

Biblioteca	
ARCHIVO PUBLICACIONES	
Nº	AÑO
1	1982

07.82.04

789

AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS RADIORESISTENTES DE AMBIENTES DE UNA PLANTA DE Co⁶⁰.

LESCANO, GRACIELA- C.N.E.A.

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 Co⁶⁰, cuyas radiaciones actúan sobre el producto expuesto y ejercen también una influencia continua en el ambiente inmediato a la fuente. Esta continua exposición a las radiaciones podría producir selección e incremento en la resistencia de la microfiora 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 Co⁶⁰ de la Planta semiindustrial del CAE, sobre la flora del agua usado como blindaje de la fuente, así como también del aire y polvo de la cámara de irradiación.

MATERIAL Y METODOS

Se analizaron 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 protección del radioisótopo.

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 aerobias, anaerobias y hongos. Estos se hicieron por técnicas de dilución por agotamiento y por filtración por membrana de nitrato de celulosa de poro 0.45 μ .

Las siembras en condiciones de anaerobiosis se realizaron en una jarra tipo Gas Pac, con generador de Co₂ Gas Pac.

En las muestras de agua se determinó 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 Gammacell 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/00). Los hongos se sembraron en agar papa Oxoid. Como diluyente se usó agua peptonada al 0.1%.

RESULTADOS

Los niveles de recuentos microbianos se expresan en la tabla siguiente.

MUESTRA	MICROOR AEROBIOS	MICROOR ANAE- ROBIOS	HONGOS	BAC.CO- LIFORMES (NMP)
Agua pile- ta fuente	5.27×10^0 MO/ml	2.26×10^0 MO/ml	2.5×10^0 MO/ml	NEG
Agua co- rriente	6.85×10^3 MO/ml	1.25×10^3 MO/ml	1.0×10 MO/ml	NEG
Polvo re- cinto fue <u>n</u> te.	2.49×10^4 MO/g	4.54×10^4 MO/g	5.5×10^3 MO/g	---
Polvo labo- ratorio	2.21×10^6 MO/g	1.62×10^6 MO/g	2.6×10^4 MO/g	---
Aire recin- to fue <u>n</u> te	1.62×10^2 MO/h	-----	3.7×10 MO/h	---
Aire depó- sito	3.8×10 MO/h	-----	5.0×10^0 MO/h	---

Con la mezcla de bacterias aerobias presentes en cada muestra analizada, se realizaron curvas de inactivación con el fin de determinar su radioresistencia. 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 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 presentan tres pendientes di-

ferentes, la primera corresponde a una flora sensible, las otras dos a microorganismos con mayor resistencia que ésta.

De las muestras analizadas 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.

MICROORGANISMOS

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

Los microorganismos PF₁ y PE₂ pertenecen al género corynebacterium y el PE₁ al género micrococcus.

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

DISCUSION

En la fig. 4 observamos el efecto de selección de las radiaciones ionizantes sobre las bacterias aerobias de las muestras de agua y polvo, éstas producen inactivación de los microorganismos sensibles de 2 y 3 ciclos de logaritmos respectivamente, comparándolos con los blancos correspondientes.

El aire de la cámara de irradiación presentó mayor número de contaminantes, que su respectivo blanco. Esto fue consecuencia de la acción continua de los extractores que renuevan el aire y renuevan la flora dando altos niveles de contaminación, su paso continuo evita largas exposiciones a la fuente, y por consiguiente su efecto de selección.

En la fig. 5 se representan las curvas de inactivación de las cepas puras aisladas y deshidratadas: PF₁, PE₁ y PE₂, Micrococcus radiodurans y Bacillus pumilus, todos con excepción de esta última presentan una curva con hombro seguida de una pendiente exponencial. El B. pumilus presenta una curva representada solo por la pendiente exponencial, sin hombro, y un D₁₀ de 310 krad, considerado no resistente. Este y el M. radiodurans fueron graficados solo con fines comparativos. El primero fue elegido porque su radioresistencia representa uno de los valores encon-

tradas en la mayoría de la flora contaminante y el segundo porque representa a un microorganismo muy conocido y estudiado con resistencia mayor a lo habitual.

El microorganismo PE₁ presentó un hombro de aproximadamente 1.0 Mrad 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, lo que nos indica que este microorganismo para tener, con esos niveles de dosis aplicados, el mismo número inicial, tendría que tener una o varias estructuras sensibles, y necesitar varios impactos para su inactivación, 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 pileta. Podría suponerse, de acuerdo a la bibliografía consultada (1-2-3-4-5-6-7y8) 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 pileta, 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 caso del microorganismo PF₁ solo se encuentra incrementada su resistencia a las radiaciones gamma, sin sufrir otras modificaciones.

Los microorganismos PE₁ y PE₂ podrían ser contaminantes ocasionales más resistentes que la flora contaminante común.

