

Pertenece a UME
Unidad de Microorganismos
Universidad de Costa Rica

Clostridios mesófilos en suelos de la Meseta Central de Costa Rica

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

(Rec. 4-III-1993. Acep. 6-VIII-1993)

Abstract: Thirty soil samples from the Central Plateau of Costa Rica yielded 710 isolates of 34 clostridia species. These were *Clostridium lituseburense*, *C. oceanicum* and *C. sardiniense* (100, 73, and 60%, respectively). The toxigenic species of the genus were present in at least one sample, except for *C. botulinum*, *C. chauvoei* and *C. spiroforme*. Diversity per sample (4-12 species) exceeded what has been reported in similar studies. No correlation has been found between the presence of a species and soil characteristics (organic matter, type of soil, pH, precipitation, altitude).

Key words: *Clostridium*, soil microorganisms, clostridia isolation, Costa Rican soil.

El género *Clostridium*, integrado por bacterias Gram positivas, anaerobias y esporuladas, consta de más de 100 especies ampliamente distribuidas en suelos, sedimentos marinos, aguas dulces y cloacales y en el tracto intestinal de humanos y otros vertebrados y en insectos (Allen y Baron 1991, Cato *et al.* 1986).

Las especies de clostridios que se encuentran en el suelo son muy variadas y su diversidad depende tanto de las condiciones del suelo como de la metodología de aislamiento empleada; de ahí que los datos mostrados por varios investigadores difieran entre sí (Matches y Liston 1974, Miwa 1975, Smith 1975a). En este trabajo se ha pretendido determinar la diversidad de especies de *Clostridium* mesófilos en ciertos suelos de Costa Rica y observar si existe relación entre las especies y algunas condiciones ambientales.

MATERIAL Y METODOS

Se tomaron 30 muestras en la Meseta Central, incluyendo 13 tipos de suelo (Pérez, Alvarado y Ramírez 1978). La altitud se tomó de mapas topográficos (Instituto Geográfico Nacional) y la precipitación media anual de mapas del Instituto Meteorológico Nacional (Cuadro 1).

La toma y procesamiento de cada muestra se hizo de acuerdo con metodología ya descrita (Rodríguez *et al.* 1991, Gamboa *et al.* 1993). Esta incluye un tratamiento térmico de 60°C por 10 min seguido de una exposición a alcohol etílico al 47.5%. De cada muestra se obtuvieron entre 25 y 30 aislamientos en cultivo puro, identificándose sólo los que correspondieron a bacilos Gram positivos, anaerobios, catalasa negativos. Cada cepa se caracterizó de acuerdo con los procedimientos bioquímicos y cromatográficos recomendados por el "Virginia Polytechnic Institute", VPI (Holdeman *et al.* 1977) y se identificó mediante un nuevo programa de computación llamado Sistema de Identificación Biológica (Ureña *et al.* en prep.).

Para la confirmación de aquellos clostridios posiblemente toxigénicos se hicieron las pruebas de toxigenicidad y neutralización recomendadas por el "Center for Disease Control", CDC (Dowell y Hawkins 1981), utilizando sueros antibotulínicos (CDC) y antitetánico (Berna).

Las determinaciones de pH y materia orgánica de las muestras de suelo se hicieron de acuerdo con la metodología para análisis de suelos, plantas y aguas de Schweizer *et al.* (1980).

RESULTADOS Y DISCUSION

Se aislaron 710 cepas de clostridios a partir de las 30 muestras de suelo examinadas, de las cuales 699 cepas (98.5%) se identificaron hasta especie. La baja proporción de cepas sin identificar (1.5%), notoriamente disminuida con respecto a otros estudios (Matches y Liston 1974, Miwa 1975, Smith 1975a), se debió probablemente al aumento en el número de especies contempladas en la nueva edición del Manual de Bacteriología Sistemática (Cato *et al.* 1986), que pasó de 63 a 83 especies y al empleo del programa de computación (Ureña *et al.* en prep.).

