por *E. coli* é a causa de várias doenças que acometem humanos. Linhagens virulentas e não-virulentas de STEC têm o trato gastrointestinal de bovinos como um importante reservatório e, o consumo de carne crua ou mal cozida contaminada pelas fezes destes animais, ingestão de leite cru ou, ainda, pelo manuseio de materiais contaminados, são as formas de infecção para o homem (KUHNERT *et al.*, 2000, STEVENS *et al.*, 2002). A transmissão pessoa-pessoa também pode ocorrer (KUHNERT *et al.*, 2000), mas neste caso devido à falta de higiene, como por exemplo lavar as mãos após idas ao banheiro ou após a troca de fraldas de uma criança.

As STEC podem causar desde uma diarréia branda, sanguinolenta (colite hemorrágica) à síndrome hemolítica urêmica (HUS) em crianças e adultos, com maiores ou menores efeitos conforme as condições imunológicas do indivíduo (KRISHNAN *et al.*, 1987; CRAY JR, *et al.*, 1996; JENKINS *et al.*, 2003; BETTELHEIM *et al.*, 2005). A HUS provoca a maior complicação das infecções, caracterizada por anemia hemolítica, trombocitopenia e falência renal aguda, que pode estender-se a outros órgãos (CRAY JR, *et al.*, 1996), a taxa de mortalidade é de 2-7% e uma taxa de seqüelas em longo prazo, como a insuficiência renal, lesões neurológicas ou hipertensão, de 12-30% (WHO, 1997).

Em 1983 ocorreram dois surtos epidemiológicos de STEC, o primeiro, nos Estados Unidos, caracterizado por uma severa dor abdominal seguida por diarréia líquida sanguinolenta (colite hemorrágica), foi associada à ingestão de hamburgueres mal cozidos, em uma rede de "fast food" (RILEY *et al.*, 1983) e o segundo, no Canadá, onde crianças apresentavam a HUS, também associada à ingestão de alimentos mal cozidos (KARMALI *et al.*, 1983). Na HUS há uma destruição de

eritrócitos e falha aguda dos rins, podendo levar o indivíduo a óbito (NASCIMENTO & STAMFORD, 2000). A prevenção é importante porque o tratamento com antibiótico das infecções por EHEC não é indicado, pois o tratamento pode desencadear a liberação de endotoxinas que predispõem ao HUS (GRIFFIN, 1995).

Há mais de 400 sorotipos O:H de STEC isolados de gado bovino (BLANCO et al., 2004). A diversidade de *E. coli* comensal não-STECC presente na microbiota intestinal bovina é de grande interesse, uma vez que esses organismos podem potencialmente adquirir genes de virulência pelo mecanismo de transferência horizontal de genes, via mobilidade genética de elementos, como os fagos por exemplo (HACKER & KAPER, 2000).

MOON *et al.* (1983) descreveu uma lesão intestinal produzida por *E. coli* como “attaching-and-effacing” (A/E), após observar a ligação íntima da bactéria à superfície apical do enterócito (“attaching”) e um entumescimento nas microvilosidades intestinais (“effacing”), produzindo uma enterotoxina termo-estável (EAST1). Os genes cromossômicos de patogenicidade que codificam as lesões histopatológicas estão presentes em uma ilha de patogenicidade de 35.6 kb, denominada por “locus of enterocyte effacement” (LEE) (McDANIEL et al., 1995; FRANKEL et al., 1998). Os LEE foram primeiramente descritos em EPEC E2348/69 por McDANIEL et al. em 1995, mas estão também presentes em EHEC, *Hafnia alvei*, *Citrobacter rodentium* e em *E. coli* patogênicas em uma diversidade de espécies animais (FRANKEL et al., 1998). Os LEE de EPEC E2348/69 contêm 41 frames abertos de leitura (ORFs) de mais de 50 aminoácidos (FRANKEL et al., 1998; ELLIOTT et al., 1998). Estes genes são organizados em três regiões principais com funções conhecidas. A região média contém os genes *eae* (que codificam a adesina íntima necessária no processo “attaching-and-effacing”) e o gene *tir* (que codifica um receptor para a íntima que é transportado para as células do hospedeiro através do sistema de secreção tipo III), os produtos que estão envolvidos na aderência da vilosidade epitelial (FRANKEL et al., 1998). Os genes *eae* e *tir* são os que codificam o sistema de secreção tipo III (ELLIOTT et al., 1998; FRANKEL et al., 1998). Nove destes genes são homólogos aos genes *ycs* que codificam o sistema de secreção

tipo III presentes em *Yersinia*, *Shigella*, *Salmonella* e em outros patógenos que possuem este importante mecanismo de secreção (FRANKEL et al., 1998). A terceira região principal dos LEE, situada abaixo dos genes *eae*, codifica diversas proteínas que são secretadas através do sistema de secreção tipo III; as mais proeminentes destas proteínas são EspA, EspB e EspD (FRANKEL et al., 1998). Muitos patógenos de animais e plantas usam o sistema de secreção tipo III para secretar os fatores de virulência, onde alguns dos fatores são injetados (transportadas) diretamente do citoplasma do patógeno para o citosol da célula do hospedeiro (HUECK, 1998; FRANKEL et al., 1998). O gene *eae* não tem sido detectado em todas as linhagens *E. coli* produtoras de Shigatoxina isoladas tanto de bovinos diarréicos como sadios, indicando a possibilidade de haver outro, ou outros, fatores importantes que influenciem na persistência da bactéria ao intestino bovino (WIELER et al., 1996; JENKINS et al., 2002; STEVENS et al., 2002)

Existe um número muito grande de sorotipos de EHEC, mas a *E. coli* O157:H7 é o protótipo desta categoria. *E. coli* O157:H7 pode causar grande surto de intoxicação alimentar, em humanos, decorrentes da ingestão de alimentos e água contaminados (RILEY et al., 1983; KARMALI et al., 1983; STEVENS et al., 2002), podendo ser encontrada na microbiota intestinal de bovinos, suínos, caprinos, caninos, felinos e aves (BEUTIN et al., 1993), mas sem causar-lhes doença ou causando-lhes apenas uma diarreia branda; portanto, são meramente considerados um reservatório da bactéria O157 (ELDER & KEEL, 2000).

Dependendo das condições e da sobrevivência do patógeno nas fezes dos animais contaminados com *E. coli* O157:H7, estas fezes são uma importante fonte de reinfecção para o rebanho e contaminação do meio ambiente (WANG et al., 1996; STEVENS, et al.2002). Esta bactéria pode se manter viável na água por um longo tempo, contaminando grandes áreas de abastecimento rural, urbano e de lazer aquático (SWERDLOW, et al., 1992; WANG & DOYLE, 1998; CHALMERS et al., 2000; STEVENS et al., 2002; SOLOMON et al., 2002). BESSER et al. (1993) associaram a infecção de 23 pessoas por *E. coli* O157:H7 ao consumo de maçãs frescas caídas no solo em uma área contaminada pelo patógeno.

A STEC não-O157 está freqüentemente associada à infecção em humanos, pelo consumo de carne contaminada mal cozida e leite cru; também está associada ao consumo de hortaliças, frutas e águas contaminadas por detritos de animais portadores, através do uso de esterco nas plantações ou, pelos detritos presentes no pasto, ou até mesmo por contaminação de pessoas que trabalham diretamente em contato com estes animais e seus detritos (RILEY *et al.*, 1983; DOYLE, 1991; SILVA *et al.*, 2001). O gado sadio é normalmente um portador da *E. coli* O157:H7, a qual também é encontrada em gado diarreico. O isolamento deste gado doente não resolve o problema, uma vez que ele dissemina o patógeno por todo o campo, contaminando o solo e águas próximas ao pasto (WANG *et al.* 1996).

## **II. 2. 2 *E. coli* enterotoxigênica (ETEC)**

Associada à diarreia em indivíduos de todas as idades; as enterotoxinas de ETEC são classificadas como termo-estáveis (ST) e termo-lábeis (LT) (LEVINE, 1987; SERIWATANA *et al.*, 1988). A termoestabilidade é definida pela retenção da atividade tóxica após incubação a 100°C por 30 minutos, enquanto a termolabilidade significa que a atividade da enzima é perdida nestas mesmas condições. Algumas amostras podem expressar uma ou ambas enterotoxinas (NATARO & KAPER, 1998).

As enterotoxinas LT são subdivididas em LT-I (*E. coli* patogênicas associadas a animais e homem) e LT-II (*E. coli* associadas a animais e alimentos mas, raramente ao homem). As ETEC aderem às células da mucosa do intestino delgado e produzem uma enterotoxina termo-estável (EAST1), sem provocar alteração nas microvilosidades e nem penetram seu epitélio. As enterotoxinas LT estimulam enzimas envolvidas na manutenção do equilíbrio hidrossalino da mucosa intestinal, causam acúmulo de água e eletrólitos no lúmen intestinal, posteriormente desencadeiam uma diarreia em que as fezes não apresentam leucócitos, sangue ou muco (NATARO & KAPER, 1998). As enterotoxinas ST são pouco imunogênicas sendo subdivididas em STa (resultam numa secreção de água e eletrólitos) e STb



(estimula a liberação de carbonatos das células intestinais) (NATARO & KAPER, 1998).

### **II. 2. 3 *E. coli* enteropatogênica clássica (EPEC)**

A EPEC é responsável pela maioria das gastroenterites que acometem principalmente crianças menores de um ano de idade, principalmente associadas aos sorogrupos O111 e O119 (LEVINE, 1987; CORRÊA, 2000), caracterizada por diarreia aquosa e sanguinolenta. O reservatório parece ser o próprio homem (TRABULSI *et al.*, 2002). Aderem intimamente às células da mucosa intestinal (pela intimina expressada pelo gene *eae*) através do pilus BFP (“Bundle-Forming-Pilus”), pelo fenômeno “attaching-and-effacing” (A/E), em célula HEp-2 (células de carcinoma epidermóide de laringe humana), mediadas pelo BFP (KAPPER *et al.*, 1995; JAWETS *et al.*, 2000). É um plasmídeo que expressa uma adesina (AAF/1) e produz uma enterotoxina termo-estável (EAST1) (NATARO *et al.*, 1992). As EPEC são classificadas em: I ou clássica (aderência em HEp-2) e II (aderência difusa ou ausente em HEp-2).

### **II. 2. 4 *E. coli* enteroinvasora (EIEC)**

São mais freqüentes em crianças com mais de dois anos de idade e em adultos. Os sorotipos de EIEC são estreitamente relacionados a *Shigella*, apresentando em comum muitas características bioquímicas, antigênicas e de patogenicidade. A infecção intestinal é resultado da penetração da bactéria nas células intestinais sem a produção de nenhum tipo de toxina, há necrose neste tecido, podendo causar diarreia sanguinolenta ou não, acompanhada de dores abdominais e febre (TRABULSI *et al.*, 2002).

