

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

***Clostridium botulinum* em sedimentos lacustres e
peixes de aquicultura, alternativas no seu isolamento e
identificação e desenvolvimento em filés de tilápia
(*Oreochromis niloticus*) refrigerados**

PARECER

Este exemplar corresponde à
redação final da tese defendida por
**Valéria Christina Amstalden
Junqueira**, aprovado pela
Comissão Julgadora em 14 de maio
de 2002.

Valéria Christina Amstalden Junqueira

Campinas, 14 de maio de 2002

Orientador: Prof. Dr. Mauro Faber de Freitas Leitão


Prof. Dr. Mauro Faber de Freitas Leitão
Presidente da Banca

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, para
obtenção do título de Doutor em Tecnologia de Alimentos

Campinas, SP
2002

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE Be
Nº CHAMADA T/UNICAMP
J968c
V _____ EX _____
TOMBO BCI 49729
PROC 16-873102
C _____ D^x _____
PREÇO R\$ 11,00
DATA 18/06/02
Nº CPD _____

CM00169245-1

BIB ID 244902

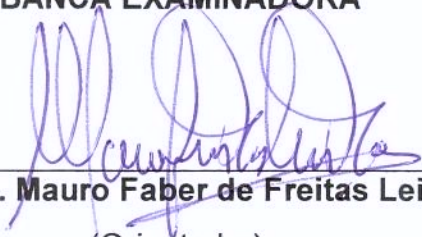
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

J968c Junqueira, Valéria Christina Amstalden
Clostridium botulinum em sedimentos lacustres e peixes de
aqüicultura, alternativas no seu isolamento e identificação e
desenvolvimento em filés de tilápia (*Oreochromis niloticus*)
refrigerados / Valéria Christina Amstalden Junqueira. –
Campinas, SP: [s.n.], 2002.

Orientador: Mauro Faber de Freitas Leitão
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos

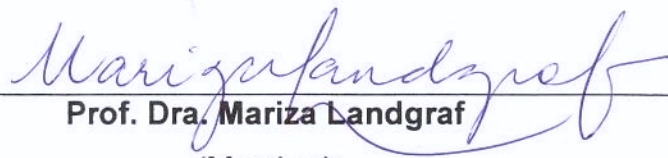
1.*Clostridium botulinum*. 2.Peixes. 3.Métodos.
4.Conservação. I.Leitão, Mauro Faber de Freitas.
II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia
de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA



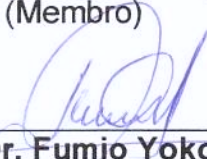
Prof. Dr. Mauro Faber de Freitas Leitão

(Orientador)



Prof. Dra. Mariza Landgraf

(Membro)



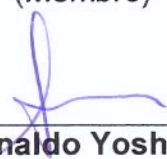
Prof. Dr. Fumio Yokoya

(Membro)



Dr. Flávio Luís Schmidt

(Membro)



Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye

(Membro)

Prof. Dr. José Luiz Pereira

(Membro)

Prof. Dr. Marcelo Cristianini

(Membro)

2722931

Dedico

- **Aos meus pais e irmãos**
- **Às minhas filhas, Cecilia e Helena**
- **Ao meu marido, Lourival**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo o que tenho recebido.

Ao Prof. Dr. Mauro Faber de Freitas Leitão, pela orientação segura e sempre disponível.

In memoriam Prof. Dr. Antônio de Melo Serrano, pelo estímulo no trabalho com bactérias anaeróbias em alimentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro no desenvolvimento experimental deste trabalho.

Ao Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), pela dispensa em período parcial e pelo auxílio nas viagens para coleta de amostras.

Às empresas Gerbi Pescados, Purac, Cryovac e White Martins pela doação dos respectivos produtos.

À Biolab Mérieux, pelo empréstimo do equipamento “mini API” para leitura automática do sistema “Rapid ID32A”.

Aos piscicultores Sr. Rui Paim Cunha, Sr. José Fausto Campregher, Sr. Luís Bertos, Sr. Cláudio Bertos e Dr. Elson Luiz de Queiroz, ao Dr. Geraldo Bernardino, diretor do Centro de Pesquisa e Treinamento em Aquicultura (CEPTA) de Pirassununga, aos pesquisadores do Instituto de Pesca, núcleos de Pirassununga, São Paulo, Pindamonhangaba e Campos do Jordão, pela doação dos peixes e aos respectivos funcionários, pelo auxílio nas coletas.

Ao Dr. Alcides Ribeiro Teixeira Filho, pesquisador científico do Instituto de Pesca, pela colaboração no trabalho “Ocorrência de *C. botulinum* no trato intestinal de peixes fluviais e lacustres e em sedimentos de tanques de criação”, que compõe esta tese.

Ao Dr. Expedito Tadeu Facco Silveira, pesquisador científico do Centro de Tecnologia de Carnes (CTC) do ITAL e aos funcionários e estagiários deste CTC, pela colaboração e auxílio técnico no trabalho “Desenvolvimento de *C. botulinum* em filés de tilápia armazenados em diferentes atmosferas e temperaturas e influência do lactato de sódio na inibição do microrganismo”, que compõe esta tese.

Às amigas e colegas Dirce Yorika Kabuki e Maria Raquel Manhani, à D. Jacinta Rodrigues de Oliveira Franco e às estagiárias Cláudia Aoki e Juliana Hirata Terra, pelo auxílio na parte experimental deste trabalho.

Aos meus colegas, pesquisadores e funcionários do Laboratório de Microbiologia do ITAL, pela compreensão e apoio na realização deste trabalho.

Aos motoristas do ITAL que me acompanharam nas viagens, principalmente ao Sr. José Araújo Vieira Filho, pelo apoio nas coletas das amostras de peixes e pela condução segura dos veículos.

À Banca Examinadora, pela doação do tempo e conhecimentos para avaliação deste trabalho.

Às Sras. Maria Vicente de Carvalho e Iracema Gonçalves Siqueira, pelo trabalho dispensado em minha casa, principalmente pelo carinho com minhas filhas.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente cooperaram para a realização desta tese.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS.....	IX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
RESUMO.....	1
SUMMARY.....	2
1. INTRODUÇÃO.....	3
2. OBJETIVOS.....	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1. Caracterização do <i>Clostridium botulinum</i>	5
3.2. Manifestações clínicas do botulismo.....	11
3.3. Isolamento e identificação do <i>Clostridium botulinum</i>	12
3.4. Hábitat e epidemiologia do <i>Clostridium botulinum</i>	16
3.5. Ação da embalagem em atmosfera modificada sobre <i>Clostridium botulinum</i>	21
3.6. Ação do lactato de sódio sob o <i>Clostridium botulinum</i>	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1. Otimização de meio seletivo e de diferenciação para isolamento e contagem de <i>Clostridium botulinum</i>	23

4.2. Ocorrência de <i>Clostridium botulinum</i> no trato intestinal de peixes fluviais e lacustres e em sedimentos de tanques de criação.....	24
4.3. Isolamento e identificação de <i>Clostridium botulinum</i>	28
4.4. Desenvolvimento de <i>Clostridium botulinum</i> em filés de tilápia armazenados em diferentes atmosferas e temperaturas e influência do lactato de sódio na inibição do microrganismo.....	31
4.4.1. Preparo dos filés de tilápia.....	31
4.4.2. Produção dos esporos, inoculação dos filés e procedimento experimental.....	31
4.4.3. Análises físico-químicas e microbiológicas efetuadas nos filés de tilápia.....	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1. Otimização de meio seletivo e de diferenciação para contagem de <i>Clostridium botulinum</i>	35
5.2. Ocorrência de <i>Clostridium botulinum</i> no trato intestinal de peixes fluviais e lacustres e em sedimentos de tanques de criação.....	40
5.3. Avaliação da eficiência dos métodos alternativos para o isolamento e identificação bioquímica de <i>Clostridium botulinum</i>	44
5.4. Desenvolvimento de <i>Clostridium botulinum</i> em filés de tilápia armazenados em diferentes atmosferas e temperaturas e influência do lactato de sódio na inibição do microrganismo.....	49
6. CONCLUSÕES.....	56
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Toxinas de <i>Clostridium botulinum</i>	6
Tabela 2. Algumas características bioquímicas de <i>Clostridium botulinum</i>	8
Tabela 3. Fatores intrínsecos e extrínsecos afetando o desenvolvimento de <i>Clostridium botulinum</i> tipos A, B e E.....	10
Tabela 4. Ocorrência de <i>Clostridium botulinum</i> em peixes de águas fluviais e lacustres.....	19
Tabela 5. Peixes e seus derivados envolvidos em surtos de botulismo.....	20
Tabela 6. Origem das culturas de referência.....	23
Tabela 7. Coleta de amostras de peixes e sedimentos de tanques de criação em diferentes localidades do Estado de São Paulo.....	25
Tabela 8. Resultados gerais da ocorrência de <i>C. botulinum</i> em vísceras de peixes fluviais e lacustres.....	42
Tabela 9. Resultados gerais da ocorrência de <i>C. botulinum</i> em sedimentos de tanques de criação de peixes.....	43
Tabela 10. Resumo dos resultados de amostras positivas para <i>C. botulinum</i>	44
Tabela 11. Identificação bioquímica das culturas presuntivamente típicas de <i>Clostridium botulinum</i> com base em características culturais.....	45

Tabela 12. Resumo dos resultados de identificação de 72 culturas presuntivas de <i>C. botulinum</i> com base em testes bioquímicos rápidos (Sistema Rapid ID32A).....	48
Tabela 13. Resultados das análises microbiológicas e físico-químicas iniciais nos filés de tilápia utilizados nos experimentos.....	50
Tabela 14. Resultados das determinações microbiológicas e físico-químicas nos filés de tilápia estocados à temperatura de 4°C.....	51
Tabela 15. Resultados das determinações microbiológicas e físico-químicas nos filés de tilápia estocados à temperatura de 12°C.....	51
Tabela 16. Produção de toxina botulínica em filés de tilápia estocados a 4°C e 12°C.....	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Leitura automática do sistema “Rapid ID32A” para identificação de bactérias anaeróbias.....	29
Figura 2. Análise quantitativa e qualitativa de <i>Clostridium botulinum</i> em pescados e sedimentos fluviais e lacustres.....	30
Figura 3. Efeito do tratamento com lactato de sódio e da embalagem em atmosfera modificada na toxigênese de <i>Clostridium botulinum</i> em filés de tilápia estocados em diferentes temperaturas de refrigeração.....	34
Figura 4. Colônias de <i>Clostridium botulinum</i> tipo A em ágar TPGY adicionado de púrpura de bromocresol e gema de ovo.....	37
Figura 5. Colônias de <i>Clostridium botulinum</i> tipo B em ágar TPGY adicionado de púrpura de bromocresol e gema de ovo.....	37
Figura 6. Colônias de <i>Clostridium botulinum</i> tipo E em ágar TPGY adicionado de púrpura de bromocresol e gema de ovo.....	38
Figura 7. Colônias de <i>Clostridium perfringens</i> em ágar TPGY adicionado de púrpura de bromocresol e gema de ovo.....	38
Figura 8. Colônias de <i>Clostridium sporogenes</i> em ágar TPGY adicionado de púrpura de bromocresol e gema de ovo.....	39

RESUMO

JUNQUEIRA, V. C. A., LEITÃO, M. F. F. ***Clostridium botulinum* em sedimentos lacustres e peixes de aquicultura, alternativas no seu isolamento e identificação e desenvolvimento em filés de tilápia (*Oreochromis niloticus*) refrigerados**. Campinas: FEA, UNICAMP, 2002. Tese (Doutorado) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2002. 65p.

Nesta pesquisa procurou-se avaliar a validade e adequacidade de métodos alternativos aplicados no isolamento e identificação de *Clostridium botulinum*, a ocorrência do mesmo em sedimentos lacustres e em peixes de aquicultura e a influência da temperatura, composição da atmosfera na embalagem e do lactato de sódio no desenvolvimento de esporos desta bactéria, inoculados experimentalmente em filés de tilápia. Os estudos efetuados permitiram otimizar o meio de Ágar Trypticase Glicose Extrato de Levedura para contagem em placas pela técnica de inoculação em profundidade, permitindo uma diferenciação na triagem inicial, podendo também ser utilizado adicionado dos antibióticos cicloserina, sulfametoxazole e trimethoprim, tornando-se seletivo para contagem preliminar de cepas proteolíticas da bactéria. Para avaliação da ocorrência de *C. botulinum*, foram analisadas um total de 200 amostras de vísceras de peixes e 100 amostras de sedimentos de tanques de criação através das técnicas de Número Mais Provável (NMP) e de contagem em placas por inoculação em profundidade, indicando ocorrência de 1% e 8%, respectivamente, constatando-se apenas a presença de cepas dos tipos C e E da bactéria. Em termos quantitativos, as populações de *C. botulinum* verificadas nas amostras positivas de vísceras e sedimentos foram muito reduzidas, na faixa de 0,01 a 0,05NMP/g. Os filés de tilápia inoculados experimentalmente com esporos de *C. botulinum* não se apresentaram tóxicos após armazenamento a 4°C durante 45 dias, em atmosfera modificada com ou sem tratamento com lactato. No entanto, pela elevação da temperatura para 12°C a toxicidade foi comprovada, independentemente do uso de outros obstáculos como o lactato de sódio ou a atmosfera modificada.

SUMMARY

***Clostridium botulinum* in lake sediments and farmed fish, alternatives for isolation and identification and its development in refrigerated tilapia (*Oreochromis niloticus*) fillets.**

In this research we aim to evaluate the validity and adequacy of alternative methods applied to the isolation and identification of *Clostridium botulinum*, its occurrence in lake sediments and farmed fish and the influence of temperature, atmospheric composition on the packaging and of sodium lactate in the development of its spores inoculated experimentally in tilapia fillets. The studies carried out led to the optimization of the Agar Trypticase Peptone Glucose Yeast Extract for pour-plate counting allowing for a preliminary differentiation as well as being able to be utilized when the antibiotics cicloserine, sulfamethoxazole and trimethoprim are added, becoming selective for preliminary counting of proteolytic strains of the bacteria. To evaluate the occurrence of *C. botulinum*, a total of 200 fish gut samples and 100 samples of sediment from fish farm tanks were analyzed by the Most Probable Number (MPN) and by pour-plate techniques, indicating levels of 1% and 8%, respectively, and showing only the presence of the C and E *C. botulinum* types. In quantitative terms, the population of *C. botulinum* verified in the positive gut and sediment samples was very low, around 0.01 to 0.05 MPN/g. The tilapia fillets experimentally inoculated with *C. botulinum* spores did not become toxic after storage at 4°C for 45 days in modified atmosphere packaging with or without lactate treatment. However, when the temperature was increased to 12°C the toxicity was proven independently of the use of other barriers such as sodium lactate and modified atmosphere.

