

## ULTRAESTRUCTURA DE LAS ESPORAS DE *CLOSTRIDIUM BOTULINUM B* Y *CLOSTRIDIUM SPOROGENES*

Giuliana Romero \* Francisco Hernández\*\* y Evelyn Rodríguez\*\*

### RESUMEN

Se procesaron y analizaron al microscopio electrónico de transmisión las esporas de *C. botulinum B* y *C. sporogenes*, dos especies bioquímicamente similares. Las esporas de ambas especies son ultraestructuralmente similares, identificándose en ambas un exosporium evidente y un arreglo conspicuo lamelar. Sin embargo, ultraestructuralmente no es posible diferenciar las esporas de esas especies, lo que sí ocurre con otras especies del género. (Rev. Cost. Cienc. Méd. 1995; 16-4:27-31).

**Palabras Clave:** *Clostridium botulinum*, *C. sporogenes*, ultraestructura, esporas.

### INTRODUCCION

El género *Clostridium*, con más de cien especies, está integrado por bacilos rectos, Gram positivos, esporulados, en su mayoría móviles y anaerobios, con un ámbito variado de tolerancia al oxígeno. Algunas especies son productoras de toxinas que las convierten en importantes patógenos para animales, incluyendo humanos (1,2). El aislamiento primario y

las pruebas bioquímicas para la identificación de especies de clostridios, requiere de cultivos en condiciones de anaerobiosis estrictas (3). Además, algunas especies no se pueden identificar bioquímicamente, pues se comportan de manera similar; esto obliga a realizar otras pruebas, por ejemplo, inoculación de ratones para detectar toxigenicidad (4). Este es el caso de *C. botulinum* y *C. sporogenes*, habitantes del suelo, con la diferencia de que la primera produce la toxina botulínica, responsable del botulismo (5).

Las condiciones descritas anteriormente estimulan la búsqueda de características que permitan hacer una diferenciación de estas especies y la ultraestructura de las esporas podría ser una alternativa. Taxonómicamente sólo se han utilizado características muy groseras de las esporas, como su posición en la bacteria, lo que las clasifica como centrales, subterminales o terminales y en cuanto a forma, sólo se menciona si son redondas u ovals (1). Sin embargo, se han descrito variaciones ultraestructurales en algunas especies, como presencia de proyecciones de aspecto tubular encerradas en el exosporium (6), o bien apéndices en forma de cinta (7), de alfiler, tubulares discretos, tubulares hirsutos y plumosos (8).

El objetivo de este estudio fue evaluar ultraestructuralmente las esporas de *C. botulinum B* y *C. sporogenes*, tratando de hallar características ultraestructurales que ayudaran en la diferenciación de ambas especies.

---

\* Unidad de Microscopía Electrónica, Universidad de Costa Rica

Dirección actual: Centro de Microscopía Electrónica, Universidad de San Marcos, Perú.

\*\* Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

\* Autor de correspondencia.

## MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron las cepas de *C. botulinum* B (ATCC 1949) y *C. sporogenes* (ATCC 7955). Para asegurar la pureza del inóculo, ambas cepas fueron rayadas en agar sangre e incubadas a 35°C por 48 horas en anaerobiosis, empleando jarras tipo GasPak con catalizador de paladio y sobre generador de CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>. Luego se hicieron inoculaciones con técnica anaerobia en tubos con caldo peptona-levadura prerreducidos antes de esterilizar ("PRAS") e incubados a 35°C durante 48 horas. También se inocularon en placas de agar yema de huevo y se incubaron en anaerobiosis durante 48 horas.

A partir de ambos medios de cultivo se evaluó el grado de esporulación mediante tinción de Shaeffer y Fulton y se cosechó el crecimiento de los medios con mayor cantidad de esporas libres. Los microorganismos cosechados se lavaron tres veces con solución salina mediante centrifugación (10 min. ca. 3500 g), para eliminar restos del medio de cultivo. El sedimento obtenido se resuspendió en glutaraldehído al 2,5% en amortiguador de fosfatos (pH 7,2) y se dejó en refrigeración por 12 horas. Luego se lavó con amortiguador de fosfatos (pH 7,2) y se dejó en refrigeración por 12 horas. Luego se lavó con amortiguador de fosfatos y se fijó con tetraóxido de osmio durante dos horas. Las bacterias y esporas fijadas se procesaron mediante la técnica de coágulo de plasma (9); el material se deshidrató en una gradiente ascendente de etanol, se embebió en resma Spurr, se seccionó en un ultramicrotomo y se analizó al microscopio electrónico (Hitachi HU-12A y H-7000).

