

Identificación morfológica de microorganismos mediante neutrografía

Marco Munive*, Kety León, Oscar Baltuano

Dirección General de Investigación y Desarrollo, Instituto Peruano de Energía Nuclear.

Resumen

La identificación morfológica ha ayudado a los taxónomos en la calificación y utilización de varios microorganismos. Un aporte a este proceso taxonómico se puede lograr mediante el uso de haces de neutrones o neutrografía, esta técnica que permite la identificación de varios medios de diferente densidad, tiene en cuenta la transmisión de neutrones y la sección eficaz de captura neutrónica del medio a analizar. Para la identificación de microorganismos con neutrones se requiere un medio convertidor y un medio de registro, el medio conversor de neutrones en alfas es una solución de ácido bórico con ^{10}B que se inocula a la muestra biológica a estudiar y el medio de registro tipo detector plástico de huellas nucleares (CR 39). La identificación morfológica de microorganismos como *E. Coli* y *Estafilococos aureus*, usando esta forma de neutrografía, han logrado resultados que coinciden con la información taxológica de dichos microorganismos.

Abstract

The morphologic identification has helped the taxonomist to classifying them and utilization of several microorganisms. An additional contribution to this process taxonomic can be achieved by means of the utilization of beams of neutrons or by means of neutrography, this technology that they allow the identification of several means of different density bears in mind the transmission of neutrons and the neutron capture cross section of the way to analyzing. For the identification of microorganisms with neutrons there is needed a half convertor and a detector, the half converter of neutrons in alphas is a solution of boric acid with ^{10}B that is inoculated to biological sample to studying and the way of record type plastic detector of truck nuclear (CR 39). The identification morphologic of microorganisms as *E. Coli* and *Staphylococci aureus*, using this form of neutrography, have achieved results that coincide with the information taxological of the above mentioned microorganisms.

1. Introducción

Los rasgos morfológicos (estructurales) han contribuido a los taxónomos por muchos años, clasificar los organismos. Los métodos más usados para la identificación microbiana están basados en criterios morfológicos, tinción diferencial, pruebas bioquímicas, etc. La identificación por forma o morfología es el primer paso en el proceso de identificación. Los organismos superiores, tienen rasgos anatómicos tan diferentes que pueden ser fácilmente utilizados en su clasificación, pero los microorganismos no poseen esta característica; es decir, los microorganismos que se ven tan parecidos bajo un microscopio, pueden diferir en propiedades bioquímicas, fisiológicas y/o serológicas. Sin embargo, aun cuando la morfología celular dice poco sobre las relaciones filogenéticas, sigue siendo útil para la identificación bacteriana; por ejemplo, la presencia de endosporas y su localización resulta de mucha utilidad en la identificación de bacilos esporulados. Es posible sacar conclusiones en relación con la morfología de una bacteria, examinando

una lámina que fue sometida a un proceso de tinción diferencial. Estos criterios morfológicos encabezan las primeras etapas del proceso de identificación bacteriana (Figura 1), la mayor parte de las bacterias, teñidas con Gram.



Figura 1: Foto de *E. coli*.(www.ucv.ve / Farmacia / Micro_web / Catedras02).

* Correspondencia autor: mmunive@ipen.gob.pe

Para realizar este tipo de identificación se requiere tener procesos de cultivos de varios días.

Lograr una imagen con neutrones recibe el nombre de neutrografía que es una técnica de *ensayo no destructivo*, similar a la radiografía común, donde se hace incidir el haz de neutrones transmitido en una muestra sobre un chasis, donde se encuentra un convertidor y una película radiográfica que transforma la radiación incidente en una imagen interna del objeto. Para este propósito, se utiliza uno de los haces radiales del reactor nuclear RP-10, pudiéndose analizar objetos de hasta un metro cúbico de volumen [1].

