

Detecção de Microorganismos em Meios de Cultura pela Técnica de Neutronografia

Reinaldo Wacha^(a), Joana D'Arc R. Lopes^(a), Verginia R. Crispim^(b), Cláudia Lage^(c)

PEN/COPPE/UFRJ

Caixa Postal 68509

21945-970, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

e-mail: wachat@lmn.con.ufrj.br

e-mail: joana@lmn.con.ufrj.br

(b)[PEN/COPPE - DNC/EE] CT/ UFRJ

e-mail: verginia@lmn.con.ufrj.br

(c) IBCCF / UFRJ

e-mail: lage@ibccf.biof.ufrj.br

Recebido 17 de novembro 1998

O estudo visa apresentar um novo método de detecção de microorganismos em diversos meios de cultura, tais como, água potável e fluidos corporais. Após os processos de crescimento no meio de cultura, separação e re-suspensão em solução tampão à base de boro, os microorganismos são depositados em detectores de traços, que são submetidos a um feixe de nêutrons térmicos ($\approx 2,2 \times 10^5$ n/cm².s). Os traços latentes registrados pelas partículas alfa provenientes da reação $B(n,\alpha)Li$ são analisados por um microscópio óptico, que permite detectar a existência dos microorganismos. Complementando a análise, um Microscópio de Força Atômica foi utilizado para comprovar essa identificação dos traços das partículas alfa.

Palavras-chave: neutronografia, microorganismos, detector de traços CR-39

The study aims to obtain a more effective and faster method for the detection of bacteria in several culture media, such as potable water and blood. After the process of growth in the culture medium, separation and suspension in buffer solution based on boron, the bacteria are deposited in track detectors that are submitted to thermal neutron beams (neutron flux: $2,2 \times 10^5$ n.cm⁻².s⁻¹), resulting from the channel J-9 of the Argonauta research reactor, from the Nuclear Engineering Institute, IEN/CNEN. The latent tracks arise from the alpha particles proceeding from the reaction $B(n,\alpha)Li$ and, after having been revealed, are analyzed by an optical microscope that allows to detect the existence of the bacteria. Afterwards, they were analyzed in a nanoscope which helps the identification of the tracks of the alpha particles.

I Introdução

Os métodos tradicionais usados na detecção de microorganismos se baseiam no cultivo de colônias em meio apropriado onde, após a fase de crescimento, procede-se a identificação dos mesmos. As amostras de tecido ou secreções, donde se pretende identificar ou mesmo averiguar a existência de microorganismos contaminantes, são coletadas e isoladas em meio nutriente, normalmente um composto contendo principalmente infusão

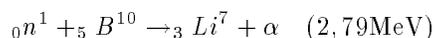
de carne, conhecido como *meio nutriente LB*, e deixados em descanso por no mínimo 18 horas. Esse tempo é necessário para que cada microorganismo chegue à saturação de crescimento, em decorrência da falta de espaço e pode variar com a fisiologia dele, de acordo com sua agressividade. Retira-se uma alíquota para ser semeada em *meio coloidal*, que é semelhante ao meio nutriente LB, porém, de forma gelatinosa, e deposita-se sobre uma placa de Petri. Ao contato novamente com meio nutriente e dispondo de espaço, os microorganismos

mos depositados voltam ao seu desenvolvimento, mas se mantém concentrados conforme foram depositados, formando colônias. As colônias formadas permitem a identificação do microorganismo, mas, dependendo da fisiologia dele, o tempo decorrido para o crescimento de uma colônia pode até ultrapassar 48 horas, mesmo que sob condições de cultura adequadas (BIER, 1970 e BROCK, 1997).

O uso de modernos equipamentos de detecção biológica (automação de testes microbiológicos) asseguram a detecção de microorganismos em poucos minutos, após a coleta das amostras, porém, não consegue identificá-los sem que seja feita a semeadura em *meio coloidal*, o que acaba por incrementar o tempo gasto. Além desse fato, outro motivo que contribui muito para sua impopularidade é o seu custo de aquisição.

