

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

CLASSIFICAÇÃO PELA TAXONOMIA NUMÉRICA
DE BACTERIAS ANAERÓBIAS PUTREFATIVAS
RELACIONADAS A Clostridium botulinum

RUBÉN PABLO SCHOCKEN YTURRINO
ENGENHEIRO DE EXECUÇÃO EM ALIMENTOS

ORIENTADOR

PROF. DR. FUMIO YOKOYA

TESE APRESENTADA À FACULDADE DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS.

- 1975 -

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

INDICE

	Página
Indice de tabelas	II
Indice de figuras e fotos	III
Resumo	IV
Summary	V
1. Introdução	1
2. Revisão bibliográfica	2
3. Material e métodos	11
4. Resultados	25
5. Discussão	37
6. Conclusões	51
Apêndice 1.	52
Apêndice 2.	57
8. Bibliografia	60
Agradecimentos	69

INDICE DE TABELAS

	Página
1. Lista de culturas putrefativas anaeróbias isoladas das fontes naturais, número de identificação, fonte de isolamento.	14
2. Lista de culturas da coleção do laboratório de microbiologia, FTA-UNICAMP, gentilmente fornecidas pelo Dr. George K. York da Universidade da Califórnia, USA	15
3. Reveladores usados para carboidratos	24
4. Temperaturas de crescimento e o tempo que as bactérias demoraram para crescer	26
5. Médias do comprimento e largura das bactérias	28
6. Reações culturais, bioquímicas e toxigenicas das culturas	33
7. Esquema dos caracteres utilizados para o cálculo de porcentagem de similaridade pelo computador ...	39
8. Programa de computação	44
9. Porcentagem de similaridade entre as bactérias....	46
10. Porcentagem de similaridade entre as bactérias já agrupadas	47

INDICE DE FIGURAS E FOTOS

	Página
Incubação de placas em jarra anaeróbia (foto)	24.1
1. Diagrama de barras	48
2. Percentagens de similaridades	49
3. Dendrograma	50

RESUMO

Este estudo efetuou-se com esporos de bactérias anaeróbias putrefativas isoladas de fontes naturais (carne, sardinha, camarão, solo e almondega) do Estado de São Paulo e Clostridium botulinum tipos A, B, E e P.A. 3679. Estes esporos isolados de fontes naturais apresentavam muito em comum com os Clostridium botulinum conhecidos.

O trabalho analisou 113 caracteres no total, morfológicos, fisiológicos e bioquímicos com o fim de obter uma ampla informação.

Os dados obtidos foram posteriormente comparados entre si e com os Clostridium conhecidos em um computador digital utilizando o método de Lockhart e Liston para determinar o seu grau de similaridade. Os resultados demonstraram que das bactérias isoladas, 86% tinham uma similaridade de 95% com os Clostridium botulinum tipo A, linhagem 69A e 109A, e 57% das bactérias tinham 97% de similaridade com o Clostridium botulinum tipo A, linhagens 240A e 68A. Só duas bactérias, as de número 30 e 32 juntamente com a P.A. 3679, apresentavam uma similaridade de 93% com o Clostridium botulinum tipo B. A cultura número 15 com o Clostridium botulinum tipo E apresentaram somente 91% de similaridade com o resto dos Clostridium.

A classificação baseada em um número pequeno de caracteres não fornece uma boa base a respeito da similaridade de uma bactéria com outras.

SUMMARY

This study was performed with spores of putrefactive anaerobic bacteria isolated from natural sources (meat, pilchards, shrimp, earth and meat balls) from the state of São Paulo and Clostridium botulinum types A, B, E and P.A. 3679. The spores isolated from natural sources exhibited great similarity to those of Clostridium botulinum already known.

This work involved 113 morphological, physiological and biochemical characteristics in order to obtain complete information.

Finally, the results on the spores were compared with each other and with those from the Clostridium types on a digital computer using Lockhart and Liston's techniques to determine the degree of similarity. The results showed that, of the bacteria isolated, 86% had 95% similarity with the Clostridium botulinum type A lineage 69A and 109A and 57% had 97% of similarity with Clostridium botulinum type A lineage 240A and 68 A. Only two bacteria, numbers 30 and 32 together with P.A. 3679, showed a similarity of 93% to the Clostridium botulinum type B. One culture, number 15, and the Clostridium botulinum type E presented only 91% of similarity with the rest of Clostridium.

The classification based on a small number of characteristics does not give a good basis for relating the similarity of one bacterium to another.

1. INTRODUÇÃO

Este trabalho tem por finalidade contribuir na classificação das bactérias anaeróbias putrefativas isoladas no Brasil.

Trabalhou-se com esporos de bactérias anaeróbias que foram isolados de carne, camarão, almondega, sardinha e solos do Estado de São Paulo. Todas elas apresentavam caracteres muito similares ao Clostridium botulinum, (bactéria anaeróbia que produz toxina letal) exceto na produção de toxina.

Para saber que porcentagem de similaridade estas linhagens tinham com relação ao Clostridium botulinum, efetuou-se a classificação mediante a técnica da Taxonomia Numérica a qual permite a comparação rápida de um grande número de características.

Para este trabalho, efetuaram-se estudos dos caracteres morfológicos, fisiológicos e bioquímicos destas bactérias, juntamente com as culturas conhecidas de Clostridium botulinum tipos A, B e E, de modo a efetuar a comparação pelo uso de computador. Pode-se, obter, assim, a porcentagem de similaridade entre as bactérias em estudo e as linhagens conhecidas de Clostridium botulinum.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Generalidades

Entre as eubactérias, a capacidade de formar endosporos é uma propriedade evolutiva muito característica. A formação de endosporos confere grande poder de sobrevivência a ditas bactérias. Com exceção de Sporosarcina ureae (que é cocaceae) todas as produtoras de endosporos têm forma de bastonetes (66).

Algumas espécies são patogênicas a insetos ou a animais superiores. A maioria são saprófitas e são em bastonete Gram positivo, móveis (51).

As bactérias em bastonete esporuladas dividem-se em dois gêneros segundo sua relação com o oxigênio:

- Bacillus que são aeróbias estritas e anaeróbias facultativas;
- Clostridium que são anaeróbias estritas.

Esporuladas anaeróbias

As bactérias do gênero Clostridium são incapazes de crescer em presença de oxigênio atmosférico, o qual lhes é altamente tóxico, exceto em estado de espora. Essas não contêm pigmentos heme e, portanto não tem catalase. Possuem, entretanto, grande quantidade de enzimas, as flavinas, que em presença de oxigênio livre atuam como oxidases com a consequente produção de peróxido de hidrogênio que se acumula até produzir-lhes a morte (25, 66).

Algumas espécies de Clostridium são fermentadoras de açúcares e outras são proteolíticas. Algumas são, também, agentes causadores de doenças quando introduzidas em fermentos

profundos. Estes organismos conseguem crescer no corpo animal e causar injúrias ao hospedeiro, seja pela produção de toxina, seja pela destruição ativa de tecidos com as suas enzimas proteolíticas. Dentre as espécies de Clostridium causadoras de infecções em fermentos tem-se : Clostridium tetani, Clostridium welchii e Clostridium histolyticum. Os Clostridium toxigênicos são:

- Clostridium botulinum, que não se desenvolvem no corpo animal, mas, causa doença através de uma potente toxina que produz durante seu desenvolvimento em produtos alimentícios, a qual é depois ingerida (7, 66, 69);
- Clostridium perfringens, que é um causador de infecção alimentar (28).

Habitat do Clostridium botulinum

O habitat natural é o solo e as águas dos mares, lagos e rios. Foi encontrado em vários pontos, principalmente no hemisfério Norte, onde constataram-se muitos casos de botulismo como na Europa, Rússia, Canadá e Estados Unidos. Pesquisas mais recentes demonstraram presença de Clostridium botulinum, também, na Argentina e no Uruguai (8, 14, 9, 70, 18).

O Clostridium botulinum tem sido isolado de numerosos produtos, como, salsicha de onde provem seu nome (Botulos que em latim significa salsicha), de peixes defumados, presunto, carnes curadas, frangos, hortaliças e frutas enlatadas, todos produtos com pH superior a 4,5 (20).

Os intervalos de temperatura que permitem crescimento variam com a espécie. Clostridium botulinum tipo A e B desenvolvem-se desde 12 °C até 37 °C. O Clostridium botulinum tipo E cresce a temperaturas tão baixas quanto 3 °C (4, 27, 46, 55, 56).

Estudos realizados tem demonstrado que o Clostridium botulinum tipo A e B são relativamente resistentes ao efeito inibidor do sal, tendo um limite de crescimento em concentrações de oito a dez por cento (22, 49), o que equivale a uma atividade de água de 0,95 a 0,94 (47). O Clostridium botulinum tipo E só resiste a concentrações de sal de 4 a 5 por cento, o que equivale a uma atividade de água de 0,98 a 0,97 (2, 3, 6).

O pH em que o Clostridium botulinum se desenvolve bem vai desde 5,25 até 7,6. Mas deve-se tomar uma margem de segurança na prática, esterilizando-se os produtos com pH acima de 4,5 para destruir os esporos destas bactérias (20).

Importância e toxidez

A importância dada ao Clostridium botulinum deve-se a sua capacidade de produzir uma potente toxina (mortal ao homem e animais) em víveres comestíveis quando encontra condições favoráveis (23).

A toxina é uma globulina de natureza proteica, termolábil, sendo destruída por aquecimento durante 40 minutos a 90 °C ou por 10 minutos a 100 °C segundo Stanier & Doudorff (66) ou durante 60 minutos a 60 °C, 10 minutos a 80 °C e imediatamente ao ferver, segundo Pyatkin (52). Estas temperaturas e tempos dependem do tipo de toxina e do meio em que está solubilizada.

A presença da toxina é determinada através do teste de sensibilidade em camandongos de laboratório, de acordo com o DLN, DL₅₀. Um DLN, (dose mínima letal) é dose mínima para matar um número determinado de cobaias em um determinado tempo. Duzentas gramas de toxina A matariam toda a população do mundo (52).

Envenenamentos produzidos por *Clostridium botulinum*

Desde a antiguidade conhece-se o perigo de comer salichas (39). O imperador da Bizantina, a cerca de 1.000 anos atrás, Leo VI, proibiu o consumo de choriço. Na Alemanha, em 1918, Dickson (11) descreveu uma intoxicação de botulismo. Na Rússia o botulismo estava associado ao peixe. Em 1818, foram constatados sete casos fatais com sintomas de neuroparalizia, depois de ter ingerido peixe salgado (37).

Tudo isto despertou uma associação histórica com o consumo de carne de peixe, particularmente produtos curados e defumados. No século XX tem sido associado a comidas enlatadas, particularmente vegetais.

O primeiro surto investigado de intoxicação por *Clostridium botulinum* foi em 1904, com onze casos fatais em Darmstadt (29). Em seguida, nos Estados Unidos, onde, devido a enlatamento de frutas e vegetais, houve oitenta e três surtos de intoxicações, com um total de 297 pessoas afetadas e 185 mortes entre 1918 e 1922 (40). Na Rússia foram registrados 93 casos fatais entre 1934 e 1936, devido ao consumo de peixe curado (37). Na França, houve mais de 500 casos entre 1940 e 1944, por consumo de carne de porco (33). Também, entre os esquimós, na América do Norte, têm havido botulismo, com 18 surtos epidêmicos (14, 16). No Japão, em 1951, apresentaram-se mais de 50 surtos epidêmicos (44).

Isto condicionou a realização de grande número de pesquisas a respeito, resultando atualmente em apenas poucos os casos de botulismo (16, 42). E já se sabe quais são suas características de crescimento e suas toxinas.

Pelas reações imunológicas das toxinas produzidas, essas bactérias dividem-se em seis tipos atualmente conhecidos: Clostridium botulinum tipo A, B, C, D, E, e F.

Os tipos A, B, E e F foram constatados no botulismo humano, e de alguns animais susceptíveis. Os tipos C e D foram constatados em animais como patos, cavalos, gado (41) e às vezes a aves e ao homem (50). O tipo E foi primeiramente descrito em 1936. Ataca o homem e está associado a epidemia causada pela ingestão de peixes e mamíferos marinhos (24). Tem importância econômica, por produzir botulismo em criadores de peles de marta. O tipo F foi descrito em 1960 (43) e tem sido causador de intoxicação humana, pelo consumo de patê caseiro.