### **II. 2. 5 *E. coli* enteroagregativa (EAEC ou EaggEC)**

Formam um padrão agregativo de adesão, quando se associam com células Hep-2 (células de carcinoma epidermóide de laringe humana) (NATARO *et al.*, 1992). São freqüentes em fezes de crianças normais e com diarreia aguda aquosa ou hemorrágica (TRABULSI *et al.*, 2002). É um plasmídeo que expressa uma adesina (AAF/1) e produz uma enterotoxina termo-estável (EAST1), mas não causam o fenômeno “attaching-and-effacing” (A/E) como ocorre em EPEC (NATARO *et al.*, 1992).

### **II. 2. 6 *E. coli* difusamente aderente (DAEC)**

Pouco se sabe sobre a epidemiologia e aplicação clínica da doença causada por DAEC. Causam diarreia aquosa em crianças e, em estudos realizados por POITRINEAU *et al.* (1995) envolvendo crianças hospitalizadas com idades entre 1 mês e 14 anos, a maioria delas também apresentavam vômitos. Uma linhagem específica de DAEC (Afa/Dr adhesins DAEC) estão envolvidas com infecções de trato urinário (pielonefrite, cistites e bacteriúria assintomática) (SERVIN, 2005).

## **II. 3 Compostagem**

Os solos são formados após decomposição de rochas através da ação de microrganismos vivos, associados a fatores físico-químicos. Para manter sua fertilidade e equilíbrio, é necessária a reposição dos nutrientes perdidos com a absorção realizada pelas plantas e da matéria orgânica consumida pelos organismos presentes nela (HARUTA *et al.*, 2005). Esta reposição é feita naturalmente com a queda de folhas, frutos, gravetos e com a morte de pequenos animais. Mas o homem também pode interferir neste processo natural recompondo a fertilidade e a vida do solo com processos como a compostagem.

Desde a antiguidade, contam-se lendas da importância de adubos orgânicos, como por exemplo, na mitologia grega, o Rei Auges mandou matar Hércules por não querer pagar-lhe 10% de esterco do curral como pagamento de honorários pela limpeza de estábulos ou, Homero, em *Odisséia*, que relata o uso de esterco na Grécia Antiga como prática agrícola. Palissy, em 1563, teorizou que a partir das cinzas das plantas no solo, é que elas retiravam o nutriente necessário para seu desenvolvimento. Atualmente, a teoria de Palissy foi constatada através de análises químicas do solo e das plantas e, de quão é necessário os nutrientes às plantas (NAKAGAWA, 1992). No Brasil, o desenvolvimento do processo de compostagem foi observado pela primeira vez, pelo primeiro diretor do Instituto Agrônomo (IAC), Dafert, em 1888, com o incentivo aos agricultores em produzir os “estrumes nacionais”, já que os adubos minerais eram importados (ALVES, 1996).

Compostagem é o termo associado ao processo biológico de tratamento de resíduos sólidos, orgânicos, agrícolas e florestais, através do qual a matéria orgânica é transformada, pela ação de microrganismos existentes no próprio resíduo, resultando em material estável e utilizável na preparação de húmus (ALVES, 1996; CAMPBELL, 1999; HARUTA et al., 2005). A compostagem é um processo de oxidação biológica onde os microrganismos decompõem, naturalmente, os compostos constituintes dos materiais, liberando dióxido de carbono e vapor d'água. É um processo tanto aeróbio como anaeróbio. Sob condições que favoreçam o desenvolvimento de microrganismos termofílicos, há produção biológica de calor (ALVES, 1996; CAMPBELL, 1999; HARUTA et al., 2005).

A norma brasileira NBR-10004 define resíduos como: produtos nos estados sólidos e semi-sólidos que resultam de atividades da comunidade, de origem industrial, doméstica, hospitalar, comercial e agrícola, ficando incluídos os lodos provenientes do tratamento de água (GROSSI, 1993).

A compostagem objetiva a conversão do material orgânico que não se encontra em condições de ser incorporado ao solo, em um material admissível para que esta mistura possa ser realizada, assim como na destruição da viabilidade das sementes, de infestantes e de microrganismos patogênicos (HARUTA et al., 2005).

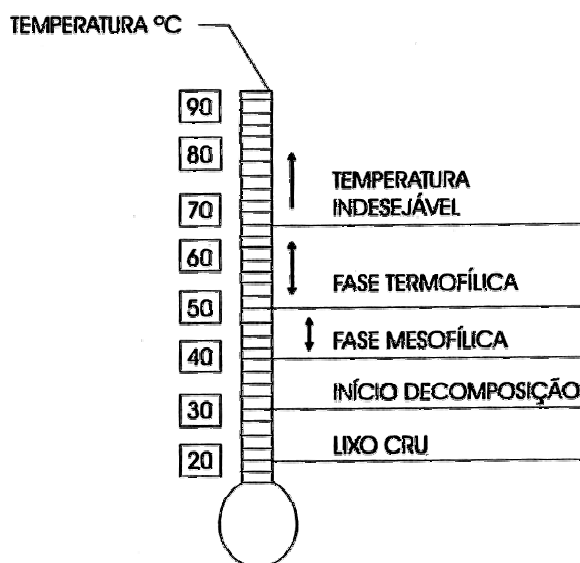
Os materiais utilizados para a compostagem podem ser divididos em duas categorias: a dos materiais ricos em carbono (materiais lenhosos, podas, cascas de árvores, serragens, folhas secas, papel, feno, etc) e os ricos em nitrogênio (folhas verdes, estrume de animais, urinas, solo, restos de hortifrutis, ervas, etc...), sendo fundamentais para o crescimento bacteriano. O carbono orgânico é a principal fonte de energia e o nitrogênio se faz necessário para a síntese celular (ALVES, 1996; PEREIRA NETO, 1996).

Para o processo adequado de compostagem, há variantes que devem ser observadas, como: umidade, temperatura, relação carbono/nitrogênio, aeração, pH, tamanho e local das pilhas, leiras ou valas, materiais utilizados na construção do sistema, entre outros (ALVES, 1996; PEREIRA NETO, 1996).

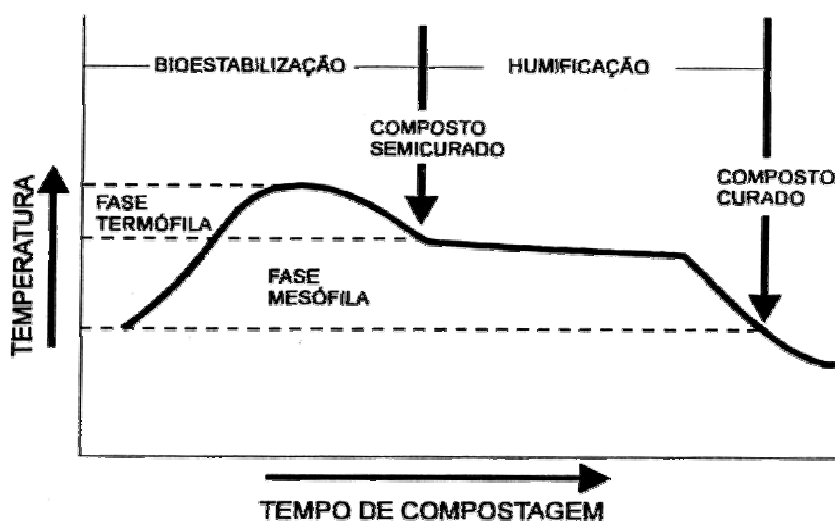
A umidade deve ser controlada, o ideal é o teor de umidade em torno de 50%, pois valores abaixo de 40% podem reduzir a ação dos microrganismos e acima de 60% podem ocorrer falta de  $O_2$  em algum ponto do composto, levando a uma decomposição por processos anaeróbios, que levam a produção de gases mal cheirosos e formação do chorume (EGREJA FILHO & PEREIRA NETO, 1993; PEREIRA NETO, 1996; CAMPBELL, 1999).

A temperatura também influi, e muito, no processo, pois há duas fases a serem levadas em conta, a primeira é denominada de fase termofílica, com temperaturas entre 45 e 65°C. Nesta fase a atividade biológica atinge seu máximo, há intenso consumo de  $O_2$ , ocorrendo eliminação de patógenos e sementes de ervas daninhas. A outra é a fase mesofílica onde as temperaturas ficam abaixo de 45°C (KIEHL, 1985; ALVES, 1996; PEREIRA NETO, 1996; CAMPBELL, 1999) (Fig. 1 e 2). A fase termofílica não deve ultrapassar 70°C para que não ocorra a morte dos microrganismos necessários para o processo de decomposição do material (KIEHL, 1985; ALVES, 1996; PEREIRA NETO, 1996; CAMPBELL, 1999). Após esta fase segue-se uma redução da temperatura, onde se dá a bioestabilização da matéria orgânica e a sua humificação (KIEHL, 1985). A humificação é um processo de transição após degradação microbiana, onde as substâncias que eram anteriormente de baixo peso molecular se condensam formando estruturas com alto peso, estáveis

a ataques microbianos (ALVES, 1996), nesta fase a temperatura do sistema está próxima à temperatura ambiente (KIEHL, 1985; ALVES, 1996; PEREIRA NETO, 1996; CAMPBELL, 1999). Na verdade esses limites de temperatura não são rígidos e representam muito mais os intervalos de temperatura ótima para cada classe de microrganismos presentes (KIEHL, 1985)



**Figura 1:** Fases de temperatura no processo de compostagem (ALVES, 1996)



**Figura 2:** Evolução da temperatura no composto em relação ao tempo de compostagem (ALVES, 1996)

A relação carbono/nitrogênio deve ser de 30/1 no início do processo, pois parte do carbono será transformado em CO<sub>2</sub> e parte utilizada no crescimento microbiano (KIEHL, 1985; ALVES, 1996; PEREIRA NETO, 1996; CAMPBELL, 1999). O carbono é fornecido com a utilização de serragem, folhas, gramas e, o nitrogênio pelos esterco, lixos orgânicos entre outros

Com relação à aeração, o suprimento de O<sub>2</sub> é um dos fatores mais influentes no processo de compostagem. Com relação à forma de aeração, este pode ser classificado como sistema aberto ou fechado (EGREJA FILHO & PEREIRA NETO, 1993), dependendo da metodologia empregada, pois a aeração em níveis adequados pode possibilitar a decomposição de forma mais rápida e com a não produção de odores ruins (EGREJA FILHO & PEREIRA NETO, 1993; PEREIRA NETO, 1996). Em estudos com esterco de ovinos, KUDVA et al. (1998) relataram que *E. coli* O157:H7 pode sobreviver por mais de um ano em esterco contaminado não-aerado exposto às condições ambientais.

Visando todas estas variáveis, o principal é o fornecimento das condições ideais para o desenvolvimento e manutenção dos microrganismos responsáveis pela estabilização da matéria orgânica (KIEHL, 1985; ALVES, 1996), uma vez que a compostagem efetivamente reduz o número de coliformes fecais à um número mínimo de células ou até mesmo a zero (CARROL & JASPER, 1978).

