

Universidade Federal de Minas Gerais  
Conselho de Pós-Graduação  
Escola de Veterinária

DISTRIBUIÇÃO DE ESPOROS DE *Clostridium botulinum* NO SOLO EM  
TORNO DE CADÁVERES DECOMPOSTOS DE BOVINOS VÍTIMAS DE BOTULISMO  
EM PASTAGENS NO SUL DE GOIÁS

Aires Manoel de Souza

Belo Horizonte  
Minas Gerais  
1985

Aires Manoel de Souza

DISTRIBUIÇÃO DE ESPOROS DE *Clostridium botulinum* NO SOLO EM  
TORNO DE CADÁVERES DECOMPOSTOS DE BOVINOS VÍTIMAS DE BOTULISMO  
EM PASTAGENS NO SUL DE GOIÁS

Tese apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.

Área: Medicina Veterinária Preventiva.

Belo Horizonte  
Minas Gerais  
1985

Souza, Aires Manoel de, 1950 -


S729d Distribuição de esporos de *Clostridium botulinum* no solo em torno de cadáveres decompostos de bovinos vítimas de botulismo em pastagens no sul de Goiás. Belo Horizonte, Escola de Veterinária da UFMG, 1985.  
66p. ilustr.

Tese, Mestre em Medicina Veterinária.

1. *Clostridium botulinum*. 2. Contaminação do solo. 3. Poluição de pastagem. 4. Tipificação de toxina. 5. Botulismo bovino. I. Título.

CDD - 636.208 961 931 5

Aprovada em: 20/12/1985



---

PROF. JEROME LANGENEGGER  
- Orientador -



---

PROF. ÉLVIO CARLOS MOREIRA



---

PROF. RÔMULO CERQUEIRA LEITE



À minha esposa, Marta;  
ã minha filha, Ana Carolina;  
ao Pedro Alzadir (in memorian);  
aos meus pais e irmãos,  
pelo carinho, amor e estímulo  
recebidos, dedico este trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Jerome Langenegger, pela valiosa orientação e incentivo.

À Unidade de Apoio ao Programa Nacional de Pesquisa em Saúde Animal - EMBRAPA - Itaguaí, Rio de Janeiro, que possibilitou a realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Goiás, pela oportunidade de realizar o curso de Pós-Graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela bolsa de estudo concedida.

A Dra. Charlotte Hubinger Langenegger, da Unidade de Apoio ao Programa Nacional de Pesquisa em Saúde Animal - EMBRAPA - Itaguaí, Rio de Janeiro, pela atenção e incentivo.

À Bibliotecária Eunice de Faria Lopes, da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, pela orientação bibliográfica.

Ao Prof. Lauro Boechat Batista, do Departamento de Matemática da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela orientação na análise estatística.

Ao Dr. Mauro Faber de Freitas Leitão, do Instituto de Tecnologia de Alimentos - Campinas, São Paulo, pela ajuda e orientação.

Ao Departamento de Produção Animal da Secretaria da Agricultura do Estado de Goiás e à EMATER-GO, pela valiosa

atenção e ajuda durante os trabalhos de campo.

Ao Instituto Interamericano de Cooperação para Agricultura IICA-Brasília, por ter fornecido os soros antibotulínicos.

Ao Prof. Joel Cecílio, do Departamento de Agricultura da Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás pelo interesse e valiosas sugestões.

Aos funcionários da Unidade de Apoio ao Programa Nacional de Pesquisa em Saúde Animal - EMBRAPA - Itaguaí, Rio de Janeiro, que contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos professores Edson Clemente dos Santos e Nivaldo da Silva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, pelas sugestões.

Ao Ministério da Agricultura - Campinas, São Paulo; Laboratório Rhodia Merieux - Paulínia, São Paulo; Centro Panamericano de Febre Aftosa - Duque de Caxias, Rio de Janeiro; Fundação Osvaldo Cruz - Rio de Janeiro e a PESAGRO - Niterói, Rio de Janeiro, por terem fornecido parte dos animais de laboratório utilizados neste trabalho.

À Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia - Coordenação Preventiva, pelo apoio financeiro.

Aos professores do curso de Pós-Graduação, pela agradável convivência.

Ao Dr. Guido Antônio de Caux, pelos trabalhos de revisão.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação, especialmente ao Jurandir e Terezinha, pelo companheirismo e amizade.

À todos aqueles que, de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho.

## RESUMO

Foi avaliada a distribuição de esporos de *Clostridium botulinum* em torno de 30 cadáveres decompostos de bovinos, supostamente vítimas de botulismo, de 15 municípios no sul de Goiás. A partir do local em que o cadáver se decompôs e na direção dos quatro pontos cardeais, coletaram-se 630 amostras de solo. A detecção de toxina botulínica dos filtrados das 630 culturas de solo foi obtida pela inoculação em cobaias e revelou a presença em 221 culturas (35,07%). A identificação dos tipos de *Clostridium botulinum*, utilizando-se a técnica de soroneutralização em camundongos, permitiu reconhecer as toxinas de 204 (32,38%) culturas pertencentes a cinco tipos, sendo 44 do tipo A (21,57%); dois do tipo B (0,98%); 37 do tipo C (18,14%); 41 do tipo D (20,10%); 77 do complexo CD (37,74%) e três do tipo G (1,47%). Os tipos E e F não foram encontrados. As toxinas de 17 (2,69%) culturas não puderam ser identificadas conclusivamente.

## SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. EVOLUÇÃO DOS ESTUDOS SOBRE <i>Clostridium botulinum</i> E EPIZOOTIOLOGIA DO BOTULISMO BOVINO NO ESTADO DE GOIÁS.	4
2.1. Primeiros isolamentos dos tipos de <i>Clostridium botulinum</i> .....	4
2.2. Relação dos tipos de <i>Clostridium botulinum</i> com as propriedades do solo.....	5
2.3. Ubiquidade do <i>Clostridium botulinum</i> .....	5
2.3.1. Em cadáveres.....	5
2.3.2. No fundo de águas estagnadas.....	6
2.4. Persistência do <i>Clostridium botulinum</i> no solo...	6
2.5. Tipos de <i>Clostridium botulinum</i> .....	7
2.6. Propriedades sorológicas das toxinas do <i>Clostridium botulinum</i> .....	7
2.7. Persistência das toxinas do <i>Clostridium botulinum</i> em restos de cadáveres.....	7
2.8. Perpetuação dos esporos de <i>Clostridium botulinum</i> no solo de região carente em fósforo.....	8



	Página
2.9. Ocorrência de esporos do <i>Clostridium botulinum</i> no solo.....	9
2.9.1. América do Norte.....	9
2.9.2. América do Sul.....	11
2.9.3. Europa.....	12
2.9.4. Ásia.....	13
2.9.5. África.....	14
2.9.6. Austrália.....	14
2.9.7. U.R.S.S.....	14
2.10. Aspectos bacteriológicos sobre a comprovação da presença de esporos de <i>Clostridium botulinum</i> no solo.....	14
2.11. Epizootiologia do botulismo bovino no Estado de Goiás.....	16
3. LITERATURA CONSULTADA.....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1. Considerações sobre a região em que foram coletadas as amostras de solo.....	20
4.1.1. Localização geográfica.....	20
4.1.2. Tipo de vegetação.....	20
4.1.3. Tipos de solo.....	20
4.1.4. Clima.....	21
4.2. Localização dos cadáveres decompostos.....	21
4.3. Procedimento da coleta das amostras de solo para pesquisa de <i>Clostridium botulinum</i> .....	21
4.4. Culturas de solo.....	22
4.4.1. Local da realização do trabalho laboratorial.....	22
4.4.2. Preparo das culturas e dos filtrados...	22
4.4.3. Detecção de toxina botulínica nos filtrados das culturas de solo.....	23

4.4.4.	Adequação da concentração da toxina dos filtrados para o teste da soro-neutralização em camundongos.....	23
4.5.	Teste de soro-neutralização para identificação dos tipos de <i>Clostridium botulinum</i> .....	24
4.5.1.	Técnica utilizada.....	24
4.5.2.	Procedência dos soros antibotulínicos..	24
4.5.3.	Procedimento do teste de soro-neutralização.....	24
4.6.	Análise química e física do solo.....	25
4.6.1.	Procedimento da coleta das amostras de solo para análise química e física.....	25
4.6.2.	Métodos utilizados para análise química e física.....	25
4.7.	Análise estatística.....	26
5.	RESULTADOS.....	27
6.	DISCUSSÃO.....	30
6.1.	Poluição do solo pelos tipos de <i>Clostridium botulinum</i> C, D e complexo CD através de cadáveres decompostos.....	30
6.2.	Frequência de <i>Clostridium botulinum</i> tipos A, B e G no solo.....	31
6.3.	Frequências dos tipos de <i>Clostridium botulinum</i> C, D e complexo CD, considerando a declividade	32
6.4.	Frequência dos tipos de <i>Clostridium botulinum</i> A, B, C, D, G e E complexo CD presentes no solo, associados aos valores químicos e físicos dos solos.....	33
7.	CONCLUSÕES.....	35

	Página
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
9. ANEXOS.....	63



## LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA I - Distribuição dos cadáveres decompostos por município, propriedade, tempo de decomposição e relevo que o circundava -sul de Goiás, 1984.....	37
TABELA II - Distribuição panorâmica de esporos de <i>Clostridium botulinum</i> no solo, demonstrado através da toxina botulínica produzida nas culturas e reprodução experimental do botulismo em cobaias - sul de Goiás, 1984...	38
TABELA III - Distribuição panorâmica dos tipos de <i>Clostridium botulinum</i> no solo, no local e em torno dos 30 cadáveres decompostos - sul de Goiás, 1984.....	39
TABELA IV - Tipos de <i>Clostridium botulinum</i> identificados do solo, no local e em torno dos 30 cadáveres decompostos - sul de Goiás, 1984..	40
TABELA V - Número e percentagens de culturas tóxicas de solo, em relação a cada um dos 30 cadáveres decompostos - sul de Goiás, 1984....	41

TABELA VI	- Número e percentagens de tipos de <i>Clostridium botulinum</i> identificados nas culturas tóxicas de solo, em relação a cada um dos 30 cadáveres decompostos - sul de Goiás, 1984.....	42
TABELA VII	- Distribuição dos diversos tipos de <i>Clostridium botulinum</i> no local e em várias distâncias dos cadáveres decompostos - sul de Goiás, 1984.....	43
TABELA VIII	- Número de <i>Clostridium botulinum</i> tipos A, B, C, D, complexo CD e G, encontrados no solo, no local e em torno dos 30 cadáveres decompostos, considerando os pontos cardeais e as distâncias - sul de Goiás, 1984.....	43
TABELA IX	- Número de <i>Clostridium botulinum</i> tipos A, B, C, D, complexo CD e G, encontrados no solo, no local e em torno dos 30 cadáveres decompostos, considerando os pontos cardeais e as distâncias. Dados transformados para $\sqrt{y+0,5}$ - sul de Goiás, 1984.....	44
TABELA X	- Análise de variância dos números de <i>Clostridium botulinum</i> tipos A, B, C, D, complexo CD e G, encontrados no solo, no local e em torno dos 30 cadáveres decompostos, considerando os pontos cardeais e as distâncias. Dados transformados para $\sqrt{y+0,5}$ - sul de Goiás, 1984.....	44
TABELA XI	- Distribuição e percentual dos tipos C, D e complexo CD de <i>Clostridium botulinum</i> identificados no solo, no local e em torno dos 30 cadáveres decompostos, considerando as distâncias - sul de Goiás, 1984.....	45

TABELA XII	- Distribuição e percentual dos tipos C, D e complexo CD de <i>Clostridium botulinum</i> identificados no solo, no local e em torno dos 30 cadáveres decompostos, considerando as distâncias - sul de Goiás, 1984.....	45
TABELA XIII	- Número de <i>Clostridium botulinum</i> tipos C, D e complexo CD, encontrados no solo, no local e em torno dos 30 cadáveres decompostos, considerando os pontos cardeais e as distâncias - sul de Goiás, 1984.....	46
TABELA XIV	- Número de <i>Clostridium botulinum</i> tipos C, D e complexo CD, encontrados no local e em torno dos 30 cadáveres decompostos, considerando os pontos cardeais e as distâncias. Dados transformados para $\sqrt{y+0,5}$ - sul de Goiás, 1984.....	46
TABELA XV	- Análise de variância dos números de <i>Clostridium botulinum</i> tipos C, D e complexo CD, encontrados no solo, no local e em torno dos 30 cadáveres decompostos, considerando os pontos cardeais e as distâncias. Dados transformados para $\sqrt{y+0,5}$ - sul de Goiás, 1984.....	47
TABELA XVI	- Número de <i>Clostridium botulinum</i> tipos C, D e complexo CD encontrados no solo, no local e em torno dos 30 cadáveres decompostos, considerando a declividade - sul de Goiás, 1984.....	47
TABELA XVII	- Valores químicos do solo e número de tipos de <i>Clostridium botulinum</i> encontrados no solo, no local ou em torno dos 30 cadáveres decompostos - sul de Goiás, 1984.....	48

TABELA XVIII - Valores físicos do solo e número de tipos de <i>Clostridium botulinum</i> encontrados no solo, no local ou em torno dos 30 cadáveres decompostos - sul de Goiás, 1984.....	49
TABELA XIX - Correlação entre os valores químicos (pH, Ca+Mg, P e K) e os valores físicos (areia, silte e argila), com os números de <i>Clostridium botulinum</i> tipos A, B, C, D, G e complexo CD, encontrados no solo, no centro e em torno dos 30 cadáveres decompostos - sul de Goiás, 1984.....	50

## LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 - Bovino procurando pegar osso no local em que se decompôs o cadáver.....	51
FIGRUA 2 - Bovino roendo osso na pastagem de Brachiaria verde e abundante.....	51
FIGURA 3 - Cadáver de bovino, com solo sem vegetação pelo pisoteio de bovinos e urubus.....	52
FIGURA 4 - Camundongo com abdomen cintado e incoordenação motora, caracterizando botulismo.....	52

## LISTA DE MAPAS

	Página
MAPA 1 - Localização dos municípios do Estado de Goiás onde foram coletadas amostras de solo para pesquisa de <i>Clostridium botulinum</i> e análises química e física do solo.....	53



## 1. INTRODUÇÃO

A região de cerrado do Estado de Goiás desenvolveu-se no setor da agropecuária, a partir da década de 1960, com a implantação de grandes projetos agropecuários.

