

Pertenece a UME
Unidad de Microscopía Electrónica
Universidad de Costa Rica

Clostridium botulinum en suelos de Costa Rica

María del Mar Gamboa, Evelyn Rodríguez y Bernal Fernández
Laboratorio de Anaerobios, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, Costa Rica.

(Rec. 18-III-1993. Acep. 22-VII-1993)

Abstract: Thirty soil samples from the Pacific Dry Forest, the Caribbean lowlands and the Central Plateau of Costa Rica yielded seven cases with botulin toxins. Of these, five were type C, one A and one B. Type C samples were from the Dry Pacific coastal area, others from the Caribbean lowlands. *C. botulinum* was isolated from three out of seven positive soil samples. The main reason for the poor recovery of *C. botulinum* from toxigenic samples is attributable to a low concentration of spores in the samples, because the toxin detection method required ten bacterial spores. An association was found between the presence of *C. botulinum* and low contents of organic matter ($p < 0.05$), but not with pH or soil type ($p > 0.05$).

Key words: *Clostridium botulinum*, soil microorganisms, toxin, Costa Rica.

C. botulinum es la bacteria responsable del botulismo, enfermedad neuroparalítica causada por sus neurotoxinas. Incluye un conglomerado de organismos con características de cultivo diferentes, capaces de producir siete tipos antigénicos de toxinas (A, B, C, D, E, F y G) de acción farmacológica similar (Cato *et al.* 1986). Se encuentra en suelos, en ambientes acuáticos y en el contenido intestinal de aves y mamíferos (Smith y Williams 1984, Cato *et al.* 1986).

Se desconoce su distribución geográfica completa, pues existen algunas áreas que no han sido estudiadas. En Centroamérica no se han realizado investigaciones al respecto, probablemente debido a que no se ha informado de casos de botulismo (Smith y Williams 1984). En Suramérica se han aislado de suelos los tipos A, B, F y G y el subtipo A_f (Cato *et al.* 1986). En camarones, peces, sedimentos y aguas litorales de Latinoamérica se han demostrado los tipos A, B, C, E y F (Carroll *et al.* 1966, Ward *et al.* 1967).

En las regiones tropicales se han realizado pocos estudios en busca de esta bacteria. No

obstante, en la mayoría de las regiones geográficas donde se ha buscado, ha sido posible demostrarla. Hasta la fecha, en Costa Rica se ha aislado una única cepa de *C. botulinum* tipo A,B,F (proteolítico) de una muestra de suelo de Guanacaste (Gamboa *et al.* 1993).

Este trabajo pretende determinar la presencia de *C. botulinum* en los suelos de Costa Rica y su posible asociación con el pH, el contenido de materia orgánica y el tipo de suelo.

MATERIAL Y METODOS

Se escogieron 30 muestras de suelo de las regiones del Atlántico, Pacífico Seco y Meseta Central de Costa Rica, empleando como base los Mapas de Asociaciones de Subgrupos de Suelos de Costa Rica (Pérez *et al.* 1978) (Cuadro 1).

La toma y homogeneización de la muestra se hizo de acuerdo con la metodología descrita en trabajos anteriores (Rodríguez *et al.* 1991, Gamboa *et al.* 1993).

Las determinaciones de pH y contenido de materia orgánica se hicieron según las técnicas

descritas en "Metodología para análisis de suelos, plantas y aguas" (Schweizer *et al.* 1980).

Para la demostración de la toxina botulínica, se inocularon 10 tubos de medio Carne Cocida Glucosa (CCG) prerreducidos, "Virginia Polytechnic Institute" (VPI, Holdeman *et al.* 1977), cada uno con 1 g de tierra (Smith 1978), dos de los cuales se sometieron a 80°C por 10 min. Todos los tubos se incubaron a 30°C por 7 días y se centrifugaron a 10 000G por 10 min. Los sedimentos se guardaron anaeróbicamente a 4°C y los sobrenadantes se congelaron toda la noche (Bott *et al.* 1968). Una vez descongelados, el sobrenadante de uno de los tubos tratados con calor y el combinado de cuatro sobrenadantes no calentados fueron tripsinizados (110 unidades ATEE/ml, 30 minutos a 37°C; Dowell y Hawkins 1981), los cinco sobrenadantes restantes se trabajaron individualmente, obteniéndose un total de siete sobrenadantes por muestra.

Se inoculó intraperitonealmente con 0.4 ml de sobrenadante cada uno de dos ratones blancos suizos de 15 a 25 g y se observaron diariamente hasta por cuatro días para determinar si presentaban síntomas de botulismo y muerte (Dowell y Hawkins 1981). Siguiendo las recomendaciones del "Center for Disease Control" (CDC, Dowell y Hawkins 1981), se les realizaron pruebas de neutralización a los sobrenadantes toxigénicos empleando antisueros polivalente botulínico y tipo específicos (CDC). Toda muestra de suelo positiva volvió a ser trabajada con el fin de confirmar los resultados.