Em pilhas muito altas ou valas muito profundas pode ocorrer compactação das camadas inferiores produzindo chorume e apresentarem um alto teor de umidade, aquecerem muito no centro ou possuírem o centro sem aeração. Em volume pequeno de material a ser decomposto há intensa troca entre o ar interno com o externo, não permitindo elevar a temperatura e, conseqüentemente, impede a proliferação de microrganismos termofílicos; este fato não impede que a compostagem ocorra, apenas retarda o processo (NAKAGAWA, *et al.*, 1991). O ideal é medir entre 1 a 1,8m<sup>3</sup> no caso de sistema de pilhas (ALVES, 1996; CAMPBELL, 1999) e 0,6m<sup>3</sup> no caso de sistema em valas (KUDVA, et al. 1998; LARNEY et al. 2003).

Estudos determinaram que variações nas condições da compostagem podem influenciar na sobrevivência de bactérias patogênicas (*Salmonella*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *E. coli*) e vírus (rotavírus, herpesvírus, vírus causador da hepatite A e vírus responsáveis por doenças respiratórias), e conseqüentemente infectar gado pastando nestas áreas contaminadas pelo processo de compostagem inadequado (CARROL & JASPER, 1978; DENG e CLIVER, 1995; GOODGER et al., 1996; WANG et al., 1996; AJARIYAHAJORN et al., 1997; KUDVA et al., 1998; LARNEY, et al., 2003), mas estes sistemas também podem ser alvo de contaminação externa ou serem fontes de contaminação para outro sistema (CARROL & JASPER, 1978).

O esterco bovino é uma boa fonte de macro e micronutrientes para a recuperação do solo (INGHAMN et al., 2004; AMORIM, 2005). Métodos tradicionais para a utilização de fezes de gado como fertilizante e, a maneira em que são feitos os tratamentos destes, podem trazer sérios danos à saúde ambiental e humana (RINK, 1992; PEREIRA NETO, 1996; AMORIM, 2005). Deve-se utilizar métodos que não causem contaminação da água ou poluição atmosférica e do solo. Mantendo-se as condições aeróbias ou não, a temperatura é o fator determinante da população microbiana durante a compostagem (TIQUIA et al, 2005).

A compostagem em vala é uma forma de sistema fechado com relação à aeração, e permite que o material permaneça aquecido durante o inverno e verão, além da vantagem de manter escondido o material a ser decomposto e evita o mau cheiro (RINK, 1992). O sistema de pilhas sob o solo é um sistema aberto com relação à aeração, devendo ser bem montado e monitorado, para que não atraia insetos e que não apresente cheiro ruim (PEREIRA NETO, 1996).

Vários trabalhos concluíram que as temperaturas obtidas pelo calor liberado não são suficientes para a destruição dos patógenos presentes no material (WANG et al. 1996; KUDVA, et al. 1998; LARNEY et al. 2003). Em fazendas onde se cria gado leiteiro, freqüentemente são isoladas *E. coli* produtora de shigatoxina, incluindo o sorotipo O157:H7 (WANG et al., 1996).

CARROL & JASPER (1978) evidenciaram a presença de *E. coli*, *Klebsiella* e *Enterobacter* após compostagem de fezes de gado leiteiro contaminados com

mastite bovina, com temperatura de 55°C em sistemas tanto em anaerobiose como aerado, após recuperação destes microrganismos em caldo de crescimento nutritivo.



### **III OBJETIVO**

Este trabalho teve por objetivo determinar qual o tempo adequado de compostagem e em qual temperatura o patógeno STEC não-O157 perde sua patogenicidade/virulência através da análise de amostras de esterco bovino em compostagem anaeróbia, coletadas por 10 dias consecutivos e, após, a cada 5 dias até o trigésimo dia e no 120<sup>o</sup> dia, em profundidades diferentes (superficial, intermediária e profunda) em dois sistemas de compostagem distintos.

## **IV MATERIAIS E MÉTODOS**

### **IV. 1 Origem e coleta das amostras**

As amostras utilizadas neste estudo foram coletadas em um laticínio presente na região da cidade de Franca – SP. Foram feitas coletas de fezes com “swabs” retais, em 50 vacas leiteiras, no momento da ordenha. Este material foi armazenado em meio de cultura Cary-Blair (DIFCO) (RAHN et al., 1997), para assegurar que as amostras se mantivessem o mais próximo possível do estado natural, sem multiplicação microbiana significativa. O gado era criado à pasto e suplementado com ração e silagem. Os “swabs” coletados foram transportados para o laboratório em caixa térmica, sendo manipulados em um prazo máximo de três horas.

### **IV. 2 Isolamento e caracterização das amostras de *E. coli***

Os “swabs” foram semeados diretamente sobre a superfície de ágar MacConkey em placas de Petri, e incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. O efeito seletivo do meio é exercido pelos sais biliares e pelo cristal violeta presentes no meio, que atuam inibindo a flora Gram positiva. A fermentação da lactose foi observada pela alteração da cor do indicador de pH vermelho neutro. De maneira aleatória, 5 colônias isoladas, fermentadoras de lactose com morfologia característica foram selecionadas desta cultura preliminar, para a detecção de *E. coli* e, crescidas novamente em ágar Luria-Bertani (DIFCO), incubadas a 37°C, por 24 horas, e armazenada a 4°C para posteriores testes bioquímicos.

### IV. 3 Testes bioquímicos

Com o auxílio de uma agulha de semeadura esterilizada, os isolados do meio de cultura Luria-Bertani (10,0g triptona, 5,0g extrato de levedura, 10,0g cloreto de sódio, água destilada qsp 1000mL) foram semeados em meio Tríplice de Açúcar e Ferro (TSI) (BIOBRÁS) picando-se o meio até o fundo do tubo e fazendo estrias no ápice e, incubadas a 37°C por 24 horas. Confirmados como coliformes fermentadores de lactose, glicose e sacarose, devido à produção de ácidos a partir da fermentação destes açúcares com modificação da cor do meio, passando de alaranjado para totalmente amarelo e produção de gás (prova positiva). Mas por ser um meio de cultura rico em compostos protéicos, as amostras que se apresentaram positivas para este teste foram analisadas, em meio ágar Citrato de Simons (BIOBRÁS), inoculando com agulha de semeadura e em linha reta. Como *E. coli* não possui a permease do citrato, este não é transportado para o interior da célula e, como o citrato de sódio é a única fonte de carbono presente, não houve crescimento na superfície do meio e, nem alteração de sua cor original, azul (prova negativa).

Para testar o indol, o microrganismo foi inoculado em tubos contendo caldo triptofano (OXOID), com o auxílio de alça de semeadura e mantidos em temperatura ambiente por 36 horas. Ao término deste período, foram adicionadas 4-5 gotas de Reativo de Kovacs (VETEC – Química Fina para Laboratórios) pela parede do tubo. O desenvolvimento de cor vermelho fúcsia brilhante na superfície de contato entre o reativo e o caldo, segundos após a adição, indicou a presença de indol (prova positiva), que é um produto metabólico da degradação do aminoácido triptofano pela ação da enzima triptofanase.

Lisinas ou descarboxilases são enzimas substrato-específicas que ao atuarem sobre a carboxila (COOH) do aminoácido cadaverina formam aminas alcalinas, por descarboxilação, e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), determinados por alteração de pH e coloração de azul-púrpura (original) para amarelo (fermentação de açúcar) e para azul-púrpura novamente (reação positiva). Uma alçada da cultura pura foi inoculada

em tubos com condições anaeróbias (com a utilização de óleo mineral esterilizado) e mantidos por aproximadamente 24 horas a 37°C.

A uréia é uma diamida do ácido carbônico sendo facilmente hidrolisada, liberando amônia e dióxido de carbono. A urease é uma enzima presente em vários microrganismos capazes de hidrolisar a uréia; este processo gera carbonato de amônio alcalinizando o meio, havendo mudança de cor para uma tonalidade rósea sendo urease positiva e *E. coli* negativa, pois nesta a enzima urease é inexistente. Após inoculação da bactéria de cultura pura com agulha de semeadura em meio ágar uréia base Christensen (BIER, 1985), por 24 horas a 37°C, sem alterações na cor do meio foram consideradas urease negativa.

Foram feitos testes adicionais para os açúcares celobiose, dulcitol e sorbitol, ambos a 10% esterilizados por filtração, a partir de cultura pura de *E. coli*, em tubos contendo 3,0mL de caldo vermelho de fenol base adicionados, separadamente, dos açúcares, de forma a obter uma concentração final do açúcar de 0,1%. Os tubos foram incubados a 37°C por 24 a 48 horas. Após a incubação foram observados as produções de ácidos, evidenciada pela alteração do indicador vermelho de fenol para amarelo (fermentadores positivos); no caso específico para *E. coli* foram considerados sorbitol e celobiose negativos e dulcitol positivo.

Uma vez isolada e confirmada a presença de *E. coli* na série bioquímica, foram feitos sorotipagens utilizando o antisoro para o sorogrupo O157 através de kit específico, "O157 latex agglutination test" (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK) . A linhagem EDL 933 (O157:H7) foi utilizada como um controle positivo. As cepas que não aglutinaram com este antisoro foram classificadas como não-O157.

#### **IV. 4 Preparação do DNA bacteriano para amplificação**

O DNA a ser amplificado foi liberado da célula bacteriana por fervura (KESKIMAKI et al, 2001). A bactéria foi cultivada em 2,0 mL de caldo Luria-Bertani sem glicose (10 g triptona, 5 g extrato de levedura, 5 g NaCl por litro, pH 7.0), por 18 horas a 37°C. Após este período de crescimento, 1,0mL da cultura foi transferido

para tubo tipo “eppendorf” e, após uma centrifugação (12.000g – 30 segundos), o sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspendido em 200µL de água Milli-Q autoclavada e, nova centrifugação foi realizada (12.000g – 30 segundos). A ressuspensão, centrifugação e o descarte do sobrenadante foram realizados novamente, sob as mesmas condições. O precipitado foi novamente ressuspendido em 200µL de água Milli-Q autoclavada e o tubo foi incubado por 10 minutos a 100°C, para que ocorra a quebra da parede celular. Após a centrifugação do lisado (12.000g – 10 segundos), 150µL do sobrenadante foi recuperado em um novo tubo tipo “eppendorf” e, estocado a –20°C como estoque de DNA molde (KESKIMAKI et al, 2001).

#### IV. 5 Amplificação dos fragmentos de DNA através da técnica da PCR

Técnicas de PCR foram utilizadas para a amplificação da seqüência genética de Stx1 e de Stx2, onde foram usados como iniciadores os oligonucleotídeos descritos por ORDEN et al. (1998). O par para Stx1 amplificará um fragmento de 894-pb e, o par para Stx2, um fragmento de 478-pb (Tabela 1).