Os estudos sobre a destruição dos esporos mostram que os esporos de Clostridium botulinum tipo A e B, são particularmente resistentes ao calor e sobrevivem na água fervente por várias horas. Tem um tempo de redução decimal a 121 °C de aproximadamente 0,2 minutos. No entanto, os esporos de Clostridium botulinum tipo E são sensíveis ao calor, sendo destruídos rapidamente a 80 °C com um tempo de redução decimal, a esta temperatura, de cerca de um minuto (54, 67). O Clostridium botulinum tipo F ocupa uma posição intermediária entre os tipos A, B e C, com alta resistência térmica (15).

Taxonomia bacteriana

A classificação das bactérias, tem sido sempre um grande problema. Os sistemas de classificação biológica dividem-se em : Naturais e Artificiais.

O sistema Natural ou Filogenético, baseia-se no parentesco evolutivo. O Sistema Artificial é arbitrário, baseando-se nos caracteres diversos: morfológicos, fisiológicos e bioquímicos.

O primeiro cientista que tentou classificar os micróbios foi o sueco C. Linnaeus. Classificou todos os microrganismos em um só gênero, o gênero Chaos. Em 1786, o naturalista Daniel O. Muller fez o primeiro intento de classificar as bactérias, baseando-se em dois grupos: Monas e Vibrio. Em 1827, o zoólogo russo A. Lovetzky identificou três gêneros de micróbios Bacillus, Vibrio e Proteus. Em 1838, o cientista alemão C. Ehrenberg, subdividiu os microrganismos em Bactéria, Vibrio, Spirillo e Spirochaeta. Já em 1854, o botânico alemão F. Cohn classificou todas as bactérias como plantas.

E, 1856, o cientista russo L. Tsenkovsky, apontou a similaridade entre bactérias e algas cianofíceas, e classificou os microrganismos cientificamente baseando-se em sua evolução. No ano 1857, o botânico alemão C. Nagelli, classificou todas as bactérias dentro de um grupo de "plantas-microrganismos" chamando-os de Schizomicetes. Em 1871, F. Cohn contribuiu com a taxonomia agregando os gêneros: Micrococcus, Bactéria, Bacillus, Vibrio, Spirillum e Spirochaete (50).

Durante o século XIX acumularam-se muitos fatores referentes as propriedades dos microrganismos. A lista de microrganismos foi-se engrandecendo e uma classificação fazia-se necessária. Em 1896 K. Lehmann e R. Niemann, deram as bases com uma aproximação científica para a classificação de micróbios de acordo com a qual todos os microrganismos eram subdivididos em três famílias: cocaceae, bacteriaceae, spirillaceae. Esta classificação foi consideravelmente alterada e suplementada, porém, não pode satisfazer aos microbiólogos, sendo gradualmente abandonada e substituída por uma classificação mais completa e moderna, a de O. Bergey, N. Krasilnikov (52).

O manual de Bergey constituiu um esforço para se construir um sistema natural, baseado numa mistura de caracteres estruturais e fisiológicos. Publicada pela primeira vez em 1923,

alcançou agora sua oitava edição em 1974 e em todas as edições, sofreu importantes modificações.

Outros tipos de taxonomia

Um novo modo de classificação das espécies bacterianas, baseia-se na relação dos pares de bases nitrogenadas do ácido desoxi-ribonucleico (DNA) da bactéria (28). Para se determinar o grupo a que o microrganismo pertence, estabelece-se primeiramente as suas propriedades principais e, depois identifica-se baseando na composição do DNA. Posteriormente, determina-se a sua posição na classificação dos micróbios de acordo com a similaridade na molécula de DNA, com as espécies conhecidas (52).

Exemplo: .	Relação GC/AT (*)
<u>Clostridium perfringens</u>	0,48
<u>Streptococcus</u>	0,51
Bacilos de tuberculose	2,08
<u>Sarcina</u>	2,57

Outro meio, que tem sido usado na classificação de microrganismos, é a determinação de sua composição química, particularmente de lípidos, utilizando para isso cromatografia de gás (1).

Também, tem sido feito estudos de classificação de Clostridium, mediante comparação de suas reações de decaminação (30).

(*) Relação GC/AT= relação molar entre guanina + citosina e adenina + timina..

Taxonomia Numérica

Taxonomia Numérica é o uso de métodos aritméticos para classificar organismos na base da similaridade de um com o outro. Foi primeiramente aplicado a bactérias, em 1956 por Sneath (62). Nessa época sua idéia ocasionou grande interesse entre os trabalhadores relacionados com os problemas de classificação. Sneath utilizou a idéia de Adamson, a que não tinha sido aceita em seu tempo, porque dava igual importância taxonômica a todos os caracteres de organismos. Além disso, os pesquisadores da época, desconfiavam dos computadores, pois achavam que poderiam substituir ao homem (36).

Agora, as ciências biológicas são mais quantitativas, e, o uso de computadores está muito difundido. Grande número de publicações tem descrito sobre a aplicação, com sucesso da taxonomia numérica, para problemas de classificação, particularmente de bactérias.

Os caracteres usados em classificação de bactérias não pode, logicamente, considerar-se como os de bases filogenéticas, porque os dados de evolução são desconhecidos. Em consequência, os taxonomistas devem utilizar grande número de caracteres para obter uma separação satisfatória e uma definição da taxa. Por este motivo, os métodos numéricos são particularmente apropriados para estudos de taxonomia bacteriana (36).

Um alto grau de concordância tem-se demonstrado entre os grupos de bactérias estabelecidas pela taxonomia numérica e aqueles derivados pelos métodos clássicos. Em muitos casos a taxonomia numérica tem facilitado a refinação e a descrição quantitativa da taxonomia clássica. Como resultado, hoje, o método está amplamente difundido, e sua utilidade como uma ferramenta de trabalho em classificação é aceita entre os microbiólogos (28).

A maioria dos trabalhos de taxonomia numérica, feita com bactérias, até a data, tem sido baseado no preceito de Adamson, em que cada propriedade do organismo recebe o mesmo grau de importância na classificação. A maneira de trabalhar envolve determinar várias propriedades de um número de espécies ou linhagens bacterianas e registrar estas observações em uma tabela onde cada fileira representa uma espécie ou linhagem e, os caracteres são anotados em colunas. Esta é, por suposição, uma maneira comum para a tabulação dos dados, para estudo de bactérias. Depois, as descrições, já em código, das propriedades de cada espécie, comparadas para determinar o grau de similaridade entre cada par.

Normalmente isto se efetua determinando o número de caracteres similares e diferentes, e, computando para cada par de espécie a média numérica de caracteres similares ao total de caracteres comparados. Às vezes, só os caracteres positivos presentes, em ambas espécies, são considerados similares. Em outras técnicas amplamente usadas, os caracteres negativos correlatos, também são incluídos (25, 36).

A similaridade entre os pares de espécies em estudo pode ser determinada rapidamente com o uso do computador eletrônico. É possível fazer este trabalho a mão, mas demoraria demasiadamente. Com a ajuda do computador é possível comparar um grande número de espécies, em poucos minutos. Agora, as espécies são ordenadas para formar grupos, ou conjuntos de espécies, medir seu grau de homogeneidade ou relacionamento dentro do grupo e entre os grupos. Finalmente os grupos aparecem em diagramas taxonômicos acompanhados de descrição definitiva dos vários grupos. Recomenda-se a inclusão de espécies já denominadas nas análises, pois são de grande ajuda na interpretação dos resultados, como uma referência (36).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi efetuado com as bactérias esporulantes, anaeróbias putrefativas isoladas de carne, almôndega, sardinha, camarão e solos do Estado de São Paulo e Clostridium botulinum dos tipos A, B, E e o Clostridium putrefativo P. A. 3679. Estas últimas foram gentilmente fornecidas pelo Dr. George K. York da Universidade da Califórnia, USA. Estas culturas formam parte da coleção do laboratório de Microbiologia da Faculdade de Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas.

As culturas isoladas das diversas fontes, num total de 205 linhagens, foram agrupadas em 16 grupos de acordo com os testes preliminares baseados em hemólise, presença de lecitina se, liquefação de gelatina, fermentação de glicose, proteases em carne moída e reação de vermelho de metila. Três culturas de cada grupo foram selecionadas para este estudo taxonômico, exceto as linhagens dos Clostridium conhecidas.

A produção de toxina e sua tipificação haviam sido feitas através de inoculação em camundongos protegidos com antissoro específico. As cepas eram mantidas em terra esterilizada a 20 °C.

Para a execução deste trabalho utilizaram-se materiais comuns em laboratório de Microbiologia, além dos seguintes aparelhos:

1 - Jarras anaeróbias (BCL) com seus respectivos catalizadores e envelopes geradores de gases "Gas-Pak Anaerobic system" (5).

2 - Conjunto para cromatografia de camada delgada marca "Desaga".

3 - Banho termostático de temperatura controlada "Fanem" mod. 120/2 de 110 V. e 1000 Kw.

4 - Microscópio de contraste de fase "Nikon LKe".

5 - Ocular micrométrico "Nikon tipo Filar".

6 - Conjunto de filtro millipore.

7 - Microscópio estereoscópico "Nikon SMZ.2".

8 - Computador digital POP 10.

Os meios foram sempre recém preparados ou fervidos durante 10 minutos para eliminar o oxigênio dissolvido e resfriados com água de torneira imediatamente antes do uso.

Os seguintes meios foram usados:

- 1 - Infusão de cérebro e coração; Difco, modificado
- 2 - Agar de Clostridia reforçada; Oxoid
- 3 - Meio de motilidade - nitrato
- 4 - Agar de infusão de coração
- 5 - Agar de gema de ovo
- 6 - Meio de carne cozida; Difco
- 7 - Meio de carne picada
- 8 - Meio de clara de ovo
- 9 - Nutriente-gelatina
- 10 - Caldo glicosado
- 11 - Meio para indol
- 12 - Meio para teste de lipase
- 13 - Meio para teste de carboidratos
- 14 - Meio para teste de hidrólise de amido
- 15 - Leite litmus; Difco
- 16 - Agar urea
- 17 - Agar de tríplice açúcar e ferro; Difco
- 18 - Agar de peptona e ferro; Difco
- 19 - Agar de contagem em placas; Difco

Estes meios e o seu preparo estão descritos no apêndice. A maioria foi ligeiramente modificada pela adição de cloridrato de cisteína como agente redutor. Os meios foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos e as soluções de açúcares em filtro de membrana millipore.

A incubação anaeróbia foi feita em jarra anaeróbia "BBL" utilizando-se todas as vezes o catalizador e envelope gerador de gás novo. Também, foi utilizado, em alguns casos, "Vas-Par" que é uma mistura de vaselina e parafina sólida em proporção de 1 para 1. Essa mistura era esterilizada e adicionada asepticamente após a inoculação dos tubos com meios e deixando solidificar.

Os reagentes utilizados estão apresentados no apêndice, nº 2, alguns com a descrição do método de preparo.

Tabela nº 1

Lista de culturas putrefativas anaeróbicas isoladas das fontes naturais, número de identificação, fonte de isolamento.

Grupo	Nº	Nº Identificação	Fonte de isolamento
A	1	47.2	Carne
A	2	48.2	Carne
A	3	47.1	Carne
B	4	156	Carne
B	5	143	Carne
B	6	59.1	Camarão
B+	7	195	Carne
B+	8	23	Solo nº 1
B+	9	54,30	Solo nº 3
C	11	5	Carne
C	12	101	Carne
C	13	107	Carne
C+	14	60.A2	Camarão
C+	15	145	Carne
C+	16	62	Solo nº 3
D	17	75	Solo nº 4
D	18	13	Solo nº 1
D	19	8	Almôndega
E	21	9	Sardinha
E	22	45.30	Solo nº 1
E	23	37	Solo nº 2
F	24	10	Sardinha
F	25	20	Solo nº 1
F	26	66	Solo nº 2
G	27	31	Carne
H	28	50	Carne
H	29	52.2	Carne
H	30	47	Solo nº 3
I	31	64.2	Camarão
J	32	82	Carne
J	33	50	Solo nº 3
K	34	154	Carne
L	35	27	Solo nº 2
M	36	28	Solo nº 2
N	37	43.30	Solo nº 2

* Anaeróbia facultativa.

