

G. N. E. A. Biblioteca	
ARCHIVO PUBLICACIONES	
Nº	AÑO
1	1982

AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS RADIORRESISTENTES DE AMBIENTES DE UNA PLANTA DE Co^{60}

por Graciela Lezcano*

Las radiaciones ionizantes son aplicadas en numerosos procesos industriales, como ser esterilización de equipos descartables de uso biomédico y farmacéutico, tejidos biológicos y conservación de alimentos. Este proceso puede ser efectuado por fuentes de Co^{60} , cuyas radiaciones actúan sobre el producto expuesto a la fuente. Esta continua exposición a las radiaciones podría producir selección e incremento en la resistencia de la microflora ambiental (1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8). Este trabajo se encaró con el objeto de observar estas posibles modificaciones por acción de una fuente de Co^{60} de 462.000 Ci, de la planta semi industrial del CENTRO ATOMICO EZEIZA, sobre la flora del agua usada como blindaje de la fuente, así como también del aire y polvo de la cámara de irradiación.

MATERIAL Y METODOS

Para la realización de este estudio se tomaron tres muestras de agua de la pileta de la fuente, de aproximadamente 1000 ml cada una. Estas fueron recogidas a 5 cm de la superficie, de ambos extremos y del centro. Como blanco de referencia, en todos los casos, se usaron muestras idénticas, que no estuvieron expuestas directamente a las radiaciones. En este caso se tomó 500 ml de agua corriente, conservada por métodos químicos comunes. Esta, después de ser desmineralizada a través del pasaje por resinas es usada como blindaje de la fuente.

TABLA I

MUESTRA	MICROORG AEROBIOS	MICROORG. ANAE-ROBIOS	HONGOS	BACILOS COLIFORMES (NMF)
Agua pileta fuente	5.27×10^0 MO/ml	2.26×10^0 MO/ml	2.5×10^0 MO/ml	NEG
Agua corriente	6.85×10^3 MO/ml	1.25×10^3 MO/ml 4.54×10^4 MO/g	1.0×10^1 MO/ml 5.5×10^3 MO/g	NEG
Polvo recinto fuente	2.49×10^4 MO/g	1.62×10^6 MO/g	2.6×10^4 MO/g 3.7×10^1 MO/hora	
Polvo laboratorio	2.21×10^6 MO/g		5.0×10^0 MO/hora	
Aire recinto fuente	1.62×10^2 MO/hora			
Aire depósito	3.8×10^1 MO/hora			

Referencias: MO Microorganismos.

Las muestras de aire fueron tomadas de la cámara de irradiación y las de referencia del depósito de materiales de la Planta. Para este fin se usó un muestreador de aire M/G modelo 250. Se tomaron muestras de aire de 1.0 pie cúbico por minuto, durante una hora.

Las muestras de polvo, de aproximadamente 5 gr, se recogieron del suelo de la cámara de irradiación y como referencia se tomaron muestras de lugares no asépticos de los laboratorios de microbiología, ubicados en una zona alejada de la Planta de Irradiación.

Se realizaron recuentos de niveles de contaminación de bacterias aeróbicas, anaeróbicas y hongos. Estos se hicieron por técnicas de dilución por agotamiento y por filtración por membranas de nitrato de celulosa de poro 0.45μ .

Las siembras en condiciones de anaerobiosis se realizaron en una jarra tipo Gas Pac, con generador de CO_2 Gas Pac.

En las muestras de agua se determinó también el número más probable (NMP) de bacilos coliformes según la técnica de Eijkman (9).

La resistencia a las radiaciones de las bacterias aerobias se determinó por medio de curvas de inactivación. Estas se realizaron en un Gamma-cell 220, con una velocidad de dosis de 2431,7 rad/min. Los microorganismos se irradiaron en

las condiciones de mayor resistencia, es decir deshidratados y en presencia de sustancias protectoras (10).

Los recuentos de bacterias aerobias, anaerobias y los de las curvas de inactivación se realizaron en medio TGY (triptona 10, glucosa 5, extracto de levadura 3, cloruro de sodio 5, agar 20, P/V, g/oo). Los hongos se sembraron en agar papa Oxoid.