Se aislaron 34 especies de clostridios en las 30 muestras de suelo (Cuadro 2). La especie más frecuente fue *C. lituseburense*, presente en todas las muestras, seguida por *C. oceanicum* y

C. sardiniense (73% y 60% de las muestras, respectivamente). Ninguna de éstas fue aislada en estudios similares realizados por Smith (1975a), Miwa (1975) y Matches y Liston (1974), aunque ya habían sido descritas al momento de esas investigaciones (Cato *et al.* 1986).

Las especies más frecuentes en suelos (Smith y Williams 1984), así como también las aisladas en Costa Rica previamente (Smith 1975a), estuvieron presentes en las muestras de la Meseta Central, excepto *C. manganotii*, a pesar de que se le ha relacionado con suelos ácidos (Smith 1975a) como los de este estudio.

Todas las especies toxigénicas de *Clostridium* (Hatheway 1990), con excepción de *C. botulinum*, *C. chauvoei* y *C. spiroforme*, estuvieron presentes en al menos una de las muestras.

CUADRO 1

Sitios de muestreo y sus características, Meseta Central, Costa Rica

Nº de muestra	Sitio de recolección	Localización	Tipo de suelo*	Precipitación pluvial (mm)	Altitud (m)
1	Montes del Aguacate	84°26'W, 09°57'N	E5	2000-2500	1100
2	Desamparados, San José	84°04'W, 09°54'N	I5	1500-2000	1150
3	San Pedro, Montes de Oca	84°04'W, 09°56'N	I5	1500-2000	1200
4	Palmita, Zarceró	84°22'W, 10°10'N	I6	2000-2500	1700
5	Naranjo, Centro	84°23'W, 10°07'N	I6	2000-2500	1150
6	Palmira, Zarceró	84°22'W, 10°13'N	I6	2000-2500	2000
7	San Rafael de Heredia	84°06'W, 10°01'N	I6	2000-2500	1300
8	San Pedro de Poás	84°15'W, 10°05'N	I6	2500-3000	1150
9	San Ramón Este, Alajuela	84°28'W, 10°05'N	I6	1500-2000	1050
10	San Ramón Oeste, Alajuela	84°29'W, 10°06'N	I6	2000-2500	1100
11	San Juanillo, Zarceró	84°24'W, 10°09'N	I6	1500-2000	1800
12	Heredia, Entrada S.E.	84°07'W, 09°59'N	I7	1500-2000	1150
13	Ciudad Universitaria, UCR	84°03'W, 09°57'N	I7	1500-2000	1200
14	Sto. Domingo, Salida Tibás	84°05'W, 09°58'N	I7	1500-2000	1150
15	Los Angeles, Heredia	84°06'W, 10°03'N	I11	2500-3000	1500
16	Pacayas, Cartago	83°49'W, 09°55'N	I11	2000-2500	1750
17	Paraíso, Cartago	83°52'W, 09°50'N	I12	1500-2000	1250
18	Río Macho, Cartago	83°51'W, 09°47'N	I14	3000-3500	1300
19	Cartago, Entrada	83°56'W, 09°52'N	I15	<1500	1400
20	Alajuela, Centro	84°13'W, 10°01'N	I17	1500-2000	950
21	Atenas, Salida Oeste	84°24'W, 09°58'N	I17	2000-2500	700
22	Aserri, Centro	84°05'W, 09°52'N	I26	1500-2000	1300
23	Ciudad Colón	84°15'W, 09°56'N	I26	1500-2000	900
24	Escazú	84°09'W, 09°56'N	I26	1500-2000	1100
25	La Legua, Aserri	84°07'W, 09°44'N	I26	2000-2500	1600
26	San Gabriel, Aserri	84°07'W, 09°47'N	I26	2000-2500	1450
27	San Rafael, Arriba Desamp.	84°05'W, 09°53'N	I26	1500-2000	1200
28	Finca Chirubres, Tarbaca	84°06'W, 09°49'N	I30	1500-2000	1800
29	Peñas Blancas, Cachí	83°48'W, 09°48'N	U4	1500-2000	1250
30	Sta. Rosa, Cruce Turrúcares	84°19'W, 09°59'N	V2	2000-2500	750

* Según clasificación de Pérez *et al.* 1978.