Tabela nº 2

Lista de culturas da coleção do laboratório de Microbiologia,
ITA-UNICAMP, gentilmente fornecidas por Dr. George K. York da
Universidade da Califórnia, USA.

Nº	Nome	Nº	Tipo de toxina
51	Anaerobia putrefativa	P.A. 3679	-
52	Clostridium botulinum	69 A	A
53	Clostridium botulinum	109 A	A
54	Clostridium botulinum	240 A	A
55	Clostridium botulinum	68 A	A
56	Clostridium botulinum	6	B
57	Clostridium botulinum	34	B
58	Clostridium botulinum	169	B
59	Clostridium botulinum	Minnesota	E

Reativação dos esporos

Os esporos foram reativados agregando 0,5 g de terra contendo esporos em tubos com infusão de cérebro e coração, submetendo-os a choque térmico em um banho termostático a 80°C durante 10 minutos. Imediatamente foram resfriados em água com gelo durante 5 minutos. Depois, os tubos foram colocados em jarra anaeróbia (5) e incubados em estufa a 30°C durante 48 horas.

Dos tubos que apresentaram crescimento, inoculou-se 0,1 ml em outro tubo com infusão de cérebro e coração e incubou-se na jarra anaeróbia a igual temperatura durante 48 horas. Esta transferência foi repetida por três vezes para obter cultura bem ativa.

Comprovação de pureza das cepas

Semearam-se as cepas em placas de ágar de Clostridia reforçada (Oxoid) em estria pela técnica do esgotamento, para obter colônias isoladas. Depois, as placas foram colocadas em jarra anaeróbia e incubadas a 30°C durante 24 horas. Observaram-se as colônias com lupa, para comprovação.

Teste de anaerobioses

Semearam-se em estria cada cepa em placas de ágar de Clostridia reforçada (oxoid) e incubou-se anaerobicamente a 30°C e paralelamente semearam-se em placas de ágar de contagem em placas (Difco) e incubou-se aerobicamente para verificar impossibilidade de crescimento em presença de ar.

Temperaturas de crescimento

Inoculou-se 0,1 ml de cada cepa em tubos com infusão

de cérebro e coração (fervidos e resfriados) em triplicata. Adicionou-se 1,5 ml de "Vas-Par" estéril em cada tubo (para mantê-los em anaeróbiose) e incubaram-se a 20°C, 25°C, 30°C, 37°C, e 42°C até obter o crescimento visível. Deste modo obtiveram-se as melhores temperaturas de crescimento.

Reação de Gram

Procedeu-se o estudo da reação de Gram de cada cepa usando o método modificado por Hucker (63).

- 1- Tratou-se o esfregaço durante 1 minuto com solução de cristal violeta-oxalato de amônia de Hucker.
- 2- Lavou-se com água de torneira por 2 segundos.
- 3- Pergulhou-se em solução de lugol ($KI + H_2O$)
- 4- Lavou-se com água de torneira.
- 5- Descolorou-se por 30 segundos com álcool etílico 95%.
- 6- Tratou-se por 10 segundos com solução de safranina.
- 7- Lavou-se com água de torneira.
- 8- Secou-se.
- 9- Observou-se no microscópio.

Medição das bactérias

Depois de observar o Gram, procedeu-se a medida das bactérias, colocando-se um ocular micrométrico no microscópio. Foram feitas as medidas de comprimento e largura das mesmas. Para isso, mediram-se 10 bactérias por cepa e obteve-se a média final.

Presença e posição de esporos

Semearam-se em duplicata, tubos com infusão de cérebro e coração recém fervidos e resfriados, com 0,1 ml de inóculo de cada cepa. Incubaram-se em jarra anaeróbia a 30°C duran

te 72 horas, a fim de obter esporos. Passado este período, fez-se um esfregaço e observou-se diretamente em microscópio de contraste de fase, em lâmina para ver a presença de esporos.

Teste de motilidade (in vivo) (63)

Foi feito mediante o método da gota pendente, colocando-se uma gota de inóculo em uma lâminula com vaselina em suas bordas. Sobre esta, colocou-se a lâmina especial (com uma concavidade) e invertendo-se obteve a gota suspensa no meio e observou-se as bactérias "in vivo".

Coloração de flagelos (34)

Foi feita pelo método de Leifson usando culturas com 24 e 48 horas de incubação em meio de infusão de cérebro e coração e observados no microscópio.

Teste de catalase (51)

Sobre as colônias desenvolvidas nas placas de ágar de Clostridia reforçada de 48 horas, agregou-se H_2O_2 a 10% para observar a presença de borbulhas de oxigênio.

Características de crescimento em placas

Semeou-se em duplicata, por estrias, em placas de Petri com ágar de Clostridia reforçada e incubou-se em jarras anaeróbias a 37°C durante 24 horas. Para evitar o espalhamento das colônias, deixaram-se as placas secarem a 37°C durante três horas antes da semeadura. Após a incubação observaram-se as placas com microscópio estereoscópico "Nikon", com um aumento de 10 a 30 vezes. Observaram-se as seguintes características:

- a) O número de colônias (só se observou se seu crescimento era abundante ou escasso).
- b) Tamanho das colônias
- c) Pigmentação
- d) Forma
- e) Elevação
- f) Margens
- g) Densidade

Teste de motilidade e redução de nitrato (68)

A partir de uma cultura na infusão de cérebro e coração de 48 horas, inoculou-se com fio de platina, tubos com meio de motilidade-nitrato. Foi feito em triplicata. O fio de platina foi introduzido somente até um terço do meio para apreciar-se as bactérias crescerem e difundem pelo meio mediante seus flagelos. Incubou-se na jarra anaeróbia por 5 dias a 30°C.

Para determinar se há redução de nitrato, agregou-se um mililitro de reativo A e um mililitro de reativo B.

Reativo A- Alfa naftil-amina, 0,5 g em 100 ml de ácido acético 5N.

Reativo B- Ácido sulfanílico, 1,0 g em 125 ml de ácido acético 5N.

O teste foi considerado positivo se for observada uma coloração vermelha. Se o teste for negativo agregou-se zinco em pó para que reduza o nitrato. Se, ainda, não aparecer a cor vermelha, significou que o nitrato já tinha sido reduzido a nitrito e outras substâncias como NO_2 , NH_3 e o teste foi considerado positivo. Se ao agregar zinco, houver formação da coloração vermelha, o teste foi considerado negativo.

Teste de hemólise (17)

Foi feito semeando em linha, por triplicata, em placas de ágar sangue, recém preparadas. Incubou-se em jarra

anaeróbia a 30°C por 24 horas. A formação ao redor das colônias de um halo incolor mostrou presença da beta hemólise pelas bactérias.

Teste de lecitinase (38)

Semeou-se cada cepa em placas de ágar gema de ovo, em linha, e por duplicata, e, incubou-se em jarra anaeróbia a 30°C por 24 horas. Depois observou-se a presença de um halo opaco ao redor das colônias, produzido pela precipitação dos lípidos.

Teste de gelatina (21)

O meio foi gelatina nutriente com 0,1% de glicose e 0,05% de cloridreto de cisteína. Os tubos de gelatina foram incubados com as cepas em duplicata e incubados em jarra anaeróbia a 30°C por 24 horas. Depois disto, foram colocados na geladeira durante 10 horas para permitir a solidificação da gelatina, caso não tenha sido hidrolizada.

Teste de lipase (58)

Depois de pronto o meio, foi distribuído em placas e tubos. Os tubos foram inoculados por picada e as placas divididas em 4 partes e inoculadas com uma gota em cada divisão. Depois foram incubados anaeróbiamente a 30°C durante 21 dias. A presença de um halo ao redor das colônias significou que o teste é positivo.

Teste em leite litmus (12) (Hidrólise da caseína)

As reações que acontecem neste teste envolvem a lactose, caseína e outros componentes do leite.

Os tubos de leite com litmus foram inoculados com 0,1 ml de cada cepa e incubados anaeróticamente a 30°C durante 5 dias. Foi possível observar a proteólise e a fermentação da lactose pela mudança da cor do indicador de pH.

Teste no meio de carne cozida (12) (Cooked meat medium Difco)

Os tubos de meio de carne cozida foram inoculados em triplicata com 0,1 ml de cada cepa e incubados anaeróticamente a 30°C durante 10 dias. A presença da proteólise foi detectada pela digestão da carne a qual ficou como um pó fino no fundo.

Teste de digestão de clara de ovo (45)

Os tubos com infusão de cérebro e coração e ovo cozido, em triplicata, foram inoculados com 0,1 ml de cada cepa e incubados anaeróticamente a 30°C durante 10 dias. Nos tubos positivos, depois de 10 dias, a clara de ovo era digerida, indicando a presença de enzimas proteolíticas.

Teste de indol (53)

Os tubos com caldo de triptofano foram inoculados, em triplicata, com 0,05 ml das diversas cepas e, incubados em anaerobioses a 30°C durante 1, 2, 5 e 10 dias. A presença de indol foi testada adicionando 0,2 ml de reativo de Kovacs em cada tubo. Quando o indol estava presente, aparecia um anel de cor vermelha na superfície.

Teste de vermelho de metila (19)

Inoculou-se, em triplicata, os tubos de caldo glicose-peptona com 0,05 ml de cada cepa e incubou-se anaeróticamente a 30°C durante 5 dias. Adicionaram-se 5 gotas de solução de ver

melho de metila e se fez a leitura imediatamente. Uma cor vermelha indica teste positivo e amarelo, negativo.

Teste de urea (10)

Os tubos de ágar-urea foram inoculados e incubados em jarra anaeróbia a 30°C por 48 horas. Se o teste for positivo, nos tubos aparecem cor de rosa.

Teste de H_2S em ágar de triplice açúcar e ferro (19) (TSI)

Inocularam-se todas as cepas em triplicata em ágar de triplice açúcar e ferro e incubaram-se anaerobicamente a 30°C durante 5 dias. Quando havia produção de H_2S , o fundo de tubo aparece preto.

Teste de H_2S no ágar de peptona-ferro (35)

Inocularam-se os tubos de ágar de peptona e ferro em triplicata e, incubaram-se anaerobicamente durante 5 dias a 30°C. Os tubos positivos adquirem o fundo preto.

Teste de fermentações (59)

Usou-se um meio basal para todas as fermentações. Os diversos carboidratos foram esterilizados por filtração e adicionados ao meio assepticamente.

Depois, os tubos de cada carboidrato, em triplicata foram inoculados com 0,05 ml de cada cepa. Os tubos foram selados com Vas-par esteril e incubados a 30°C durante 10 dias. Nos tubos em que o carboidrato era fermentado, o indicador de pH vira de cor vermelha para amarela.

Mas, como foi constatado, em alguns casos, o indicador (vermelho de fenol) era degradado pelas bactérias e não era descolorido pela viragem de pH. Procedeu-se então a adição de 5 gotas de corante no momento da leitura, para ver se havia mudança de cor.

Para maior segurança, fez-se cromatografia de camada fina com os tubos testados. Para isto, foram feitas placas com sílica -gel 60, e as amostras aplicadas com micropipetas. Colocou-se a placa na câmara com solvente. Depois foram reveladas para observar ausência ou presença de carboidratos.

Os reveladores usados para revelação de carboidratos aparecem na tabela nº 3.

Teste de hidrólise de amido (61)

As placas de ágar-amido, por duplicata, foram inoculadas em linha e, incubadas em jarra anaeróbia durante 24 horas a 30°C. Depois foram cobertas com álcool de 95º para observar a hidrólise do amido. Também foi usada a solução de lugol.