1. INTRODUÇÃO

Clostridium botulinum é a designação taxonômica da bactéria anaeróbia esporogênica, em forma de bastonete, Gram positiva, catalase negativa, produtora de uma potente toxina que atua principalmente sobre o sistema nervoso periférico, causando manifestações clínicas que incluem principalmente distúrbios neuromusculares e digestivos.

O botulismo, causado pela ingestão de alimento contendo a toxina botulínica pré-formada, está entre as doenças de origem alimentar de maior gravidade que se conhece, uma vez que determina uma alta taxa de mortalidade.

Sabe-se que o *C. botulinum* possui como hábitat natural o solo e os sedimentos aquáticos. A partir deste hábitat ele pode contaminar tanto os alimentos de origem vegetal como também os de origem animal. Geralmente os alimentos envolvidos em surtos de botulismo são conservas caseiras de vegetais, embutidos cárneos, presunto, peixe defumado e fermentado (Banwart, 1979, Hauschild, 1989).

A ocorrência do *C. botulinum* no ambiente natural tem sido intensivamente avaliada nos Estados Unidos e em países europeus e asiáticos. No Brasil, raros são os relatos da ocorrência de tipos patogênicos ao homem no ambiente natural, podendo-se mencionar a pesquisa realizada por Ward et al. (1967), que constatarem sua ocorrência em sedimentos de açudes no Ceará. Além disso, Delazari et al. (1981/1982) relataram a positividade desta bactéria em pescados marinhos. Também Leitão & Delazari (1983) detectaram *C. botulinum* em amostras de solo do Estado de São Paulo.

Em face à importância de um melhor conhecimento sobre a distribuição do *C. botulinum* no ambiente natural, decidiu-se pela realização da presente pesquisa, visando avaliar a ocorrência do mesmo em sedimentos e pescado de origem fluvial e lacustre, no Estado de São Paulo.

Além disso, no âmbito deste trabalho foram avaliados alguns métodos para o isolamento, diferenciação, contagem e identificação da bactéria, que seriam alternativas ou complementos à metodologia clássica de ensaios biológicos com camundongos. Finalmente, estudamos o efeito de algumas técnicas de conservação e processamento no eventual desenvolvimento ou inibição da bactéria, inoculada experimentalmente em filés de tilápia.

2. OBJETIVOS

A presente pesquisa foi desenvolvida com os seguintes objetivos:

2.1. Avaliar a validade e adequacidade de métodos alternativos aplicados ao isolamento e identificação da bactéria.

2.2. Estudar a ocorrência de *Clostridium botulinum* em sedimentos de tanques de criação e nas vísceras de algumas espécies de peixes criados comercialmente e de origem fluvial ou lacustre, procurando avaliar a influência do habitat na prevalência de tipos específicos.

2.3. Estudar a influência da temperatura, composição da atmosfera e do lactato de sódio no desenvolvimento de *C. botulinum* inoculado experimentalmente em filés de tilápia.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Caracterização do *Clostridium botulinum*

Clostridium botulinum é uma bactéria anaeróbia esporogênica, Gram positiva, em forma de bastonete reto ou ligeiramente curvo. Os esporos são ovais, o esporângio é dilatado e geralmente subterminal. A bactéria é móvel por flagelos peritricos, sendo observada ao microscópio usualmente isolada e menos freqüentemente aos pares ou em cadeias curtas (Sneath et al., 1986).

A espécie inclui sete tipos, A, B, C, D, E, F e G, diferenciados com base em características fisiológicas e bioquímicas e principalmente pela especificidade antigênica de suas toxinas. As toxinas produzidas pelos vários tipos de *C. botulinum* são proteínas termolábeis, sorologicamente distintas, porém com efeitos sintomáticos similares (Sneath et al., 1986).

Os tipos A, B e E de *C. botulinum* têm causado a maioria dos casos de botulismo em humanos, enquanto os tipos C e D são mais freqüentemente envolvidos em botulismo de outros mamíferos e aves (Smith, 1977, Eklund, 1982). O tipo F foi implicado em apenas dois surtos de botulismo no homem e o tipo G ainda não foi reconhecido em casos de botulismo (Hauschild, 1989). Contudo, o microrganismo e a toxina tipo G foram identificados em material de autópsia, a partir de cinco casos de morte súbita de pacientes acometidos por outras doenças (Sonnabend et al., 1981).

As toxinas botulínicas são designadas de forma correspondente aos tipos das cepas de *C. botulinum* que as produzem. Uma vez que a maioria das cepas produz apenas um tipo de toxina, esta forma de classificação tem-se mostrado prática. Porém, este procedimento não é correto já que o tipo C de *C. botulinum* é subdividido em subtipos C α e C β , desde 1924. As cepas C α produzem três tipos de toxina, C₁, C₂ e D, e as cepas C β produzem somente toxinas C₂. Quanto às cepas do tipo D, elas produzem toxinas D, C₁ e C₂ (Smith, 1977). Assim, Sugiyama (1980) reconhece oito tipos de toxinas A, B, C₁, C₂, D, E, F e G,

considerando que as toxinas C_1 e C_2 são completamente diferentes quanto à especificidade sorológica. Os autores que ainda se referem a sete tipos de toxina consideram C_1 e C_2 como subtipos de toxina.

Hauschild (1989), numa revisão, correlaciona os tipos e subtipos mencionados de *C. botulinum* da forma exposta na Tabela 1 e as toxinas em maiores e menores, de acordo com as quantidades produzidas.

TABELA 1. Toxinas de *Clostridium botulinum*.

Tipos	Subtipos	Toxinas	
		Maiores	Menores
A	-	A	-
	AB	A	B
	AF	A	F
B	-	B	-
	BA	B	A
	BF	B	F
C	(C α)	C_1	C_2 , D
	(C β)	-	C_2
D	-	D	C_1 , C_2
E	-	E	-
F	-	F	-
G	-	G	-

Fonte: Hauschild (1989).

O agrupamento dos tipos de *C. botulinum*, com base nas características metabólicas, foi introduzido por Holdeman & Brooks (1970), para os tipos de A a F, até então reconhecidos. Estes grupos permaneceram dispostos da forma que se segue:

Grupo I - inclui todas as cepas do tipo A e as cepas proteolíticas dos tipos B e F; fermentam alguns carboidratos (Tabela 2).

Grupo II - inclui todas as cepas do tipo E e as cepas não-proteolíticas dos tipos B e F; são fortemente sacarolíticos, fermentando açúcares com grande produção de gases.

Grupo III - inclui todas as cepas dos tipos C e D, as quais podem ser fracamente ou não-proteolíticas.

Smith & Hobbs (1974) incluíram o tipo G em um quarto grupo separado:

Grupo IV - que inclui todas as cepas do tipo G, proteolíticas, mas que não fermentam carboidratos.

O termo proteolítico refere-se à capacidade de digerir a caseína, as proteínas da carne, do ovo coagulado e do soro sanguíneo, mas não à hidrólise de gelatina ou de outras proteínas modificadas, que as cepas não-proteolíticas também conseguem hidrolisar (Sneath et al., 1986).

Algumas toxinas botulínicas, em particular aquelas produzidas pelas cepas não-proteolíticas, requerem ativação "in vitro" com proteases, tais como a tripsina, para efetividade no teste biológico de detecção de toxina. Essa ativação ocorre naturalmente durante a passagem do alimento contaminado pelo estômago da vítima (Center for Disease Control - CDC, 1979).

Na Tabela 2 são citadas algumas características bioquímicas dos quatro grupos de *C. botulinum*, anteriormente referidos.

TABELA 2. Algumas características bioquímicas de *Clostridium botulinum*.

Características	Grupos			
	I	II	III	IV
Digestão de proteínas	+	-	-*	+
Hidrólise de gelatina	+	+	+	+
Fermentação de:				
- glicose	+	+	+	-
- manose	-	+	+	-
- frutose	-*	+	v	-
- sacarose	-	+	-	-
- lactose	-	-	-	-
Produção de:				
- urease	-	-	-	-
- lipase	+	+	+	-
- lecitinase	-	-	-*	-
- indol	-	-	-*	-
Redução de nitrato	-	-	-	-

Símbolos: + = reação positiva; - = reação negativa; v = reação variável; * = reação positiva fraca em algumas cepas.

Fonte: Holdeman et al. (1977), Sneath et al.(1986)

A determinação, por cromatografia gasosa, dos produtos da fermentação dos carboidratos em caldo Peptona Extrato de Levedura Glicose (PYG) permite confirmar a divisão estabelecida nos quatro grupos metabólicos de *C. botulinum* (Holdeman et al., 1977, Sneath et al., 1986). São detectados, de modo geral, no Grupo I grandes quantidades dos ácidos acético e butírico, quantidades moderadas dos ácidos isobutírico, isovalérico e propiônico e traços dos ácidos isocapróico e valérico; no Grupo II, apenas os ácidos acético e butírico; no Grupo III, adicionalmente aos ácidos acético e butírico, aparece em grande quantidade o ácido propiônico; no Grupo IV, o ácido acético é detectado em grande quantidade e os ácidos butírico, isobutírico e isovalérico em quantidades moderadas.

O conteúdo de guanina e citosina (G + C) no ácido desoxiribonucléico (ADN), de acordo com Sneath et al. (1986) também indica homologia entre os tipos de *C. botulinum* dispostos naqueles grupos descritos. Nos grupos I e III, o conteúdo de G + C é de 26-28 mol%; no grupo II é de 27-29 mol% (Sneath et al., 1986) e no grupo IV de 28-30 mol% (Suen et al., 1988).

Com o objetivo de demonstrar os principais fatores que afetam o desenvolvimento e a multiplicação do *C. botulinum*, foi elaborada a Tabela 3, a partir de dados citados por Leistner (1986), Hauschild (1989) e pela International Association of Milk, Food and Environmental Sanitarians - IAMFES (1991).

TABELA 3. Fatores intrínsecos e extrínsecos afetando o desenvolvimento de *Clostridium botulinum* tipos A, B e E.

Fatores	Tipos de <i>C. botulinum</i>	
	A e B	E e B
	proteolíticos	não-proteolíticos
pH:		
mínimo	4,8	5,0
ótimo	7,0	7,0
máximo	8,5	8,5
Atividade de água (Aa) mínima (NaCl como soluto)	0,94	0,97
Temperatura (°C):		
mínima	10	3
ótima	37	30
máxima	50	45
Concentração máxima de NaCl (%)	10	5
Concentração máxima (a pH 6) de NaNO ₂ (mg/kg)	300	200
Tratamento térmico (esporos):		
D _{100°C} (minutos)	25	0,1

Fonte: Leistner (1986), Hauschild (1989) e IAMFES (1991)

Apesar das marcantes diferenças entre os quatro grupos descritos, tem-se conservado o *C. botulinum* em uma só espécie devido à ação similar que as toxinas produzidas pelos diversos tipos provocam nos animais. Contudo, em 1988, a criação de uma nova espécie para o gênero *Clostridium* foi proposta por Suen et al. (1988), denominando *Clostridium argentinense* sp. nov. todas as cepas de *C.*

botulinum produtoras de toxina tipo G incluídas no grupo IV. Com o descobrimento de cepas de *Clostridium barati* (Hall et al., 1985) e de *C. butyricum* (McCroskey et al., 1986) produtoras de toxinas botulínicas tipos F e E, respectivamente, toda a classificação deverá ser revista.

3.2. Manifestações clínicas do botulismo

O botulismo de origem alimentar provavelmente tem ocorrido desde que o homem vem tentando conservar alimentos para consumo posterior. No século XVIII, na Europa Central, essa doença era associada ao consumo de embutidos, principalmente de sangue ou fígado, daí foi introduzido o termo botulismo, do latim "botulus", que significa embutido, para denominar a doença (Dolman, 1964; Smith, 1977). Em 1943, outra categoria de botulismo foi reconhecida nos Estados Unidos da América (CDC, 1979), o botulismo de feridas, consequência da formação de toxina em uma lesão infeccionada, após a multiplicação do *C. botulinum*. Mais tarde, em 1976, foi reconhecida uma terceira categoria, o botulismo infantil, resultante da absorção da toxina botulínica "in vivo" no trato intestinal de crianças, geralmente com idade inferior a um ano, após a ingestão de esporos e multiplicação da bactéria no intestino infantil (CDC, 1979). Nas três categorias da doença, a toxina botulínica atua sobre o sistema nervoso periférico ao bloquear a passagem do estímulo nos terminais dos nervos, causando principalmente distúrbios neuromusculares. Os sintomas mais freqüentes desta intoxicação são: diplopia, fotofobia, disfagia, cansaço generalizado, disfonia e vertigens. Náuseas, vômitos, dores abdominais e diarreia às vezes precedem o início dos sintomas neurológicos quando a intoxicação tem origem alimentar; porém, a constipação é comum à medida que o envolvimento neurológico progride. Como principais sinais de botulismo observam-se dificuldade respiratória, fraqueza muscular ou paralisia, ataxia, pupilas fixas e dilatadas e ptose das pálpebras. As membranas mucosas da boca, língua e faringe apresentam-se freqüentemente secas. O sistema nervoso central não é afetado e o processo mental permanece normal. A ausência de febre é característica, a menos que complicações, devido a algum tipo de infecção, venham a se desenvolver. A pulsação do paciente geralmente é normal

ou mais lenta, mas pode ocorrer taquicardia devido ao desenvolvimento de hipotensão. À medida que a doença progride, ocorre maior dificuldade respiratória, sendo que a principal causa de morte por botulismo é decorrente da parada respiratória (CDC, 1979, Sakaguchi, 1979, Sugiyama, 1980).

O aparecimento dos sintomas e sinais de botulismo pode ocorrer em poucas horas ou tão tarde quanto oito dias após a ingestão do alimento contaminado com a toxina. O período normal de incubação da doença é de 18 a 36 horas. Geralmente, os pacientes apresentando período de incubação mais curto são afetados mais severamente e, mais comumente, são os que morrem; os que sobrevivem desenvolvem uma recuperação mais prolongada (CDC, 1979).

3.3. Isolamento e Identificação de *Clostridium botulinum*

O diagnóstico do botulismo de origem alimentar é geralmente confirmado quando, em adição aos sintomas clínicos característicos deste tipo de intoxicação, a toxina botulínica e/ou *C. botulinum* viável são detectados em amostras do alimento suspeito ou em amostras clínicas do paciente ou em ambos (CDC, 1979). As amostras clínicas podem constituir-se de soro sanguíneo, fezes, vômito, conteúdo gástrico, líquido de enemas e porções de intestinos delgado, grosso e fígado, em casos de morte do paciente e autópsia. Com exceção do soro, as demais amostras também podem ser utilizadas para detecção da bactéria.

Em casos de botulismo infantil, Hatheway & McCroskey (1981) relataram que as fezes são as amostras que mais comumente contêm *C. botulinum* viável e/ou sua toxina. Amostras de soro raramente têm se apresentado positivas para toxina, nestes casos.