La neutrografía partiendo de la sección eficaz de captura neutrónica para diversos elementos, logra una imagen, pero ello no sólo depende de la sección eficaz de captura, sino del medio conversor de neutrones transmitido en una señal registrable. Una neutrografía común (Figura 2) usa convertidores de gadolinio o disprosio para convertir, a partir de los neutrones, fotones de luz que luego queman una placa radiográfica.

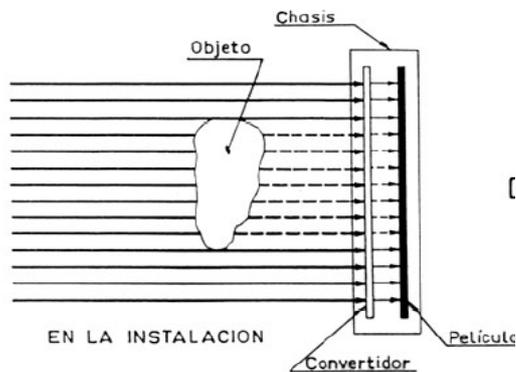


Figura 2: Esquema de neutrografía directa típica.

2. Fundamento

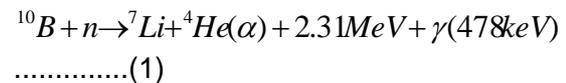
Las partes necesarias para obtener una imagen radiográfica con neutrones son: neutrones, muestra, objeto conversor y detector o registro de imagen.

En cuanto a los neutrones, se logra tener un flujo relativamente alto de estos elementos en un reactor nuclear o una fuente radiactiva (Cf252, Am-Be). Lo ideal es tener neutrones del rango energético muy bajo o neutrones térmicos para así aumentar

la posibilidad de interacción con elementos, el rango de energía promedio para nuestro caso es de 0.025 eV.

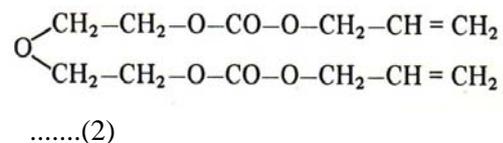
Las muestras que se utilizaron son cultivos de incubación; es decir, no requiere tener una gran población de microorganismos, esto ayuda a disminuir el tiempo de identificación de cualquier bacteria y por ello la respuesta ante cualquier patógeno. Las bacterias usadas en el presente trabajo fueron extraídas de sepa de *E. Coli* y *Estafilococos aureus*.

Para aumentar la sección eficaz de interacción de los microorganismos ante los neutrones, la colonia es inoculada con una solución de ácido bórico enriquecido con boro 10, este isótopo presenta una sección eficaz muy grande ante neutrones térmicos (3837 b); la colonia y la solución están sobre un portamuestra de vidrio, se deja que se evapore el agua de la solución y como parte final de preparación de la muestra, se coloca sobre ella un trozo de una lámina de polímero. La incidencia de neutrones sobre el boro genera partículas alfa con las siguientes características:



Las partículas alfa al tener un camino libre medio de corto alcance, son de difícil detección, para lograr registrarlas, se puede usar detectores plásticos como los polímeros, que en presencia de la radiación alfa, dejan una huella, también conocida como huella nuclear. Según el ángulo de incidencia de la radiación alfa sobre el polímero la huella nuclear registrada tendrá formas muy variadas, las cuales podrían ir desde círculos, si la interacción es perpendicular, hasta elipses si carecen de ella [2] Figura 3.