CUADRO 2

Especies de clostridios según su frecuencia (#) en
 suelos y muestras positivas (%) para cada especie, Meseta Central, Costa Rica

Especie	#	(%)	Muestras Positivas
<i>C. lituseburens</i>	30	(100)	1-30
<i>C. oceanicum</i>	22	(73)	2-11,13-15,19,21-23,25-30
<i>C. sardiniense</i>	18	(60)	2-6,9-11,13,16-20,23,27-28,30
<i>C. bifermens</i>	16	(53)	1-3,9,11-15,21-25,27,29
<i>C. glycolicum</i>	14	(47)	2,4-5,8-9,12-13,17,21-26
<i>C. sporogenes</i>	13	(43)	2-3,6,8,12,14,17-18,25-29
<i>C. putrificum</i>	12	(40)	2-3,8,10,13-15,22-24,26,28
<i>C. subterminale</i>	12	(40)	1-2,6-9,13,19-20,25,27,30
<i>C. perfringens</i>	11	(37)	2,4-6,9-10,16,19,28-30
<i>C. tertium</i>	10	(33)	8,14,16,18,20,23,24,26,28,30
<i>C. beijerinckii</i>	7	(23)	8-9,11,14,16,29-30
<i>C. baratii</i>	4	(13)	5,16-17,28
<i>C. carnis</i>	4	(13)	4,18-19,25
<i>C. clostridioforme</i>	4	(13)	5,16-17,28
<i>C. durum</i>	4	(13)	17,19,27,29
<i>C. leptum</i>	4	(13)	4,6,10,20
<i>C. limosum</i>	4	(13)	1,4,13-14
<i>C. sordellii</i>	4	(13)	4,6,20,28
<i>C. acetobutylicum</i>	3	(10)	19,28-29
<i>C. butyricum</i>	3	(10)	8,21,30
<i>C. fallax</i>	3	(10)	3,6,21

C. felsineum, *C. hastiforme*, *C. novyi* tipo B, *C. sphenoides* y *C. tetani* se aislaron en dos muestras. *C. celatum*, *C. difficile*, *C. histolyticum*, *C. indolis*, *C. irregulare*, *C. novyi* tipo A, *C. paraputrificum* y *C. septicum* se aislaron en una sola muestra.

C. perfringens, el microorganismo patógeno de mayor distribución en la naturaleza (Cato *et al.* 1986), fue la especie toxigénica más frecuente (37%).

Las cepas de *C. butyricum* y *C. baratii* no fueron toxigénicas, aunque se ha descrito la producción de toxinas botulínicas por parte de algunas cepas de estas especies (Hatheway 1990).

Se encontró *C. novyi* en tres muestras de suelo (Cuadro 2), a diferencia de Nishida y Nakagawara (1964) quienes lo aislaron en todas sus muestras. Debido a que las esporas de *C. novyi* son muy termorresistentes (Smith y Williams 1984) y a que se trabajó con medios prerreducidos (PRAS), probablemente la frecuencia de esta especie en los suelos de la Meseta Central es menor.

Se aisló *C. tetani* (Rodríguez *et al.* 1991) en sólo un 7% de las muestras (Cuadro 2), frecuencia menor a la descrita en otras latitudes

(Sanada y Nishida 1965, Beland y Rossier 1973, Tavares 1975, Smith 1978). Esto posiblemente se debió a que no se utilizó un método específico para *C. tetani*, a que la acidez de nuestros suelos (pH 5.8 en promedio) no le favorece (Wilkins *et al.* 1988) o a que su prevalencia en las zonas estudiadas es menor que en otras áreas geográficas. A pesar de que las pruebas de toxigenicidad y neutralización confirmaron la identificación de las cepas, éstas mostraron algunos cambios con respecto a los patrones bioquímicos descritos (Cato *et al.* 1986, Wilkins *et al.* 1988, Hatheway 1990), pues contrario a lo esperado, la lipasa, la fermentación de glucosa y la hidrólisis de la gelatina fueron positivas; estas dos últimas variaciones ya habían sido informadas en otros estudios (Sanada y Nishida 1965, Smith y Williams 1984).

