

Rev Biomed 1999; 10:209-215.

Efecto inhibitorio de Clostridium perfringens sobre C. botulinum en muestras de suelo.

Artículo Original

Mario Monge-Izaguirre, Evelyn Rodríguez-Cavallini.

Laboratorio de Investigación en Bacteriología Anaerobia y Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, Costa Rica.

RESUMEN.

Introducción. La frecuencia de aislamiento de *Clostridium botulinum* en Costa Rica y en otros sitios es baja, en tanto que *C. perfringens* es la especie toxigénica más abundante en la naturaleza. Se ha descrito que *C. perfringens* podría impedir el aislamiento de *C. botulinum* o la producción de su toxina a partir de muestras de suelo, razón por la cual se pensó en investigar el efecto al respecto, de cepas de *C. perfringens* aisladas de suelos costarricenses.

Material y Métodos. Se analizaron 38 cepas de *C. perfringens* obtenidas de suelos costarricenses para demostrar si los sobrenadantes de cultivo inhibían el crecimiento de *C. botulinum* A (ATCC 19399). Además, se realizaron cultivos mixtos de *C. botulinum* y *C. perfringens* para evaluar si se impedía el crecimiento y la producción de toxina botulínica.

Resultados. El 58% de las cepas de *C. perfringens* tuvo efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *C. botulinum*; al menos dos cepas inhibían totalmente el efecto de la toxina botulínica en los cultivos mixtos aún cuando se demostró la presencia de células viables de *C. botulinum*. El número mínimo de células de *C. perfringens* necesarias para lograr lo anterior fue de 10^8 células.

Conclusión. Es posible que la presencia de *C. perfringens* limite el aislamiento o demostración de *C. botulinum* en suelos costarricenses. Se requiere investigar si las cepas nativas de *C. perfringens* tienen efecto sobre otras cepas y otros grupos de *C. botulinum*.

(Rev Biomed 1999; 10:209-215)

Palabras clave: *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, microorganismos del

Solicitud de sobretiros: Evelyn Rodríguez-Cavallini. Lab. de Investigación en Bacteriología Anaerobia y Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, Costa Rica, América Central. Tel.: 506-207-4364 Fax: 506-225-2374

E-mail : evelynr@cariari.ucr.ac.cr.

Recibido el 26/Marzo/1999. Aceptado para publicación el 29/Junio/1999.

Este artículo esta disponible en <http://www.uady.mx/~biomedic/rb991043.pdf>

Vol. 10/No. 4/Octubre-Diciembre, 1999

suelo, botulismo, inhibición bacteriana.

SUMMARY.

Inhibitory effect of *Clostridium perfringens* on *C. botulinum* in soil samples.

Introduction. The frequency of isolation of *Clostridium botulinum* in Costa Rica, as well as in other countries is low; at the same time, *C. perfringens* is the most common pathogenic species in nature. Because it has been described that *C. perfringens* is able to inhibit the growth of *C. botulinum* and the production of botulinum toxin, we decided to research on the effect that strains of *C. perfringens* isolated from Costa Rican soils could have on the growth and toxin production of a strain of *C. botulinum*.

Procedure. Thirty-nine supernatants of strains of *C. perfringens* from Costa Rican soils were tested for inhibition over the growth of *C. botulinum* A (ATCC19399). Also, mixed cultures of *C. botulinum* and *C. perfringens* were performed to evaluate for prevention of growth and toxin production.

Results. Fifty-eight percent of the strains of *C. perfringens* showed an inhibitory effect on the growth of *C. botulinum*; at least two strains completely inhibited the synthesis or the effect of botulinum toxin in the mixed cultures, even though *C. botulinum* cells were isolated. The minimum number of necessary *C. perfringens* cells to achieve this phenomenon was 10^8 .

Conclusion. It is possible that the presence of *C. perfringens* interferes with the isolation and confirmation of *C. botulinum* in Costa Rican soils. It is still necessary to research more on the effects of native *C. perfringens* over other groups and strains of *C. botulinum*.

