

COMPARACIÓN CINÉTICA Y BIOQUÍMICA DE TRES CEPAS DE *Clostridium tetani*, PARA LA PRODUCCIÓN DE TOXINA TETÁNICA

KINETIC AND BIOCHEMICAL COMPARISON BETWEEN THREE STRAINS OF *Clostridium tetani* FOR PRODUCTION OF TETANIC TOXIN

Ivonne del Socorro Gutiérrez-Rojas^{1,3}, Rubén Darío Godoy Silva², José Manuel Granados¹, Raúl Alberto Poutou-Piñales³

¹ Subdirección de Producción, Instituto Nacional de Salud

² Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia, Avenida Cra. 30 N° 45-03, Ciudad Universitaria, Bogotá, Colombia

³ Laboratorio de Biotecnología Aplicada, Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Cra. 7 # 43-82, Bogotá, Colombia
ivonne.gutierrez@javeriana.edu.co

Recibido: 16-01-2008; Aceptado: 14-10-2008;

Resumen

En este estudio se comparó el comportamiento bioquímico y cinético de tres cepas de *Clostridium tetani*, Harvard (Ha), Massachusetts (Ms) y Caracas (Ca); cepas utilizadas comúnmente en la producción del toxoide tetánico. Se realizaron pruebas bioquímicas para la identificación de los microorganismos anaerobios y se desarrollaron cultivos en reactor de 5L, bajo las siguientes condiciones: Medio Latham Mueller "Con" y "Sin" glutamato de sodio; 1% (v/v) de inóculo, pH inicial, 7.1 ± 0.2 (variable), 35°C y 100 r.p.m. Los resultados mostraron características bioquímicas similares entre las tres cepas y la cepa control ATCC 9441. El comportamiento cinético de las cepas Ms y Ha fue similar para todos los parámetros evaluados, obteniéndose mayor productividad en cultivos suplementados con 2.5g/L de glutamato de sodio (Ms: Sin: 625Lf/L.h y Con: 658Lf/L.h; Ha: Sin: 610Lf/L.h y Con: 658Lf/L.h). La cepa Ca, produjo mayor cantidad de biomasa (Ca: 0.5420g/L; Ms: 0.2721g/L y Ha: 0.2009g/L); sin embargo, la productividad de toxina fue menor (Sin: 174Lf/L.h y Con: 417Lf/L.h). Estos resultados descartan la utilización de la cepa Ca para la producción del toxoide, bajo las condiciones de fermentación ensayadas.

Palabras clave: *Clostridium tetani*, fermentación, toxina tetánica.

Abstract

In this study was compared the biochemical and kinetic behavior of three strains of *Clostridium tetani*: Harvard (Ha), Massachusetts (Ms) and Caracas (Ca), strains commonly used for the production of the tetanic toxoid. Biochemical tests for anaerobic microorganisms identification were done and cultures in 5L reactor were developed, under the following conditions: Latham means Mueller "With" and "Without" sodium glutamate; 1% (v/v) of inoculum, initial pH 7.1 ± 0.2 (variable), 35°C and 100 r.p.m. The results showed similar biochemical characteristics between the strains including the ATCC 9441 control. The kinetic behavior of the Ms and Ha strains was similar for all the evaluated parameters, obtaining greater productivity in cultures supplemented with 2.5g/L of sodium glutamate (Ms: Without: 625Lf/L.h and With: 658Lf/L.h; Ha: Without: 610Lf/L.h and With: 658Lf/L.h). The Ca strain, produced greater amount of biomass (Ca: 0.5420g/L; Ms: 0.2721g/L and Ha: 0.2009g/L), nevertheless, its toxin productivity was smaller (Without: 174Lf/L.h and With: 417Lf/L.h). These results discard the use of the Ca strain for the production of the toxoid, under the assayed fermentation conditions.

Key words: *Clostridium tetani*, fermentation, tetanic toxin.

INTRODUCCIÓN

El tétano es una enfermedad infecciosa grave, causada por la bacteria anaerobia *Clostridium tetani*; este microorganismo es ubicuo y las esporas y células vegetativas se encuentran en suelos, agua dulce y salada así como en el tracto intestinal de animales domésticos. *Clostridium tetani* produce una neurotoxina muy potente (tetanoespasmina), que es sintetizada como una cadena polipeptídica simple de 150kDa y fraccionada extracelularmente por proteasas bacterianas en dos cadenas, una pesada de 107kDa y una liviana de 53kDa que permanecen unidas por un puente disulfuro. Esta proteína entra en las células del tejido nervioso del hospedero y bloquean la liberación de neurotransmisores inhibitorios como glicina y ácido gamma-amino butírico; generando parálisis espasmódica, lo que puede llevar a la muerte. La tasa de mortalidad para esta enfermedad oscila entre 20 y 60% en hospederos no inmunizados (Bizzini 1979; Bizzini y Germanier 1984; Reyes y Flores 1986; Kenneth 1997; Demain *et al.*, 2005). La enfermedad es completamente prevenible por vacunación. El uso del toxoide tetánico desde 1923, el cual consiste en toxina tetánica inactivada con formaldehído, ha reducido considerablemente los casos de tétano, especialmente en países industrializados. Sin embargo, el tétano continúa siendo un problema de salud pública en los países en vías de desarrollo, en los cuales la cobertura de vacunación puede ser tan baja como el 20% de la población (Oladiran *et al.*, 2002; Demain *et al.*, 2005). Es por esta razón, que se hace necesario el desarrollo de investigaciones encaminadas a la optimización del proceso de producción de la toxina, de manera que se aumente la productividad del sistema, lo que lleva consecuentemente a una mayor disponibilidad de vacuna para cubrir la demanda y un menor costo de la misma.