O exame e a detecção de microorganismos utilizando a técnica neutrográfica (WALKER, 1975 e CRISPIM, 1993), com as amostras depositadas sobre detector sólido de traços nucleares (SSNTD) não necessita, *a priori*, de amostras pré-desenvolvidas ou cultivadas em meio específico. O requisito básico para a detecção dos microorganismos por este processo é que os mesmos estejam em plena atividade biológica, para propiciar uma melhor interação do elemento conversor de nêutrons em partículas α , responsáveis pela formação da imagem no filme, o que se dá por incubação.

O elemento conversor utilizado foi o boro, enriquecido a 99,97%, que, devido a sua alta seção de choque de absorção para nêutrons de 25 meV, cerca de 3890 barns (KNOLL, 1973), contribui com uma alta probabilidade de detecção. A interação dos nêutrons com o boro-10 é dada pela reação:



As amostras coletadas em tecidos ou fluidos corporais, de onde se suspeita uma contaminação, podem ser examinadas *"In Natura"*, ou seja, sem a necessidade de cultivo, pois, quando os microorganismos manifestam uma anormalidade infecciosa, eles se encontram em plena atividade biológica e se posicionam na fase exponencial da curva de crescimento (BIER, 1970 e BROCK, 1997). Nessa situação, a aquisição de amostras não prevê e nem necessita que os microorganismos possuam dimensões compatíveis com o espectro visível. As partículas α que formam a imagem no filme através de danos, com dimensões que variam de 30 a 100 (DURRANI e BULL, 1987), se originam da interação do nêutron incidente com o agente conversor. Com esse

tamanho elas preenchem, de forma aleatória, a região do microorganismo e o delineiam, mostrando sua morfologia, já que esta possui dimensões médias bem maiores, normalmente acima de 2 μm . Após a revelação toda a imagem produzida durante a irradiação (pequenos traços aglomerados na área ocupada pelo microorganismo que não estava no espectro visível) se apresenta ampliada e pode ser examinada sob microscopia óptica convencional.

Uma simulação da sobreposição de traços de partículas α , delineando a imagem do microorganismo, pode ser apreciada na figura 1.

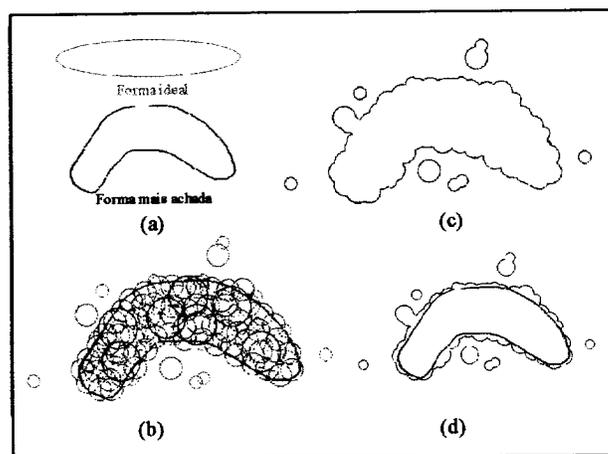


Figura 1 - (a) Formas de uma bactéria *"in natura"*; (b) Ampliação da bactéria com a sobreposição de traços de partículas α ; (c) Imagem formada após a revelação dos traços; (d) Superposição das configurações vistas em (a) e em (c).

Em suma, utilizando-se os métodos convencionais de detecção e identificação de microorganismos, mesmo com o auxílio de modernos equipamentos, necessita-se de um tempo mínimo de exame entre 18 e 36 horas (BIER, 1970 e BROCK, 1997). O uso da técnica neutrográfica é vantajoso perante os métodos convencionais, possibilitando a completa detecção do microorganismo, em poucas horas (WACHA, 1999). Tal fato poderá tornar este método atrativo, aumentando as chances de sobrevivência dos portadores de enfermidade, a partir da aplicação mais rápida do medicamento adequado.

A revelação para a obtenção da imagem neutrográfica se dá através de um ataque químico. O ataque químico é preferencial no caminho percorrido pela partícula, devido a ionização provocada no meio. No microscópio óptico, os traços apresentam uma geometria característica do ângulo de incidência, em relação a normal à superfície do detector, sendo uma circun-

ferência, para incidência normal, e elíptico, para incidência oblíqua, como demonstrado na figura 2.

