

**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS**

mestrado

BC/53058

IB/81940

INSTITUTO DE BIOLOGIA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



Rosa Maria Moraes Ferreira

CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL PELO *Clostridium Botulinum* TIPOS C E D DE VALAS DE CAPTAÇÃO HÍDRICA E CULTIVO DO MICRORGANISMO EM UM SISTEMA EXPERIMENTAL

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Rosa Maria Moraes Ferreira e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular na área de Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Iveraldo dos Santos Dutra

-2002-

| | |
|------------|-------------------------------------|
| UNIDADE | 11-81940 |
| Nº CHAMADA | |
| V | EX |
| TOMBO BC/ | S3058 |
| PROC. | 16-124103 |
| C | <input type="checkbox"/> |
| D | <input checked="" type="checkbox"/> |
| PREÇO | 28,11,00 |
| DATA | 08/04/03 |
| Nº CPD | |

UNICAMP 4.1.2.5

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

F414c

Ferreira, Rosa Maria Moraes

Contaminação ambiental pelo *Clostridium botulinum* tipos C e D de valas de captação hídrica e cultivo do microrganismo em um sistema experimental/Rosa Maria Moraes Ferreira. – Campinas, SP:[s.n.], 2002

Orientador: Iveraldo dos Santos Dutra

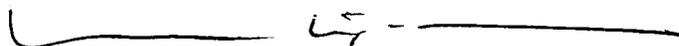
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia

1. *Clostridium botulinum*. 2. Contaminação ambiental. 3. Água. I. Dutra, Iveraldo dos Santos. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

BANCA EXAMINADORA

Titulares:

Prof. Dr. Iveraldo dos Santos Dutra



Prof. Dr. Tomomasa Yano



Prof. Dr. Luiz Augusto do Amaral



Profa. Dra. Clarice Weis Arns

*Aos meus pais Antonio Nascimento Ferreira e
Maria Neusa Moraes Ferreira.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Iveraldo dos Santos Dutra, pela credibilidade, compreensão e sabedoria.

A Profa. Dra. Silvia Helena Venturoli Perri, pela dedicação, sabedoria e pelos préstimos na aplicação da estatística.

Ao Prof. Dr. Aires Manoel de Souza, por fazer parte da minha Pré-Banca e por sua valiosa contribuição.

Ao Prof. Dr. Domingos da Silva Leite, pela simplicidade, sabedoria, amizade e pela valiosa contribuição como membro da minha qualificação e Pré-Banca.

A Profa. Dra. Lucila Costallat Ricci pela participação como na minha banca qualificação.

Ao Corpo Técnico Administrativo e Bibliotecários da UNICAMP (IB) pelos seus préstimos.

Aos funcionários da Biblioteca da UNESP- Campus de Araçatuba , pelos seus préstimos.

Aos meus sobrinhos Andréa e Alexandre pelo auxílio e colaboração na parte de computação.

Aos funcionários do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal: Iraci, Gilmara e Devani, e a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

Sumário

| Ítem | Descrição | Página |
|------|--|--------|
| | LISTA DE FIGURAS..... | viii |
| | LISTA DE TABELAS..... | x |
| | LISTA DE QUADROS..... | xii |
| | RESUMO..... | xiii |
| | ABSTRACT..... | xv |
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA..... | 3 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 12 |
| | 3.1 Local de Realização do Trabalho..... | 12 |
| | 3.2 Localização das Propriedades Rurais e Valas de Captação..... | 12 |
| | 3.3 Colheita das Amostras de Água, Solo/Limo e Fezes de Bovinos..... | 13 |
| | 3.4 Análise Físico-química da Água..... | 13 |
| | 3.5 Detecção de Esporos de <i>Clostridium botulinum</i> Tipos C e D..... | 14 |
| | 3.6 Bioensaio em Camundongos para a Detecção de Toxina Botulínica..... | 14 |
| | 3.7 Microfixação de Complemento..... | 15 |
| | 3.8 Cultivo das Cepas de <i>Clostridium botulinum</i> Tipos C e D em Sistema Solo/Fezes de Bovinos/Água de chuva..... | 15 |
| | 3.8.1 Preparo do Sistema Solo/Limo/Água de Chuva/Fezes de Bovino..... | 15 |
| | 3.8.2 Testes de Esterilidade e Inocuidade do Sistema Solo/Limo/Água de Chuva/Fezes de Bovino..... | 16 |

| | | |
|-------|---|----|
| 3.8.3 | Cepas de <i>Clostridium botulinum</i> Tipos C e D..... | 16 |
| 3.8.4 | Preparo do Inóculo de <i>Clostridium botulinum</i> | 16 |
| 3.8.5 | Teste Preliminar para Detecção de Toxina Tipos C e D na Suspensão Bacteriana..... | 17 |
| 3.8.6 | Contagem Preliminar das Unidades Formadoras de Colônias..... | 17 |
| 3.8.7 | Contagem Bacteriana e Detecção de Toxina Botulínica nos Sistemas..... | 17 |
| 3.8.8 | Soroneutralização em Camundongo..... | 18 |
| 3.8.9 | Análise Físico-química dos Sistemas..... | 18 |
| 3.9 | Análise Estatística..... | 18 |
| 4 | RESULTADOS..... | 20 |
| 4.1 | Caracterização da Valas de Captação, Análise Físico-química da Água e Verificação da Presença de Esporos de <i>Clostridium botulinum</i> | 20 |
| 4.2 | Cultivo de Cepas de <i>Clostridium botulinum</i> Tipos C e D em Sistema Solo/Fezes de Bovino/Água de Chuva..... | 33 |
| 5 | DISCUSSÃO..... | 43 |
| 6 | CONCLUSÕES..... | 50 |
| 7 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 52 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | Título | Página |
|--------|--|--------|
| 1 | Valas de captação em áreas de pastagem de bovinos, localizadas em propriedades rurais dos municípios de Planalto (1 e 2), Onda Verde (3 e 4), Estado de São Paulo, utilizadas na dessedentação dos animais e avaliadas no presente estudo..... | 21 |
| 1a | Representação gráfica das dimensões das valas de captação de pastagem de bovinos e áreas agrícolas, localizadas em seis Municípios do Estado de São Paulo..... | 22 |
| 2 | Profundidade média na área central das valas de captação de pastagem de bovinos e áreas agrícolas..... | 23 |
| 3 | Representação gráfica do valor médio do pH da água de valas de captação de pastagem de bovinos e áreas agrícolas..... | 25 |
| 4 | Representação gráfica da temperatura média da água das valas de captação de pastagem de bovinos e áreas agrícolas..... | 26 |
| 5 | Representação gráfica do teor médio de matéria orgânica da água de valas de captação em pastagem de bovinos e áreas agrícolas..... | 27 |
| 6 | Representação gráfica do número de amostras de solo/limo de valas de captação de pastagem de bovinos e áreas agrícolas examinados, e resultados obtidos na verificação da presença de esporos de <i>Clostridium botulinum</i> | 30 |
| 7 | Representação gráfica do resultado da análise das amostras de fezes de bovinos, colhidas em valas de captação de pastagem, para a evidenciação de esporos de <i>Clostridium botulinum</i> | 31 |
| 8 | Representação gráfica do resultado da tipificação da toxina botulínica pela microfixação de complemento das amostras positivas no bioensaio em camundongo..... | 32 |

| | | |
|----|--|----|
| 9 | Representação gráfica das médias dos valores das análises do teor de matéria orgânica nos sistemas inoculados com <i>Clostridium botulinum</i> tipo C..... | 35 |
| 10 | Representação gráfica dos valores semanais da matéria orgânica nos sistemas inoculados com <i>Clostridium botulinum</i> tipo C e testemunha..... | 36 |
| 11 | Representação gráfica das médias do pH e da temperatura nos sistemas inoculados com <i>Clostridium botulinum</i> tipo C..... | 36 |
| 12 | Aspecto do crescimento do <i>Clostridium botulinum</i> tipo D em meio de cultura TPGY-EY inoculado com solo/fezes de bovino/água de chuva..... | 39 |
| 13 | Representação gráfica dos valores médios das unidades formadoras de colônias (UFC) nos sistemas inoculados com <i>Clostridium botulinum</i> tipo D..... | 40 |
| 14 | Representação gráfica da média das unidades formadoras de colônias (UFC) dos sistemas inoculados com o <i>Clostridium botulinum</i> Tipo D..... | 40 |
| 15 | Representação gráfica dos valores médios do pH e do logaritmo das unidades formadoras de colônias dos sistemas inoculados com <i>Clostridium botulinum</i> tipo D..... | 41 |
| 16 | Representação gráfica das médias da temperatura e do logaritmo das unidades formadoras de colônias dos sistemas inoculados com <i>Clostridium botulinum</i> tipo D..... | 41 |
| 17 | Representação gráfica dos valores médios da matéria orgânica e do logaritmo das unidades formadoras de colônias dos sistemas inoculados com <i>Clostridium botulinum</i> tipo D..... | 42 |
| 18 | Representação gráfica dos valores das médias do pH e da temperatura dos sistemas tipo D..... | 42 |

LISTA DE TABELAS

| Tabela | Título | Página |
|---------------|--|---------------|
| 1 | Dimensão aproximada das valas de captação em pastagem de bovinos e áreas agrícolas localizadas em seis Municípios do Estado de São Paulo..... | 22 |
| 2 | Profundidade média obtida na área central de valas de captação em pastagem de bovinos e áreas agrícolas..... | 23 |
| 3 | Valor médio do pH da água de valas de captação em pastagem de bovinos e em áreas agrícolas..... | 25 |
| 4 | Temperatura média da água, obtida nas valas de captação em pastagem de bovinos e áreas agrícolas..... | 26 |
| 5 | Teor de matéria orgânica da água de valas de captação; amostras obtidas em pastagem de bovinos e áreas agrícolas..... | 27 |
| 6 | Resultados da detecção de esporos de <i>Clostridium botulinum</i> nas amostras de solo/limo das valas de captação de pastagem de bovinos e de áreas agrícolas..... | 30 |
| 7 | Resultados da detecção de esporos de <i>Clostridium botulinum</i> nas fezes de bovinos, colhidas em torno das valas de captação na pastagem de bovinos | 31 |
| 8 | Resultados da tipificação pela microfização de complemento de amostras positivas no bioensaio em camundongo..... | 32 |
| 9 | Resultados das análises físico-químicas, quantificação da matéria orgânica, contagem bacteriana, detecção e tipificação da toxina botulínica nos sistemas solo/fezes de bovino/água de chuva inoculados com <i>Clostridium botulinum</i> tipo C..... | 34 |
| 10 | Valores médios da matéria orgânica e do pH, avaliados no sistema solo/fezes de bovino/água de chuva inoculados com o <i>Clostridium botulinum</i> tipo C..... | 35 |

| | | |
|----|--|----|
| 11 | Resultados das análises físico-químicas, quantificação da matéria orgânica, contagem bacteriana, detecção e tipificação da toxina botulínica nos sistemas solo/fezes de bovino/água de chuva inoculados com <i>Clostridium botulinum</i> tipo D..... | 37 |
| 12 | Valores médios da contagem de esporos de <i>Clostridium botulinum</i> tipo D, da matéria orgânica e do pH, avaliados nos sistemas solo/fezes de bovinos/água de chuva..... | 39 |

LISTA DE QUADROS

| Quadro | Descrição | Página |
|--------|--|--------|
| 1 | Características dos grupos de <i>Clostridium botulinum</i> , segundo SMITH (1977)..... | 5 |

RESUMO

Foi avaliada por um período de 12 meses consecutivos a ocorrência de esporos de *Clostridium botulinum* tipos C e D no solo/limo do interior de dez valas de captação hídrica localizadas em áreas de pastagem de bovinos, onde anteriormente foram registrados surtos de botulismo associados à ingestão de água contaminada, comparando-a com oito valas de captação de áreas agrícolas. Foi avaliada ainda a ocorrência de esporos da bactéria nas fezes de bovinos, colhidas ao redor das valas de captação e analisadas algumas características físico-químicas da água das valas. O trabalho avaliou também a possibilidade de cultivo de cepas de *C. botulinum* tipos C e D em um sistema experimental simulado, constituído por solo, fezes de bovino e água de chuva. A evidenciação da presença de esporos da bactéria, produtores de toxina botulínica, foi realizada indiretamente pelo cultivo de amostras de solo/limo e de fezes de bovinos em meio de cultura *Cooked Meat medium* e inoculação do sobrenadante em camundongo. A tipificação das amostras positivas no bioensaio foi realizada pela microfixação de complemento com as antitoxinas C ou D homólogas. Das 600 amostras de solo/limo das valas localizadas em pastagem de bovinos, 358 (59,67%) foram positivas para a presença de *C. botulinum*. Das 480 amostras de áreas agrícolas, 22 (4,58%) foram consideradas positivas no bioensaio em camundongo. O número de amostras de solo/limo positivas para a presença de *C. botulinum* das valas de captação das áreas de pastagem foi significativamente superior ($p < 0,05$), quando comparado com os resultados obtidos das valas de captação das áreas agrícolas. Das 502 amostras de fezes de bovinos examinadas, 206 (41,2%) foram positivas no bioensaio em camundongo. A tipificação por amostragem de 68 dos cultivos do solo/limo positivos das áreas de pastagem revelou que 16 (23,53%) pertenciam ao tipo C, 22 (32,35%) ao tipo D e 12 (17,65%) ao complexo CD. Dezoito

amostras positivas (26,47%) não foram tipificadas. Das 46 amostras de fezes positivas e tipificadas, 8 (17,39%) foram pertencentes ao tipo C, 14 (30,43%) ao tipo D, 18 (30,13%) ao complexo CD e 6 (13,04%) não foram identificadas. Das 22 amostras do solo/limo positivas e oriundas das áreas agrícolas, 6 (27,27%) foram pertencentes ao tipo C, 14 (18,18%) ao tipo D, 5 (22,73%) ao complexo CD e 7 (31,82%) não identificadas. Não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre o pH das coleções de água localizadas nas duas áreas. Os valores da temperatura e do teor de matéria orgânica foram significativamente superiores a favor das amostras de água das valas localizadas nas áreas de pastagem. O cultivo de cepas dos tipos C e D em um sistema experimental constituído por solo/fezes de bovino/água de chuva foi realizado a temperatura ambiente e avaliado por um período de até cinco semanas quanto ao número de unidades formadoras de colônias em meio de cultura TPGY-EY, presença de toxina botulínica pelo bioensaio e soroneutralização em camundongo, pH e teor de matéria orgânica. Não foi registrado crescimento bacteriano nos sistemas inoculados com o tipo C. A contagem do número de unidades formadoras de colônias dos sistemas inoculados com a cepa do tipo D apresentou variações. O número de esporos foi significativamente inferior ($p>0,05$) na semana zero, quando comparado com as cinco semanas seguintes. Paralelo ao crescimento bacteriano, foi evidenciada a presença de toxina botulínica em todos os sistemas inoculados e avaliados por cinco semanas consecutivas. Não foram observadas mudanças significativas nos valores médios do pH, da temperatura e da matéria orgânica dos sistemas inoculados com o tipo D.

ABSTRACT

The occurrence of *Clostridium botulinum* type C and D spores was investigated in the soil/sludge of ten water-catching ditches located in areas of cattle pasture where outbreaks of botulism had previously occurred associated with the ingestion of contaminated water and compared to eight water-catchment ditches in agricultural areas. The occurrence of *Clostridium botulinum* spores was also investigated in cattle feces collected around the water ditches and some physicochemical characteristics of the water in the latter were evaluated. The possibility of culturing *Clostridium botulinum* type C and D strains in a simulated experimental system consisting of soil, cattle feces and rain water was also explored. The presence of bacterial spores producing botulin toxin was demonstrated indirectly by culturing soil/sludge and cattle fecal samples in Cooked Meat Medium culture medium and by inoculating the supernatant in mice. The samples found to be positive in the bioassay were typed by complement microfixation with homologous C or D antitoxins. Of the 600 soil/sludge samples from the ditches located in the area of cattle pasture, 358 (59.67%) were positive for the presence of *Clostridium botulinum*. Of the 480 samples from the agricultural areas, 22 (4.58%) were considered to be positive in the mouse bioassay. The number of *Clostridium botulinum*-positive soil/sludge samples from the ditches in the pasture areas was significantly higher ($p < 0.05$) than the number detected in the ditches in the agricultural areas. Of the 502 cattle fecal samples examined, 206 (41.2%) were positive in the mouse bioassay. Typing by sampling 68 of the positive soil/sludge samples from the pasture areas revealed that (23.53%) belonged to type C, 22 (32.35%) to type D, and 12 (17.65%) to the CD complex. Eighteen positive samples (26.47%) were not typed. Of the 46 positive and typed fecal samples, 8 (17.39%) belonged to type C, 14 (30.43%) to type D, 18 (30.13%) to the CD

complex, and 6 (13.04%) were not identified. Of the 22 positive soil/sludge samples from agricultural areas, 6 (27.27%) belonged to type C, 14 (18.18%) to type D, 5 (22.73%) to the CD complex, and 7 (31.82%) were not identified. There was no significant difference ($p>0.05$) in pH between the water samples collected in the two areas. Temperature and organic matter content were significantly higher for the water samples collected from the ditches in the pasture areas. Type C and D samples were cultured in an experimental system consisting of soil/cattle feces/rain water at room temperature and assessed over a period of up to five weeks for colony forming units in TPGY-EY culture medium, for the presence of botulin toxin by mouse bioassay and serum neutralization, and for pH and organic matter content. No bacterial growth was recorded in the system inoculated with type C. Counts of colony forming units in the systems inoculated with type D showed variations, with the number of spores being significantly lower ($p>0.05$) at week zero compared to the five subsequent weeks. In parallel to bacterial growth, the presence of botulin toxin was detected in all system inoculated and evaluated over five consecutive weeks. No significant changes in mean pH, temperature or organic matter content were observed in systems inoculated with type D.