Dentro de este contexto, en el presente trabajo se compara el comportamiento cinético, las características bioquímicas y la producción de toxina tetánica de las cepas de *Clostridium tetani*, Harvard y Massachusetts versus la cepa Caracas, las cuales son utilizadas corrientemente para la producción industrial de la toxina. Dichas cepas han sido obtenidas por aislamiento en pacientes infectados y han demostrado ser altamente toxigénicas y estables genéticamente, por lo cual han sido aprobadas por la Organización Mundial de la Salud para uso en la producción industrial del toxoide (WHO 1977). Las cepas más utilizadas son la Harvard, obtenida en 1939 por la División de Laboratorios de Investigación del "New York State Department of Health" y la Massachusetts, obtenida en 1953, en el "Massachusetts Public Health Biologic Laboratories", la cual se diferencia de la primera por la capacidad de crecer en medios sin infusión de cerebro corazón (Reyes y Flores, 1986). Por otro lado se evalúa la

influencia de la adición de glutamato al medio de cultivo sobre el crecimiento y la producción de toxina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas. Se utilizaron las cepas de *Clostridium tetani*: Massachusetts (Ms), Harvard (Ha), Caracas (Ca) y ATCC 9441, suministradas por el Laboratorio de Tétanos del Instituto Nacional de Salud, Bogotá D.C., Colombia. La propagación de las cepas se hizo siguiendo el protocolo de lote semilla; el cual consiste en tres liofilizaciones a partir de una ampollita liofilizada primaria (WHO 1977), se consideró primaria la ampollita suministrada por el Laboratorio. Para cada liofilización se siguió el siguiente procedimiento: El contenido liofilizado de la ampollita fue reconstituido en 1mL de medio tioglicolato® (MERCK) y sembrado en 2 tubos con 30 mL (c/u) del mismo medio. Los tubos fueron incubados a 35°C durante 24 h. Una vez verificada la pureza microbiana, se distribuyó el cultivo en tubos estériles con tapa de rosca (10 mL c/u) y se centrifugó a 2250 g por 30 minutos. El sobrenadante fue descartado y el "pellet" resuspendido 10 mL de leche descremada estéril al 20% (p/v) y distribuido en ampollitas de vidrio para liofilizar (0.2 mL/ampollita). Las ampollitas fueron mantenidas a -70°C durante toda la noche y liofilizadas en el equipo VIRTIS, Modelo 10-145, MR-BA. Los liofilizados se conservaron de 2 a 8°C. Para el control de cada lote de semilla se hicieron las pruebas de pureza microbiana y floculación de Ramón (WHO 1977).

Preparación de la pre-semilla o semilla de reserva. A partir de cada lote semilla se preparó la pre-semilla o semilla de reserva. Ésta se obtuvo reconstituyendo y sembrando en 60 mL de tioglicolato (2 tubos con 30 mL c/u) un liofilizado de cultivo de trabajo; el caldo fue incubado a 35°C por 24 h. Una vez verificada la pureza microbiana, se distribuyó el cultivo en tubos estériles con tapa de rosca de 10x100 mm (3 mL/ tubo) y se congeló a -70°C. De esta manera la cepa, se conservó viable y sin perder sus características de producción por tres meses. Pasado este tiempo fue necesario reconstituir otro liofilizado de cultivo de trabajo siguiendo el mismo procedimiento.

Caracterización bioquímica. Para la caracterización bioquímica se tomó 1 mL del cultivo del tubo pre-semilla, se sembró en 30 mL de medio de tioglicolato y se incubó a 35°C durante 24 horas. Luego se hizo un subcultivo en agar sangre y se incubó a 35°C 24 h en anaerobiosis. A partir de este cultivo se preparó una suspensión en caldo LD (tripticasa soya, 5 g/L; extracto de levadura, 5 g/L; NaCl 2.5g/L; sulfito de sodio, 0.1g/L; L-triptófano, 0.2 g/L; vitamina K₁, 0.01g/L; L-cistina, 0.4g/L y hemina, 0.01g/L).