A detecção de toxina botulínica é, geralmente, feita por meio do ensaio biológico em camundongos. Este teste baseia-se na ação letal da toxina em camundongos e na sua neutralização com antitoxina específica e permite detectar menos que 0,1 micrograma de toxina (Sakaguchi, 1979). O procedimento básico inclui a injeção intraperitoneal de camundongos fêmeas, tipo "Swiss", pesando de

20-30g, com amostras líquidas ou extratos de amostras sólidas, com e sem antitoxina específica (CDC, 1979). Os extratos são preparados homogeneizando-se a amostra com igual quantidade de solução tampão ligeiramente ácida, tal como fosfato-gelatina pH 6,6 (Bowmer, 1963). O extrato é então separado por centrifugação a 12.000xg, durante 20 minutos, sob refrigeração (4°C) e, quando necessário, filtrado em membrana de 0,45µm, para evitar infecções no camundongo. Em adição à filtração, as infecções no camundongo também podem ser controladas com 200mg/kg de tetraciclina no extrato a ser injetado (Health Protection Branch - HPB, 1973). Tratamentos com tripsina também podem ser necessários para ativar a toxina, especialmente quando cepas não-proteolíticas estão envolvidas. A tripsina não interfere na neutralização com antitoxina (CDC, 1979, Food and Drug Administration - FDA, 1984).

A escolha das antitoxinas utilizadas na neutralização da toxina depende dos tipos mais possivelmente suspeitos de estarem envolvidos. Em casos de botulismo humano de origem alimentar, a neutralização preliminar com antitoxina trivalente (A, B, E) e com duas destas antitoxinas monovalentes é usualmente adequada. A neutralização pode ser feita "in vitro" ou injetando-se previamente as antitoxinas nos camundongos antes de injetar o extrato. Este último método é mais trabalhoso e raramente utilizado (Hauschild, 1989).

Como as toxinas são termolábeis, uma porção do alimento ou das amostras clínicas (com exceção do soro sanguíneo) deve ser aquecida a 100°C durante 10 minutos e injetada em um par de camundongos para servir de controle negativo (CDC, 1979).

Os sinais típicos de botulismo no camundongo são: pêlo eriçado, respiração ofegante, estreitamento da cintura, dificuldade de locomoção, principalmente com os membros posteriores, paralisia progressiva e morte (Kautter & Lynt, 1984). Tempos de sobrevivência são menores com quantidades maiores de toxina, porém se ocorrerem mortes com menos de duas horas da injeção, a causa mais comum é a presença de agentes não-específicos. A maioria das mortes por

botulismo geralmente ocorre ao redor de 24 horas, porém a observação dos camundongos deve continuar por até quatro dias. Quando apenas um camundongo do par inoculado morrer (1/2) após 24 horas, recomenda-se a inoculação de mais um par. Neste caso, o resultado é considerado positivo para toxina quando dois ou mais camundongos morrerem (pelo menos 2/4). Algumas amostras, provavelmente contendo pequenos níveis de toxina, podem causar sinais de botulismo sem, contudo, causar a morte do camundongo; nestes casos, resultados definitivos podem ser obtidos aumentando-se a dose injetada (por exemplo de 0,4 a 0,5ml para 0,8 a 1,0ml, no máximo).

O bioensaio em camundongos tem permanecido sem modificações durante décadas. Vários outros testes "in vitro" também foram desenvolvidos, porém poucos se revelaram tão sensíveis, específicos e seguros. Hobbs et al. (1982) relataram que dentre os métodos "in vitro", os mais sensíveis permitem a detecção de aproximadamente 1 micrograma de toxina por mililitro. Os métodos moleculares estão em significativo avanço e alguns trabalhos mostram uma alta correlação entre os resultados do PCR (Polymerase Chain Reaction), ou Reação em Cadeia da Polimerase, e o bioensaio em camundongos. O PCR resulta em alta especificidade pois ele é, essencialmente, um método com duas sondas genéticas de hibridização repetido dezenas de vezes (Hill, 1996). Dessa forma, o uso de sondas genéticas e o seqüenciamento do DNA estão intimamente relacionados com o desenvolvimento dos testes baseados no PCR. A partir da seqüência do DNA pode-se construir oligonucleotídeos sintéticos para serem utilizados como primers ou sondas genéticas específicas. Alguns estudos demonstraram que os resultados do bioensaio em camundongos corresponderam completamente (Hielm et al., 1996), ou quase (95,6%, de acordo com os resultados obtidos por Szarbo, 1994). Infelizmente, não há padrão de sensibilidade para essa técnica. Alguns autores indicam picogramas de DNA que podem ser detectados em uma amostra, outros utilizam o número de células por ml do caldo de enriquecimento (Hill, 1996). O desafio preliminar para a utilização do PCR como ferramenta na área de alimentos é a complexidade dos diversos grupos de alimentos. Um esforço considerável tem sido feito no sentido de remover substâncias inibidoras ao teste

de PCR das amostras homogeneizadas de alimentos e procedimentos específicos para cada tipo de alimento devem ser desenvolvidos (Hill, 1996). Além disso, células mortas também contêm DNA amplificável e, por isso, um resultado positivo obtido por PCR não demonstra conclusivamente que células viáveis estão presentes no alimento. Wictome et al. (1999) desenvolveram um novo ensaio “in vitro” mais sensível que o ensaio biológico, específico para detecção de neurotoxina botulínica tipo B (BoNT/B) numa gama variada de alimentos, sendo capaz de detectar BoNT/B numa concentração de 5pg/ml em aproximadamente 5 horas. Neste ensaio, em um primeiro estágio a toxina é capturada em uma coluna de imunoafinidade com anticorpos monoclonais; a seguir, um substrato peptídico é quebrado pela atividade endopeptídica da BoNT/B e, finalmente, um sistema ELISA modificado detecta os produtos da quebra do peptídeo. Usando anticorpos monoclonais altamente específicos, os autores concluíram que o ensaio endopeptídico foi capaz de diferenciar entre BoNT/B produzida por cepa proteolítica e por não-proteolítica. Estes ensaios, ora aplicados em pesquisa laboratorial, poderão, no futuro, substituir o convencional bioensaio em camundongos.

Na detecção de *C. botulinum* viável, o procedimento consiste essencialmente na inoculação das amostras clínicas ou de alimentos em caldo de enriquecimento e identificação da toxina neste caldo através do ensaio biológico. Os meios de enriquecimento comumente utilizados são o meio de carne cozida (CMM), meio de carne cozida com glicose, meio de carne cozida-glicose-amido (CMGS), meio de triptona-peptona-glicose-extrato de levedura (TPGY) sem ou com tripsina (FDA, 1984, Elliott et al. 1988). No mínimo, dois tubos do meio de enriquecimento devem ser inoculados. Um deles, após inoculação, deve ser aquecido a 75-80°C ou a 60°C durante 10 a 15 minutos, para cultura seletiva dos esporos; o outro tubo deve ser inoculado e incubado sem aquecimento prévio para permitir o desenvolvimento de esporos de tipos não-proteolíticos e de células vegetativas de *C. botulinum* (FDA, 1984).

Os meios sólidos para isolamento de *C. botulinum*, a partir dos meios de enriquecimento, podem conter sangue (Dolman, 1964) ou, mais comumente, emulsão de gema de ovo (CDC, 1979, FDA, 1984, Elliott et al., 1988). *C. botulinum*, assim como alguns outros clostridia, produz enzimas lipolíticas que causam a precipitação da gordura contida no meio, resultando em uma iridiscência ou aparência aperolada ao redor e por cima das colônias (Kautter & Lynt, 1984). A inclusão de gema de ovos aos meios de cultura também permite a recuperação de esporos injuriados pelo calor, provavelmente devido à presença de lisosima (Hauschild & Hilsheimer, 1977).

As placas de Petri contendo meios sólidos inoculados devem ser incubadas em atmosfera anaeróbia imediatamente após a semeadura. O gás nitrogênio é recomendado em Kautter & Lynt (1984) para obtenção de atmosfera anaeróbia em jarras, podendo ser utilizado também o gás hidrogênio puro (Futter & Richardson, 1971, Serrano & Junqueira, 1991) ou em combinação com gás carbônico e nitrogênio.

3.4. Hábitat e Epidemiologia do *Clostridium botulinum*

A distribuição geográfica dos esporos de *C. botulinum* na natureza tem sido extensivamente estudada por diversos pesquisadores. Hauschild (1989) apresenta um sumário geral sobre essa ocorrência, a nível mundial, mostrando que os ambientes terrestres e aquáticos são o hábitat natural deste microrganismo. Em geral, o número de esporos, os tipos de *C. botulinum* no ambiente e a relativa prevalência do tipo de toxina produzida são fatores significativos associados com a incidência de surtos de botulismo. A esse respeito, Smith (1977), Banwart (1979) e Hauschild (1989) mencionam que os surtos de botulismo ocorridos nos Estados Unidos foram devidos principalmente às cepas do tipo A deste microrganismo, país onde esporos deste tipo preponderam no solo; já os ocorridos na Europa foram devidos às cepas do tipo B; na Escandinávia, Japão, Canadá, Alasca e parte da URSS, o tipo E foi mais freqüentemente relacionado com os surtos. Smith (1977) sugere que a psicrotolerância das cepas do Grupo II deve ser o fator-chave

para a prevalência do tipo E naquelas regiões de clima frio do hemisfério norte, bem como no ambiente aquático.

Tanto os alimentos de origem animal como vegetal mostram-se envolvidos em surtos humanos de botulismo alimentar. Os alimentos associados com o tipo A são principalmente vegetais, enquanto o tipo B é predominante em produtos cárneos. Os pescados (peixes, crustáceos, ovas de peixe e outros produtos) aparecem freqüentemente associados ao tipo E (Banwart, 1979, Hauschild, 1989).

A respeito da ocorrência de *C. botulinum* em ambientes naturais, particularmente em ambientes aquáticos, pesquisas realizadas na América do Norte mostram concentrações de esporos mais elevadas em sedimentos da costa do Oceano Pacífico, no nordeste dos Estados Unidos e em sedimentos da região dos Grandes Lagos, com predominância do sorotipo E (Sugiyama et al., 1972, Huss, 1981). Na Costa Atlântica, também ocorre prevalência do tipo E, porém seguido de elevada percentagem dos tipos C e D, na maioria C (Ward et al., 1967a, Laycock & Longard, 1972).

Na América Latina, Ward et al. (1967b) constataram a presença de *C. botulinum* tipos A, B, C e F em sedimentos de açudes e areias de praias do Estado do Ceará, Brasil.

Na Europa, Smith & Morryson (1975), fazendo um estudo dos lagos de Londres, observaram que dos 69 locais examinados, 50 (75,5%) continham *C. botulinum*, sendo o tipo B o mais comum. Estes autores preconizaram que o lodo aquático daquela região era um ambiente muito mais favorável ao desenvolvimento do microrganismo do que o solo devido a fatores como: alcalinidade da água, grandes áreas de águas superficiais estagnadas, abundância de invertebrados aquáticos e um esgotamento de oxigênio associado a uma grande quantidade de vegetais em decomposição (Smith & Morryson, 1977).

Em pesquisas realizadas por Huss (1974) e Burns & Williams (1975) a contagem de esporos em lodo de tanques de piscicultura variou de 0,0 a superior a 300NMP/kg, dependendo muitas vezes do tipo de sedimento do tanque. Os sorotipos predominantes foram B não-proteolítico na Escócia e E na Dinamarca e Alemanha.

Smith et al. (1978), analisando amostras coletadas de lagos, reservatórios, rios, canais, lagoas e córregos da Irlanda e Dinamarca, verificaram que do total de 554 amostras analisadas, 194 (35%) foram positivas, sendo que 167 (30,1%), 19 (3,4%), 6 (1,1%) e 15 (2,7%) continham os tipos B, C, D e E, respectivamente.

A criação de peixes em tanques (aquicultura) tem sido amplamente difundida e a associação do *C. botulinum* com a mesma tem conduzido a diversas pesquisas, especialmente em países do hemisfério norte (Huss, 1981). Nos dados contidos na Tabela 4, Huss (1981) relaciona a ocorrência de *C. botulinum* em peixes de águas fluviais.

TABELA 4. Ocorrência de *Clostridium botulinum* em peixes de águas fluviais e lacustres.

Local	Espécime	Amostra	Nº de amostras analisadas	Nº de amostras positivas (%)	Tipo
Tanques:					
Grã-Bretanha	truta	vísceras	1.400	72 (11,0)	3B:7C:41E:21F
Grã-Bretanha	truta	inteira	617	58 (9,4)	7B:8C:43E
Escócia	truta	inteira	69	1 (1,4)	B
Noruega	truta	inteira	152	17 (11,0)	E
Finlândia	truta	vísceras	56	4 (7,0)	E
Dinamarca	truta	inteira	550	359 (65,0)	1A:1B:357E
Rios:					
Estados Unidos					
- Diversos	truta	guelras e vísceras	30	7 (23,0)	2B:5E
- Grandes Lagos	diversas	intestino s	2.512	120 (8,0)	E
- Baía Verde	diversas	intestino s	728	416(57,0)	E
- Lago Cayuga	diversas	intestino s	32	2 (6,0)	E
Dinamarca	carpa	vísceras	70	-	-
Japão	truta		110	4 (4,0)	3E:1F

Fonte: Huss (1981)

Na Tabela 5 são mencionados dados da ocorrência de botulismo decorrentes do consumo de peixes submetidos a diferentes tipos de processamento, de acordo com Huss (1981).

TABELA 5. Peixes e seus derivados envolvidos em surtos de botulismo

Espécie	Ligeiramente conservado		Semiconservado		Totalmente conservado
	Defumado	Fermentado	Salgado	Marinado	Enlatado
Salmão	2	1	-	-	2
Arenque	-	1	8	7	1
Truta	-	12	-	1	-
Peixe de água doce	5	4	-	-	-
Peixe de pântano	2	15	-	-	-
Sardinha	1	2	-	-	-
Desconhecida	1	38	-	-	-

Fonte: Huss (1981)

No Brasil, Delazari et al. (1981-1982) estudaram a ocorrência de *C. botulinum* em 300 amostras de peixes, compreendendo a pescada-foguete, o bagre-do-mar e a sardinha verdadeira, capturados em águas do litoral de São Paulo e da Região Sul. Os autores detectaram a presença da bactéria em 27% das amostras, sendo o sorotipo E o mais freqüentemente detectado (74,2%).

Portugal et al. (1991) e Baldassi et al. (1991) relataram a ocorrência de surtos de botulismo em anatídeos e em peixes de lagos no Estado de São Paulo. Em ambos os surtos foi detectada a toxina botulínica do tipo C e o microrganismo foi isolado de amostras de sedimentos dos lagos.