1 INTRODUÇÃO

O botulismo é causado pela ingestão da neurotoxina produzida por *Clostridium botulinum*. A toxina é absorvida pelo intestino e transportada até os nervos motores, onde bloqueia a liberação de acetilcolina nas sinapses e nas junções neuromusculares. As toxinas produzidas por *Clostridium botulinum* são extremamente potentes. Classificadas como tipos sorológicos A, B, C, D, E, F e G elas possuem a mesma estrutura e ação farmacológica. No entanto, são antígenicamente distintas. A toxina botulínica está associada à intoxicação no homem, aves e nos animais. Nesta condição, a toxina formada previamente é veiculada pela ingestão de alimentos ou água contaminados.

O *Clostridium botulinum* é um microrganismo ubiqüitário encontrado no solo ou na água e pode multiplicar em alimentos se as condições de conservação forem inadequadas. A bactéria ocorre sob duas formas na natureza: vegetativa e esporulada. Na forma esporulada alguns sorotipos resistem até 180°C por 10 minutos, podendo sobreviver no ambiente por vários anos.

No Brasil, o botulismo em bovinos assumiu uma grande importância econômica e sanitária (DÖBEREINER et al., 1992; DUTRA & DÖBEREINER, 1995), com perdas estimadas de 1,5 bilhões de reais nos últimos dez anos (DUTRA, 2001). Como consequência dos altos coeficientes de mortalidade registrados no país e da inexistência da prática de eliminação correta dos cadáveres da pastagem, houve a intensificação da contaminação ambiental pelos esporos do *Clostridium botulinum* (SOUZA & LANGENEGGER, 1987).

Um aspecto epidemiológico importante que corrobora a dedução de que houve a intensificação da contaminação ambiental pelo microrganismo foi o surgimento de surtos de botulismo associados à ingestão de água contaminada (DUTRA et al., 2001; SOUZA, 2001),

milho, cama de frango, silagem e feno (DUTRA, 2001). Surtos de botulismo em bovinos, atribuídos à ingestão da toxina através da água de dessedentação têm sido também registrados no Senegal (DOUTRE, 1969; THIONGANE et al., 1984) e África do Sul, onde não raramente ocorrem mortalidades com o envolvimento de centenas de animais (KRIEK & ODENDAAL, 1994).

Uma situação bastante peculiar no nosso país surgiu a partir da adoção em larga escala de práticas de conservação do solo, com a construção de valas de captação de águas de chuva. A finalidade primária da construção das valas de captação foi a de evitar a erosão, a secundária foi a sua utilização na captação de água para a dessedentação dos animais. Os animais têm acesso direto às valas e freqüentemente defecam no seu interior, facilitando a veiculação de patógenos pela rota fecal-oral.

O objetivo do presente estudo foi o de avaliar por um período de 12 meses consecutivos a contaminação ambiental por esporos de *Clostridium botulinum* tipos C e D do solo/limo do interior de valas de captação de áreas de pastagem de bovinos onde ocorreram surtos da doença associados à ingestão de água contaminada, comparando-a com valas de captação de áreas agrícolas. O trabalho pretendeu ainda averiguar a ocorrência de esporos da bactéria nas fezes de bovinos, colhidas ao redor das valas de captação e analisar as características físico-químicas da água das valas. Objetivou também investigar a possibilidade de cultivo de cepas de *Clostridium botulinum* tipos C e D em um sistema experimental simulado, constituído por solo, fezes de bovino e água de chuva.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A distribuição e habitat naturais do *Clostridium botulinum* variam amplamente, oscilando entre solo, sedimentos de água doce e marinha e possivelmente como habitante obrigatório, ou ao menos como integrante da microbiota digestiva normal de vários mamíferos terrestres, marinhos e aves (SMITH, 1977).

O *Clostridium botulinum* tipo C é o mais sensível para o oxigênio, quando comparado com os tipos A e B. Seu crescimento em 2% peptona e 1% de glicose é inibido com 3,8% de oxigênio atmosférico ou pressão de oxigênio de 0,61 cm. Os tipos A e B deixam de crescer quando a tensão excede de 1,14 cm a 1,36 cm de O₂, ou 7,16% e 8,6% de oxigênio atmosférico, respectivamente (MEYER, 1929).

Segundo SMITH & SUGIYAMA (1988), o espectro de temperatura para o crescimento *in vitro* de diversas cepas de *Clostridium botulinum* tipos C e D é maior que outros tipos. A temperatura ótima de crescimento é em torno de 40°C. Diversas cepas crescem bem entre 37°C e 45°C, crescem fracamente a 25°C e não crescem a 10°C. O pH limitante para cepas isoladas do solo é de 5,6, enquanto que o das cepas marinhas é de 5,1.

A relação entre lisogenização por fagos e a produção de toxina foi descrita por INOUE & IIDA (1970). Os autores obtiveram, a partir de uma cepa toxigênica tratada com laranja de acridina, mutantes não tóxicos e não lisogênicos. Quando tais mutantes foram tratados com o lisado obtido pela ação de mitomicina de cepas toxigênicas, converteram-se em toxigênicas e lisogênicas (EKLUND et al., 1972). Estas cepas puderam ser convertidas novamente em lisogênicas e toxigênicas, quando infectadas com um dos fagos isolados de bactéria tratada com

mitomicina ou radiação ultravioleta. Após repetidas passagens em meios de cultura as cepas perdem ainda a sua toxigenicidade. Apenas os fatores tóxicos C1 e D são mediados por bacteriófagos (INOUE & IIDA, 1971).

A possibilidade de conversão do tipo D para tipo C foi pela primeira vez observada por INOUE & IIDA (1971). Segundo os autores, os *Clostridium botulinum* tipos C e D, semelhantes em características culturais e em outras propriedades, têm a possibilidade de que um tipo possa converter-se em outro mediante o intercâmbio de fagos toxigênicos. Uma cepa não toxigênica do tipo C, adicionada ao filtrado do cultivo de uma cepa toxigênica do tipo C, produziu uma cepa toxigênica do tipo C. Uma cepa não toxigênica do tipo D não pode converter-se em outra toxigênica do mesmo tipo, ao ser cultivada em filtrado do tipo D.

DOLMAN & CHANG (1972) agruparam os fagos que haviam encontrado em cepas de *Clostridium botulinum* em quatro grupos. Os que atuavam sobre as cepas não proleolíticas dos tipos B e F eram morfologicamente distintos dos que haviam nas cepas tóxicas e não tóxicas do tipo E. Os bacteriófagos mesófilos das diversas cepas do grupo I são semelhantes e a maioria deles tem um fago icosaédrico de bainha contrátil; outros contêm um fago de tamanho relativamente constante com uma cabeça alongada e gola larga e flexível sendo que algumas cepas contêm ambos.

As cepas muito toxigênicas de todos os tipos formam poucos esporos (SKULBERG & HAUSKEN, 1965). A maioria das cepas toxigênicas dos tipos C e D são anaeróbias obrigatórias e não crescem na superfície de placas de ágar sangue expostas ao ar, entretanto as cepas menos toxigênicas crescem em tais meios. O emprego de procedimento que não proporciona anaerobiose estrita tende a selecionar variantes não toxigênicas ou pouco toxigênicas, e pode ocorrer a perda de toxigenicidade nos cultivos armazenados.

Segundo SMITH (1977), o *Clostridium botulinum* não é uma espécie bacteriana única, podendo ser dividida em vários grupos culturalmente distintos, semelhantes somente por serem clostrídios e que produzem toxinas de ação farmacológica similar, no entanto neutralizadas somente pelas antitoxinas homólogas. Estas diferenças culturais permitiram classificar o *Clostridium botulinum* em quatro grupos, que são apresentadas no Quadro 1.

QUADRO 1 - Características dos grupos de *Clostridium botulinum*, segundo SMITH (1977)

| Características | Grupo I | Grupo II | Grupo III | Grupo IV |
|-------------------------|-----------------|----------|-----------|-----------------|
| Tipo de Toxina | A, B, F | B, E, F | C, D | G |
| Digestão de Proteínas | + | - | - | + |
| Fermentação da Glicose | + | + | + | - |
| Hidrólise da Gelatina | + | + | + | + |
| Formação de Lipases | + | + | + | + |
| Produção de Indol | - | - | - | - |
| Produtos da fermentação | A, P, IB, B, IV | A, B | A, P, B | A, P, IB, B, IV |

A = ácido acético, B = ácido butírico, IB = ácido isobutírico, IV = ácido isovalérico, P = ácido propiônico.

OGUMA et al. (1986) descreveram as propriedades bioquímicas de algumas cepas do tipo C e D, dividindo-as também em quatro grupos baseados nas estruturas antigênicas das toxinas e na relação entre produção de toxinas e fagos e relatam também as divergências quanto à atividade da lecitinase dos tipos C e D.

As reações cruzadas entre os tipos de toxinas C e D ocorrem devido à existência de determinantes antigênicos comuns entre os fatores C1 e D (OGUMA et al., 1980).

Os *Clostridium botulinum* tipos C e D produzem toxinas complexas e a produção das toxinas dos tipos C e D pode não ocorrer em meios convencionais, em meios que contém

quantidades elevadas de glicose, ou em meios que contenham quantidade apreciável de carne (JANSEN, 1971). GIMÉNEZ & GIMÉNEZ (1993), em revisão sistemática sobre as questões envolvendo a neutralização para a tipificação das neurotoxinas botulínicas, sugerem estudos sistemáticos para elucidar os aspectos das reações cruzadas e denominações empregadas na classificação sorológica dos tipos C e D do *Clostridium botulinum*. Ainda de acordo com os autores, e em conformidade com os registros da literatura, as toxinas botulínicas tipos C e D podem representar extremos de uma série de graus intermediários de variantes sorológicas.

Diversos trabalhos relatando a ocorrência de *Clostridium botulinum* em ambientes naturais foram publicados no século passado, normalmente registrando a sua presença em locais onde ocorreram surtos de botulismo em animais silvestres e domésticos.

QUORTRUP & HOLT (1941) sugeriram que a vegetação aquática em decomposição favoreceria o crescimento de bactérias aeróbias e anaeróbias que utilizavam o oxigênio dissolvido, produzindo zonas de anaerobiose, nas quais o *Clostridium botulinum* poderia se multiplicar e produzir toxinas.

BELL et al. (1955) desenvolveram o conceito de micro-ambiente, baseados nos seus dados de campo acompanhando surtos de botulismo em aves aquáticas, seguidos de estudos laboratoriais. Esta hipótese pressupõe a existência prévia do microrganismo no solo ou lama de pântanos ou campos inundados e dependendo de certas condições, como grande quantidade de matéria orgânica em decomposição e consumo de oxigênio pelas bactérias aeróbias, a bactéria se multiplicaria e produziria as suas toxinas.

O *Clostridium botulinum* é encontrado com maior frequência em amostras de sedimentos do fundo e nas margens dos lagos, do que em amostras de solo ao seu redor (BOTT et al. 1968).

Na Inglaterra, SMITH & MORYSON (1975) registraram a ocorrência de *Clostridium*

botulinum em amostras de limo, colhidas em lagoas e canais de Londres. Dos 69 locais avaliados, 50 (72,5%) continham pelo menos um dos tipos B, C, D e E, com predominância do tipo B e frequência menor do tipo D. Na França, os mesmos autores analisaram amostras de limo dos córregos da região de Camargue e duas amostras (4,5%) foram positivas para o tipo E (SMITH & MORYSON, 1977^a).

SMITH (1975) isolou a partir do solo três cepas de *Bacillus cereus*, três de *Clostridium sporogenes*, e cinco de *Clostridium perfringens*, que produziam bacteriocinas ativas frente ao *Clostridium botulinum*.

SMITH & MORYSON (1977^b) compararam a ocorrência de *Clostridium botulinum* entre amostras de solo e limo. As amostras de solo foram obtidas a uma distância de 200 metros dos lagos que haviam apresentado contaminação do limo no ano anterior. Das 25 amostras de solo examinadas, em apenas uma foi detectada a presença do tipo B, enquanto que 25 amostras de limo, 20 foram positivas para a bactéria.

Na Grã-Bretanha e Irlanda, SMITH et al. (1978), tentando verificar a ocorrência de *Clostridium botulinum* em ambientes aquáticos, examinaram 554 amostras de limo, das quais 167 (30,1%), 19 (3,4%), 6 (1,1%) e 15 (2,7%) continham os tipos B, C, D e E, respectivamente, e 13 (2,3%) mais de um tipo.

GRAHAN (1978) analisou a inibição do crescimento de *Clostridium botulinum* por microrganismos isolados de sedimentos de lagos negativos para o microrganismo anaeróbio. Na ocasião isolou 108 espécies de bactérias, sendo 73,0% pertencentes ao gênero de *Bacillus spp.* e sete diferentes amostras desta bactéria produziram bacteriocinas contra o *Clostridium botulinum* tipo C e que poderiam inibir este microrganismo no ambiente ou desnaturar a toxina botulínica presente.

SMITH & MILLIGAN (1979), em Londres, analisaram 60 amostras de solos em áreas de comercialização de bovinos, e verificaram que 15 (25 %) continham *Clostridium botulinum* dos tipos B, C, D e F. Em estudo anterior nos mesmos locais, apenas de 4 a 8% das amostras apresentaram os tipos A e B.

GILL & PENNEY (1980) pesquisaram a presença de *Clostridium botulinum* em amostras de lama de 20 lagos na Nova Zelândia e em 11 locais, dos 20 lagos examinados, foi detectada somente a presença de cepas produtoras de toxinas C, D ou C e D nos cultivos.

SONNABEND et al. (1987) avaliaram a prevalência de *Clostridium botulinum* tipo G e outros tipos formadores de toxinas em 41 amostras de solo, sendo 21 de área cultivada, inoculando as amostras em meio de carne cozida, com e sem tratamento térmico, para a detecção de esporos. Os sobrenadantes foram centrifugados e inoculados em camundongos e no caso da observação de sintomatologia de botulismo e morte dos animais inoculados, os materiais foram submetidos ao teste de soroneutralização em camundongo para a tipificação da toxina. Os sedimentos das culturas positivas foram plaqueados em agar gema de ovo e a presença do *Clostridium botulinum* foi demonstrada em 18 amostras (43,9%) dos sedimentos.

SANDLER et al. (1993), nos Estados Unidos da América, avaliaram amostras de sedimentos colhidas em locais onde o botulismo ocorria regularmente acometendo aves aquáticas, e constataram que 54%, das 2200 amostras de todos os 10 pântanos examinados num período de 18 meses, foram positivas para *Clostridium botulinum* tipo C. Os pântanos que permanecem alagados durante todo ano apresentaram um número maior de positividade, quando comparado com os pântanos que são drenados na primavera e reinundados no outono.

FACH et al. (1995) utilizaram um par de *primer* degenerado para ampliar especificamente um fragmento de DNA de 260 bp de *Clostridium botulinum* tipos A, B, E, F e G. Cinco sondas

individuais permitiram a identificação de cada tipo de toxina por hibridização dos produtos do PCR sendo a sensibilidade para a detecção foi de 10 bactérias por grama da amostra, e a correlação com o bioensaio em camundongo alcançou 95,6%.

A distribuição de *Clostridium botulinum* tipos A, B, E e F foi avaliada por HIELM et al. (1998) com a utilização do PCR, num um total de 333 amostras, o *Clostridium botulinum* tipo E foi encontrado em 68% dos sedimentos, em 15% das amostras de intestinos e em 5% das peles dos peixes respectivamente. Nenhum outro tipo foi encontrado; e a contagem de esporos pelo método do número mais provável foi consideravelmente mais alta para os sedimentos que para os intestinos e pele dos animais com valores de 2×10^3 , $1,7 \times 10^2$, e $3,1 \times 10^2$ de esporos tipo E por grama nas amostras de sedimento, intestino de peixe e pele, respectivamente. A tipagem com eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) de 42 amostras isoladas sugeriram que havia uma grande diversidade genética entre as cepas.

WILLIAMSOM et al. (1999) empregaram uma metodologia incluindo a utilização do PCR *in situ* para o gene da toxina C1, com a finalidade de analisar amostras de sedimentos de solos úmidos e evitar o enriquecimento prévio das amostras colhidas em meios de cultura. Isto evitaria a competitividade e a eventual ação inibitória de outros microrganismos presentes nestas amostras.

No Brasil, alguns estudos registraram a ocorrência de *Clostridium botulinum* no solo, sedimentos aquáticos e fezes de bovinos. No Estado do Ceará, WARD et al. (1967) isolaram os tipos A, B, C e F em amostras de sedimentos marinhos.

SOUZA & LANGENEGGER (1987), no Estado de Goiás, avaliaram 630 amostras de solo colhidas em torno de cadáveres bovinos decompostos na pastagem e supostamente acometidos pelo botulismo e das 630 amostras de solo examinadas, 224 (32,38%) foram positivas

para os tipos A (21,57%), B (9,98%), C (18,14 %), D (20,10 %), complexo CD (37,74%) e G (1,47%).

RIBAS et al. (1994) verificaram a presença de esporos e toxinas de *Clostridium botulinum* em 58 costelas de cadáveres de bovinos em diferentes estados de decomposição, colhidas em propriedades rurais situadas no Estado de São Paulo, Brasil onde haviam sido registradas mortalidades pelo botulismo. Das 58 costelas, 17 foram positivas para a toxina botulínica tipo C e 10 para o tipo D, perfazendo um total de 27 amostras positivas (46,55%). Esporos foram detectados em 32 amostras de costelas examinadas, incluindo todas as amostras que foram positivas para a toxina.

A ocorrência e distribuição de esporos de *Clostridium botulinum* tipos C e D em amostras de solo, limo e fezes de búfalos, colhidas aleatoriamente em áreas inundáveis da criação de búfalos na Baixada Maranhense, Estado do Maranhão, foram avaliadas por SILVA et al. (1996). A evidenciação de esporos foi realizada em 40 amostras de fezes, 65 de limo e 35 de solo, provenientes de quatro municípios. Os resultados revelaram que 104 (74,28%), das 140 amostras examinadas, foram positivas para a presença dos tipos C (14,29%), D (82,14%) e complexo CD (3,5%).