II Método experimental

Para o experimento, a fonte de nêutrons utilizada foi o reator Argonauta do IEN/CNEN, embora sistemas montados com outras fontes neutrônicas, tais como Am^{241} -Be e Cf-252, possam ser utilizadas, desde que obedeçam as normas de proteção radiológica e possuam atividades adequadas ao tempo de exposição desejado. O sistema esquematizado na figura 3 está instalado no canal de irradiação J-9, na coluna térmica do reator (CRISPIM, 1993). O feixe neutrônico provindo do núcleo passa por 25 cm de grafita e por um colimador divergente de grafita com 60 cm de comprimento e orifício longitudinal igual a um tronco de pirâmide com bases quadradas de $16,0\text{ cm}^2$ e $50,0\text{ cm}^2$, revestido internamente, na parte final, com $0,5\text{ mm}$ de espessura de cádmio. A amostra (depósito de microorganismos no detector de traços) é fixada na superfície de um chassi radiográfico e submetida ao feixe de nêutrons térmicos.

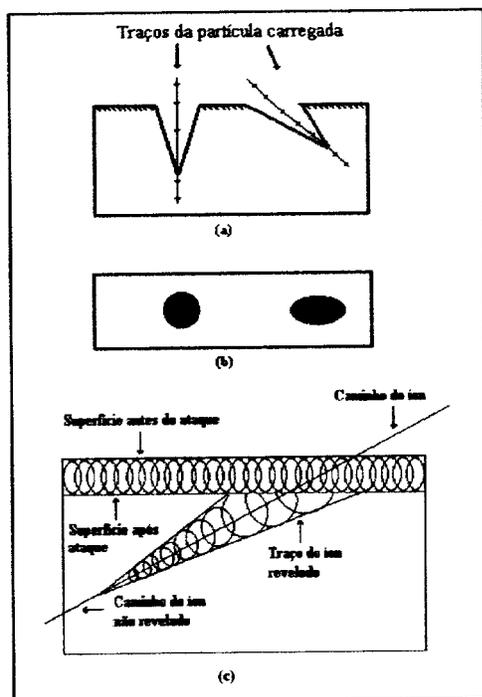


Figura 2. (a) Corte lateral do detector de traços; (b) Geometria dos traços visíveis ao microscópio; (c) Vista lateral do detector durante o ataque químico.

A princípio, com a necessidade de comprovar a eficácia da técnica proposta, seguiu-se o protocolo de preparação usual da microbiologia como referência.

Não obstante a isso, utilizou-se também um microorganismo bem conhecido, onde sua fisiologia está bem definida.

Para esse experimento, foi escolhida especificamente a bactéria *Escherichia coli*, não patogênica, cujas características morfológicas são bastonetes de $2\text{ a }3\ \mu\text{m}$ de comprimento e $0,6\ \mu\text{m}$ de largura (BIER, 1970).

Os microorganismos foram semeados em meio de cultura LB por um pernoite, quando foi coletada uma amostra e inoculada por mais 90 minutos, para que os microorganismos pudessem atingir um valor de crescimento populacional em torno de 10^8 células/ml, que é assinalado por uma seta, no gráfico da curva de crescimento de microorganismos apresentado na figura 4. Em seguida, passaram pelo processo de separação sendo resuspensas em solução tampão contendo solução de boro (com boro enriquecido), o que fez com que elas o absorvessem. Após serem submetidas a diluição, foram depositadas sobre uma lâmina do detector, que foi então irradiada por aproximadamente 20 minutos, no feixe de nêutrons térmicos do reator Argonauta, operado nas condições citadas na figura 3.