Com a substituição gradual das pastagens nativas por pastagens cultivadas e a introdução de bovinos selecionados, desencadearam-se os surtos enzoóticos de botulismo (LANGENEGGER & DOBEREINER, 1980), emergidos no final de 1977, tendo ocasionado a mortalidade de milhares de bovinos, principalmente vacas em gestação e em lactação, cujos cadáveres decompostos nas pastagens, certamente contribuíram para o enriquecimento do solo por esporos de *Clostridium botulinum*.

A importância das pesquisas voltadas para o *Clostridium botulinum* repousa principalmente na elevada patogenicidade da toxina produzida por esta bactéria, tanto nos animais como no homem. Nos animais, principalmente nos bovinos, o botulismo torna-se um problema econômico pela alta taxa de mortalidade de animais em regiões com solos e pastagens carentes em fósforo (THEILER, 1920; SEDDON, 1922). No homem, além do botulismo clássico, de origem alimentar, a bactéria pode também provocar aquele oriundo de lesão séptica, anfractuosa e profunda (MERSON & DOWELL, 1973) e o botulismo infantil (PICKETT et alii, 1976).

BURKE (1919) demonstrou pela primeira vez a presen

ça do esporo do *Clostridium botulinum* no solo, sendo que os primeiros estudos sobre sua distribuição no solo foram realizados por MEYER & DUBOVSKY (1922b) nos Estados Unidos. Os resultados desses estudos deram lugar a uma série de trabalhos em vários países do mundo, onde as pesquisas sobre *Clostridium botulinum* vêm se desenvolvendo, o que permite a coleta de valiosas informações relacionadas com aspectos diversos, como a distribuição de seus esporos no ambiente natural, em alimentos mais frequentemente contaminados e aprimoração de técnicas mais adequadas para seu isolamento e identificação.

Sabe-se que o *Clostridium botulinum* tem seu habitat original e preferencial no solo, embora haja variações na frequência de isolamentos nos diversos tipos de solos. As evidências indicam a ampla distribuição de *Clostridium botulinum* nos vários continentes e países, não se podendo afirmar que existam áreas de exclusão da bactéria na superfície terrestre. É provável que as variações relatadas nos índices de ocorrência nos vários países sejam muito mais devidas às deficiências em termos qualitativos e quantitativos das pesquisas voltadas para o *Clostridium botulinum* do que uma eventual irregularidade na distribuição do mesmo.

No Brasil foram poucas as pesquisas sobre a presença de esporos de *Clostridium botulinum* no solo, impedindo, portanto, uma avaliação mais concreta de sua ocorrência.

Neste trabalho procurou-se avaliar a presença de esporos de *Clostridium botulinum* no solo de uma região enzoótica de botulismo.

As áreas escolhidas foram propriedades de 15 municípios situados em região de cerrado, localizados no sul de Goiás.

Baseados nestes problemas e considerando-se que são relativamente poucos os trabalhos de pesquisa sobre *Clostridium botulinum* no Brasil e especialmente no Estado de Goiás, onde o botulismo ocorre sob a forma enzoótica, este trabalho tem os seguintes objetivos:

1. Revelar a presença de tipos de *Clostridium*



*botulinum* existentes no solo nesta região.

2. Avaliar a distribuição de esporos de *Clostridium botulinum* em torno de cadáveres decompostos de bovinos vítimas de botulismo.

3. Demonstrar a importância dos cadáveres decompostos na contaminação do solo por esporos de *Clostridium botulinum* e, conseqüentemente, no agravamento do botulismo enzoótico na região.

4. Analisar as correlações lineares entre os valores de análises químicas e físicas com a freqüência dos tipos de *Clostridium botulinum* no solo da região.

## 2. EVOLUÇÃO DOS ESTUDOS SOBRE *Clostridium botulinum* E EPIZOOTIOLOGIA DO BOTULISMO BOVINO NO ESTADO DE GOIÁS

### 2.1. Primeiros isolamentos dos tipos de *Clostridium botulinum*

Hã vários sēculos jã se conhecia, na Europa, o sīndrome do botulismo, mas somente VAN ERMENGEM (1897), na Alemanha, conseguiu esclarecer a etiologia, demonstrando que a toxina, altamente letal, era produzida pelo *Clostridium botulinum*, encontrada em salsichas (latim = botulus) e outros produtos de origem animal e vegetal mal conservados.

BURKE (1919), nos Estados Unidos, diferenciou, pela primeira vez, toxinas de *Clostridium botulinum*, designando-as por tipos A e B. BENGSTON (1922), tambēm nos Estados Unidos, isolou de larvas da mosca *Lucilia caesar*, encontradas em cadãver de ave, o *Clostridium botulinum* tipo C alfa. SEDDON (1922), na Austrália, descobriu *Clostridium botulinum* tipo C beta em cadãver de bovino. THEILER & ROBINSON (1927) encontraram o *Clostridium botulinum* tipo D, na África do Sul, em cadãver de bovino que havia morrido de "Lamsiekte" (doença paralisante). KUSMIR et alii (1937), na Rússia, isolaram de peixe *Clostridium botulinum* tipo E. MOLLER & SCHEIBEL (1960), na Dinamarca, isolaram *Clostridium botulinum* tipo F de patē de fígado. GIMENEZ & CICCARELLI (1970a), na Argentina, identificaram *Clostridium*

*botulinum* tipo G, presente no solo.

## 2.2. Relação dos tipos de *Clostridium botulinum* com as propriedades do solo

São poucas as informações que estabelecem as relações entre propriedades do solo e a presença de tipos de *Clostridium botulinum*, já que os mesmos diferem em seu habitat com variação na frequência entre solos de diferentes áreas (SMITH, 1977a).

MEYER & DUBOVSKI (1922b) crêem que em solo de área virgem habitam cepas de *Clostridium botulinum* tipo A, as quais são substituídas por cepas do tipo B quando a mesma área é submetida a cultivo agrário. PARRY (1946) e RIEMANN (1969) mencionam que o habitat dos tipos E e F está associado com solos de áreas úmidas. GIMENEZ & CICCARELLI (1976) relatam que o tipo G foi encontrado em solo de área virgem, como também de cultivo agrário. SMITH (1975) cita que a presença de *Clostridium botulinum* tipo A se associa a solo de reação neutra ou alcalina e com baixo conteúdo orgânico.

## 2.3. Ubiquidade do *Clostridium botulinum*

A ubiquidade do *Clostridium botulinum* na natureza se dá sob a forma de esporos, encontrados no solo e na água e que se perpetuam por dois mecanismos (LANGENEGGER, 1982).

### 2.3.1. Em cadáveres

O alimento de muitos vertebrados e invertebrados, tendo contato com o solo ou com a água, pode carrear o esporo de *Clostridium botulinum* para e através do tubo digestivo de um animal. Por ocasião da morte deste, por uma causa qualquer, no cadáver, os germes aeróbios ao se multiplicarem, consomem o oxigênio, deixando um ambiente de anaerobiose, no qual o *Clostridium botulinum* e outros germes anaeróbios se multiplicam durante o processo de decomposição do cadáver. A pele do animal,

habitualmente mais resistente, serve de isolamento para o oxigênio do ar. Finda a decomposição, milhares de formas vegetativas, ao entrarem em contato com o oxigênio do ar, passam para a forma de esporos e assim se mantêm no solo ou na água à espera de um novo cadáver.

### 2.3.2. No fundo de águas estagnadas

Os esporos de *Clostridium botulinum*, presentes nos sedimentos de águas estagnadas, poluídas, ricas em matéria orgânica, aproveitam-se da anaerobiose que se cria no fundo pela falta de movimentação d'água durante períodos de estiagem e pelo consumo de oxigênio pela flora e fauna aeróbia, para multiplicar-se e produzir toxinas.

### 2.4. Persistência do *Clostridium botulinum* no solo

Trabalhos de INGRAM & ROBERTS (1970) demonstraram que nem todos os solos permitem a sobrevivência de esporos de *Clostridium botulinum*, e que isto não se deve necessariamente à competição microbiana.

SMITH (1975) cita que a presença de *Clostridium botulinum* no solo pode estar condicionada à presença de outros microrganismos que, nas culturas, inibem seu crescimento. Algumas amostras de sedimentos de rios são tão inibidoras que necessitam inóculos de  $10^6$  esporos de *Clostridium botulinum* tipo E por grama de sedimentos, para que, no cultivo, possa detectar-se toxina deste tipo. Certas cepas de *Clostridium perfringens* e de *Clostridium sporogenes*, procedentes do solo, inibem as cepas do *Clostridium botulinum* dos tipos A, B e F, porém não as dos tipos C e D.

SMITH (1977a) relata que em nenhuma das 64 amostras de solo coletadas na Ilha de Páscoa foi isolado *Clostridium botulinum*. Ou o solo desta Ilha nunca tinha sido contaminada com esta bactéria ou esta não sobrevive em solo de origem vulcânica recente.



## 2.5. Tipos de *Clostridium botulinum*

Até hoje são conhecidos sete tipos de *Clostridium botulinum*, com uma distribuição geográfica mundial. Suas toxinas são designadas por A, B, C alfa, C beta, D, E, F e G. As toxinas A, B, E e F são mais frequentemente responsáveis pelo botulismo no homem. A toxina C alfa é encontrada na grande maioria das intoxicações das aves domésticas e silvestres. As toxinas C beta e D causam o botulismo nos bovinos, eqüinos, ovinos e, esporadicamente, em outros animais. Finalmente, a toxina G, identificada recentemente, foi obtida pelo isolamento de *Clostridium botulinum* no solo da Argentina, desconhecendo-se ainda sua ocorrência em vítimas de intoxicações naturais (GIMENEZ E CICCARELLI, 1976; ACHA & SZFRES, 1977; SMITH, 1977a; LANGENEGGER et alii, 1983).

## 2.6. Propriedades sorológicas das toxinas do *Clostridium botulinum*

As toxinas produzidas pelos diversos tipos de *Clostridium botulinum* possuem efeitos farmacológicos similares, determinam o mesmo quadro clínico e são proteínas antigenicamente diferentes, com umas poucas reações cruzadas. As frações antigênicas comuns foram evidenciadas entre os tipos E e F, dado que uma grande quantidade de antitoxina E neutraliza uma pequena quantidade de toxina do tipo F. As toxinas produzidas pelos tipos C alfa, C beta e D também mantêm um relacionamento antigênico (SMITH, 1977a).

## 2.7. Persistência das toxinas do *Clostridium botulinum* em restos de cadáveres

As toxinas botulínicas podem persistir em restos de cadáveres expostos em pastagens durante longos tempos, mesmo sob a ação da luz solar.

FOURIE (1946) cita que, havendo esporos de *Clostridium*

*botulinum* na carcaça em decomposição, pode-se desenvolver toxina botulínica em poucos dias. Em fragmentos de carcaça em decomposição de um bovino foi isolada toxina botulínica até o 349 dia em região em que o botulismo nos bovinos apresentava-se sob a forma enzoótica. Carcaças de tartaruga, sob a mesma condição, retiveram a referida toxina por 324 a 351 dias.

HENNING (1956) admite que a persistência da toxina botulínica, em condições de campo (céu aberto), é influenciada pela predominância de fatores ambientes. Quando há umidade suficiente, temperatura adequada e anaerobiose, a toxina é imediatamente produzida em cadáveres em decomposição. Mas havendo mudanças de clima, a temperatura tornando-se mais fria e a umidade menor, a toxina persiste menos tempo.

#### 2.8. Perpetuação dos esporos de *Clostridium botulinum* no solo de região carente em fósforo

Admite-se que o esporo de *Clostridium botulinum* é ubiqüitário em todos os continentes e se mantém no solo, mesmo em pequena concentração, durante muitos anos. Sabe-se também que o esporo passa inofensivamente através do tubo digestivo dos animais vivos. Com a morte do animal por uma causa qualquer, porém, a flora bacteriana aeróbia, consumindo o oxigênio do trato digestivo, cria condições de anaerobiose para o desenvolvimento de *Clostridium botulinum*, cujas formas vegetativas invadem os tecidos em decomposição e produzem a toxina letífera. Partindo-se de um caso esporádico que tenha ocorrido numa região com acentuada deficiência de fósforo, pode-se compreender que o instinto da osteofagia dos bovinos possa desencadear uma cadeia epizootiológica e disseminar lentamente o botulismo numa região. Estas condições predisponentes podem fazer surgir simultaneamente os surtos em locais diferentes. O processamento seria o seguinte: o animal, ao roer ossos, ingere tecidos em decomposição impregnados com toxina botulínica e com a presença de esporos do germe. Ao morrer, em local mais ou menos distante, o cadáver torna-se nova fonte de intoxica-

ção e deixa no solo, onde a carcaça se decompõe, um novo ponto rico em esporos. Por sua vez, o pasto que ao nascer nesses locais, facilmente carrega esporos de *Clostridium botulinum* e sendo ingerido por um animal, será eliminado com as fezes, em outro ponto, contribuindo para enriquecer o solo com os esporos. Isto favorece o aparecimento de novos casos acidentais de cadáveres nos quais o *Clostridium botulinum* venha a se desenvolver. Além desta circunstância, os animais silvestres, como os urubus, carnívoros e as tartarugas contribuem para a disseminação dos esporos (TOKARNIA et alii, 1970).