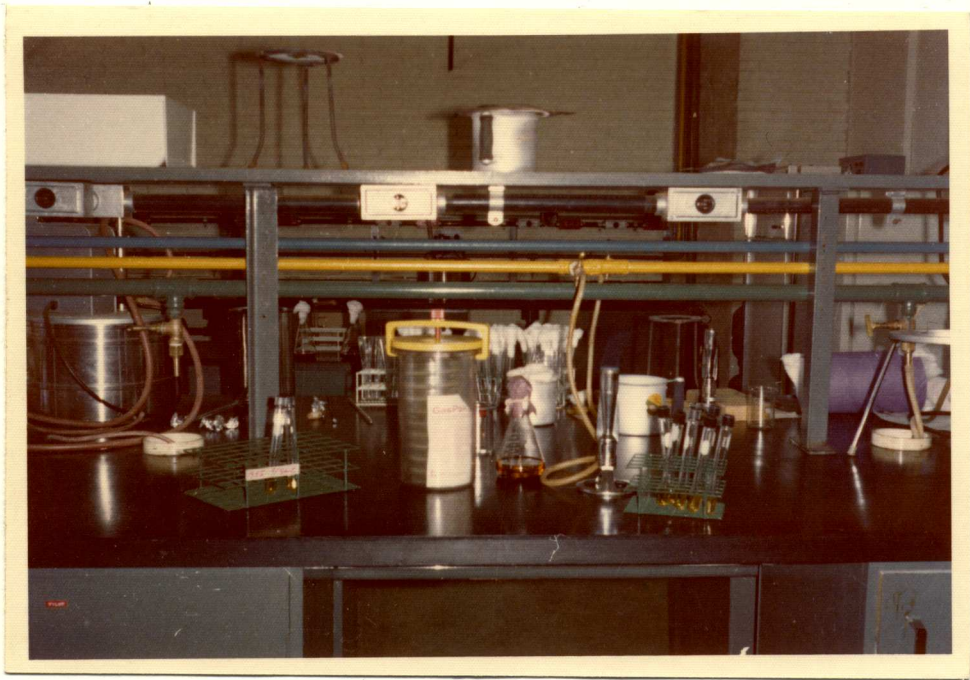
Nas placas hidrolizadas havia formação de um halo incolor ao redor das colônias.

Tabela nº 3

Reveladores usados para carboidratos

Carboidrato	Revelador 1	Revelador 2	Revelador 3
	H_2SO_4 + $K_2Cr_2O_7$	Anilina	$AgNO_3$ + KOH + Acetona
Manitol			+
Lactose		+	
Sacarose	+	+	
Maltose		+	
Salicina	+		
Glicerol			+
Arabinose		+	
Xilose		+	
Esculina			+
Glicose	+	+	+
Frutose	+	+	+

+ Indica que o revelador é adequado para o teste.



Incubação de placas em jarra anaerôbia.

4. RESULTADOS

Características culturais

O meio usado para a reativação dos esporos (infusão de cérebro e coração) deu ótimos resultados, já que depois de feito o choque térmico e incubados, obteve o crescimento em quase todos os tubos em 48 horas, com uma marcada turbidez do meio e produção de gás. Com a transferência repetida de inóculo neste meio, obteve-se bom crescimento em 24 horas, e a presença de esporos em algumas das cepas em 48 horas.

Trabalhou-se com as culturas que apresentaram crescimento satisfatório. Semeou-se em placas com agar de Clostridia reforçada o que permitiu descobrir alguns contaminantes, os quais mediante sucessivos isolamentos foram eliminados, obtendo-se nas placas colonias puras.

O terceiro passo a seguir foi testar a capacidade de crescimento em presença de oxigênio. Comprovou-se que a cepa número nove era anaeróbia facultativa, mas não se eliminou, para ver que porcentagem de similaridade apresentava com o resto das cepas que são estritamente anaeróbias.

No estudo do intervalo de temperatura de crescimento, deixaram-se os tubos a 20, 25, 30, 37 e 42°C, por um tempo que variou de 24 horas até 10 dias. Os intervalos de temperatura para obter ótimo crescimento das diferentes culturas foram variáveis. A maioria das culturas cresceu bem a 30°C exceto as cepas de número 4, 7 e 28 que cresceram melhor a 37°C (ver tabela 4).

Clostridium botulinum tipo A cresceu bem a 30°C e 37°C; o Clostridium botulinum tipo B (nº 56) cresceu lentamente a temperaturas de 20°C a 37°C, obtendo melhor crescimento a 42°C; o Clostridium botulinum tipo B (nº 58), por outro lado, cresceu bem a 30°C e 37°C e não cresceu a 42°C; o Clostridium botulinum tipo E apresentou melhor crescimento a 20°C e 25°C que a 37°C, mas também cresceu a 42°C.

Tabela nº 4

Temperaturas de crescimento e o tempo que as bactérias demoraram para crescer.

Crescimento em 24 horas	 +4
Crescimento em 48 horas	 +3
Crescimento em 72 horas	 +2
Crescimento em 96 horas	 +1
Crescimento em 120 horas	 +
Crescimento em 10 dias	 +d
Sem crescimento	 -

Nº da Cultura	T E M P E R A T U R A S				
	20°C	25°C	30°C	37°C	42°C
1	+3	+3	+4	+4	+3
2	+2	+4	+4	+4	+4
3	+1	+3	+4	+4	+4
4	-	+2	+3	+4	+4
5	+3	+4	+4	+4	+4
6	+3	-	+4	+4	+4
7	-	-	+3	+4	+3
8	+2	+2	+4	+4	+4
9	+4	+4	+4	+4	+4
11	+	+4	+4	+4	+1
12	+	+4	+4	+4	+
13	-	+4	+4	+4	+
14	+1	+4	+4	+4	+4
15	+3	+4	+4	+4	+4
16	+3	+4	+4	+4	+2
17	+3	+4	+4	+4	+4
18	+	+4	+4	+4	+4
19	+	+4	+4	+4	+3
21	+3	+3	+4	+4	+4
22	+3	+2	+4	+4	+2

Nº da Cultura	T E M P E R A T U R A S				
	20°C	25°C	30°C	37°C	42°C
23	+3	+4	+4	+3	+2
24	+3	+4	+4	+4	+3
25	+3	+3	+4	+4	+4
26	+3	+3	+4	+4	+4
27	+2	+3	+4	+4	-
28	+2	+3	+3	+4	+3
29	+	+3	+4	+4	+4
30	+3	+3	+4	+4	+4
31	+	+3	+4	+4	+4
32	+2	+3	+4	+4	+4
33	+2	+3	+4	+4	+4
34	+1	+3	+4	+4	+3
35	+1	+3	+4	+4	-
36	+	+3	+4	+4	+3
37	+2	+3	+4	+4	+4
51	+2	+4	+4	+4	+4
52	+1	+4	+4	+4	+4
53	+2	+4	+4	+4	+4
54	+3	+4	+4	+4	+4
55	+4	+4	+4	+4	+4
56	+1	+2	+2	+2	+3
57	+2	+4	+4	+4	+3
58	+3	+4	+4	+4	-
58	+4	+4	+3	+3	+4

A reação de Gram efetuada às culturas de 24 horas apresentaram resultados positivos para todas as cepas.

Medição das bactérias

O resultado da medição das células, utilizando os mesmos esfregaços usados para ver a reação de Gram, estão apresentados na tabela nº 5. Aí estão apresentadas as médias do comprimento e da largura das bactérias. Esta média foi tirada da leitura de 10 bactérias por esfregaço.

Tabela nº 5

Médias do comprimento e largura das bactérias

<u>Nº da cultura</u>	<u>Comprimento (nm)</u>	<u>Largura (nm)</u>
1	1,62	0,45
2	1,44	0,72
3	1,17	0,72
4	2,03	0,55
5	2,29	0,68
6	2,03	0,59
7	1,98	0,68
8	2,12	0,70
9	2,30	0,52
11	2,80	0,55
12	2,39	0,68
13	2,10	0,52
14	2,61	0,48
15	2,35	0,66
16	2,48	0,54
17	2,34	0,70
18	2,26	0,79
19	2,23	0,30
21	2,28	0,64
22	2,05	0,70

Nº da cultura	Comprimento (nm)	Largura (nm)
23	2,43	0,61
24	2,30	0,68
25	2,64	0,66
26	2,59	0,75
27	2,60	0,57
28	2,44	0,54
29	2,29	0,69
30	1,99	0,63
31	2,19	0,82
32	2,15	0,60
33	2,21	0,59
34	2,12	0,66
35	1,65	0,50
36	2,23	0,58
37	2,23	0,55
51	3,21	0,52
52	2,25	0,58
53	3,15	0,65
54	3,33	0,64
55	2,44	0,51
56	2,07	0,50
57	3,42	1,04
58	4,05	1,30
59	2,63	0,66

Presença e posição dos esporos

Todas as cepas apresentaram esporos a 72 horas de incubação em infusão de cérebro e coração, na observação com microscópio de contraste de fase. Verificou-se que todos os bacilos possuíam esporos subterminais, exceto as cepas 4, 23 e 28 que tinham-no indistintamente em posição subterminal ou central.

Motilidade

Os testes feitos com agar motilidade e com método de gota pendente mostraram que todas as bactérias são móveis (63).

Coloração de flagelos

Trabalhou-se usando método de Leifson para coloração de flagelo e foi observado que todas as bactérias possuíam flagelo peritríquio (34).

Características das colônias

A aparência das colônias de Clostridium botulinum e as cepas relacionadas apresentaram variações de espécie a espécie. O tipo mais comum de colônia em placas de agar de Clostridia reforçada a 24 horas de incubação foi de um diâmetro de 3 a 5 mm, brilhante, quase circular com superfície plana, elevada no centro, onde era opaca em comparação com as bordas que eram transparentes e irregulares.

A cor variava de transparente a branca e a densidade variava de translúcida nas margens a opaca no centro. as margens variavam de irregulares lisas a altamente filamentosas.

O maior número das espécies eram similares a colônias de Clostridium botulinum tipo A (nº 54, 55) deu margens rizoides e elevadas no centro.

Crescimento espalhado sobre a superfície do agar, foi comum para todas as espécies, especialmente se o agar estava úmido. Colônias similares foram descritas por Dolman (13). As mesmas variações foram observadas em placas de agar de gema de ovo e agar sangue. Muitas das culturas eram planas translúcidas, com uma zona opaca e o centro elevado, como grumo.

Características bioquímicas

Nenhuma das culturas reduziram o nitrato a nitrito e nem produziram urease. Para medir a atividade proteolítica foram usados cinco meios- gelatina, leite (leite litmus), carne moída (chopped meat), clara de ovo e carne picada. A atividade proteolítica foi intensa e a maioria das culturas digeriu a proteína de quase todos os meios.

Todos os Clostridium botulinum tipos A e B digeriram rapidamente o leite, gelatina e carne moída e, lentamente a carne picada e clara de ovo. O Clostridium botulinum tipo E, digeriu rapidamente a gelatina, carne picada e não digeriu e nem atacou a clara de ovo ou leite.

Entre as culturas desconhecidas, a atividade proteolítica foi marcante, só a cultura n) 9, que era anaeróbia facultativa demonstrou não ter atividade proteolítica, mas ela digeriu a gelatina em 48 horas.

Todas as culturas desconhecidas digeriram a carne moída e só três culturas não digeriram a carne picada. A proteína do leite foi digerida por todas as culturas em 24 horas (na cultura nº 9 houve fermentação do leite).

A gelatina foi liquefeita por todas as culturas.

A atividade proteolítica sobre a clara de ovo foi variável havendo quatro culturas que não a atacaram, e o resto das culturas demorou entre 10 a 15 dias para a sua digestão.

A maioria das culturas produziu uma clara hemólise ao redor das colônias em agar com 5% de sangue de ovelha.

Quase todas as bactérias produziram lecitinase em agar gema de ovo. A enzima lipase só foi produzida por sete culturas desconhecidas, uma cultura de Clostridium botulinum tipo A e três culturas de Clostridium botulinum tipo B.

A fermentação de carboidratos foi variável. A glicose foi fermentada por todas as culturas, com exceção do Clostridium botulinum tipo B (nº 58) e por P.A. 3679. A maltose fermentada por todas as culturas. O glicerol só foi fermentado pelo Clostridium botulinum tipo A (nº 55). A fermentação de manitol e sacarose foi escassa e nestes casos muito fracas. A lactose foi fermentada só por três bactérias, as de número 9, 21 e o Clostridium botulinum tipo E. A fermentação de salicina e frutose foi variável. Amido, arabinose e xilose foram raramente atacados. A hidrólise da esculina foi abundante.

A reação de vermelho de metila, foi fracamente positiva na bactéria de nº 21 e muito fracas nas de nº 31 e 36. Entre os Clostridium botulinum houve duas reações duvidosas: os nº 52 e 53. O Clostridium botulinum tipo B nº 57 e o Clostridium botulinum tipo E foram positivos.

Toxicidade

Só os Clostridium botulinum tipo A, B, E, eram tóxicos.