SOUZA (2001) avaliou a ocorrência e distribuição de esporos e toxinas de *Clostridium botulinum* tipos C e D em cacimbas utilizadas como bebedouros de bovinos em pastagem no Vale do Araguaia, Estado de Goiás. Foram avaliadas 300 cacimbas de 130 propriedades rurais localizadas em 12 municípios, nos anos de 1998 e 1999 através da análise amostras de sedimento das cacimbas, do solo superficial e de fezes de bovinos, colhidas ao redor das cacimbas. Foram correlacionados ainda os valores obtidos da análise físico-química de amostras de solo e do sedimento das cacimbas com a ocorrência de esporos e toxinas.

As amostras de fezes de bovinos analisadas apresentaram positividade significativamente superior para *Clostridium botulinum* (31%), quando comparadas com as amostras de solo superficial (19%) e dos sedimentos (10%), a detecção de toxina botulínica, tipo C e/ou D nos sedimentos das cacimbas foi possível em seis amostras (2%), das 300 examinadas.

Na análise físico-química da água das cacimbas os valores médios das amostras que continham esporos e/ou toxinas foram estatisticamente diferentes das amostras negativas, para a demanda bioquímica e química de oxigênio, matéria orgânica e pH e em 100% das cacimbas estudadas o aspecto da água era turvo, sendo que 15,33%, das 300 cacimbas, apresentaram características objetáveis (odor pútrido) e 84,67% não objetáveis.

Com base nos resultados obtidos, o autor enfatiza o risco potencial permanente e crescente para a ocorrência da intoxicação botulínica dos bovinos que utilizam dessa água para a sua dessedentação.

DUTRA et al. (2001) descreveram a ocorrência de sete surtos de intoxicação botulínica em bovinos nos Estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul, associados possivelmente à ingestão de água contaminada.

O coeficiente médio de mortalidade foi de 20,1%, com letalidade de 99,92% e morbidade de 31,62%. Dos cerca de 9.000 bovinos envolvidos nos surtos, 2.844 morreram com quadro clínico predominantemente super agudo e agudo.

As circunstâncias em que ocorreram os surtos estiveram relacionadas com a existência de carcaças de animais decompostas ou matéria orgânica vegetal em abundância na água de dessedentação dos animais. Foram detectadas toxinas botulínicas C e/ou D nas coleções de água, nas vísceras e no soro sanguíneo de parte considerável dos materiais examinados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de realização das análises

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisas em Enfermidades Infecciosas dos Animais causadas por Anaeróbios da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Curso de Medicina Veterinária, Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, Câmpus de Araçatuba, SP.

3.2 Localização das propriedades rurais e valas de captação

Durante o período de 12 meses consecutivos, dos anos de 1999 e 2000, as valas foram visitadas regularmente para realização das análises descritivas e colheita de amostras para o processamento laboratorial. A escolha das valas de captação das áreas agrícolas foi realizada considerando a sua localização, preferencialmente distante de áreas de pastagem e tempo de existência relativamente recente. Foram utilizadas dez valas de captação localizadas em pastagem de bovinos e oito em áreas agrícolas.

Foram avaliadas no presente estudo propriedades rurais localizadas no Estado de São Paulo, nos municípios de Planalto (P1 a P4, pastagem de bovinos), Onda Verde (P5 a P8, pastagem de bovino), Nhandeara (P9 e P10 pastagem de bovinos), Auriflama (P1 a P6, área agrícola), Jales (P7, área agrícola) e Araçatuba (P8, área agrícola). Nas propriedades com as valas de captação localizadas na pastagem de bovinos, e utilizadas na dessedentação dos animais, havia o histórico da ocorrência de botulismo em anos anteriores, com elevados coeficientes de mortalidade bovina e confirmados pelo diagnóstico clínico-patológico e laboratorial, com envolvimento dos tipos C e D (DUTRA et al., 2001)

3.3 Colheita das amostras de água, solo/limo e fezes de bovinos

Foram realizadas visitas mensais nas propriedades por um período de doze meses, totalizando até doze colheitas de amostras de água, limo, solo e fezes de bovino. Nas valas localizadas na pastagem foram colhidas amostras compostas do interior do bolo fecal de bovinos, encontrados no solo e quando existentes. As amostras de fezes foram colhidas dentro de um raio de aproximadamente 30 metros a partir da vala de captação. Durante o período da seca, quando da não existência de água nas valas, as amostras de solo foram colhidas dentro da área de maior depressão da vala. As amostras de fezes e solo/limo, de 500g aproximadamente, foram colhidas em recipientes estéreis, transportadas e conservadas a temperatura ambiente até o processamento.

Os critérios para colheita, transporte e conservação das amostras de água foram de acordo com a metodologia descrita no MANUAL DE OPERAÇÃO E MANUTENÇÃO E.T.A. (META,1973). A análise físico-química da água foi realizada logo após a chegada ao laboratório, enquanto que as amostras de solo/limo e fezes foram analisadas em períodos distintos. Em cada visita foram colhidas cinco repetições de cada material, para tentativa de detecção de esporos de *Clostridium botulinum* tipos C e D.

3.4 Análise físico-química da água

Nas amostras de águas foram avaliados o pH, com auxílio de peagâmetro digital, e a temperatura através de termômetro de filamento de mercúrio. O teor de oxigênio consumido foi realizado pela reação de oxidação pelo permanganato de potássio em meio ácido. O cálculo da matéria orgânica foi baseado no teor de oxigênio consumido, segundo metodologia descrita no (META 1973).

3.5 Detecção de esporos de *Clostridium botulinum* tipos C e D

Para a tentativa de detecção de esporos de *Clostridium botulinum* tipos C e D nas amostras de solo do interior das valas de captação ou do limo, quando as mesmas continham água, da mesma forma que nas amostras de fezes colhidas ao redor das valas, foi utilizada a metodologia descrita por VENKASTESWARAM et al. (1989), modificada pela utilização do meio de cultura *Chopped Meat Medium* (CMM), que foi recomendado por DOWELL & HAWKINS (1974). As amostras foram processadas adicionando-se 50g em 250 mL de água peptonada a 0,1%. Após a homogeneização e um período de 30 min. de repouso foi realizada a centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos e o precipitado foi suspenso em solução fisiológica e inoculado 0,1mL em 20 ml do meio de cultura CMM para o exame indireto. Após a inoculação no meio de cultura, os tubos foram aquecidos a 80°C por 10 min., levados à estufa e mantidos na temperatura de 35°C durante 5 a 7 dias. A evidenciação da presença de esporos de *Clostridium botulinum* foi realizada indiretamente pela verificação da produção de toxina botulínica no meio de cultura, através do bioensaio em camundongo do sobrenadante da cultura centrifugado e filtrado em Millipore (0,45 µm). A tipificação das amostras positivas no Bioensaio foi realizada por amostragem pelo teste de Microfixação de Complemento.

3.6 Bioensaio em camundongo para detecção de toxina botulínica

O sobrenadante, esterilizado por filtração (Millipore 0,45 µm), foi inoculado via intraperitoneal (0,5 mL) em camundongos da raça Swiss albina, linhagem Webster, com peso corporal variando entre 20 a 25 g e submetidos à observação para os sinais de botulismo por 96 horas. Como controle foram inoculados camundongos com os mesmos materiais aquecidos a 100°C por 10 minutos, para inativação de toxina botulínica eventualmente presente.

3.7 Microfixação de complemento

O teste de Microfixação de Complemento (MFC), para tipificação por amostragem dos cultivos de solo e fezes de bovinos considerados positivos para a toxina botulínica no bioensaio em camundongo seguiu a metodologia descrita por WEISS & WEISS (1988).

3.8 Cultivo das cepas de *Clostridium botulinum* tipos C e D em sistema solo/fezes de bovinos/água de chuva

Para a realização do presente estudo foi simulada uma condição experimental para a tentativa de evidenciação da eventual multiplicação de esporos de *Clostridium botulinum* tipos C e D e formação das respectivas toxinas botulínicas. As amostras de solo/limo e de fezes de bovinos, utilizadas para o preparo de um sistema composto, simulando as condições físicas e de substrato existentes na natureza, foram colhidas no Sitio G., localizado no município de Santo Antonio do Aracaguá, SP. Nesta propriedade não havia o histórico da ocorrência de mortalidade bovina sugestiva de botulismo em anos anteriores.

As amostras de solo/limo foram colhidas diretamente do sedimento de açude existente na pastagem, e as amostras de fezes foram colhidas diretamente da ampola retal de bovinos pertencentes ao rebanho da propriedade. A água de chuva utilizada no experimento foi colhida diretamente da precipitação pluviométrica e armazenada em recipientes estéreis até o seu uso.

3.8.1 Preparo do sistema solo/limo/ água de chuva/ fezes de bovino

Foram preparados 12 sistemas solo/fezes de bovino/água de chuva. Cada sistema foi constituído por 20g de solo/limo, 100g de fezes de bovino e 300 mL de água de chuva esterilizadas pelo processo de tindalização.

3.8.2 Testes de esterilidade e inocuidade do sistema solo/limo/água de chuva/fezes de bovino

Amostras do sistema solo/limo/água de chuva fezes de bovino foram cultivadas em meio de cultura BHI, Ágar Sangue, Tioglicolato e TPGY-EY, para a verificação da esterilidade e inocuidade. Suspensão de 0,5 mL do sistema, centrifugada e filtrada, foi inoculada em camundongos via intraperitoneal para comprovar a inocuidade dos sistemas.

3.8.3 Cepas de *Clostridium botulinum* tipos C e D

Foram utilizadas duas cepas liofilizadas de *Clostridium botulinum*. As cepas de *C. botulinum* tipo C (STUAH-CbC) e *C. botulinum* tipo D (STUAH-CbD) utilizadas no presente estudo, pertencentes à bacterioteca do Laboratório Pesquisas em Enfermidades Infecciosas Animais causadas por Anaeróbios, DAPSA, UNESP, Câmpus de Araçatuba, SP. A tipificação pela soroneutralização em camundongo foi realizada para a confirmação dos dois tipos.

3.8.4 Preparo do inóculo de *Clostridium botulinum*

As suspensões de *Clostridium botulinum* tipos C e D foram preparadas em 400 mL de *Cooked Meat Medium* (CMM), seguindo-se as recomendações de DOWELL & HAWKINS (1974). Após o período de incubação o sobrenadante foi centrifugado a 3000 rpm (centrífuga Excelsa BABY I, modelo 206, FANEM) por 10 min. O sedimento foi lavado quatro vezes em solução fisiológica estéril e o volume elevado para 35 ml com solução fisiológica estéril.

Foram utilizados cinco sistemas para o tipo C, inoculados com $5,90 \times 10^4$ unidades formadoras de colônias (UFC) contidas em 5 mL. Da mesma forma, foram constituídos cinco sistemas para o tipo D; cada sistema foi inoculado com 5 mL de uma suspensão contendo $2,15 \times 10^4$

10⁴ UFC. Como testemunha foi utilizado um sistema para cada tipo, não inoculados com a suspensão da bactéria.

3.8.5 Teste preliminar para detecção de toxina tipo C e D na suspensão bacteriana

O volume de cada suspensão bacteriana foi diluído 1:400 em água de chuva esterilizada, filtrado em Millipore (0,45µm) e inoculado em camundongo para verificação da eventual presença das respectivas toxinas botulínicas. Todos os resultados obtidos foram negativos no bioensaio em camundongo.

3.8.6 Contagem preliminar das unidades formadoras de colônias

A contagem das unidades formadoras de colônias nos sistemas foi realizada em meio de cultura TPGY-EY (Ágar tripticase-peptona-glicose-extrato de levedura e gema de ovo) conforme otimização realizada por JUNQUEIRA & LEITÃO (1997) e com diluições decimais seriadas de acordo com metodologia descrita por SILVA et al. (1997).

3.8.7 Contagem bacteriana e detecção de toxina botulínica nos sistemas

Os sistemas foram mantidos em temperatura ambiente e presença da luz solar indireta por cinco semanas consecutivas. Foram colhidas semanalmente de cada sistema, após leve homogenização, uma amostra de 5 mL para contagem de *Clostridium botulinum*. Da mesma maneira, foi realizada a tentativa de detecção de toxina botulínica pelo bioensaio em camundongo no sobrenadante dos sistemas, conforme metodologia descrita no item 3.6.

3.8.8 Soroneutralização em camundongo

A soroneutralização em camundongo para a tipificação da toxina botulínica com as antitoxinas homólogas foi realizada segundo normas recomendadas por DOWELL & HAWKINS (1974). As amostras positivas foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 min., o sobrenadante foi filtrado em Millipore (0,45 μ m) e 0,6 mL do filtrado foi adicionado a 30 μ L com 1000 UI/mL de antitoxina C ou D (*Onderstepoort Veterinary Research Institute, Africa do Sul*) incubada por 30 minutos a 37°C. Posteriormente, 0,5 mL desta mistura foi inoculada por via intraperitoneal em camundongos da raça Swiss albina, linhagem Webster, pesando entre (20-25g). O tipo de toxina foi verificada quando da neutralização pela antitoxina homóloga.

3.8.9 Análise físico-química da fase líquida dos sistemas

Na análise físico-química da fase líquida dos sistemas foram avaliados os parâmetros de pH, temperatura e matéria orgânica, conforme descrito no item 3.4.

3.9 Análise estatística

Para a análise estatística da variável matéria orgânica foi utilizado o teste Mann-Whitney (ZAR,1998), pH e temperatura o teste t para amostras independente (ZAR,1998), avaliadas nas valas de captação localizadas nas áreas de pastagem e agrícolas, e comparandos os resultados obtidos nas duas áreas.

O teste do Qui-quadrado foi utilizado para comparar a porcentagem de amostras positivas na detecção indireta de esporos de *Clostridium botulinum* nas duas áreas estudadas. Os resultados

da contagem bacteriana, pH e matéria orgânica dos sistemas solo/fezes de bovinos/água de chuva inoculados com *C. botulinum* tipos C e D foram submetidos à análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey (ZAR,1998) ao nível de significância de 5%. As análises estatísticas foram efetuadas empregando-se o Programa SAS (*Statistical Analysis System*,1998).

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização das valas de captação, análise físico-química da água e verificação da presença de esporos de *Clostridium botulinum*

Uma idéia parcial e momentânea das valas de captação está registrada na Fig. 1. As dimensões das valas de captação, localizadas na pastagem de bovinos ou em áreas agrícolas de propriedades rurais situadas nos municípios de Planalto, Onda Verde, Nhandeara, Auriflama, Jales e Araçatuba, Estado de São Paulo, estão registradas na Tab. 1. Foram avaliadas dez valas de captação localizadas em pastagem e oito em áreas agrícolas, durante 12 meses consecutivos dos anos de 1999 e 2000. Os valores máximos e mínimos das dimensões aproximadas (em m²) das valas de captação localizadas na pastagem de bovinos foram de 11,01 e 7,25m² e nas valas localizadas nas áreas agrícolas foram de 10,04 e 7,39m², respectivamente. A representação gráfica dos valores das dimensões médias está na Fig. 1a. Os valores mínimos e máximos das profundidades médias das valas localizadas nas pastagens foram de 0,27m e 0,43m, e 0,36m e 0,54m nas áreas agrícolas, respectivamente (Tab. 2 e Fig. 2).

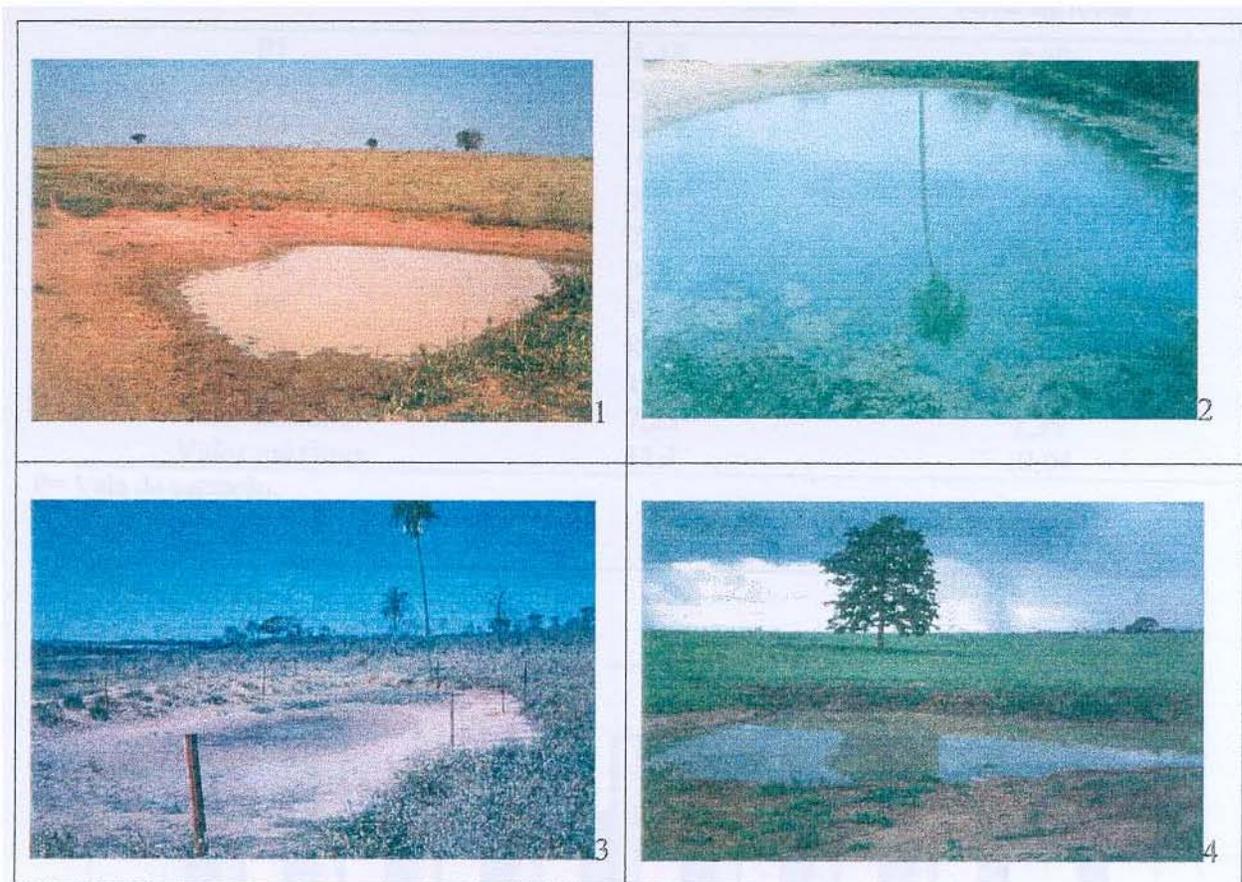


FIGURA 1 - Valas de captação em áreas de pastagem de bovinos, localizadas em propriedades rurais dos Municípios de Planalto (1 e 2), Onda Verde (3 e 4), Estado de São Paulo, utilizadas na dessedentação dos animais e avaliadas no presente estudo.