## 2.9. Ocorrência de esporos do *Clostridium botulinum* no solo

O *Clostridium botulinum* é encontrado ubiqüitariamente, sob a forma de esporos, nos solos, em todas as partes do mundo, com variação, no entanto, na concentração e na distribuição dos tipos toxigênicos (SMITH, 1977a).

### 2.9.1. América do Norte

MEYER & DUBOVSKY (1922a), na Califórnia, verificaram que de 624 amostras de solo analisados, 179 deram cultivos tóxicos, dos quais 89 pertenciam ao *Clostridium botulinum* tipo A; 26 ao B; quatro tinham cepas dos tipos AB e 60 não puderam ser identificados na ocasião.

MEYER & DUBOVSKY (1922b) analisaram um total de 963 amostras de solos procedentes de todos os estados dos Estados Unidos, exceto a Califórnia, sendo 335 amostras de solo de área virgem e 628 de área de pastagem. Nos solos de área virgem detectaram *Clostridium botulinum* tipo A, em 59 amostras; B em 22 e AB em duas. Já nos solos de área de pastagem identificaram *Clostridium botulinum* tipo A em 50 amostras e B em 38.

COLEMAN (1922), estudando 12 amostras de solo de uma área de 59,57 Km<sup>2</sup> na Califórnia, verificou que oito continham



*Clostridium botulinum* do tipo A e nenhum do tipo B.

DUBOVSKY & MEYER (1922b), no Canadá, examinaram 100 amostras de solo de área virgem, detectando *Clostridium botulinum* tipo A em 15 amostras; tipo B em quatro e tipo AB em uma.

SCHOENHOLZ & MEYER (1922) demonstraram a presença de *Clostridium botulinum* tipo A em duas das 17 amostras de solo no Havaí e o tipo B em seis.

TANNER & DACK (1922) analisaram 55 amostras de solo de Illinois e 17 do Oeste Central, demonstrando em sete delas somente a presença do tipo B de *Clostridium botulinum*.

BACHMAN & HAYNES (1924) relatam que em certas regiões de Illinois, onde os solos procediam de glaciação, não puderam detectar nenhum tipo de *Clostridium botulinum* nas 146 amostras de solo que analisaram.

EASTON & MEYER (1924), na Califórnia, identificaram *Clostridium botulinum* tipo A em cinco das 50 amostras de excreto animal coletados em áreas de pastagem.

HALL & PETERSON (1924) verificaram que em 10 das 20 amostras de solo da Califórnia havia *Clostridium botulinum* tipo A, e três continham o tipo B.

DAMON & BAYABAL (1926) em Maryland, verificaram que de 72 amostras de solo analisadas, 47 deram cultivos tóxicos, dos quais 33 pertenciam ao *Clostridium botulinum* tipo A, cinco ao tipo C, quatro ao AC e cinco ao BC.

JONES & TANNER (1945) identificaram *Clostridium botulinum* tipo B em 10 das 604 amostras de solo estudadas, procedentes de Illinois, sendo que quase todas essas amostras positivas eram de solos procedentes de região de glaciação.

PARRY (1946), no Estado de Nova York, verificou que das 283 amostras de solos analisadas, 33 (11,7%) tinham *Clostridium botulinum*. Destas culturas, 26 pertenciam ao tipo A; cinco ao B e dois ao AB.

MORSE et alii (1950) encontraram *Clostridium botulinum* em só uma das amostras de solo examinadas no Estado de Geórgia, sendo provavelmente uma cultura mista dos tipos AB.



SMITH (1975) encontrou *Clostridium botulinum* tipos A e B em sete das 14 amostras de solo coletadas ao Oeste do Rio Missouri nos Estados Unidos, porém em nenhuma das sete amostras coletadas ao Leste.

#### 2.9.2. América do Sul

GIMENEZ & CICCARELLI (1968, 1970a) isolaram *Clostridium botulinum* tipo F a partir de amostras de solo provenientes de área de cultura em Balcarce, na Província de Buenos Aires, aproximadamente a 60 Km da costa do Atlântico; e na Província de Mendoza, isolaram o tipo G, também em área de cultivo.

Em outra pesquisa, GIMENEZ & CICCARELLI (1970b), na Província de Mendoza, realizaram um estudo sobre a prevalência de *Clostridium botulinum* em 169 amostras de solo, sendo 129 de área de solo cultivado, e 40 de área de solo virgem. Das 169 amostras examinadas, 64 (37,9%) produziram culturas tóxicas. A maior percentagem de culturas tóxicas correspondeu aos solos cultivados, com 55 positivos de 129 examinadas (41,9%), em contraposição a nove positivos de 40 examinadas (22,5%) correspondentes a solo de área virgem. Das 64 culturas tóxicas, somente 37 foram tipificadas, sendo 24 identificadas como pertencentes ao tipo A; seis do B; cinco a uma mistura dos tipos A e B; dois do tipo F, e as demais não foram identificadas. Referem-se ainda uma cultura mista AF (GIMENEZ & CICCARELLI, 1970c).

RIGO (1973) efetuou um estudo sobre a prevalência de *Clostridium botulinum* em solos das províncias de São Luis e Córdoba, Argentina. Analisou 250 amostras de solo, das quais 179 oriundas de São Luis e 71 de Córdoba, de área virgem e cultura. Das 179 amostras provenientes da Província de São Luis, 62 (34,63%) produziram cultivos tóxicos, correspondendo em maior percentagem a solos de área de cultura, resultando, sobre um total de 104 examinadas, 48 (46,15%) positivas; já nos solos de área virgem constatou *Clostridium botulinum* sobre 75 examinadas, 14 (18,66%) positivas. Pela prova de soro-

neutralização identificou, como pertencente ao tipo A, 51 (82,25%) amostras; ao tipo B, quatro (6,4%); a uma mistura dos tipos A e B, dois (3,22%); ao tipo F, um (1,61%); ao subtipo AF, três (4,83%) e não identificado, provavelmente tipo G, um (1,61%). Na Província de Córdoba, de 71 amostras de solo de área virgem e cultura, 28 (39,43%) produziram cultivos tóxicos, dos quais nove (32,14%) corresponderam ao tipo A, 12 (42,85%) ao B; quatro (14,25%) a uma mistura A e B; um (3,56%) ao tipo F e dois (7,13%) não identificadas.

LEITÃO & DELAZERI (1983) examinaram um total de 115 amostras de solos procedentes de cinco municípios do Estado de São Paulo, sendo 40 provenientes de áreas de hortas comerciais e as demais de área de pastagem de eqüinos e bovinos, 35 e 40 amostras respectivamente. Detectou-se *Clostridium botulinum* em 14 (35%) das amostras de solos de área de horta, não sendo constatada nos solos de área de pastagem. Entre as amostras positivas, observou-se uma predominância do tipo A (57,1%), segundo dos tipos B (7,1%) e F (7,1%). O restante (28,7%) não foi submetido a testes para avaliação da presença de toxinas dos tipos C, D, E e G.

### 2.9.3. Europa

MEYER & DUBOVSKY (1922c) verificaram baixa presença de *Clostridium botulinum* nos solos da Europa. As investigações realizadas demonstraram apenas o tipo B em três das 54 amostras de solos procedentes da Dinamarca; em uma das três procedentes da Bélgica; em duas das 10 da Holanda; em oito das 34 da Suíça e em cinco das 64 da Inglaterra.

LEIGHTON & BUXTON (1928), na Escócia, demonstraram a presença de *Clostridium botulinum* em 4,0% das 100 amostras de solo estudadas, sendo que duas continham o tipo A; uma tipo B e uma tipo AB.

HAINES (1942), no Sudoeste da Inglaterra, verificou que cinco amostras de solo das 106 estudadas tinham *Clostridium botulinum*, sendo que quatro eram do tipo A e uma do tipo

B.

FAHRAEUS (1949) verificou a incidência de 4,5% de *Clostridium botulinum* tipos A e B em amostras de solo examinadas, procedentes da Suécia.

PEDERSON (1955), na Dinamarca, isolou *Clostridium botulinum* tipo E proveniente de amostras de solo de região pesqueira.

JOHANNSEN (1963), examinando 13 amostras de solo de área de campo e jardim na Suécia, detectou *Clostridium botulinum* tipo E em duas amostras e tipo B em uma.

SMITH & MORYSON (1977) não demonstraram a presença de *Clostridium botulinum* em nenhuma das 20 amostras de solo coletadas em área de pastagem nas proximidades de lagos na Inglaterra.

SMITH & MILLIGAN (1979), na Inglaterra, examinaram 22 amostras de solo coletadas em área de estábulos de bovinos, suínos e ovinos, detectando *Clostridium botulinum* tipo B em 15 amostras; tipo C em duas; tipo D em duas; tipo E em uma e tipo CD em outra.

HUSS (1980), estudando a ocorrência de *Clostridium botulinum* em 133 amostras de solo na Dinamarca, verificou que 18 amostras continham tipo B; 66 tipo E; uma CD e cinco não identificadas.

SMITH & YOUNG (1980), na Inglaterra, analisando 174 amostras de solo provenientes de áreas de pastagem e cultivo, demonstraram *Clostridium botulinum* tipo E em 10 (5,7%) das amostras.

#### 2.9.4. Ásia

SCHOENHOLZ & MEYER (1922) demonstraram a presença de *Clostridium botulinum* tipo B em 13 das 52 amostras de solo na China.

PASRICHA & PANJA (1940) isolaram *Clostridium botulinum* tipo A em quatro das oito amostras de solo de área de jardim na Índia.



### 2.9.5. África

KNOCK (1952) isolou *Clostridium botulinum* tipo B em três das 102 amostras de solo estudadas de áreas não cultivadas na África do Sul.

### 2.9.6. Austrália

EALES & GILLESPIE (1947) analisaram 183 amostras de solo na Austrália, demonstrando em quatro delas *Clostridium botulinum* tipo A. O material coletado procedia de área montanhosa virgem, aproximadamente a 1.000 metros de altitude.

EALES & TURNER (1952) citam que na Austrália os tipos de *Clostridium botulinum* B, C e D causam botulismo nos bovinos e ovinos. Apenas o tipo D foi isolado de amostras de solo.

### 2.9.7. U.R.S.S.

KRAVCHENKO & SHISHULINA (1967), na U.R.S.S., realizaram um trabalho sobre a presença de *Clostridium botulinum* em 4.242 amostras de solo, encontrando 449 positivas das quais 37 pertenciam ao tipo A; 127 ao B; nove ao C; uma ao D e 227 ao E.

BULATOVA et alii (1973) estudou a ocorrência do *Clostridium botulinum* em 1.949 amostras de solo na U.R.S.S.. Os resultados revelaram que seis amostras pertenciam ao tipo A; 20 ao tipo B; 10 a uma mistura dos tipos A e C; 27 ao tipo E e 17 ao tipo F.

## 2.10. Aspectos bacteriológicos sobre a comprovação da presença de esporos de *Clostridium botulinum* no solo

A comprovação bacteriológica da presença de *Clostridium botulinum* em alimentos contaminados foi feita por VAN ERMENGEM (1897), que conseguiu a multiplicação do germe e a

produção de toxina em caldo de carne ligeiramente alcalino contendo 1% de peptona e de cloreto de sódio e 2% de glicose. BURKE (1919) demonstrou pela primeira vez a presença de esporo de *Clostridium botulinum* no solo com o emprego do mesmo meio. DUBOVSKY & MEYER (1922a) modificaram o meio original de VAN ERMENGEM (1897), reduzindo para 1% a glicose e para 0,5% o cloreto de sódio e adicionaram 0,5% de tampão fosfatado para aumentar a estabilidade do meio, visto que, nas culturas de amostras de solo, era inevitável a presença de contaminação por outras bactérias e fungos que, acidificando o meio rapidamente, inibiam o desenvolvimento e a produção de toxina de *Clostridium botulinum* em muitas amostras. DUBOVSKY & MEYER (1922b) e MEYER & DUBOVSKY (1922a,b,c) adotaram para pesquisa de *Clostridium botulinum* no solo o meio de cultura à base de caldo de músculo cardíaco de bovino e fígado de suíno preparado por digestão péptica, considerando-o mais eficaz do que os meios anteriormente utilizados. A partir de então, inúmeras composições de meios de cultura utilizados, porém na grande maioria o componente básico era o caldo de carne, enriquecido por vários componentes e em diferentes proporções. A condição de anaerobiose era obtida em cubas de vácuo, jarras em que o oxigênio era eliminado pelo vácuo ou quimicamente ou pelo uso de vaspar de parafina ou camada de óleo na superfície dos meios de cultura. Esses artifícios, no entanto, podem ser dispensados em meios como os de ROBERTSON (1919) ou de WRIGHT (1933) nos quais, também à base de caldo de carne, permanecem as partículas de carne moída que agem como oxiredutores. Os meios são distribuídos em coluna alta (8 a 9 cm), com três a quatro cm de partículas de carne, dispensando assim vaspar ou ambiente de anaerobiose em cubas.

A alta resistência dos esporos de *Clostridium botulinum* ao calor permite que as amostras de solo sejam aquecidas para reduzir a contaminação, principalmente de bactérias não esporuladas. A partir do trabalho de DUBOVSKY & MEYER (1922 a), adotou-se o uso de aquecer as amostras de solo antes da semeadura ou então logo após, juntamente com o meio, numa tempera-

tura de 80°C por 30 a 60 minutos.

A proporção de inóculo sob a forma de terra ou de lavado de solo para a quantidade de meio de cultura é bastante variável de um autor para outro, mas a maioria gira em torno de 1 grama de solo por 10 ml de meio.

A temperatura de incubação das culturas de solo também não é uniforme. A maior parte dos pesquisadores adotou a temperatura de 37°C e outros variaram entre esta a 30°C. Muito variável foi o período de incubação que variou de dois a 14 dias, sendo o mais freqüente entre cinco a 10 dias.