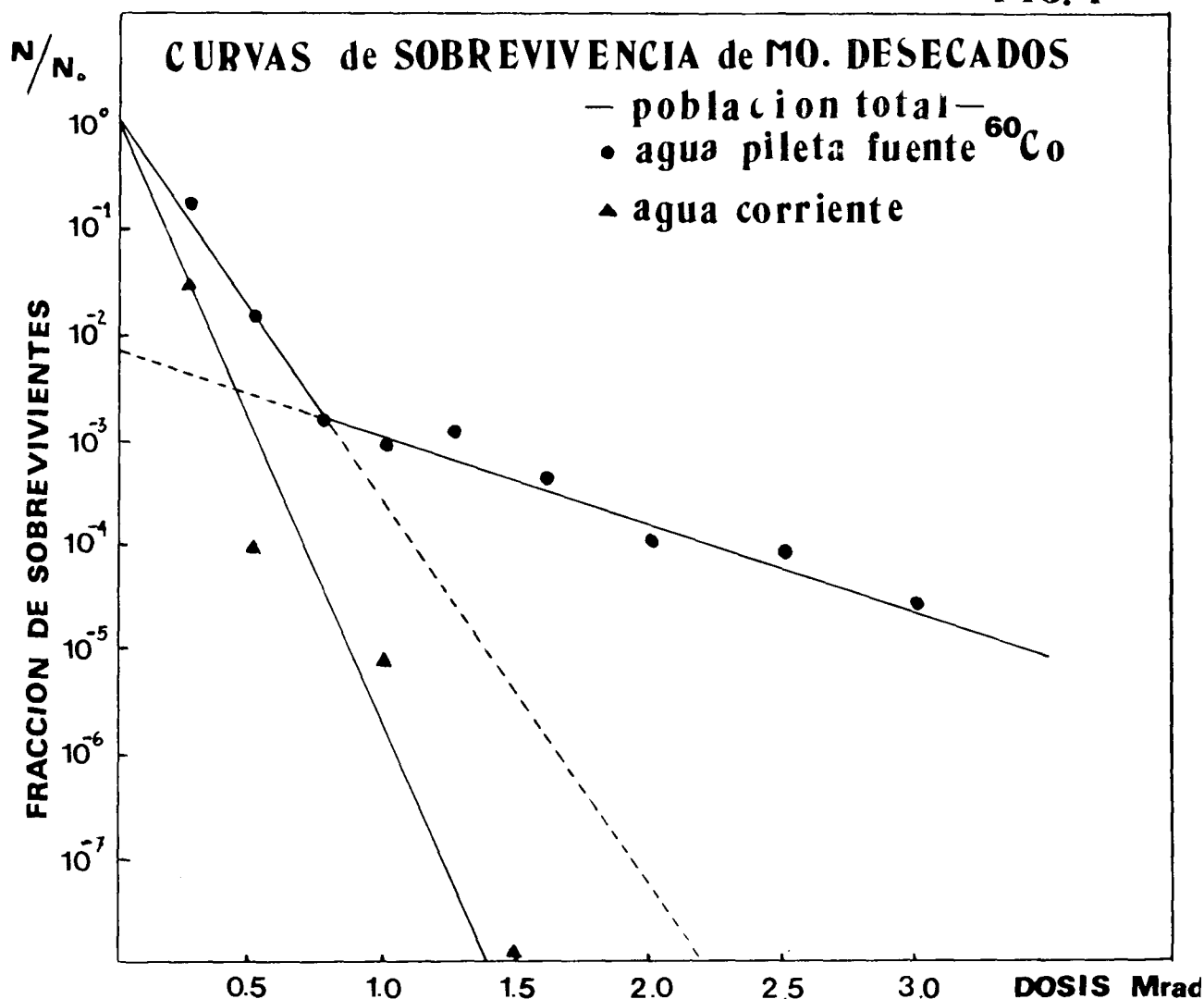
En todos los casos se usó como diluyente agua peptonada al 0.1%.