TABELA 1 - Dimensão aproximada das valas de captação em pastagem de bovinos e áreas agrícolas, localizadas em seis Municípios do Estado de São Paulo

| Valas de captação | Dimensão aproximada (m ²) | |
|-------------------|---------------------------------------|---------------|
| | Pastagem de bovinos | Área agrícola |
| P1 | 8,48 | 8,59 |
| P2 | 9,24 | 9,69 |
| P3 | 8,73 | 10,04 |
| P4 | 10,95 | 9,42 |
| P5 | 7,23 | 9,72 |
| P6 | 7,71 | 8,17 |
| P7 | 9,32 | 7,39 |
| P8 | 9,48 | 9,62 |
| P9 | 8,26 | - |
| P10 | 11,1 | - |
| Valor mínimo | 7,23 | 7,39 |
| Valor máximo | 11,1 | 10,04 |

P= Vala de captação.

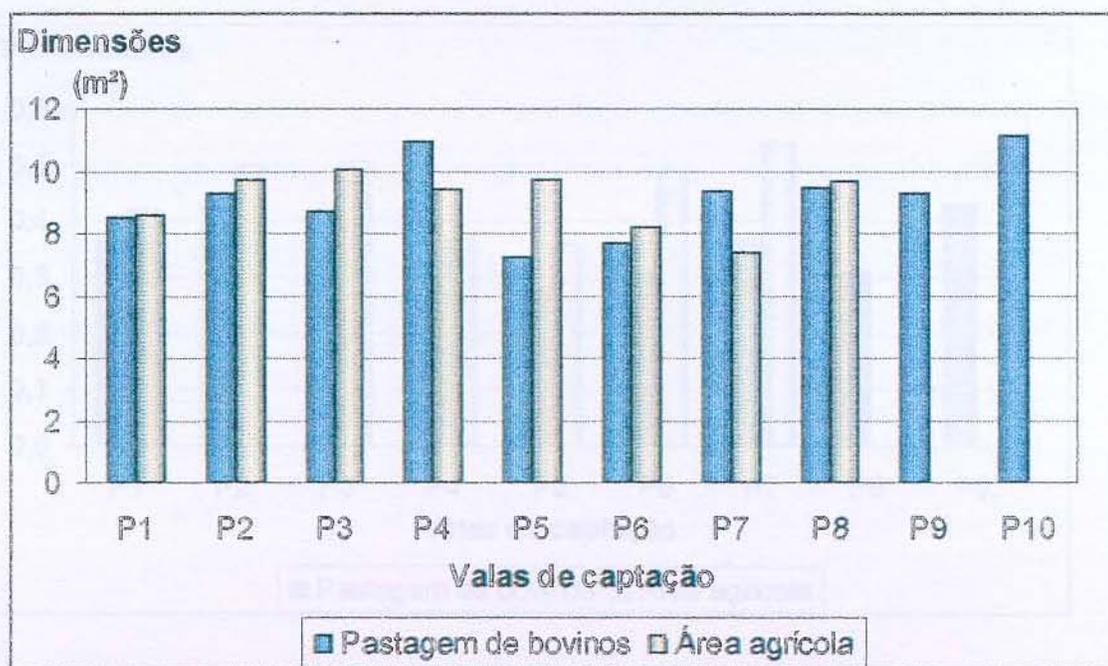


FIGURA 1a – Representação gráfica das dimensões das valas de captação de pastagem de bovinos e áreas agrícolas, localizadas em seis Municípios do Estado de São Paulo.

TABELA 2 - Profundidade média obtida na área central de valas de captação em pastagem de bovinos e áreas agrícolas

| Valas de captação | Profundidade média (m) | |
|-------------------|------------------------|---------------|
| | Pastagem de bovinos | Área agrícola |
| P1 | 0,27 | 0,40 |
| P2 | 0,37 | 0,42 |
| P3 | 0,43 | 0,50 |
| P4 | 0,31 | 0,51 |
| P5 | 0,29 | 0,37 |
| P6 | 0,28 | 0,36 |
| P7 | 0,31 | 0,49 |
| P8 | 0,37 | 0,54 |
| P9 | 0,31 | - |
| P10 | 0,43 | - |
| Valor mínimo | 0,27 | 0,36 |
| Valor máximo | 0,43 | 0,54 |

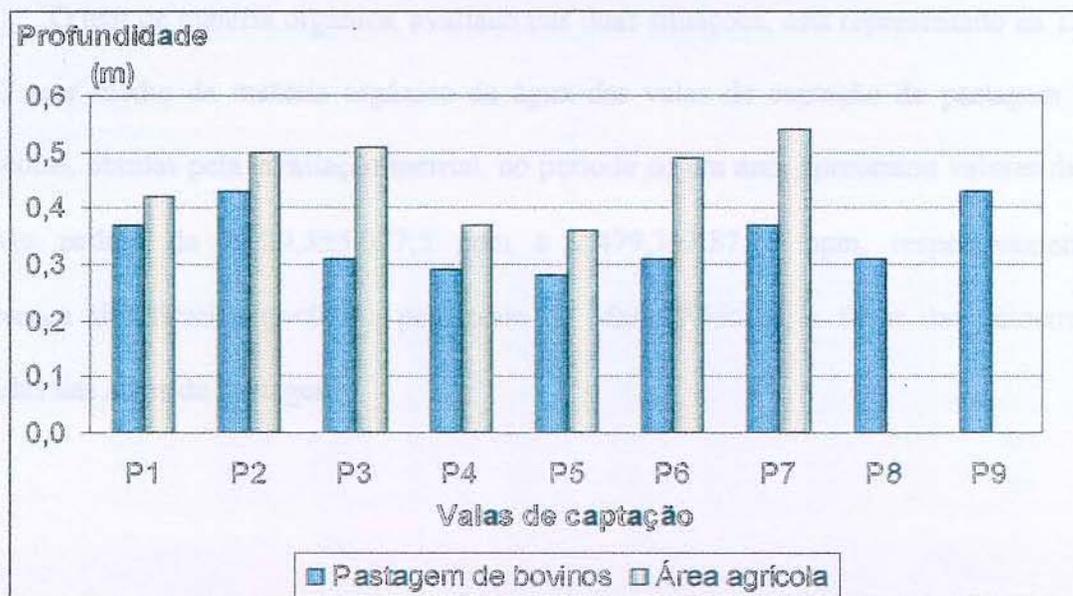


FIGURA 2 – Profundidade média na área central das valas de captação de pastagem de bovinos e áreas agrícolas.

O valor médio do pH da água das valas de captação em pastagem de bovinos e área agrícola e a sua representação gráfica estão na Tab. 3 e Fig. 3. Os valores da média e do desvio padrão do pH foram de $5,77 \pm 0,24$ e $5,98 \pm 0,19$ nas duas áreas, respectivamente. Pelo teste t não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre o pH das coleções de água localizadas em área de pastagem, quando comparado com os valores obtidos das coleções em áreas agrícolas.

Os valores obtidos na tomada de temperatura em aferições mensais consecutivas, por doze meses, nas áreas de pastagem e agrícolas, são apresentados na Tab. 4 e representados na Fig. 4. Os valores médios calculados e o desvio padrão foram de $28,6 \pm 1,3^\circ\text{C}$ e $20,5 \pm 1,2^\circ\text{C}$, respectivamente, com diferença significativa ($p < 0,001$) pelo teste de Mann-Whitney, entre as temperaturas das valas localizadas nas áreas de pastagem e áreas agrícolas.

O teor de matéria orgânica, avaliado nas duas situações, está representado na Tab. 5 e Fig. 5. O teor médio da matéria orgânica da água das valas de captação de pastagem e de áreas agrícolas, obtidas pela avaliação mensal, no período de um ano, apresentou valores das médias e desvio padrão de $7.029,3 \pm 5.077,5$ ppm e $2.479,3 \pm 3.875,8$ ppm, respectivamente. Houve diferença significativa ($p < 0,05$), pelo teste de Mann-Whitney, a favor das amostras de água obtidas nas áreas de pastagem.

TABELA 3 - Valor médio do pH da água de valas de captação localizadas em pastagem de bovinos e em áreas agrícolas

| Valas de captação | pH | |
|-----------------------|---------------------|---------------|
| | Pastagem de bovinos | Área agrícola |
| P1 | 5,99* | 5,98 |
| P2 | 5,72 | 6,18 |
| P3 | 5,77 | 6,29 |
| P4 | 6,02 | 6,02 |
| P5 | 5,49 | 5,99 |
| P6 | 5,70 | 5,81 |
| P7 | 5,51 | 5,74 |
| P8 | 5,42 | 5,81 |
| P9 | 6,04 | - |
| P10 | 5,99 | - |
| Média e desvio padrão | 5,77±0,24 | 5,98±0,19 |

* Valor médio obtido em até 12 aferições realizadas mensalmente, durante um ano.

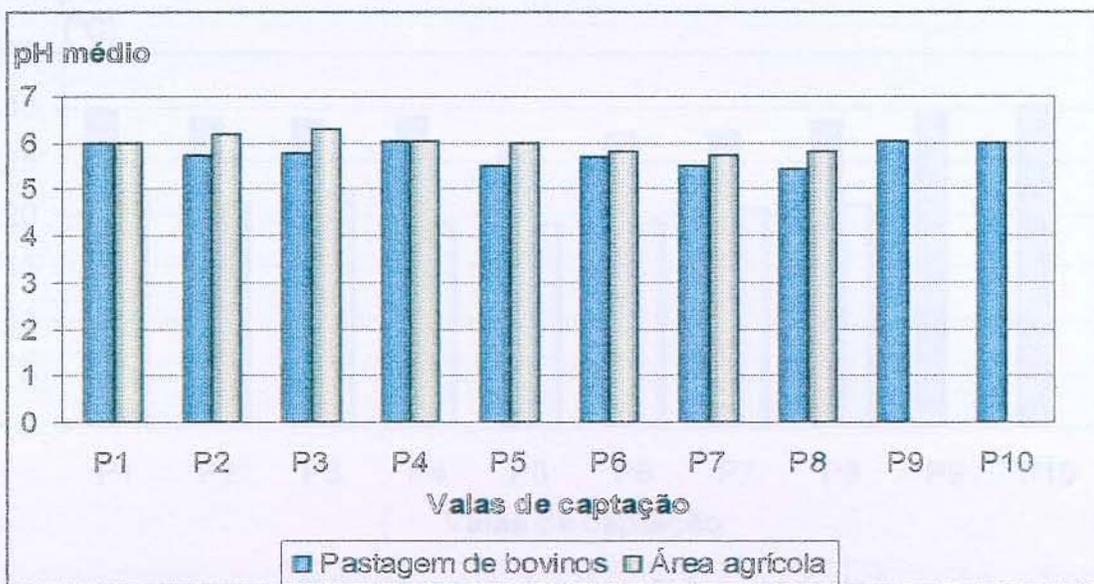


FIGURA 3 - Representação gráfica do valor médio do pH da água de valas de captação de pastagem de bovinos e áreas agrícolas.

TABELA 4 - Temperatura média da água, obtida nas valas de captação em pastagem de bovinos e áreas agrícolas

| Valas de captação | Temperatura (°C) | |
|-----------------------|---------------------|---------------|
| | Pastagem de bovinos | Área agrícola |
| P1 | 29,8* | 22,1 |
| P2 | 29,0 | 21,0 |
| P3 | 28,9 | 21,9 |
| P4 | 29,1 | 19,2 |
| P5 | 25,8 | 19,0 |
| P6 | 27,6 | 19,1 |
| P7 | 27,8 | 20,4 |
| P8 | 28,6 | 20,9 |
| P9 | 29,5 | - |
| P10 | 30,1 | - |
| Média e desvio padrão | 28,6 ± 1,3 | 20,5 ± 1,2 |

* Temperatura média obtida em até 12 aferições mensais consecutivas.

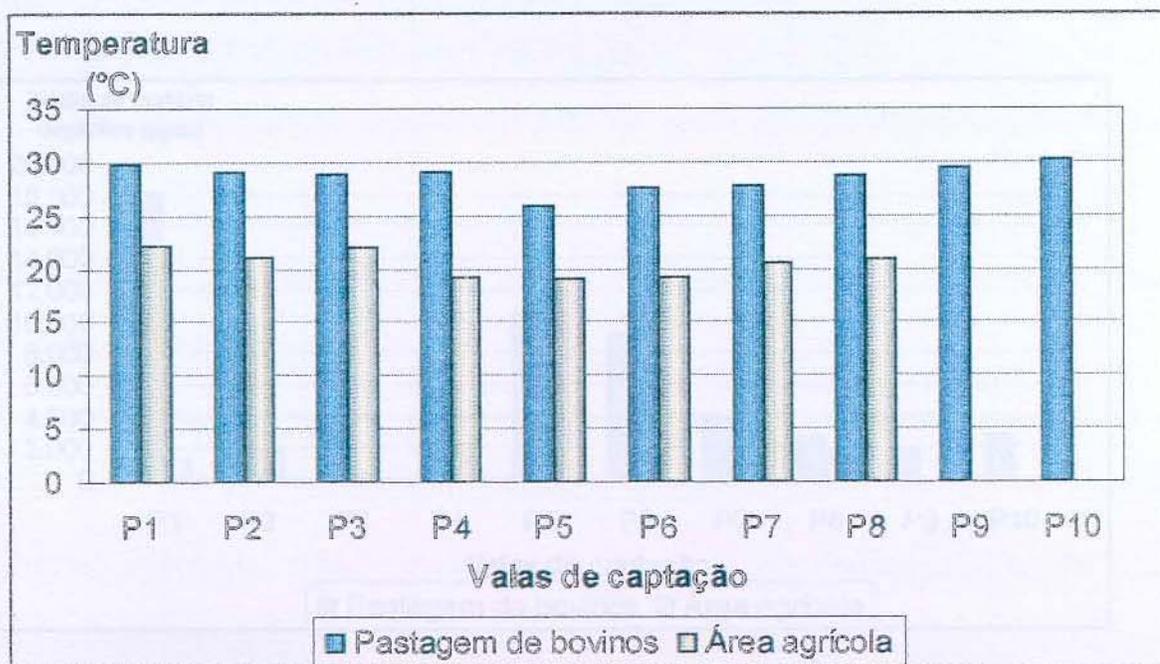


FIGURA 4 - Representação gráfica da temperatura média da água das valas de captação de pastagem de bovinos e áreas agrícolas.

TABELA 5 - Teor de matéria orgânica da água de valas de captação; amostras obtidas em pastagem de bovinos e áreas agrícolas.

| Valas de captação | Matéria orgânica (ppm) | |
|-----------------------|------------------------|-------------------|
| | Pastagem de bovinos | Área agrícola |
| P1 | 18174* | 1139 |
| P2 | 9937 | 1839 |
| P3 | 3817 | 370 |
| P4 | 7406 | 2142 |
| P5 | 10480 | 11956 |
| P6 | 9139 | 334 |
| P7 | 3982 | 810 |
| P8 | 2683 | 1388 |
| P9 | 1919 | - |
| P10 | 2756 | - |
| Média e desvio padrão | 7.029,3 ± 5.077,5 | 2.497,3 ± 3.875,8 |

* Valor médio obtido pela avaliação mensal por período de um ano.

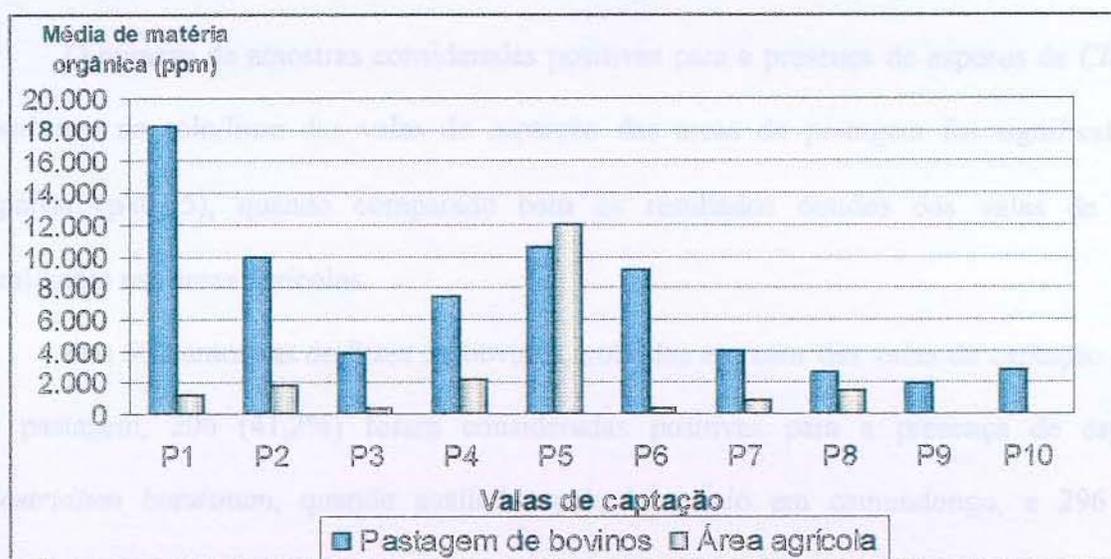


FIGURA 5 - Representação gráfica do teor médio de matéria orgânica da água de valas de captação em pastagem de bovinos e áreas agrícolas.

A contaminação ambiental, pelos esporos de *Clostridium botulinum*, das valas de captação de áreas de pastagem de bovinos foi avaliada pela análise de 600 amostras de solo/limo, colhidas no interior das valas de captação de água, e 502 amostras de fezes de bovinos, colhidas ao redor das mesmas. Das valas de captação localizadas nas áreas agrícolas foram examinadas 480 amostras de solo/limo.