**Tabela 1.** Seqüências de bases dos iniciadores específicos para Stx usados em PCR e tamanho dos produtos amplificados.

Iniciador	Seqüência do Oligonucleotídeo (5´-3´)	Tamanho do Produto Amplificado (pares de base)
Stx1a	CAGTTAATGTGGTGGCGAAG	894
Stx1b	CTGCTAATAGTTCTGCGCATC	
Stx2a	CTTCGGTATCCTATTCCCGG	478
Stx2b	GGATGCATCTCTGGTCATTG	

A PCR foi realizada em um volume de 50 µL, contendo 10 µL do DNA molde; oligonucleotídeos 150 ng (cada); dNTPs 0,2 mM (cada); Tris-HCl pH 8.3 10mM; MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM; KCl 50 mM e Taq DNA Polymerase (Perkin Elmer) 2.5 unidades. As reações foram recobertas com óleo mineral para evitar a evaporação no processo de

termociclagem. A PCR foi realizada em termociclador (ELMER LETUS), com um ciclo de desnaturação inicial de 2 minutos a 94°C, seguido de 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e ciclo final de extensão a 72°C por 10 minutos (ORDEN *et al.*, 1998).

Após a reação de PCR, 10 µL das amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 2 % em tampão 1 x TAE acrescido de brometo de etídeo (0,5 µg/mL), por aproximadamente 50 minutos a 90 volts. Este gel foi analisado sob incidência de luz UV para a verificação da presença do DNA amplificado, usando como padrão de peso molecular o marcador da Ø X174 Hae III-digest (Pharmacia). Cepas de *E. coli* utilizadas como padrão: Stx1 *E. coli* O157:H7 e Stx2 (J2), ambos cedidos pelo Departamento de Microbiologia do IB – UNICAMP.

#### **IV. 6 Compostagem**

Os sistemas de compostagem foram montados em uma área cedida pelo Setor de Jardins no Campus da USP-Ribeirão Preto; uma área de acesso restrito aos funcionários do setor e que estava desativada, mas mesmo assim a área foi cercada com arames e estacas.

No rebanho examinado apenas o gene *stx2* foi detectado nas células bacterianas fecais e em apenas 6% delas. Após o confinamento das vacas previamente confirmadas para STEC, o esterco coletado foi manualmente misturado em um recipiente, coberto com plástico esterilizado e adicionado a dois sistemas de compostagem um sobre o solo em forma de pirâmide (1m<sup>3</sup>) e o outro em vala (0,6m<sup>3</sup>).

O período de execução do experimento foi compreendido entre 08.05.2005 a 04.09.2005 e as coletas realizadas entre 14:00 hs a 16:00 hs.

A cada dia, nos 10 primeiros dias, a cada cinco dias por durante um mês, e nos 60<sup>o</sup> e 120<sup>o</sup> dias, amostras de esterco foram coletadas, respectivamente do topo, do meio e da base dos compostos. A cada dia de coleta sete amostras foram obtidas e seguidas por culturas para se determinar a presença de *E. coli*. Como forma de

“simular” o que ocorre naturalmente no pasto, uma pilha de fezes bovina foi depositada diretamente sobre uma cobertura de grama, na área destinada ao experimento e deixada exposta sob as condições ambientais locais (Fig. 3); este procedimento foi denominado, por nós, de “monte”, de onde também foram feitas coletas que seguiram o mesmo destino que as dos sistemas de compostagem. As coletas foram feitas com “swab” esterilizado e transportadas ao laboratório em meio Cary-Blair (DIFCO); para dar o comprimento necessário para os pontos de coleta, foram colocadas uma extensão com vara de bambu. À este aparato foi afixado um termômetro para medir a temperatura nos pontos de coleta (Fig. 4).



**Figura 3.** O “monte” de esterco sobre uma cobertura de capim, destacando uma das coletas.



**Figura 4.** Aparato montado para as coletas e medições de temperaturas.

As amostras foram semeadas em placas de ágar MacConkey (BIOBRÁS) e em caldo de crescimento nutritivo (Sigma Chemical) no máximo 1 hora após a coleta (CARROL & JASPER, 1978). Após o período de uma noite em condições de crescimento aeróbio a 37°C, uma alçada do caldo foi estricada em uma placa de ágar MacConkey e novamente incubada por uma noite a 37°C. Foram coletadas uma alçada de células de uma área de crescimento confluyente e inoculadas em meio de crescimento Luria Bertani; o estoque de DNA molde foi obtido como descrito acima. A presença do gene bacteriano *stx 2* foi analisado por PCR.

Foi realizada uma coleta inicial das fezes que estavam dentro do cano, determinada como “Tempo Zero”, para confirmar a presença de STEC não-O157 e, também foram coletadas amostras do esterco maturado que fazia parte dos sistemas de compostagem, como forma de controle negativo, para apenas averiguar a ausência de *E. coli*. A área foi completamente cercada para proteção (Fig. 5). Os riscos de contaminação cruzada foram minimizados pela ausência de gado ou outro animal considerado como possível reservatório e, os riscos de contaminação do solo, de água ou de culturas foram minimizados com o acondicionamento das fezes



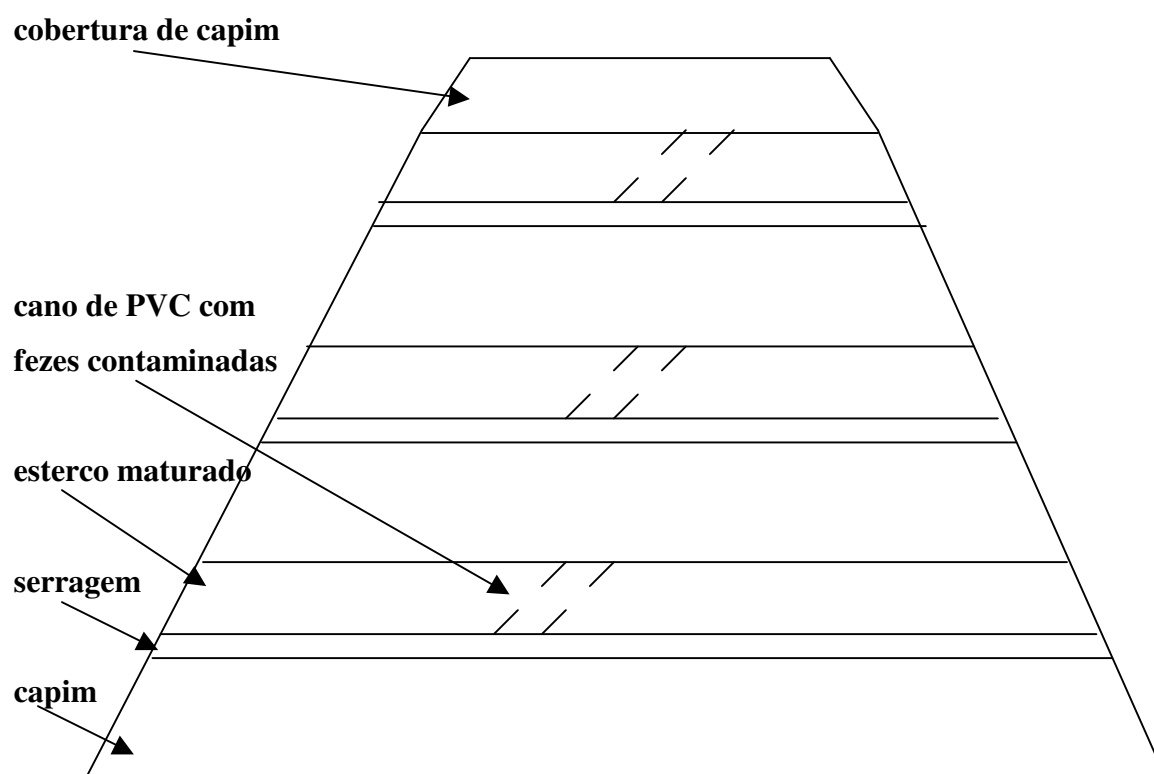
frescas em canos de PVC antes do processo de montagem dos sistemas de compostagem.



**Figura 5.** Área dos sistemas de compostagem completamente cercada para proteção.

#### **IV.6.1 Esterco bovino em compostagem sobre o solo em forma de pirâmide**

A compostagem foi feita da seguinte maneira: foram dispostas camadas intercaladas de capim (20 cm), serragem (1-2 cm) e esterco maturado (10 cm), até que se fizessem 3 camadas de cada e, que estas ficassem em forma de pirâmide com um volume de 1 m<sup>3</sup> (KUDVA et al., 1998). Entre as camadas de esterco foram colocados tubo de PVC 3/4" (um para cada camada), com perfurações de 2mm, do centro da pirâmide para uma das extremidades, contendo as fezes a serem analisadas. Os tubos foram fechados, nas extremidades que ficaram no centro, com uma tampa (também de PVC) e, nas outras extremidades foram fixados tubos feitos com tela antiáfítica (por onde se fizeram as coletas). Os canos foram colocados em três alturas diferentes na pilha, onde o primeiro esteve a 32,0cm do solo (SP), o segundo a 64,0cm (SI) e o último a 96,0cm (SS). A última camada de esterco foi coberta por outra camada de capim (10 cm) até que a pirâmide atingisse aproximadamente 1m de altura e coberta com um encerado (Fig. 6, 7 e 8)



**Figura 6.** Compostagem em forma de pirâmide: esquema representativo das disposições das camadas de capim, serragem e esterco maturado e, das posições dos canos de PVC contendo as fezes contaminadas.



**Figura 7** Sistema de compostagem em forma de pirâmide; destacando por seta a extremidade do cano de PVR com tela antifúngica por onde foram feitas as coletas.