3.5. Ação da embalagem em atmosfera modificada sobre *Clostridium botulinum*

O pescado fresco é altamente perecível e susceptível à deterioração causada pelo rápido crescimento de bactérias psicrotróficas. A estocagem destes produtos em gelo picado ou sob refrigeração durante a distribuição e comercialização resulta em um prazo de validade curto, entre 5 a 10 dias, dependendo da espécie, das condições de pesca, do clima, etc., ocasionando considerável perda econômica. Como resultado disso, somente uma pequena porcentagem dos produtos de pescado é comercializada fresca. Assim sendo, alternativas que estendam a vida útil do produto fresco, como a embalagem em atmosfera modificada (MAP), associada à refrigeração, têm sido pesquisada mais extensivamente (Stammen et al., 1990; Eklund, 1992; Reddy et al., 1992).

A refrigeração combinada com a MAP, utilizando vários níveis de CO₂, estende a vida útil do produto devido à inibição das bactérias psicrotróficas deteriorantes que contribuem para a alteração das características organolépticas do produto (Stammen et al., 1990; Reddy et al., 1992, 1994). Contudo, a MAP de produtos de pescado fresco envolve o risco potencial de crescimento e produção de toxina de cepas psicrotróficas de *Clostridium botulinum*. Estas cepas são amplamente distribuídas no ambiente aquático e são capazes de crescer em temperatura de refrigeração tão baixa como 3,3°C como anteriormente mencionado. A redução da população das bactérias aeróbias deteriorantes pelo uso de MAP com baixa concentração ou ausência de oxigênio pode permitir o crescimento do *C. botulinum* durante a estocagem prolongada, principalmente se ocorrer elevação da temperatura de refrigeração para níveis acima do limite de crescimento das cepas psicrotróficas desta bactéria. De acordo com Post et al. (1985) produtos de pescado que se tornaram tóxicos em MAP continuavam apresentando condições aceitáveis para o consumo.

3.6. Ação do lactato de sódio sob o *Clostridium botulinum*

O lactato de sódio é um sal orgânico derivado do ácido láctico e considerado inócuo pela FDA (Food and Drug Administration) dos Estados Unidos. Este sal tem sido usado há mais de trinta anos pela indústria de alimentos, primariamente devido às suas propriedades umectantes (Reid, 1969 citado por Papadopoulos et al., 1991) e, desde o início da última década, para acentuar o aroma e o sabor e estender a vida de prateleira, principalmente quando adicionado a produtos cárneos (Maas et al., 1989; De Wit & Rombouts, 1990; Papadopoulos et al., 1991; Miller & Acuff, 1994). Em 1972, Krol, citado por Maas et al. (1989) postulou que o lactato de sódio apresenta efeito bactericida, diminuindo o crescimento de lactobacilos, micrococos e de espécies de *Achromobacter* em presunto formulado com lactato de sódio. De acordo com Anders et al, 1989 (citado por Papadopoulos et al., 1991), o crescimento do *C. botulinum* foi retardado em pescado, frango e peru tratados com 1,5% a 3,5% de lactato de sódio. Na literatura, são encontrados poucos trabalhos relativos ao mecanismo de inibição do lactato de sódio no crescimento e produção de toxina por cepas de *C. botulinum*. Maas et al. (1989) verificaram retardamento na produção de toxina botulínica em peito de peru embalado a vácuo como resultado da adição de 2% a 3,5% de lactato de sódio. Esses autores propuseram dois mecanismos de ação possíveis para a inibição da toxigênese pelo lactato de sódio; primeiro, a presença de um elevado nível de íons lactato pode reduzir a intensidade do processo de transformação do piruvato a lactato, aproximando-se de seu equilíbrio termodinâmico, conseqüentemente inibindo a principal via anaeróbia de produção de energia, essencial para o crescimento microbiano. Um segundo mecanismo sugere que um elevado nível de lactato pode inibir a geração de ATP a partir da transferência de prótons através da membrana celular bacteriana. Contudo, mais estudos são necessários para avaliar o efeito do lactato de sódio na permeabilidade da membrana celular bacteriana. Meng, 1992 (citado por Houstma, 1994), supõe que o efeito inibitório na germinação dos esporos deve-se à competição do lactato por ativadores da germinação dos esporos, tais como a alanina.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Otimização de meio seletivo e de diferenciação para isolamento e contagem de *Clostridium botulinum*

Os estudos foram efetuados analisando-se cepas de *C. botulinum* de diferentes tipos bem como culturas de *C. sporogenes*, *Clostridium* sp proteolítico e *C. perfringens*, microrganismos estes comumente presentes no mesmo hábitat e apresentando características fisiológicas e culturais semelhantes. Na Tabela 6 são especificadas as culturas avaliadas.

TABELA 6. Origem das culturas de referência.

Cultura	Código	Origem
<i>C. botulinum</i> tipo A	ATCC 25763	American Type Culture Collection, USA
<i>C. botulinum</i> tipoB, proteolítico	ATCC 7949	American Type Culture Collection, USA
<i>C. botulinum</i> tipo E	ATCC 9564	American Type Culture Collection, USA
<i>C. sporogenes</i>	NCTC 533	National Collection of Type Culture, UK
<i>Clostridium</i> sp proteolítico	PA 3679	National Cannery Association, USA
<i>C. perfringens</i>	V	Prof. A.M. Serrano, Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP - Campinas - SP

A partir de diluições de culturas dos microrganismos de referência com 24h de incubação a 35°C em meio de carne cozida (CMM), foram realizadas inoculações em profundidade em placas de Petri, utilizando meio Trypticase Peptona Glicose Extrato de Levedura (TPGY), formulado de acordo com FDA

(1984), adicionado de 20,0g/L de ágar, 2,0ml/L de solução alcoólica a 1,6% de púrpura de bromocresol e 8,0ml/L de solução salina com gema de ovo (1:1) como agentes diferenciais, e dos antibióticos recomendados por Dezfulian et al. (1981) como agentes seletivos, a saber: 250,0mg/L de solução aquosa de cicloserina (Sigma C6880); 76,0mg/L de solução aquosa de sulfametoxazole (Sigma S7507) dissolvido em quantidade suficiente de NaOH 10% e 4,0mg/L de solução aquosa de trimethoprim (Sigma T7883)) dissolvido em quantidade suficiente de HCl 0,05N a 55°C. Após solidificação do meio inoculado, foi adicionada uma sobrecamada de ágar contendo 0,1g/L de ditioneitol (Sigma D5545) preparado de acordo com Hauschild & Hilsheimer (1977). As placas inoculadas foram incubadas em atmosfera anaeróbia de hidrogênio e gás carbônico, a 30°C durante 48h, seguindo-se observação das colônias formadas. Foram consideradas como típicas e, portanto, suspeitas as colônias apresentando coloração amarela devido à fermentação da glicose presente no meio, com a região adjacente à borda da colônia formando um halo opaco, circundado externamente por outro halo transparente devido provavelmente à reação da lipase com a gema de ovo.

Os ensaios com as diferentes culturas em teste foram efetuados com três repetições, avaliando-se não apenas as características culturais das diferentes espécies e tipos mas também a intensidade de crescimento observada.

4.2. Ocorrência de *Clostridium botulinum* no trato intestinal de peixes fluviais e lacustres e em sedimentos de tanques de criação

Foram realizadas 2 amostragens em estações do ano distintas, coletando-se, em cada uma delas, 10 exemplares de peixes e 5 amostras de sedimentos dos respectivos tanques de criação, de acordo com a Tabela 7.

TABELA 7. Coleta de amostras de peixes e sedimentos de tanques de criação em diferentes localidades do Estado de São Paulo.

Local da Coleta	Estação do ano	Espécime coletada
Campos do Jordão	Inverno/96 Verão/97	Truta (<i>Oncorhynchus myrkiss</i>)
São Paulo	Inverno/96 Verão/97	Carpa (<i>Cyprinus carpio</i>)
Pindamonhangaba	Inverno/96 Verão/97	Tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>)
Pindamonhangaba	Verão/97 Inverno/97	Curimatá (<i>Prochilodus scrofa</i>)
Pirassununga	Verão/97 Inverno/97	Pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>)
Bananal	Inverno/97 Verão/98	Truta (<i>Oncorhynchus myrkiss</i>)
Indaiatuba	Verão/98 Inverno/98	Carpa (<i>Cyprinus carpio</i>)
Monte-Mor	Verão/98 Inverno/98	Tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>)
Pirassununga	Verão/97 Inverno/97	Curimatá (<i>Prochilodus scrofa</i>)
Registro	Verão/98 Inverno/98	Pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>)

Imediatamente após a captura, as amostras dos peixes foram colocadas individualmente em sacos plásticos que, em seguida, foram acondicionados em caixas isotérmicas, contendo gelo em escamas e transportadas ao laboratório.

No laboratório, as amostras dos peixes foram retiradas dos plásticos em cabine de fluxo laminar, seguindo-se o corte da região ventral, com remoção das vísceras, utilizando-se instrumentos previamente esterilizados. Foram retiradas 11,1g de cada uma das dez amostras de vísceras descongeladas. A seguir foram adicionados 99,9ml de caldo Trypticase Peptona Glicose Extrato de Levedura (TPGY) e, com o auxílio de sacos plásticos contendo filtro, foi efetuada a homogeneização das diluições 10^{-1} em homogeneizador de pistões ("stomacher"). Após homogeneização, as amostras diluídas foram transferidas para frascos de vidro refratário com tampa de plástico rosqueável e submetidas a choque térmico por aquecimento a 70°C durante 3 minutos, seguido de resfriamento em água gelada, para ativação de esporos dormentes.

Em continuação, 10,0ml da diluição 10^{-1} foram inoculados em 50ml do ágar otimizado no item 4.1, sem adição de antibióticos (TPGY-ot) e distribuído em 3 placas de Petri altas (15mm de altura x 100mm de diâmetro), sendo adicionada uma sobrecamada de ágar Ditiotreitól após solidificação do ágar TPGY-ot. Também foi realizada inoculação de 1,0ml da diluição 10^{-1} . As placas foram incubadas em anaerobiose, à temperatura de 30°C durante 48hs e as colônias típicas enumeradas e transferidas para tubo contendo caldo TPGY ou caldo de Carne Cozida (CMM) previamente desaerados, seguindo-se incubação a 30°C durante 72h. Após o período de incubação, o tubo com a cultura foi mantido sob refrigeração para posterior identificação.

Para quantificação pela técnica do NMP, a porção remanescente nos frascos das diluições 10^{-1} , perfazendo 10g de vísceras, foi incubada a 30°C durante 5 dias, em atmosfera anaeróbia. Após incubação, aproximadamente 5ml do conteúdo dos frascos foram filtrados em membrana de 0,45 μ . A partir do filtrado, 1,0ml foi adicionado de 0,25ml de solução estéril de tripsina a 0,5% e mantido à temperatura de 35°C durante 30 minutos; posteriormente, 0,5ml desta

suspensão foi injetada intraperitonealmente em dois camundongos tipo Swiss de acordo com a técnica preconizada pelo CDC (1979). Os animais injetados foram mantidos sob observação por um período máximo de 4 dias, visando constatar sintomas de botulismo. Em caso de morte dos camundongos inoculados, outra alíquota de 1,25ml do filtrado tripsinizado e aquecida à ebulição durante 10 minutos, com o objetivo de inativar a toxina eventualmente presente, foi injetada em dois camundongos após resfriamento (0,5ml em cada animal). Os resultados foram considerados presuntivamente positivos quando houve morte dos camundongos inoculados (2/2 ou pelo menos 2/4) com os filtrados não aquecidos e sobrevivência daqueles inoculados com os submetidos a aquecimento.

A partir das amostras presuntivamente positivas foram realizadas provas confirmativas do tipo de toxina botulínica presente. Para tanto, 1,0ml do filtrado tripsinizado presuntivamente positivo foi adicionado de 0,25ml de antitoxina polivalente e incubado a 35°C durante 30 minutos; a seguir, dois camundongos foram injetados intraperitonealmente com 0,5ml do líquido e mantidos em observação durante 4 dias. A prova foi considerada positiva quando os camundongos injetados com o sobrenadante adicionado da antitoxina polivalente sobreviveram.

Finalmente, para a identificação do tipo de toxina botulínica presente, foram repetidos os testes de inoculação com filtrado não submetido a tratamento com tripsina e, posteriormente, a neutralização "in vitro", desta feita com antitoxinas monovalentes A, B, C, D, E, F e G, e inoculação em camundongos. A identificação do tipo de *C. botulinum* foi conseguida quando houve sobrevivência do par de camundongos que foi injetado com filtrado tripsinizado ou não, neutralizado com uma das antitoxinas monovalentes e morte de todos os demais.

As cinco amostras de sedimento de cada local e época também foram examinadas de maneira semelhante à descrita para vísceras, com diluição inicial (10^{-1}) de 22g para 198ml de caldo TPGY, sendo utilizadas 20g no caldo TPGY para contagem pela técnica do NMP e 1,0g, 0,1g e 0,01g para contagem em placas de Petri.

Após confirmação da presença de *C. botulinum*, os resultados obtidos foram expressos em UFC (Unidades Formadoras de Colônias)/g para a contagem em placas e em NMP/kg, através da equação desenvolvida por Halvorson & Ziegler (1933).

$$\text{NMP} = \frac{1}{a} \ln \frac{N}{Q}$$

onde: N = número total de amostras
Q = número de amostras negativas
a = peso de cada amostra em kg.

4.3. Isolamento e identificação de *Clostridium botulinum*

Para identificação das colônias típicas, isoladas em ágar TPGY-ot a partir das amostras de vísceras e sedimentos, descritas em 4.2, foram inicialmente realizados exames microscópicos em contraste de fase, para observação da presença de esporos e morfologia das células, seguindo-se purificação por estrias em ágar Anaeróbio Gema de Ovo (EYA), formulado de acordo com FDA (1984). A partir destas culturas, procedeu-se a sua identificação preliminar, utilizando-se o sistema "Rapid ID32A" da Biolab Mérieux para identificação de bactérias anaeróbias (Figura 1). As culturas presuntivamente identificadas como *C. botulinum* foram posteriormente submetidas a ensaios biológicos para confirmação, calculando-se finalmente a população presente na amostra original, expressa em Unidades Formadoras de Colônias por grama (UFC/g). O fluxograma da Figura 2 define o procedimento utilizado.



FIGURA 1. Leitura automática do sistema “Rapid ID32A” para identificação de bactérias anaeróbias.