C. botulinum está en Costa Rica (Gamboa *et al.* 1993), pero no apareció en nuestras 30

muestras. Ya que el método de aislamiento no fue específico para dicha especie, su baja proporción en suelos con respecto a otros clostridios (Smith y Williams 1984), la variabilidad en la termorresistencia de sus esporas (Smith y Williams 1984) y la poca cantidad de toxina que producen algunos tipos en cultivo puro (Ciccarella *et al.* 1977) podrían explicar este hecho. Además se ha informado que cepas de *C. perfringens* y *C. sporogenes*, muy frecuentes en los suelos analizados, inhiben su crecimiento (Smith 1975b).

Ninguna condición del suelo en particular pudo ser asociada con una mayor diversidad de clostridios, ya que los coeficientes de correlación fueron: 0.27 (contenido de materia orgánica), 0.19 (precipitación) y 0.04 (pH). Tampoco pudo establecerse asociación entre la presencia de una especie de clostridios en particular y alguna condición del suelo como pH, contenido de materia orgánica, tipo de suelo, altitud o precipitación. Las características de los sitios de muestreo y de los suelos se encuentran en los Cuadros 1 y 3.

La diversidad de especies de clostridios en las muestras analizadas fue grande, ya que se aisló desde cuatro hasta 12 especies por muestra, con un total de 34 en las 30 muestras. Estos datos demuestran que la biodiversidad descrita en otros ambientes costarricenses, también está presente en los suelos de la Meseta Central.

El alto número de especies aisladas permite considerar que el método de selección de clostridios empleado en esta investigación es satisfactorio. La frecuencia obtenida para algunas especies (*C. perfringens*, *C. butyricum*, *C. baratii*, *C. tetani*, entre otras) podría ser mayor que la descrita en esta investigación, ya que la termorresistencia de sus esporas es variable (Koransky *et al.* 1978, Smith y Williams 1984) y ningún método permitirá el aislamiento de todos los clostridios presentes en una muestra tan compleja como el suelo.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a William Castillo, Oscar Prendas y Pablo Vargas por su ayuda técnica, a Charles Hatheway (CDC) por los antisueros suministrados y a la Vicerrectoría de Investigación (UCR) por el apoyo económico.

CUADRO 3

Materia orgánica, pH y diversidad de especies de clostridios en las muestras de suelo Meseta Central, Costa Rica

Nº de muestra	% materia orgánica	pH	especies diferentes
1	2.6	5.9	4
2	3.8	6.5	9
3	2.8	6.5	8
4	7.8	6.0	10
5	9.5	5.2	8
6	13.5	5.6	9
7	1.7	6.1	4
8	7.0	6.5	9
9	11.5	5.5	8
10	8.1	5.0	6
11	5.3	5.5	5
12	7.2	6.3	4
13	2.7	6.2	8
14	7.2	6.1	9
15	7.8	5.7	5
16	14.9	5.5	8
17	8.3	5.3	7
18	8.9	4.6	5
19	4.1	7.4	7
20	10.3	5.7	8
21	5.3	6.4	6
22	4.3	5.1	5
23	1.5	6.5	9
24	1.5	7.2	5
25	4.5	5.8	9
26	3.3	5.2	7
27	7.2	6.3	7
28	6.5	5.1	12
29	12.8	5.4	10
30	2.0	5.4	8
Media	8.5	6.5	7.3

RESUMEN

A partir de 30 muestras de suelo de la Meseta Central de Costa Rica, se logró aislar 710 cepas de *Clostridium* correspondientes a 34 especies. Las más frecuentes fueron *C. lituseburense* (100%), *C. oceanicum* (73%) y *C. sardiniense* (60%). Todas las especies toxigénicas del género estuvieron presentes en al menos una de las muestras, excepto *C. botulinum*, *C. chauvoei* y *C. spiroforme*. La diversidad de especies encontrada fue de 4-12 especies por muestra. No se encontró relación entre las especies aisladas y el pH, el contenido de materia orgánica, el tipo de suelo, la altitud o la precipitación.