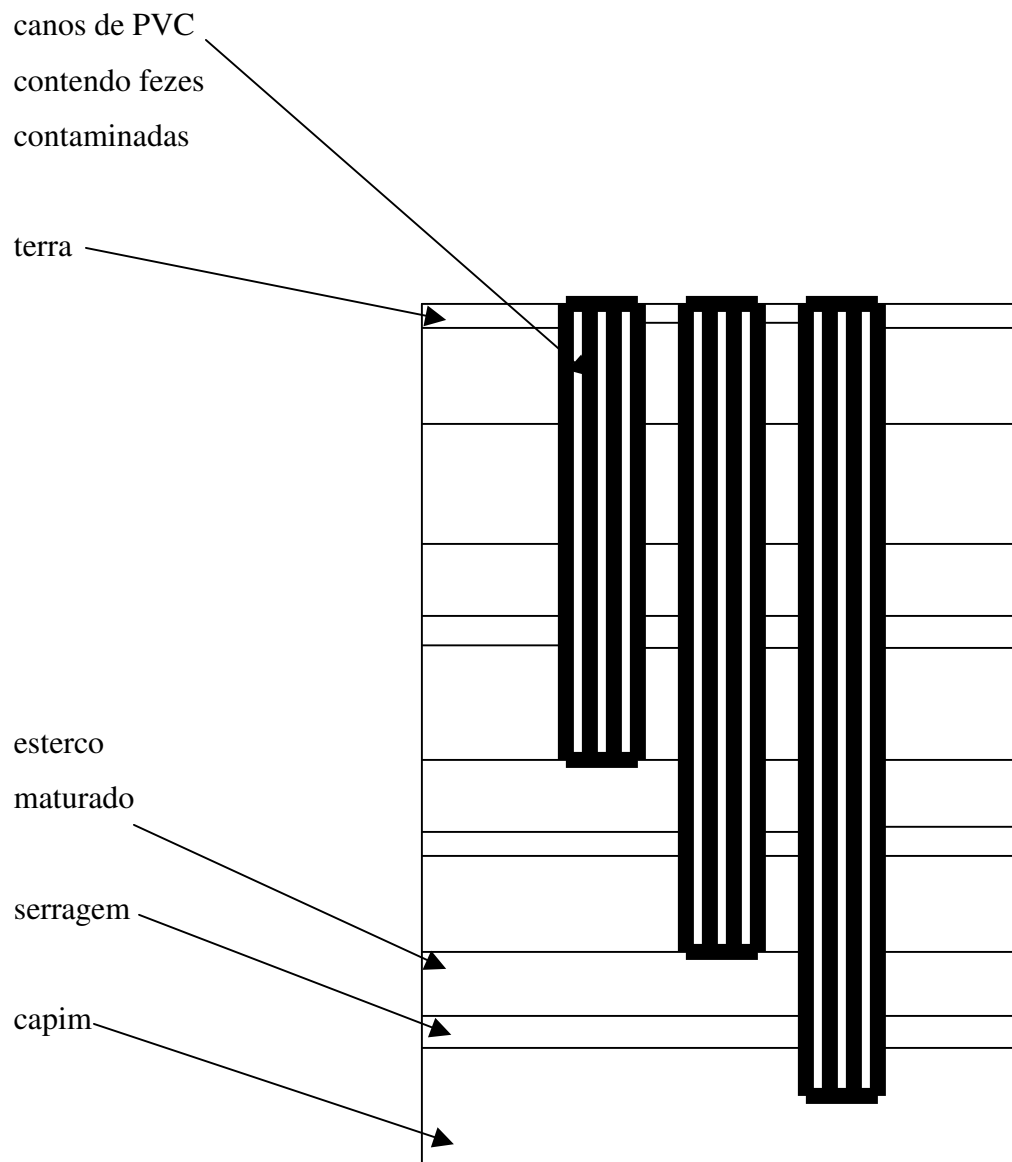
**Figuras 8.** Coletas de amostras do sistema de compostagem em forma de pirâmide, destacando as coletas nas camadas superficial e inferior.

#### IV.6.2 Esterco bovino em compostagem em vala

Uma vala de 0,60 m<sup>3</sup> de profundidade foi aberta no solo (CARROL & JASPER, 1978; KUDVA et al., 1998) e preenchida respectivamente com três camadas de capim (10 cm), serragem (1-2 cm) e esterco maturado (5 cm); esta seqüência de arranjo foi repetida por três vezes; na parte superior foram colocadas uma camada capim (10 cm) e uma de terra (5 cm). A vala foi completamente coberta com uma lona preta. No centro da vala foi fixada uma estaca verticalmente e, à esta, foram presos 3 canos de PVC ¾' com alturas diferentes de 60 cm (EP), 40 cm (EI) e 20 cm (ES). Uma extremidade do cano foi fechada com tampa e a outra fechada com um tubo feito de borracha (por onde se fizeram as coletas) para evitar aeração e entrada de água das chuvas. Estes foram coberto com capim, para não deixar as borrachas à mostra (Fig. 9, 10 e 11).



**Figura 9.** Uma das extremidades dos canos de PVC fechadas com borracha, por onde se fizeram as coletas.



**Figura 10.** Compostagem enterrada em sistema de vala: esquema representativo das disposições das camadas de capim, serragem e esterco e das posições dos canos de PVC contendo as fezes contaminadas.



**Figura 11.** Coleta de amostra do sistema de compostagem em vala, destacando uma das coletas.

#### **IV.7 Confirmação da presença de *E. coli* nos sistemas de compostagem**

Os swabs utilizados nas coletas foram semeados em meio ágar MacConkey para confirmação da presença ou não de células de *E. coli*. Para reafirmar os resultados, estes mesmos swabs foram colocados em caldo nutritivo, por 18 horas a 37°C, sob aeração e após, o caldo foi semeado em outra placa contendo novo ágar MacConkey, como já descrito.

## V RESULTADOS E DISCUSSÃO

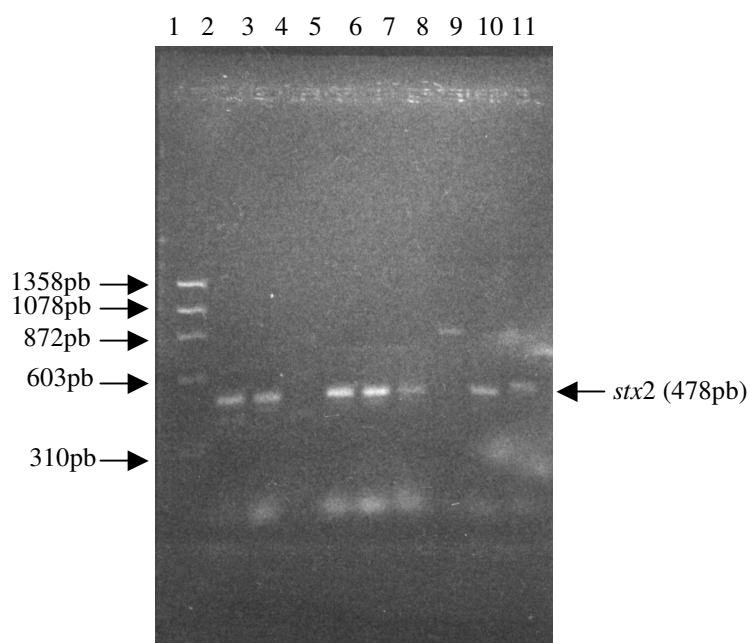
### V. 1 Avaliação da presença de *E. coli* STEC não-O157 e detecção dos genes *stx1* e *stx2* na compostagem

Em nosso estudo tentamos detectar cepas de *E. coli* e STEC apresentando os genes *stx1* e *stx2*, mas apenas o gene *stx2* (Fig. 12) foi localizado e em 6% das cinquenta vacas leiteiras do rebanho analisado. O papel da Shigatoxina de STEC na colonização intestinal de ruminantes ainda não está bem conhecido (STEVENS et al., 2002). A proteína Stx parece facilitar a colonização intestinal através da modulação da resposta imune local no hospedeiro (DEAN-NYSTROM et al., 2002).

Em estudos realizados por STEVENS et al. (2002) na Inglaterra, foram observados que em 97,8% das células de *E. coli* O157 isoladas de gado bovino e em 100% das células isoladas de ovelhas, continham apenas o gene *stx2*; resultados semelhantes também foram encontrados por PAIBA et al. (2002). KUHNERT et al. (2005) relataram que 45% de fezes bovinas STEC-positiva na Suíça, continham o gene *stx2*, o que está de acordo com um trabalho australiano realizado em rebanho de gado leiteiro (COBBOLD & DESMARCHELIER, 2001). Os resultados obtidos para o continente sul americano apontam para a mesma direção; GUTH et al. (2003) verificaram que as cepas STEC apresentando o gene *stx2* predominavam entre o gado argentino, da mesma forma LIRA et al. (2004) também apontaram o gene *stx2* como prevalente nas STEC isoladas de gado bovino no Brasil. IRINO et al. (2005) reforçaram esta afirmativa, pois verificaram que o gene *stx2* sozinho ou em associação com o gene *stx1*, predominaram em gado saudável no Brasil. Assim, o isolamento de cepas STEC apresentando o gene *stx2* proveniente de fezes de gado saudável, está de acordo com relatos anteriores da literatura.



A proteína Stx1 não esteve envolvida na indução da secreção intestinal e nem mesmo na resposta inflamatória em trabalhos realizados por STEVENS et al (2002b), com EHEC O132:H2. Existem indicações de que o gene *stx2* é mais importante para o desenvolvimento da doença que o gene *stx1*. Mais importante ainda, o gene *stx2* está também associado à maioria das linhagens de STEC que causam doenças em humanos (BOERLIN et al., 1999).



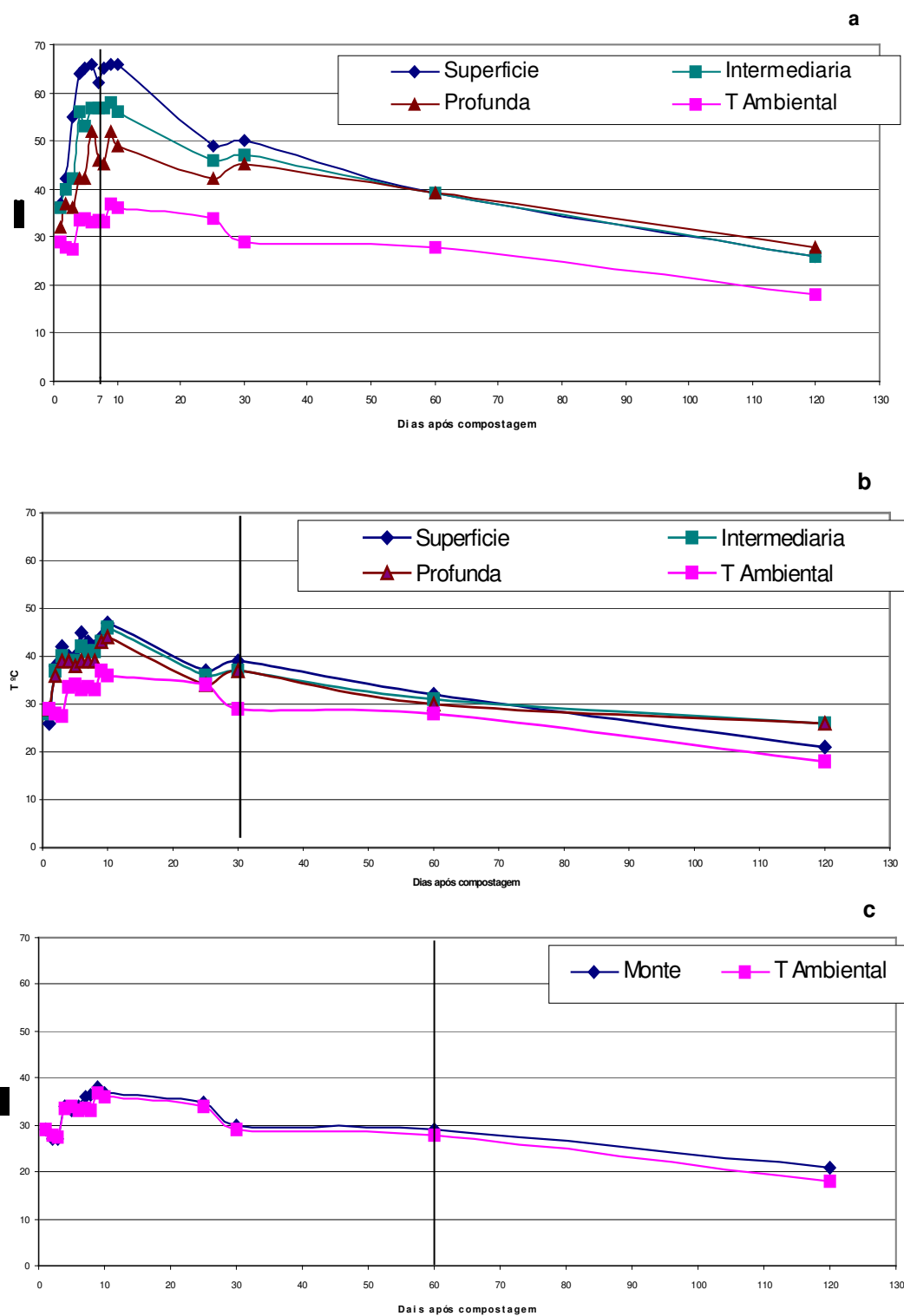
**Figura 12.** Perfil eletroforético dos produtos de PCR para os genes *stx1* e *stx2*, em gel de agarose 1% em 1 x TBE, na presença de marcador de peso molecular  $\Phi$  X174 Hae III-digest (Pharmacia) (linha 1); padrão *Stx2 E. coli* J2 (linha 2); cepa Es1 para *stx2* (linha 3); controle (branco) da reação de PCR (linha 4); cepa ET1 (linha 5); cepa da coleta em vala na maior profundidade no oitavo dia de coleta (linha 6); cepa do monte do quarto dia de coleta (linha 7); padrão *stx1* para *E. coli* O157:H7 (linha 8); cepa da coleta em vala na profundidade intermediária no vigésimo quinto de coleta (linha 9); cepa da coleta sobre o solo na maior profundidade no quinto dia de coleta (linha 10).