Nas 600 amostras de solo/limo das valas localizadas na pastagem de bovinos, 358 (59,67%) foram positivas para a presença de toxina botulínica quando avaliadas pelo cultivo em meio de cultura e inoculação do sobrenadante filtrado em camundongos; 242 (40,33%) amostras foram consideradas negativas (Tab. 6 e Fig. 6).

Das 480 amostras de solo/limo examinadas, colhidas em oito valas de captação localizadas nas áreas agrícolas, 22 (4,58%) foram consideradas positivas no bioensaio em camundongo e 458 (95,42%) negativas (Tab. 6 e Fig. 6).

O número de amostras consideradas positivas para a presença de esporos de *Clostridium botulinum* no solo/limo das valas de captação das áreas de pastagem foi significativamente superior ($p < 0,05$), quando comparado com os resultados obtidos das valas de captação localizadas nas áreas agrícolas.

Das 502 amostras de fezes de bovinos, colhidas ao redor das valas de captação das áreas de pastagem, 206 (41,2%) foram consideradas positivas para a presença de esporos de *Clostridium botulinum*, quando avaliadas pelo bioensaio em camundongo, e 296 (58,8%) negativas (Tab. 7 e Fig. 7).

A tipificação dos cultivos positivos no bioensaio em camundongo foi realizada por amostragem pela técnica de microfixação de complemento. Foram tipificados 68 cultivos das amostras de solo/limo das áreas de pastagem de bovinos. Destes cultivos, 16 (23,53%) foram

neutralizados pela antitoxina C, 22 (32,35%) pela antitoxina D, 12 (17,65%) pelas duas antitoxinas, sendo consideradas como pertencentes ao complexo CD, e 18 (26,47%) não foram tipificadas (Tab. 8 e Fig. 8).

Das 46 amostras de fezes de bovino positivas no bioensaio em camundongo para a toxina botulínica e tipificadas, 08 (17,39%) foram consideradas como pertencentes ao tipo C, 14 (30,43%) ao tipo D, 18 (39,13%) ao complexo CD e 6 (13,04%) não foram identificadas (Tab. 8 e Fig. 8).

Das 22 amostras positivas, obtidas dos cultivos das amostras de solo/limo colhidas em áreas agrícolas e tipificadas, 06 (27,27%) foram pertencentes ao tipo C, 04 (18,18%) ao tipo D, 05 (22,73%) ao complexo CD e 07 (31,82%) não foram identificadas (Tab. 8 e Fig. 8).

TABELA 6 – Resultados da detecção de esporos de *Clostridium botulinum* nas amostras de solo/limo das valas de captação de pastagem de bovinos e de áreas agrícolas

| Local | N. de valas | Esporos de <i>Clostridium botulinum</i> | | | | Total de amostras examinadas | % |
|---------------|-------------|---|-------|--------------------|-------|------------------------------|-----|
| | | Amostras positivas | | Amostras negativas | | | |
| | | N. | % | N. | % | | |
| Pastagem | 10 | 358 | 59,67 | 242 | 40,33 | 600 | 100 |
| Área agrícola | 08 | 22 | 4,58 | 458 | 95,42 | 480 | 100 |

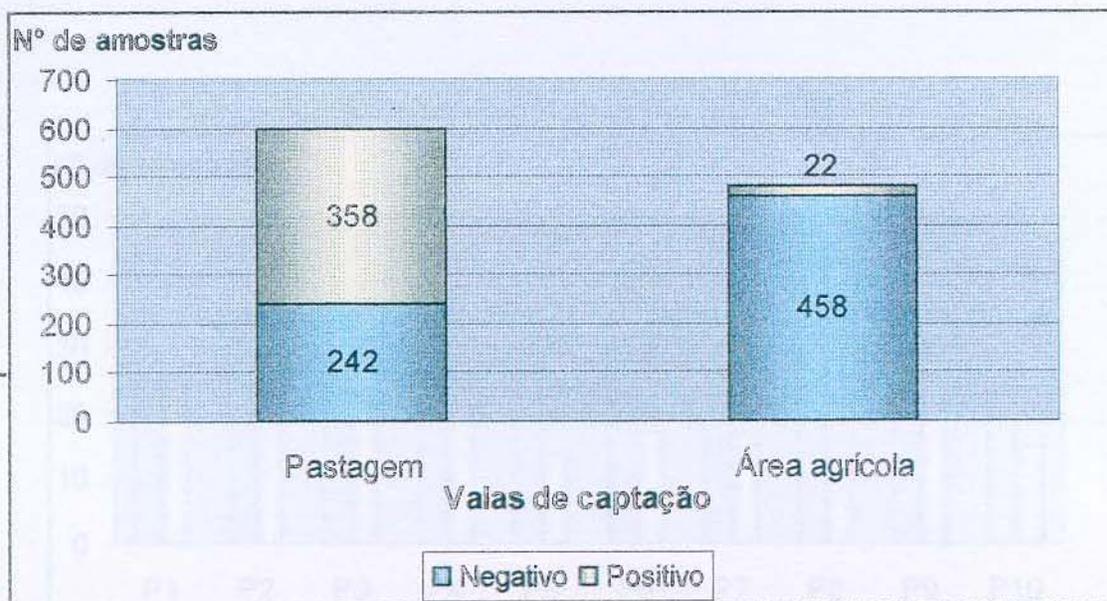


FIGURA 6 – Representação gráfica do número de amostras de solo/limo de valas de captação de pastagem de bovinos e áreas agrícolas examinados, e resultados obtidos na verificação da presença de esporos de *Clostridium botulinum*.

TABELA 7 - Resultados da detecção de esporos de *Clostridium botulinum* nas fezes de bovinos, colhidas em torno das valas de captação na pastagem de bovinos

| N. da vala | N. de colheitas | N. de amostras por colheita | Total de amostras de fezes examinadas | Esporos de <i>Clostridium botulinum</i> | | | |
|------------|-----------------|-----------------------------|---------------------------------------|---|------|----------|------|
| | | | | Positivo | | Negativo | |
| | | | | N. | % | N. | % |
| P1 | 10 | 5 | 50 | 25 | 50 | 25 | 50 |
| P2 | 12 | 5 | 60 | 29 | 48,3 | 31 | 51,7 |
| P3 | 11 | 5 | 55 | 30 | 54,5 | 25 | 45,5 |
| P4 | 11 | 5 | 55 | 21 | 38,2 | 34 | 61,8 |
| P5 | 10 | 4 | 40 | 14 | 35 | 26 | 65 |
| P6 | 09 | 5 | 45 | 17 | 37,8 | 28 | 62,2 |
| P7 | 11 | 3 | 33 | 17 | 51,5 | 16 | 48,5 |
| P8 | 12 | 5 | 60 | 13 | 21,6 | 47 | 78,4 |
| P9 | 12 | 5 | 60 | 25 | 41,6 | 35 | 58,4 |
| P10 | 11 | 4 | 44 | 15 | 34,1 | 29 | 65,8 |
| Total | | | 502 | 206 | 41,2 | 296 | 58,8 |

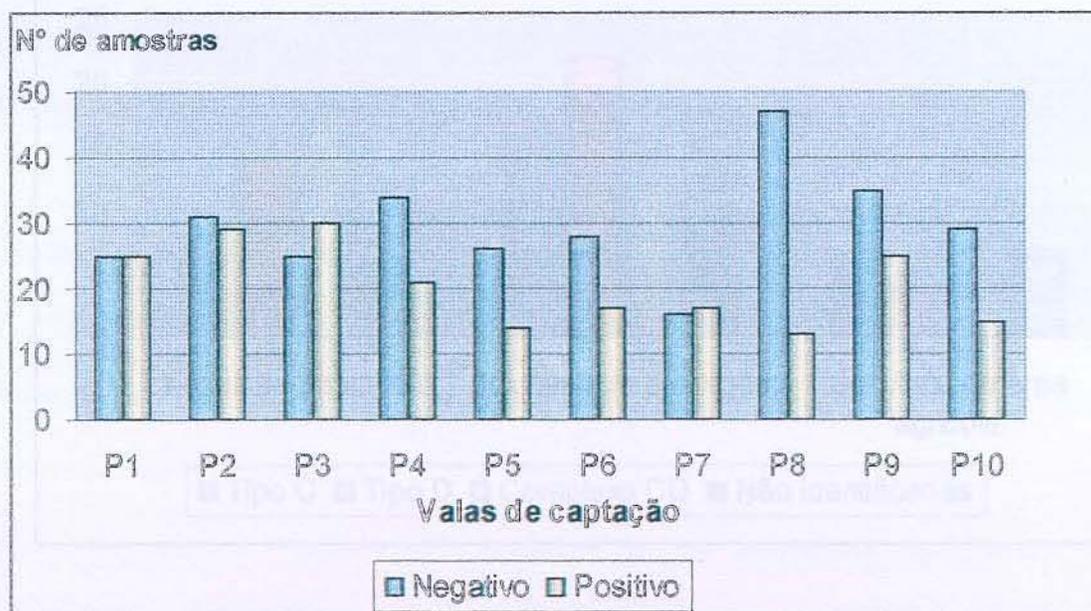


FIGURA 7 – Representação gráfica do resultado da análise das amostras de fezes de bovinos, colhidas em valas de captação de pastagem, para a evidenciação de esporos de *Clostridium botulinum*.

TABELA 8 - Resultado da tipificação pela microfixação de complemento de amostras positivas no bioensaio em camundongo

| Origem | Total de amostras tipificadas | <i>Clostridium botulinum</i> | | | | | | | |
|---------------|-------------------------------|------------------------------|-------|--------|-------|-------------|-------|-----|-------|
| | | Tipo C | | Tipo D | | Complexo CD | | NI* | |
| | | N. | % | N. | % | N. | % | N. | % |
| Área pastagem | | | | | | | | | |
| Solo/limo | 68 | 16 | 23,53 | 22 | 32,35 | 12 | 17,65 | 18 | 26,47 |
| Fezes | 46 | 08 | 17,39 | 14 | 30,43 | 18 | 39,13 | 06 | 13,04 |
| Área agrícola | | | | | | | | | |
| Solo/limo | 22 | 06 | 27,27 | 4 | 18,18 | 5 | 22,73 | 7 | 31,82 |
| Total | 136 | 30 | 22,06 | 40 | 29,41 | 35 | 25,74 | 31 | 22,79 |

* NI = não identificadas.

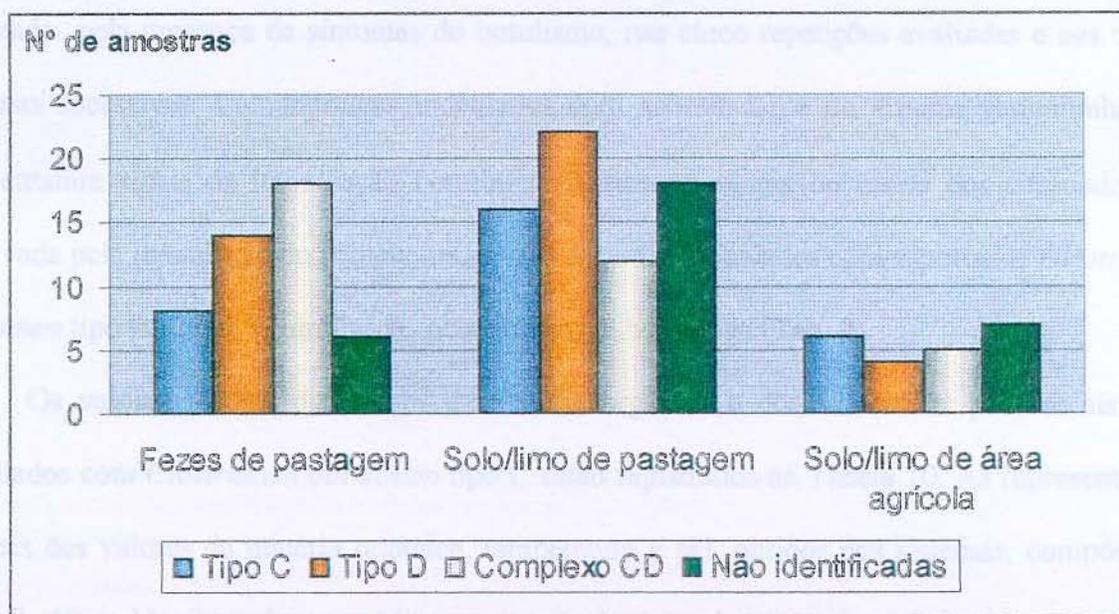


FIGURA 3 – Representação gráfica do resultado da tipificação da toxina botulínica pela microfixação de complemento das amostras positivas no bioensaio em camundongo.

4.2 Cultivo de cepas de *Clostridium botulinum* tipos C e D em sistema solo/fezes de bovino/água de chuva

Foram constituídos cinco sistemas solo/fezes de bovino/água de chuva para cada tipo de *Clostridium botulinum* C e D. Dois sistemas adicionais, um para cada tipo, foram utilizados como testemunha. Os resultados das análises físico-químicas, do crescimento bacteriano e da detecção e tipificação da toxina botulínica, obtidos nas colheitas semanais para o tipo C, estão registrados na Tabela 9. Não foi registrado crescimento de *Clostridium botulinum* tipo C nas diluições avaliadas, em amostragem semanal e por um período de 4 semanas. A presença de toxina botulínica, mesmo em níveis não suficientes para provocar a morte dos camundongos foi detectada pela presença de sintomas do botulismo, nas cinco repetições avaliadas e nas quatro semanas sucessivas. Camundongos inoculados com sobrenadante do sistema testemunha não apresentaram sinais da intoxicação botulínica. A sintomatologia ou morte dos camundongos, observada pela inoculação do sobrenadantes dos sistemas inoculados com esporos de *Clostridium botulinum* tipo C, foram neutralizadas pela antitoxina homóloga (Tab. 9).

Os valores médios dos teores da matéria orgânica e dos valores de pH nos sistemas inoculados com *Clostridium botulinum* tipo C estão registrados na Tabela 10. As representações gráficas dos valores da matéria orgânica, temperatura e pH, obtidos nos sistemas, compõem as Figs. 9, 10 e 11. Os valores médios semanais do teor de matéria orgânica das repetições, avaliados por quatro semanas consecutivas, não diferiram entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$), e ocorreram variações significativas nos valores do pH ($p=0,0001$) e a temperatura variou de 25°C a 28°C dos sistemas inoculados com o *Clostridium botulinum* tipo C .

TABELA 9 – Resultados das análises físico-químicas, quantificação da matéria orgânica, contagem bacteriana, detecção e tipificação da toxina botulínica nos sistemas solo/fezes de bovino/água de chuva inoculados com *Clostridium botulinum* tipo C

| Sistemas | Semanas | pH | Temp (°C) | Matéria orgânica (ppm) | Contagem bacteriana (diluições) | | | Bioensaio em camundongo | | Soroneutralização (tipo) |
|----------------|----------------|------|-----------|------------------------|---------------------------------|------|-------|-------------------------|--------------|--------------------------|
| | | | | | Pura | 1:10 | 1:100 | Inativado | Sem inativar | |
| 1 | 0 ^a | 5,20 | 28 | 20.000 | * | * | * | | | |
| | 1 | 5,15 | 28 | 20.000 | - | - | - | - | + | C |
| | 2 | 5,29 | 26 | 22.000 | - | - | - | - | + | C |
| | 3 | 5,21 | 25 | 21.500 | - | - | - | - | ± | C |
| | 4 | 5,53 | 27 | 21.500 | - | - | - | - | ± | C |
| 2 | 0 ^a | 5,52 | 28 | 21.500 | * | * | * | | | |
| | 1 | 5,11 | 28 | 21.500 | - | - | - | - | + | C |
| | 2 | 5,31 | 26 | 20.500 | - | - | - | - | ± | C |
| | 3 | 5,48 | 25 | 23.000 | - | - | - | - | ± | C |
| | 4 | 5,53 | 27 | 22.500 | - | - | - | - | ± | C |
| 3 | 0 ^a | 5,52 | 28 | 23.500 | * | * | * | | | |
| | 1 | 5,16 | 28 | 20.000 | - | - | - | - | + | C |
| | 2 | 5,33 | 26 | 20.500 | - | - | - | - | ± | C |
| | 3 | 5,30 | 25 | 21.000 | - | - | - | - | ± | C |
| | 4 | 5,58 | 27 | 20.500 | - | - | - | - | ± | C |
| 4 | 0 ^a | 5,31 | 28 | 22.500 | * | * | * | | | |
| | 1 | 5,13 | 28 | 21.500 | - | - | - | - | ± | C |
| | 2 | 5,30 | 26 | 20.500 | - | - | - | - | ± | C |
| | 3 | 5,57 | 25 | 23.500 | - | - | - | - | ± | C |
| | 4 | 5,58 | 27 | 22.500 | - | - | - | - | ± | C |
| 5 | 0 ^a | 5,32 | 28 | 21.000 | * | * | * | | | |
| | 1 | 5,11 | 28 | 21.500 | - | - | - | - | + | C |
| | 2 | 5,31 | 26 | 20.500 | - | - | - | - | ± | C |
| | 3 | 5,48 | 25 | 23.000 | - | - | - | - | ± | C |
| | 4 | 5,58 | 27 | 22.500 | - | - | - | - | ± | C |
| 6 ¹ | 0 ^a | 5,30 | 28 | 23.000 | * | * | * | | | |
| | 1 | 5,18 | 28 | 21.000 | - | - | - | - | - | |
| | 2 | 5,30 | 26 | 21.500 | - | - | - | - | - | |
| | 3 | 5,31 | 25 | 23.000 | - | - | - | - | - | |
| | 4 | 5,48 | 27 | 20.000 | - | - | - | - | - | |

* A estimativa no ponto zero foi feita pelo cálculo da diluição do inoculo de 5ml de suspensão com $5,90 \times 10^4$ UFC em 400mL do sistema solo/fezes de bovino/água de chuva, o que resultou em 1475 UFC/mL.

¹ Testemunho negativo.