A tabela nº 6 apresenta os resultados dos testes bioquímicos, características culturais e toxicidade das culturas.

Quadro 15 C: ANÓXIS CUPURAIS, DIOXÍGENO E TOXIGENAS DAS CÉLULAS (continua)

Nº Da	Cultura	Rel. com O ₂	Gram	Esporos	Notabilidade	Hemólise	Lecitínase	Lipase	Carne Moída	Carne Picada	Leite	Gelatina	Clara de Ovo	Nitrato	Indol	V. de Metila	Catalase	Urease	H ₂ S em Plagar	H ₂ S em T.S.I.	Esculina	Glicose	Mantol	Lactose	Sacarose	Maltose	Salicina	Glicerol	Amido	Frutose	Xilose	Arabinose	Toxidade	Tipo de Toxina
1		V	+	S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2		V	+	S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3		V	+	S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4		A	+	S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5		A	+	S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6		A	+	S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7		V	+	S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8		A	+	S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9		F	+	S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11		A	+	S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12		A	+	S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13		V	+	S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14		A	+	S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

ANEXO 6: RESULTADOS CULTURAIS, BIOQUÍMICOS E MORFOLÓGICOS DAS CULTURAS (continua)

Nº Da	Cultura	Rel. com O ₂	Gram	Esporos	Motilidade	Hemólise	Lecitínase	Lípase	Carne foida	Carne picada	Leite	Gelatina	Clara de ovo	Nitrato	Indol	V. de Metila	Catalase	Urease	H ₂ S em PI agar	H ₂ S em T.S.I.	Esculina	Glicose	Manitol	Lactose	Sacarose	Maltose	Salicina	Glicerol	Ácido	Frutose	Xilose	Arabinose	Toxidade	Tipo de Toxina
13		A	+	S	+	-	(+)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14		A	+	S	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15		A	+	S	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16		A	+	S	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17		A	+	S	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18		A	+	S	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19		A	+	S	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21		A	+	S	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22		A	+	S	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23		A	+	S	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24		A	+	S	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25		A	+	S	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
26		A	+	S	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

ANEXO 1: RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS, SEGUN TIPO DE IDENTIFICACION POR CARACTERES (continúa)

Nº Da	Cultura	Rel. con O ₂	Gram	Esporos	Motilidad	Hemólisis	Lactinase	Lípase	Carne Molde	Carne Pícosa	Leite	Gelatina	Clara de Ovo	Nitrato	Indol	V. de Metila	Catalase	Urease	H ₂ S em P.I. agar	H ₂ S em T.S.I.	Esculina	Glicase	Mentof.	Lactosa	Sacrose	Maltose	Salicina	Glicerol	Ácido	Frutosa	Xilose	Arabinosa	Toxidade	Tipo de Toxina
27	A	A	+	S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
28	A	A	+	S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
29	A	A	+	S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30	A	A	+	S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
31	A	A	+	S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
32	A	A	+	S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
33	A	A	+	S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
34	A	A	+	S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
35	A	A	+	S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
36	A	A	+	S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37	A	A	+	S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

TESTES DE CULTURA, BIOQUÍMICA E AGREGAÇÃO DAS ESPÉCIES

Nº Da	Cultura	Rel. com O ₂	Gram	Reporos	Notabilidade	Hemólise	Leotifacção	Lipase	Carne Molde	Carne Picada	Leite	Gelatina	Clara de Ovo	Nitrato	Indol	V. de Metila	Catalase	Urease	H ₂ S em P.I. agar	H ₂ S em T.S.I.	Esculina	Glicose	Mantitol	Lactose	Sacarose	Maltose	Salicina	Glicerol	Amido	Frutose	Xilose	Arabinose	Toxidade	Tipo de Toxina
51		A	+	S	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	A
52		A	+	S	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	A
53		A	+	S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	A
54		A	+	S	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	A
55		A	+	S	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	B
56		A	+	S	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	B
57		A	+	S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	B
58		A	+	S	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	B
59		A	+	S	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	E

Nota: + = reação positiva

- = reação negativa

(+) = reação fracamente positiva

A = anaerobia

S = esporo sub-terminal

C = esporo central

A = toxina tipo A

B = toxina tipo B

E = toxina tipo E

5. DISCUSSÃO

Os resultados dos exames morfológicos, fisiológicos e bioquímicos conduzidos com as bactérias anaeróbias putrefativas isoladas das fontes naturais, P.A. 3679 e Clostridium botulinum dos tipos A, B e E foram esquematizados de acordo com a recomendação do Lockhart e Liston (36) para ser analisado pelo computador digital. A tabela nº 7 mostra o esquema usado. Um total de 113 caracteres foram considerados para a análise.

O programa de computador utilizado, foi baseado no trabalho de Lockhart e Liston (36) e está apresentado na tabela nº 8. As modificações introduzidas no programa foram para que tome em consideração, no presente caso, os caracteres negativos similares além dos positivos similares, ao contrário daquele apresentado pelo trabalho dos citados autores, o qual só considera os caracteres positivos similares.

Seguindo a marcha de trabalho de Lockhart e Liston, as porcentagens de similaridades foram colocadas em tabelas conforme a ordem numérica das bactérias ensaiadas (ver tabela nº 9). A seguir, as diferentes linhagens foram agrupadas de acordo com as respectivas similaridades e apresentadas conforme a tabela nº 10. A figura nº 1 mostra o diagrama de barras dos dados apresentados na tabela nº 10. Para ilustrar melhor, foram feitos agrupamentos de acordo com o grau de similaridade, apresentando a intensidade progressiva da cor segundo o seu grau (figura 2). Após esses manejamentos, foi feito o dendrograma (figura 3) que apresenta a chave de agrupamento conforme as similaridades e dissimilaridades entre as diferentes linhagens analisadas.

Das 35 linhagens de Clostridium putrefativas anaeróbias isoladas das fontes naturais analisadas, 27 (77%) apresentaram 96% das características similares a Clostridium botulinum

tipo A, linhagens 69A e 109A, 20 (57%) apresentaram 97% de similaridade com o Clostridium botulinum tipo A Linhagem 240A e 68A e, 30 (86%) apresentaram 95% de similaridade com todas as quatro culturas de Clostridium botulinum tipo A estudadas. As culturas de Clostridium botulinum tipo B e P.A. 3679 juntamente com duas linhagens desconhecidas apresentaram 93% de similaridade entre si. A cultura nº 15 juntamente com a cultura de Clostridium botulinum tipo E apresentaram similaridade de apenas 91% e a cultura nº 31 apresentou 92%.

Esses resultados concordam com a análise genética do Clostridium botulinum e organismos relacionados apresentada por Lee e Riemann (31, 32), exceto a linhagem P.A. 3679 que não ficou estritamente relacionada com o Clostridium botulinum-tipo A como no caso da análise genética.

Observando a distribuição dos grupos preliminarmente selecionados no dendrograma de figura nº 3, pode-se verificar que essa classificação preliminar não representam um agrupamento real das bactérias. Isso indica que a classificação baseada em poucos testes morfológicos, fisiológicos e bioquímicos, frequentemente usados na descrição de linhagens, não dá suficiente segurança para um agrupamento real, pelo menos no caso Clostridium putrefativo.

Tabela nº 7

Esquema dos caracteres utilizados para o cálculo de porcentagem de similaridade pelo computador.

Caracter Nº	Características e descrição
	<u>MORFOLOGIA CELULAR</u>
	- <u>Comprimento</u> (75% ou mais em uma categoria; medida com o ocular micrométrico, tipo filar, em microscópio Nikon, estimada de 10 células).
1	$\leq$ a 0,5 nm
2	0,5 a 1,2 nm
3	1,3 a 3 nm
4	$>$ 3 nm
5	comprimento variável (75% das células em algumas das categorias acima).
	- <u>Largura</u>
6	Longas, comprimento x largura 3:1
7	Curtas, comprimento x largura 2-3:1
8	Ovais, comprimento x largura 1:1
9	Largura variável ($<$ 75% em alguma das categorias acima).
	- <u>Forma da célula</u> (75% ou mais em alguma categoria: se menos de 75%, passa a categoria pleomórfica).
10	Reto
11	Curvado
12	Espiral
13	Coco-bacilo
14	Coco (esférico)
15	Remificado
16	Pleomórfico ($<$ 75% em alguma das categorias acima)
17	Célula de ponta quadrada
18	Célula de ponta redonda

Caracter nº	Características e descrição
19	Célula aguçada, pontiaguda
20	Célula fusiforme
	- <u>Formação de esporos</u> (Em meio de infusão de cérebro e coração)
21	Esporo presente
22	Esporângio inchado (paredes da célula distendidas)
23	Esporângio normal (paredes da célula paralelas)
24	Esporo terminal dentro da célula
25	Esporo Sub-terminal localizado dentro da célula
	- <u>Reação a coloração de Gram</u>
26	Reação de Gram negativa
27	Reação de Gram positiva
28	Reação de Gram variável (> 75% em alguma das categorias acima)
	- <u>Motilidade</u>
29	Flagelo polar (monotríquio, lofotríquio)
30	Flagelo peritríquio
31	Flagelo lateral ou misto
32	Motilidade rotatória (como aspiroqueta)
33	Motilidade deslizante
	<u>AGRUPAMENTO CELULAR</u>
	- Tipos de agrupamento (> 75% em alguma das seguintes categorias)
34	Células isoladas
35	Células em pares
36	Cadeias curtas de células, menos de 5 células
37	Cadeias longas de células, mais de 5 células
38	Cacho de cocos
39	Pacotes de cocos
40	Filamentosas (8 nm de comprimento e relação comprimento-largura de 20:1)

Caracter Nº	Características e descrição
41	Agrupamentos variáveis
	<u>TIPO DE COLONIA</u>
	(Para a definição dos termos procurar ilustração no Topley and Wilson, 25).
	- <u>Tamanho</u>
42	< 2 mm
43	2 a 5 mm
44	> 5 mm
	- <u>Forma (elevação)</u>
45	Plana
46	Elevada
47	Convexa
48	Mais de uma elevação
	- <u>Bordas</u>
49	Inteiras
50	Dentadas
51	Irregulares
52	Rizoides
53	Espalhadas
	- <u>Densidade das colônias</u>
54	Transparentes (se pode ver um papel impresso através da colônia)
55	Translúcida (luz é visível através da colônia)
56	Opacas
	<u>FORMAÇÃO DE PIGMENTOS</u>
	- <u>Pigmentos não difusíveis</u>
57	Branco
58	Cinza
59	Vermelho
60	Rosa

Caracter nº	Características e descrição
61	Laranja
62	Amarelo
63	Verde
64	Roxo
65	Marron
66	Preto
67	Azul
	- <u>Pigmentos difusíveis</u>
68	Amarelo
69	Verde
70	Marron
71	Preto
72	Fluorescente (baixos raios ultravioletas)
73	Luminoso
	<u>FISIOLOGIA</u>
	- Temperaturas de crescimento (As cepas semeadas em infusão de cérebro e coração, foram incubadas anaerobicamente a temperaturas de 20, 25, 30, 37, 42°C durante tempos que foram de 1 a 10 dias para ver a temperatura mínima e máxima de crescimento).
74	Crescimento a 20°C
75	Crescimento a 25°C
76	Crescimento a 30°C
77	Crescimento a 37°C
78	Crescimento a 42°C
	<u>CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS</u>
	- <u>Características</u>
79	Teste da catalase (com água oxigenada 10%)
80	Aeróbia
81	Anaeróbia facultativa
82	Anaeróbia estrita

Caracter Nº	Características e descrição
	- <u>Enzimas proteolíticas</u>
83	Teste de hemólise
84	Alfa-hemólise
85	Beta-hemólise
86	Liquefação de gelatina
87	Digestão de carne moída (cooked meat medium)
88	Digestão de carne picada (chooped meat medium)
89	Peptonização em leite (leite litmus)
90	Fermentação do leite (leite litmus)
91	Redução do litmus em leite (leite litmus)
92	Digestão de clara de ovo
	- <u>Enzimas lipídicas</u>
93	Presença de halo opaco ao redor das colônias (em agar gema de ovo)
94	Presença de lipase
	<u>TESTES GERAIS</u>
	- <u>Testes</u>
95	Redução de nitratos
96	Teste de indol
97	Vermelho de metila
98	Presença de urease
99	Produção de H ₂ S (em T.S.I. agar)
100	Produção de H ₂ S (em agar de peptona e ferro)
	<u>FERMENTAÇÃO DE CARBOIDRATOS</u>
	- <u>Fermentações</u>
101	Fermentação da glicose
102	Fermentação da esculina
103	Fermentação do manitol
104	Fermentação da lactose
105	Fermentação da sacarose