L), con una turbidez equivalente al tubo número 1 de la escala MacFarland, con ésta se sembraron los siguientes medios, agar-LD (caldo LD y agar 20g/L), agar esculina-LD (agar LD sin sulfito de sodio, esculina 1 g/L y citrato férrico 0.5 g/L), agar bilis-LD (agar LD suplementado con 20 g/L de oxgall (DIFCO) y 1g/L de glucosa), agar ADN-LD (agar LD suplementado con 1.25 g/L de ADN polimerizado y 25 mL/L de solución acuosa 0,25% (v/v) de azul de toluidina O), agar leche-LD (agar LD suplementado con 50 g/L de leche descremada), agar almidón-LD (agar LD suplementado con 5 g/L de almidón soluble), agar yema de huevo-LD (agar LD suplementado con 100 mL/L de suspensión de yema de huevo DIFCO) y agar gelatina-LD (agar LD suplementado con 4g/L de gelatina y 1g/L de glucosa). Las cajas fueron incubadas en anaerobiosis a 37°C durante 48 h (Whaley *et al.*, 1995).

De la misma suspensión se inocularon de 2 a 3 gotas en el fondo de cada uno de los tubos para pruebas bioquímicas (glucosa, manitol, manosa, xilosa, lactosa, arabinosa, ramnosa, sacarosa, indol, y nitratos) y se incubaron en anaerobiosis a 37°C durante 48 h. La preparación y lectura de las reacciones se realizó según se describe en el *Manual de Procedimientos en Microbiología Médica* (INS 1988).

Fermentaciones. Para la preparación del inóculo se sembraron 0.3 mL de pre-semilla en cada uno de tres tubos con tapa de rosca de 50 mL, con 30 mL de medio tioglicolato, se incubaron a 35°C por 24 h (Ballén y Aldana, 1995). Las fermentaciones se realizaron en un biorreactor “New Brunswick”, modelo BIOFLO IIC, se utilizó el medio de cultivo Latham Mueller (NZ-Caseína, 33.3 g/L; CaCl₂, 0.8 g/L; K₂HPO₄, 1.1 g/L; Glucosa, 8.0 g/L; MgSO₄·7H₂O, 0.1 g/L; NaCl, 2.5 g/L; Clorhidrato de Tiamina, 0.00025 g/L; Riboflavina, 0.00025g/L; Piridoxina, 0.00025 g/L; Pantotenato de calcio, 0.001 g/L; Biotina, 2.5x10⁻⁶g/L; Cianocobalamina, 2.5x10⁻⁶g/L; Ácido Nicotínico, 0.00025 g/L; Uracilo, 0.00125 g/L; L-Cistina, 0.125g/L; Glutamato de sodio, 2.5g/L y FeCl₃·6H₂O, 0.032 g/L) suplementado o no con 2.5 g/L de glutamato de sodio. Las condiciones de fermentación fueron las siguientes; volumen efectivo de trabajo, 5L; porcentaje de inóculo, 1% (v/v); pH inicial, 7.1 ± 0.2, (variable), 35°C y 100 r.p.m. Durante las primeras 12 horas de fermentación se tomaron muestras de 30 mL cada dos horas; y posteriormente cada 4 horas, hasta las 76 horas de cultivo; pasado este tiempo se tomaron muestras a intervalos regulares hasta que se estabilizara la producción de toxina (que por lo menos tres muestras consecutivas dieran el mismo título). A cada muestra se le hizo análisis de biomasa, toxina, pH, y glucosa residual.

Técnicas analíticas. La morfología del microorganismo y la pureza microbiana se determinaron al microscopio, por

tinción de Gram. La concentración de biomasa se expresó como peso seco de células totales (vivas y muertas) por unidad de volumen. Para su determinación se empleó una técnica turbidimétrica, utilizando un espectrofotómetro Genesis 5 (Spectronic & Milton Roy) a l_{620nm}, y una curva de calibración de absorbancia vs., peso seco. Para la determinación de glucosa se utilizó el método de antrona (Dreywood, 1946; Kabat y Mayer, 1968). La cantidad de toxina tetánica producida se determinó mediante la prueba de floculación de Ramón y la potencia de la misma determinando la Dosis Letal Mínima en ratones (cepa NIH, peso 18-20g) (WHO 1977).