A demonstração da toxina botulínica nas culturas de solo é feita através da inoculação do filtrado em cobaias ou camundongos. A cobaia foi utilizada desde os trabalhos de BURKE (1919) e MEYER & DUBOVSKY (1922a) sendo considerada mais sensível (LAMANNA & GLASSMAN, 1947; STEVENSON et alii 1947), porém outros autores consideram tanto a cobaia quanto o camundongo como satisfatórios para a demonstração de toxina botulínica dos diferentes tipos de *Clostridium botulinum* (PARRY et alii, 1946).

## 2.11. Epizootiologia do botulismo bovino no Estado de Goiás

Em Goiás, há 10 anos atrás, praticamente não se tinha conhecimento sobre o botulismo. A deficiência de fósforo sempre existiu na região do cerrado. O *Clostridium botulinum* embora não provado, com toda certeza, também já existiu ubiqüitariamente no solo de Goiás, como existe em solos de outros estado e países. Com a substituição gradual das pastagens nativas por pastagens cultivadas, como, por exemplo, por espécies de *Brachiaria* e com a introdução de bovinos selecionados, criaram-se fatores predisponentes para o aparecimento do botulismo. Na pastagem natural do cerrado, o animal se adaptava ao meio, quer dizer, havia deficiência de fósforo e também a falta de pasto, pois a lotação normal é um bovino para cada 5 hectares. Os animais, tendo pouco pasto, desenvolviam-se mais len



tamente e a estrutura óssea era mais fina. Isto acontece ainda com o gado azebuado que se mantém no cerrado, que, em geral, tem ossos finos, e a reprodução só ocorre tardiamente. O feto, por sua vez, nasce pequeno, e a produção de leite é mínima. A *Brachiaria* é pouco dependente de fósforo, pois cresce em solos carentes e conseqüentemente também tem baixo teor de fósforo. Mas as pastagens cultivadas, proporcionando razoável fonte protéica e massa energética para os animais geneticamente selecionados, determinam um crescimento rápido, e formação de esqueleto grande. Mesmo que a pastagem, durante sua formação, tenha sido adubada, que geralmente se faz de modo inadequado, persiste uma subdeficiência de fósforo, que evidentemente causa desequilíbrio da necessidade deste mineral na formação do esqueleto, no desenvolvimento do tamanho do feto, no aumento da produção de leite. A necessidade de fósforo manifesta-se mais acentuadamente nas vacas em gestação e nas paridas em lactação. É justamente nesta ocasião que se acentua a deficiência de fósforo, a tal ponto, que o animal sente necessidade de supri-la por outras fontes. Levado pelo instinto, o animal procura ossos de animais mortos (FIG. 1 e 2), tanto faz de bovinos, eqüinos, suínos, galinhas ou qualquer outro animal silvestre para suprir a sua deficiência. Portanto, a partir de um esporo que tenha estado presente no tubo digestivo destes animais que morrem desenvolve-se a "carcaça tóxica", e o bovino que tem acesso a ela procurando roer osso se torna vítima de intoxicação botulínica, com maior ocorrência nas vacas em gestação e nas paridas em lactação. Estas condições predisponentes ocorrem mais acentuadamente na estação da chuva, no auge do período vegetativo de gramíneas de pastagens cultivadas, porque nesta época os teores de proteína e de material energético são maiores e proporcionalmente menores os de fósforo. O fazendeiro, por sua vez, vendo abundante forragem verde, deixa de fornecer a suplementação mineral. Desta forma se explica o início da cadeia epizootiológica do botulismo bovino no Estado de Goiás, contribuindo para a contaminação do solo pelo *Clostridium botulinum* (LANGENEGGER, 1981).

### 3. LITERATURA CONSULTADA

SCHEUBER (1929), na África do Sul, não encontrou *Clostridium botulinum* em nenhuma das 100 amostras de solo que estudou, salvo quando eram tomadas debaixo ou próximo a cadáveres de bovinos em decomposição. Nesses casos tratava-se dos tipos C e D.

No Estado do Piauí, TOKARNIA et alii (1970) coletaram 11 amostras de solo de locais onde se decompuseram cadáveres de bovinos cuja doença sugeria ter sido botulismo. As referidas amostras foram semeadas no meio de ROBERTSON e no meio de WRIGHT, obtendo-se oito culturas tóxicas para cobaias que apresentavam sintomas de botulismo antes da morte. A soroproteção em cobaias revelou tratar-se de toxina botulínica dos tipos C e D.

SMITH (1977b) coletou 260 amostras de solo nos Estados Unidos nos meses de setembro e outubro, em intervalos de 80 Km em quatro trajetos Leste-Oeste, percorrendo um total de 20.800 Km. O *Clostridium botulinum* foi isolado em 62 (23,8%) das 260 amostras de solo coletadas de diferentes regiões geográficas com variação do pH do solo, sendo que 26 pertenciam ao tipo A; 22 ao B; três ao C; cinco ao D e seis ao E.

MOREIRA et alii (1980) no Estado de Goiás isolaram toxinas de *Clostridium botulinum* tipos C e D a partir de amostras de solos provenientes de áreas de pastagem localizadas no município de Silvânia, onde o botulismo ocorre sob a forma en



zoótica.

TURNES et alii (1984) em Alegrete, Estado do Rio Grande do Sul, coletaram sete amostras de solo subjacentes a carcaças em decomposição e três amostras de cadáveres putrefatos de bovinos. Detectou-se a presença de toxinas de *Clostridium botulinum* tipo D nos filtrados de seis amostras de solo e duas amostras de carcaças.

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

##### 4.1. Considerações sobre a região em que foram coletadas as amostras de solo

###### 4.1.1. Localização geográfica

Os municípios localizam-se ~~no~~ sul de Goiás, entre os paralelos 14º 50' e 19º 27' 15" de latitude sul e entre os meridianos 47º 15' 30" e 53º 13' 30" de longitude oeste de Greenwich (MAPA 1), com altitudes de 900 a 3.200 metros (O ESTADO DE GOIÁS, 1981).

###### 4.1.2. Tipo de vegetação

O quadro fitogeográfico acha-se constituído por vegetação tipo cerrado. Essa vegetação se caracteriza por formações arbustivo-arbóreas, abertas, com árvores e arbustos tortuosos e espaçados, de casca grossa, folhas grandes e pilosas ou duras e coráceas (RIZZO, 1981). Ela está sendo substituída por gramíneas cultivadas para pastagens, destacando-se pela frequência espécies de Brachiaria.

###### 4.1.3. Tipos de solo

Dentre as associações de solos relacionados com a

região, sobressaem os latossolos vermelho-escuros e vermelho-amarelos, combinados geralmente com areias quartzosas, ou subcondominante. De maneira geral, são solos distróficos, com índice de fertilidade variando de baixo a muito baixo. Destaca-se a uma generalizada carência de fósforo (O ESTADO DE GOIÁS, 1981).

#### 4.1.4. Clima

As condições climáticas acham-se representadas pelos fatores físicos da posição continental e longitudinal e dinâmicos regulados pela circulação atmosférica, que responde pela caracterização de um clima quente e úmido, com uma temperatura média em torno de 22 a 26<sup>o</sup>C e precipitação média anual de 1.500 mm, com quatro meses de duração da estação seca, compreendido entre os meses de maio a agosto (NIMER, 1977).

#### 4.2. Localização dos cadáveres decompostos

Localizaram-se no período de janeiro a março de 1984, 30 cadáveres decompostos de bovinos semelhantes ao da FIG. 3, supostamente vítimas de botulismo, com tempo médio de exposição de um a quatro meses em pastagens com relevo variando de plano a montanhoso, em 25 propriedades de 15 municípios (TAB. I) no sul de Goiás, onde o botulismo ocorre sob a forma enzoótica. A região é de cerrado, e as pastagens, quase na totalidade, são cultivadas, principalmente com gramíneas de gênero *Brachiaria*.

#### 4.3. Procedimento da coleta das amostras de solo para pesquisa de *Clostridium botulinum*

A partir do local em que o cadáver se decompôs, determinou-se a direção dos quatro pontos cardeais, coletando amostras de solo de cada uma delas a cinco, 10, 20, 40 e 80 metros, que, com a amostra do local do cadáver decomposto, tota

lizaram 21 amostras, as quais multiplicadas por 30 (nº de cadáveres decompostos), resultaram em 630 amostras de solo coletadas.

Cada amostra constituiu-se de aproximadamente 400 gramas de solo homogeneizado, colhida numa superfície de 400 cm<sup>2</sup> e numa profundidade de dois a três cm, usando espátulas de aço e coletores cuidadosamente limpos com gase antes de cada coleta. A seguir, as amostras de solo foram acondicionadas em sacos de plástico convenientemente lacrados, identificados com número de ordem geral, a inicial de norte, sul, leste ou oeste, seguido da distância, transportadas para o laboratório e armazenadas em caixotes de madeira até momentos antes do cultivo.

#### 4.4. Culturas de solo

##### 4.4.1. Local da realização do trabalho laboratorial

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia e nas dependências da Unidade de Apoio do Programa Nacional de Pesquisa em Saúde Animal - EMBRAPA - Itaguaí - Estado do Rio de Janeiro, no período de abril a dezembro de 1984.

##### 4.4.2. Preparo das culturas e dos filtrados

No laboratório, cada amostra homogeneizada de solo era semeada em alíquotas de duas gramas, em cinco tubos de ensaio de 20 x 200 mm, contendo 20 ml de meio de WRIGHT (1933). O meio de cultura recém semeado com amostra de solo era aquecido em banho-maria a 80°C, durante uma hora. Após o resfriamento no meio ambiente, os tubos eram levados para a estufa bacteriológica, regulada a 30°C, onde permaneciam durante cinco dias. O conteúdo líquido dos 5 tubos foi reunido num frasco, centrifugado a 3.000 rpm, durante 10 minutos e o sobrenadante filtrado em placas de SEITZ EK. O filtrado foi acondi-



cionado em frascos estêreis tipo penicilina e mantido congelado a  $-15^{\circ}\text{C}$ , até o teste em cobaias para detectar a presença de toxina no filtrado.

#### 4.4.3. Detecção de toxina botulínica nos filtrados das culturas de solo

Porção de 1,0 ml do filtrado obtida de forma descrita em 4.4.2. era inoculada por via subcutânea em uma cobaia, utilizando-se seringa e agulha estêreis. Outra porção de 1,0 ml do mesmo filtrado era aquecida a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos, com objetivo de inativar a toxina botulínica eventualmente presente. Após resfriamento, era inoculado em outra cobaia.

As cobaias eram examinadas duas vezes por dia, durante 10 dias, visando constatar evidências sintomáticas do botulismo, caracterizadas principalmente pelas seguintes manifestações: respiração ofegante, incoordenação motora, dificuldades de andar, abdomen cintado, paralisia flácida progressiva, incapacidade de locomoção e finalmente asfixia e morte.

Os testes descritos em 4.4.3. revelaram a presença de toxina botulínica nos filtrados das culturas de solo quando os seguintes resultados eram observados: a) sintomas de botulismo e morte da cobaia que recebeu o filtrado, obtido pela forma descrita em 4.4.2.; b) ausência de sintomas e sobrevivência da cobaia que recebeu o filtrado submetido ao tratamento térmico obtido pela forma descrita em 4.4.3.

#### 4.4.4. Adequação da concentração da toxina dos filtrados para o teste da soro-neutralização em camundongos

Foi seguido o procedimento de SHANTZ (1964) para a adequação da concentração da toxina dos filtrados, baseado na relação entre o tempo de morte dos camundongos e a concentração de toxina botulínica do inóculo. Inocularam-se dois camun

dongos adultos com 0,5 ml de filtrado puro que no teste da cobaia (4.4.3.) revelara presença de toxina botulínica. Quando a morte dos camundongos ocorria entre uma e duas horas ap<sup>o</sup>s inoculação, o filtrado era diluído a 1/1.000; entre duas e três horas, era diluído a 1/5 e quando a morte ocorria ap<sup>o</sup>s três horas, o filtrado foi usado puro (não diluído). O diluente utilizado foi a solução salina fosfatada gelatina (PGS).

#### 4.5. Teste de soro-neutralização para identificação dos tipos de *Clostridium botulinum*

##### 4.5.1. Técnica utilizada

A identificação dos tipos de *Clostridium botulinum* foi realizada, utilizando-se a técnica de soro-neutralização em camundongos, obedecendo-se as normas recomendadas pelo CENTER FOR DISEASE CONTROL (1980), com modificação do BACTERIOLOGICAL ANALYTICAL MANUAL FOOD (1976).

##### 4.5.2. Procedência dos soros antibotulínicos

Os soros antibotulínicos A, B, C; D, E, F e G, sob a forma liofilizada, foram obtidos no "CENTER FOR DISEASE CONTROL", de Atlanta, Geórgia, USA, através do IICA, Brasília.

##### 4.5.3. Procedimento do teste de soro-neutralização

Os soros antibotulínicos foram hidratados com solução glicerizada a 50% em água destilada e diluída em solução salina fosfatada gelatina (PGS), conforme indicação no r<sup>o</sup>tulo dos frascos, de modo que cada 0,5 da solução contivesse uma UI (unidade internacional) de soro monovalente A, B, C, D, E, F e G.

Numa bateria de sete frascos, identificados com as letras de cada um dos sete soros antibotulínicos, colocou-se 0,5 ml de cada soro antibotulínico nos frascos correspondentes e

adicionou-se 1 ml do filtrado de uma cultura a ser testada, a drede adequada. Apõs homogeneizaçõ rãpida, incubou-se a 37<sup>0</sup>C durante 30 minutos. Num 8<sup>o</sup> frasco, testemunho, colocou-se 0,5 de salina estãril ao qual tambãem foi adicionado um ml do mes-  
mo filtrado.