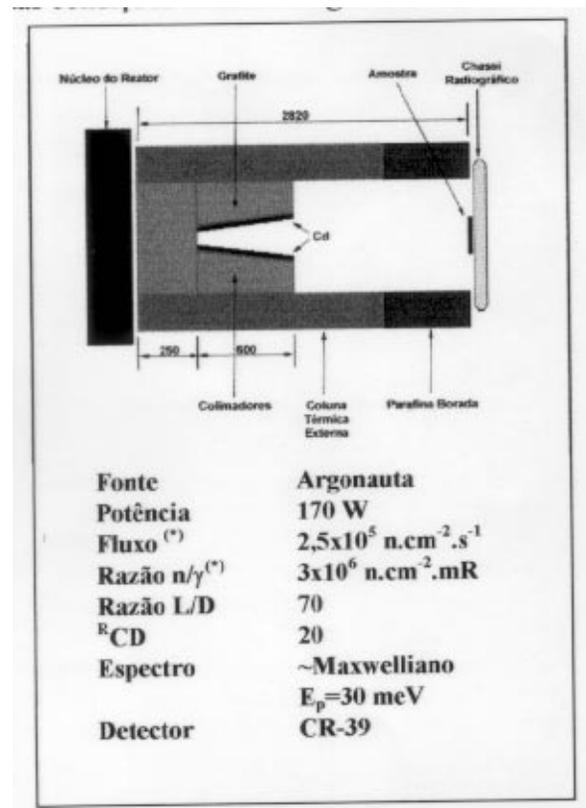


Figura 3 - Diagrama esquemático do reator e condições de operação.

O detector utilizado para se registrar a imagem é um detector sólido de traços nucleares, denominado CR-39

($H_{18}C_{12}O_7$). A escolha do CR-39 deveu-se ao fato de mesmo ter mostrado possuir uma grande sensibilidade e excelente resolução, se comparado a outros tipos de detectores (makrofol, mica, etc.), de registrar traços e detectar partículas ionizantes, como os prótons, as partículas alfa de alta energia e os íons pesados. Além do CR-39 não ser sensível à luz, às radiações β e γ , apresenta baixo custo por dispensar montagens e circuitos eletrônicos e possui pequeno desvanecimento de traços latentes, devido a sua grande estabilidade molecular (Da FONSECA, 1983 e BRANDÃO, 1983).

Os traços provocados pelas partículas α provenientes da reação (n,α) foram revelados segundo os parâmetros de revelação (temperatura, normalidade do atacante químico, tempo de revelação) (De SOUZA, 1991). A análise dos traços revelados foi realizada por microscopia óptica convencional (microscópio Olympus BX-60M, ocular 10x e objetiva 100x).

Após a localização dos prováveis focos de traços, utilizou-se um nanoscópio (AFM-Topometrix) para o mapeamento e a comprovação da geometria característica dos mesmos.

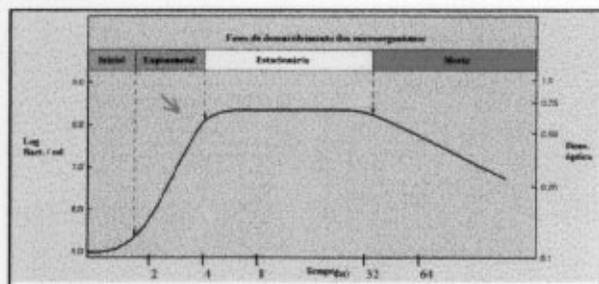


Figura 4. Curva de crescimento de microorganismos (BIER, 1970).

A simples obtenção de focos de traços não significa, a princípio, a ocorrência de microorganismo. É necessário que estes traços, além de estarem aglomerados, possuam um ordenamento, de acordo com a geometria do mesmo, para uma posterior identificação. Uma vez localizada e comprovada a aglomeração de traços, é possível reconhecer o tipo e a forma do microorganismo comparando-a com a dos microorganismos conhecidos.

III Resultados e conclusões

Na análise dos filmes contendo microorganismos observou-se, em sua totalidade, agrupamentos e sobreposições de traços que possuíam a morfologia característica de um bacilo, conforme visto na figura 5. Em

nenhum momento este tipo de aglomeração foi observado em amostras contendo apenas solução boro-salina. Na análise desses filmes observou-se traços bem nítidos e diferenciados do ruído de fundo, como mostra a figura 6.