Caracter nº	Características e descrição
106	Fermentação da maltose
107	Fermentação da salicina
108	Fermentação do glicerol
109	Fermentação da frutose
110	Fermentação da xilose
111	Fermentação da arabinose
112	Hidrólise do amido (em placas)
113	Teste de toxicidade (camandongos)

Tabela nº 8

Programa de computação

C-COMPUTE PERCENTAGE SIMILARITY (S) OF SNEATH

C-FOR 44 STRAINS WITH 113 ATTRIBUTES EACH

C-CODED 0=NEGATIVE,1=POSITIVE

C-FORTRANIV FOR SOUTHOUGHS P0010 DIGITAL

C-DEFINE DATA AREA

DIMENSION IDAT(44,113)

C-INPUT OF DATA

CALL IFILE(1,'DADOS')

1 READ(1,2)NR,NT

2 FORMAT(214)

DO 6 J=1,NT

6 READ(1,3)(IDAT(I,J),I=1,NR)

3 FORMAT(3512)

END FILE 1

PRINT 10

10 Format(20X,'NO.I',5X,'NO.J',20X,'S',10X,'NS',10X,'NSD')

```

      DO 4 J=1,NR
      DO 4 I=J,NR
      NS=0
      ND=0
C-COUNT SIMILARITIES AND DISSIMILARITIES
      DO 5 M=1,NT
      ITOT=IDAT(I,M)+IDAT(J,M)
      IF(ITOT-1)8,7,8
7      ND=ND+1
      GO TO 5
8      NS=NS+1
5      CONTINUE
      XNS=NS
      XND=ND
      S=(XNS*100.0)/(XNS+XND)
C-OUTPUT OF S(I,J)
4      PRINT 9,I,J,S,NS,ND
9      FORMAT(19X,15,4X,15,15X,F10.4,3X,15,7X,15)
      GO TO 1
      END

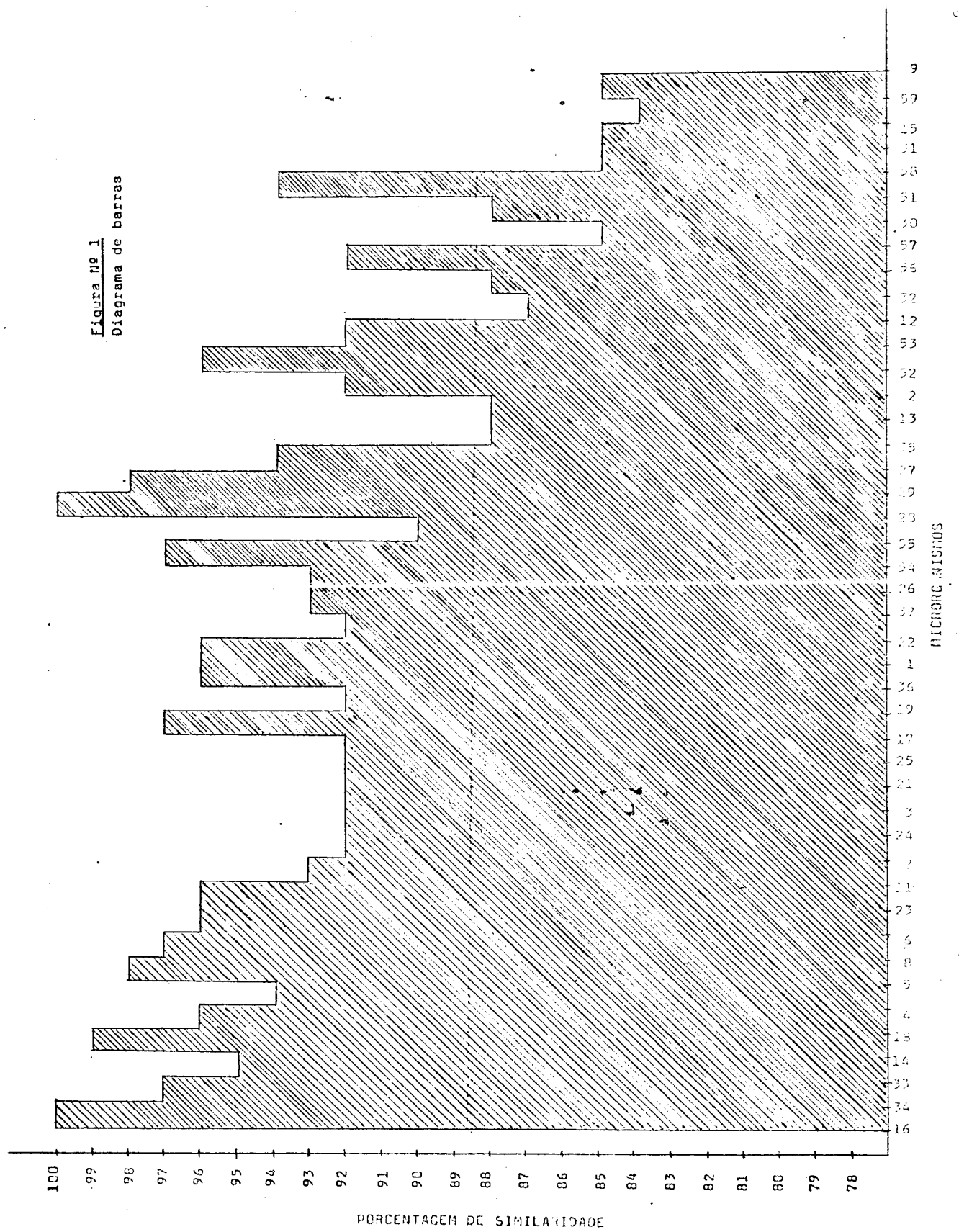
```