REFERENCIAS

- Allen, S.D. & E.J. Baron. 1991. *Clostridium*, p. 505-521. In Balows, A. (ed.). Manual of Clinical Microbiology, 5th ed. American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Beland, S. & E. Rossier. 1973. Isolement et identification de *Clostridium tetani* dans le sol des cantons de L'Est de la province de Quebec. Can. J. Microbiol. 19:1513-1518.
- Cato, E. P., W. George & S.M. Finegold. 1986. Genus *Clostridium* Prazmowski 1980, p. 1141-1200. In Sneath, P.H.A. (ed.). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Ciccarelli, A.S., D.N. Whaley, L.M. McCroskey, D.F. Giménez, V.R. Dowell, Jr. & C.L. Hatheway. 1977. Cultural and physiological characteristics of *Clostridium botulinum* type G and the susceptibility of certain animals to its toxin. Appl. Environ. Microbiol. 34:843-848.
- Dowell, V.R. Jr. & T.M. Hawkins. 1981. Laboratory methods in anaerobic bacteriology, C.D.C. laboratory manual, Department of Health and Human Services, H.H.S. publication C.D.C. 81-8272. Center for Disease Control, Atlanta. 96p.
- Gamboa, M.M., E. Rodríguez & B. Fernández. 1993. Primer aislamiento de *Clostridium botulinum* en Costa Rica. Rev. Biol. Trop. 41:285-286.
- Hatheway, C.L. 1990. Toxigenic clostridia. Clin. Microbiol. Rev. 3:66-98.
- Holdeman, L.V., E.P. Cato & W.E.C. Moore (ed.). 1977. Anaerobe Laboratory Manual, 4th. ed., Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg. 152p.
- Koransky, J.R., S.D. Allen & V.R. Dowell, Jr. 1978. Use of ethanol for selective isolation of sporeforming microorganisms. Appl. Environ. Microbiol. 35:762-765.
- Matches, J.R. & J. Liston. 1974. Mesophilic clostridia in Puget Sound. Can. J. Microbiol. 20:1-7.
- Miwa, T. 1975. Clostridia in soil of the Antarctica. Japan. J. Med. Sci. Biol. 28:201-213.
- Nishida, S. & G. Nakagawara. 1964. Isolation of toxigenic strains of *Clostridium novyi* from soil. J. Bacteriol. 88:1636-1640.
- Pérez, S., A. Alvarado & E. Ramírez. 1978. Mapas de Asociaciones de Subgrupos de Suelos de Costa Rica. Ministerio de Agricultura y Ganadería, Unidad de Suelos, 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.
- Sanada, I. & S. Nishida. 1965. Isolation of *Clostridium tetani* from soil. J. Bacteriol. 89:626-629.
- Schweizer, S., H. Coward & A. Vázquez. 1980. Metodología para análisis de suelos, plantas y aguas. Ministerio de Agricultura y Ganadería, Unidad de Suelos, San José, Costa Rica.
- Smith, L.D.S. 1975a. Common mesophilic anaerobes, including *Clostridium botulinum* and *C. tetani* in 21 soil specimens. Appl. Microbiol. 29:590-594.
- Smith, L.D.S. 1975b. Inhibition of *Clostridium botulinum* by strains of *C. perfringens* isolated from soil. Appl. Microbiol. 30:319-323.
- 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, Springfield, Illinois. 331p.
- Tavares, W. 1975. Contaminação do solo do estado do Rio de Janeiro pelo *Clostridium tetani*. Bol. Cien. Vital Brasil. 2:9-179.
- Wilkins, C.A., M.B. Richter, W.B. Hobbs, M. Whitcomb, N. Bergh & J. Carstens. 1988. Occurrence of *Clostridium tetani* in soil and horses. S. Afr. Med. J. 73:718-720.