Análisis estadístico. Para el análisis estadístico de los datos, se usó la herramienta SAS versión 6.12. Para todas las variables de respuesta se hizo un análisis de varianza y se aplicaron las pruebas de Duncan, Tukey y Scheffe para determinar si entre los niveles de cada factor existían diferencias significativas. Se trabajaron dos factores, **Cepa**, con tres niveles: Ms, Ha y Ca y **Glutamato**, con dos niveles: 2.5g/L o 0g/L.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 aparecen los resultados de la caracterización bioquímica de las cepas estudiadas; en las pruebas realizadas por triplicado no se encontraron diferencias. Los resultados obtenidos para la cepa ATCC concuerdan con lo descrito para *Clostridium tetani* en el Manual de Bergey's de 1984 (Holt *et al.*, 1984). Las otras tres cepas estudiadas muestran resultados negativos para todas las características analizadas, excepto para la producción de indol. Sin embargo, la única característica que no correspondió con la descripción de *Clostridium tetani* es la de no hidrolizar la gelatina (Holt *et al.*, 1984). Esta diferencia puede deberse, a que el desarrollo de cepas altamente toxigénicas, para la producción de la toxina tetánica, implica el cultivo y pases sucesivos de las cepas en diversas fuentes de carbono y factores de crecimiento, así como diferentes condiciones de fermentación, lo que puede haber modificado la expresión fenotípica con respecto al momento en que fueron aisladas de los pacientes (Mueller y Miller, 1948; Stone, 1953; Latham *et al.*, 1962).

En el comportamiento cinético en Latham Mueller sin glutamato, no se observó fase de adaptación para las cepas, iniciando directamente la fase de crecimiento exponencial (Ms: t=0h hasta t=48h; Ha: t=0h hasta t=48h y Ca: t=0h hasta t=100h) (Figura 1A), observándose para las tres cepas una pequeña fase de desaceleración (Ms: t=8h hasta t=10h; Ha: t=8h hasta t=10h y Ca: t=28h hasta t=32h); comportamiento que ha sido descrito por otros

TABLA 1. Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a las cepas de *Clostridium tetani*: ATCC 9441, Massachusetts, Harvard y Caracas.

Característica	Cepa ATCC	Massachusetts	Harvard	Caracas
Producción de Indol	+	+	+	+
Producción de H ₂ S	+	-	-	-
Producción de desoxirribonucleasa	+	-	-	-
Producción de catalasa	-	-	-	-
Producción de lecitinas	-	-	-	-
Producción de lipasa	-	-	-	-
Reducción de nitratos	-	-	-	-
Crecimiento en bilis al 20%	-	-	-	-
Hidrólisis del almidón	-	-	-	-
Hidrólisis de la esculina	-	-	-	-
Hidrólisis de la caseína	+	-	-	-
Hidrólisis de la gelatina	+	-	-	-
Fermentación de glucosa	-	-	-	-
Fermentación de maltosa	-	-	-	-
Fermentación de sacarosa	-	-	-	-
Fermentación de galactosa	-	-	-	-
Fermentación de manitol	-	-	-	-
Fermentación de lactosa	-	-	-	-

autores (Quintero *et al.*, 1998; Gutiérrez *et al.*, 2005), debido a lisis parcial por agotamiento de algún nutriente de más fácil asimilación que la glucosa, el cual podría ser glutamato, ácido aspártico, serina, treonina, asparagina o histidina (Clifton, 1942; Pickett, 1943; Andreesen *et al.*, 1989; Porfirio *et al.*, 1997). La producción máxima de biomasa fue encontrada para la cepa Caracas (0.5420 g/L), seguida de la cepa Massachusetts (0.2721 g/L) y por último la cepa Harvard (0.2009 g/L). Sin embargo, el tiempo requerido para la producción de esta biomasa es mucho mayor para la cepa Caracas ($t=100h$) que para las otras dos cepas evaluadas (Ms: $t=48h$ y Ha: $t=48h$), lo que tiene una relación inversa con la velocidad específica de crecimiento (Ca: $0.2120 h^{-1}$; Ha: $0.4793 h^{-1}$ y Ms: $0.6145 h^{-1}$).

El consumo de glucosa (Figura 1B) fue bajo para las cepas Ms y Ha (Ms: 29,6% y Ha: 21,4%), este comportamiento puede explicarse por el fenómeno diáuxico observado, en el cual la glucosa sustenta la segunda fase de crecimiento y no tiene influencia sobre la primera fase. Estos resultados coinciden con los encontrados en 1959 (Martínez y

Sydney, 1959), donde se detectó que la tasa inicial de crecimiento no estaba influenciada por la presencia de glucosa en el medio y que la utilización de glucosa se iniciaba al final de la fase exponencial. Sin embargo, aunque la glucosa no es utilizada como sustrato durante la primera fase de crecimiento, su presencia es necesaria en el medio para el crecimiento del microorganismo de acuerdo con Quintero (Quintero *et al.*, 1998); esta dependencia se debe a que existe una interacción química entre la glucosa y la cistina durante la esterilización del medio en la cual se forma un complejo reductor indispensable para el crecimiento del microorganismo. La cepa Ca presentó aproximadamente el doble del consumo de glucosa (61%), lo que se explica por la producción de biomasa, lo que corresponde casi al doble de la obtenida con las otras dos cepas.