Logo em seguida cada mistura soro-monovalente + fil-  
trado era inoculada em dois camundongos, por via intra-perito-  
nial, na dose de 0,5 ml e em dois camundongos testemunho eram  
inoculados 0,5 do filtrado testemunho. Os camundongos eram ob-  
servados durante quatro dias, registrando-se em protocolo prõ-  
prio o aparecimento de sintomas de botulismo, caracterizados  
principalmente por uma dispnãia progressiva com a formaçõ de  
abdomen cintado (FIG. 4), como conseqũência da paralisia pro-  
gressiva dos mũsculos respiratõrios, especialmente o diafragma  
e finalmente a morte. Os camundongos sobreviventes de cada  
bateria indicavam o tipo da toxina presente na cultura. Quan-  
do sobreviviam os camundongos inoculados com soros C e D, o  
teste indicava reações, cruzadas do complexo CD.

#### 4.6. Anãlise quĩmica e fĩsica do solo

Coletou-se uma amostra de solo em torno de cada um  
dos 30 cadãveres decompostos em 25 fazendas, para anãlise quĩ-  
mica e fĩsica do solo; com intuito de correlacionar esses va-  
lores com a freqũência dos tipos de *Clostridium botulinum* pre-  
sente no solo.

##### 4.6.1. Procedimento da coleta das amostras de solo para anãlise quĩmica e fĩsica

As amostras de solo foram coletadas segundo as ins-  
truções do "manual de descriçõ e coleta de solo no campo"  
(LEMOS & SANTOS, 1982).

##### 4.6.2. Mãtodos utilizados para anãlise quĩmica e fĩsica



As análises\* do pH, Al, Ca+Mg, P e K, bem como a areia, silte e argila, foram realizadas de acordo com as técnicas descritas no "manual de métodos de análise de solo" (SERVIÇO NACIONAL DE LEVANTAMENTO E CONSERVAÇÃO DE SOLO - EMBRAPA, 1979).

#### 4.7. Análise estatística

Os resultados foram submetidos a análise de variância onde aplicou-se o teste "F" de Snedecor e posteriormente o teste de Tuckey. Foi também utilizado o teste de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) bem como foram obtidas correlações lineares simples e testadas pelo teste "t" de Student (GOMES, 1978; SPIEGEL, 1979).

---

\* Análises realizadas na Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás.



## 5. RESULTADOS

A cultura de 630 amostras de solo colhidas em 30 locais onde se haviam decomposto cadáveres supostamente vítimas de botulismo, oriundos de 25 fazendas, de 15 municípios no sul de Goiás, revelou a presença de *Clostridium botulinum* em 221 (35,07%) amostras, o que ficou demonstrado através da toxina produzida nas culturas e da reprodução do botulismo em cobaias, cuja distribuição panorâmica pode ser vista na TAB. II.

A identificação dos tipos de *Clostridium botulinum*, determinada por soro-neutralização das toxinas produzidas nas culturas, permitiu reconhecer as toxinas de 204 (32,38%) culturas (TAB. III) pertencentes a cinco tipos, sendo 44 do tipo A (21,57%); duas do tipo B (0,98%); 37 do tipo C (18,14%); 41 do tipo D (20,10%); 77 do complexo CD (37,74%) e três do tipo G (1,47%). Os tipos E e F não foram encontrados (TAB. IV).

As toxinas de 17 (2,69%) culturas não puderam ser identificadas conclusivamente (TAB. V). O número e percentagem de culturas contendo toxinas identificadas, relacionados com os 30 cadáveres decompostos nas pastagens, podem ser vistas na TAB. VI.

A distribuição dos cinco tipos de *Clostridium botulinum*, totalizando 204, encontrados no ponto em que o cadáver se decompôs e nas distâncias de cinco, 10, 20, 40 e 80 metros, nas direções dos quatro pontos cardeais e em 30 lugares

diferentes, revelou respectivamente a seguinte frequência: 64\* (25,39%); 47 (18,65%); 37 (14,68%); 32 (12,69%) 36 (14,28%). Com exceção do ponto central (25,40%), as percentagens de *Clostridium botulinum* variaram pouco em função das distâncias, sendo aproximadamente de 12,69% e 18,65%, conforme TAB. VII. Os dados referentes a todos os tipos de *Clostridium botulinum* encontrados no solo, no local e em torno dos 30 cadáveres decompostos, considerando os pontos cardeais e as distâncias, encontram-se na TAB. VIII, enquanto que os mesmos valores, transformados para  $\sqrt{y+0,5}$ , para normalização dos dados, estão contidos na TAB. IX. Os dados da TAB. IX foram submetidos à análise de variância (TAB. X), e verificou-se somente significância quando foi comparado o ponto central com a média das médias dos pontos cardeais, pelo teste "F" de Snedecor ao nível de 5% de probabilidade. Com o objetivo de comparar o ponto central com os demais, nova análise de variância foi realizada, e verificou-se, através do teste de Tuckey, ao nível de 5%, que a quantidade de esporos no ponto central não diferenciou estatisticamente da quantidade de esporos nos demais pontos.

Os tipos de *Clostridium botulinum* C, D e o complexo CD, considerados os agentes etiológicos do botulismo enzootico do bovino, foram encontrados em 155 (75,98%) das 204 amostras de solo, enquanto que os tipos A, B e G em apenas 49 (24,02%) conforme pode-se observar na TAB. XI.

A distribuição dos tipos de *Clostridium botulinum* C, D e do complexo CD no local e em volta dos 30 cadáveres decompostos decresceu do centro para a periferia da área pesquisada, tomando as seguintes frequências conforme pode-se observar na TAB. XII; 60<sup>+</sup> (30,00%) amostras no centro; 45 (22,50%) aos cinco metros; 31 (15,50%) aos 10 metros; 27 (13,50%) aos 20 metros; 19 (9,50%) aos 40 metros e 18 (9,00%) aos 80 metros, caracterizando uma regressão linear, significativa no nível de 1% de probabilidade pelo teste "F" de Snedecor, con-

---

\* Os dados referentes ao ponto central foram multiplicados por quatro, visto que os demais tinham quatro repetições.

forme demonstrativo da análise de variância (TAB. XIII) obtidos dos dados provenientes das TAB. XIV e XV.

O número de *Clostridium botulinum* tipos C, D e complexo CD encontrados no solo, no local e em torno dos 30 cadáveres decompostos, considerando a declividade, pode-se observar na TAB. XVI.

Os valores químicos e físicos do solo e número de tipos de *Clostridium botulinum* encontrados no solo, no local ou em torno dos 30 cadáveres decompostos, estão nas TAB. XVII e XVIII.

Os dados da correlação entre os valores químicos e os valores físicos, com os números de *Clostridium botulinum*, estão na TAB. XIX.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. Poluição do solo pelos tipos de *Clostridium botulinum* C, D e complexo CD através de cadáveres decompostos

Sabe-se que o *Clostridium botulinum*, sob a forma de esporos, é encontrado ubiqüitariamente no solo de todas as partes do mundo, e que as carcaças decompostas contribuem ainda mais para a poluição das pastagens pelos esporos de *Clostridium botulinum*. Na compilação de dados na literatura, tal observação foi notada por SCHEUBER (1929), na África do sul; TOKÁRNIA et alii (1970), no Piauí; MOREIRA et alii (1980), em Goiás e TURNES et alii (1984), no Rio Grande do Sul, onde o botulismo bovino ocorre sob a forma enzoótica. Encontraram maior percentagem de esporos de *Clostridium botulinum* tipo C e D em amostras de solo coletadas debaixo ou próximo a cadáveres de bovinos decompostos. Os citados autores não reportaram em seus trabalhos a abrangência em área em que as carcaças estavam poluindo o solo da pastagem. Partindo dos resultados observados nos trabalhos consultados, torna-se oportuno discutir alguns resultados obtidos na presente pesquisa.

Os tipos de *Clostridium botulinum* C, D e complexo CD, considerados os agentes etiológicos do botulismo enzoótico dos bovinos, foram encontrados em 155 (75,98%) das 204 culturas tóxicas identificadas de solo analisadas, procedentes de



de regiões enzoóticas de botulismo em pastagens de cerrado no sul de Goiás (TAB. XI), havendo uma distribuição decrescente de freqüência de esporos no solo do centro para a periferia da área pesquisada (TAB. XII), caracterizando uma regressão linear negativa.

A alta prevalência dos tipos de *Clostridium botulinum* C, D e complexo CD em relação aos demais tipos encontrados nas culturas de solo, além de caracterizar a região enzoótica, mostra nitidamente a influência do cadáver decomposto na pastagem como o agente poluente.

Foi observado pelo teste de Tuckey, ao nível de 5% de probabilidade, no caso de *Clostridium botulinum* tipos C, D e complexo CD, que a concentração de esporos do ponto central não diferiu estatisticamente da concentração de esporos até aos 20 metros, mas que, entretanto, diferem da concentração aos 40 e 80 metros. Pode-se dizer, tomando como base o ponto médio entre 20 e 40 metros que até num raio de 30 metros, ou seja, numa superfície de 2.827 m<sup>2</sup>, os cadáveres decompostos poluíram diretamente a pastagem com esporos de *Clostridium botulinum* tipos C, D e complexo CD. Considerando como base a média de esporos das distâncias aos 40 e 80 metros, verificou-se um acréscimo de 45,94% de esporos aos 20 metros; 67,57% aos 10 metros; 143,24% aos cinco metros e 224,32% no centro.

Entende-se que essa disseminação dos esporos de *Clostridium botulinum* no solo foi influenciada diretamente pelos animais carnívoros, como os urubus, por canídeos, pela chuva, pela declividade do solo e, indiretamente, pelo pasto que, ao nascer em local contaminado por esporos de *Clostridium botulinum*, provavelmente carrou esses esporos, que, ingeridos por um animal, foram eliminados com as fezes em outros pontos mais distantes, contribuindo assim para a poluição do solo da pastagem na região enzoótica do botulismo.

#### 6.2. Freqüência de *Clostridium botulinum* tipos A, B e G no solo

O *Clostridium botulinum* tipo A é mais frequentemente responsável pelo botulismo humano (SMITH, 1977b) sendo encontrado no solo e nos sedimentos de diversas partes do mundo com freqüências variadas, não havendo informações sobre a ocorrência nos bovinos com intoxicações naturais.

No presente trabalho, o tipo de *Clostridium botulinum* A foi encontrado com alta freqüência em relação aos tipos B e G, num total de 44 vezes ou seja, 21,57% dentre os tipos identificados e 7% do total das 630 amostras de solo da região de cerrado no sul de Goiás, onde o botulismo bovino ocorre sob a forma enzoótica. Curiosamente, houve uma distribuição crescente da freqüência de esporos no solo do centro para a periferia da área pesquisada, isto é, o contrário do que foi observado com os tipos C, D e complexo CD (TAB.IV).

Cumprе assinalar que os tipos de *Clostridium botulinum* B e G foram identificados em apenas duas e três amostras de solo respectivamente, e que em nenhuma amostra foram detectados os tipos E e F.

### 6.3. Freqüências dos tipos de *Clostridium botulinum* C, D e complexo CD, considerando a declividade

Nenhuma citação a respeito de freqüências de tipos de *Clostridium botulinum* no solo, considerando a declividade, foi encontrada na presente pesquisa. Portanto procurou-se analisar a influência da declividade do solo na distribuição dos esporos de *Clostridium botulinum*, a partir de carcaças decompostas na pastagem, considerando que, entre outros fatores, a chuva poderia carrear esporos para pontos ou áreas mais baixas, alterando assim a distribuição radial.

Dos resultados obtidos, verificou-se que no ponto em que o cadáver se decompôs e nas distâncias de 5, 10, 20, 40 e 80 metros em relação aos quatro pontos cardeais, as distribuições das freqüências dos tipos C, D e complexo CD foram: 30,00%; 22,50%; 15,50%; 13,50%; 9,50% e 9,00%. A análise de



variância mostrou uma regressão linear negativa na distribuição dos esporos de *Clostridium botulinum* tipos C, D e complexo CD conforme TAB. XV, comprovando a influência do cadáver no qual se multiplicam os tipos de *Clostridium botulinum* C, D e complexo CD.

Quanto à declividade, verificou-se que a área no local em que os cadáveres se decomuseram apresentava declividade em 17 dos 30 casos estudados, conforme TAB. I. Computando-se as freqüências dos achados de esporos de *Clostridium botulinum* tipos C, D e complexo CD da área em aclive e da declive em relação ao ponto em que o cadáver se decompôs, verificou-se maior freqüência na parte em declive, porém o Qui-quadrado ( $X^2$ ) calculado foi igual a 2,67, inferior ao Qui-quadrado ( $X^2$ ) tabelado de valor 3,84, portanto não significativo, apesar de que no declive há uma maior percentagem (61,11%) de tipos de *Clostridium botulinum* do que no aclive (38,88%), conforme TAB. XVI.

#### 6.4. Freqüência dos tipos de *Clostridium botulinum* A, B, C, D, G e E complexo CD presentes no solo, associados aos valores químicos e físicos dos solos

São poucas as pesquisas sobre análises químicas e físicas dos solos, com intuito de correlacionar esses valores com as freqüências dos tipos de *Clostridium botulinum* presentes no solo.

Na literatura consultada, apenas SMITH (1977b), nos Estados Unidos, estudou a ocorrência de *Clostridium botulinum* considerando, as condições químicas dos solos. Analisou o pH das amostras de solo, matéria orgânica e os níveis de cálcio, magnésio, fósforo e potássio. Verificou que em solos neutros e alcalinos com níveis baixos de matéria orgânica há um certo relacionamento com a ocorrência do *Clostridium botulinum* do tipo A; em solos levemente ácido e com níveis altos de matéria orgânica há ocorrência de *Clostridium botulinum* do tipo C, en

quanto que em solos alcalinos ocorreu *Clostridium botulinum* do tipo D. Pode-se verificar, portanto, que, de acordo com aquele autor, apenas o pH e matéria orgânica influenciaram sobre a maior ou menor presença dos tipos de *Clostridium botulinum*, não havendo portanto correlação aparente entre a ocorrência de esporos de algum tipo de *Clostridium botulinum* com níveis de cálcio, magnésio, fósforo e potássio.