Los polímeros que se usan para este tipo de detección suelen ser LR 115 y el CR 39, este último posee la siguiente cadena de carbonos:



Fuente: Track Analysis Systems Ltd

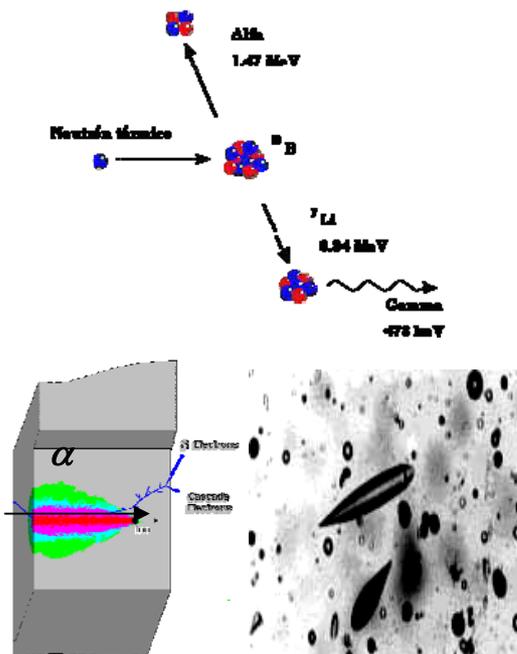


Figura 3: Arriba: Interacción neutrónica en un átomo de boro. Abajo: camino libre medio de una partícula alfa y huellas alfa registradas por detector plástico (www.erilresearch.com/).

3. Proceso experimental

Haz de neutrones

La identificación de bacterias se realizó en los laboratorios auxiliares del reactor RP-10, usando la facilidad externa o conducto de irradiación N° 4, con una potencia térmica de 320 kW, lo cual reporta un flujo de neutrones térmicos cercana a $5.6 \times 10^6 \text{ n.s}^{-1}.\text{cm}^{-2}$.

Preparación de muestra

Las muestras se prepararon en el laboratorio de biología, en un ambiente seguro para la manipulación de agentes patógenos. La preparación consistió en colocar sobre un portamuestras de vidrio, dos gotas de solución de ácido bórico, de 0.1 M de concentración, con volumen de 2 μl cada una, sola a una de las gotas se le inoculó con una pequeña muestra del cultivo del microorganismo a estudiar; la otra gota, se utilizó como muestra de control. La cepa de los microorganismos tiene un tiempo de cultivo promedio de 18 horas, luego es diluida y centrifugada por un tiempo de 5 minutos.

El portamuestra con las dos gotas es secado a temperatura ambiente, por un lapso de 8 a

10 minutos, una vez seca, se le coloca el polímero detector CR 39 de un tamaño suficiente que cubra ambas gotas; el porta muestra y el plástico detector se irradian con neutrones (Figura 4).

Proceso de irradiación

La irradiación al haz de neutrones se realiza en el conducto de irradiación N° 4, los tiempos de irradiación para cada muestra fueron de 1 hora, luego se retiró el detector plástico (CR 39), para realizarle el ataque químico correspondiente.

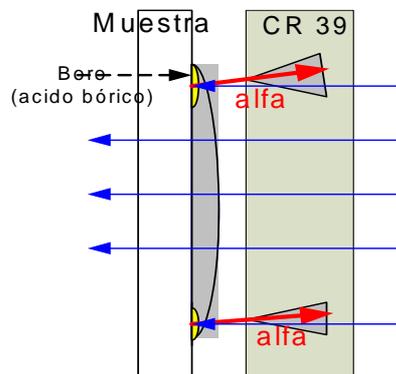
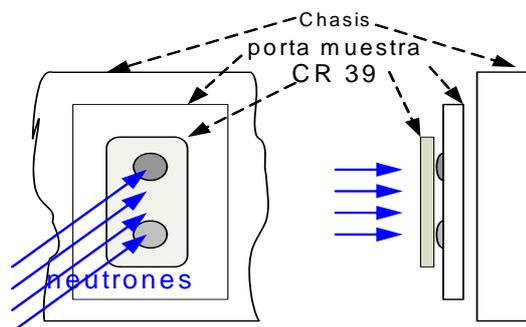


Figura 4: Arriba: esquema de ubicación de muestra borada y plástico detector frente al haz de neutrones. Abajo: esquema de la producción de huellas nucleares.