El inicio de la liberación de la toxina al medio coincide con la fase estacionaria de crecimiento, lo que es indicativo de un metabolito secundario (Figura 1C). Este comportamiento coincide con lo reportado por Ozutsumi (Ozutsumi *et al.*, 1985), quienes en los estudios cinéticos de produc-

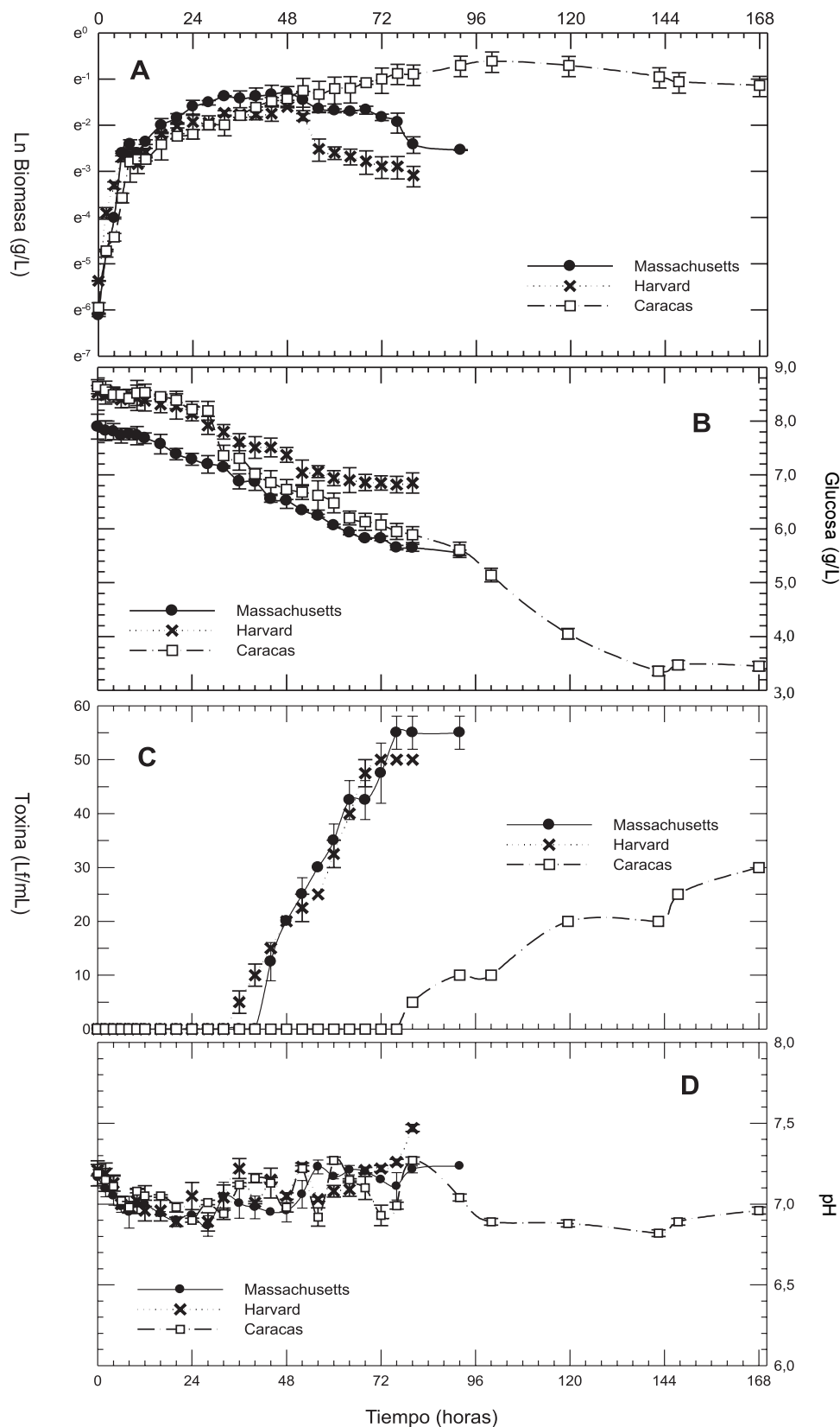


FIGURA 1. Cinética de fermentación *Clostridium tetani*, medio Latham Mueller SIN glutamato. (A) Biomasa (g/L). (B) Glucosa (g/L). (C) Toxina (Lf/mL). (D) pH.