- = Negativo.

+ = Positivo (Sintomas e óbito).

± = Sintomas.

a = Os parâmetros físico-químicos foram medidos antes da inoculação da suspensão de bactérias.

TABELA 10 - Valores médios dos teores matéria orgânica e do pH, avaliados no sistema solo/fezes de bovinos/água de chuva inoculados com o *Clostridium botulinum* tipo C

| <i>Clostridium botulinum</i> tipo C | Matéria orgânica ($\bar{x} \pm s$) | pH ($\bar{x} \pm s$) |
|-------------------------------------|--------------------------------------|------------------------|
| 0 | 21.833 \pm 1.366 a | 5,30 \pm 0,05 b |
| 1 | 20.917 \pm 736 a | 5,14 \pm 0,03 c |
| 2 | 20.917 \pm 665 a | 5,31 \pm 0,01 b |
| 3 | 22.583 \pm 1.068 a | 5,39 \pm 0,14 b |
| 4 | 21583 \pm 1.114 a | 5,56 \pm 0,04 a |
| P | 0,0595 | 0,0001 |
| CV % | 4,82 | 1,22 |

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5% ($p > 0,05$).

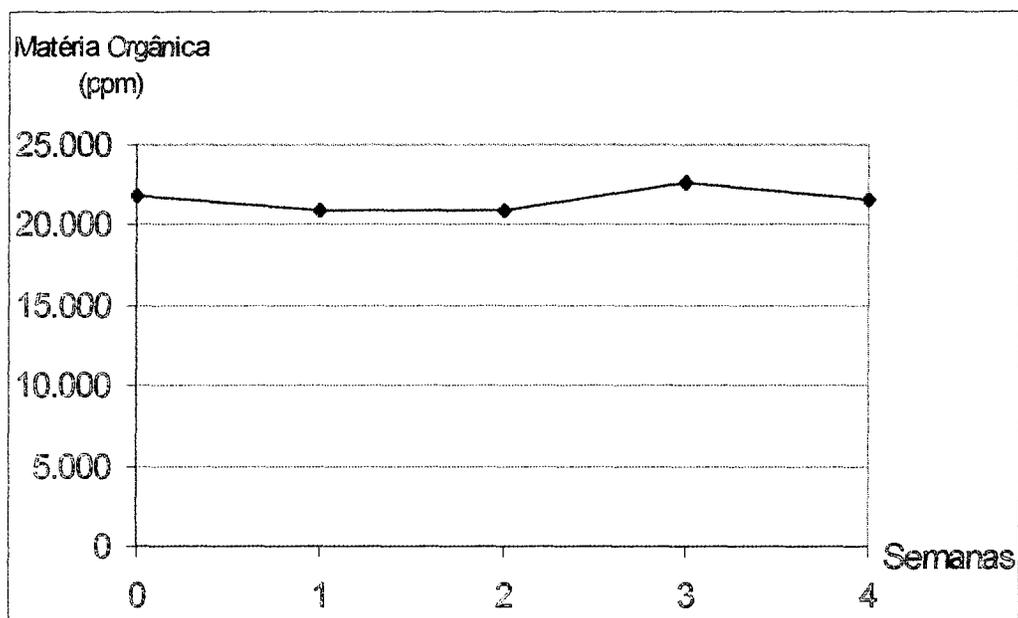


FIGURA 9 - Representação gráfica das médias dos valores das análises do teor de matéria orgânica nos sistemas inoculados com *Clostridium botulinum* tipo C.

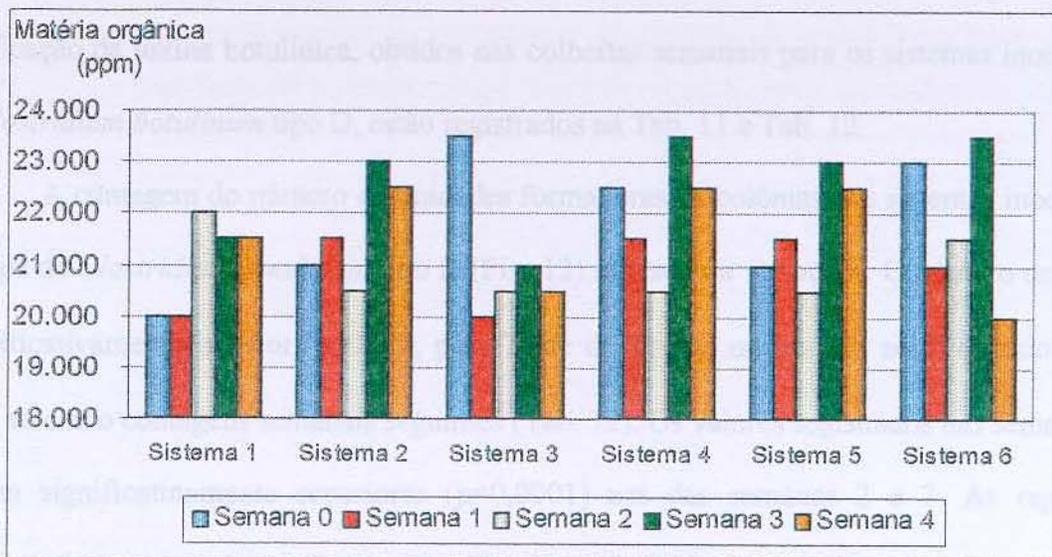


FIGURA 10 – Representação gráfica dos valores semanais da matéria orgânica nos sistemas inoculados com *Clostridium botulinum* tipo C e testemunha.

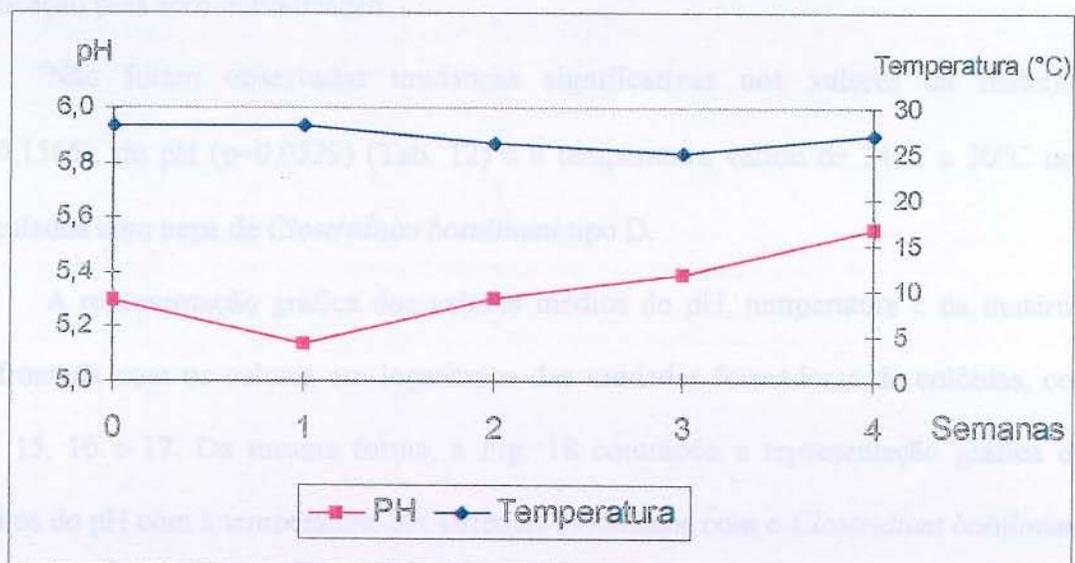


FIGURA 11 - Representação gráfica das médias do pH e da temperatura nos sistemas inoculados com *Clostridium botulinum* tipo C.

Os resultados das análises físico-químicas, do crescimento bacteriano e da detecção e tipificação da toxina botulínica, obtidos nas colheitas semanais para os sistemas inoculados com o *Clostridium botulinum* tipo D, estão registrados na Tab. 11 e Tab. 12.

A contagem do número de unidades formadoras de colônias dos sistemas inoculados com a cepa de *Clostridium botulinum* tipo D (Fig. 12) apresentou variações. O número de esporos foi significativamente inferior ($p > 0,05$), pelo Teste de Tukey, na semana zero, quando comparado com as cinco contagens semanais seguintes (Tab. 12). Os valores registrados nas semanas 1, 4 e 5 foram significativamente superiores ($p = 0,0001$) aos das semanas 2 e 3. As representações gráficas destas variações estão nas Fig. 13 e Fig. 14. O coeficiente de variância calculado foi de 9,89% (Tab. 12). Em um dos sistemas não foi possível detectar o crescimento bacteriano, embora tenha sido detectada a presença de toxina botulínica pela inoculação em camundongo e tipificação pela soroneutralização.

Não foram observadas mudanças significativas nos valores da matéria orgânica ($p = 0,1565$), do pH ($p = 0,0529$) (Tab. 12) e a temperatura variou de 24°C a 30°C nos sistemas inoculados com cepa de *Clostridium botulinum* tipo D.

A representação gráfica dos valores médios do pH, temperatura e da matéria orgânica, confrontada com os valores em logaritmos das unidades formadoras de colônias, compõem as Fig. 15, 16 e 17. Da mesma forma, a Fig. 18 contrapõe a representação gráfica dos valores médios do pH com a temperatura dos sistemas inoculados com o *Clostridium botulinum* tipo D.

TABELA 11 – Resultados das análises físico-químicas, quantificação da matéria orgânica, contagem bacteriana, detecção e tipificação da toxina botulínica nos sistemas solo/fezes de bovino/água de chuva inoculados com *Clostridium botulinum* tipo D

| Sistemas | Semanas | PH | Temp. (°C) | Matéria orgânica (ppm) | Contagem bacteriana (diluições) | | | Bioensaio em camundongo | | Soroneutralização (tipo) |
|----------------|----------------|------|------------|------------------------|---------------------------------|------|-------|-------------------------|--------------|--------------------------|
| | | | | | Pura | 1:10 | 1:100 | Inativado | Sem inativar | |
| 1 | 0 ^a | 6,51 | 28 | 23.000 | * | * | * | | | |
| | 1 | 6,59 | 30 | 24.000 | 100 | 100 | 400 | - | + | D |
| | 2 | 6,54 | 30 | 23.000 | 84 | 160 | - | - | + | D |
| | 3 | 6,73 | 26 | 22.000 | 80 | - | 200 | - | + | D |
| | 4 | 6,65 | 24 | 22.500 | - | 220 | - | - | + | D |
| 2 | 5 | 6,60 | 24 | 22.500 | 140 | 340 | 400 | - | + | D |
| | 0 ^a | 6,48 | 28 | 22.000 | * | * | * | | | |
| | 1 | 6,27 | 30 | 22.000 | 148 | 180 | 400 | - | + | D |
| | 2 | 6,26 | 30 | 24.000 | 84 | 160 | - | - | + | D |
| | 3 | 6,34 | 26 | 24.000 | 90 | 100 | 200 | - | + | D |
| 3 | 4 | 6,42 | 24 | 21.500 | 84 | 200 | 400 | - | + | D |
| | 5 | 6,31 | 24 | 23.000 | 150 | 300 | 400 | - | + | D |
| | 0 ^a | 6,48 | 28 | 21.000 | * | * | * | | | |
| | 1 | 6,28 | 30 | 22.500 | 140 | - | 400 | - | + | D |
| | 2 | 6,57 | 30 | 24.000 | 90 | - | 200 | - | + | D |
| 4 | 3 | 6,66 | 26 | 21.000 | 90 | - | 200 | - | + | D |
| | 4 | 6,68 | 24 | 20.500 | - | 240 | - | - | + | D |
| | 5 | 6,78 | 24 | 22.000 | 160 | 400 | - | - | + | D |
| | 0 ^a | 6,48 | 28 | 23.500 | * | * | * | | | |
| | 1 | 5,13 | 30 | 23.500 | 128 | 140 | 400 | - | + | D |
| 5 | 2 | 6,52 | 30 | 24.000 | 80 | - | 200 | - | + | D |
| | 3 | 6,66 | 26 | 22.000 | 100 | 180 | - | - | + | D |
| | 4 | 6,68 | 24 | 20.500 | 90 | - | 400 | - | + | D |
| | 5 | 6,78 | 24 | 21.000 | 152 | 320 | - | - | + | D |
| | 0 ^a | 6,45 | 28 | 23.000 | * | * | * | | | |
| 6 ¹ | 1 | 6,33 | 30 | 23.000 | - | - | - | - | + | D |
| | 2 | 6,33 | 30 | 22.000 | - | - | - | - | + | D |
| | 3 | 6,31 | 26 | 22.500 | - | - | - | - | + | D |
| | 4 | 6,30 | 24 | 21.500 | - | - | - | - | + | D |
| | 5 | 6,38 | 24 | 21.500 | - | - | - | - | + | D |
| 6 ¹ | 0 ^a | 6,43 | 28 | 22.500 | | | | | | |
| | 1 | 6,38 | 30 | 22.500 | - | - | - | - | - | |
| | 2 | 6,38 | 30 | 21.000 | - | - | - | - | - | |
| | 3 | 6,44 | 26 | 22.500 | - | - | - | - | - | |
| | 4 | 6,46 | 24 | 21.500 | - | - | - | - | - | |
| 5 | 6,35 | 24 | 22.500 | - | - | - | - | - | | |

* A estimativa no ponto zero foi feita pelo cálculo da diluição do inoculo de 5ml de suspensão com $2,15 \times 10^4$ UFC em 400mL do sistema solo/limo, água de chuva e fezes de bovino, o que resultou em 53,7 UFC/mL.

¹ Testemunha.

- = Negativo.

+ = Positivo (Sintomas e óbito).

± = Sintomas.

a = Os parâmetros físico-químicos foram medidos antes da inoculação da suspensão de bactérias.

TABELA 12 - Valores médios da contagem de esporos de *Clostridium botulinum* tipo D, da matéria orgânica e do pH, avaliados nos sistemas solo/fezes de bovinos/água de chuva

| <i>C. botulinum</i> tipo D | Contagem de esporos | Matéria orgânica ($\bar{x} \pm s$) | pH ($\bar{x} \pm s$) |
|----------------------------|---------------------|--------------------------------------|------------------------|
| 0 | 50 ± 0 c | 22.500 ± 894 a | 6,47 ± 0,03 a |
| 1 | 234 ± 30 a | 22.833 ± 753 a | 6,38 ± 0,12 a |
| 2 | 128 ± 9 b | 23.083 ± 1.114 a | 6,43 ± 0,13 a |
| 3 | 139 ± 6 b | 22.333 ± 983 a | 6,52 ± 0,18 a |
| 4 | 233 ± 11 a | 21.750 ± 880 a | 6,52 ± 0,15 a |
| 5 | 273 ± 25 a | 21.917 ± 736 a | 6,52 ± 0,20 a |
| P | 0,0001 | 0,1565 | 0,0529 |
| CV % | 9,89 | 4,24 | 1,39 |

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5% ($p > 0,05$).

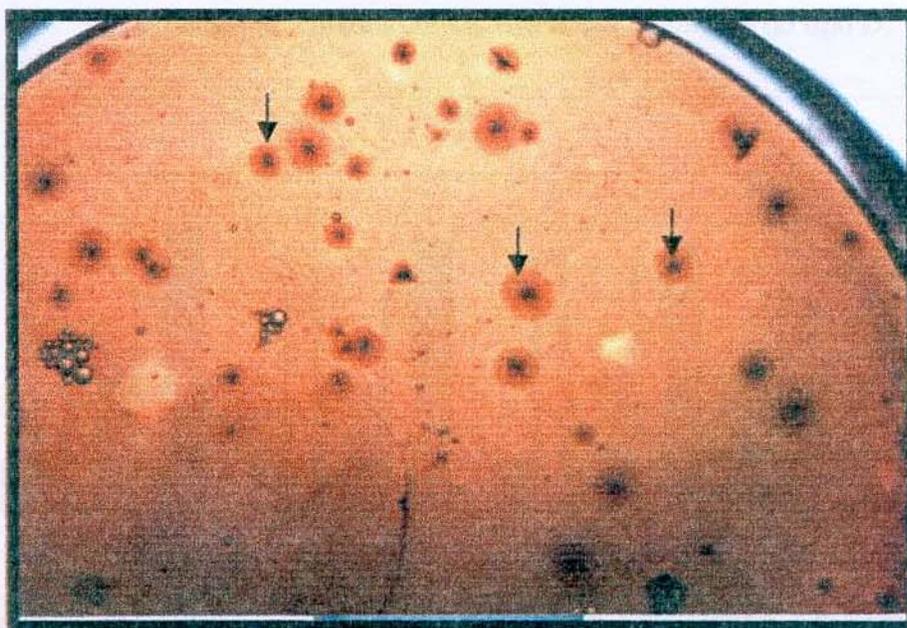


FIGURA 12 - Aspecto do crescimento do *Clostridium botulinum* tipo D (►) em meio de cultura TPGY-EY inoculado com solo/fezes de bovino/água de chuva.

