

ANÁLISE DO CRESCIMENTO DE MICOBACTÉRIAS E FUNGOS EM FLUÍDOS DE CORTE.

Rodolfo Thomé, Eduardo Carlos Bianchi, Olavo Speranza de Arruda, Paulo Roberto de Aguiar, Ellen Cristina Mella, Danielle Polito. – Engenharia Mecânica – Licenciatura Plena em Ciências Biológicas – Departamentos de Engenharia Mecânica e Ciências Biológicas – FE e FC, Campus de Bauru.

Fluídos de corte são compostos derivados de petróleo amplamente utilizados em indústrias como lubrificante e refrigerante em processos que envolvem usinagem. Seu uso dificulta que o calor gerado pelo atrito da peça com a ferramenta de corte danifique ambos. Além disso o óleo promove a retirada de resíduos do processo.

Por se tratar de um composto químico constituído de diversos anéis aromáticos e formas carboxílicas cuja composição é rica em matéria orgânica, esses óleos frequentemente são atacados por microrganismos os quais, através da liberação de seus metabólitos, diminuem gradativamente a qualidade e eficiência do fluido como lubrificante, podendo até provocar defeitos na peça e na bomba em contato com o reservatório onde é armazenado. Os microrganismos que contaminam o fluido são, em sua maioria, bactérias Gram-negativas. Estas utilizam as substâncias constituintes do produto para seu metabolismo, alterando as propriedades físico-químicas, o que acarreta instabilidade na emulsão e prejudica seu uso. Com isso, o descarte do óleo é torna-se necessário porem deve ser precedido de um processo oneroso de descontaminação por se tratar de agente poluente ambiental.

Com o intuito de aumentar a vida útil do produto, formulações biocidas têm sido adicionadas ao fluido. Esses aditivos geralmente são constituídos de formaldeído, substância que é letal à maioria das bactérias. No início do tratamento do óleo, ocorre uma diminuição significativa na população total de microrganismos, mas com o passar dos dias, novas espécies começam a aparecer. Esses novos indivíduos são resistentes à concentração do biocida utilizada. Estudos identificaram as novas espécies como pertencentes ao gênero *Mycobacterium*, e também a diversos outros gêneros de fungos como *Aspergillus*, *Candida* e *Cladosporum*.

O crescimento de micobactérias no fluido gera preocupação, pois entre representantes de suas espécies estão os causadores da tuberculose (*M. tuberculosis*) e de outras infecções bacterianas. Dentre os fungos pertencentes ao gênero *Candida*, estão os responsáveis pela candidíase (*C. albicans*), micose amplamente distribuída e que compromete mucosas e pele daqueles que entram em contato direto com o fungo.

Concomitantemente com o isolamento desses tipos de organismos, estão sendo feitas associações entre sua presença em fluidos contaminados e o aparecimento de doenças respiratórias, como a hipersensibilidade pulmonar (HP), nos operários expostos aos aerossóis formados durante a usinagem. Tendo em vista o fato de serem organismos potencialmente patogênicos, é necessário um acompanhamento de seu surgimento em fluidos, com o objetivo de ser feita uma análise bacteriológica de seu desenvolvimento.

Para a experimentação uma retificadora foi ligada por 45 dias, 8 horas por dia, mantendo o fluido de seu reservatório em constante movimentação. Amostras de 7 mL foram coletadas três dias por semana, sempre ao final das 8 horas em que a máquina permaneceu em operação. Mediu-se o pH, concentração e temperatura do fluido e do ambiente.

Cerca de 100 µL da amostra foram semeados em meio mycosel, para a análise do crescimento fúngico. Após, o tubo contendo o meio de cultura foi incubado a 37°C por cinco dias, que é o tempo necessário para que sejam visualizadas as primeiras hifas do organismo. Cumprido esse tempo os tubos passaram a ser armazenados em temperatura ambiente.

Quanto a análise do crescimento de micobactérias, cerca de 2mL da amostras sofreram um procedimento de descontaminação, para que o crescimento não fosse mascarado por outras espécies bacterianas. Esse procedimento consistia em submeter a amostra ao método de Petroff, que consiste no seguinte: em tubo cilíndrico, sobre os 2mL da amostras adicionar o mesmo volume da solução A. Após homogeneização, a mistura é incubada a 37°C por 15 minutos, e depois centrifugada a 2500 rpm por 15

minutos. O sobrenadante é retirado e a solução B é adicionada até que o 'pellet' adquira tonalidade amarelada. Então gotejar a solução C de modo que a amostra final possua uma coloração rosa claro. Dessa amostra retirar 100µL para posteriormente serem semeados em tubos contendo meio de cultura Lowstein-Jensen, próprio para micobactérias. Os tubos são incubados a 37°C por 30 dias, já que o crescimento desse tipo de bactéria é lento em relação aos demais.

No que se refere às bactérias não houve crescimento identificado, a não ser por Gram-negativas que não formam o alvo de estudo no projeto. Isso pode ser explicado pelo não uso de biocidas, pois bactérias competem entre si por substrato e quando o aditivo é colocado no ambiente ocorre uma seleção artificial com as micobactérias, as quais são resistentes a esses produtos devido à sua parede celular altamente hidrofóbica.