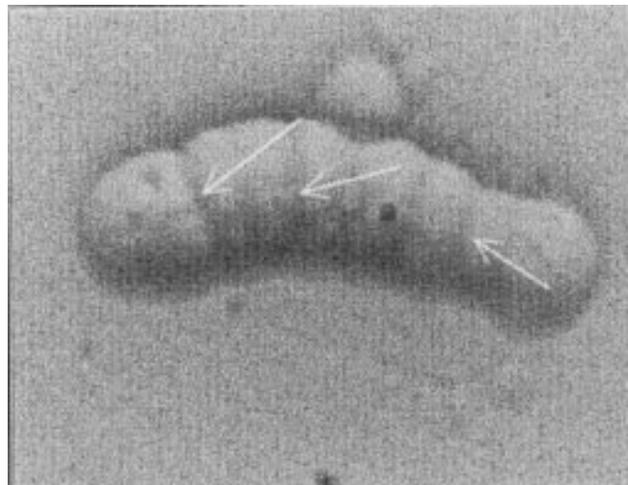


Figura 5. Imagem do bacilo por microscopia óptica, mostrando a sobreposição de traços de partículas alfa assinalados por setas.

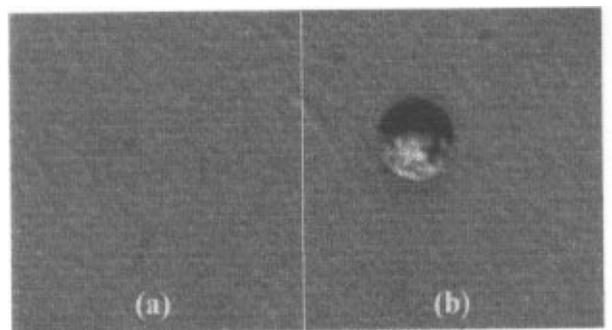


Figura 6. (a) CR-39 sem a presença de traços de partículas α ; (b) Traço de uma partícula α no CR-39.

A fim de se fazer uma confirmação de que realmente a imagem é devida a uma aglomeração de traços de partículas α , elas foram submetidas a análise por nanoscópio. Esta técnica permite uma comparação da geometria característica de um traço alfa, mostrado na figura 2, por topologia, como demonstra a figura 7.

A ocorrência de defeitos provenientes da aglomeração de microorganismos e traços de alfa espúrios dificultam sua quantificação, mas permitem a detecção de, ao menos, um microorganismo, o que é suficiente para garantir sua presença na amostra conforme visto na figura 8.

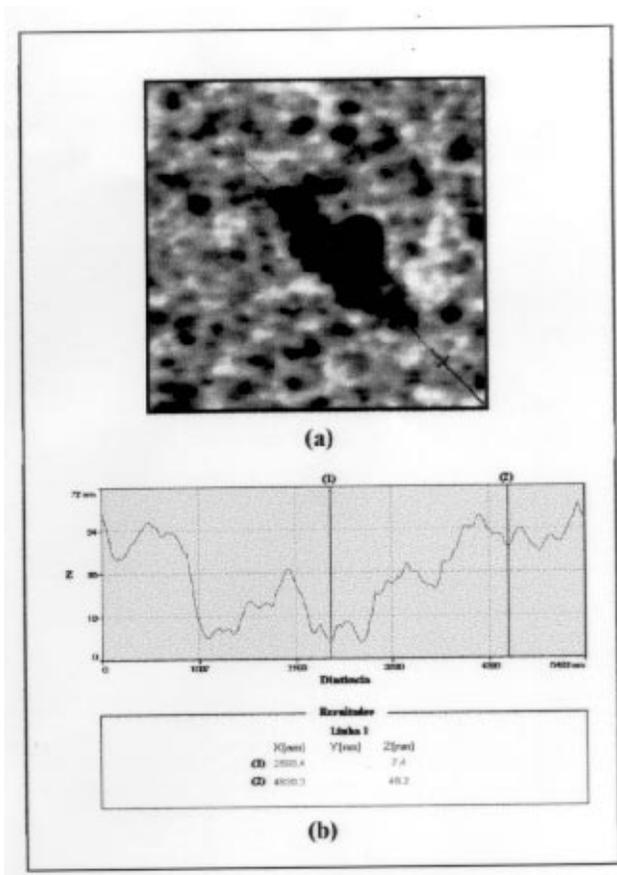


Figura 7. (a) Aglomeração de traços identificando um microorganismo da forma bacilo (*E. coli*); (b) Detalhe do relevo dos traços em (a).