Tabela Nº 9

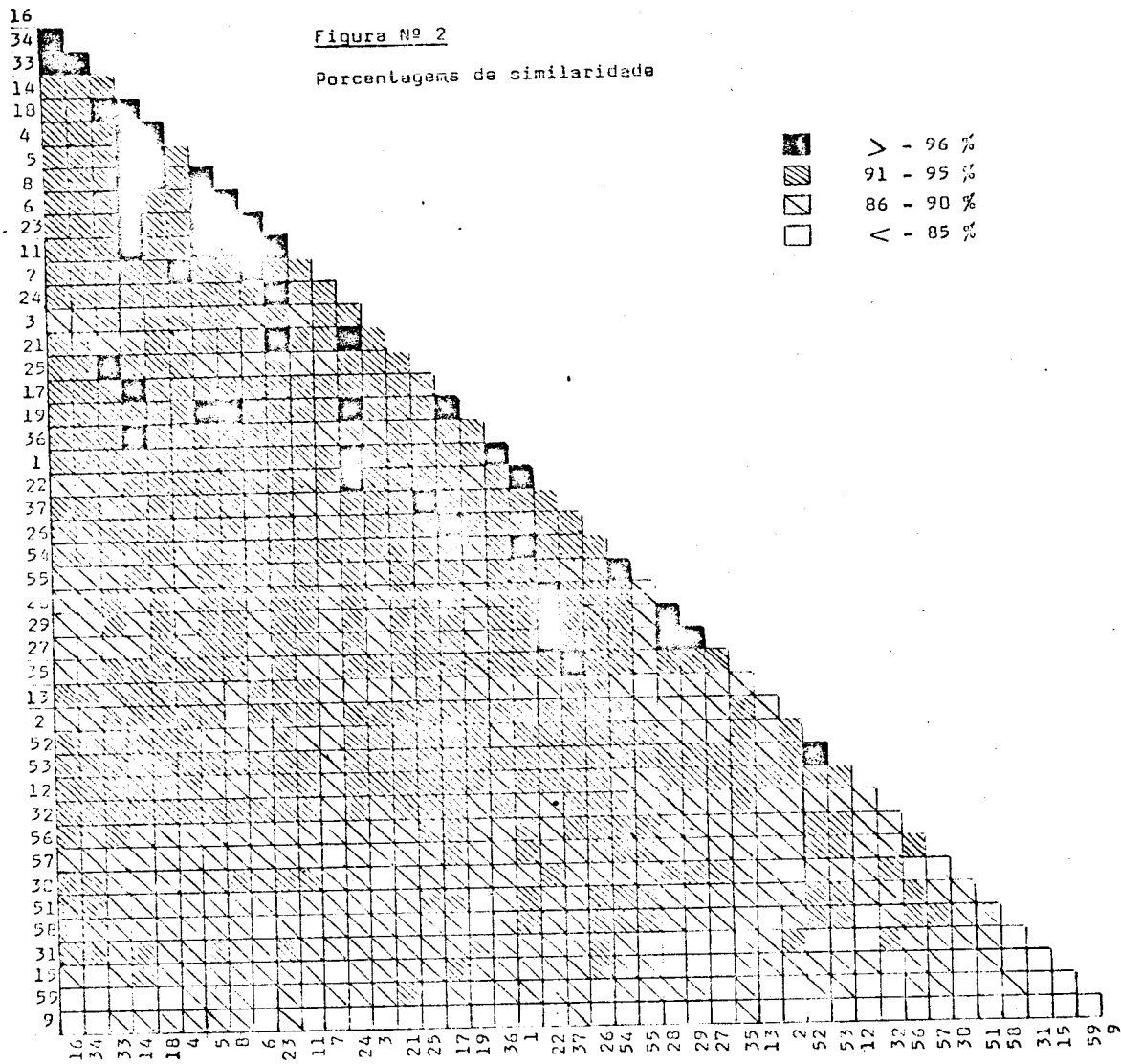
MICROORGANISMS

Tabela Nº 10

MICROFILMED

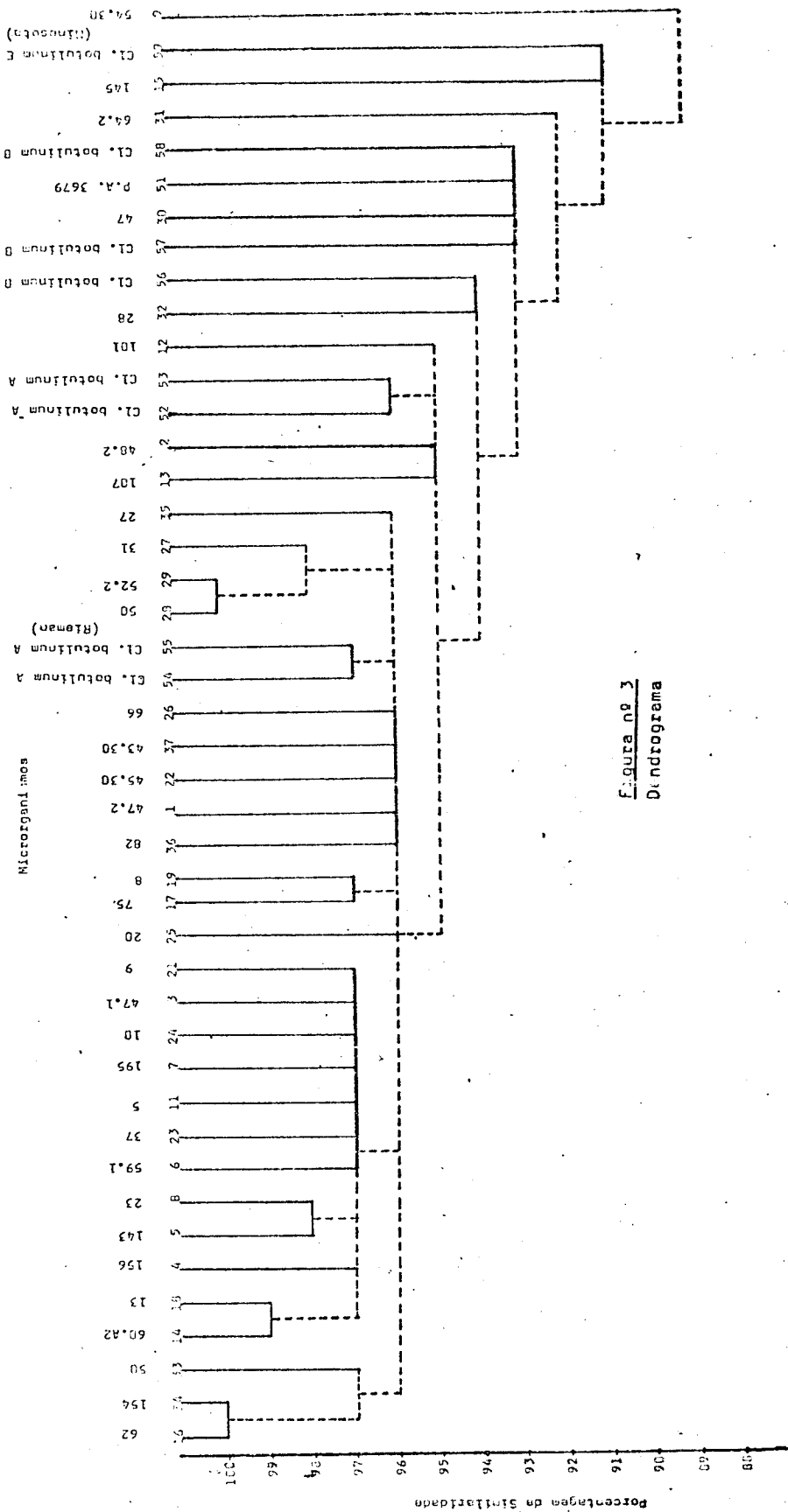


MICROORGANISMOS



MICROORGANISMOS

1114



6. CONCLUSÕES

1. Das 35 linhagens representando as 205 culturas isoladas de diferentes fontes naturais do Estado de São Paulo, cerca de 86% eram similares à Clostridium botulinum tipo A, nas 95% das suas características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas.
2. O Clostridium botulinum tipo E, assim como duas outras linhagens isoladas de fontes naturais apresentaram similaridades de apenas 91%, indicando ser bastante distintas nas suas características comparadas com as demais anaeróbias putrefativas.
3. A classificação em grupos considerando um pequeno número de caracteres não fornece base segura quanto a similaridades e dissimilaridades das linhagens consideradas.
4. O Clostridium botulinum tipo E é bastante diferente dos tipos A e B, e encontra-se agrupado a eles só pela importância dada a sua capacidade de produzir toxina letal já que em seus testes bioquímicos, fisiológicos e morfológicos é muito distinto a ditos Clostridium.

APÊNDICE 1

Meios e o seu preparo

1. Infusão de cérebro e coração

a) Composição:

Infusão de cérebro de bezerro	200	g
Infusão de coração de boi	250	g
Proteose peptona	10	g
Glicose	2	g
Cloreto de sódio	5	g
Fosfato dissódico	2,5	g
Cloridreto de cisteína	0,5	g
Água destilada	1000	ml

b) Preparo:

Dissolvem-se os ingredientes (ou 37 g de B.H.I. Difco desidratado agregando-se 0,5 g de cloridreto de cisteína) em 1000 ml de água destilada. Distribuem-se 5 ml em tubos com tampa de rosca e esteriliza-se a 121°C durante 15 minutos em autoclave.

2. Agar de clostridia reforçado

a) Composição:

Extrato de levedura	3	g
Extrato de carne	10	g
Peptona	10	g
Amido solúvel	1	g
Glicose	5	g
Cloridreto de cisteína	0,5	g
Cloreto de sódio	5	g
Acetato de sódio	3	g
Agar	15	g
Ágar destilada	1000	ml

b) Preparo:

Agregam-se os ingredientes (ou 52,5 g de Agar de clostrodia reforçado Oxoid) em 1000 ml de água destilada e aquece-se até dissolver. Ajustar o pH a 7,0 e distribuir aproximadamente 250 ml em frascos Erlenmeyer de 500 ml e autoclava-se a 115°C durante 20 minutos. Depois de estéril distribui-se o meio ainda líquido em placas de Petri (20 ml) e deixa-se solidificar.

3. Meio de motilidade-nitrato

a) Composição:

Extrato de carne bovina	3	g
Peptona	5	g
Nitrato de potássio	1	g
Ágar	3	g
Água destilada	1000	ml

b) Preparo:

Agregam-se os ingredientes e aquece-se até dissolver. Distribue-se 5 ml em cada tubo e esteriliza-se em autoclave a 121°C por 15 minutos.

4. Agar de infusão de coração

a) Composição

Infusão de coração de boi	500	g
Triptose	10	g
Cloreto de sódio	5	g
Cloridrato de cisteína	0,5	g
Agar	10	g
Água destilada	1000	ml
Sangue desfibrinado	5	%

b) Preparo:

Dissolver-se os ingredientes (ou 40 g de Agar de infusão de coração Difco e 0,5 g de cloridrato de cisteína) em 1000 ml de água destilada. Aquece-se até dissolver o agar.

Distribuem-se 250 ml em frascos Erlenmeyer de 500 ml, autoclava-se a 121°C durante 15 minutos, resfria-se até 50-55°C e adiciona-se 5% de sangue de ovelha desfibrinado. Homogenisa-se e distribue-se 20 ml em placas de Petri deixando-se solidificar.

5. Agar de gema de ovo

a) Composição:

Proteose peptona	40	g
Fosfato dissódico	5	g
Fosfato monopotássico	1	g
Cloreto de sódio	2	g
Sulfato de magnésio	0,1	g
Glicose	2	g
Cloridreto de cisteína	0,5	g
Agar	25	g
Água destilada	1000	ml

b) Preparo:

Agregam-se os ingredientes a 1000 ml de água destilada, aquece-se até dissolver, ajusta-se o pH a 7,0 e distribue-se 250 ml em frascos Erlenmeyer de 500 ml. Esteriliza-se em autoclave a 121°C durante 20 minutos. Resfria-se até 50-55°C e adiciona-se 10% de suspensão estéril de gema de ovo, homogeniza-se e distribue-se 20 ml em placas de Petri e deixa-se solidificar. A suspensão de gema de ovo é preparada retirando-se asepticamente a gema de um ovo fresco, misturando-se com igual volume de solução salina estéril a 0,85%.

6. Meio de carne picada

a) Composição:

Infusão de cérebro e coração (B.H.I.)	1000	ml
Cloridreto de cisteína	0,5	g
Carne de boi picada	200	g

b) Preparo:

Prepara-se a infusão, adiciona-se o cloridreto de cisteína e distribue-se 5 ml em tubos contendo 0,5 g de carne de boi sem gordura, picada. Esteriliza-se a 121°C. durante 15 minutos em autoclave.

7. Meio de clara de ovo

a) Composição:

Infusão de cérebro e coração (B.H.I.)	1000	ml
Clara de ovo coagulada de	6	ovos
Cloridreto de cisteína	0,5	g

b) Preparo:

Prepara-se a infusão, agrega-se o cloridreto de cisteína e pedaços de clara de ovo cozido (0,5 g por tubo). Esteriliza-se a 121°C durante 15 minutos, em autoclave.

8. Nutriente-gelatina

a) Composição:

Extrato de carne bovina	3	g
Peptona	5	g
Gelatina	120	g
Glicose	1	g
Cloridreto de cisteína	0,5	g
Água destilada	1000	ml

b) Preparo:

Agregam-se 128 g de gelatina-nutriente Difco e os demais ingredientes em 1000 ml de água destilada. Aquece-se até dissolver, distribue-se 5 ml por tubo e esteriliza-se em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

9. Calco glicosado

a) Composição:

Fosfato dipotássico	5	g
Peptona tamponada	7	g

Glicose	5	g
Água destilada	1000	ml

b) Preparo:

Dissolvem-se os ingredientes na água e distribuem-se 5ml em tubos. Esteriliza-se em autoclave a 121°C durante 10 minutos.

10. Meio para indol (51)

11. Meio para testar lipase (56)

12. Meio basal para testes de carboidratos (57)

13. Meio para testar hidrólise de amido

a) Composição:

Agar nutriente Difco	1000	ml
Amido solúvel	0,2	%

b) Preparo:

Dissolve-se 23 g de agar nutriente em 500 ml de água e o amido solúvel dissolve-se em outros 500 ml de água. Aquece-se lentamente agitando. Depois que o amido estiver dissolvido junta-se o agar nutriente e aquece-se um pouco mais. Despeja-se em um frasco Erlenmeyer e esteriliza-se em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Deixa-se esfriar até 50-55°C e distribue-se em placas de Petri e deixa-se solidificar.

14. Leite litmus Difco (12)

15. Agar urea Difco (10,12)

16. Agar de triplíce açúcar e ferro Difco (T.S.I. agar) (12,19)

17. Agar de peptona e ferro Difco (12,33)

18. Agar de contagem em placas Difco (G.T.L. agar) (12,63)

19. Meio de carne cozida Difco (Cooked meat medium) (12)

APÊNDICE 2

Reagentes

1. Água oxigenada a 10%
2. Solução de vermelho de fenol a 0,005%
3. Solução alcoólica de vermelho de metila
 - a) Composição:

Vermelho de metila	0,1	g
Etanol 95%	300	ml
Água destilada	200	ml
4. Carboidratos em pó Difco e Merck
5. Revelador de nitratos
 - a) Composição:

Solução A		
Alfa-naftilamina	0,5	g
Ácido acético 5N	100	ml
Solução B		
Ácido sulfanílico	1	g
Ácido acético 5N	125	ml
6. Zinco em pó
7. Reagentes normais usados na coloração de Gran segundo técnica de Hucker (61).
8. Reagente usado para revelar presença de amido
Álcool 95% e ou solução de lugol
9. Silica gel 60 da Merck

10. Solução salina estéril (para diluição de gema de ovo)

a) Composição:

Cloreto de sódio	0,05	g
Água destilada	100	ml

b) Preparo:

Dissolve-se o sal na água e esteriliza-se a 121°C por 15 minutos em autoclave.

11. Vas-Par

Mistura de vaselina e parafina na proporção de 1:1 esterilizada a 121°C por uma hora.

12. Solventes para desenvolver placas de cromatografia de camada delgada.

a) Composição:

N-propanol	6	partes
Acetato de etila	1	parte
Água destilada	3	partes

13. Reveladores de açúcares

1 - Solução

a) Composição:

Dicromato de potássio	5	g
Ácido sulfúrico 40%	100	ml

2 - Anilina ftalato Merck em spray

3 - Solução (p.899 Thin-layer chromatograph, Egon-Stalh)

a) Composição:

Nitrato de prata	1	g
Acetona	200	ml
Álcool	980	ml
Hidróxido de sódio	20	g
Água destilada	20	ml

14. Reagente de Kovacs

a) Composição:

P-dimetil aminobenzaldeído	5	g
Álcool amílico	75	ml
Ácido clorídrico concentrado	25	ml

15. Reagentes para coloração de flagelos

a) Composição:

$KAl(SO_4)_2 \cdot 12 H_2O$ ou $NH_4Al(SO_4)_2 \cdot 12 H_2O$	solução
aquosa saturada	20 ml
Ácido tânico (20% em solução aquosa)	10 ml
Água destilada	10 ml
Álcool etílico 95%	15 ml
Fucsina básica (solução saturada em álcool etílico 95%)	3 ml

As técnicas utilizadas foram específicas para enzimbios e, dentro do possível utilizou-se meios prontos das marcas Difco, Oxoid e BBL.

7. BIBLIOGRAFIA

1. ABEL, K.; SCHMERTZING, H. & PETERSON, J. I. Classification of microorganisms by analysis of chemical composition. I. Feasibility of utilizing gas chromatography. J. Bact., 85, 1039, 1963.
2. ABRAHAMSSON, K. Studies on the effect of different chemical inhibitors on the toxin production of Clostridium botulinum. Nord Hyg. Tidskr, 45, 49, 1964.
3. _____; GULLMAR, B. & MOLIN, N. The effect of temperature on toxin formation and toxin stability of Clostridium botulinum type E in different environments. Can. J. Microbiol., 12, 385, 1966.
4. AJMAL, M. Growth and toxin production of Clostridium botulinum type E. J. Appl. Bact., 31, 120, 1968.
5. B.B.L. MANUAL OF PRODUCTS AND LABORATORY PROCEDURES; Cat. 60465. Gas Pak anaerobic system. Appl. Microbiol., 14, 985, 1972.
6. BAIRD-PARKER, A.C. & FREAME, B. Combined effect of water activity, pH and temperature on growth of Clostridium botulinum from spores and vegetable cell inocula. J. Appl. Bact., 30, 420, 1967.
7. BREED, R.S.; MURRAY, E.G.D. & SMITH, V.R. Bergey's manual of determinative bacteriology. 7 ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1957.
8. BULATOVA, T.I.; MATVEEV, K.I. & KAZDOBINA, I.S. Clostridium botulinum contamination of soil on shores of lake

Balkhash. Hyg Sanit., 34, 317, 1969.