(*Rev Biomed* 1999; 10:209-215)

Key words: *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, soil microorganisms, botulism, bacterial inhibition.

INTRODUCCIÓN.

Clostridium botulinum es un bacilo gram positivo, anaerobio, formador de esporas. Tiene distribución mundial y se encuentra en suelos, sedimentos y en el intestino de animales vertebrados e insectos (1). Bajo condiciones adecuadas *C. botulinum* produce una neurotoxina muy potente que actúa a nivel de las sinapsis nerviosas, originando una enfermedad neuroparalítica de evolución muy rápida conocida como botulismo (2-4), siendo el tipo clásico el más frecuente. En estos casos la toxina se ingiere usualmente a partir de alimentos enlatados contaminados, sin tratamiento térmico adecuado, en los cuales el *C. botulinum* pudo crecer y formar la toxina. Debido a la severidad del cuadro y a que mucha gente se podría exponer si aparece un lote de alimento contaminado, el botulismo mantiene gran importancia epidemiológica a nivel mundial (5). La distribución geográfica de *C. botulinum* se estudia analizando muestras de suelos y buscando en ellas la producción de toxina botulínica después de incubar anaeróticamente (6,7).

En Costa Rica, no se ha encontrado *C. botulinum* en muestras recolectadas en la Meseta Central (8), pero sí se ha aislado a partir de tres muestras de suelo de las Zonas Atlántica y Pacífico Norte (6,9). Por otra parte, *C. perfringens* es la especie de clostridios toxigénica más frecuente en suelos de la Meseta Central de Costa Rica (8) y está descrita como la especie toxigénica más abundante en la naturaleza (10).

En un experimento clásico, Smith (11) demostró que algunas cepas de *C. perfringens* aisladas del suelo, mostraban un efecto inhibitorio sobre cepas de *C. botulinum*. Este efecto podría deberse a la producción de bacteriocinas por parte de *C. perfringens*, lo que impediría el aislamiento y la producción de la toxina botulínica a partir de muestras de suelo con esporas de *C. botulinum* (12,13). Por lo tanto, el hecho de que no se aísle *C. botulinum* del suelo no puede ser considerado una prueba de su ausencia, sino que es necesario demostrar que no hay microorganismos inhibidores

Efecto inhibitorio de Clostridium perfringens sobre C. botulinum.

en la muestra (11).

En este trabajo se pretende establecer si las cepas de *C. perfringens* aisladas de suelos de Costa Rica tienen efecto inhibitorio sobre el crecimiento o la producción de toxina de *Clostridium botulinum*, esto como un posible elemento que ayude en la explicación de la baja frecuencia en el aislamiento de *C. botulinum* en suelos costarricenses.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Se analizaron 38 cepas, identificadas bioquímica y cromatográficamente como *C. perfringens* por el Laboratorio de Investigación en Bacteriología Anaerobia de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica, obtenidas a partir de muestras de suelos costarricenses. Se utilizó además la cepa *C. botulinum* A, ATCC 19399, productora de grandes cantidades de toxina botulínica.

Inhibición del crecimiento de *C. botulinum* A por sobrenadantes de cultivos de *C. perfringens*.

Se cultivó las cepas de *C. perfringens* en caldo infusión cerebro corazón más glucosa (BHI) prerreducido, durante por 24 horas a 45°C (14) y se centrifugó por 10 minutos a 10 000 rpm para obtener los sobrenadantes. A cada sobrenadante se le midió el pH y se mantuvo a 4°C hasta utilizarlo, antes de 24 horas.

La cepa de *C. botulinum* se inoculó en medio de carne cocida, chopped meat (CM), prerreducido (14). Se tomó 0,1 mL del cultivo y se esparció sobre la superficie de placas de agar infusión cerebro corazón. Se dejó adsorber por 10 minutos y sobre la superficie de cada plato se colocaron cinco discos de papel filtro de 1,27 cm de diámetro. Los discos se impregnaron con alícuotas de 75 mL de cada uno de los sobrenadantes de cultivos de *C. perfringens*. Las placas así preparadas se incubaron 24 horas a 35°C en jarra de anaerobiosis; posteriormente se removieron los discos y se midió el diámetro del

halo de inhibición.