CONCLUSIONES

Debe evitarse la exposición de microorganismos en forma reiterativa, por largos periodos 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 radiorresistente, 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. 1

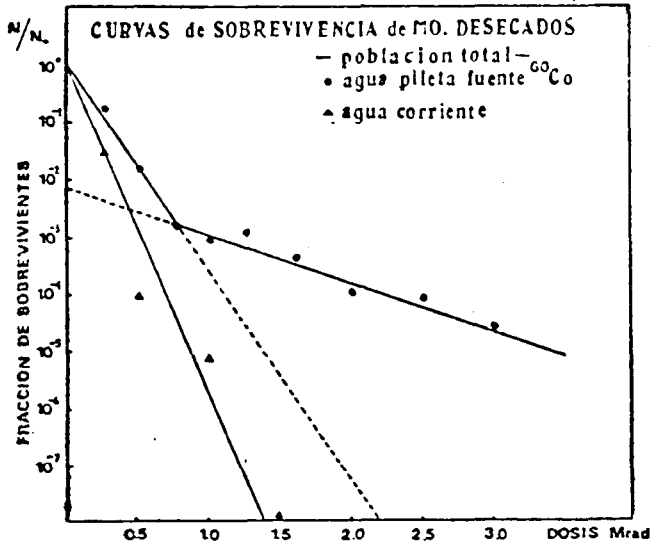


FIG. 2

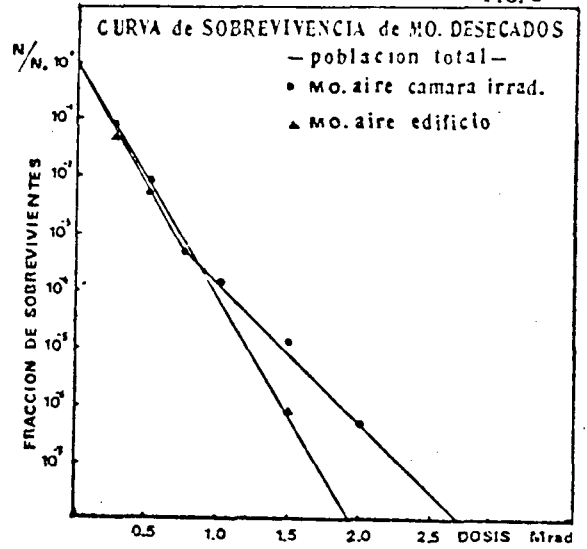


FIG. 3

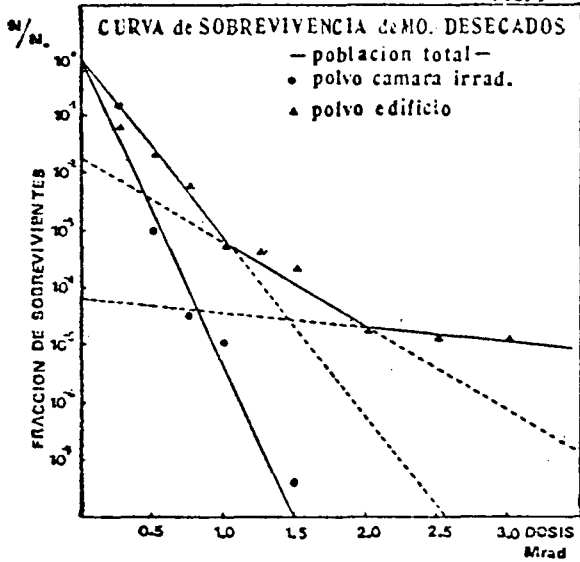


FIG. 4

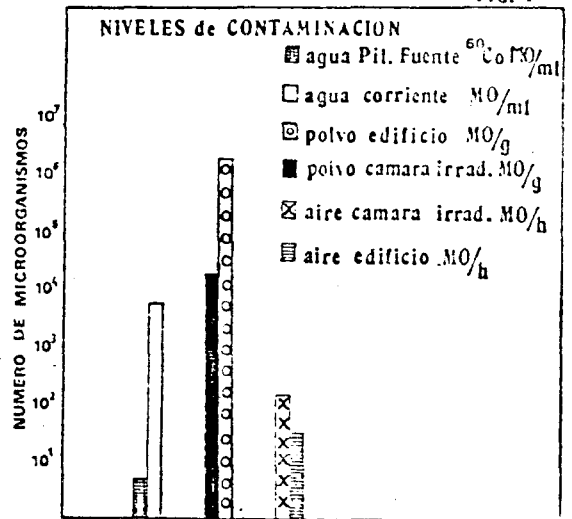
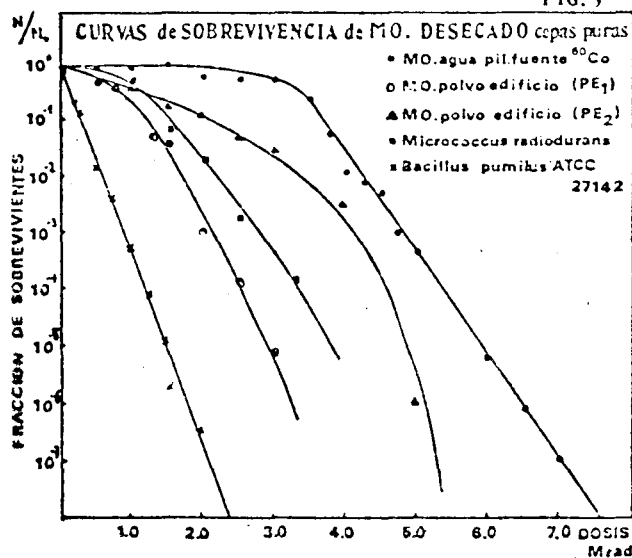


FIG. 5



BIBLIOGRAFIA

- 1) CHRISTENSEN, E.A.-IAEA Working Group Meeting Riso-Denmarck-5-9 June 1972.
- 2) MOUTON, R.F. et Trémeau, 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 all. 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. scan-dinav. 63 (1965) 281-190.
- 7) PREVITE, J.J. et all, 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 Microbio-logy. 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. Heidel-berg Science Library. Vol. 12-New York-Berlin-1970.