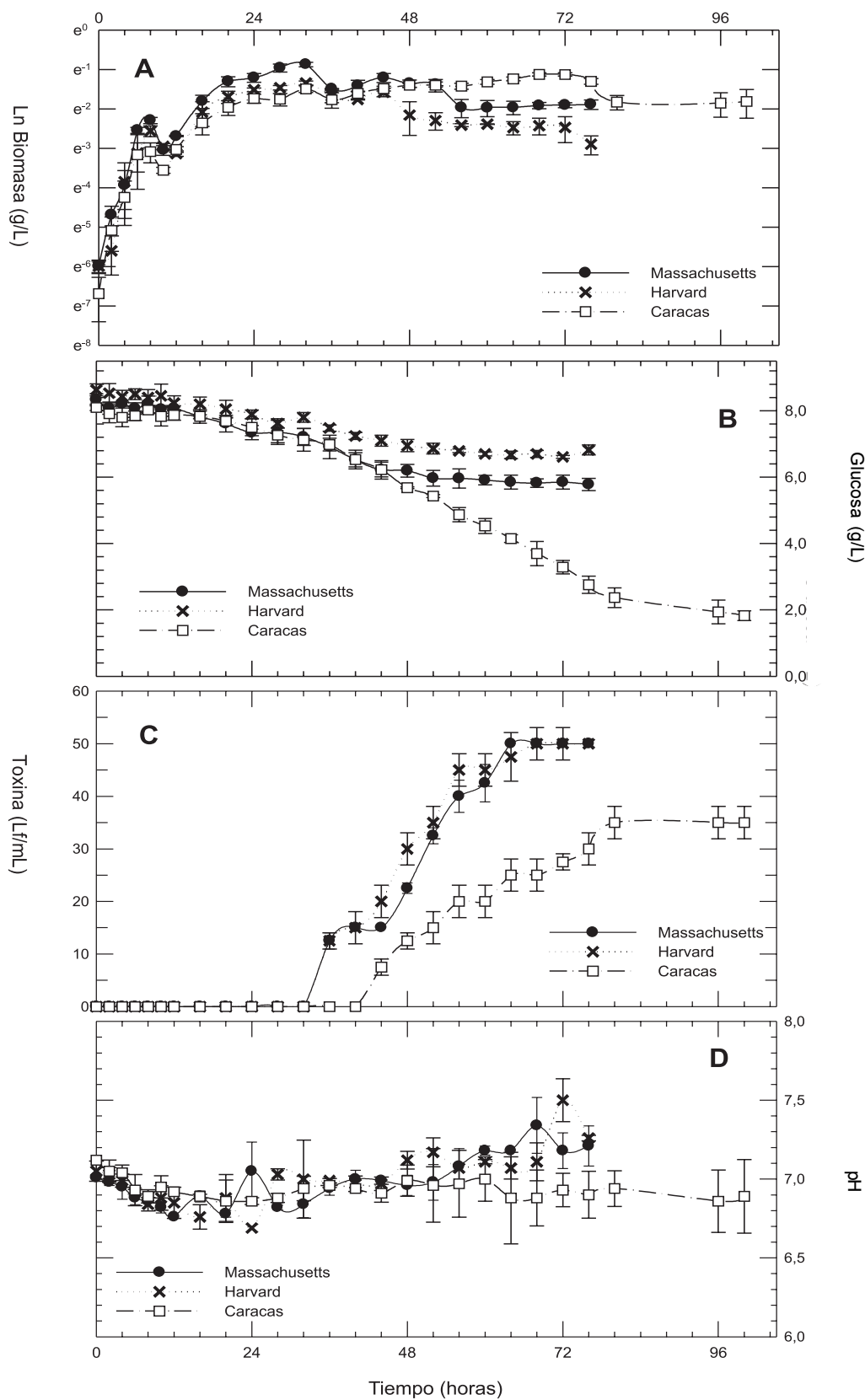


FIGURA 2. Cinética de fermentación *Clostridium tetani*, medio Latham Mueller CON glutamato. (A) Biomasa (g/L). (B) Glucosa (g/L). (C) Toxina (Lf/mL). (D) pH.

TABLA 2. Resultados promedio de las fermentaciones de las cepas Massachusetts, Harvard y Caracas cultivadas en medio Latham-Mueller suplementado con 2.5 g/L de glutamato y sin suplementar

Parámetro	Massachusetts		Harvard		Caracas	
	Sin	Con	Sin	Con	Sin	Con
Biomasa máxima (g/L)	0.2721	0.4188	0.2009	0.2616	0.5420	0.3250
Tiempo de biomasa máxima (h)	48	32	48	32	100	68
Velocidad máxima de crecimiento (h^{-1})	0.6145	0.5218	0.4793	0.5118	0.2120	0.5090
Porcentaje de consumo de glucosa (%)	29.6	30.6	21.4	24.3	61	91
Velocidad de consumo de glucosa (g glucosa/L.h)	0.0310	0.0310	0.0252	0.0310	0.0357	0.0583
Rendimiento observado biomasa-sustrato (g biomasa /g glucosa)	0.3126	0.3766	0.1372	0.3173	0.1399	0.0651
Inicio de detección de toxina en el medio (h)	44	36	36	36	94	44
Toxina máxima (Lf/mL)	55	50	50	50	30	35
Tiempo de toxina máxima (h)	76	64	72	68	168	80
Velocidad de formación de toxina (Lf/L.h)	1378.8	1489.6	1250	1401.5	297.6	761.4
Potencia (DML/Lf)	1202.2	1000	1050	1025.1	841.66	859.72
Rendimiento observado toxina-biomasa (Lf/g biomasa)	257774	297619	314164	333510	163447	231748
Productividad (Lf/L.h)	625	658	610	658	174	417