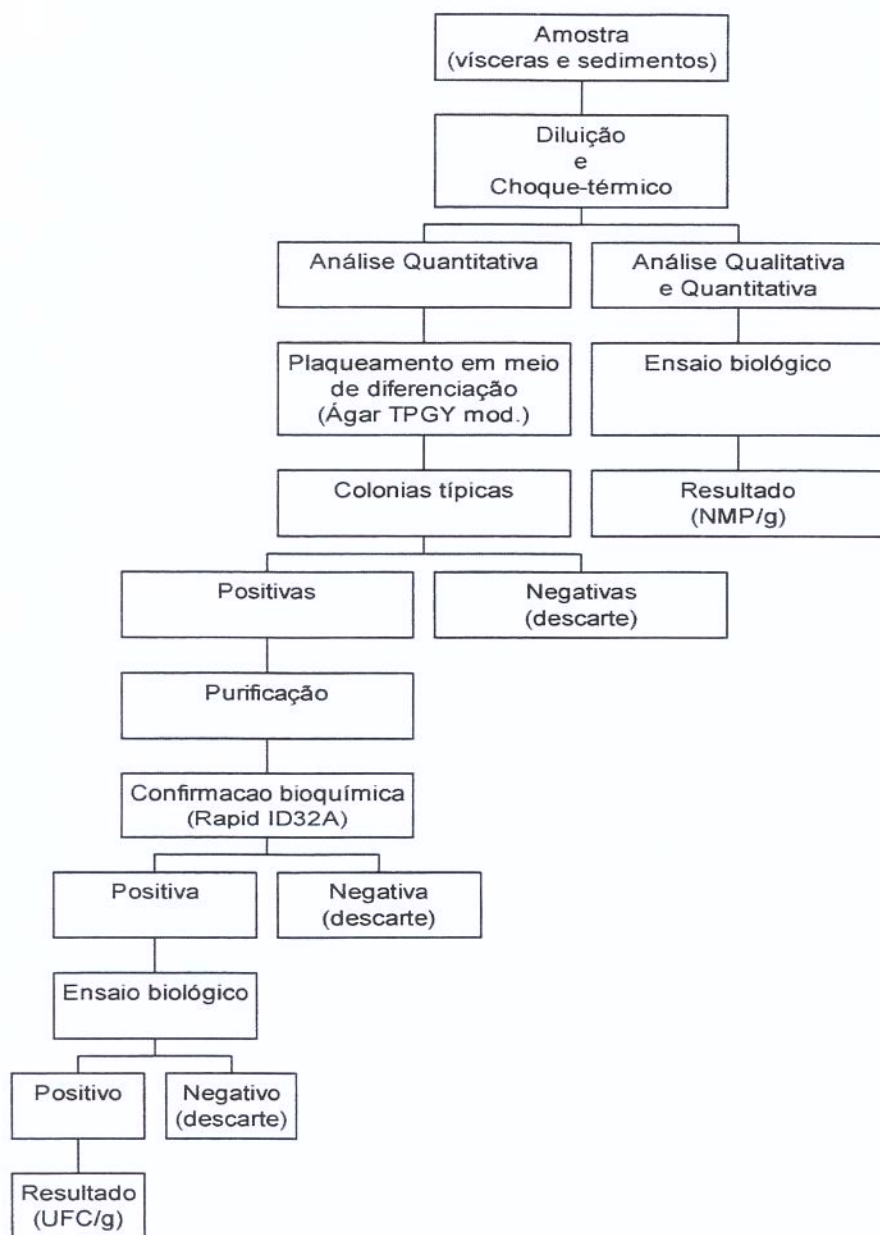


FIGURA 2. Análise quantitativa e qualitativa de *Clostridium botulinum* em pescados e sedimentos fluviais e lacustres.

4.4. Desenvolvimento de *Clostridium botulinum* em filés de tilápia armazenados em diferentes atmosferas e temperaturas e influência do lactato de sódio na inibição do microrganismo

4.4.1. Preparo dos filés de tilápia

Os filés de tilápia foram gentilmente doados pela Gerbi Pescados (Mogi-Guaçu - SP) sendo transportados acondicionados em caixas isotérmicas à temperatura ao redor de 2°C, para a Planta Piloto do Centro de Tecnologia de Carnes (CTC) - ITAL. Na Planta Piloto, em ambiente refrigerado, os filés foram divididos em quatro lotes. Dois lotes foram distribuídos em bandejas isotérmicas e acondicionados em plástico PVC (lote I – sem tratamento com lactato, em atmosfera normal) e em sacos plásticos de baixa permeabilidade (barrier bag 20x26-01 – cód. 3000670 - Cryovac) com atmosfera substituída por mistura dos gases CO₂ e N₂ (White Martins) na proporção de 75% e 25%, respectivamente (lote III – sem tratamento com lactato, em atmosfera modificada). Os filés dos outros dois lotes restantes foram imersos, durante aproximadamente 30 segundos, em solução aquosa (v/v) de lactato de sódio a 4% (Purasal S/SP 60 – Purac), a seguir drenados e distribuídos em bandejas isotérmicas e acondicionados nas mesmas condições anteriores (lote II – tratado com lactato, em atmosfera normal; lote IV – tratado com lactato, em atmosfera modificada). Os quatro lotes obtidos foram transportados em caixas isotérmicas, à temperatura ao redor de 4°C, para o Laboratório de Higiene da FEA - UNICAMP.

4.4.2. Produção dos esporos, inoculação dos filés e procedimento experimental

Culturas de *C. botulinum* tipos A (ATCC 25763), B (ATCC 7949) e E (ATCC 9564) foram reativadas em Caldo TPGY; 0,1-0,2ml das culturas com 48h foram espalhados em superfície de placas de Petri contendo o meio TPGY adicionado de 2,0% de ágar. Após inoculação, as placas foram imediatamente incubadas em anaerobiose a 30°C durante 3 dias e, a seguir, foram mantidas em aerobiose, à temperatura ambiente, durante 7 dias. Em continuação, as colônias da superfície

das placas foram removidas com auxílio de uma alça de Drigalski e aproximadamente 10ml de água destilada estéril. O volume foi transferido para tubos de centrifuga, sendo lavado com água destilada estéril durante quatro centrifugações sucessivas a 10.000xg, a 4°C durante 10min (Hauschild et al., 1975). A suspensão obtida foi submetida à microscopia de contraste de fase para observação de esporos refringentes e à contagem em placas por inoculação em profundidade utilizando o meio TPGY adicionado de púrpura de bromocresol, gema de ovo e 2% de ágar, com sobrecamada de ágar com ditioneitol e incubação anaeróbia a 30°C durante 48h. As suspensões de esporos de *C. botulinum* tipos A, B e E permaneceram estocadas sob refrigeração ao redor de 4°C.

Para inoculação nos filés de tilápia, foi preparada uma suspensão contendo aproximadamente 10^3 esporos/ml de cada tipo de *C. botulinum*. Uma alíquota de 0,1ml desta suspensão foi inoculada com seringa descartável estéril de 1ml nas amostras dos lotes I e II. Para as amostras acondicionadas em atmosfera modificada (lotes III e IV), a inoculação foi realizada através de um septo de silicone, colado no centro da embalagem, para evitar a entrada de ar.

As amostras dos quatro lotes inoculados foram estocadas às temperaturas de 12°C e 4°C durante 5 e 45 dias, respectivamente. Para cada lote, tempo e temperatura de estocagem, 3 amostras foram analisadas quanto à presença de toxina botulínica através de bioensaio em camundongos. Os extratos foram preparados homogeneizando-se 25 ± 5 g de amostra, retirada da região inoculada, com o dobro do peso em volume de solução tampão fosfato-gelatina pH 6,6, sendo centrifugados a 12.000xg durante 20 minutos a 4°C. Uma alíquota de 1ml do sobrenadante obtido foi ativada com tripsina e inoculada em par de camundongos tipo Swiss, conforme CDC (1979). Os resultados foram considerados presuntivamente positivos quando houve morte do par de camundongos inoculados (2/2) ou quando houve morte de pelo menos um camundongo de dois pares inoculados ($\geq 2/4$). A confirmação foi realizada por neutralização dos sobrenadantes previamente tóxicos, através de fervura em

banho-maria durante 10 minutos e posteriormente com antitoxinas botulínicas tipos A, B e E.

4.4.3. Análises físico-químicas e microbiológicas efetuadas nos filés de tilápia

Amostras de filés de tilápia dos mesmos lotes, não inoculadas com esporos de *C. botulinum*, foram analisadas inicialmente e durante estocagem à temperatura de 12°C e 4°C, para determinar:

- a) **pH**, através de potenciômetro elétrico.
- b) **Atividade de água (Aw)**, através de higrômetro elétrico.
- c) **Potencial redox (Eh)**, através de potenciômetro elétrico (Marca Mettler/Toledo - Modelo MA 130), com eletrodo de platina aferido em solução tampão redox 220mV/ pH7,0/ 25°C.
- d) **Composição gasosa das embalagens com atmosfera modificada** em analisador de gases (Marca PBI Dansensor - Modelo Bombi check 9800-1), com medida de oxigênio e gás carbônico residual.
- e) **Contagem de bactérias lácticas** em ágar APT, com incubação a 30°C durante 3 dias em atmosfera microaerófila contendo aproximadamente 5% de O₂, 10% de CO₂ e 85% de N₂, de acordo com Vanderzant & Splittstoesser (1992).
- f) **Contagem de bactérias psicrotróficas** em superfície de Ágar Padrão para Contagem (PCA), com incubação a 7°C durante 10 dias, de acordo com Vanderzant & Splittstoesser (1992).

A Figura 3 apresenta um fluxograma do procedimento experimental.

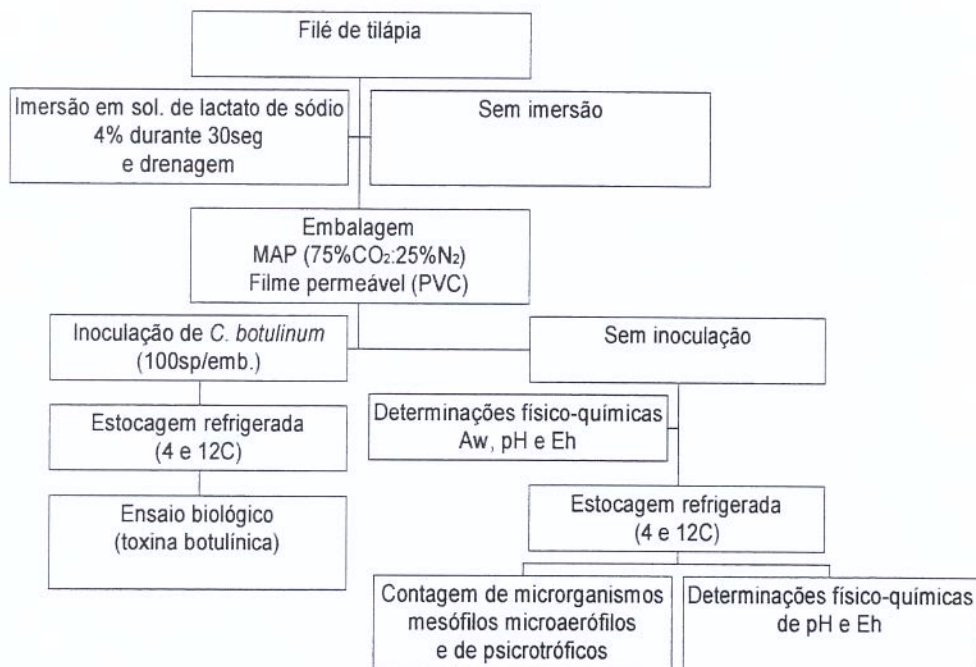


FIGURA 3. Efeito do tratamento com lactato de sódio e da embalagem em atmosfera modificada na toxigênese de *Clostridium botulinum* em filés de tilápia estocados em diferentes temperaturas de refrigeração.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Otimização de meio seletivo e de diferenciação para contagem de *Clostridium botulinum*

A otimização do método de contagem de *Clostridium botulinum* através da inoculação em profundidade, utilizando o meio de cultura ágar TPGY acrescido de agentes diferenciais (gema de ovo, glicose e púrpura de bromocresol), aqui denominado ágar TPGY-ot, e agentes redutores (sobrecamada de ágar com ditiotreitol), mostrou-se eficiente para diferenciação das cepas de *C. botulinum* utilizadas. A combinação e a concentração dos antibióticos trimethoprim, sulfametoxazole e cicloserina, utilizados como agentes seletivos ao meio otimizado, foram baseadas nas descritas originalmente por Dezfulian et al. (1981), que as utilizaram em meio seletivo para isolamento de *C. botulinum* a partir de fezes humanas. As cepas de *C. botulinum* empregadas como referência naquela pesquisa eram constituídas dos tipos classificados no grupo I (tipo A e cepas proteolíticas dos tipos B e F) e do tipo G. A cepa de *C. botulinum* tipo E (ATCC 9564) utilizada nesta pesquisa foi inibida pelos antibióticos adicionados ao meio otimizado; contudo, as demais cepas, dos tipos A e B, mostraram-se resistentes, em concordância portanto com Dezfulian et al. (1981).

A vantagem do meio otimizado reside na possibilidade de emprego na contagem por plaqueamento em profundidade, permitindo um maior nível de detecção comparativamente ao plaqueamento em superfície e reduzindo a quantidade de material utilizado, em relação ao método de NMP.

As colônias típicas de *C. botulinum* no meio TPGY-ot (sem a adição de antibióticos) apresentaram-se com coloração amarela, devido à fermentação da glicose presente no meio; na região adjacente à borda das colônias pôde-se observar a formação de um halo opaco circundado externamente por outro halo transparente (Figuras 4, 5 e 6) devido provavelmente à ação da lipase sobre a gema de ovo adicionada ao meio. Ocorreu boa diferenciação das colônias de *C. botulinum* em relação às de *C. perfringens* (Figura 7), que apresentaram um halo

opaco mais difundido ao redor das colônias, provavelmente devido à ação da lecitinase caracteristicamente produzida por esta bactéria. Quando comparadas às colônias de *C. sporogenes*, não ocorreu uma clara diferenciação (Figura 8), principalmente em razão desta espécie apresentar características bioquímicas semelhantes às do *C. botulinum*, principalmente as cepas alocadas no grupo I (Hauschild, 1989).

Assim sendo, em conclusão, os resultados obtidos evidenciam que o uso do ágar TPGY-ot possibilita apenas uma diferenciação preliminar do *C. botulinum* frente a algumas espécies de *Clostridium*. Como limitações importantes destacam-se a ausência de crescimento de cepas não-proteolíticas (tipo E) de *C. botulinum* no meio quando adicionado dos antibióticos trimethoprim, sulfametoxazole e cicloserina, bem como a ausência de diferenciação frente aos clostrídios anaeróbios putrefativos, em especial o *C. sporogenes*, freqüentemente presente no mesmo hábitat. Nestas condições, a presença de colônias típicas neste meio não pode ser considerada uma evidência de *C. botulinum*, tornando necessária, portanto, a execução de ensaios biológicos de detecção da toxina botulínica.



FIGURA 4. Colônias de *Clostridium botulinum* tipo A em ágar TPGY adicionado de púrpura de bromocresol e gema de ovo.