Para el aislamiento de *C. botulinum* se utilizaron los sedimentos de los sobrenadantes toxigénicos, los cuales se trabajaron siguiendo los métodos descritos en la literatura (Pace *et al.* 1967, Yamakawa *et al.* 1988). Las colonias lipasa positivas que correspondieron a bacilos Gram positivos se identificaron mediante pruebas bioquímicas y cromatográficas de acuerdo con los procedimientos recomendados por el VPI (Holdeman *et al.* 1977) y utilizando el programa de computación "Sistema de identificación biológica para clostridios" (Ureña *et al.* en prep.). Las pruebas de toxigenicidad y neutralización se realizaron siguiendo los procedimientos del CDC.

Se determinó la sensibilidad del método para demostrar la toxina añadiendo 10, 100 y 1000 esporas de *C. botulinum* a tubos de medio CCG que habían sido inoculados con 1 g de tie-

rra negativa por este microorganismo y sometiendo a los mismos procedimientos utilizados con las muestras.

RESULTADOS Y DISCUSION

Se demostró la presencia de toxina botulínica en siete de las 30 tierras trabajadas (Cuadro 1), de las cuales cinco eran del tipo C, una del tipo A y otra del tipo B. Los tipos de toxina de *C. botulinum* presentaron una distribución regional, por cuanto el tipo C se encontró únicamente en localidades de la costa Pacífica cercanas al Golfo de Nicoya, mientras que los tipos A y B se encontraron sólo en la costa Atlántica.

Todas las muestras positivas por toxina C, excepto la de Barranca, provenían de suelos mal drenados con influencia de mareas en regiones costeras (suelo E 6, Cuadro 1). Esto concuerda con estudios previos en los que se ha demostrado *C. botulinum* C asociado con suelos húmedos, cienos o sedimentos (Smith y Williams 1984).

La mayor frecuencia con que se encontró el tipo C está en concordancia con otras investigaciones que demuestran que este tipo predomina en los ambientes tropicales (Carroll *et al.* 1966, Ward *et al.* 1967, Huss 1980).

Aunque se ha señalado la necesidad de dar un tratamiento térmico inicial a los cultivos o tripsinizar los sobrenadantes para demostrar algunos tipos de toxina (Smith y Williams 1984), en este estudio las toxinas A, B y C se pudieron detectar independientemente del tratamiento dado a los cultivos.

Una regresión múltiple demostró una asociación entre un bajo contenido de materia orgánica del suelo y la presencia de *C. botulinum* (U de Mann-Whitney, $p < 0.05$), siendo el valor promedio de las muestras negativas de 5.5 y el de las muestras positivas de 1.7; hallazgo que ha sido informado anteriormente para los tipos A, B y E (Smith 1975, Tsai y Ting 1977, Smith 1978). Su presencia fue independiente del tipo de suelo y del pH (Regresión Múltiple, $p > 0.05$). Los resultados de ambas características del suelo se encuentran en el Cuadro 1.

Se aisló *C. botulinum* en tres de las siete muestras positivas (Chirripó, Pitahaya y Paquera). No se aisló *C. botulinum* en las otras cuatro muestras positivas, probablemente debido a una baja proporción de esporas en dichas muestras (Yamakawa *et al.* 1988), a la pérdida

CUADRO 1

Sitios de muestreo, características de los suelos y resultados por toxina de C. botulinum