Proceso de obtención de imagen o huellas nucleares

La obtención de imagen en el detector plástico se logra mediante un ataque químico del mismo, con el cual se busca sacar micras de capa de polímero, las cuales están relacionados al tiempo de ataque con una sustancia agresiva a plásticos, buscando con ello hacer mas visible la huella nuclear producida por la partícula alfa ($E= 2.31 \text{ MeV}$).

Se procedió hacer el ataque químico del plástico CR 39, en una solución NaOH a 4,6 M, con temperatura de 70 °C, por un período

de 160 minutos, posteriormente se enjuaga y se deja secar.

Los plásticos son visualizados con microscópico óptico marca Meiji, amplificación de 20x100. Se registraron algunas fotos mediante una cámara digital.

Tratamiento de datos

Las huellas nucleares registradas depende de varios parámetros, el primer parámetro está relacionado con el tiempo de irradiación, seguido del tiempo de ataque químico (tamaño) y de la concentración de microorganismos en la gota de ácido bórico. Para el tiempo de irradiación y el ataque químico se utilizó la data de la referencia [3,4], tomando en cuenta la variación en forma, tamaño y al número de huellas.

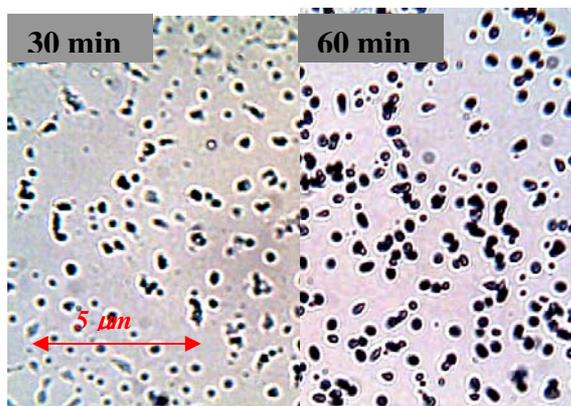


Figura 5: Tiempos de irradiación diferentes 30 y 60 minutos el número de huellas por área es mayor a mayor tiempo de irradiación.

Para esta técnica no se requiere una población muy grande de muestra, por ello un parámetro que también contribuye es la preparación de la muestra biológica. Las muestras biológicas deben de ser diluidas en agua y centrifugadas en períodos de 5 minutos, con ello se busca que los microorganismos no formen colonias y se logre diferenciar individualmente (Figura 6).

Identificación de muestras

Las muestras de microorganismos que se registraron mediante esta técnica fueron cepas de *E. coli* y *Estafilococos aureus*. Los resultados preliminares mostraron que para este tipo de bacterias se logra tener una buena identificación morfológica. Con una mejora en el tratamiento químico del detector y la preparación de muestra pueden

lograrse resultados bastante relevantes (Figura 7 y 8).

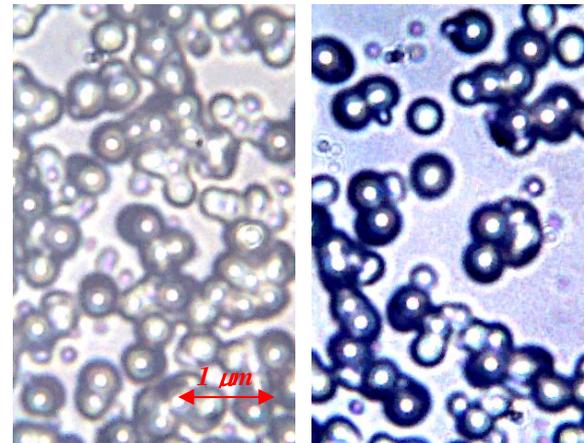


Figura 6: Huellas nucleares de muestra biológica. Izquierda: centrifugada una sola vez. Derecha: dos veces.