## RESULTADOS

Ambas especies presentan

esporas subterminales esféricas de diámetro mayor al de la célula vegetativa, pues en los estadios iniciales ésta presenta un abultamiento en el sitio de formación de la espora. En las preparaciones de ambas especies se encontraron formas inmaduras similares, caracterizadas por la formación de una estructura de mayor electrodensidad que el citoplasma, rodeada por la pared de la espora altamente electrodensa. En *C. sporogenes* es frecuente, aun en cultivos jóvenes de menos de 48 horas, la presencia de gran cantidad de esporas en diversos grados de maduración, como se aprecia en Figura 1. Por el contrario, *C. botulinum* produce esporas con menos frecuencia, requiriéndose de medios de cultivo que promuevan la esporulación como el agar yema de huevo y durante períodos de incubación mayores de 48 horas (1)

El aspecto global de las esporas de ambas especies es similar, predominando las formas esféricas, en las cuales la pared de la espora (PE) es muy conspicua por su alta electrodensidad. Esta pared usualmente es ondulada y hasta prácticamente poligonal (Figs. 1 a 3). Sin embargo, en *C. sporogenes* se observan esporas esféricas con pared más regular (Fig. 2).

La Figura 2 muestra una espora madura, en la que se señalan las diferentes envolturas: una cubierta compleja en la que es posible reconocer la membrana citoplasmática (MC) y la pared celular (PC) que aparecen recubriendo el nucleóide o centro de la espora, compuesto por una masa cito-plasmática muy condensada y de alta electrodensidad, en la que se observan los ribosomas de aspecto puntiforme. Externamente a la PC aparece una serie de envolturas, que de adentro hacia fuera se denominan: cortex (CX), representado por una zona relativamente gruesa de densidad electrónica intermedia, limitada por la pared de la espora (PE), que

sobresale por su alta electrodensidad; luego hay una zona en la que se aprecia una serie de procesos lamelares (PL), que fueron más evidentes en *C. botulinum* (Fig. 3). Finalmente la envoltura más externa es el exosporium (EX). En la Figura 3 se observa una evoltura adicional, externa al exosporium indicada por flecha, que corresponde a la membrana citoplasmática y la pared celular de la célula vegetativa, pues se trata de una espora madura aún no liberada.

En las esporas de ninguna de las dos especies estudiadas se encontraron apéndices, ni otra característica que pudiese distinguirlas entre sí, pues el aspecto regular de la pared de la espora de *C. sporogenes* no fue una característica constante.

### DISCUSION

Ultraestructuralmente las esporas de *C. botulinum* B y *C. sporogenes* son similares y las diferencias observadas no son concluyentes para emplear esas características en esquemas de diferenciación de especies.

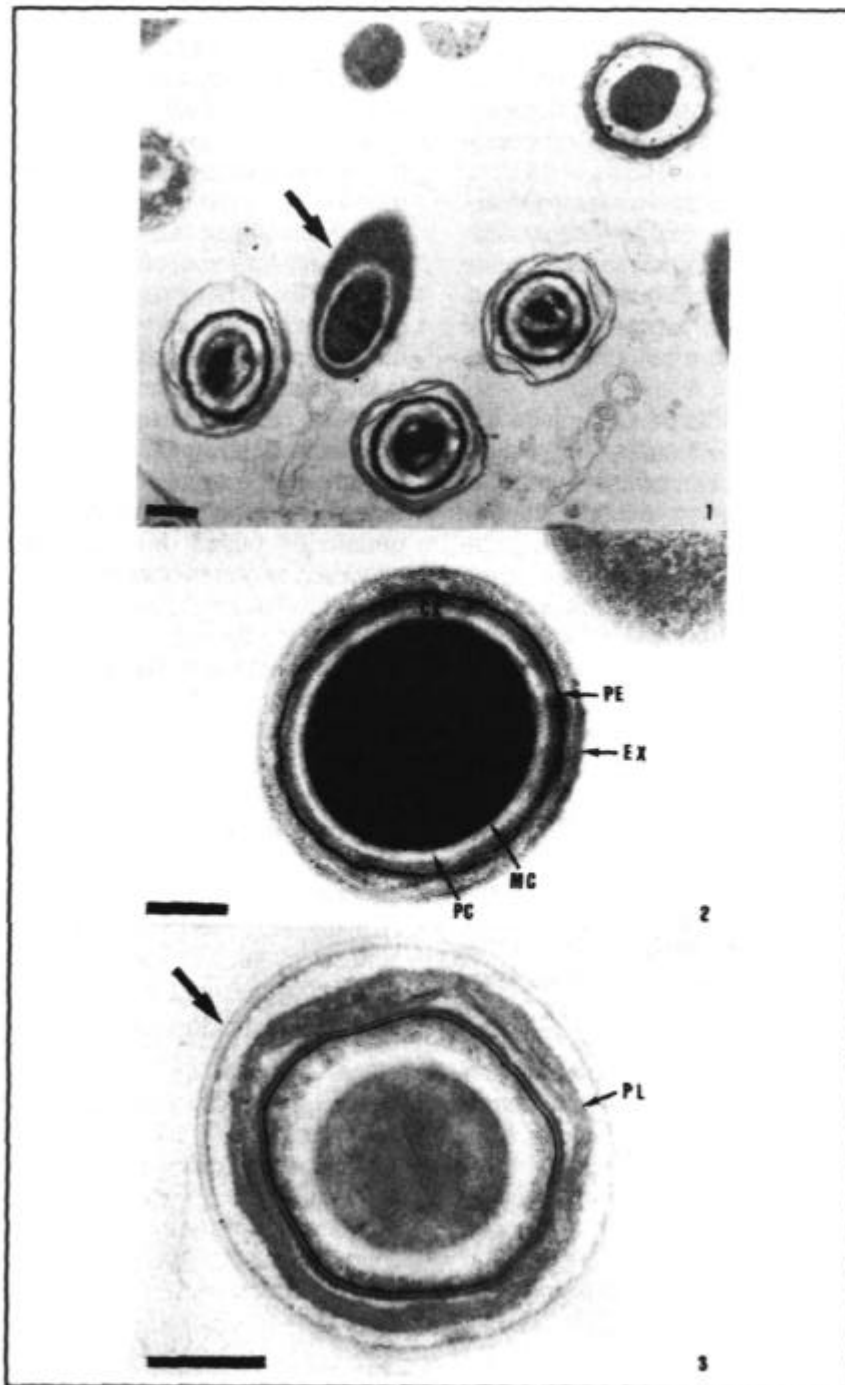
Aunque las esporas de ambas especies son parecidas a las esporas de *Bacillus thuringiensis* (10), en éstas últimas los procesos lamelares sólo se observaron en especímenes tratados con criotécnicas para preservar estructuras