RESULTADOS

Los estudios de los niveles de recuentos microbianos, de las muestras analizadas, se expresan en la tabla siguiente.

Con el fin de determinar la radioresistencia de la flora bacteriana aerobia, contaminante de las muestras analizadas, se realizaron curvas de inactivación y se determinó la D_{10} (dosis necesaria para inactivar el 90% de la población). En la fig. 1 se observan las curvas de los microorganismos de las muestras de agua, en una escala semilogarítmica. En ella vemos que la flora del agua corriente no presenta mayor resistencia, ($D_{10} = 180$ Krad) que la mayoría de los contaminantes comunes considerados sensibles en condiciones

FIG. 1



similares. En la curva que representa a los microorganismos del agua de la pileta se observan dos pendientes, la primera corresponde a microorganismos con resistencias similares a los de la muestra tomada como blanco, y la segunda parte, con una pendiente menor, nos indica la presencia de un microorganismo con resistencia mayor a los antes mencionados.

En la fig. 2 observamos las curvas correspondientes a los microorganismos de las muestras de aire, en ella vemos que ambas presentan pendientes similares y con valores de D_{10} considerados como sensibles (D_{10} 255 y 260 krad).

La fig. 3 muestra las curvas de inactivación de las bacterias contaminantes del polvo. La correspondiente a la cámara de irradiación presenta microorganismos considerados sensibles (D_{10}

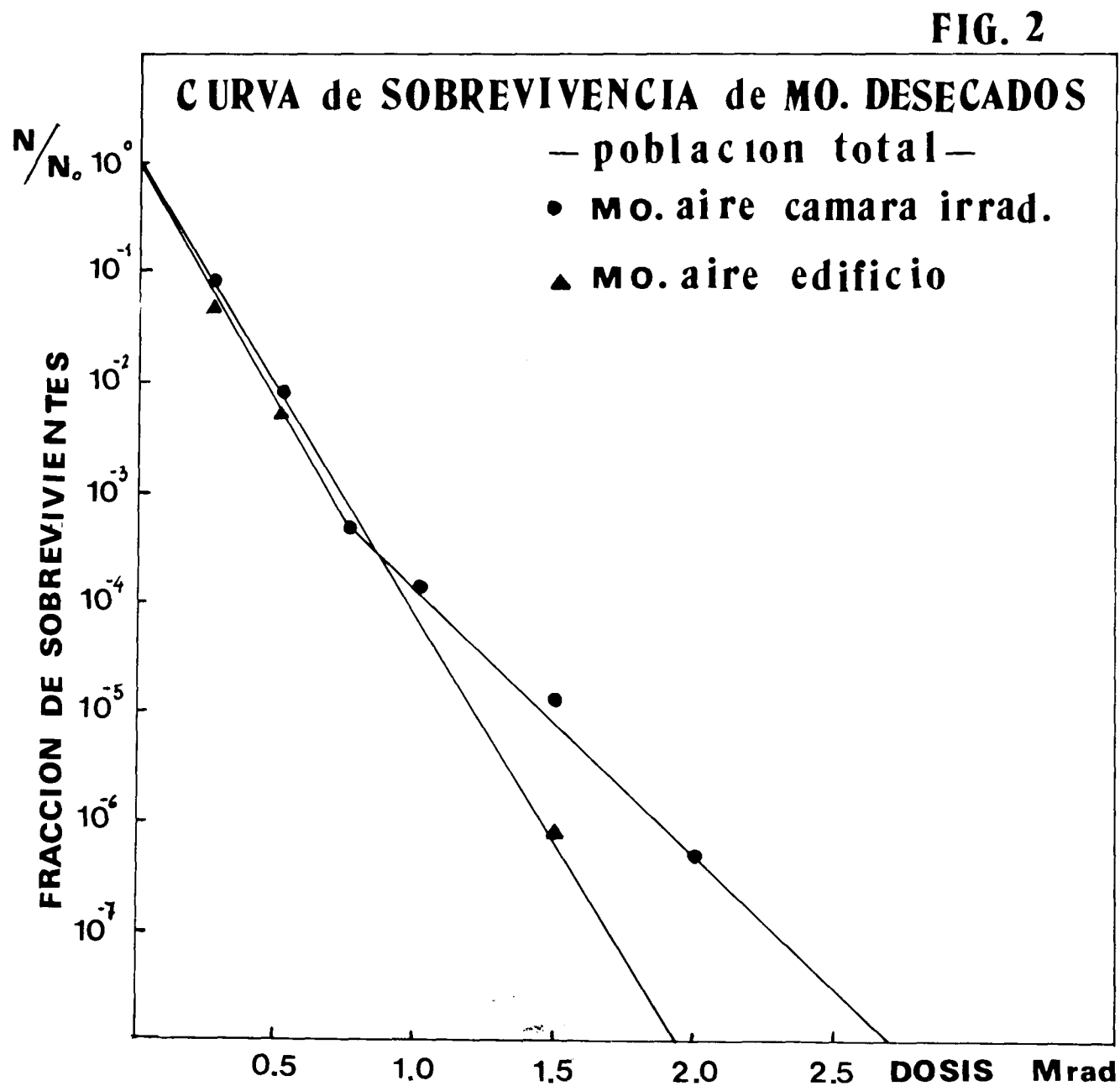
320 krad). La del polvo de los laboratorios presenta tres pendientes diferentes, la primera corresponde a una flora sensibles, las otras dos a microorganismos con mayor resistencia.