A presente pesquisa mostrou, contrariando os resultados de SMITH (1977b), que os esporos de *Clostridium botulinum* tipos A e D foram isolados respectivamente em 6,98% e 6,50% de amostras de solos ácidos, com pH variando entre 6,2 e 3,7 e com pouca matéria orgânica. Confirmou que o tipo C é frequentemente encontrado em solos ácidos.

Neste trabalho foram verificadas correlações lineares entre os valores de análises químicas e físicas do solo com as frequências de todos os tipos de *Clostridium botulinum* identificados (A, B, C, D, G e complexo CD) e também com o conjunto (C, D e complexo CD) de *Clostridium botulinum* (TAB. XVII, XVIII e XIX). Verificou-se que somente houve significância estatística pelo teste "t" de Student no caso da correlação entre os tipos de *Clostridium botulinum* e o potássio ( $r = -0,46$ ), demonstrando que somente o potássio influencia na concentração total de esporos e essa influência é inversamente proporcional, isto é, com o aumento da quantidade de potássio no solo, há uma diminuição no número de esporos de *Clostridium botulinum* tipos A, B, C, D, G e complexo CD.



## 7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões:

1. A probabilidade de detecção de esporos de *Clostridium botulinum* tipos C, D e complexo CD no sul de Goiás é elevada.

2. Os cadáveres decompostos aumentam significativamente a poluição do solo das pastagens por esporos de *Clostridium botulinum* tipos C, D e ou complexo CD, numa área média de 2.827m<sup>2</sup>.

3. A distribuição dos tipos de *Clostridium botulinum* C, D e do complexo CD no local e em volta dos cadáveres decompostos decrescem do centro para a periferia.

4. Verificou-se maior frequência de esporos de *Clostridium botulinum* tipos C, D e complexo CD na parte de declive, em relação ao ponto de decomposição do cadáver.

5. Dentre os tipos de *Clostridium botulinum* sem importância etiológica do botulismo enzoótico dos bovinos, tipo A foi encontrado em maior frequência, seguindo-se os tipos B e G, com pouca expressão.

6. É pouco provável detectar os tipos de *Clostridium botulinum* E e F.

7. A elevada concentração de esporos de *Clostridium botulinum* tipos C, D e ou complexo CD no local e ou em torno

dos cadáveres decompostos constitui riscos de surtos epidêmicos para botulismo em bovinos.

8. Os cadáveres encontrados nas pastagens devem ser cremados para prevenção do botulismo em bovinos.

TABELA I - Distribuição dos cadáveres decompostos por município, propriedade, tempo de decomposição e relevo que o circundava - sul de Goiás, 1984

Nº do cadáver	Nome do município	Nome da propriedade	Tempo de decomposição	Tipo do relevo
01	Itajã	Barra ou Salto	2 meses	Plano
02	Itajã	Barra ou Salto	2 meses	Suave ondulado com declive para o norte
03	Aporã	Santa Amélia	1 mês	Plano
04	Aporã	Alto Formoso	3 meses	Plano
05	Piracanjuba	Lambari	2 meses	Ondulado com declive para o norte
06	Piracanjuba	Três Barras	2 meses	Plano
07	Piracanjuba	Boa Vista do Jacaré	2 meses	Ondulado com declive para o sul
08	Piracanjuba	Boa Vista do Jacaré	1 mês	Plano
09	Silvânia	Variado	2 meses	Ondulado com declive para o leste
10	Silvânia	Olho D'Água	2 meses	Ondulado com declive para o sul
11	Orizona	Morro Alto	2 meses	Ondulado com declive para o norte e sul
12	Orizona	Santa Inácia	3 meses	Ondulado com declive para o norte
13	Catalão	Degredo	1 mês	Plano
14	Catalão	Olho D'Água	1 mês	Ondulado com declive para o norte
15	Catalão	Posse	1 mês	Plano
16	Ipameri	Buriti	4 meses	Ondulado com declive para o norte
17	Pires do Rio	Guará	1 mês	Ondulado com declive para o sul
18	Nova Glória	Cipó	1 mês	Ondulado com declive para o norte
19	Nova Glória	Cipó	1 mês	Plano
20	Nova Glória	Cipó	1 mês	Plano
21	Rubiataba	Bonsucesso	2 meses	Forte ondulado com declive para o leste
22	Serranópolis	Solução	2 meses	Montanhoso com declive para o oeste
23	Serranópolis	Santa Verônica	1 mês	Plano
24	Serranópolis	Santa Verônica	1 mês	Plano
25	Mineiros	Recanto da Fé	2 meses	Ondulado com declive para o leste
26	Jataí	Certeza	2 meses	Ondulado com declive para o leste
27	Jataí	Campo Alto	1 mês	Suave ondulado com declive para o leste
28	Rio Verde	Posto do Chapadão	1 mês	Plano
29	Bela Vista	Barreiro Vermelho	1 mês	Suave ondulado com declive para o sul
30	Bela Vista	Mato do Rio	3 meses	Plano
Plano.....	Declives menores que 3%		Forte ondulado.....	Declives de 20 a 45%
Suave ondulado....	Declives de 3 a 8%		Montanhoso.....	Declives de 45 a 75%
Ondulado.....	Declives de 8 a 20%			







TABELA IV - Tipos de *Clostridium botulinum* identificados do solo, no local e em torno dos 30 cadáveres decompostos - sul de Goiás, 1984

Tipos de <i>Clostridium botulinum</i> isolados	Localização					Total	%	
	Central	5m	10m	20m	40m			80m
A	1	2	5	5	15	16	44	21,57
B			1		1		2	0,98
C	1	10	12	7	3	4	37	18,14
D	6	11	10	8	4	2	41	20,10
Complexo CD	8	24	9	12	12	12	77	37,74
E								
F								
G					1	2		1,47
Total	16	47	37	32	36	36	204	
%	25,39	18,65	14,68	12,69	14,28	14,28		

Obs.: Nos cálculos das percentagens das localizações, os dados referentes ao ponto central foram multiplicados por 4, visto que os demais tinham 4 repetições.

TABELA V - Número e percentagens de culturas tóxicas de solo, em relação a cada um dos 30 cadáveres decompostos - sul de Goiás, 1984

Nº do cadáver	Nº de amostras de solo analisadas	Número de culturas					
		Tóxicas		Identificadas		Não identificadas	
		Total	%	Total	%	Total	%
1	21	10	47,61	10	47,61		
2	21	12	57,14	12	57,14		
3	21	6	28,57	6	28,57		
4	21	3	14,28	3	14,28		
5	21	10	47,61	10	47,61		
6	21	10	47,61	10	47,61		
7	21	8	38,09	7	33,33	1	4,76
8	21	3	14,28	3	14,28		
9	21	12	57,14	10	47,61	2	9,53
10	21	13	61,90	9	42,85	4	19,05
11	21	18	85,71	15	71,42	3	14,29
12	21	6	28,57	6	28,57		
13	21	6	28,57	4	19,04	2	9,53
14	21	3	14,28	3	14,28		
15	21	3	14,28	3	14,28		
16	21	12	57,14	11	52,38	1	4,76
17	21	3	14,28	3	14,28		
18	21	2	9,52	2	9,52		
19	21	2	9,52	2	9,52		
20	21	2	9,52	2	9,52		
21	21	6	28,57	6	28,57		
22	21	13	61,90	6	61,90		
23	21	3	14,28	3	14,28		
24	21	8	38,09	8	38,09		
25	21	13	61,90	13	61,90		
26	21	16	76,19	12	57,14	4	19,05
27	21	6	28,57	6	28,57		
28	21	4	19,04	4	19,04		
29	21	2	9,52	2	9,52		
30	21	6	28,57	6	28,57		
<b>Total</b>	<b>630</b>	<b>221</b>	<b>35,07</b>	<b>204</b>	<b>32,38</b>	<b>17</b>	<b>2,69</b>

TABELA VI - Número e percentagens de tipos de *Clostridium botulinum* identificados nas culturas tóxicas de solo, em relação a cada um dos 30 cadáveres decompostos - sul de Goiás, 1984

Nº do cadáver	Tipos de <i>Clostridium botulinum</i> identificados								Total	%
	A	B	C	D	Complexo CD	E	F	G		
1	3		1	2	3			1	10	47,61
2	1			1	10				12	57,14
3	3		1	1				1	6	28,57
4					3				3	14,28
5	1		2	2	5				10	47,61
6	1		1	3	5				10	47,61
7			2		5				7	33,33
8			1	1	1				3	14,28
9			2	4	3			1	10	47,61
10	6		1	2					9	42,85
11		1	4	3	7				15	71,42
12		1		3	2				6	28,57
13				2	2				4	19,04
14	1			1	1				3	14,28
15	1			1	1				3	14,28
16	9		2						11	52,38
17				1	2				3	14,28
18			2						2	9,52
19			1		1				2	9,52
20					2				2	9,52
21	2			1	3				6	28,57
22	5		3	1	4				13	61,90
23			1	1	1				3	14,28
24	1		4	3					8	38,09
25	3		4	3	3				13	61,90
26	4		2	3	3				12	57,14
27	1		2	1	2				6	28,57
28	1				3				4	19,04
29	1				1				2	9,52
30			1	1	4				6	28,57
Total	44	2	37	41	77			3	204	
%	21,57	0,98	18,14	20,10	37,74			1,47		32,38



TABELA VII - Distribuição média dos diversos tipos de *Clostridium botulinum* no local e em várias distâncias dos cadáveres decompostos - sul de Goiás, 1984

Distâncias em metros	<i>Clostridium botulinum</i>	
	Número	Porcentagem
0	16*	25,39
5	47	18,65
10	37	14,68
20	32	12,69
40	36	14,28
80	36	14,28

\* No cálculo da porcentagem da localização, o dado referente ao ponto central foi multiplicado por 4, visto que os demais tinham 4 repetições.

TABELA VIII - Número de *Clostridium botulinum* tipos A, B, C, D, complexo CD e G, encontrados no solo, no local e em torno dos 30 cadáveres decompostos, considerando os pontos cardeais e as distâncias - sul de Goiás, 1984

Pontos cardeais	Distância (m)				
	5	10	20	40	80
Norte	12	13	8	10	12
Sul	10	9	8	9	8
Leste	15	7	6	7	9
Oeste	10	8	10	10	7
Ponto central	16				

TABELA IX - Número de *Clostridium botulinum* tipos A, B, C, D, complexo CD e G, encontrados no solo, no local e em torno dos 30 cadáveres decompostos, considerando os pontos cardeais e as distâncias. Dados transformados para  $\sqrt{y+0,5}$  - sul de Goiás, 1984

Pontos cardeais	Distância (m)				
	5	10	20	40	80
Norte	3,54	3,67	2,92	3,24	3,54
Sul	3,24	3,08	2,92	3,08	2,92
Leste	3,94	2,74	2,55	2,74	3,08
Oeste	3,24	2,92	3,24	3,24	2,92
Ponto central	4,06				

TABELA X - Análise de variância dos números de *Clostridium botulinum* tipos A, B, C, D, complexo CD e G, encontrados no solo, no local e em torno dos 30 cadáveres decompostos, considerando os pontos cardeais e as distâncias. Dados transformados para  $\sqrt{y+0,5}$  sul de Goiás, 1984

Fontes de variação	G.L.	Q.M.
Ponto central x distâncias	1	0,8096*
Pontos cardeais	3	0,1472 N.S.
Regressão linear	1	0,0615 N.S.
Desvio da regressão linear	3	0,2232 N.S.
Resíduo	12	0,0881

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste "F" de Snedecor.

N.S. Não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste "F" de Snedecor.

TABELA XI - Número e percentual da frequência do grupo C, D e complexo CD e dos tipos A, B e G de *Clostridium botulinum* identificados no solo, no local e em torno dos 30 cadáveres decompostos - sul de Goiás, 1984

Tipos de <i>Clostridium botulinum</i>	Total	%
C, D e complexo CD	155	75,98
A, B e G	49	24,02

TABELA XII - Distribuição e percentual dos tipos C, D e complexo CD de *Clostridium botulinum* identificados no solo, no local e em torno dos 30 cadáveres decompostos, considerando as distâncias - sul de Goiás, 1984

Distância em (m)	<i>Clostridium botulinum</i> identificados	
	Total	%
Centro	60	30,00
5	45	22,50
10	31	15,50
20	27	13,50
40	19	9,50
80	18	9,00

TABELA XIII - Número de *Clostridium botulinum* tipos C, D e complexo CD, encontrados no solo, no local e em torno dos 30 cadáveres decompostos, considerando os pontos cardeais e as distâncias - sul de Goiás, 1984

Pontos cardeais	Distância (m)				
	5	10	20	40	80
Norte	12	12	6	5	7
Sul	10	9	8	6	5
Leste	14	4	4	4	3
Oeste	9	6	9	4	3
Ponto central	15				

TABELA XIV - Número de *Clostridium botulinum* tipos C, D e complexo CD, encontrados no local e em torno dos 30 cadáveres decompostos, considerando os pontos cardeais e as distâncias. Dados transformados para  $\sqrt{y+0,5}$  - sul de Goiás, 1984

Pontos cardeais	Distância (m)				
	5	10	20	40	80
Norte	3,54	3,54	2,55	2,35	2,74
Sul	3,24	3,08	2,92	2,55	2,35
Leste	3,81	2,12	2,12	2,12	1,87
Oeste	3,08	2,55	3,08	2,12	1,87
Ponto central	3,94				



TABELA XV - Análise de variância dos números de *Clostridium botulinum* tipos C, D e complexo CD, encontrados no solo, no local e em torno dos 30 cadáveres decompostos, considerando os pontos cardeais e as distâncias. Dados transformados para  $\sqrt{y+0,5}$  - sul de Goiás, 1984

Fontes de variação	G.L.	Q.M.
Ponto central x distâncias	1	1,5120 *
Pontos cardeais	3	0,3086 N.S.
Regressão linear	1	2,5541 *
Desvio da regressão linear	3	0,4068 N.S.
Resíduo	12	0,1455

\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste "F" de Snedecor.  
N.S. Não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste "F" de Snedecor.