Sitios de muestreo	Localización	Tipo de suelo*	pH	% materia orgánica	Tipo de toxina botulínica
San Miguel, Cañas	85°05'W, 10°21'N	A 1	6.8	3.3	-
Chirripó, puente	83°15'W, 10°04'N	E 4	4.8	1.6	A
Jicaral	85°07'W, 09°58'N	E 6	6.2	3.8	C
Pitahaya	84°48'W, 10°00'N	E 6	6.4	2.6	C
Paquera, estero	84°56'W, 09°50'N	E 6	7.9	3.2	C
Mata de Limón	84°42'W, 09°55'N	E 6	6.5	0.0	C
Tamarindo	85°50'W, 10°18'N	E 6	7.2	1.3	-
Puerto Limón	83°03'W, 10°00'N	I 2	7.1	2.0	-
Sabanilla, Montes de Oca	84°02'W, 09°57'N	I 6	3.2	3.2	-
Parque Braulio Carrillo	83°59'W, 10°09'N	I 6	4.9	7.0	-
San Ramón, este, Alajuela	84°28'W, 10°05'N	I 6	5.5	11.5	-
Alajuela, parque	84°13'W, 10°01'N	I 7	4.9	8.9	-
Puente Río Jiménez, 1 Km Oeste	83°44'W, 10°12'N	I 6	6.2	5.1	-
Guápiles	83°47'W, 10°13'N	I 9	4.7	7.2	-
Pacayas	83°49'W, 09°55'N	I 11	5.5	14.9	-
Tapantí, Carretera a Río Macho	83°51'W, 09°47'N	I 14	4.6	9.0	-
Itiquís, Alajuela	84°13'W, 10°47'N	I 17	7.2	3.4	-
Pueblo Nuevo, Camino Ferry Tempis.	85°09'W, 10°13'N	I 19	6.4	2.0	-
Playa Curú	84°55'W, 09°47'N	I 21	6.5	0.6	-
Filadelfia	85°33'W, 10°27'N	I 21	7.2	0.6	-
Barranca	84°45'W, 09°58'N	I 22	6.6	0.0	C
Canjel	85°12'W, 09°58'N	I 22	5.1	3.3	-
Cruce hacia Ferry Tempisque	85°02'W, 10°17'N	I 23	6.4	5.9	-
San Josecito, Alajuelita	84°06'W, 09°54'N	I 26	4.9	1.3	-
Nambí	85°31'W, 10°30'N	I 32	6.6	7.0	-
La Palma, salida Oeste	85°04'W, 10°15'N	M 1	6.3	3.3	-
Parismina, Guácimo	83°38'W, 10°12'N	U 1	3.8	0.6	B
Búfalo	83°11'W, 10°00'N	U 4	4.7	6.4	-
Peñas Blancas, Cachí	83°48'W, 09°48'N	U 4	5.4	12.8	-
Pavones	85°14'W, 10°00'N	V 1	7.4	5.7	-
	Promedio		5.9	4.6	
	Desviación estándar		1.15	3.86	

* Según clasificación de Pérez *et al.* 1978

de toxigenicidad mediada por fagos (Smith y Williams 1984), o a que sólo un bajo porcentaje de las cepas compatibles bioquímicamente con *C. botulinum* son toxigénicas (Pace *et al.* 1967, Yamakawa *et al.* 1988), requisito indispensable para identificarlas como tales (Cato *et al.* 1986).

Cinco de las muestras presentaron una toxigenicidad inespecífica (no reproducible), que consistió en la muerte de los ratones a las pocas horas de inoculados, pero sin síntomas de botulismo. Esto pudo deberse a compuestos derivados del crecimiento bacteriano, a altas concentraciones de sales y ácidos en el medio o al crecimiento de bacterias Gram negativas en el cultivo de enriquecimiento (Segner y Schmidt 1968).

El método de demostración de la toxina empleado permitió detectar la presencia de la bacteria cuando habían al menos diez esporas de *C. botulinum*, sensibilidad similar a la informada anteriormente (Smith 1975).

La frecuencia de *C. botulinum* en las muestras (23.3%) es similar a la de Estados Unidos (23.5%, Smith y Williams 1984) y Canadá (28.5%, Smith y Williams 1984), aunque los porcentajes fluctúan desde un 1.3% en Roma (Creti 1990) hasta un 78% en Taiwan (Yamakawa *et al.* 1988). Estas variaciones pueden ser un reflejo de las diferentes condiciones del suelo o clima, así como de las metodologías empleadas.

A pesar de que la bacteria se encuentra en algunos suelos de Costa Rica, no se han presen-

tado casos de botulismo, probablemente debido a que el uso de conservas no es común, a diferencia de otros países con cambios estacionales marcados. La demostración de *C. botulinum* a partir de muestras de suelo sin que se presenten casos de botulismo ha sido informada en Taiwan por Tsai y Ting (1978) y en Gran Bretaña por Smith y Young (1980) donde no hay casos clínicos desde 1955.

Aunque en este trabajo se emplearon los métodos de aislamiento para *C. botulinum* recomendados en la literatura, no resultaron muy efectivos. Es necesario diseñar nuevos medios y condiciones de cultivo, con el fin de favorecer el crecimiento selectivo de esta bacteria.

La demostración de *C. botulinum* en suelos de Costa Rica amplía el conocimiento de su distribución geográfica mundial y debe constituir una voz de alerta a la industria alimentaria nacional, sobre la importancia de mantener vigentes las normas recomendadas para la conservación de alimentos. También debe llamar la atención del personal médico y paramédico para que estén atentos a la posibilidad de que se presenten casos de botulismo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Pablo Vargas, William Castillo y Oscar Prendas por su ayuda técnica, así como a Charles L. Hatheway (CDC) por el suministro de los sueros antibotulínicos. Este trabajo fue financiado por la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica, proyecto N° 430-88-044.