## V.2 Variações nas temperaturas dos compostos

As amostras foram sempre coletadas no período da tarde, entre 14:00 e 16:00 horas, neste período os sistemas de compostagem recebiam sol diretamente, e no período da manhã, sombra. As temperaturas variaram muito de camada para camada e de um sistema para outro. A temperatura é um dos pontos fundamentais na sobrevivência de *E. coli* nos compostos, assim como determinado por McGEE et al. (2001), que em seus estudos observaram uma redução do número de células de *E. coli* em 50% na terceira semana em estudos em esterco bovino e na nona até a décima segunda semana reduziram a níveis quase não detectáveis.

A temperatura no centro do composto em vala atingiu 40°C após 72 horas da montagem do sistema e alcançou um valor máximo de 45°C em 10 dias; gradualmente a temperatura foi caindo até alcançar a temperatura ambiente, estando de acordo com dados relatados por ISHII et al (2000) e por PEEL (1997). A variação da temperatura entre as camadas superior e inferior foi de 40°C  $\pm$  2°C seguindo a mesma taxa de declínio. Entretanto no “monte”, a temperatura foi menor, alcançando um valor máximo de 33°C durante o período experimental; neste caso as bactérias apresentando o gene *stx2* puderam ser detectadas por 60 dias, o que coincide com o relato de PEEL (1997), que descreveu a sobrevivência de *E. coli* O157 no esterco a 37°C por 49 dias.

No sistema de compostagem convencional, as temperaturas foram mais altas do que as observadas no sistema em vala; o valor máximo de temperatura foi observado na camada superior de 66°C no sexto, nono e décimo dias, nunca se aproximando da temperatura ambiente. Na camada intermediária a temperatura máxima foi de 58°C no nono dia e, na camada inferior 52°C no sexto e nono dias (Fig. 13).



**Figura 13.** Comportamento da temperatura em diferentes profundidades e temperatura ambiente para a compostagem Sobre o Solo (a); em Vala (b) e no Monte (c).

Obs.: A linha vertical indica o tempo mínimo necessário para que fossem removidas 100% da presença de *Escherichia coli* apresentando o gene *stx2*.

Conforme recomendado pelo US EPA (2006), a temperatura no interior do composto deve manter-se acima de 55°C por mais de três dias consecutivos, conferindo assim sucesso na diminuição ou eliminação de microrganismos indicadores de poluição fecal.

Existem alguns relatos sobre a persistência de *E. coli* de outros sorotipos que não o O157:H7 em esterco animal. Entretanto, um estudo que investigou a sobrevivência de *E. coli* O26, O111 e O157 em fezes bovina (FUKUSHIMA et al., 1999), demonstrou que ao serem armazenados a 5, 15 e 25°C, os patógenos conseguiram sobreviver por até 8 semanas a 25°C, o que está de acordo com os resultados obtidos no “monte” neste estudo.

### **V. 3 Sobrevivência de *E. coli* e de STEC não-O157**

Uma avaliação da sobrevivência de *E. coli* e da presença do gene *stx2* nas cepas STEC recuperadas dos sistemas de compostagem e no monte, é mostrado na Tabela 2.

Bactérias apresentando o gene *stx2* foram detectadas na camada superior do sistema de compostagem em vala até o trigésimo dia; na camada intermediária até o vigésimo quinto dia e, na camada inferior até o oitavo dia. No sistema de compostagem convencional o gene *stx2* foi detectado nas camadas superior e intermediária até o quarto dia e na camada inferior até o sétimo dia. No “monte”, células de *E. coli* apresentando o gene *stx2* foram detectadas até o sexagésimo dia, diferentemente do que foi observado em estudos realizados por FENLON et al. (2000) onde em esterco bovino contendo baixos níveis de *E. coli* O157:H7 (33 UFC), estas não poderiam ser mais detectadas após o sétimo dia de adubação, o que também foi observado por WILLIAMS et al. (2005).

**Tabela 2.** Sobrevivência de *Escherichia coli* não-O157 e detecção do gene *stx2* nos sistemas de compostagem e no monte.

SISTEMAS	Sobrevivência de <i>E. coli</i>	STEC com o gene <i>stx 2</i>
	Duração (dias)	
Compostagem em vala		
(não-aerado)		
Parte superior	120 *	30 *
Parte intermediária	120	25
Parte inferior	120	8
Controle (“monte”)	120	60
Compostagem sobre o solo		
(não-aerado)		
Parte superior	120	4
Parte intermediária	120	4
Parte inferior	120	7

\* Período máximo de dias no qual *E. coli* foi detectada por plaqueamento direto, ou o gene *stx 2* foi detectado por PCR de DNA molde.

Embora a eliminação dos patógenos pelo sistema de compostagem seja bem documentada (DEPORTES et al., 1998; TIQUIA et al, 2002; LARNEY et al., 2003), as condições de compostagem (tempo, temperatura), necessárias para conseguir a eliminação ou redução do número de células de *E. coli*, varia extensamente. TURNER (2002) verificou a inativação de células de *E. coli* em esterco de fezes de porco misturadas com palha após 2h na temperatura de 50°C. LAU e INGHAM (2001) relataram que *E. coli* pode ser recuperada de esterco bovino após 19 semanas a 21°C. Neste estudo, células de *E. coli* puderam ser recuperadas em cada condição de teste por até 120 dias, mas as linhagens de STEC não-O157 apresentando o gene *stx2*, não foram encontradas após o trigésimo dia assim, a competição entre as bactérias parece ser um ponto muito importante juntamente com a temperatura; aparentemente as linhagens de STEC são mais sensíveis às altas temperaturas do que *E. coli* comensal.

O Programa Nacional Orgânico (NOP), nos Estados Unidos, estabelece que após 120 dias da aplicação de esterco cru no solo, pode-se utilizar desta área fertilizada para o cultivo de vegetais; INGHAM et al (2004) contestando o NOP, analisaram a contaminação de cenouras e alfaces de lavouras de áreas fertilizadas com esterco não-composto, e determinaram a presença de células de *E. coli* até 168 dias após a aplicação. AVERY et al. (2004) adubaram áreas com fezes de gado bovino, ovelha e porco contaminadas por *E. coli* O157 e conseguiram recuperar este patógeno em até 162 após a aplicação inicial, mas que a taxa de declínio foi maior e mais rápido nas fezes de porco contaminadas do que nas de gado bovino e ovelha.

É bem conhecido o fato que células STEC são difundidas nas fezes de animais e, conseqüentemente a aplicação de esterco não-tratado em culturas de vegetais, pode ser um risco para a transmissão de STEC para os alimentos (INGHAM et al., 2004). Grandes quantidades de dejetos de animais domésticos são utilizados na agricultura brasileira e, desta forma, pequenas reduções tanto na prevalência como na quantidade de agentes patogênicos reduziram significativamente o risco de disseminação de patógenos através da utilização de esterco.

Segundo AVERY et al. (2004), a sobrevivência do patógeno presente nas fezes bovina depositadas no solo é de fundamental preocupação para a saúde do meio ambiente, de um rebanho ou de uma cultura, uma vez que o patógeno pode infectar e re-infectar um animal ou um rebanho inteiro, através de contaminação externa pela água das chuvas, pode também potencializar a contaminação de uma hortaliça e até mesmo, contaminar um lençol d'água. Este risco de contaminação ficou melhor evidenciado no trabalho de MUKHERJEE et al. (2006), que descreveram um caso de um menino de 2 anos de idade por *E. coli* O157:H7 provenientes de fezes bovina distribuídas na grama do jardim de sua residência. Foi comprovado que o menino brincou neste jardim 1 dia após a colocação das fezes na grama. Os autores recuperaram a mesma cepa de O157:H7, encontrada no intestino do menino 4 dias após a infecção; no solo após 19 dias. Através de análises sucessivas, os autores demonstraram que a bactéria se manteve viável na grama por 70 dias, mantendo a sua patogenicidade, o que está de acordo com o tempo de 60 dias demonstrado neste trabalho (Tabela 2) para cepa não-O157 depositada diretamente na grama.

Os resultados obtidos neste trabalho receberam uma comparação adicional através do trabalho de FREMAUX et al. (2006-“in press”). Os autores descreveram a eliminação de cepas STEC não-O157 em sistema de compostagem em pilha (igual ao sobre o solo descrito neste trabalho), e os resultados obtidos indicaram a eliminação de STEC após 9 e 16 dias, respectivamente a 65 e 56°C, o que está próximo dos resultados aqui descritos.

## VI CONCLUSÕES

Foi demonstrado que a linhagem STEC não-O157 apresentando o gene *stx 2* pode sobreviver em um sistema de compostagem, por um período de 4 a 30 dias, dependendo da temperatura alcançada e, que este sistema pode ser uma boa alternativa para minimizar o risco de disseminação de patógenos em solos que sofreram adubação com esterco de origem animal.