Preparación y cuantificación de la suspensión de esporas de *C. botulinum*.

Se preparó una suspensión de esporas de *C. botulinum* A de la siguiente manera: se sembró la bacteria en medio BHI y se incubó por 7 días a 35°C. El cultivo se centrifugó a 2 500 rpm durante 20 minutos, el sedimento se lavó dos veces con agua destilada estéril (ADE) y se resuspendió en 2 mL de ADE. Este preparado se cuantificó según lo siguiente: se tomó 0,5 mL de la suspensión, se calentó en baño a 80°C durante 10 minutos para eliminar las células vegetativas y provocar la germinación de las esporas (10), se enfrió en baño de agua fría y se le añadió 4,5 mL de ADE. Se hicieron diluciones decimales, desde 10^{-1} hasta 10^{-5} y se sembró, por esparcimiento, 0,1 ml de cada una de las diluciones en platos de agar tripticasa soya, por duplicado. Las placas se incubaron 48 horas a 35°C en anaerobiosis y se realizó el recuento de colonias, procedimiento que se repitió a los 2 y a los 8 días de preparada la suspensión inicial. Se preparó una suspensión madre de 10^5 esporas/mL y se mantuvo a 2-8°C, temperatura a la que se ha demostrado su estabilidad, por lo menos por 10 meses (11).

Evaluación de la toxigenicidad de *C. botulinum* A y *C. perfringens*.

Se inocularon tubos de CM glucosa prerreducido con 10 , 10^2 y 10^3 esporas de *C. botulinum* y se incubaron por 24 horas a 35°C, en anaerobiosis. Se centrifugaron a 10 000 rpm durante 10 minutos y se obtuvieron los sobrenadantes. Se inocularon por duplicado ratones blancos suizos de 15-25g, con 0,1 mL del sobrenadante de cada uno de los cultivos anteriores siguiendo la metodología para detección y neutralización de toxina con antisuero polivalente y específico anti toxina botulínica A descrita por Dowell y Haukins (7). Se observaron los ratones hasta por cuatro días para determinar síntomas de botulismo y muerte (7).

Se escogieron las cinco cepas de *C. per-*

M Monge-Izaguirre, E Rodríguez-Cavallini.

fringens que mostraron mayor inhibición del crecimiento sobre *C. botulinum* y se les determinó su toxigenicidad en ratones. Para ello las cepas se inocularon en caldo CM glucosa prerreducido, se incubaron a 35°C durante 24 horas y se obtuvieron los sobrenadantes. Las pruebas de toxigenicidad en ratón se realizaron tal y como se describió antes; esto con el fin de seleccionar cepas no toxigénicas y evitar interferencias en las evaluaciones posteriores.

Inhibición de la producción de toxina botulínica en cultivos mixtos.

Se utilizaron cuatro cepas de *C. perfringens* que inhibían el crecimiento de *C. botulinum* y que no mostraron toxigenicidad en ratón. Se rayaron en Agar Sangre (AS) y se incubaron en anaerobiosis por 48 horas a 45°C, temperatura óptima de *C. perfringens* (10). Se prepararon suspensiones a partir de las colonias que crecieron en el AS y se estandarizaron según el tubo 5 de McFarland a $1,5 \times 10^9$ células/mL (15). A partir de estas suspensiones, se inocularon tubos de CM glucosa con 10^8 células de cada una de las cepas seleccionadas. A cada uno de los cuatro tubos se le agregó 10 esporas de *C. botulinum*, pues previamente se determinó que son suficientes para producir sobrenadantes tóxicos para ratón; se inoculó además un tubo con 10 esporas de *C. botulinum* únicamente. Todos los tubos se incubaron 24 horas a 35°C, se centrifugaron por 10 minutos a 10 000 rpm y se prepararon diluciones 1:5, 1:10 y 1:20 de cada uno de los sobrenadantes. Todas las diluciones, al igual que los sobrenadantes sin diluir se inocularon en ratones de acuerdo a la técnica descrita anteriormente (7).