ción de toxina intra y extracelular encontraron que durante la fase de crecimiento exponencial la toxina es sintetizada en muy baja cantidad y que la mayoría de la toxina es producida al final de la fase de crecimiento. La mayor cantidad de toxina fue obtenida con la cepa Ms (55Lf/mL, $t=76h$), luego la cepa Ha (50Lf/mL, $t=72h$) y por último la cepa Ca (30Lf/mL, $t=168h$). Bizzini hizo una analogía de la producción de toxina de *Clostridium tetani* con la producción de enzimas extracelulares en *Bacillus* spp., y propuso que existe competencia entre la síntesis de material celular y la síntesis de metabolitos secundarios regulados en la transcripción del mRNA en función de la limitación nutricional (Bizzini 1979), lo que podría explicar el comportamiento de la cepa Ca.

La evolución del pH fue muy similar para las tres cepas evaluadas (Figura 1D), durante las primeras horas de cultivo se presentó un descenso constante hasta $\sim 6.8 \pm 0.2$, lo que coincide con la primera fase de crecimiento, debido probablemente a la liberación al medio de ácidos débiles como acético y butírico productos del metabolismo de aminoácidos (Clifton, 1942; Pickett, 1943). Luego se observó un incremento del pH hasta $\sim 7.4 \pm 0.2$, coincidiendo con una disminución apreciable de la biomasa y un incremento importante en producción de toxina extracelular, lo cual puede deberse a lisis celular.

Por otro lado, la adición de 2.5 g/L de glutamato de sodio al medio de cultivo ejerce un efecto sobre la producción de biomasa (Figura 2A), para las cepas Ms (Sin: 0.2721 g/L y Con: 0.4188 g/L) y Ha (Sin: 0.2009 g/L y Con: 0.2616 g/L) y en el tiempo en que se obtiene el valor máximo de biomasa, para las tres cepas evaluadas, Ms (Sin: 48 h y Con: 32h), Ha (Sin: 48 h y Con: 32 h) y Caracas (Sin: 100 h y Con: 68 h). Adicionalmente, aunque no ejerce un efecto sobre la cantidad de toxina producida (Figura 2C) (Ms: Sin: 55Lf/mL y Con: 50Lf/mL; Ha: Sin: 50Lf/mL y Con: 50Lf/mL; Ca: Sin: 30Lf/mL y Con: 35Lf/mL), se observa un efecto estadísticamente significativo sobre el tiempo en el que se obtiene el valor máximo de toxina (Ms: Sin: 44 h y Con: 36 h; Ha: Sin: 72 h y Con: 68 h; Ca: Sin: 168 h y Con: 80 h) y por lo tanto, en la productividad del cultivo (Ms: Sin: 625Lf/L.h y Con: 658Lf/L.h; Ha: Sin: 610Lf/L.h y Con: 658Lf/L.h; Ca: Sin: 174Lf/L.h y Con: 417Lf/L.h).

Varios autores han reportado (Mellanby, 1968; Bizzini, 1979; Quintero et al., 1998; Gutiérrez et al., 2005) que el exceso de glutamato en el medio acelera el crecimiento del microorganismo y reduce el tiempo necesario para la lisis celular, es por esta razón que en los cultivos suplementados con glutamato la toxina es detectada en el medio y su título máximo se alcanza antes que en los cultivos

sin este suplemento. Sin embargo, el glutamato no ejerce efecto sobre la cantidad de toxina producida ni sobre el rendimiento observado toxina/biomasa, indicando que no afecta la capacidad de la célula de producir la toxina.

CONCLUSIÓN

Las cepas Ms y Ha presentan un comportamiento muy similar para todos los parámetros evaluados en las dos condiciones estudiadas (con y sin glutamato), obteniéndose una mayor productividad en cultivos suplementados con 2.5 g/L de glutamato de sodio, probablemente por favorecer la lisis celular. Mientras que con la cepa Ca se obtuvo mayor cantidad de biomasa con menor velocidad de crecimiento y menor producción de toxina, lo que la descarta como candidato para la producción industrial del toxoide.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento al Instituto Nacional de Salud (INS) por la financiación de este trabajo.