Figura 7: Arriba: huellas de la muestra de *E. coli*. Abajo: muestra de Micrografía SEM (<http://es.wikipedia.org/wiki/>).

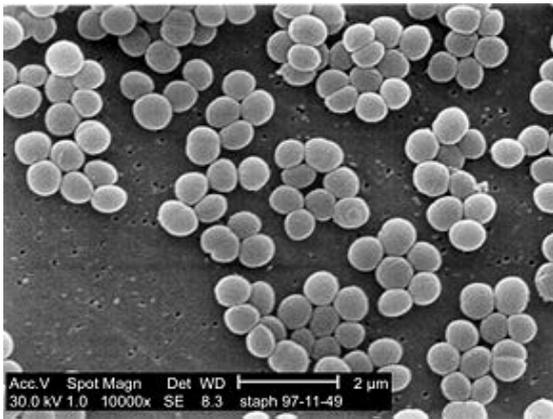
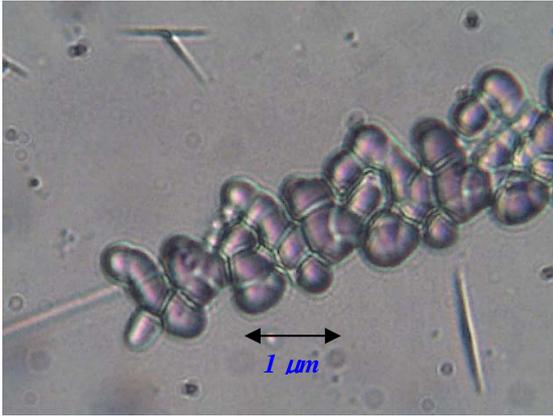


Figura 8: Arriba: huellas de la muestra de estafilococos aureus. Abajo: muestra de Micrografía SEM de colonias de *S. aureus*; (<http://es.wikipedia.org/wiki/>).

4. Conclusiones y comentarios

- Usando los haces de neutrones se propone una nueva técnica de identificación de bacterias, que agilizaría el proceso de identificación, reduciendo tiempo.
- Para la identificación de bacterias con períodos de cultivos muy largos y/o complicados (Ej. *Mycobacterium tuberculosis*), la técnica podría usarse sin problema, ya que la identificación se puede hacer en una muestra sin requerir cultivo.
- Las imágenes obtenidas de *E. Coli* y *E. Aureus* verifican la buena afinidad de las bacterias con un ambiente ácido y con el boro, lográndose una buena identificación morfológica por esta técnica.

5. Agradecimientos

Al Sr. Ángel Revilla, por su apoyo en el tratamiento químico de los detectores plásticos. Al Sr. Rolando Arrieta y al staff de operadores del reactor RP-10.

6. Referencias

- [1]. Ravello Y. Caracterización y puesta a punto de la facilidad de neutrografía del Reactor Nuclear RP-10. [tesis para optar el título de Licenciado en Ciencias mención: Física]. Lima: Universidad Nacional de Ingeniería; 2001.
- [2]. Ng, C.W.Y. Yip, J.P.Y. Ho, D. Nikezic¹, Non-destructive measurement of active-layer thickness of LR 115 SSNTD, Radiation Measure, El Sevier, sep 2003.
- [3]. Reinaldo Wacha,, Verginia R. Crispimb, Neutron radiography applied to the microorganisms Detection, Short communication Radiation Measure, El Sevier, October 1999.
- [4]. Reinaldo Wacha, Verginia R. Crispim, Claudia Lage, O uso da Neutronografia no Diagnostico da contaminacao por microorganismos.
- [5]. Reinaldo Wacha,, Verginia R. Crispimb, Neutron radiography applied to the microorganisms Detection, Short communication Radiation Measure, El Sevier, October 1999.
- [6]. Reinaldo Wacha, Verginia R. Crispim, Claudia Lage. O uso da Neutronografia no Diagnostico da contaminacao por microorganismos.