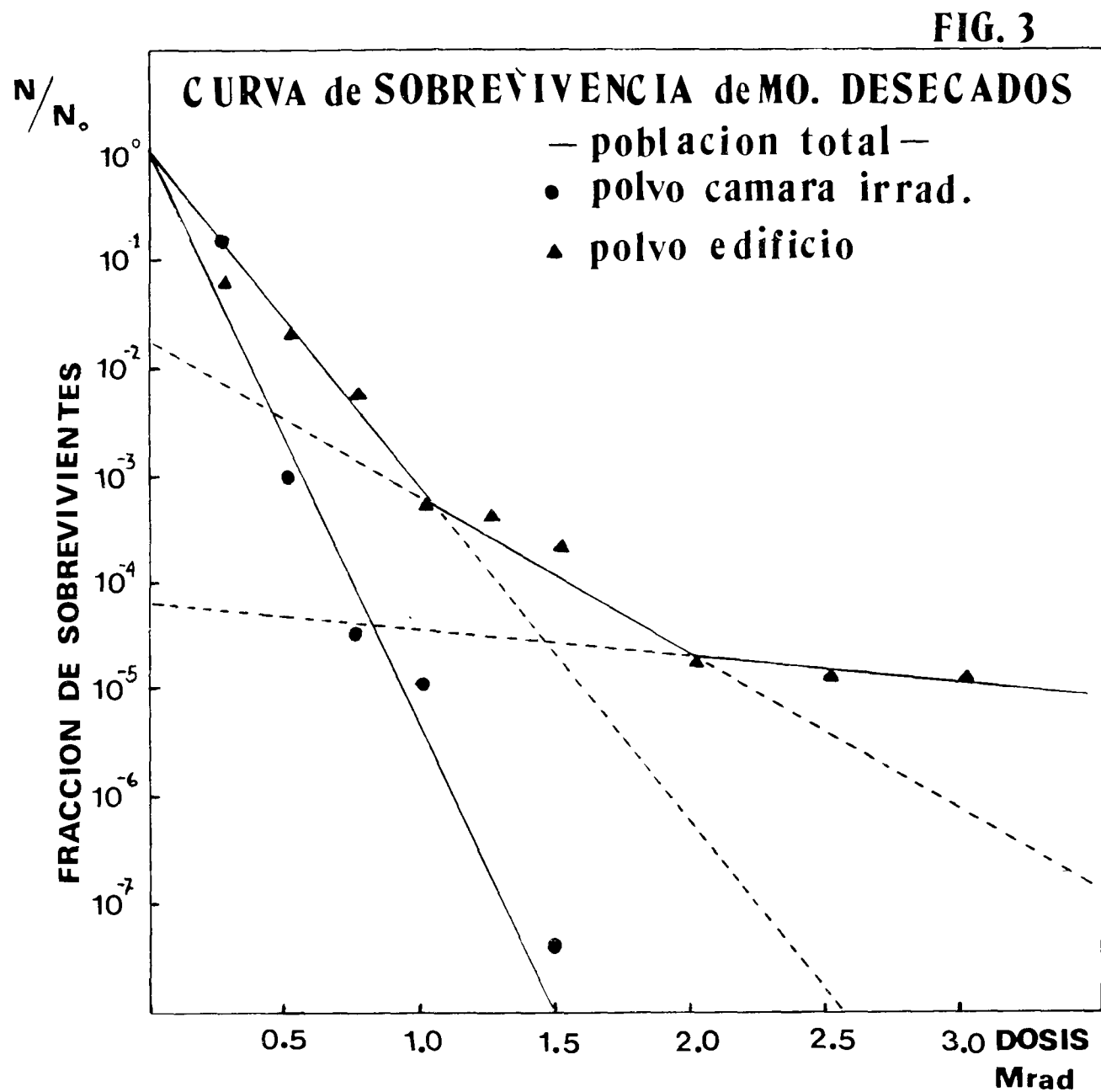
De esta flora aerobia contaminante analizada se seleccionaron los microorganismos que presentaron resistencias superiores a las encontradas habitualmente en la mayoría de los contaminantes comunes, y se realizaron reacciones de caracterización a nivel de género según el esquema de Cowan (11).