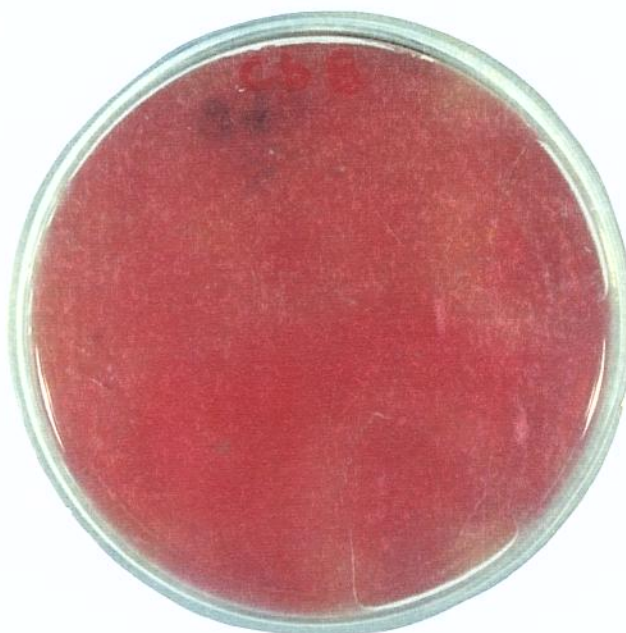


FIGURA 5. Colônias de *Clostridium botulinum* tipo B em ágar TPGY adicionado de púrpura de bromocresol e gema de ovo.



FIGURA 6. Colônias de *Clostridium botulinum* tipo E em ágar TPGY adicionado de púrpura de bromocresol e gema de ovo.

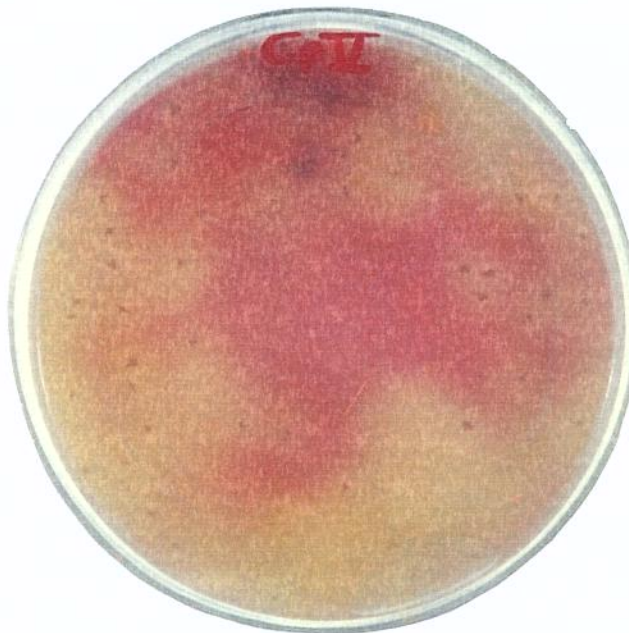


FIGURA 7. Colônias de *Clostridium perfringens* em ágar TPGY adicionado de púrpura de bromocresol e gema de ovo.



FIGURA 8. Colônias de *Clostridium sporogenes* em ágar TPGY adicionado de púrpura de bromocresol e gema de ovo.

5.2. Ocorrência de *Clostridium botulinum* no trato intestinal de peixes fluviais e lacustres e em sedimentos de tanques de criação

Nas Tabelas 8 e 9 podem ser observados os resultados gerais obtidos no estudo da ocorrência de esporos de *C. botulinum*. Foram analisadas um total de 200 amostras de vísceras de peixes e 100 amostras de sedimentos, resultando em um percentual de ocorrência correspondente a 1% das amostras de vísceras analisadas e de 8% das amostras de sedimentos. Concentrando-se nas amostras positivas, foi detectado *C. botulinum* tipo C em 1 amostra de víscera de curimatã e tipo E em 1 amostra de carpa, correspondendo a uma população estimada de 0,01NMP/g. O mesmo tipo E de *C. botulinum* também foi detectado em 1 amostra de sedimento de tanque de criação de truta, correspondendo a 0,01NMP/g. Em 3 amostras de sedimentos provenientes de um tanque de criação de pacu foi constatado o *C. botulinum* tipo C, numa população de 0,05NMP/g. O resumo destes resultados consta na Tabela 10.

Através da técnica de contagem em placas utilizando o ágar TPGY-ot não foi detectado *C. botulinum* em nenhuma das amostras de vísceras de peixes e sedimentos analisadas. O limite de detecção do método empregado foi de 1,0UFC/g, permitindo estimar a população de *C. botulinum* como sendo <1,0UFC/g. Com base neste limite, pode-se inferir que este resultado está de acordo com o obtido pela técnica do NMP, que permitiu estimar uma população máxima de apenas 0,05NMP/g.

A incidência de *C. botulinum* nas vísceras de peixes e sedimentos dos tanques de criação apresentou-se baixa quando comparada aos resultados relatados por Huss (1974) e Burns & Williams (1975), que encontraram índices variando de 0 a >300NMP/kg, com predominância dos tipos B não-proteolíticos na Escócia e E na Dinamarca e Alemanha. Em nossa pesquisa, o tipo predominante foi o C, detectado em vísceras de curimatã coletado em Pirassununga e em sedimentos de tanque de pacu, em Registro, no verão e no inverno e, provavelmente, em uma amostra de sedimento coletada em outro tanque de criação de tilápia, em Monte-Mor. Nessa amostra, os camundongos morreram com

sintomas típicos de botulismo, ocorreu a neutralização da toxina após fervura em banho-maria durante 10 minutos, a neutralização parcial com as antitoxinas tipos A, B, E, F e G (com morte de um ou dois camundongos do par ou dos pares inoculados), provavelmente devido a baixa toxicidade desta cepa; ocorreu neutralização com as antitoxinas tipos C e D (sobrevivência dos pares de camundongos inoculados), conduzindo à maior chance de tratar-se de uma cepa de um destes tipos.

Nos casos onde o tipo C (ou D) de *C. botulinum* foi detectado em sedimentos, havia criação de aves e pastagem de bovinos próximas aos tanques. No Brasil, existem diversos trabalhos científicos mostrando a presença de *C. botulinum* tipos C e D no ambiente aquático e envolvendo-o em surtos de botulismo em bovinos e aves (Portugal et al., 1991; Baldassi et al., 1991; Dutra et al., 2001).

TABELA 8. Resultados gerais da ocorrência de *C. botulinum* em vísceras de peixes fluviais e lacustres.

Espécime de peixe analisada	Local (SP, Brasil)	Estação do ano	Nº de amostras positivas	Tipo de <i>C. botulinum</i> identificado
Truta	Campos do Jordão	Verão	0	E
		Inverno	0	
	Bananal	Verão	0	
		Inverno	0	
Carpa	São Paulo	Verão	0	
		Inverno	1	
	Indaiatuba	Verão	0	
		Inverno	0	
Tilápia	Pindamonhangaba	Verão	0	C
		Inverno	0	
	Monte-Mor	Verão	0	
		Inverno	0	
Curimatá	Pindamonhangaba	Verão	0	
		Inverno	0	
	Pirassununga	Verão	0	
		Inverno	1	
Pacu	Pirassununga	Verão	0	
		Inverno	0	
	Registro	Verão	0	
		Inverno	0	

TABELA 9. Resultados gerais da ocorrência de *C. botulinum* em sedimentos de tanques de criação de peixes.

Espécime de peixe criada	Local (SP, Brasil)	Estação do ano	Nº de amostras positivas	Tipo de <i>C. botulinum</i> identificado
Truta	Campos do Jordão	Verão	0	E
		Inverno	0	
	Bananal	Verão	0	
		Inverno	1	
Carpa	São Paulo	Verão	0	
		Inverno	0	
	Indaiatuba	Verão	0	
		Inverno	0	
Tilápia	Pindamonhangaba	Verão	0	NC*
		Inverno	0	
	Monte-Mor	Verão	1	
		Inverno	0	
Curimatá	Pindamonhangaba	Verão	0	
		Inverno	0	
	Pirassununga	Verão	0	
		Inverno	0	
Pacu	Pirassununga	Verão	0	
		Inverno	0	
	Registro	Verão	3	
		Inverno	3	

* Não confirmado, provavelmente tipo C ou D.

TABELA 10. Resumo dos resultados de amostras positivas para *C. botulinum*.

Natureza da amostra	Amostras analisadas (Nº)	Amostras contaminadas (Nº)	(%)	Tipos identificados	Estimativa da contaminação (NMP/g)
Vísceras de carpa	40	1	2,5	E	0,01
Vísceras de curimatá	40	1	2,5	C	0,01
Sedimentos / truta	20	1	5,0	E	0,01
Sedimentos / pacu	20	6	30,0	C	0,05

5.3. Avaliação da eficiência dos métodos alternativos para o isolamento e identificação bioquímica de *Clostridium botulinum*

Foram selecionadas para identificação um total de 72 culturas isoladas consideradas presuntivamente típicas com base em características culturais no ágar TPGY-ot; estas culturas foram purificadas em ágar Anaeróbio-Gema de Ovo (EYA), seguido de exame microscópico em contraste de fase e observação da presença de células em forma de bastonetes, com ou sem esporos livres, ou com esporângio dilatado e com observação das reações de lipases no ágar EYA. Através do uso do sistema “Rapid ID32A” para identificação de bactérias anaeróbias, as culturas previamente selecionadas foram caracterizadas como pertencentes a 7 espécies diferentes, a saber: *C. botulinum*, *C. bifermentans*, *C. difficile*, *C. tyrobutyricum*, *C. tetani*, *C. septicum* e *C. perfringens*, conforme Tabelas 11 e 12.

TABELA 11. Identificação bioquímica das culturas presuntivamente típicas de *Clostridium botulinum* com base em características culturais.

Código da cultura	Característica da colônia no Agar TPGY-ot	Morfologia (Contraste de fase)	Lipase*	Lecitinase*	Identificação (Rapid ID32A)
3.1	2H	Bastonetes, poucos esporos presentes	+	+	<i>C. botulinum</i>
12.1	1HOP	Bastonetes e esporos livres	+	+	<i>C. botulinum</i>
13.1	1HOP	Bastonetes e esporos livres	+	+	<i>C. botulinum</i>
15.1	2H	Bastonetes, poucos esporos presentes	+	+	<i>C. botulinum</i>
16.1	2H	Bastonetes e esporos livres	+	+	<i>C. botulinum</i>
18.1	2H	Bastonetes e esporos livres	+	+	<i>C. botulinum</i>
20.1	1HOP	Bastonetes e esporos livres	+	-	<i>C. botulinum</i>
30.1	1HOP	Esporos livres	-	+	<i>C. bifermentans</i>
30.2	2H	Bastonetes com extremidades retas	+	+	<i>C. botulinum</i>
30.3	1HOP	Esporos livres	-	+	<i>C. bifermentans</i>
41.1	1HOP	Bastonetes e esporos livres	d	d	<i>C. difficile</i>
48.1	1HOP	Bastonetes, poucos esporos presentes	+	+	<i>C. botulinum</i>
50.1	1HT	Bastonetes e esporos livres	d	+	<i>C. botulinum</i>
54.1	2H	Bastonetes com esporângio subterminal ligeiramente dilatado e esporos livres	-	+	<i>C. difficile</i>

2H = presença de 2 halos ao redor da colônia, sendo um halo opaco circundado externamente por outro halo transparente.

1HOP = presença isolada de halo opaco

1HT = presença isolada de halo transparente

* = reação das enzimas observadas em ágar EYA

+ = reação positiva

- = reação negativa

d = reação duvidosa

TABELA 11. Continuação

Código da cultura	Característica da colônia no Agar TPGY-ot	Morfologia (Contraste de fase)	Lipase*	Lecitinase*	Identidade (Rapid ID32A)
54.2	2H	Bastonetes e esporos livres	+	+	<i>C. difficile</i>
55.1	2H	Bastonetes e esporos livres	+	-	<i>C. tyrobutyricum</i>
55.2	2H	Esporos livres	+	+	<i>C. difficile</i>
56.1	2H	Bastonetes, poucos esporos presentes	+	+	<i>C. botulinum</i>
58.1	2H	Bastonetes com esporângio subterminal dilatado	+	d	<i>C. difficile</i>
60.1	2H	Bastonetes, poucos esporos presentes	+	-	<i>C. tyrobutyricum</i>
61.1	1HOP	Esporos livres	-	+	<i>C. bifermentans</i>
62.1	1HOP	Esporos livres	d	+	<i>C. bifermentans</i>
62.2	1HOP	Esporos livres	-	+	<i>C. bifermentans</i>
63.1	1HOP	Esporos livres	-	+	<i>C. bifermentans</i>
63.2	1HOP	Esporos livres	-	+	<i>C. bifermentans</i>
63.3	1HOP	Esporos livres	-	-	<i>C. tyrobutyricum</i>
63.4	1HOP	Esporos livres	-	+	<i>C. bifermentans</i>
65.1	1HOP	Bastonetes, poucos esporos presentes	-	+	<i>C. bifermentans</i>
65.2	1HT	Esporos livres	-	+	<i>C. bifermentans</i>
65.3	1HOP	Esporos livres	-	+	<i>C. bifermentans</i>
67.1	1HOP	Esporos livres	-	+	<i>C. bifermentans</i>
68.1	1HOP	Bastonetes	-	+	<i>C. bifermentans</i>
70.1	1HOP	Esporos livres	-	+	<i>C. bifermentans</i>
70.2	1HOP	Esporos livres	-	+	<i>C. bifermentans</i>
70.3	1HOP	Esporos livres	-	+	<i>C. bifermentans</i>
84.1	1HOP	Bastonetes e esporos livres	+	+	<i>C. botulinum</i>
86.1	1HOP	Esporos livres	+	+	<i>C. botulinum</i>
86.2	1HOP	Esporos livres	-	-	<i>C. septicum</i>
88.1	1HOP	Bastonetes com esporângio subterminal dilatado	+	+	<i>C. bifermentans</i>

TABELA 11. Continuação

Código da cultura	Característica da colônia no Agar TPGY-ot	Morfologia (Contraste de fase)	Lipase*	Lecitinase*	Identidade (Rapid ID32A)
88.2	1HOP	Bastonetes	-	+	<i>C. botulinum</i>
88.3	1HOP	Bastonetes	+	+	<i>C. bifermentans</i>
90.1	2H	Bastonetes	+	+	<i>C. botulinum</i>
113.1	1H	Bastonetes e esporos livres	+	-	<i>C. tetani</i>
117.1	2H	Bastonetes e esporos livres	+	+	<i>C. botulinum</i>
117.2	2H	Bastonetes e esporos livres	+	+	<i>C. botulinum</i>
118.1	2H	Bastonetes e esporos livres	+	+	<i>C. botulinum</i>
118.2	2H	Bastonetes e esporos livres	+	+	<i>C. botulinum</i>
120.1	2H	Bastonetes	+	+	<i>C. botulinum</i>
127.1	1HOP	Bastonetes e esporos livres	+	-	<i>C. botulinum</i>
131.1	1HOP	Bastonetes	-	+	<i>C. tyrobutyricum</i>
132.1	2H	Esporos livres	-	+	<i>C. bifermentans</i>
135.1	2H	Esporos livres	-	+	<i>C. tyrobutyricum</i>
136.1	1HOP	Bastonetes	+	+	<i>C. bifermentans</i>
139.1	1HOP	Esporos livres	+	+	<i>C. botulinum</i>
140.1	1HOP	Bastonetes	+	+	<i>C. botulinum</i>
155.1	1HOP	Bastonetes	+	-	<i>C. difficile</i>
157.1	2H	Bastonetes com esporângio subterminal dilatado	+	-	<i>C. difficile</i>
196.1	2H	Bastonetes e esporos livres	+	+	<i>C. bifermentans</i>
1.1s	2H	Bastonetes	+	+	<i>C. botulinum</i>
52.1s	2H	Bastonetes com esporângio subterminal dilatado	+	+	<i>C. botulinum</i>
55.1s	1H	Esporos livres	+	+	<i>C. botulinum</i>
63.1s	1HOP	Esporos livres	+	+	<i>C. botulinum</i>
63.2s	1 HOP	Esporos livres	+	+	<i>C. botulinum</i>
71.1s	2H	Bastonetes	+	+	<i>C. botulinum</i>
71.2s	1HOP	Bastonetes	+	+	<i>C. bifermentans</i>
74.1s	1HOP	Bastonetes	-	+	<i>C. perfringens</i>

TABELA 11. Continuação

Código da cultura	Característica da colônia no Agar TPGY-ot	Morfologia (Contraste de fase)	Lipase*	Lecitinase*	Identidade (Rapid ID32A)
103.1s	2H	Bastonetes, poucos esporos livres	+	-	<i>C. botulinum</i>
104.1s	2H	Bastonetes e esporos livres	+	-	<i>C. botulinum</i>
105.1s	2H	Bastonetes e esporos livres	+	-	<i>C. botulinum</i>
111.1s	2H	Bastonetes, poucos esporos livres	+	-	<i>C. botulinum</i>
152.1s	2H	Bastonetes com esporângio subterminal pouco dilatado	-	+	<i>C. bifermentans</i>
155.1s	1HOP	Bastonetes com esporângio subterminal dilatado	+	-	<i>C. botulinum</i>

TABELA 12. Resumo dos resultados de identificação de 72 culturas presuntivas de *C. botulinum* com base em testes bioquímicos rápidos (Sistema Rapid ID32A).