TABELA XVI - Número de *Clostridium botulinum* tipos C, D e complexo CD encontrados no solo, no local e em torno dos 30 cadáveres decompostos, considerando a declividade - sul de Goiás, 1984

Declividade	<i>Clostridium botulinum</i>	
	Número	%
Declive	33	61,11
Aclive	21	38,88

Qui-quadrado ( $X^2$ ) = 2,67 N.S.

N.S. Não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA XVII - Valores químicos do solo e número de tipos de *Clostridium botulinum* encontrados no solo, no local ou em torno dos 30 cadáveres decompostos - sul de Goiás, 1984

Nº do cadáver	Valores químicos				Nº total de tipos de <i>Clostridium botulinum</i>	Nº de <i>Clostridium botulinum</i> tipos C,D e CD
	pH	eg. mg/100 ml		ppm		
		Ca+Mg				
1	5,8	1,0	1,4	48	10	6
2	5,8	1,0	1,4	48	12	11
3	5,1	0,3	1,1	19	6	2
4	3,7	0,3	0,8	24	3	3
5	4,7	0,3	1,1	14	10	9
6	4,7	0,5	1,4	41	10	9
7	5,0	1,2	1,7	48	7	7
8	5,0	1,2	1,7	48	3	3
9	4,7	0,2	1,7	17	10	9
10	5,0	0,3	1,7	29	9	3
11	4,9	0,4	0,8	29	15	14
12	6,1	3,8	1,4	94	6	5
13	5,3	1,9	0,6	66	4	4
14	5,9	6,3	1,1	49	3	2
15	5,2	1,1	0,6	17	3	2
16	4,8	0,4	0,3	12	11	2
17	6,0	2,9	1,1	96	3	3
18	6,2	8,1	0,3	69	2	2
19	6,2	8,1	0,3	69	2	2
20	6,2	8,1	0,3	69	2	2
21	6,1	2,3	0,6	50	6	4
22	5,4	0,3	0,3	8	13	8
23	5,6	0,9	0,3	37	3	3
24	5,6	0,9	0,3	37	8	7
25	5,6	7,5	0,8	42	13	10
26	5,7	3,0	0,6	17	12	8
27	5,3	0,4	0,6	8	6	5
28	4,0	0,6	2,6	14	4	3
29	5,3	1,3	0,6	72	2	1
30	5,3	0,7	0,8	25	6	6

TABELA XVIII - Valores físicos do solo e número de tipos de *Clostridium botulinum* encontrados no solo, no local ou em torno dos 30 cadáveres decompostos - sul de Goiás, 1984

Nº do cadáver	Valores físicos em %			Nº total de tipos de <i>Clostridium botulinum</i>	Nº de <i>Clostridium botulinum</i> tipos C, D e CD
	Areia	Silte	Argila		
1	59,5	22,2	18,3	10	6
2	59,5	22,2	18,3	12	11
3	90,3	2,5	7,2	6	2
4	64,8	7,4	27,8	3	3
5	60,9	11,4	27,7	10	9
6	23,8	2,38	52,4	10	9
7	62,5	14,7	22,8	7	7
8	62,5	14,7	22,8	3	3
9	70,4	9,4	20,2	10	9
10	49,2	17,0	33,8	9	3
11	54,3	22,2	33,5	15	14
12	60,8	11,2	28,0	6	5
13	46,2	27,1	26,7	4	4
14	60,3	21,8	17,9	3	2
15	65,9	16,1	18,0	3	2
16	59,1	19,2	21,7	11	2
17	36,9	17,4	45,7	3	3
18	64,4	17,0	18,6	2	2
19	64,4	17,0	18,6	2	2
20	64,4	17,0	18,6	2	2
21	64,4	13,4	22,2	6	4
22	32,0	22,6	45,4	13	8
23	38,5	23,7	37,8	3	3
24	38,5	23,7	37,8	8	7
25	54,0	15,3	30,7	13	10
26	25,5	22,6	51,9	12	8
27	57,2	16,0	26,8	6	5
28	50,9	16,2	32,9	4	3
29	54,7	11,7	33,6	2	1
30	78,3	5,5	16,2	6	6

TABELA XIX - Correlação entre os valores químicos (pH, Ca+Mg, P e K) e os valores físicos (areia, silte e argila), com os números de *Clostridium botulinum* tipos A, B, C, D, G e complexo CD, encontrados no solo, no centro e em torno dos 30 cadáveres decompostos - sul de Goiás, 1984

Tipos de <i>Clostridium botulinum</i>	pH	eq. mg/100 ml			ppm			Valores físicos em %		
		Ca+Mg	P	K	Areia	Silte	Argila			
A, B, C, D, G e complexo CD	-0,16	-0,33	0,10	0,46*	-0,28	0,24	0,30			
C, D e complexo CD	-0,13	-0,25	0,15	0,21	-0,26	0,08	0,31			

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste "t" de Student.





FIGURA 1 - Bovino procurando pegar osso no local em que se decompôs o cadáver.



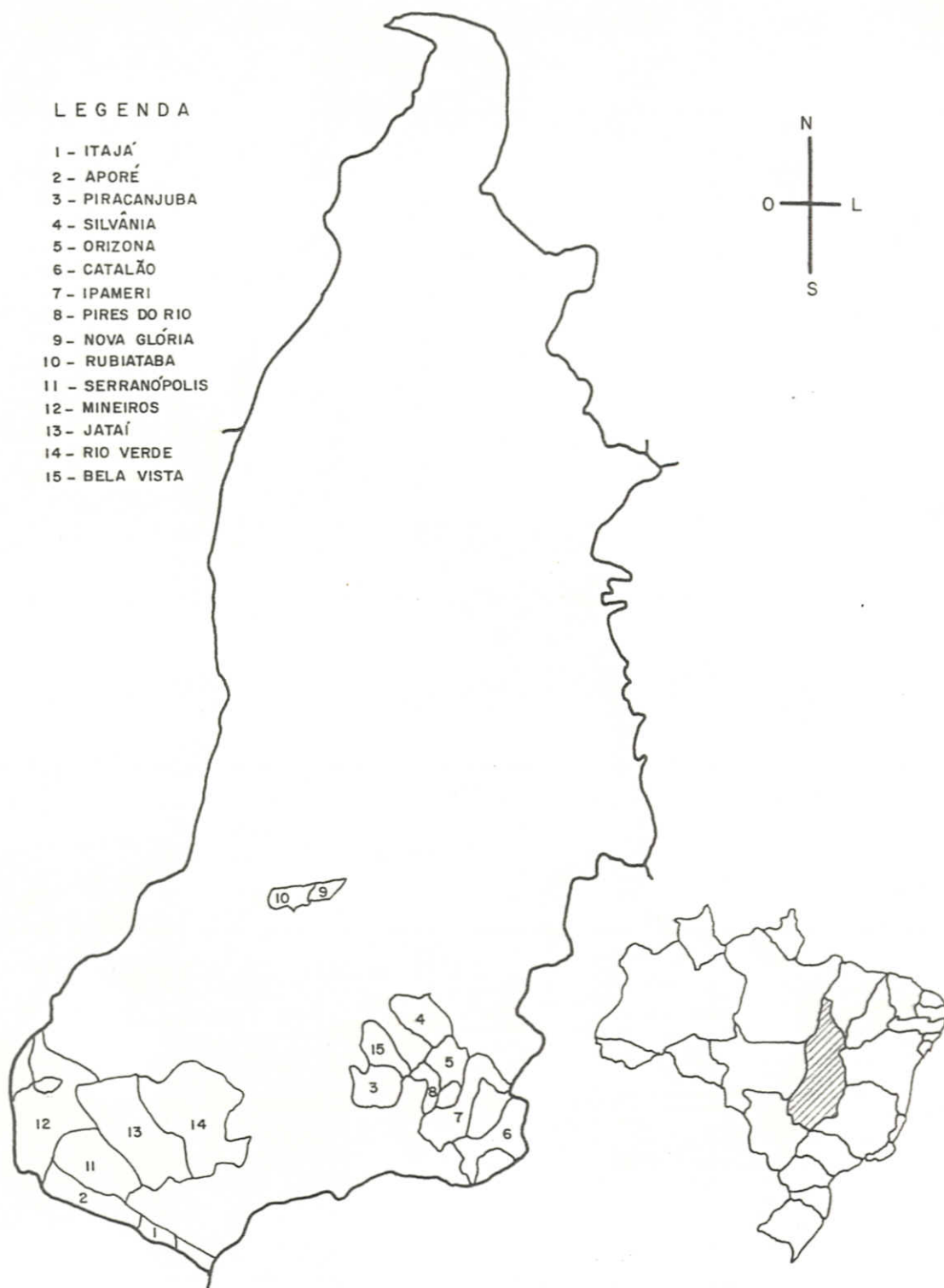
FIGURA 2 - Bovino roendo osso na pastagem de Brachiaria verde e abundante.



FIGURA 3 - Cadáver de bovino, com solo sem vegetação pelo pisoteio de bovinos e urubus.



FIGURA 4 - Comundongo com abdomen cintado e incoordenação motora, caracterizando botulismo.



MAPA I Localização geográfica dos municípios do Estado de Goiás onde foram coletadas amostras de solo para pesquisa de Clostridium botulinum e análises química e física do solo.



## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACHA, P.N. & SZFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comuns al hombre y a los animales. Washington, Organization Panamericana de la Salud, 1977. 708p.
2. BACHMAN, F.M. & HAYNES, E. Prevalence of Toxin-producing anaerobes in Wisconsin. J. Infect. Dis., Chicago, 34:132-6, 1924.
3. BENGSTON, I.A. Preliminary note on a toxin producing anaerobe isolated from the larvae of Lucilia caesar. Publ. Health Rept., Washington, 37:164-70, 1922.
4. BULATOVA, E.; CHULKOVA, I.F.; ANISIONOVA, L.I. Detection in the U.R.S.S. of Clostridium botulinum type F and its differential diagnosis with type E. Zl. Microbiol. Immunobiol. U.R.S.S., 50:105-7, 1973 apud SMITH, L.D. Botulism, the organism, its toxins, the disease. Springfield, Charles C. Thomas, 1977. p.90.
5. BURKE, G.S. The occurrence of Bacillus botulinus in nature. J. Bacteriol., Washington, 4(5):541-53, 1919.
6. COLEMAN, G.E. The distribution of spores of B. Botulinus in the soil of a restricted area in California. J. Infect. Dis., Chicago, 31:556-8, 1922.



7. DAMON, S.R. & BAYABAL, L.B. Distribution of spores Bacillus botulinus and Bacillus tetani in the soil. J. Infect. Dis., Chicago, 34:491-501, 1926.
8. DUBOVSKY, B.J. & MEYER, K.F. An experimental study of the methods available for the enrichment, demonstration and isolation of B. botulinus in specimens of soil and its products, in suspected food, in clinical and necropsy material. J. Infect. Dis., Chicago, 31:501-39, 1922a.
9. DUBOVSKY, B.J. & MEYER, K.F. The distribution of the spores of B. botulinus in the territory of Alaska and dominion of Canada. J. Infect. Dis., Chicago, 31:595-9, 1922b.
10. EALES & GILLESPIE. 1947 apud SMITH, L.D. Botulism, the organism, its toxins, the disease. Springfield, Charles C. Thomas, 1977, p.91.
11. EALES, C.E. & TURNER, A.W. Description of Clostridium botulinum type D recovered from soil in South Australia. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., Adelaide, 30:295-300, 1952.
12. EASTON, E.J. & MEYER, K.F. Occurrence of Bacillus botulinum in human and animal excreta. J. Infect. Dis., Chicago, 35:207-12, 1924.
13. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Serviço Nacional de levantamento e conservação de solos, Rio de Janeiro. Manual de métodos de análise de solos. Rio de Janeiro, 1979. p. irreg.
14. FAHRAEUS, J. "Botulinum bacilli" and their occurrence in Sweden. Stockholm, State Bacteriological Laboratory 1949 apud SMITH, L.D. Botulism, the organism, its toxins, the disease. Springfield, Charles C. Thomas, 1977. p.88.
15. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Bureau of Foods, Washington .

Bacteriological analytical manual for foods. Washington, 1976. p.XIV/1 - XIV/16.

16. FOURIE, J.M. Persistence of botulinus toxin in carcase material with special references to that of tortoises. J.S. Afr. Vet. Med. Assoc. Pretōria, 17(1):85-7, 1946.
17. GIMENEZ, D.F. & CICCARELLI, A.S. Another type of Clostridium botulinum. Zentralbl. Bakteriol. I. Abt. Orig., Stuttgart-Hobenheim, 215:221-4, 1970a.
18. GIMENEZ, D.F. & CICCARELLI, A.S. Clostridium botulinum en Argentina: presente y futuro. Rev. Assoc. Argent. Microbiol., Buenos Aires, 8(2):82-91, 1976.
19. GIMENEZ, D.F. & CICCARELLI, A.S. Clostridium botulinum type F in the soil of Argentina. Appl. Microbiol., Washington, 16(5):732-4, 1968..
20. GIMENEZ, D.F. & CICCARELLI, A.S. Distribucion de Clostridium botulinum en Mendoza, Argentina. Bol. Of. Sanit. Panam., Washington, 69:505-10, 1970b.
21. GIMENEZ, D.F. & CICCARELLI, A.S. Studies on strain 84 of Clostridium botulinum. Zentralbl. Bakteriol. I. Abt. Orig., Stuttgart-Hobenheim, 215:212-20, 1970c.
22. GOMES, F.P. Estatística experimental. 8.ed. São Paulo, Nobel, 1978. 430p.
23. HAINES, R.B. The occurrence of toxigenic anaerobes, especially Clostridium botulinum in some English soils. J. Hyg., Cambridge, 42:323-7, 1942.
24. HALL, I.C. & PETERSON, E.C. The detection of Bacillus botulinus and Bacillus tetani in soil samples by the constrictec tube method. J. Bacteriol., Washington, 9(3):201-9, 1924.