RESUMEN

Se trabajaron 30 muestras de tierra de las regiones del Pacífico, del Atlántico y de la Meseta Central de Costa Rica, de las cuales siete fueron positivas por toxinas de *C. botulinum*: cinco del tipo C, una del A y otra del B. Las muestras positivas por el tipo C eran de la costa Pacífica, mientras que las de los tipos A y B eran de la región Atlántica. Se aisló *C. botulinum* en tres de las siete muestras toxigénicas; se postula que la principal razón por la que no se aisló en cuatro de ellas fue una baja concentración de esporas, ya que el método de demostración de toxina requirió únicamente diez

esporas. La presencia de *C. botulinum* es independiente del pH y del tipo de suelo ($p > 0.05$) y dependiente de un bajo contenido de materia orgánica ($p < 0.05$)

REFERENCIAS

- Carroll, B.J., E.S. Garrett, G.B. Reese & B.Q. Ward. 1966. Presence of *Clostridium botulinum* in the Gulf of Venezuela and the Gulf of Darien. *Appl. Microbiol.* 14:837-838.
- Cato, E.P., W. George & S.M. Finegold. 1986. Genus *Clostridium* Prazmowski 1880, 23, p. 1141-1200. In P.H.A. Sneath (ed.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 2, Williams and Wilkins, Baltimore.
- Creti, R., L. Fenicia & P. Aureli. 1990. Occurrence of *Clostridium botulinum* in the soil of the vicinity of Rome. *Curr. Microbiol.* 20:317-321.
- Dowell, V.R., Jr. & T.M. Hawkins. 1981. *Laboratory methods in anaerobic bacteriology*, CDC laboratory manual. Department of Health and Human Services, HHS publication no. (CDC) 81-8272. Center for Disease Control, Atlanta. 96 p.
- Gamboa, M.M., E. Rodríguez & B. Fernández. 1993. Primer aislamiento de *Clostridium botulinum* en Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 41: 285-286.
- Holdeman, L.V., E.P. Cato & W.E.C. Moore (ed.). 1977. *Anaerobe laboratory manual*, 4th ed., Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg. 152 p.
- Huss, H.H. 1980. Distribution of *Clostridium botulinum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 39:764-769.
- Pace, P.J., E.R. Krumbiegel, R. Angelotti & H.J. Wisniewski. 1967. Demonstration and isolation of *Clostridium botulinum* types from whitefish chubs collected at fish smoking plants of the Milwaukee area. *Appl. Microbiol.* 15:877-884.
- Pérez, S., A. Alvarado & E. Ramírez. 1978. Mapa de asociaciones de subgrupos de suelos de Costa Rica. Oficina de Planificación Sectorial Agropecuaria, San José, Costa Rica.
- Rodríguez, E., M.M. Gamboa & B. Fernández. 1991. Primer aislamiento de *Clostridium tetani* a partir de suelos de la Meseta Central de Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 39:153-154.
- Schweizer, S., H. Coward & A. Vázquez. 1980. Metodología para análisis de suelos, plantas y aguas. M.A.G. Dirección de Investigaciones Agrícolas, Unidad de Suelos, San José, Costa Rica.
- Segner, W.P. & C.F. Schmidt. 1968. Non specific toxicities in the mouse assay test for botulinum toxin. *Appl. Microbiol.* 16:1105-1109.

- Smith, L.D.S. 1975. Common mesophilic anaerobes, including *Clostridium botulinum* and *C. tetani* in 21 soil specimens. *Appl. Microbiol.* 29:590-594.
- Smith, L.D.S. 1978. The occurrence of *Clostridium botulinum* and *Clostridium tetani* in the soil of the United States. *Health Lab. Sci.* 15:74-80.
- Smith, L.D.S. & B.L. Williams. 1984. The pathogenic anaerobic bacteria. 3rd ed. C.C. Thomas Publisher, Springfield, Illinois. 331 p.
- Smith, G.R. & A.M. Young. 1980. *Clostridium botulinum* in British soil. *J. Hyg. Camb.* 85:271-274.
- Tsai, C. & S. Ting. 1977. Ecological studies of *Clostridium botulinum* in soils of Taiwan. *J. Formos. Med. Assoc.* 76:563-570.
- Ward, B.Q., E.S. Garrett & G.B. Reese. 1967. Further indication of *Clostridium botulinum* in Latin American Waters. *Appl. Microbiol.* 15:1509.
- Wobeser, G., S. Marsden & R.J. MacFarlane. 1987. Occurrence of toxigenic *Clostridium botulinum* type C in the soil of wetlands in Saskatchewan. *J. Wildl. Dis.* 23:67-76.
- Yamakawa, K., S. Kamiya, S. Nishida, K. Yoshimura, H. Yu, D. Lu & S. Nakamura. 1988. Distribution of *Clostridium botulinum* in Japan and in Shinkiang District of China. *Microbiol. Immunol.* 32:579-587.

Pertenece a UME
Unidad de Microscopía Electrónica
Universidad de Costa Rica

Pertenece a UME
Unidad de Microscopía Electrónica
Universidad de Costa Rica