delicadas (10). Por el contrario, en las especies de *Clostridium* analizadas esos procesos lamelares fueron conspicuos, aun con procedimientos de fijación estándar, lo que denota diferencias morfológicas importantes en las esporas de estas bacterias.

Las esporas de algunas especies de *Clostridium* presentan apéndices recubiertos por el exosporium, que en conjunto brindan un aspecto característico que podría emplearse en la identificación de esas especies (6-8). Este tipo de arreglo no aparece en *C. botulinum* B ni en *C. sporogenes*; no obstante, debe seguirse investigando la estructura de las otras especies del género en busca de esquemas que ayuden a su identificación.

### ABSTRACT

Spores of *C. botulinum* B and *C. sporogenes*, two species biochemically similar, were processed and analyzed under transmission electron microscope. The spores of both species were ultrastructurally similar. They showed an evident exosporium and conspicuous lamellar layers. However, the differentiation of both species is not possible based on the ultrastructure of their spores.



**Explicación de la figuras**

Figura 1: Espora de *C. sporogenes* en diferentes estados de maduración. La flecha señala un corte oblicuo de una célula madre con una espora inmadura (Barra = 0,25  $\mu$ m).  
 Figuras 2 y 3: Esporas de *C. Sporogenes* y *C. botulinum* B respectivamente; se aprecian la membrana citoplasmática (MC), pared celular (PC), cortex (CX), pared de la espora (PE), proceso lamelar (PL) y exosporium (EX). Para más detalles ver el texto (Barra = 025  $\mu$ m).

## REFERENCIAS

1. Cato, E. P. ; George, W. L. y Finegold, S. M. Genus *Clostridium* Prazmowski. En: Sneath, P.H.; Mair, N. S.; Sharpe, M. E. y Holt, J.G. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. The William & Wilkins Co. Baltimore, New York. 1986; vol 2:1141-1200.
2. Stephen, D. y Baron, E. J. *Clostridium*. En: Balw, A.; Hausler, Jr.; Herrmann, K. L.; Isenberg, H.D. y Shadomy, H. J. *Manual of clinical microbiology*. 5 ed ASM, Washington, D.C. 1991:505-521.
3. Murray, P.R. y Citron, D.M. General procesing of specimens for anaerobic bacteria. En: Balow, A.; Hausier, Jr W. J.; Herrmann, K.L.; Isenberg, H.D. y Shadomy, H.J. *Manual of clinical micobiology*. 5 es. ASM, Washington, D. C.1991: 488-504.
4. Holdeman, L.V.; Gato, E.P. y Moore, W.E.C. (eds). *Anaerobic Laboratory Manual*, 4th. ed Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg. 1977.152p.
5. Cato, E. P.; Dash, E. D.; Holdeman, L.V. y Moore, W.E.C. Electroforetic estudy of *Clostridium* species. *J. Clin. Microbiol.* 1982; 15:588-702.
6. Pope, L.J.; Filip, C. Smith, L.D. Spore appendages and taxonomy of *Clostridium sordellii*. *J. Bacteriol.* 1971; 108: 1384-1389
7. Rode, L.J.; Crawford, M. A. y Williams, G. *Clostridium* spores with ribbon -like appendages. *J. Bacteriol.* 1967; 93 11660- 1173.
8. Rodi, L.J. y Smith L.D. Taxonomic implications of spore fine structure in *Clostridium bifermentans*. *J. Bacteriol.* 1971; 105:349-354.
9. Hernández, F.; Coto, E.; Colmenares, A. y Moreira, L. Aplicación del método de coágulo da plasma al estudio ultraestructural de especimenes biológicos. *Rev. Biol. Trop.* 1991; 39: 177-180.
10. Ebersod, H. B.; Luthy, P.; Cordier, L. y Muller, M. A. freeze-subtitution and freeze- fracture stuy of bacterial spore structures. *J. Ultraestruc. Res.* 1981; 76:71 -81