Se obtuvieron los siguientes resultados.

De acuerdo con estos resultados los microorganismos PF_1 y PE_2 pertenecen al género *Corynebacterium* y el PE_1 al género *Micrococcus*.

Con estas cepas puras y deshidratadas se repitieron las curvas de inactivación.





MICROORGANISMOS

	AISLADO PIL. FUENTE	AISLADO POLVO	AISLADO POLVO
	(PF ₁)	LAB (PE ₁)	LAB (PE ₂)
FORMA	bac.	coco	bac.
GRAM	(+)	(+)	(+)
AC. RESIST.	(-)	(-)	(-)
CREC. AEROBIO	(+)	(+)	(+)
CREC. ANAEROBIO	(+)	(-)	(+)
ESPORO	(-)	(-)	(-)
MOVILIDAD	(-)	(-)	(-)
CATALASA	(+)	(+)	(-)
OXIDASA	(-)	(-)	(-)
GLUGOSA (Ac)	(-)	(-)	(-)
O/F	(-)	(-)	(-)

DISCUSION

Podemos observar el efecto de selección de las radiaciones ionizantes sobre la flora aerobia, anaerobia y hongos en las muestras de agua y polvo (tabla I). En la fig. 4 se graficaron los valores correspondientes a la primera mencionada; las radiaciones producen inactivación de los microorganismos sensibles de 2 y 3 órdenes de magnitud respectivamente, comparándolos con los blancos correspondientes.

Con respecto al aire de la cámara de irradiación, éste presentó mayor número de contaminantes, que su respectivo blanco. Esto fue consecuencia de la acción continua de los extractores que renuevan el aire y remueven la flora ambiental dando altos niveles de contaminación, su paso continuo evita largas exposiciones a la fuente, altas dosis, y por consiguiente no se observa el efecto de selección.

Con referencia a la radioresistencia, en la fig. 5 se pueden observar las curvas de inactivación PE₂, *Micrococcus radiodurans* y *Bacillus pumilus*, todos con excepción de este último presentan una curva con hombro seguida de una pendiente exponencial, sin hombro, y una D₁₀ de 310 krad, es considerado no resistente. Este y el *M. radiodurans* fueron graficados sólo con fines comparativos. El primero fue elegido porque su radioresistencia representa uno de los valores encontrados en la mayoría de la flora contaminante y el segundo porque representa a un microorganismo radioresistente muy conocido y estudiado.