Efecto de la variación en el número de células de *C. perfringens* sobre la producción de toxina botulínica, en cultivos mixtos.

Se preparó una suspensión de *C. perfringens* de 10^9 células/mL, de acuerdo al procedimiento anterior. Se inocularon por duplicado tubos de CM glucosa con 10^8 , 10^7 , 10^6 ,

10^5 , 10^4 , 10^3 células de *C. perfringens*. A cada uno de estos tubos se le agregó 10 esporas de *C. botulinum* y se incubaron por 24 horas a 35°C. Se ensayó la producción de toxina botulínica y su neutralización con antisuero específico tal y como se describió anteriormente (7). También de cada tubo se sembró una placa de agar yema de huevo (AYH), para evidenciar si había crecimiento de ambas especies. Esto por cuanto las colonias en dicho medio son claramente distinguibles: *C. botulinum* es lecitinasa negativo y lipasa positivo y *C. perfringens* es lecitinasa positivo y lipasa negativo (10).

RESULTADOS.

De las 38 cepas de *C. perfringens* analizadas, 22 (58%) mostraron sobrenadantes con algún tipo de inhibición, ya fuera únicamente debajo del disco (13 mm) o más allá de este (cuadro 1). Para los estudios posteriores se seleccionaron las cinco cepas que presentaron mayor halo de inhibición (números 10, 17, 18, 20 y 28), para evaluar su toxigenicidad en ratón. Esto es necesario para establecer en los análisis posteriores, que la muerte del ratón se debe exclusivamente a la toxina botulínica y no a una toxigenicidad de *C. perfringens*; debido a que la cepa 10 fue tóxica, en los análisis siguientes sólo se usaron las cuatro cepas restantes. En este estudio la inhibición de los sobrenadantes de *C. perfringens* sobre *C. botulinum* no parece estar relacionada con el pH, pues no hay diferencias significativas entre los valores de pH de los sobrenadantes que inhibieron el crecimiento (promedio 4,99) y los que no inhibieron (promedio 5,18) (cuadro 1). Se determinó que el sobrenadante que demostró mayor inhibición (15mm), tuvo un pH de 4,6; mientras que varios sobrenadantes que no mostraron ninguna inhibición tuvieron un pH muy similar (cuadro 1).

La alta capacidad toxigénica de la cepa de *C. botulinum* A quedó demostrada, pues presentó toxigenicidad, independientemente del número de esporas inoculadas. La prueba en ratón fue posi-

Efecto inhibitorio de *Clostridium perfringens* sobre *C. botulinum*.

va, al inocular los sobrenadantes de los cultivos con 10^3 , 10^2 y 10 esporas, aún cuando fueron incubados únicamente 24 hrs. Además se observó que la toxina sólo podía ser neutralizada por el antisuero correspondiente si se diluía el sobrenadante 1:10, como mínimo.

En el cuadro 2 se muestran los resultados obtenidos con los sobrenadantes de cultivos mixtos de *C. botulinum*. A pesar de la gran cantidad de toxina que produce el *C. botulinum* utilizado, las cepas de *C. perfringens* 17 y 18 inhibieron completamente el efecto de la toxina botulínica, puesto que los ratones inyectados con los sobrenadantes de dichos cultivos mixtos no murieron. Las cepas 20 y 28 lograron una disminución en el título de toxina botulínica. Se observó que los sobrenadantes de los cultivos mixtos diluidos 1/5 ya no fueron lo suficientemente tóxicos, mientras que el sobrenadante de *C. botulinum* solo, mantuvo la

toxicidad aunque se diluyera 1:20 (cuadro 2)

Cuando se inoculó el sedimento de los cultivos mixtos en las placas de AYH, se pudo demostrar claramente el crecimiento de ambas especies. Aunque con la mezcla de la cepa 18 se logró aislar tanto *C. botulinum* como *C. perfringens*, de alguna forma, la presencia de este último impidió la producción de toxina, puesto que el sobrenadante perdió toda toxicidad. Con el sedimento mixto de la cepa de *C. perfringens* 17 y *C. botulinum*, fue posible recuperar únicamente a *C. perfringens*, por lo que se concluye que este caso inhibió completamente el crecimiento de *C. botulinum*.