O melhor sistema de compostagem para eliminação de *E. coli* apresentando o gene *stx2* foi o sobre o solo em forma de pirâmide, que após o sétimo dia não apresentava mais.

Concluimos também, que as fezes contendo *E. coli* apresentando o gene *stx2* podem ser viáveis no solo por um período de até 60 dias, sofrendo todas as variações climáticas ambiente, o que reforça a necessidade de cuidados especiais com o esterco, para evitar a contaminação do solo e disseminação de cepas patogênicas. A compostagem parece ser um processo rápido e eficiente de eliminação deste patógeno.



## VII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJARIYAHAJORN, C.; GOYAL, S.M.; ROBINSON R.A.; JOHNSTON, J.; CLANTON, C.A. The survival of *Salomonella anatum*, pseudorabies virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine slurry. **New Microbiology**, v.20, p.365-369, 1997.

ALVES, W.L. **Compostagem e vermicompostagem no tratamento de lixo urbano**. Jaboticabal: Funep, 1996.

AMORIM, A.C. Avaliação do potencial de impacto ambiental e do uso da compostagem e biodigestão anaeróbia na produção de caprinos. 2005. 129f. Tese (Doutorado em Produção Animal) – Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

AVERY, S.M.; MOORE, A.; HUTCHISON, M.L. Fate of *Escherichia coli* originating from livestock faeces deposited directly onto pasture. **Letters in applied Microbiology**, v.38, p.355-359, 2004.

BESSER, R.E.; LETT, S.M.; WEBER, J.T.; DOYLE, M.P.; BARRETT, T.J.; WELLS, J.G.; GRIFFIN, P.M. An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider. **JAMA**, v.269, p.2217-2220, 1993.

BETTELHEIM, K.A.; KUZEVSKI, A.; GILBERT, R.A.; KRAUSE, D.O.; MCSWEENEY, C.S. The diversity of *Escherichia coli* serotypes and biotypes in cattle faeces. **Journal of Applied Microbiology**, v.98, p.699-709, 2005.

BEUTIN, L.; GEIER, D.; STEINRUCK, H.; ZIMMERMAN, S.; SCHEUTZ, F. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, p.2483-2488, 1993.

BIER, O. **Microbiologia e Imunologia**, 24 ed. Melhoramentos, São Paulo, 1985.

BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; MORA, A.; DAHBI, G.; ALONSO, M.P.; GONZALEZ, E.A..BERNARDEZ, M.I.; BLANCO, J. Serotypes, virulence genes, and intimin types of shiga toxin (Verotoxin) – producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (eae  $\xi$ ). **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p.645-651, 2004.

BOERLIN, P.; MCEWEN, S.A.; BOERLIN-PETZOLD, F.; WILSON, J.B.; JOHNSON, R.P.; GYLES, R.P. Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. **Journal of Clinical Microbiology** v.37, p.497-503, 1999.

CAMPBELL, S. **Manual de compostagem para hortas e jardins**: como aproveitar bem o lixo orgânico doméstico. Tradução de Marcelo Jahnel. Ed. Nobel, São Paulo, 1999.

CARROL, E.J.; JASPER, D.E. Distribution of Enterobacteriaceae in recycled manure bedding on California dairies. **Journal of Dairy Science**, v.61, p.1498-1508, 1978.

CHALMERS, R.M.; AIRD, H.; BOLTON, F.J. Waterborne *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.124-132, 2000.

COBBOLD, R.; DESMARCHELIER, P. Characterization and clonal relationship of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) isolated from Australian dairy cattle. **Veterinary Microbiology**, v.79, p.323-335, 2001.

CORRÊA, M.G.P. **Análise microbiológica, sorológica e molecular de linhagens de *Escherichia coli* isoladas de leite obtido de vacas com mastite**. 2000. 93f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – FCAV, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2000.

CRAY JR, W.C. THOMAS, L.A., SCHNEIDER R.A., MOOM H.W. Virulence attributes of *Escherichia coli* isolated from dairy heifer feces. **Veterinary Microbiology**, v.53, p.369-374, 1996.

DEAN-NYSTROM, E.A.; GANSHEROFF, L.J.; MILLS, M.; MOON, H.W.; O'BRIEN, A.D. Vaccination of pregnant dams with intimin (O157) protects suckling piglets from *Escherichia coli* O157:H7 infection. **Infection and Immunity**, v.70, p.2414-2418, 2002.

DENG, M.Y.; CLIVER, D.O. Persistence of inoculated hepatitis A virus in mixed human and animal wastes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.87-91, 1995.

DEPORTES, I.; BENOIT-GUYOD, J.L.; ZMIROU, D.; BOUVIER, M.C. Microbial disinfection capacity of municipal solid waste (MSW) composting. **Journal of Applied Microbiology**, v.85, p.238-246, 1998.

DOYLE, M.P. *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in food. **International Journal of Food Microbiology**, v.12, p.289-302, 1991.

EGREJA FILHO, F.B.; PEREIRA NETO, J.T. Avaliação da ocorrência e distribuição química de metais pesados na compostagem do lixo domiciliar urbano. In: XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 1993, Natal, RN. Anais do XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 1993. v.3, p.39-57.

ELDER, R.O.; KEEL, J.E. Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing. **Proceedings of the National Academy Sciences USA**, v.97, p.2999-3003, 2000.

ELLIOTT, S.J., et al. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. **Molecular Microbiology**, v.28, p.1-4, 1998.

FENLON, D.R.; OGDEN, I.D.; VINTEN, A.; SVOBODA, I. The fate of *Escherichia coli* and *E. coli* O157 in cattle slurry after application to land. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.149-156, 2000.

FRANKEL, G., et al. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. **Molecular Microbiology**, v.30, p.911, 1998.

FREMAUX, B.; DELIGNETTE-MULLER, M.L.; PRIGENT-COMBARET, C.; GLEIZAL, A.; VERNIZY-ROZAND, C. Growth and survival of non-O157 Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in cow manure. **Journal of Applied Microbiology**, 2006, "in press".

FUKUSHIMA, H.; KEN, H.; GOMYODA, M. Long-term survival of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* O26, O11 and O157 in bovine feces. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.5177-5181, 1999.

GIRON, J.A.; JONES, T.; MILLAN-VELASCO, F.; CASTRO-MUNOZ, E.; ZARATE, L.; FRY, J.; FRANKEL, G.; MOSELEY, S.L.; BAUDRY, B.; KAPER, J.B. Diffuse-adhering *Escherichia coli* (DAEC) as a putative cause of diarrhea in Mayan children in Mexico. **Journal of Infectious Disease**, v.163, n.3, p.507-513, 1991.

GOODGER, W.J.; COLLINS, M.T.; NORDLUND, K.V.; EISELE, C.; PELLEWTIER, J.; THOMAS, C.B.; SOCKETT, D.C. Epidemiologic study of on-farm management practices associated with prevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* infections in dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.208, p.1877-1881, 1996.

GRIFFIN, P.M. ***Escherichia coli* O157:H7 and other enterohaemorrhagic *Escherichia coli***. In BLASER, M.J.; SMITH, P.D.; RAVDIN, J.I.; GREENBERG, H.B.; GUERRANT, R.L. *Infections of the Gastrointestinal Tract*. New York: Raven Press Ltd., 1995.

GROSSI, M.G. Avaliação da quantidade dos produtos obtidos de usinas de compostagem brasileira, de lixo doméstico através de determinação de metais pesados e substâncias orgânicas tóxicas. São Paulo, USP, Tese de Doutorado, 222p., 1993.

GUTH, B.E.C.; CHINEN, I.; MILIWEBSKY, E.; CERQUEIRA, A.M.F.; CHILLEMI, G.; ANDRADE, J.R.C.; BASCHKIER, A.; RIVAS, M. Serotypes and Shiga toxin genotypes among *Escherichia coli* isolated from animals and food in Argentina and Brazil. **Veterinary Microbiology**, v.92, p.335-349, 2003.

HACKER, J.; KAPER, J.B. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. **Annual Review of Microbiology**, v.54, p.641-679, 2000.

HARUTA, S.; NAKAYAMA, T.; NAKAMURA, K.; HEMMI, H.; ISHII, M.; IGARASHI, Y.; NISHINO, T. Microbial diversity in biodegradation and reutilization processes of garbage. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.99, p.1-11, 2005.

HUECK, C.J. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v.62, p.379-433, 1998.

INGHAM, S.C.; LOSINSKI, J.A.; ANDREWS, M.P.; BREUER, J.E.; BREUER, J.R.; WOOD, T.M.; WRIGHT, T.H. *Escherichia coli* contamination of vegetables grown in soils fertilized with noncomposted bovine manure: garden-scale studies. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.11, p.6420-6427, 2004.

IRINO, K.; KATO, M.A.M.F.; VAZ, T.M.I., RAMOS, I.I.; SOUZA, M.A.C.; CRUZ, H.S.; GOMES, T.A.T.; VIEIRA, M.A.M.; GUTH, B.E.C. Serotypes and virulence markers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from dairy cattle in São Paulo State, Brazil. **Veterinary Microbiology**, v.105, p.29-36, 2005.

ISHII, K.; FUKUL, M.; TAKIL, S. Microbial succession during a composting process as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis. **Journal of Applied Microbiology**, v.89, p.768-777, 2000.

JAWETS, E.; MELNICK, J.L.; ADELBERG, E.A. Bastonetes Gram-negativas e entéricos (enterobacteriaceae). In: BROOKS, G.F.; BUFEL, J.S.; MORSE, S.A. (edit.). **Microbiologia Médica**. 21ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, cap.16, p.175-184.

JENKINS, C.; CHART, H.; CHEASTY, T. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) other than serogroup O157 from Scottish cattle. **Veterinary Record**, v.15, p.58-60, 2002.

JENKINS, C., et al. Distribution of the *saa* Gene in Strains of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* of Human and Bovine Origins. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.1775-1778, 2003.

KAPPER, J.B.; RODRIGUES, J.; CARNEIRO-SAMPAIO, M.M.S.; TRABULSI, L.R. Proceedings of the intestinal Symposium on enteropathogenic *E. coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.2, p.15-38, 1995.

KARMALI, M.A.; PETRIC, M.; LIM, C.; FLEMING, P.C.; STEELE, B.T. *E. coli* cytotoxin, haemolytic-uraemic syndrome and haemorrhagic colitis. **Lancet**, p.1299-1300, 1983.

KARMALI, M.A. Infection by verocitotoxin-producing *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Review**, v.2, p.15-38, 1989.

KESKIMAKI, M.; EKLUND, M.; PESONEN, H.; HEISKANEN, T.; SIITONEN, A. The Study Group. EPEC, EAEC and STEC in stool specimens: prevalence and molecular epidemiology of isolates. **Diagnostic of Microbiology Infectious Disease**, v.40, p.151-156, 2001.