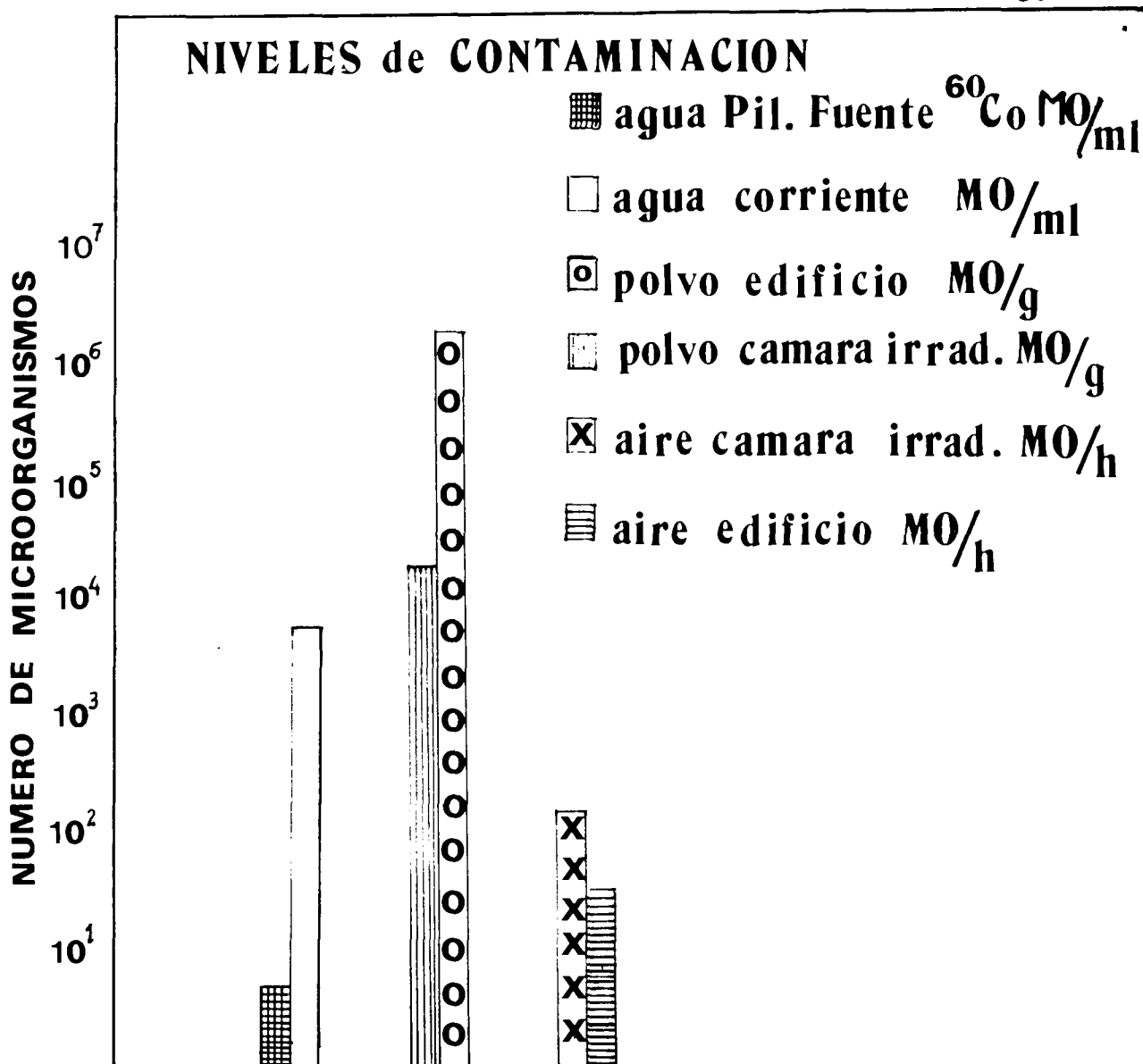
El microorganismo PE₁ presentó un hombro de aproximadamente 1.0 Mrad algo menor que

el del *Micrococcus radiodurans*, y una pendiente con un D₁₀ de 420 krad. Es considerado resistente. El microorganismo PE₂ presenta una curva que incrementa su pendiente con el incremento de dosis, y una resistencia mayor que el PE₁. El microorganismo PF₁ presenta un hombro de aproximadamente 3.2 Mrad, sensiblemente superior al que presenta el *Micrococcus radiodurans*. Esto nos indica que para mantener el número inicial, con estos niveles de dosis aplicadas, el microorganismo PF₁ tendría que poseer una y/o varias estructuras sensibles, y/o tener importantes mecanismos de reparación (12).