9. CARROL, B.J.; GARRET, E.S.; REESE, G.B., & WARD, B.Q. Presence of Clostridium botulinum in the gulf of Venezuela and the gulf of Darien. Appl. Microbiol., 14, 837, 1966.
10. CHRISTENSEN, W.B. Urea decomposition as a means of differentiating Proteus and Paracolon cultures from each others and Salmonella and Shigella types. J. Bact., 52, 461, 1946.
11. DICKSON, E.C. Botulism a clinical and experimental study. Monogr. Rockefeller Int. Med. Res. n^o 8. The Avi Publishing Co. Inc. Westport, Connecticut, 1918.
12. DIFCO MANUAL OF DEHYDRATED CULTURE MEDIA AND REAGENTS. 9 ed. Detroit, Michigan, 1972, 350 p.
13. DOLMAN, C.E. The influence of bacterial mutation upon type E botulinus toxin production. Canad. J. Public. Health., 48, 27, 1957.
14. _____. Type E botulism a hazard of North Artic. J. Artic. Inst. of North America 13, 230, 1960.
15. _____. & MURAKAMI, L. Clostridium botulinum type E with recent observation on others types. J. Infect. Dis., 109, 107, 1961.
16. _____. Botulism a world health problem. In "Botulism" Proceeding of a Symposium. Cincinnati, US Dept. of Health, Education and Welfare, p. 5, 1964.
17. DONAHUE, J.A. & BALWIN, J.N. Hemolysin and leukocidin pro-

- duction by 80/81 strains of Staphylococcus aureus. J. Infect. Dis., 116, 324, 1966.
18. EKLUND, M.W. & POYSHY, F. Incidence of Clostridium botulinum type E from the Pacific coast of the United States. In Proc. 5 th. International Symposium of Food Microbiology. Moscow, ed. by M.Ingram and T.A. Robertis. London Chapman and Hall, 1965. p. 49-53.
 19. ERWING, W. H. Enterobacteriaceae biochemical methods for group differentiation. U.S. Dept. of Health, Education and Welfare. Public Health Service Publication no 734, 1947.
 20. Esty, J.R. & MEYER, K.F. The heat resistance of spores of Clostridium botulinum and allied anaerobes. J. Infect. Dis., 31, 650, 1922.
 21. GOUDKOV, A.V. & SHARPE, M.E. A preliminary investigation of the importance of Clostridia in the production of rancid flavour in Cheddar cheese. J. Dairy Res., 33, 139, 1966.
 22. GREENBERG, R.A.; SILLKER, J.M. & FATLA, L.D. The influence of sodium chloride and toxin production and organoleptic down in perishable cured meat inoculated with Clostridium botulinum. Fd Technol, Champaign 13, 509, 1959.
 23. GUNSALES, I.C. & STANIER, R.Y. The bacteria, a treatise on structure and function. New York, Academic Press, 1960. v. 1.
 24. GUNNISON, J.B.; CUMFINGS, J.R., & MEYER, K.F. Clostridium

- botulinum type E. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 35, 278, 1936.
25. HILL, L.R. The Adansonian classification of the Staphylococci. J. Gen. Microbiol., 20, 277, 1959.
26. HOWELL, R.T. An evaluation of cultural and biochemical methods for the identification of Clostridium botulinum and Clostridium sporogenes. University Microfilms, England, 1972. 135 p. Thesis (Ph.D) University of North Carolina at Chapel Hill.
27. Kautter, D.A. Clostridium botulinum type E in smoked fish. J. Fd Sci., 29, 843, 1964.
28. LANANNA, C. & MALLETTE, F. Basic bacteriology. 3. ed. Baltimore. Williams & Wilkins, 1965, 1001 p.
29. LANDMANN, H. Ueber die ursache der darmstadter bohmenvergiftung. Hyg. Rdsch., 14, 449, 1904.
30. LANGREBE, J.C. Taxonomic studies of Clostridia using deamination reactions. Dissertation, U. Kentucky, Lexington, Ky. 1967.
31. LEE, W.H. & RIEMANN, H. The genetic Relatedness of proteolytic. Clostridium botulinum Strains. J. Gen. Microbiol., 64, 85, 1970.
32. LEE, W.H. & RIEMANN, H. Correlation of toxic and non-toxic Strains of Clostridium botulinum by DNA composition and Homology J. Gen. Microbiol., 60, 117, 1970.

33. LEGROUX, R.; LEVADITTI, J. & JERAMEC, C. Le botulisme en France penden l'occupation 1940-1944. Presse Med.nº 10 109, 1947.
34. LEIFSON, E. A method of stainig bacterial flagella and capsules together with a study of the origin of flagella. J. Bacteriol., 20, 203, 1930.
35. LEVINE, et al. Am. J. Pub. Health 24, 505, 1934. (Cited by Difco Manual).
36. LOCKHART, W.R. & LISTON, J. Methods for numerical taxonomy. Bethesda, Maryland, American Society for Microbiology, 1970, 63 p.
37. MATVEEV, K.I. Botulism Medgiz. Moscow. (Cited by Dolman 1964)
38. Mc CLUNG, L.S. & TOABE, R. The egg yolk plate reaction for the presumptive diagnosis of Clostridium sporogenes and certain species of the gangrene and borulinum grups. J. Bact., 53, 139, 1947.
39. MEYER, K.F. Ueber botulismus. Handbuch der pathog.. Mikroorganismen. 4 th ed. Kolle, Kraus. U. Uhlenhuth., 4, 1269, 1928.
40. _____. & EDDIE, B. Fifty years of botulism in the United States and Canada. Report from George Williams Hooper Foundation. San Francisco Med. Center. University of California, 1950.
41. _____. Proc. 6 th International Congress Microbiology.. Springfield, Illinois, C.C. Thomas, 1954. v.2 p. 276.

42. _____. The status of botulism as a world health problem. Bull. Wld. Hith. Org., 15, 281, 1956.
43. MOELLER, V. & SCHEIBEL, I. Preliminary report on the isolation of an apparently new type of Clostridium botulinum Acta. Path. Microbiol. Scand., 48, 80, 1960.
44. NAKAMURA, Y. Botulism in Japan. Jap. J. Med. Sci. Biol., 16, 304, 1963.
45. NG, H. & VAUGHN, R.H. Clostridium rubrum sp. and other pectinolytic Clostridia from soil. J. Bact., 85, 1104, 1963.
46. OHYE, D.F. & SCOTT, W.J. The temperature relations of Clostridium botulinum types A and B. Aust. J. Biol. Sci., 6, 178, 1953.
47. _____ & CHRISTIAN, J.H.B. Combined effects of temperature, pH and water activity on growth and toxin production by Clostridium botulinum types A, B, and E. In Botulism 1966. Proc. 7 th Int. Symposium Fd Microbiol. London, Chapman and Hall, 1966, p. 217.
48. OXOID MANUAL OF CULTURE MEDIA INGREDIENTS AND OTHER LABORATORY SERVICES. England, Shipbourne Road Tonbridge Kent, 1973, 264 p.
49. PEDERSEN, H.O. The survival of Clostridium botulinum in curing brines. In The Microbiology of Fish and Meat Curing Brines. Proc. 2nd Int. Symposium Fd Microbiol., 1957. London, ed. E.P. Eddy, H.P.S.O., 1958, p. 289.

50. PREVOT, A.R.; TERRASSE, J.; DAUMAIL, J.; CAVAROC, M.; RIOL, J.; & SILLIOT, R. Existence en France du Botulisme humain de type C. Bull Acad. Natn. Med. Paris 139, 355, 1955.
51. _____ Manual for the classification and determination of anaerobic bacteria. Philadelphia, 1966. Lea and Febiger. Monogr. of the Pasteur Inst., 402 p.
52. PYATKIN, K. Microbiology. Moscow, 1967. Mir Publishers, 584 p.
53. REED, R.W. Nitrate, nitrite and indol reactions of gangrene anaerobes. J. Bact., 44, 425, 1942.
54. ROBERT'S, T.A. & INGRAM, M. The resistance of spores of Clostridium botulinum type E to heat and radiation. J. Appl. Bact., 28, 125, 1965.
55. _____ & HOBBS, G. Low temperature growth characteristics of Clostridia. J. Appl. Bact., 31, 75, 1968.
56. SALETH, M.A. & ORDAL, Z.J. Studies on growth and toxin production of Clostridium botulinum in precooked frozen food. I. Some factor affecting growth and toxin production. Fd Res., 20, 332, 1955.
57. SCHMIDT, C.F. Spores of Clostridium botulinum: formation, resistance, germination. In Botulism, Cincinnati, ed. K.H. Lewis & K. Cassel. Jnr. 1964. U.S. Dept. of health, Education and Welfare, p. 69.
58. SEBALD, M. & PRÉVOT, A.R. Quantitative study of bacterial lipolysis in soil. Compt. rend., 248, 3363, 1959.

59. SINCLAIR, N.A. & STOKES, J.L. Isolation of obligately anaerobic psychrophilic bacteria. J. Bact., 87, 562, 1964.
60. SKERMAN, V.B.D. Abstracts of microbiological methods. New York, Wiley-Interscience, 1969, 883 p.
61. SMITH, GORDON, N.R. & CLARK, F.E. U.S.D.A. Agr. Monogr. n° 6, 1952. (Cited by Skerman p. 805)
62. SNEATH, P.H.A. The application of computers to taxonomy. J. Gen. Microbiol., 17, 201, 1957.
63. SOCIETY OF AMERICAN BACTERIOLOGIST. Manual of microbiological methods. New York, Mc Graw-Hill, 1957, 315 p.
64. SPENCER, R. Food poisoning due to Clostridia, the factors affecting the survival and growth of food poisoning Clostridia in cured foods. Leatherhead, England, Adlard & Son Ltd., Bartholomew press, Dorking, 1969. B.F.M.I.R.A. 61 p. (Scientific and Technical Surveys n° 58).
65. STANDARD METHODS FOR EXAMINATION OF DAIRY PRODUCTS; 13 th ed. Washington, D.C., ed. by William & Hausler, APHA, 1972. 345 p.
66. STANIER, R.Y.; DOUDORFF, M. & ALDELBURG, E.A. The microbial world. Englewood Cliffs, N.Y. Prentice-Hall, 1969. 741 p.
67. STUNBO, C.R.; MURPHY, J.R. & COCHRAN, J. Nature of thermal death time curves for P.A. 3679 and Clostridium botulinum. Fd Technol. Campaign 4, 321, 1950.

68. THATCHER, F.S. & CLARK, D.S. Microorganisms in food, their significance and methods of enumeration. Canada, University of Toronto Press, 1968, 179-p.
69. THIMAN, K.V. The life of bacteria. New York, Mac Millan U.S.A. 1955.
70. WARD, B.Q.; GARRETT, E.S. & REESE, G.B. Further indications of Clostridium botulinum in latin America waters. Appl. Microbiol., 15, 1509, 1967.

AGRADECIMENTOS

O autor deseja expressar os mais sinceros agradecimentos ao Prof. Dr. Fumio Yokoya pela sua orientação, paciência e facilidades proporcionadas na execução deste trabalho.

Também agradece ao Prof. Dr. José Sátiro de Oliveira pela sua assistência e sugestões.

Agradecimentos ao Prof. Dr. André Tosello, Diretor da Faculdade de Tecnologia de Alimentos pelas facilidades proporcionadas.

Agradecimentos a todos os funcionários da Biblioteca, especialmente a Sra. Angelina Franco de Godoy.

Aos amigos Anna Lourdes Gândara, Júlio Gândara e Luís M. Valent pela sua ajuda na tradução e escritura desta tese.

Aos professores, companheiros e colegas e, a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Finalmente o autor estende os reconhecimentos a Faculdade de Tecnologia de Alimentos, Organização dos Estados Americanos e a Universidade de Chile, sede La Serena.