DISCUSIÓN.

Aunque desconocemos la naturaleza exacta de la inhibición, este fenómeno se podría explicar por la presencia en el cultivo, de productos

Cuadro 1
Inhibición de *C. botulinum* A por sobrenadantes de *C. perfringens* y valores de pH de los sobrenadantes.

Cepa	pH	Halo de Inhibición (mm)	Cepa	pH	Halo de Inhibición (mm)
1	5,5	0	20	4,7	15
2	5,6	0	21	4,7	13
3	5,4	13	22	4,7	0
4	6,0	0	23	4,9	0
5	5,9	13	24	4,5	0
6	5,9	0	25	4,7	0
7	5,0	0	26	5,3	0
8	5,5	0	27	4,6	13
9	5,5	0	28	4,8	14
10	4,7	14	29	4,5	0
11	5,0	13	30	4,7	13
12	4,7	0	31	5,7	13
13	5,5	0	32	4,7	13
14	4,7	13	33	4,8	13
15	6,7	13	34	4,9	13
16	5,7	13	35	5,0	0
17	4,6	15	36	4,7	14
18	4,6	14	37	4,6	13
19	4,6	13	38	4,9	13

Cuadro 2
Toxicidad en ratones de los sobrenadantes de cultivos mixtos de *C. perfringens* y *C. botulinum*.

Mezcla	Toxicidad (+/-) en cada dilución			
	1/1	1/5	1/10	1/20
<i>C. bot</i> + <i>C. per</i> -18	-	-	-	-
<i>C. bot</i> + <i>C. per</i> -20	+	-	-	-
<i>C. bot</i> + <i>C. per</i> -17	-	-	-	-
<i>C. bot</i> + <i>C. per</i> -28	+	-	-	-
<i>C. botulinum</i>	+	+	+	+

metabólicos de carácter proteico o no, propios de cada cepa y que inhiben en algunos casos el crecimiento y en otros la producción o el efecto de la toxina. Es necesario caracterizar este tipo de relación antagonica y esclarecer el mecanismo por el cual opera.

En una investigación previa Smith (11) logró demostrar la presencia de microorganismos inhibidores de *C. botulinum* en 8 de 31 muestras de suelo, cinco de las cuales eran atribuibles a *C. perfringens*. Se conoce que *C. perfringens* produce sustancias inhibidoras, de las cuales ya han sido caracterizadas siete tipos y 50 subtipos distintos de bacteriocinas (13, 16). También podría ser que la inhibición no se deba a la producción de bacteriocinas sino a otros factores, como presencia de fagos, productos metabólicos (amonio, ácido láctico, ácidos grasos libres), enzimas bacteriolíticas y antibióticos (13).

Las técnicas para demostrar la presencia de *C. botulinum*, incluyen la demostración de toxina botulínica en cultivos. Esta metodología es muy sensible cuando se pretende recobrar pocas células de esta bacteria. Sin embargo, si en la muestra se encuentran células de *C. perfringens*, tal y como se demostró en este estudio, es posible que se disminuya la producción de toxina hasta niveles indetectables. Por lo tanto, no se puede probar la ausencia de *C. botulinum* en muestras de suelo, que pudieran contener organismos inhibidores (11). En uno de los trabajos realizados en nuestro país,

se logró demostrar toxina botulínica en siete de 30 muestras de suelo analizadas; no obstante, sólo se pudo aislar *C. botulinum* en tres de ellas. Es posible que la presencia de bacterias inhibidoras, entre ellas *C. perfringens*, tenga como consecuencia que se mantengan números bajos de *C. botulinum*, por lo que no se logra su aislamiento aunque se detecte la toxina (9). Tampoco se puede descartar la presencia de *C. botulinum* en las muestras donde no se detecte toxina, debido a la posible presencia de cepas de *C. perfringens* con capacidad inhibidora, de la producción o del efecto de la toxina como se logró demostrar en esta investigación.