Quanto aos fungos, após cerca de dez dias, surgiram hifas macroscópicas sobre o meio de alguns tubos, numa próxima etapa será feita identificação dessas espécies. O aparecimento em poucos tubos corrobora o que consta na literatura, que alega haver apenas uma pequena concentração desses organismos no fluido total armazenado.

Esses resultados sugerem que sejam feitas novas investigações quanto ao crescimento de micobactérias e fungos, pois não há uma certeza no que concerne ao que causa a contaminação do fluido e o aparecimento desses organismos em especial. Autores divergem quanto à origem da contaminação, já que a higiene precária do trabalhador frente ao óleo pode ser um fator, e também o isolamento de bactérias na água utilizada para diluir o fluido pode ser outra fonte. Entretanto é razoável inferir que seja uma mistura desses fatores e também do tipo de óleo utilizado, que favorece o estabelecimento de diferentes microrganismos.

Referências Bibliográficas

Bernstein, D.I., Lummus, Z.L., Santilli, G., Siskosky, J., Bernstein, I.L. in **Machine Operator's Lung: A Hypersensitivity Disorder Associated With Exposure to Metalworking Fluid Aerosols**. CHEST, 106:636-641, 1995.

Bracker, A., Storey, E., Yang, C., Hodgson, M.J. in **An Outbreak of Hypersensitivity Pneumonitis at a Metalworking Plant: A Longitudinal Assessment of Intervention Effectiveness**. Applied Occupational and Environmental Hygiene, 18(2):96-108,2003.

Irani, R.A., Bauer, R.J., Warkentin, A. in **A Review of Cutting Fluid Application in the Grinding Process**. International Journal of Machine Tools & Manufacture, 45:1696-1705,2005.

Kennedy, S.M., Chan-Yeung, M., Teschke, K., Karlen, B. in **Change in Airway Responsiveness among Apprentices Exposed to Metalworking Fluids**. American Journal Respir Crit Care Med, 1559:87-93,1999.

Kreiss, K., Cox-Ganser, J. in **Metalworking Fluid-Associated Hypersensitivity Pneumonitis: A Workshop Summary**. American Journal of Industrial Medicine, 32:423-432, 1997.

Laitinen, S., Linnainmaa, M., Laitinen, J., Kiviranta, H., Reiman, M., Liesivuori, J. in **Endotoxins and IgG Antibodies as Indicators of Occupational Exposure to the Microbial Contaminants of Metalworking Fluids**. Int Arch Occup Environ Health, 72:443-450, 1999.

Moore, J.S., Christensen, M., Wilson, R.W., Wallace, R.J.Jr., Zhang, Y., Nash, D.R., Shelton, B. in **Mycobacterial Contamination of Metalworking Fluids: Involvement of a Possible New Taxon of Rapidly Growing Mycobacteria**. AIHAJ, 61 (2): 205-212,2000.

Rosenman, K.D., Reilly, M.J., Kalinowski, D. in **Work-Related Asthma and Respiratory Symptoms Among Workers Exposed to Metalworking Fluids**. American Journal of Industrial Medicine, 32:325-331, 1997.

Selvaraju, S.B., Khan, U.H., Yadav, J.S. in **Biocidal Activity of Formaldehyde and Nonformaldehyde Biocides Towards *Mycobacterium immunogenum* and *Pseudomonas fluorescens* in Pure and Mixed Suspensions in Synthetic Metalworking Fluid and Saline**. Applied and Environmental Microbiology, 71:542-546, 2005.

Shelton, B.G., Flanders, W.D., Morris, G.K. in ***Mycobacterium* sp. As a Possible Cause of Hypersensitivity Pneumonitis in Machine Workers**. Emerging Infectious Diseases, 5:270-273, 1999.

Skerlos, S.J., Skerlos, L.A., Aguilar, C.A., Zhao, F. in **Expeditious Identification and Quantification of Mycobacteria Species in Metalworking Fluids Using Peptide Nucleic Acid Probes**. Journal of Manufacturing Systems, 22(2):136-147, 2003.

Veillette, M., Thorne, P.S., Gordon, T., Duchaine, C. in **Six Month Tracking of Microbial Growth in a Metalworking Fluid After System Cleaning and Recharging**. Ann Occup Hyg, 48(6): 541-546, 2004.

Wallace Jr., R.J., Zhang, Y., Wilson, R.W., Mann, L., Rossmore, H. in **Presence of a Single Genotype of the Newly Described Species *Mycobacterium immunogenum* in Industrial Metalworking Fluids Associated with Hypersensitivity Pneumonitis**. Applied and Environmental Microbiology, 68:5580-5584, 2002.

Wang, H.X., Reponem, T., Adhikari, A., Willeke, K., Grinshpun, S.A. in **Effect of Fluid Type and Microbial Properties on the Aerosolization of Microorganisms from Metalworking Fluids**. Aerosol Science and Technology, 38:1139-1148, 2004.

Woskie, S.R., Virji, M.A., Hallock, M., Smith, T.J., Hammond, S.K. in **Summary of the Findings from the Exposure Assessments for Metalworking Fluid Mortality and Morbidity Studies**. Applied Occupational and Environmental Hygiene, 18:855-864, 2003.

Bolsa: CNPq/PIBIC