El agua de donde se aisló este microorganismo se ha mantenido sin recambio durante 6 años en la piletta. Podría suponerse, de acuerdo a la bibliografía consultada (1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - y 8) que la continua y prolongada exposición a dosis bajas incrementó su radioresistencia, no observándose este efecto en las muestras de aire y polvo de la cámara de irradiación. En el caso del aire el tiempo de exposición es mínimo y en el caso del polvo los altos niveles de dosis de exposición, cuando la fuente se encuentra fuera de la piletta, producen un gran daño, efecto letal y consecuente inactivación, evitando daños subletales, adaptación y modificaciones.

Según la bibliografía 3 - 4 - 7, los reciclados con rayos gamma podrían incrementar la radioresistencia de los microorganismos, sin observarse modificaciones en las características bioquímicas, virulencia o resistencia a los antibióticos. En nuestro caso, como no contamos con la cepa salvaje, estas pruebas comparativas son imposibles de realizar. De acuerdo a los antecedentes mencionados podríamos suponer, que en el

FIG. 4



caso del microorganismo PF_1 sólo se encuentra incrementada su resistencia a las radiaciones gamma, sin sufrir otras modificaciones.

Los microorganismos PE_1 y PE_2 podrían ser contaminantes ocasionales más resistentes que la flora contaminante común.