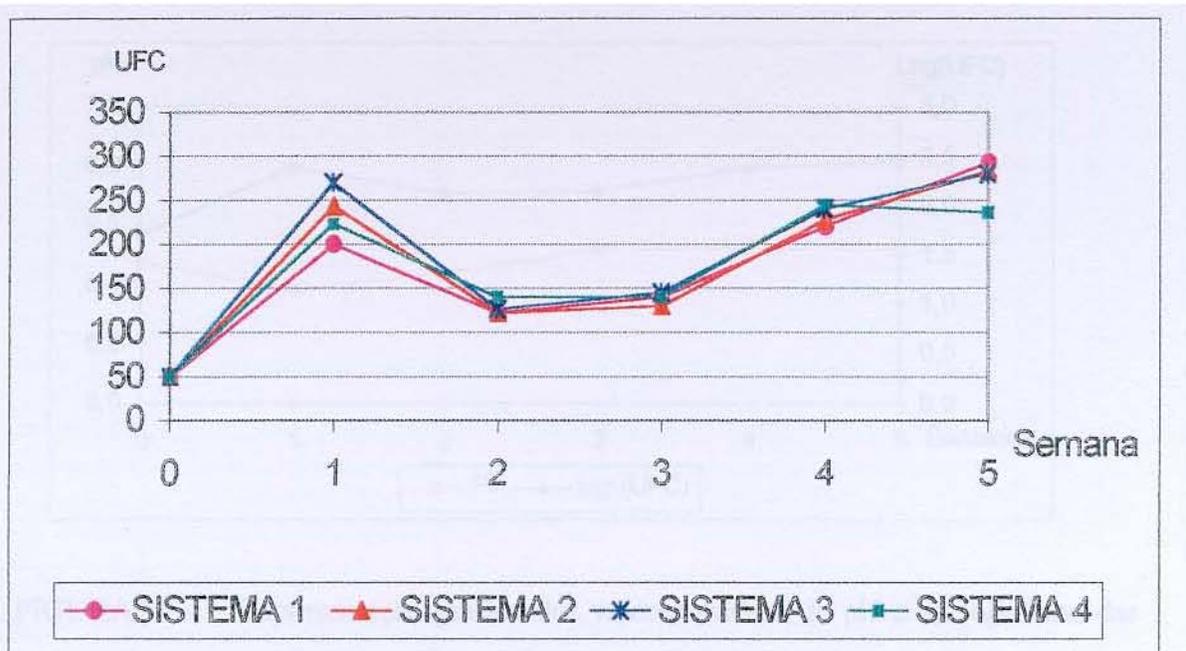


FIGURA 13 – Representação gráfica dos valores médios das unidades formadoras de colônias nos sistemas inoculados com *Clostridium botulinum* do tipo D.

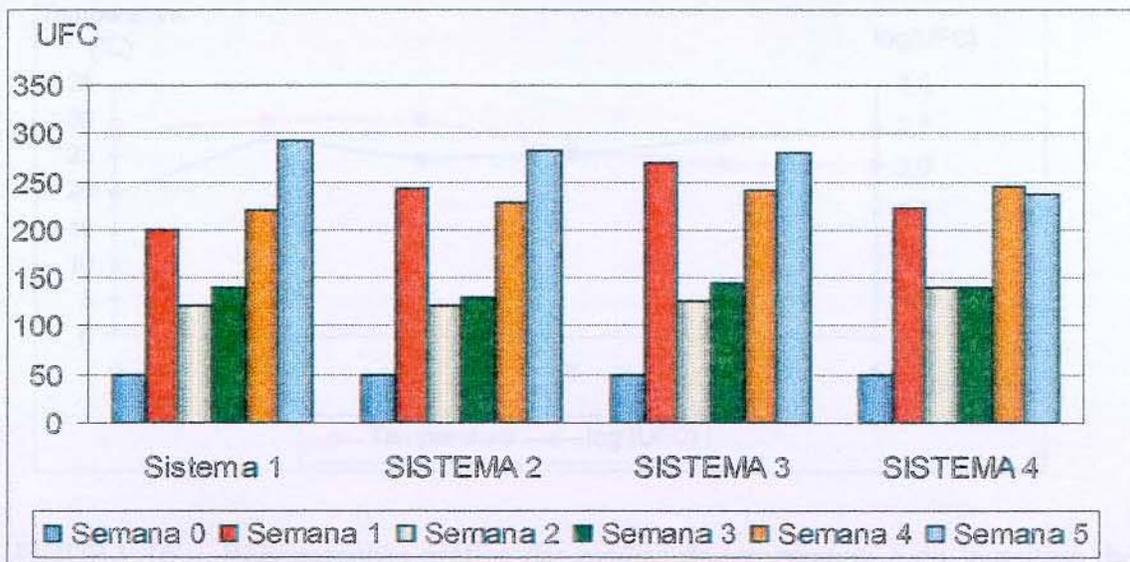


FIGURA 14 - Representação gráfica da média das unidades formadoras de colônias (UFC) dos sistemas inoculados com o *Clostridium botulinum* tipo D.

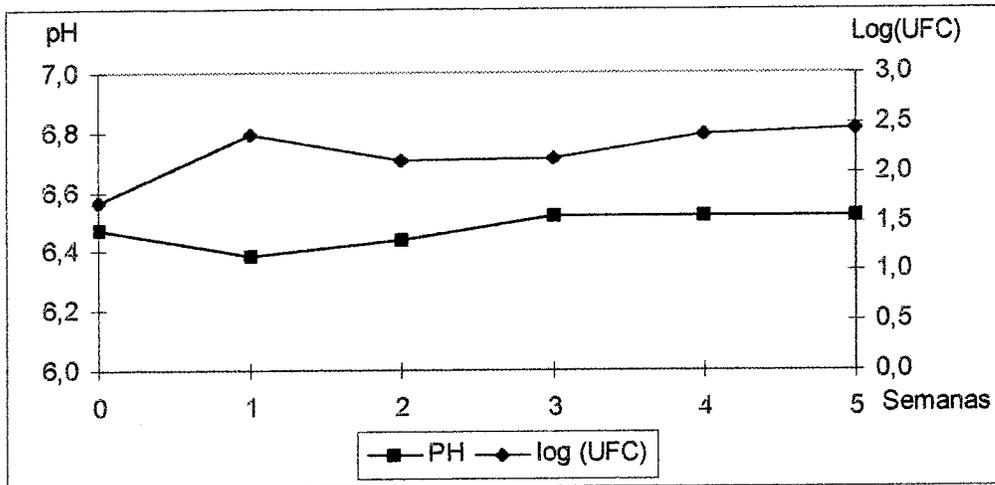


FIGURA 15 - Representação gráfica dos valores médios do pH e do logaritmo das unidades formadoras de colônias dos sistemas inoculados com *Clostridium botulinum* tipo D.

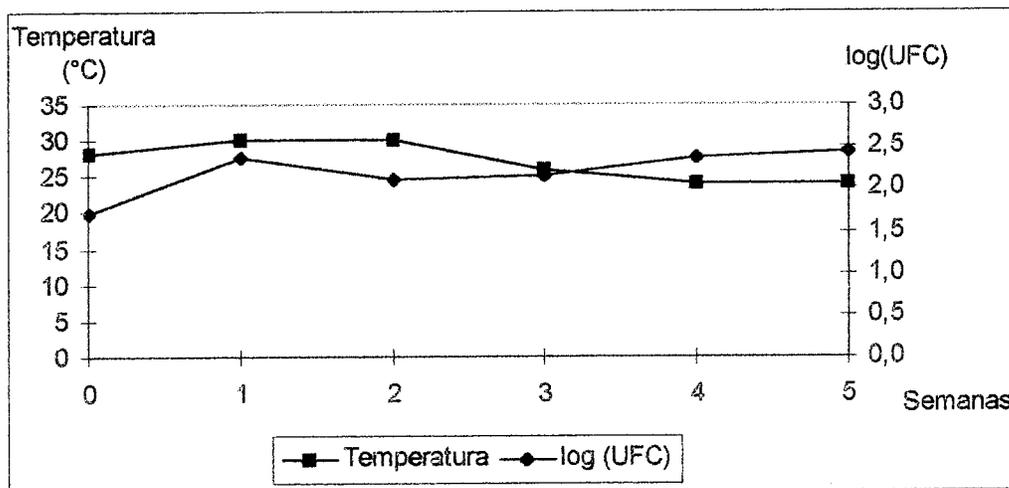


FIGURA 16 - Representação gráfica das médias da temperatura e do logaritmo das unidades formadoras de colônias dos sistemas inoculados com o *Clostridium botulinum* tipo D.

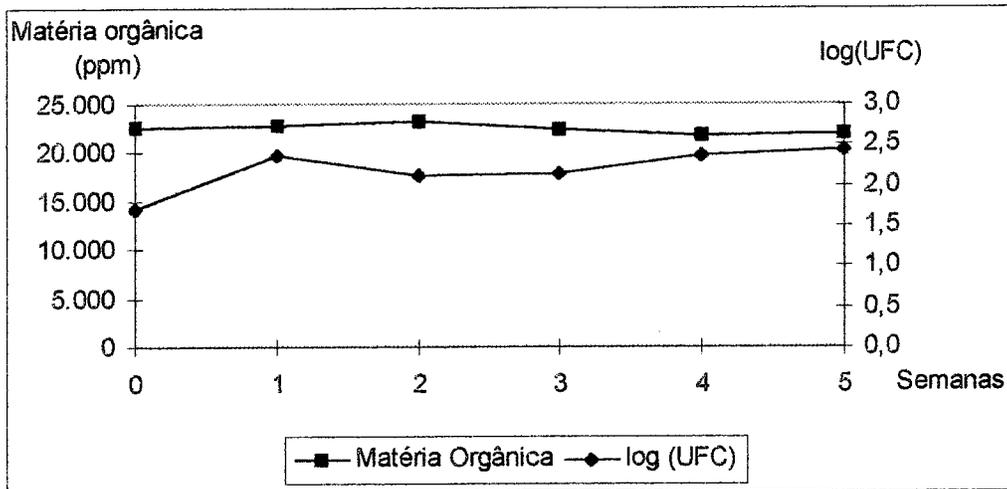


FIGURA 17 - Representação gráfica dos valores médios de matéria orgânica e do logaritmo das unidades formadoras de colônias dos sistemas inoculados com *Clostridium botulinum* tipo D.

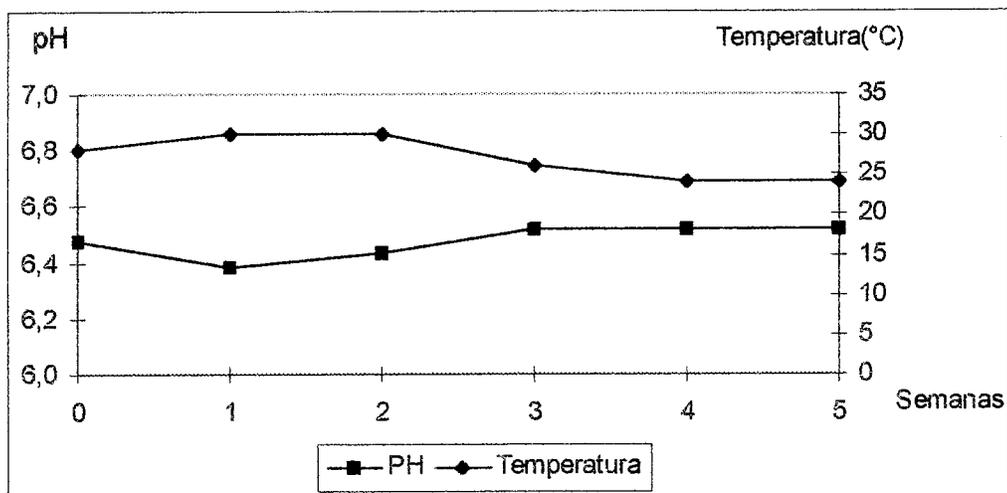


FIGURA 18 - Representação gráfica dos valores das médias do pH e da temperatura dos sistemas do tipo D.

5 DISCUSSÃO

O botulismo é um importante problema sanitário, econômico e ambiental da bovinocultura brasileira. Nos bovinos trata-se de uma intoxicação, na qual a toxina formada previamente é ingerida pelos animais. No país, a doença tem sido associada à osteofagia (DÖBEREINER et al., 1992), à ingestão de alimentos contaminados (DUTRA, 2001) e à presença na pastagem de água estagnada contaminada (DUTRA et al., 2001).

Os surtos de botulismo de origem hídrica, assim denominados quando a água de dessedentação dos animais está envolvida na veiculação da toxina, ocorrem associados à duas situações distintas. Uma delas decorre da presença de cadáveres de pequenos animais ou mesmo de bovinos que entram em decomposição no interior das valas; a outra da presença de grande quantidade de material vegetal em pequenas coleções de água estagnada, ambas com a presença de *Clostridium botulinum* tipos C e D e suas toxinas (DUTRA et al., 2001).

Dois aspectos relacionados com o botulismo associado à ingestão de água estagnada foram objetos de estudo do presente trabalho: a verificação da contaminação ambiental pelo *Clostridium botulinum* tipos C e D de valas de captação localizadas em áreas agrícolas e em área de pastagem de bovinos, e o cultivo de cepas dos dois tipos em um sistema constituído por solo/fezes de bovinos/água de chuva, para a verificação do eventual crescimento bacteriano e tentativa de detecção da toxina botulínica.

As valas de captação utilizadas no presente estudo constituíram-se de coleções de água de chuva localizadas em depressões especialmente construídas no solo com a finalidade de evitar ou conter a erosão decorrente da precipitação pluviométrica. Conseqüentemente, nas propriedades rurais as valas acabam sendo utilizadas pelos animais para a sua dessedentação. Com o acesso

direto às valas, freqüentemente os animais defecam e urinam no seu interior, gerando situações inusitadas e que potencialmente facilitam a transmissão de enfermidades de veiculação feco-oral.

Os dados descritivos constantes das Tab. 1 a 5, referentes à dimensão e profundidade das valas de captação e dos valores do pH, temperatura e do teor de matéria orgânica da água das valas de captação refletiram as suas condições no momento das visitas mensais nas propriedades ou da sua tomada e registro nas valas localizadas em áreas de pastagem e agrícolas. As variações das dimensões e profundidades das valas revelam a dinâmica dessas coleções e estão relacionadas com diversos fatores, dentre eles a precipitação pluviométrica, o tipo de solo, o local da construção, a taxa de evaporação e o consumo pelos animais quando localizadas em áreas de pastagem.

Os valores médios do pH não diferiram quando comparados os registrados nas valas de captação localizadas em áreas de pastagem e agrícolas. No entanto, ocorreram diferenças significativas nos valores da temperatura média e nos teores da matéria orgânica. O fato dos valores médios da matéria orgânica serem significativamente superiores nas valas de captação localizadas na pastagem de bovinos não pode ser atribuído à presença de animais. Por outro lado, a tomada da temperatura da água das valas não foi correlacionada com a temperatura ambiental, o que eventualmente poderia também contribuir para elucidar o porque dessas diferenças.

Os valores elevados da matéria orgânica das valas localizadas na pastagem devem-se provavelmente à contaminação fecal provocada pelos bovinos, o que pode ser claramente observado por ocasião das visitas. As variações dessa contaminação fecal decorrem da taxa de lotação da pastagem, hábito dos animais e tempo de permanência no local. Deve-se ressaltar que a construção das oito valas localizadas nas áreas agrícolas eram mais recentes que as localizadas

nas áreas de pastagem, não sendo possível precisar o quanto por ocasião do levantamento efetuado nas propriedades.

A ocorrência de esporos de *Clostridium botulinum* no solo/limo das valas de captação revelou a intensidade da contaminação ambiental pelo microrganismo, com valores significativamente superiores das valas localizadas nas áreas de pastagem e tendo como referência valas localizadas em áreas agrícolas. Estes dados, em conjunto com os resultados que demonstraram que 41,20% (206/500) das amostras fezes de bovinos colhidas ao redor das valas continham esporos da bactéria, indicam o envolvimento da contaminação fecal bovina como sendo um elemento importante na veiculação de esporos para as valas. Isto, no entanto, não exclui a possibilidade da própria água das chuvas carrear fezes e o microrganismo para o interior das valas, uma vez que estas estão localizadas em áreas de sedimentação, construídas com a finalidade de captar água de pequenas áreas evitando assim a erosão.

A presença de bactéria do gênero *Clostridium*, e em particular o *Clostridium botulinum*, nas fezes de herbívoros e onívoros é amplamente conhecida (SEIFERT & BOEHNEL, 1994; SILVA, 1996). NOTERMANS et al. (1981) avaliaram a persistência do *C. botulinum* tipo B em uma fazenda de gado leiteiro após um surto de botulismo. Na ocasião, constataram que a adubação do capim com as fezes de bovinos contendo esporos da bactéria fazia com que a silagem preparada com a gramínea estivesse contaminada, completando-se assim o ciclo do microrganismo e os riscos de novas intoxicações. Esta situação encontra paralelo com as observações do presente estudo, onde os animais eliminam pelas fezes esporos da bactéria e contaminam direta ou indiretamente a água de dessedentação.

A tipificação dos cultivos positivos no bioensaio em camundongo, realizada pela microfização de complemento e por amostragem, evidenciou a ocorrência de *Clostridium*.

botulinum dos tipos C e D, ou considerados como pertencentes ao complexo CD. Nas 46 amostras de fezes de bovinos positivas e examinadas pela microfização, seis (13,04%) pertenceram a outros tipos de toxina botulínica, não sendo possível a sua tipificação. Nas 22 amostras de solo das valas localizadas nas áreas agrícolas, positivas no bioensaio e que foram tipificadas, sete (31,82%) pertenceram também a outros tipos de *Clostridium botulinum*. Isso indica que outros tipos de *Clostridium botulinum*, além dos C e D, estão também eventualmente envolvidos na contaminação ambiental nessas áreas.

As valas de captação encontram paralelo na literatura com as cacimbas utilizadas como bebedouros de bovinos no Vale do Araguaia, Estado de Goiás, Brasil, e avaliadas por SOUZA (2001) para a presença de *Clostridium botulinum* tipos C e D. Segundo o autor, as cacimbas com mais idade têm maior probabilidade de estarem contaminadas com os esporos da bactéria. Da mesma forma, as amostras de fezes de bovinos examinadas apresentaram maior positividade (31%), quando comparadas com as amostras de solo superficial (19%) e das provenientes dos sedimentos das cacimbas (10%).

No presente estudo a porcentagem de amostras de solo/limo, oriundas das valas de captação da pastagem e positivas para a presença da bactéria foi 59,67%, enquanto que a positividade das amostras de fezes foi de 41,2%. A diferença na intensidade da contaminação ambiental numa localidade decorre de uma série de fatores, dentre eles o histórico da ocorrência de surtos anteriores da doença (SEIFERT & BOEHNEL, 1994). A elevada positividade de amostras de solo provenientes das valas de captação localizadas na pastagem decorre provavelmente também do fato de que nas propriedades estudadas ocorreram surtos de botulismo anteriormente, associados na ocasião com a origem hídrica (DUTRA et al., 2001).