<i>Clostridium</i> sp identificado	Ocorrência	
	Nº	%
<i>C. botulinum</i>	34	47,2
<i>C. bifermentans</i>	23	31,9
<i>C. difficile</i>	7	9,7
<i>C. tyrobutyricum</i>	5	6,9
<i>C. tetani</i>	1	1,4
<i>C. septicum</i>	1	1,4
<i>C. perfringens</i>	1	1,4

De acordo com as instruções do fabricante do sistema “Rapid ID32A”, as cepas caracterizadas como *C. botulinum* deveriam ser necessariamente confirmadas quanto à produção de toxina botulínica. No entanto, pela execução do ensaio biológico, nenhuma das culturas testadas foi confirmada como *C. botulinum*, evidenciando, portanto, a insuficiência do sistema “Rapid ID32A” na caracterização desta espécie. Quanto à caracterização de outras espécies de *Clostridium*, Fontana et al. (1995), utilizando o sistema “Rapid ID32A”, conseguiram identificar corretamente apenas 10 cepas de um total de 55 culturas testadas que compreendiam *C. bifermentans*, *C. perfringens*, *C. difficile* e *C. sordellii*. Ainda na presente pesquisa, alguns resultados observados na identificação de outros *Clostridium* sp merecem uma melhor avaliação; assim, nas culturas de códigos 54.1, 54.2, 55.2, 58.1, 155.1 e 157.1 (Tabela 11), identificadas como *C. difficile* ocorreram produções de lipase e/ou lecitinase, em contradição com a descrição desta espécie no Bergey’s Manual (Sneath et al., 1986). Esta contradição também ocorreu nas culturas 55.1, 60.1, 131.1 e 135.1, identificadas como *C. tyrobutyricum*.

Os resultados obtidos, confirmados por dados esparsos de outros autores, evidenciam o desempenho insatisfatório do sistema “Rapid ID32A” na identificação presuntiva de culturas do gênero *Clostridium*; a rapidez na obtenção dos resultados não justifica os inconvenientes representados pelo custo elevado das análises e principalmente a baixa confiabilidade nos resultados.

5.4. Desenvolvimento de *Clostridium botulinum* em filés de tilápia armazenados em diferentes atmosferas e temperaturas e influência do lactato de sódio na inibição do microrganismo

Na Tabela 13 estão contidos os resultados das análises das amostras de filés de tilápia utilizadas na execução dos diversos experimentos.

TABELA 13. Resultados das análises microbiológicas e físico-químicas iniciais nos filés de tilápia utilizados nos experimentos.

Tratamento	Contagem de microrganismos		Eh (mV)	pH	Aw (a 20°C±0,2°C)
	(logUFC/g)				
	Psicrotróficos	Mesófilos microaerófilos			
Sem lactato	6,6	6,5	20,4	6,47	0,990
Com lactato	6,7	6,7	-2,4	6,48	0,989

Observa-se pelos resultados que a carga mínima inicial de microrganismos psicrotróficos e de microrganismos microaerófilos, provavelmente com predominância de bactérias lácticas, já era bastante elevada, antevendo um tempo de vida de prateleira (shelf life) bastante restrito. Por outro lado, os valores de pH, Eh, e Aw eram satisfatórios para o desenvolvimento microbiano, sem evidências maiores de um efeito germicida ou de outra natureza em decorrência da presença de lactato de sódio.

Nas Tabelas 14 e 15 são relatados os resultados obtidos nos testes de armazenamento dos filés de tilápia, introduzindo como variáveis a presença ou ausência de lactato de sódio, a variação na temperatura (4°C e 12°C) e a atmosfera envolvendo os filés.

TABELA 14. Resultados das determinações microbiológicas e físico-químicas nos filés de tilápia estocados à temperatura de 4°C.

Período de incubação (dias)	Tratamento/Atmosfera	Contagem de Microrganismos (logUFC/g)		Eh (mV)	pH
		Mesófilos			
		Psicrotróficos	microaerófilos		
4	Sem lactato/Normal	8,6	9,1	-174,0	6,50
	Com lactato/Normal	8,6	8,8	-370,8	6,69
	Sem lactato/Modificada	6,6	7,4	-25,5	6,16
	Com lactato/Modificada	6,6	7,6	-25,3	6,32
7	Sem lactato/Normal	8,5	9,6	-	-
	Com lactato/Normal	8,4	9,2	-	-
	Sem lactato/Modificada	7,6	8,8	-105,2	6,40
	Com lactato/Modificada	7,6	8,6	-60,2	6,33
15	Sem lactato/Modificada	7,5	8,2	-91,6	6,37
	Com lactato/Modificada	7,4	8,0	-63,3	6,19
21	Sem lactato/Modificada	7,5	8,6	-128,1	6,21
	Com lactato/Modificada	7,5	8,6	-213,5	6,37

TABELA 15. Resultados das determinações microbiológicas e físico-químicas nos filés de tilápia estocados à temperatura de 12°C.

Período de incubação (dias)	Tratamento/Atmosfera	Contagem de Microrganismos		Eh (mV)	pH
		(logUFC/g)			
		Psicrotróficos	Mesófilos microaerófilos		
3	Sem lactato/Normal	8,5	8,8	-301,0	6,23
	Com lactato/Normal	8,4	8,8	-209,1	6,38
	Sem lactato/Modificada	7,5	8,4	-45,9	6,05
	Com lactato/Modificada	7,4	8,4	-25,7	5,97

Com base nos resultados expressos nas Tabelas 14 e 15, observamos que o tratamento por imersão dos filés de tilápia em solução aquosa a 4% de lactato de sódio não se mostrou eficiente na redução da microbiota deterioradora dos filés; observamos, também, que nas amostras acondicionadas em atmosfera modificada as contagens de microrganismos psicrotróficos e mesófilos microaerófilos aumentaram mais lentamente e atingiram valores finais menores do que nas amostras acondicionadas em filme permeável de PVC, que, após 4 dias de incubação à temperatura de 4°C, já haviam atingido população na ordem de $8,6 \log \text{UFC/g}$. A concentração mínima de oxigênio atingida inicialmente nos filés de tilápia acondicionados em atmosfera modificada foi de aproximadamente 0,5% (medição realizada em triplicata). Após 21 dias de estocagem à temperatura de 4°C a composição gasosa das amostras foi determinada, contendo 0,00% de O_2 , 66,3% de CO_2 e 34,7% de N_2 (bal). A esse tempo, observava-se odor indesejável no momento da abertura da embalagem que desaparecia após exposição das amostras ao ar.

Quanto aos valores de pH, os resultados obtidos mostram uma redução ao longo do tempo de armazenamento, em níveis máximos de 0,4, passando de 6,4 a valores próximos de 6,0. É provável que o desenvolvimento de mesófilos microaerófilos, incluindo as bactérias lácticas, tenha influência nesta gradual redução; por outro lado, deve ser considerado que, principalmente em pescado, no momento de deterioração há formação de aminas, que tendem a provocar uma alcalinização do substrato (Elliott et al., 1988). De qualquer forma, em todos os ensaios, independentemente do uso de lactato, de atmosfera modificada e de temperaturas mais ou menos elevadas, as contagens microbianas de psicrotróficos e de microaerófilos foram bastante elevadas, rapidamente alcançando valores de $7-8 \log \text{UFC/g}$ já indicativos de uma alteração organoléptica do substrato (Elliott et al., 1988).

Com referência ao uso do lactato de sódio como antimicrobiano, observamos que nas pesquisas relatadas anteriormente, tais como as realizadas por Maas et al. (1989) e por Meng & Genigeorgis (1994), foi observado diminuição

do crescimento de microrganismos e prolongamento da vida de prateleira dos produtos avaliados, retardando a toxigênese de *C. botulinum*. Nossos resultados, baseando-se no fato de que a forma de introdução do lactato de sódio nas amostras avaliadas foi diferente, não podem ser considerados contraditórios. Nas pesquisas anteriormente mencionadas o lactato foi incorporado por homogeneização no produto, sendo adicionado durante suas formulações, pouco se sabendo a respeito do efeito antimicrobiano deste sal em tratamentos por imersão.

Finalmente, na Tabela 16 estão contidos os resultados dos testes de avaliação do crescimento e produção de toxina por *C. botulinum* inoculado experimentalmente nas amostras.

TABELA 16. Produção de toxina botulínica em filés de tilápia estocados a 4°C e 12°C.

Período de incubação (dias)	Temperatura de estocagem (°C)	Tratamento/Atmosfera	Toxina botulínica (*)
5	12	Sem lactato/Normal	Presente (2/3)
		Com lactato/Normal	Presente (1/3)
		Sem lactato/Modificada	Presente (3/3)
		Com lactato/Modificada	Presente (2/3)
10	4	Sem lactato/Normal	Ausente (0/3)
		Com lactato/Normal	Ausente (0/3)
		Sem lactato/Modificada	Ausente (0/3)
		Com lactato/Modificada	Ausente (0/3)
15	4	Sem lactato/Normal	Ausente (0/3)
		Com lactato/Normal	Ausente (0/3)
		Sem lactato/Modificada	Ausente (0/3)
		Com lactato/Modificada	Ausente (0/3)
30	4	Sem lactato/Modificada	Ausente (0/3)
		Com lactato/Modificada	Ausente (0/3)
45	4	Sem lactato/Modificada	Ausente (0/3)
		Com lactato/Modificada	Ausente (0/3)

(*) = Número de amostras positivas/Número de amostras analisadas

Os resultados evidenciam que a 4°C, independente das variações nos outros obstáculos (lactato, atmosfera), não houve produção de toxina botulínica mesmo após 45 dias de incubação, situação em que as amostras estavam totalmente deterioradas. No entanto, à temperatura de 12°C e com 5 dias de estocagem, o desenvolvimento e produção de toxina por parte de *C. botulinum* foi positivada em todos os ensaios, não ficando definida claramente uma inibição em decorrência da atmosfera modificada ou da presença de lactato de sódio, embora

o percentual de positividade tenha sido menor quando o mesmo foi utilizado (3 e 5 unidades de amostras positivas com uso e sem uso, respectivamente).

Reddy et al. (1997) não detectaram produção de toxina em filés de tilápia inoculados com cepas de *C. botulinum* tipo E estocados a 4°C. Nessa pesquisa, filés de tilápia acondicionados em condições atmosféricas gasosas normais (100% ar), a vácuo e em atmosfera modificada com 75% de CO₂ e 25% de N₂ apresentaram-se deteriorados, com base em características sensoriais, aos 10, 47 e 80 dias de estocagem, respectivamente. Lobera (citado por Reddy et al., 1996), Garcia et al. (1987) e Ikawa & Genigeorges (1987) também não detectaram toxina botulínica antes da ocorrência de alterações sensoriais em diferentes espécies de filés de pescado acondicionados sob 100% CO₂ e 70% CO₂ + 30% ar, estocados em temperatura na faixa de 4,0 a 4,4°C. Em contraste, Post et al. (1985) encontraram toxina botulínica antes que alterações sensoriais fossem detectadas em bacalhau fresco e em filés acondicionados em atmosfera com 100% CO₂ e estocados a 4°C.

De acordo com Reddy et al. (1996), a margem de segurança entre alteração sensorial e toxigenese de *C. botulinum* em filés de tilápia acondicionados sob atmosfera modificada diminui à medida que a temperatura de estocagem aumenta. Isto ocorre porque nesta situação, o desenvolvimento de microrganismos deterioradores coincide com o crescimento e produção de toxina por *C. botulinum*.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste estudo são possíveis as seguintes conclusões:

6.1. O ágar TPGY modificado, utilizado como meio seletivo e de diferenciação para *C. botulinum*, mostrou-se válido na identificação preliminar de cepas proteolíticas da bactéria, sendo inibitório para as do tipo E, não proteolíticas. Assim mesmo, outros clostrídios putrefativos anaeróbios podem apresentar características culturais similares, razão pela qual a utilidade do meio seria restrita apenas a uma triagem inicial.

6.2. A ocorrência de *C. botulinum* em amostras de vísceras de peixes fluviais e lacustres e de sedimentos de tanques de criação foi muito reduzida, em níveis de 1% e 8%, respectivamente, constatando-se apenas a presença de cepas dos tipos C e E da bactéria.

6.3. Também em termos quantitativos as populações de *C. botulinum* constatadas nas amostras positivas de vísceras e sedimentos foram muito reduzidas, na faixa de 0,01 a 0,05NMP/g .

6.4. O sistema de identificação bioquímica rápida de anaeróbios, Rapid ID 32A, revelou-se bastante deficiente, não permitindo a identificação segura de *C. botulinum* e mesmo de outras espécies do gênero *Clostridium*.