KIEHL, E.J. **Fertilizantes orgânicos**. Piracicaba: Agronômica Ceres Ltda, 1985.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; DOWELL JR., V.R.; SOMMERS, H.M. **Diagnóstico microbiológico**. Texto e atlas colorido. 2.ed., São Paulo, Editora Panamericana, 61-132, 1997.

KONOWALCHUC, J.; SPEIRS, J.L.; STAVRIC, S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, 1977.

KRISHNAN, C.; FITZGERALD, V.A.; DAKIN, S.J.; BEHME, R.J. Laboratory investigation of outbreak of hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, v.25, p.1043-1047, 1987.

KUDVA, I.T.; BLANCH, K.; HOVDE, C.J. Analysis of *Escherichia coli* O157:H7 survival in ovine or bovine manure and manure slurry. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.3166-3174, 1998.

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.

KUHNERT, P.; DUBOSSON, C.R.; ROESCH, M.; HOMFELD, E.; DOHERR, M.G.; BLUM, J.W. Prevalence and risk-factor analysis of Shiga toxigenic *Escherichia coli* in faecal samples of organically and conventionally farmed dairy cattle. **Veterinary Microbiology**, v.109, p.37-45, 2005.

LARNEY, F.J.; YANKE, L.J.; MILLER, J.J.; McALLISTER, T.A. Fate of coliform bacteria in composted beef cattle feedlot manure. **Journal of Environmental Quality**, v.32, p.1508-1515, 2003.

LAU, M.M.; INGHAM, S.C. Survival of faecal indicator bacteria in bovine incorporated into soil. **Letter and Applied Microbiology**, v.33, p.131-136, 2001.

LEVINE, M.M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. **Journal of Infectious Disease**, v.155, p.377-389, 1987.



LIRA, W.M.; MACEDO, C.; MARIN, J.M. The incidence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle with mastitis in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v.97, p.861-866, 2004.

McDANIEL, T.K.; JARVIS, K.G.; DONNENBERG, M.S.; KAPER, J.B. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.92, n.5, p.1664-1668, 1995.

McGEE, P.; BOLTON, D.J.; SHERIDAN, J.J.; EARLEY, B.; LEONARD, N. The survival of *Escherichia coli* O157:H7 in slurry from cattle fed different diets. **Letters in Applied Microbiology**, v.32, p.152-155, 2001.

MOON, H.W.; WHIPP, S.C.; ARGENZIO, R.A.; LEVINE, M.M.; GIANELLA, R.A. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *E. coli* in pig and rabbit intestines. **Infection and Immunity**, v.41, p.1340-1351, 1983.

MUKHERJEE, A.; CHO, S.; SCHEFTEL, J.; JAWAHIR, S.; SMITH, K.; DIEZ-GONZALES, F. Soil survival of *Escherichia coli* O157:H7 acquired by a child from garden soil recently fertilized with cattle manure. **Journal of Applied Microbiology**, v.101, p.429-436, 2006.

MURRAY, P.R. et al. **Enterobacteriaceae**. In: \_\_\_\_ Microbiologia Médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.193-203.

NAKAGAWA, J. **Compostagem**: obtenção e uso In: Encontro sobre Matéria Orgânica do Solo: problemas e soluções. Botucatu, 1992, p. 159-187, Guerrini, Iraê Amaral e Leonardo Theodoro, ed. Botucatu, Faculdade de Ciências Agrônômicas.

NAKAGAWA, J.; BÜLL, L.T.; PROCHNOW, L.I.; VILLAS-BOAS, R.L. Estudo de obtenção de compostos orgânicos com o uso de biofertilizantes. **Científica**, Série Agronomia, v.19, n.2, p.119-128, 1991.

NASCIMENTO, M.R.; STAMFORD, T.L.M. Incidência de *Escherichia coli*O157:H7 em alimentos. **Higiene Alimentar**, v.14, n.70, p.32-35, 2000.

NATARO, J.P.; DENG, Y.; MANEVAL, D.R.; GERMAN, A.L.; MARTIN, W.C.; LEVINE, M.M. Aggregative adherence fimbrial I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. **Infection and Immunity**, v.60, p.2297-2304, 1992.

NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Review**, v.11, p.142-201, 1998.

O'BRIEN, A.D.; LA VECK, G.D. Purification and characterization of a *Shigella dysenteriae* like toxin produced by *E. coli*. **Infection and Immunity**, v.40, p.675-683, 1983.

ORDEN, J.A., RUIZ-SANTA-QUITERIA, J.A.; CID, D.; GARCIA, S.; SANZ, R.; DE LA FUENTE, R. Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) and *eae*-positive non – VTEC in 1-30-days-old diarrhoeic dairy calves. **Veterinary Microbiology**, v.63, p.239-248, 1998.

PAIBA, G.A.; GIBBENS, J.C.; PASCOE, S.J.S. Faecal carriage of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in cattle and sheep at slaughter in Great Britain. **Veterinary Record**, v.150, p.593-598, 2002.

PEEL, A.N. Manure and microbes: public and animal health problem. **Journal of Dairy Sciences**, v.80, p.2673-2681, 1997.

PEREIRA NETO, J.T. **Manual de compostagem processo de baixo custo**. Belo Horizonte: UNICEF, 1996.

POITRINEAU, P.; FORESTIER, C.; MEYER, M.; JALLAT, C.; RICH, C.; MALPUECH, G.; DE CHAMPS, C. Retrospective case-control study of diffusely adhering *Escherichia coli* and clinical features in children with diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n.7, p.1961-1962, 1995.

RAHN, K.; RENWICK, S.A.; JOHNSON, R.P.; WILSON, J.B.; CLARKE, R.C.; ALVES, D.; McEWEN, S.; LIOR, H., SPIKA, J. Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy cattle and the dairy farm environment. **Epidemiology and Infection**, v.119, p.251-259, 1997.

RILEY, L.W.; REMIS, R.S.; HELGERSON, S.; McGEE, H.B.; WELLS, J.; DAVIS, B.; HEBERT, R.J.; OLCOTT, E.S.; JOHNSON, L.; HARGRETT, N.; BLAKE, P.A.; COHEN, M.L. Hemorrhagic colitis with a rare *Escherichia coli* serotype. **New England Journal of Medicine**, v.308, p.681-685, 1983.

RINK, R. **On-farm composting handbook**. Publ. NRAES-54. Northeast Regional Agric. Eng. Serv., Ithaca, N.Y., 1992.

SABRÁ, A. *Escherichia coli* subtypes EPEC, ETEC, EAEC, EHEC, EIEC and DAEC in acute diarrhea. **Jornal de Pediatria**, v.78, n.1, p.05-07, 2002.

SCOTLAND, S.M.; SMITH, H.R.; ROWE, B. Two distinct toxins active on vero cells from *Escherichia coli* O157. **Lancet**, p.885-886, 1985.

SERIWATANA, J.; ECHEVERRIA, P.; TAYLOR, D.N. Type II enterotoxin-producing *Escherichia coli* from animals and humans. **Infection and Immunity**, v.56, p.1158-1161, 1988.

SERVIN, A.L. Pathogenesis of Afa/Dr Diffusely adhering *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.18, n.2, p.264-292, 2005.

SILVA, C.H.P.M. **Bacteriologia um texto ilustrativo**. Teresópolis: Eventos, 1999. 531p.

SILVA, Z.N.; CUNHA, A.S.; LINS, M.C.; CARNEIRO, L.A.; ALMEIDA, A.C.F.; QUEIROZ, M.L.P. Isolation and serological identification of enteropathogenic *Escherichia coli* in pasteurized milk in Brazil. **Revista Saúde Pública**, p.375-379, 2001.

SOLOMON, E.B.; YARON, S.; MATTHEWS, K.R. Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.397-400, 2002.

STEVENS, M.P.; van DIEMEN, P.M; DZIVA, F.; JONES, P.W., WALLIS, T.S. Options for the control of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in ruminants. **Microbiology**, v.148, p.3767-3778, 2002.

STEVENS, M.P.; MARCHÉS, O.; CAMPBELL, J.; HUTER, V.; FRANKEL, G.; PHILLIPS, A.D.; OSWALD, E.; WALLIS, T.S. Intimim, Tir and Shiga toxin 1 do not influence enteropathogenic responses to Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in bovine ligated intestinal loops. **Infection and Immunity**, v.70, p.945-952, 2002b.

STROCKBINE, N.A.; JACKSON, M.P.; SUNG, L.M.; HOLMES, R.K.; O'BRIEN, A.D. Cloning and sequencing of the genes for Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* type 1. **Jornal of Bacteriology**, v.170, n.3, p.1116-1122, 1988.

SWERDLOW, D.L.; WOODRUFF, B.A.; BRADY, R.C.; GRIFFIN, P.M.; TIPPEN, S.; DONNELL, H.D.; GELDREICH, E.; PAYNE, B.J.; MEYHER JR, A. A water-borne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death. **Annals of Internal Medicine**, v.117, p.812-819, 1992.

TIQUIA, S.M.; WAN, J.H.C.; TAM, N.F.Y. Microbial population dynamics and enzyme activities during composting. **Compost Science and Utilization**, v.10, n.2, p.150-161, 2002.

TIQUIA, S.M.; ICHIDA, J.M.; KEENER, H.M.; ELWELL, D.L.; BURTT JR, E.H.; MICHAEL JR, F.C. Bacterial community profiles on during composting as determined by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of 16S rDNA genes. **Applied and Microbiology Biotechnology**, v.67, n.3, p.412-419, 2005.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N.; **Microbiologia**. 3ed., Editora Atheneu, Rio de Janeiro, 586p., 2002.

TURNER, C. The thermal inactivation of *Escherichia coli* in straw and pig manure. **Bioresource of Technology**, v.84, p.57-61, 2002.

US Environmental Protection Agency - Disponível em: <<http://www.epa.gov/epaoswer/non-hw/composting/index.htm>>. Acesso em 05 de agosto de 2006.

WANG, G.; ZHAO, T.; DOYLE, M.P. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine faces. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.7, p.2567-2570, 1996.

WANG, G.; DOYLE, M.P. Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in water. **Journal of Food Protection**, v.61, p.662-667, 1998.

WHO. **Prevention and control of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infections**. Geneva: WHO, 1997.

WIELER, L.H.; WIELER, E.; ERPESTEIN, C.; SCHLAPP, T.; STEINRÜCK, H. BAUERFEIND, R.; BYOMI, A.; BALJER, G. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from bovines: association of adhesion with carriage of *eae* and other genes. **Infection and Immunity**, v.34, p.2980-2984, 1996.

WILLIAMS, A.P.; AVERY, L.M.; KILLHAM, K.; JONES, D.L. Persistence of *Escherichia coli* O157 on farm surfaces under different environmental conditions. **Journal of Applied Microbiology**, v.98, p.1075-1083, 2005.