O cultivo de cepas de *Clostridium botulinum* tipos C e D em sistemas constituídos por solo, fezes de bovino e água de chuva teve por objetivo verificar se ocorre a multiplicação bacteriana e eventual formação de toxina botulínica, numa tentativa de simulação das condições em que são relatadas a ocorrência de surtos da intoxicação associados à presença de água estagnada (DUTRA et al., 2001) quando não são encontrados carcaças de animais no interior da valas. Não existem dados na literatura consultada sobre a quantidade mínima de toxina botulínica suficiente para desencadear casos individuais ou eventualmente surtos em rebanhos.

Da mesma forma é desconhecida a dinâmica da formação da toxina na natureza e a sua associação com surtos da intoxicação.

Os valores da matéria orgânica, temperatura e do pH nos sistemas simulados, avaliados por um período de quatro semanas consecutivas não apresentaram variações significativas para os tipos C e D. O mesmo não ocorreu, no entanto, com a contagem bacteriana. Não houve crescimento bacteriano para o tipo C, enquanto que nos sistemas simulados inoculados com o tipo D foi possível verificar amplas variações na contagem bacteriana em pelo menos quatro das cinco repetições avaliadas. O número de esporos foi inferior na semana zero, quando comparado com as cinco contagens semanais seguintes (Tab. 12). Os valores registrados nas semanas 1, 4 e 5 foram significativamente superiores aos das semanas 2 e 3, com coeficiente de variância de 9,89%. A temperatura e o pH dos sistemas inoculados encontram-se dentro da faixa de normalidade para o crescimento bacteriano *in vitro*, embora a temperatura tenha sido abaixo das condições ótimas para a multiplicação bacteriana relatadas por SMITH (1988).

Em todos os denominados sistemas, inoculados com a cepa de *Clostridium botulinum* do tipo D, foi possível detectar a toxina botulínica homóloga pela soroneutralização em camundongo. Desta forma, pode-se concluir que houve multiplicação bacteriana, seguida também

da presença de toxina botulínica em níveis detectáveis pelo bioensaio em camundongo por até cinco semanas consecutivas, com desencadeamento de sintomas e morte dos camundongos e neutralização pela antitoxina D.

Um aparente paradoxo, no entanto, ocorreu nos sistemas inoculados com a cepa do tipo C, nos quais não foi possível evidenciar o crescimento bacteriano, mas a toxina pode ser detectada pelo bioensaio e neutralizada pela antitoxina homóloga. Neste caso, deve-se ressaltar que a quantidade de toxina detectada, na maioria das avaliações, não foi suficiente para desencadear a morte dos camundongos (Tab. 9). Foram observados apenas os sintomas do botulismo, sendo os mesmos neutralizados pela antitoxina botulínica C.

Um aspecto a ser considerado refere-se à metodologia utilizada para o preparo da suspensão bacteriana das cepas do *Clostridium botulinum* para a inoculação nos sistemas, que não garantiu a utilização exclusiva da forma esporulada da bactéria. Não foi possível, desta maneira, excluir a possibilidade de que a lise celular das formas vegetativas tenha sido responsável pela presença de toxina botulínica detectada pelo bioensaio.

Diversos fatores estão envolvidos na multiplicação dos microrganismos anaeróbios esporulados e produção de suas toxinas (SEIFERT & BOEHNEL, 1994). O cultivo de cepas de *Clostridium botulinum* tipos C e D em sistemas constituídos por solo/fezes de bovino/água de chuva foi na realidade uma tentativa de simulação *in vitro* das condições em que estão associadas a ocorrência de surtos de botulismo em condições naturais e sem a presença de cadáveres nas aguadas. Estudos desta natureza são complexos, uma vez que envolvem diferentes fatores, alguns ainda desconhecidos e que são decisivos para a multiplicação bacteriana e eventual formação de toxina. Por outro lado, não encontram paralelo na literatura.

Estudos conduzidos para avaliar as condições em que ocorrem a multiplicação bacteriana e formação de toxina botulínica em alimentos processados e destinados à alimentação humana foram realizados com outros tipos, excetuando-se os *Clostridium botulinum* C e D (SMITH, 1977). As condições para a ativação e germinação dos esporos, crescimento pós-germinação, substratos ideais, condições ótimas de crescimento, resistência ao calor, à radiação, agentes químicos e formação de toxinas foram amplamente estudadas para os tipos envolvidos no botulismo humano.

A ocorrência de esporos de *Clostridium botulinum* dos tipos C e D nas fezes dos bovinos e no solo/limo do interior das valas de captação de área de pastagem, associada à possibilidade de crescimento bacteriano no sistema solo/fezes de bovino/água de chuva e presença de toxina botulínica, demonstrados no presente estudo para o tipo D, evidencia o envolvimento potencial dessas coleções de água das chuvas como a origem da intoxicação botulínica. São necessários estudos para elucidar os mecanismos envolvidos na formação da toxina botulínica e a participação da água das valas de captação no desencadeamento da intoxicação botulínica, com a finalidade de fornecer subsídios para se indicar mudanças no sistema tradicional utilizado na dessedentação de bovinos.

6 CONCLUSÕES

A avaliação da contaminação ambiental pelo *Clostridium botulinum* tipos C e D em valas de captação em áreas agrícolas e de pastagem de bovinos e o cultivo de cepas destes microrganismos em um sistema experimental constituído por solo/fezes de bovinos/água de chuva permitiram concluir que:

- a) o teor de matéria orgânica e a temperatura das valas de captação localizadas nas áreas de pastagem foram superiores aos das valas localizadas nas áreas agrícolas;
- b) a contaminação ambiental do solo/limo do interior das valas de captação localizadas nas áreas de pastagem por esporos de *Clostridium botulinum* tipos C e D foi significativamente superior à contaminação das valas de captação das áreas agrícolas;
- c) 41,2% das amostras de fezes dos bovinos colhidas ao redor das valas de captação das áreas de pastagem foram consideradas positivas para a presença de esporos de *Clostridium botulinum*, quando avaliadas indiretamente;
- d) esporos de *Clostridium botulinum* dos tipos C e D, ou considerados como pertencentes ao complexo CD, predominaram tanto nas amostras de solo/limo positivas e tipificadas (73,5%), quanto nas amostras de fezes dos bovinos (86,9%), quando comparados com os outros tipos;
- e) não foi detectado crescimento bacteriano no sistema experimental constituído por solo/fezes de bovino/água de chuva inoculado com *Clostridium botulinum* tipo C;

f) no sistema experimental constituído por solo/fezes de bovino/água de chuva e inoculado com *Clostridium botulinum* tipo D ocorreu a multiplicação bacteriana, seguida da presença de toxina homóloga em níveis detectáveis pelo bioensaio em camundongo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BELL, J.F.; SCIPLE, G.W. & HURBERT, A.A. A microenvironment concept of the epizootology of avian botulism. **J. Wildl. Mgmt.**, v. 19, n. 3, p. 352-357, 1955.
2. BOTT, T.L.; JOHNSON, J.; FOSTER, E.M. & SUGIYAMA, H. Possible origin of high incidence of *Clostridium botulinum* type E in an Inland Bay (Green Bay of Lake Michigam). **J. Bacteriol.**, v. 95, n. 5, p. 1542-1547, 1968.
3. DÖBEREINER, J.; TOKARNIA, C.H., LANGENEGGER, J. & DUTRA, I.S. Epizootic botulism of cattle in Brazil. **Dtsch. Tierarztl. Wschr.**, v. 99, p. 188 –190, 1992.
4. DOLMAN, C.E. & CHANG, E. Bacteriophages of *Clostridium botulinum*. **Can. J. Microbiol.**, v. 18, p. 67-76, 1972.
5. DOUTRE, M.P. Frequence au Sénégal du botulisme animal d' origine hydrique. **Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop.**, v.22n. 1, p. 29-31, 1969.
6. DOWELL, V.R.; HAWKINS, T.M. Laboratory methods in anaerobic bacteriology – CDC Control Disease Center). U. S. Departament of Health, Education, and Welfare. Public Health Service, **Center for Disease Control** (Atlanta), Georgia, 1974.
7. DUTRA, I. S. Epidemiologia, quadro clínico e diagnóstico pela soroneutralização em camundongo do botulismo em bovinos no Brasil, 1989–2000. Araçatuba, SP. 2001. 157p. Tese (Livre–Docência) – Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista.
8. DUTRA, I.S; DÖBEREINER, J.; ROSA.I.V. ; SOUZA, L.A.A. ; NONATO, M. Surtos de botulismo em bovinos no Brasil associados á ingestão de água contaminada. **Pesq. vet. Bras.**, v.2, p.43 –48, 2001.

9. DUTRA, I.S.; DÖBEREINER, J. Fatos e teorias sobre a doença da vaca caída: botulismo. **Hora Veterinária**, v. 84, p. 7-10, 1995.
10. EKLUND, M.W.; POYSKY, F.T.; REED, S.M. & SMITH, C.A. Bacteriophage and toxicity of *Clostridium botulinum* type D. **Nature New Biol.**, v. 235, p. 16-17, 1972.
11. FACH, P.; GILBERT, M., GRIFFAIS, R., GUILLOU, J.P., & POPOFF, M.R. PCR and gene probe identification of botulinum neurotoxin A-, B-, E-, F-, and G-producing *Clostridium spp.* and evaluation in food samples. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, n. 1, p. 389-392, 1995.
12. GIL, C.O. & PENNY, N. Occurrence of *Clostridium botulinum* at aquatic sites in and around Auckland and other urban areas of the North Island. **N. Z. Vet. J.**, v. 30, p. 110-112, 1980.
13. GIMÉNEZ, D.F.; GIMÉNEZ, J.A. Serological subtypes of botulinum neurotoxins. In: Dasgupta, B.R. **Botulinum and tetanus neurotoxins**, New York; Plenum Press, p. 421-431, 1993.
14. GRAHAM, J.M. Inhibition of *Clostridium botulinum* type C by bacteria isolate from mud. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 45, n. 1, p. 205-211, 1978.
15. HIELM, S., BJÖRKROTH, J., HYYTIÄ, E., & KORKEALA. Prevalence of *Clostridium botulinum* in finnish trout farms: Pulsed-Field Gel Electrophoresis typing reveals extensive genetic diversity among type E isolates. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, n. 11, p. 4161-4167, 1998.
16. INOUE, K. & IIDA, H. Conversion of toxigenicity in *Clostridium botulinum* type C. **J. Microbiol.**, v. 14, n. 1, p. 87-89, 1970.

17. INOUE, K. & IIDA, H. Phage-conversion of toxigenicity in *Clostridium botulinum* types C and D. **Jpn. J. Med. Sci.**, v. 24, n. 34, p. 53–56, 1971.
18. JANSEN, B.C. The toxic antigenic factors produced by *Clostridium botulinum* type C and D. **J. Vet. Res.**, v. 38, n. 2, p. 93-98, 1971.
19. JUNQUEIRA, V.C.A; LEITÃO, M.F.F. Otimização de meio de cultura para contagem de *Clostridium botulinum* em alimentos. In: **Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**, II, 1997, Campinas, SP. Anais. Campinas, UNICAMP, p. 153-154, 1997.
20. KRIEK, N.P.J.; ODENDAAL, M.W. Botulism. In: COETZER, J.A.W.; THOMSON, G.R.; TUSTIN, R.C. (ed.) *Infectious diseases of livestock*. Cape Town : Oxford Press, p. 1354–1371, 1994.
21. MANUAL DE OPERAÇÃO E MANUTENÇÃO DE E.T.A. (META), São Paulo, Secretaria de Serviços e Obras Públicas, CETESB, v. 2, p. 736, 1973.
22. MEYER, K.F. Maximum oxygen tolerance of *Clostridium botulinum* A, B and C, of *Clostridium sporogenes* and *Clostridium welchii*. **J. Infect. Dis.**, v. 44, p. 408-411, 1929.
23. NOTERMAN, S.; DUFRENNE, J. & OOSTEROM, J. Persistence of *Clostridium botulinum* type B on a cattle farm after outbreak of botulism. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 41, n. 1, p. 179-183, 1981.
24. OGUMA, K.; YAMAGUCHI, T.; SUDOU, K.; YOKOSAWA, N. & FUJIKAWA, Y. Biochemical classification of *Clostridium botulinum* type C and D strains and their nontoxigenic derivatives. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 51, n. 2, p. 256-260, 1986.
25. OGUMA, K.; SYUTO, B., IIDA, H. & KUBO, S. Antigenic similarity of toxins type C and D strains. **Inf. Immunity.**, v. 30, n. 3, p. 656–660, 1980.

26. QUORTRUP, E.R. & HOLT, L. Detection of potencial botulinus-toxin-producing areas in western duck marshes with suggestions for control. **J. Bacteriol.**, v. 41, p. 363-372, 1941.
27. RIBAS, A.I.; FERREIRA, R.M.M.; MAZZER, R.C. Detecção de esporos e toxinas de *Clostridium botulinum* em costelas de cadáveres decompostos de bovinos. In: **Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, Olinda, v. 23, p. 142, 1994.
28. SANDLER, R.J.; ROCKE T.E.; SAMUEL, M.D. & YUILL, T.M. Seasonal prevalence of *Clostridium botulinum* type C in sediments of a northern California wetland. **J. Wild. Dis.**, v. 29, n. 4, p. 533-539, 1993.
29. SAS – INSTITUTE. SAS/STAT user's guide version 6.12. Cary Statistical Analysis System Institute, 1998. 956p.
30. SEIFERT, H.; BÖHNEL, H. Clostridioses. In: BLOBEL, H. & SCHLIESSER, T. **Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren**. Band II. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, p. 89-153, 1994.
31. SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A. & SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. Livraria Varela, São Paulo, 295 p., 1997.
32. SILVA, T.M.D. Ocorrência de esporos de *Clostridium botulinum* tipos C e D em áreas de criação de búfalos na Baixada Maranhense. Seropédica, RJ. 1996. 65 f. UFRRJ. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós Graduação, UFRRJ.
33. SILVA, T.M.D.; DUTRA, I.S.; CASTRO, R.N. & DÖBEREINER, J. Ocorrência e distribuição de esporos de *Clostridium botulinum* tipos C e D em áreas de criação de búfalos na Baixada Maranhense. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 18, n. 3/4, p. 127-131, 1996.

34. SKULBERG, A. & HAUSKEN, W. The differentiation of various of *Clostridium botulinum* and transformation experiments with type E. **J. Appl. Bact.**, v. 28, p. 83-89, 1965.
35. SMITH, G.R. & MILLIGAN, R.A. *Clostridium botulinum* in soil on the site of the former Metropolitan (Caledonian) Cattle Market, London. **J. Hyg.**, v. 83, n. 2, p. 237-241, 1979.
36. SMITH, G.R.; MILLIGAN, R.A. & MORYSON, C.J. *Clostridium botulinum* in aquatic environments in Great Britain and Ireland. **J. Hyg.**, v. 80, p. 431-438, 1978.
37. SMITH, G.R. & MORYSON, C.J. *Clostridium botulinum* in the lakes and waterways of London. **J. Hyg.**, v. 75, n. 3, p. 371-379, 1975.
38. SMITH, G.R. & MORYSON, C.J. The low prevalence of *Clostridium botulinum* in the lakes, marshes and waterways of the Camargue. **J. Hyg.** v. 78, n. 1, p. 33-37, 1977a.
39. SMITH, G.R. & MORYSON, C.J. A comparison of the distribution of *Clostridium botulinum* in soil and in lake mud. **J. Hyg.**, v. 78, n. 1, p. 39-41, 1977b.
40. SMITH, L.D.S. Inhibition of *Clostridium botulinum* by strain of *Clostridium perfringens* isolated from soil. **Applied. Microbiol.**, v. 30, n. 2, p. 319-323, 1975.
41. SMITH, L.D.S. **Botulism: the organism, its toxins, the disease.** Springfield, Illinois: Charles C. Thomas, 1977.
42. SMITH, L.D.S. & SUGIYAMA, H. **Botulism: the organism, its toxins, the disease.** 2 ed., Springfield, Illinois: Charles C. Thomas, 1988.

43. SONNABEND, W.F.; SONNABEND, U.P. & KRECH, T. Isolation of *Clostridium botulinum* type G from Swiss soil specimens by using sequential steps in an identification scheme. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 53, n. 8, p. 1880-1884, 1987.
44. SOUZA, A. M. Ocorrência de esporos e toxinas de *Clostridium botulinum* tipos C e D em cacimbas utilizadas como bebedouros de bovinos em pastagens do Vale Araguaia, Estado de Goiás, Brasil. São Paulo, 2001. 164 f. Tese (Doutorado)- Universidade de São Paulo.
45. SOUZA, A.M. & LANGENEGGER, J. Esporos de *Clostridium botulinum* em torno de cadáveres decompostos de bovinos em pastagens do sul de Goiás. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 7, n. 1, p. 17-22, 1987.
46. THIONGANE, Y., LEFORBAN, Y. & DOUTRE, M.P. Le botulism type D an Senegal. Un nouveau foyer d'origine hydrique responsable d'une forte mortalité. **Rev. Elev. Med. Pays Trop.**, v. 37, n. 2, p. 152-154, 1984.
47. VENKASTESWARAM, K.; NAKANO, H., OKABE, T., TAKAYAMA, K., MATSUDA, O. & HASHIMOTO, H. Occurrence and distribution of *Vibrio spp.*, *Listonella spp.* and *Clostridium botulinum* in the Seto Island Sea of Japan. **App. Envir. Microb.**, v. 55, n. 3, p. 559-567, 1989.
48. WARD, B.Q.; GARRET, E.S. & REESE, G.B. Further indication of *Clostridium botulinum* in Latin American waters. **Appl. Microbiol.**, v. 15, n. 6, p. 1509, 1967.
49. WEISS, H.S. & WEISS, H. Nachweis von *Clostridium botulinum* toxin mittels mikro-wärmekomplementbindungsreaktion. **Tierärztl. Umschau**, v. 43, p. 117-126, 1988.
50. WILLIAMSON, J.L. ROCKE, T.E. & AIKEN, J.M. In situ detection of the *Clostridium botulinum* type C₁ toxin gene in wetland sediments with a wested PCR assay. **Appl. Env. Microbiol.**, v. 65, n. 7, p. 3240-3243, 1999.

51. ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. 4. ed. New Jersey: Prentice – Hall. 1998. 930p.