6.5. Filés de tilápia inoculados experimentalmente com esporos de *C. botulinum* não se tornaram tóxicos após armazenamento a 4°C durante 45 dias, em atmosfera modificada; no entanto, pela elevação da temperatura para 12°C, a toxicidade foi comprovada, independentemente do uso de outros obstáculos como o lactato ou a atmosfera modificada.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BALDASSI, L., HIPOLITO, M., CALIL, E. M. B. Botulismo em duas espécies animais que compartilham a água como habitat. **Resumos da 4ª Reunião Anual do Instituto Biológico**, São Paulo, n. 74, p.37, 1991.
2. BANWART, G. L. **Basic Food Microbiology**, Westport: AVI, 1979, 781p.
3. BOWMER, E. J. Preparation and assay of the International Standards for *Clostridium botulinum* types A, B, C, D and E antitoxins. **Bulletin of the World Health Organization**, New York, v.29, p. 701-709, 1963.
4. BURNS, G. F., WILLIAMS, H. *Clostridium botulinum* in Scottish fish farm and farmed trout. **Journal of Hygiene**, London, v.74, p. 1-6, 1975.
5. CENTER FOR DISEASE CONTROL. **Botulism in the United States, 1899-1977: Handbook for Epidemiologists, Clinicians and Laboratory Workers**, Washington: U. S. Department of Health, Education and Welfare, 1979. 41p (Public Health Service Publication n. (CDC) 74-8279.
6. DELAZARI, I., CAMARGO, R., LEITÃO, M. F. F. *Clostridium botulinum* em pescado do litoral do Estado de São Paulo. I: Ocorrência em pescada-foguete (*Macrodon ancylodon*), bagre-do-mar (*Netuna barba*) e sardinha verdadeira (*Sardinella brasiliensis*). **Colêanea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 12, p. 163-177, 1981-1982.
7. DE WIT, J. C., ROMBOUTS, F. M. Antimicrobial activity of sodium lactate. **Food Microbiology**, London, v. 7, p. 113-120, 1990.
8. DEZFULIAN, M., McCROSKEY, L. M., HATHEWAY, C. L. Selective medium for isolation of *Clostridium botulinum* from human feces. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 13, p.526-531, 1981.

9. DOLMAN, C. E. Botulism as a world health problem. In: LEWIS, R. H., CASSEL, Jr. K. **Botulism**. Washington: U.S. Department of Health, Education and Welfare, 1964, p. 3-32.
10. DUTRA, I. S., DÖBEREINER, J., ROSA, I. V., SOUZA, L. A. A., NONATO, M. Surtos de botulismo em bovinos no Brasil associados à ingestão de água contaminada. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 2, p. 43-48, 2001.
11. EKLUND, M. E. Significance of *Clostridium botulinum* in fishery products preserved short of sterilization. **Food Technology**, Chicago, v. 36, n. 12, p. 107-112, 115, 1982.
12. _____. Control in fishery products. In: HAUSCHILD, A. H. W., DODDS, K. L. ***Clostridium botulinum: Ecology and Control in Foods***. New York: Marcel Dekker, Inc., 1992, p. 209-232.
13. ELLIOTT, R. P., CLARK, D. S., LEWIS, K. H. **Microorganisms in foods. Their significance and methods of enumeration**. International Commission on Microbiological Specification for Foods. 2.ed., Toronto: University of Toronto Press, 1988. v. 1, 435p.
14. FONTANA, C., JEZZI, T., TESTORE, J. P., DAINELLI, B. Differentiation of *Clostridium difficile*, *Clostridium bifermentans*, *Clostridium sordellii*, and *Clostridium perfringens* from diarrheal stool by API ZYM and API LRA oxidase test. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v. 39, p. 231-235, 1995.
15. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION **Bacteriological Analytical Manual**, 6.ed. Arlington, VA: Association of Official Analytical Chemists, 1984.
16. FUTTER, B. J., RICHARDSON, G. Anaerobic jars in the quantitative recovery of clostridia. In: SHAPTON, D. A., BOARD, R. G. **Isolation of anaerobes**. London: Academic Press, 1971. p. 81-91.

17. GARCIA, G. W., GENIGEORGES, C. A., LINDROTH, S. E. Risk of growth and toxin production by *Clostridium botulinum* non-proteolytic types B, E and F in salmon fillets stored under modified atmospheres at low and abused temperatures. **Journal of Food Protection**, Des Moines, IA, v. 50, p. 330-336, 1987.
18. HALL, J. D., McCROSKEY, L. M., PINCOMP, B. J. Isolation of an organism resembling *Clostridium barati* which produces type F botulinal toxin from an infant with botulism. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.21, p. 654-655, 1985.
19. HALVORSON, H. O., ZIEGLER, A. Application of statistics to problems in bacteriology. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 25, p. 101-121, 1933.
20. HATHEWAY, C. L., McCROSKEY, L. M. Laboratory investigation of human and animal botulism. In: **Biomedical Aspects of Botulism**. New York: Academic Press, 1981, p.165-180.
21. HAUSCHILD, A. H. W., ARIS, B. J., HILSHEIMER, R. *Clostridium botulinum* in marinated products. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, Ottawa, v. 8, p. 84-88, 1975.
22. _____, HILSHEIMER, R. Enumeration of *Clostridium botulinum* spores in meats by a pour-plate procedure. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 23, n. 6, p. 829-832, 1977.
23. HAUSCHILD, A. H. W. *Clostridium botulinum*. In: DOYLE, M. P. **Foodborne Bacterial Pathogens**. New York: Marcel Dekker, 1989. p. 111-189.
24. HEALTH PROTECTION BRANCH LABORATORIES Detection of *Clostridium botulinum* and its toxins in foods. **MPA-16**, Ottawa, 1973. 19p.

25. HIELM, S., HYYTIÄ, E., RIDELL, J., KORKEALA, H. Detection of *Clostridium botulinum* in fish and environmental samples using polimerase chain reaction. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 31, p. 357-365, 1996.
26. HILL, W. E. The polimerase chain reaction: applications for the detection of foodborne pathogens. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 36, p. 123-173, 1996.
27. HOBBS, G., CROWTHER, J. S., NEAVES, P. Detection and identification methods for food poisoning organisms. **Society for Applied Bacteriology Symposium Series**, San Diego, v. 17, p. 151-164, 1982.
28. HOLDEMANN, L. V., BROOKS, J. B. Variation among strains of *Clostridium botulinum*, and related clostridia. In: **US-Japan Conference on Toxic Microorganisms, 1, 1968. Proceedings**. Washington: U. S. Government Printing Office, 1970, p. 278-286.
29. _____, CATO, E. P., MOORE, W. E. C. **Anaerobe laboratory manual**. 4.ed. Backsburg, VA: Virginia Polytechnic Institute and State University, 1977.
30. HOUTSMA, P. C., HEUVELINK, A., DUFRENNE, J., NOTERMANS, S. Effect of sodium lactate on toxin production, spore germination and heat resistance of proteolytic *Clostridium botulinum* strains. **Journal of Food Protection**, Des Moines, IA, v. 57, n. 4, p. 327-330, 1994.
31. HUSS, H. H., PEDERSEN, A., CANN, D. C. The incidence of *Clostridium botulinum* in Danish trout farm I. Distribution in fish and their environment. **Journal of Food Technology**, Oxford, v.9, p. 445-450, 1974.
32. _____ **The *Clostridium botulinum* type E and botulism**. Copenhagen: Technological Laboratory. Ministry of Fisheries. Technical University, 1981, 58p.

33. IKAWA, J. Y., GENIGEORGES, C. A. Probability of growth and toxin production by non-proteolytic *Clostridium botulinum* in rockfish fillets stored under modified atmospheres. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 4, p. 167-181, 1987.
34. INTERNATIONAL ASSOCIATION OF MILK, FOOD AND ENVIRONMENTAL SANITARIANS. **Procedures to implement the hazard analysis critical control point system**. Committee on Communicable Diseases Affecting Man, Ames, Iowa, USA, 1991, 72p.
35. KAUTTER, D. A., LYNT, R. K. *Clostridium botulinum*. In: SPECK, M. L. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 2 ed., Washington: American Public Health Association, 1984. p. 468-482.
36. LAYCOCK, R. A., LONGARD, A. A. *Clostridium botulinum* in sediments from the Canadian Atlantic seaboard. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, Ottawa, v.29, p.443-446, 1972.
37. LEISTNER, L. Nitrate (salpetre) and meat products. Situation in West Germany. **Die Fleischerei**, Bad Worishofen, Germany, v.37, n.4, p. XIV-XVI, 1986.
38. LEITÃO, M.F.F., DELAZARI, I. *Clostridium botulinum* em solos no Estado de São Paulo. **Coletânea do ITAL**, Campinas, SP, v.13, p. 75-82, 1983.
39. MAAS, M. R., GLASS, K. A., DOYLE, M. P. Sodium lactate delays toxin production by *Clostridium botulinum* in cook-in-bag turkey products. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, n. 9, p. 2226-2229, 1989.
40. McCROSKEY, L. M., HATHEWAY, C. L., FENICIA, B. Characterization of an organism that produces type E botulinal toxin but which resembles

- Clostridium botulinum* from the feces of an infant with type E botulism. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 23, p. 201-202, 1986.
41. MENG, J., GENIGEORGIS, C. A. Delaying toxigenesis of *Clostridium botulinum* by sodium lactate in "sous-vide" products. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 19, p. 20-23, 1994.
42. MILLER, R. K., ACUFF, G. R. Sodium lactate affects pathogens in cooked beef. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 59, n.1, p. 15- 19, 1994.
43. PAPADOPOULOS, L. S., MILLER, R. K., ACUFF, G. R., VANDERZANT, C., CROSS, H. R. Effect of sodium lactate on microbial and chemical composition of cooked beef during storage. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 56, n. 2, p. 341-347, 1991.
44. PORTUGAL, M. A. S. C., BALDASSI, L., CALIL, E. M. B. Surto de botulismo em anatídeos no Município de Valinhos, SP. **Resumos da 4ª Reunião Anual do Instituto Biológico**, São Paulo, n. 73, p. 37, 1991.
45. POST, L. S., LEE, D. A., SOLBERG, D. F., FURGANG, D., SPECCHIO, J., GRAHAM, C. Development of botulinal toxin and sensory deterioration during storage of vacuum and modified atmosphere packaged fish fillets. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 50, p. 990 – 996, 1985.
46. REDDY, N. R., ARMSTRONG, D. J., RHODEHAMEL, E. J., KAUTTER, D. A. Shelf-life extension and safety concerns about fresh fishery products packaged under modified atmospheres: a review. **Journal of Food Safety**, Trumbull, CT, v. 12, p. 87-118, 1992.
47. _____, SCHREIBER, C. L., BUZARD, K. S., SKINNER, G. E., ARMSTRONG, D. J. Shelf-life of tilapia fillets packaged in high barrier film with modified atmospheres. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 59, p. 260-264, 1994.

48. _____, PARADIS, A., ROMAN, M. G., SOLOMON, H. M., RHODEHAMEL, E. J. Toxin development by *Clostridium botulinum* in modified atmosphere-packaged fresh tilapia fillets during storage. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 61, n. 3, p. 632-635, 1996.
49. SAKAGUCHI, G. Botulism. In: RIEMANN, H., BREJAN, F. L. **Food Borne Infections and Intoxications**. 2.ed. New York: Academic Press, 1979, p. 389-442.
50. SERRANO, A. M., JUNQUEIRA, V. C. A. Crescimento de *Clostridium botulinum* em meios de cultura de *Clostridium perfringens*, em diferentes atmosferas anaeróbias e temperaturas de incubação. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 131-135, 1991.
51. SMITH, G. R., MORYSON C. J. *Clostridium botulinum* in the lakes and waterways of London. **Journal of Hygiene**, London, v. 75, p. 731-739, 1975.
52. _____; _____ A comparison of the distribution of *Clostridium botulinum* in soil and in lake mud. **Journal of Hygiene**, London, v. 78, p. 39-41, 1977.
53. _____, MILLIGRAN, R. A., MORYSON, C. J. *Clostridium botulinum* in aquatic environments in Great Britain and Ireland. **Journal of Hygiene**, London, v. 80, p. 431-438, 1978.
54. SMITH, L. D. S., HOBBS, G. Genus III. *Clostridium prazmowski* 1880, 23. In: BUCHANAN, R. E. et al., **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 8. ed. Baltimore: Williams & Wilkins Co., 1974, p. 551-572.
55. _____, **Botulism: The organism, its toxins, the disease**. Springfield, IL: Charles C. Thomas, 1977. 236p.

56. SNEATH, P. H. A., MAIR, N. S., SHARE, M. E. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins Co., 1986, v. 2., 1599p.
57. SONNABEND, O., SONNABEND, W., HEINZLE, R. Isolation of *Clostridium botulinum* type G and identification of type G toxin in human: report of five sudden unexpected death. **Journal of Infections Diseases**, Chicago, v. 143, p. 22-27, 1981.
58. STAMMEN, K., GERDES, D., CAPORASO, F. Modified atmosphere packaging of seafood. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, Florida, v. 29, p. 301-331, 1990.
59. SUEN, J. C., HATHEWAY, C. L., STEIGERWALT, A. G. *Clostridium argentinense* sp nov: a genetically homogenous group composed of all strains of *Clostridium botulinum* toxin type G and some nontoxigenic strains previously identified as *Clostridium subterminale* or *Clostridium hastiforme*. **International Journal on Systematic Bacteriology**, Washington, v.38. n. 4, p. 375-381, 1988.
60. SUGIYAMA, H., BOTT, T. L., SOUCHECK, J. A. *Clostridium botulinum* in Great Lakes. In: HALVORSON, H. O., HANSON, R., CAMPBELL, L. L. **Spores V**. Washington: American Society for Microbiology, 1972.
61. _____ *Clostridium botulinum* neurotoxin **Microbiological Reviews**, Washington, v. 44, n. 3, p. 419-448, 1980.
62. SZARBO, E. A., PEMBERTON, J. M., GIBSON, A. M., EYLES, M. J., DESMARCHELIER, P. M. Polymerase chain reaction for detection of *Clostridium botulinum* types A, B and E in food, soil and infant faeces. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 76, p. 539-545, 1994.

63. VANDERZANT, C., SPLITTSTOESSER, D. F. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 3.ed. Washington: American Public Health Association, 1992, 1219p.
64. WARD, B. Q., CARROLL, B. J., GARRETT, E. S., REESE, G. B. Survey of the U.S. Gulf Coast for the presence of *Clostridium botulinum*. **Applied Microbiology**, Washington, v. 15, p. 629-636, 1967a.
65. _____, GARRET, E. S., REESE, G. B. Further indication of *Clostridium botulinum* in Latin America waters. **Applied Microbiology**, Washington, v. 15, p. 1509, 1967b.
66. WICTOME, M., NEWTON, K., JAMESON, K., HALLIS, B., DUNIGAN, P., MACKAY, E., CLARKE, S., TAYLOR, R., GAZE, J., FOSTER, K., SHONE, C. Development of an in vitro bioassay for *Clostridium botulinum* type B neurotoxin in foods that is more sensitive than the mouse bioassay. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 9, p. 3787-3792, 1999.