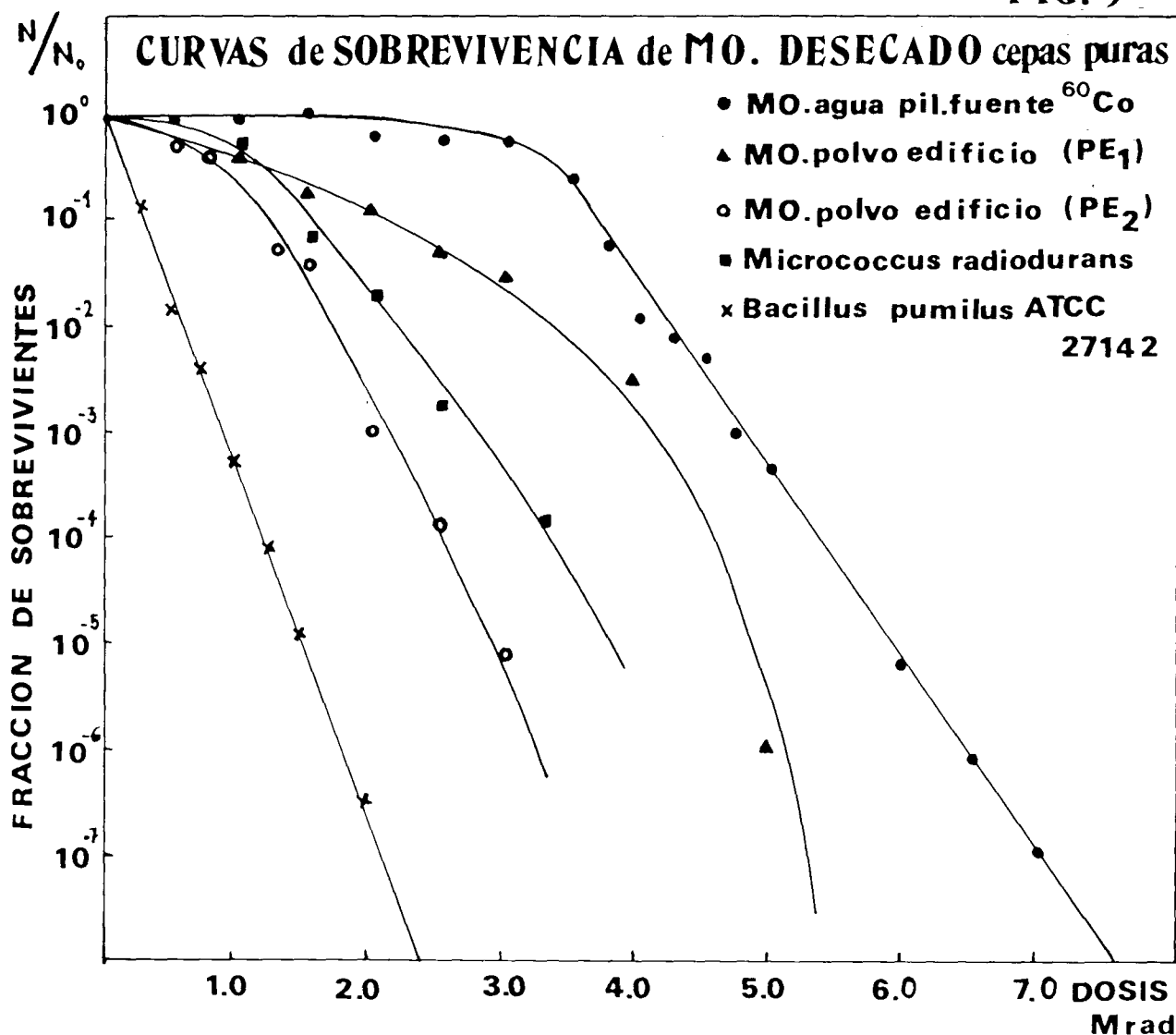
CONCLUSIONES

Debe evitarse la exposición de microorganismos en forma reiterativa, por largos períodos de

tiempo a dosis bajas de irradiación. En nuestro caso se debe renovar periódicamente el agua usada como blindaje de la fuente, evitando así producir cambios en la radioresistencia de la flora contaminante.

El hecho de no haberse encontrado este microorganismo radioresistente, aislado del agua, en las otras muestras analizadas (polvo y aire) nos indicaría que su presencia se encuentra limitada al agua de la pileta y que no es transmitido a otros lugares, hecho verificado por comprobaciones prácticas, de pruebas de radioresistencia, de la flora contaminante de los productos sometidos a irradiación.

FIG. 5



BIBLIOGRAFIA

- 1) CHRISTENSEN, E.A.-IAEA Working Group Meeting Riso-Denmark-5-9 June 1972.
- 2) MOUTON, R.F. et Trémau, O. *Int. J. Radiat. Biol.* 17 (1970) 237 - 248.
- 3) CORRY, J.E.L. and ROBERTS, T.A.J. *Appl. Bact.* 33 (1970) 733 - 737.
- 4) PREVITE, J. et al. *CAN. J. of Microbiol.* 17 (1971) 105 - 110.
- 5) EMBORG, C and ERIKSEN, E.H. -Working Group Meeting-Riso-Denmark 5-9 June 1972.
- 6) CHRISTENSEN, E.A. and KSEMS, E. *Acta Path et Microbiol. Scandinav.* 63 (1965) 281 - 190.
- 7) PREVITE, J.J. et al., *Can. J. Microbiol.* 17 (1971)

385 - 389.

- 8) KRISTENSEN, H., Working Group Meeting-Riso-Denmark - 5 - 9 June 1972.
- 9) HARRIGAN, W.F. and Mc CANCE, M. *Laboratory Methods in Microbiology.* Academic Press. London and New York (1966).
- 10) CHRISTENSEN, E.A. *Acta Path and Microbiol. scandinav.* 61 (1964) 483 - 486.
- 11) COWAN and STEEL'S. *Manual for the Identification of Medical Bacteria.* Cambridge University Press-London-New York, Melbourne 1974.
- 12) DERTINGER, H. and JUNG, H. *Molecular radiation biology.* Heidelberg Science Library. Vol. 12-New York-Berlin-1970.

SERVICIO I.A. 45