25. HENNING, M.W. Animal disease in South Africa. 3.ed.s.l., Central News Agency, 1956. 1239p.
26. HUSS, H.H, Distribution of Clostridium botulinum. Appl. Environ. Microbiol., Washington, 39(4):764-9, 1980.
27. INGRAM, M. & ROBERTS, T.A. The ecology of C. botulinum. Proc. 3rd Interm. Congress Food Sci. Technol, 654-660, 1970 apud SMITH, L.D. Botulism the organism, its toxins, the disease. Springfield, Charles, C. Thomas, 1977. p.93.
28. JOHANNSEN, A. Clostridium botulinum in Sweden and the adjacent waters. J. Appl. Microbiol., New York, 26(1):43-7, 1963.
29. JONES, M.T. & TANNER, F.W. Incidence and distribution of Clostridium botulinum in soil of Illinois. Food Res., Champaign, 10:238-45, 1945.
30. KNOCK, G.S. Survey of soil for spores of Clostridium botulinum (Union of South Africa and South West Africa) J. Sci. Food Agric., Oxford, 3:86-91, 1952.
31. KRAVCHENKO, A.T. & SHISHULINA, L.M. Distribution of Clostridium botulinum in soil and water in the U.R.S.S. In: INGRAM, M. & ROBERTS, T.A. Botulism, London, Chapman and Hall, 1967, apud SMITH, L.D. Botulism, the organism, its toxins, the disease. Springfield, Charles C. Thomas, 1977, p.90.
32. KUSMIR, E.D.; BRUN, T.M.; PAIKINA, S.S. The sources of Bacillus botulinus infection in sturgeons. Z. Mikrobiol., Moskva, 19:80-5, 1937 apud LANGENEGGER, J. Comunicação pessoal, 1982.
33. LAMANNA, C. & GLASSMAN, H.N. The isolation of B. botulinum toxin. J. Bacteriol., Washington, 54(5):575-84, 1919.
34. LANGENEGGER, J. Considerações epizootiológicas de botulismo



- mo em animais. Comunicação pessoal. 1982. (EMBRAPA, Seropédica, RJ).
35. LANGENEGGER, J. Epidemiologia do Botulismo em nosso meio, aspectos relacionados com diagnóstico da doença e considerações sobre a utilização da vacina. In: SIMPÓSIO SOBRE CARÊNCIAS MINERAIS NO ESTADO DE GOIÁS, Goiânia, 1981. Anais. Goiânia, SOGOVE/CRMV-8, 1981. p.218-37.
  36. LANGENEGGER, J. & DOBEREINER, J. Fatores predisponentes dos surtos de botulismo no cerrado de Goiás. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 17., Fortaleza, 1980. Anais. Fortaleza, 1980. p.16. (Resumo).
  37. LANGENEGGER, J.; DOBEREINER, J.; TOKARNIA, C.H. Botulismo epizootico em bovinos no Brasil. Agroquímica, São Paulo, (20):22-6, 1983.
  38. LEIGHTON, G. & BUXTON, J.B. The distribution of B. botulinum in Scottish soils. J. Hyg., Cambridge, 28:79-82, 1928.
  39. LEITÃO, M.F.F. & DELAZERI, I. Clostridium botulinum em solos no Estado de São Paulo. Bol. Inst. Tecnol. Aliment., Campinas, 13:75-82, 1983.
  40. LEMOS, R.C. & SANTOS, R.D. Manual da descrição e coleta de solo no campo. 2.ed. Campinas, Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, 1982. 45p.
  41. MERSON, M.H. & DOWELL, V.R. Epidemiological, clinical and laboratory aspects of wound botulism. N. Engl. J. Med., Boston, 289:3-8, 1973.
  42. MEYER, K.F. & DUBOVSKY, B.J. The distribution of the spores of B. botulinus in California. J. Infect. Dis., Chicago, 31:541-55, 1922a.
  43. MEYER, K.F. & DUBOVSKY, B.J. The distribution of the spores of B. botulinus in the United States. J. Infect.



Dis., Chicago, 31:559-94, 1922b.

44. MEYER, K.F. & DUBOVSKY, B.J. The occurrence of the spores of B. botulinus in Belgium, Denmark, England, The Netherlands and Switzerland. J. Infect. Dis., Chicago, 31: 600-9, 1922c.
45. MOLLER, V. & SCHEIBEL, I. Preliminary report on the isolation of an apparently new type of Clostridium botulinum. Acta. Pathol. Microbiol. Scand., Copenhagen, 48:80, 1960.
46. MOREIRA, E.C.; LIMA, J.D.; LEITE, R. Botulismo no Sul de Goiás e Marajó. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 17., Fortaleza, 1980. Anais. Fortaleza, 1980. p.24. (Resumo).
47. MORSE, R.E.; POWERS, J.J.; WILLIAMS, C.J. Spores of Clostridium botulinum in Georgia. Food. Res., Champaign, 15: 454-8, 1950.
48. NETHERLANDS, L. Deats of grazing cattle caused by Clostridium botulinum type D toxin, drived from poultry manure. Tijdschr. Diergeneesk., Utrecht, 106(2):83-4,1981.
49. NIMER, E. Clima In: FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, Rio de Janeiro. Região Centro-Oeste brasileira. Rio de Janeiro, 1977.
50. PARRY, E.W. Prevalence of Clostridium botulinum in soil of Central New York. Food. Res., Champaign, 11:203-9, 1946.
51. PASRICHA, C.L. & PANJA, G. Clostridium botulinum in samples of Calcuta. Indian. J. Med. Res., Kashmir, 8(1): 49-54, 1940.
52. PEDERSON, H.O. On type E botulism. J. Appl. Bacteriol., New York, 18:619-28, 1955.

53. PICKETT, J.; BERG, B.; CHAPLIN, E.; BRUNSTETTER-SHAFER, M.A. Syndrome of botulism in infancy: clinical and electrophysiologic study. N. Engl. J. Med., Boston, 295(14): 770-2, 1976.
54. RIEMANN, H. Food born infections and intoxications. New York, Academic Press, 1969. 698p.
55. RIGO, A.M.G. Prevalência de "Clostridium botulinum" en suelos de las Provincias de San Luis y Cordoba, Argentina. São Luis, Facultad de Ciências Físico-Químico-Matemáticas, Universidad Nacional de San Luis, 1973. 87p. (Tese, Doutor en bioquímica).
56. RIZZO, J.A. Flora do Estado de Goiás. Goiânia, Editora da Universidade Federal de Goiás, 1981. 35p.
57. ROBERTSON, W. The value of a cooked meat medium. J. Bacteriol., Washington, 4:2, 1919.
58. SHANTZ, E.J. Purification and characterization of C. botulinum toxins. Botulism proceeding of a symposium. Editors Keith H. Lewis and Kenneth Cassel Jr. U.S. Department of Health Education and Welfare Public Service, 1964 apud RIGO, A.M.G. Prevalência de "Clostridium botulinum" en suelos de las Provincias de San Luis y Cordoba, Argentina. São Luis, Facultad de Ciências Físico-Químico-Matemática, Universidad Nacional de San Luis, 1973. (Tese, Doutor en bioquímica). p.34.
59. SCHEUBER, J.R. A note on investigations into the distribution of the lamsiekte organism (C. parabotulinum C type). Ann. Rept. Dir. Vet., South Africa, 15:223-6, 1929 apud SMITH, L.D. Botulism, the organism, its toxins, the disease. Springfield, Charles C. Thomas, 1977, p.91.
60. SCHOENHOLZ, P. & MEYER, K.P. The occurrence of the spores of B. botulinus in the Hawaiian Islands and China. J.

Infect. Dis., Chicago, 31:610-3, 1922.

61. SECRETARIA DA INDÚSTRIA E COMÉRCIO, GOIÂNIA. O Estado de Goiás. Goiânia, 1981. 384p. (mimeografado).
62. SEDDON, H.R. Bulbar paralysis in cattle due a toxicogenic bacilus. J. Comp. Pathol. Ther., New York, 35(3): 147-90, 1922.
63. SMITH, G.R. & MILLIGAN, R.A. Clostridium botulinum in soil on the site of the former Metropolitan (Caledonia) Cattle Market, London, J. Hyg., Cambridge, 83:237-40, 1979.
64. SMITH, G.R. & MORYSON, C.J. A Comparation of the distribu tion of Clostridium botulinum in soil and lake mud. J. Hyg., Cambridge, 78(39):39-41, 1977.
65. SMITH, G.R. YOUNG, A.M. Clostridium botulinum in British soil. J. Hyg., Cambridge, 85(2):271-4, 1980.
66. SMITH, L.D. Botulism, the organism, its toxins, the disease. Sprigfield, Charles C. Thomas, 1977a. 236p.
67. SMITH, L.D. Common mesophilic anaerobes, includind Clostridium botulinum and Clostridium tetani in soil speci mes, Appl. Microbiol., Washington, 29(5):590-4, 1975.
68. SMITH, L.D. The occurrence of Clostridium botulinum and Clostridium tetani in the soil of the United States. Health Lab. Sci., Washington, 15(2):74-80, 1977b.
69. SPIEGEL, M.R. Estatística: Resumo da teoria, 875 problemas resolvidos, 619 problemas propostos. 13. ed. São Paulo, McGraw Hil do Brasil, 1979, 580p.
70. STEVENSON, J.W.; NELSON, V.A.; REED, G.B. Preparation of Clostridium botulinum toxins. Can. J. Res., Ottawa, 25: 14-24, 1947.



71. TANNER, F.W. & DACK, G.M. Clostridium botulinum. J. Infect. Dis., Chicago, 31:92-100, 1922.
72. THEILER, A. The cause and prevention of lamsiekte. J. Dep. Agric. South Afr., Pretória, 1:221-44, 1920.
73. THEILER, A. & ROBINSON, E.M. Der Botulismus der Haustiere. Z. Hyg. Infektionskr., Heidelberg, 31:165-220, 1927.
74. TOKARNIA, C.H.; LANGENEGGER, J.; LANGENEGGER, C.H. CARVALHO, E.B. Botulismo em bovinos no Piauí, Brasil. Pesq. Agropec. Bras. Vet., Brasília, 5:465-72, 1970.
75. TURNES, C.G.; LANGENEGGER, J.; SCARSI, R.M. "Mal de Alegrete", evidências de Clostridium botulinum D como agente etiológico. In CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 19., Belém, 1984. Anais. Belém, 1984.p.138.
76. U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. Centers for Disease Control, Atlanta. "Clostridium botulinum" polyvalent and monovalent antitoxins for neutralization. Atlanta, 1977. 14p. (B305, B43).
77. VAN ERMENGEM, E. Ueber einem neuen anaeroben Bacillus und seine Beziehungen zum Botulismus. Z. Hyg. Infektionskr., Heidelberg, 26:1-56, 1897.
78. WRIGHT, H.D. The importance of adequate reduction of peptons in the preparation of media for pneumococcus and other organism. J. Pathol. Bacteriol., Edinburgh, 37:257, 1933.



## 9. ANEXOS

## ANEXO 1

## Meio de Wright

Fórmula

Carne moída de bovino.....	500 g
H <sub>2</sub> O destilada.....	1000 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	11 g

Procedimento

- 1 - Moeu-se a carne de boa qualidade após retirada do tecido adiposo.
- 2 - Colocaram-se todos os componentes da fórmula acima num balão de fundo chato, levado à fervura, em fogo brando, por 90 minutos. No fim repôs a água evaporada.
- 3 - Deixou-se resfriar e procedeu-se a retirada de toda gordura da superfície do meio.
- 4 - Acertou-se o pH para 7,4 com NaOH a 10%.
- 5 - Filtrou-se o meio utilizando papel xarope.
- 6 - Colocaram-se as partículas de carne em tubo de 20X 200mm até a altura de 3 a 4 cm.
- 7 - Adicionaram-se 20 ml do líquido filtrado nos

tubos, formando uma coluna de 8-9 cm.

- 8 - Autoclavou-se o meio durante uma hora a  $120^{\circ}\text{C}$ .
- 9 - Deixou-se esfriar e adicionou-se, a cada tubo, 0,5 ml de solução de dextrose a 40%.
- 10 - Estocou-se em refrigeração a  $3^{\circ}\text{C}$ .

## ANEXO 2

Solução de dextrose a 40%

Fórmula

Dextrose..... 4 g  
H<sub>2</sub>O destilada..... 100 ml

Procedimento

- 1 - Colocou-se a dextrose em H<sub>2</sub>O destilada em um erlenmeyer com capacidade de 100 ml.
- 2 - Tindalizou-se essa solução, levando-a a vapor fluente, durante 1/2 hora 3 dias seguidos.
- 3 - Estocou-se em refrigeração a 3<sup>o</sup>C.

## ANEXO 3

## Solução de salina fosfato gelatina (PGS)

Fórmula

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O.....	3 g
NaCl.....	9 g
Gelatina.....	1 g
H <sub>2</sub> O destilada.....	1000 ml

Procedimento

- 1 - Colocaram-se todos os componentes da fórmula a cima num balão volumétrico, porém com a gelatina já dissolvida em uma pequena quantidade da H<sub>2</sub>O destilada aquecida.
- 2 - Acertou-se o pH para 6,0 com NaOH a 10%.
- 3 - Estocou-se em refrigeração a 3°C.