LITERATURACITADA

- ANDRESEN, J.; BAHL, H.Y.; GOTTSCHALK, G. Introduction to the Physiology and Biochemistry of the Genus *Clostridium*. *Clostridia*. Minton, N.P. y Clarke, D.J. New York, USA, Plenum Press: 1989, 27-53.
- BALLÉN, L. y ALDANA, N. Estudio Preliminar de la Concentración Inicial de Células en la Producción de Toxina por Fermentación del *Clostridium tetani*. Departamento de Ingeniería Química. Trabajo de Pregrado. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 1995.
- BIZZINI, B. Tetanus toxin. *Microbiology Review* 1979, 43 (2): 224-240.
- BIZZINI, B. y GERMANIER, R. Tetanus. Bacterial Vaccines. Paris, France, Academic Press: 1984, 37-67.
- CLIFTON, C.E. The utilization of Amino Acids and Related Compounds by *Clostridium tetani*. *Journal of Bacteriology* 1942, 44: 179-183.
- DEMAIN, A.; GERSON, D.; FANG, A. Effective levels of tetanus toxin can be made in a production medium totally lacking both animal (e.g., brain heart infusion) and dairy proteins or digests (e.g., casein hydrolysates). *Vaccine* 2005, 23: 5420-5423.
- DREYWOOD, R. Qualitative test for carbohydrate material. *Indian Engineering Chemical Annal Education* 1946, 18: 499.
- GUTIÉRREZ, I.; GARZÓN, E.L.; VARGAS, P.; MORENO, N.; POUTOU, R.A. Influence of Sodium Glutamate, N₂-gas Bubbling and Superficial Aeration on the *Clostridium tetani* Culture for Tetanus Toxin Production. *Universitas Scientiarum* 2005, 10 (2): 79-86.
- HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; J.T., S.; WILLIAMS, S.T. *Clostridium tetani*. New York, Williams & Wilkins Press: 1984, 1195-1196.
- INS *Microbiología Médica, Manual de Procedimientos*. Bogotá, D.C., Colombia, Instituto Nacional de Salud: 1988, 151-190.
- KABAT, E.A. y MAYER, M.M. Métodos y procedimientos químicos y físicos especiales usados en inmunoquímica. Inmunoquímica Experimental. México, D.F., México, La Prensa Médica Mexicana: 1968, 499-500.
- KENNETH, T. Pathogenic Clostridia: Tetanus and Botulism. Department of Bacteriology. University of Wisconsin. Wisconsin, USA. 1997.
- LATHAM, W.C.; DONALD, F.B.; LEO, L. Tetanus Toxin Production in the Absence of Protein. *Applied Microbiology* 1962, 10: 146-152.
- MARTÍNEZ, R. y SYDNEY, C. Glucose Dissimilation by *Clostridium tetani*. *Journal of Bacteriology* 1959, 77: 156-163.
- MELLANBY, J. The Effect of Glutamate on Toxin Production by *Clostridium tetani*. *Journal of General Microbiology* 1968, 54: 77 -82.
- MUELLER, J.H. y MILLER, P.A. Factors Affecting the Production of Tetanus Toxin: Temperature. *Journal of Bacteriology* 1948, 55: 421-423.
- OLADIRAN, I.; MEIER, D.; OJELADE, A.; OLAOLORUN, D.; ADENIRAN, A.; TARPLEY, J. Tetanus: Continuing Problem in the Developing World. *World Journal of Surgery* 2002, 26: 1282-1285.
- OZUTSUMI, K.; SUGUMOTO, N.; MATSUDA, M. Rapid, Simplified Method for Production and Purification of Tetanus Toxin. *Applied and Environmental Microbiology* 1985, 49 (4): 939-943.
- PICKETT, M.J. Studies on the Metabolism of *Clostridium tetani*. *Journal of Biological Chemistry* 1943, 151: 203-209.
- PORFIRIO, Z.; PRADO, S.M.; VANCETTO, M.D.; FRATELLI, F.; ALVES, E.W.; RAW, I.; FERNANDES, B.L.; CAMARGO, A.C.; LEBRUN, I. Specific Peptides of Casein Pancreatic Digestion Enhance the Production of Tetanus Toxin. *Journal of Applied Microbiology* 1997, 6 (83): 678-684.
- QUINTERO, J.; GRANADOS, J.; BUITRAGO, G. Study of the Tetanus Toxin Production by Fermentation. *Revista Colombiana de Biotecnología* 1998, 1 (2): 27-32.

REYES, E. y FLORES, E. Tétanos. *Manual Moderno*. México D.F., México: 1986, 289.

STONE, J.L. A Modified Mueller medium without native protein for tetanus toxin. *Applied Microbiology* 1953, 1: 166-168.

WHALEY, D.; WIGGS, L.; MILLER, P.; SRIVASTAVA, P.; MILLER, M. Use of presumpto plates to identify anaerobic bacteria. *Journal of Clinical Microbiology* 1995, 33 (5): 1196-1202.

WHO. *Manual for the Production and Control of Vaccines: "Tetanus Toxoid"*. Ginebra, Suiza: 1977, 150.