Para lograr la inhibición completa del efecto de la toxina botulínica o del crecimiento de *C. botulinum* fue necesario utilizar 10^8 células de *C. perfringens*. En la naturaleza, es posible que este número sea menor si las cepas nativas de *C. botulinum* no son tan tóxicas como la utilizada en este estudio. Sería deseable además, investigar si las cepas de *C. perfringens* tienen efecto sobre otros grupos de *C. botulinum*.

Los resultados de este trabajo permiten concluir que es posible que la presencia de *C. perfringens* limite el aislamiento y la demostración de *C. botulinum* en suelos costarricenses.

REFERENCIAS.

1. Brooks F, Butel S, Ornston L. Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 15ª ed. México: Manual Moderno; 1996. p. 205-14.
2. Scully R (ed). Case Records of the Massachusetts General Hospital. A 58-year-old woman with multiple cranial neuropathies, case 22-1997. New Engl J Med 1997; 337: 184-90.
3. Centers for Disease Control and Prevention. Foodborne Botulism-Oklahoma, 1994. JAMA 1995; 273: 1167.
4. Glatman FA. Infant botulism. Pediatrics Rev 1996; 17:185-6.
5. Shapiro RL, Hatheway C, Becher J, Swerdlow D. Botulism surveillance and emergency response. A public health strategy for a global challenge. JAMA 1997; 278:433-5.

Efecto inhibitorio de Clostridium perfringens sobre C. botulinum.

6. Gamboa MM, Rodríguez E, Fernández B. Primer aislamiento de *Clostridium botulinum* en Costa Rica. Rev Biol Trop 1993; 41:285-6.
7. Dowell VR Jr, Hawkins TM. Laboratory methods in anaerobic bacteriology, CDC Laboratory Manual, Department of Health and Human Services, HHS pub. N° 81-872, CDC, Atlanta; 1981. p. 96.
8. Rodríguez E, Gamboa MM, Fernández B. Clostridios mesófilos en suelos de la Meseta Central de Costa Rica. Rev Biol Trop 1993; 41:365-9.
9. Gamboa MM, Rodríguez E, Fernández B. *Clostridium botulinum* en suelos de Costa Rica. Rev Biol Trop 1993; 41:359-63.
10. Cato EP, George W, Finegold SM. Genus *Clostridium* Praznowski 1980. En Sneath PHA (ed) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2 Baltimore: Williams and Wilkins; 1986. p. 1120-41.
11. Smith L DS. Inhibition of *Clostridium botulinum* by Strains of *Clostridium perfringens* Isolated from Soil. Appl Microbiol 1975; 30:319-23.
12. Rood JI, Cole ST. Molecular Genetics and Pathogenesis of *Clostridium perfringens*. Microbiol Rev 1991; 55: 621-48.
13. Tagg JR, Dajani AS, Wannamaker LW. Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. Bacteriol Rev 1976; 40: 722-56.
14. Holdeman LV, Cato EP, Moore WEC (ed). Anaerobe Laboratory Manual. 4ª ed. Blacksburg :Virginia Polytechnic Institute and State University; 1977. p. 152.
15. Rodríguez E, Hernández F, Gamboa MM, García JD, Fernández B. Microbiología Básica y Aplicada Manual de Laboratorio. 5ª ed. San José: Universidad de Costa Rica; 1995. p. 191.
16. Mahony DE. Bacteriocin Susceptibility of *Clostridium perfringens*: a Provisional Typing Schema. Appl Microbiol 1974; 28:172-6.