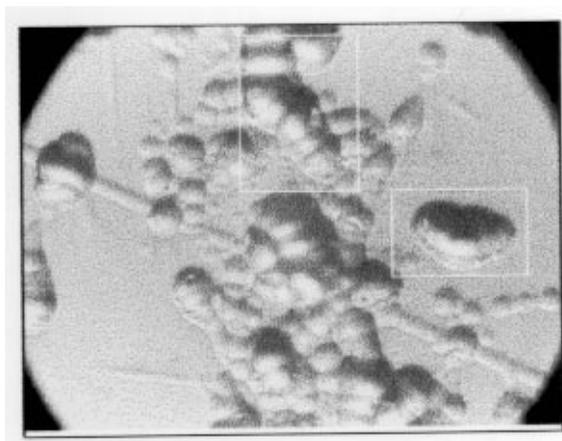


Figura 8. Aglomeração de microorganismos, identificados pelas caixas brancas, e traços alfa espúrios.

A garantia de que as aglomerações observadas indicam a presença de microorganismos vem do fato de que, além de possuírem uma morfologia característica (bastonete), elas não estão presentes nas amostras contendo apenas solução de boro-salina, como pode ser observado na figura 9.

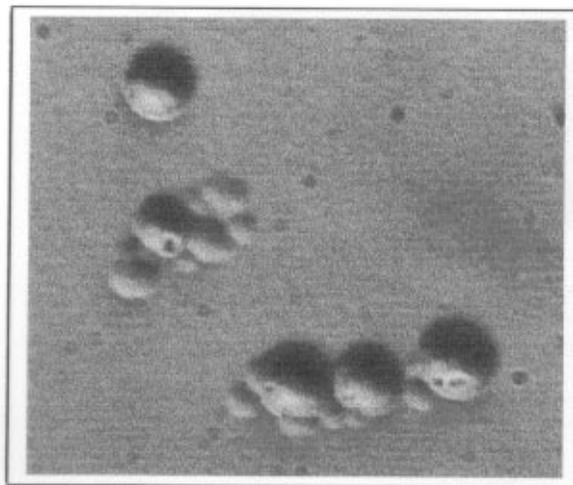


Figura 9. Aglomeração de traços de uma amostra contendo apenas solução boro-salina.

A vantagem da técnica proposta em relação a atualmente utilizada pelo meio biológico, está no fato de não haver necessidade de cultivo em pernoite, possibilitando a redução do tempo total de detecção do microorganismo.

Agradecimentos bigskip

Ao Físico Rodrigo Prioli, aluno de doutorado pertencente ao Laboratório de Nanoscopia do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF).

A Equipe da SUFIN / IEN / CNEN.

A Fundação José Bonifácio (FUJB).

Ao Laboratório de Radiobiologia do Instituto de Biofísica do Centro de Ciências Sociais da UFRJ.

Referências

- BIER, O., 1970, *Bacteriologia e Imunologia*, Edições Melhoramentos, 15^o Edição, São Paulo, Brasil, p 446.
- BRANDÃO, L. E. B., 1983, "Estudo das Características de Registro de Partículas Ionizantes do Detector de Traços CR-39", Tese de Mestrado, PEN/COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro.
- BROCK, 1997, *Biology of Microorganisms*, 8a ed, Prence Hall, New Jersey, USA.
- CRISPIM, V. R., 1993, "Desenvolvimento de Ensaios Não-Destrutivos com Neutronografia", Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- Da FONSECA, E. S ., 1983, "Algumas Características do Detector Sólido de Traços C-39 para Registro de Prótons e Partículas Alfa de Baixa

Energia”, Tese de Mestrado, Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas, Rio de Janeiro.

DURRANI, S. A.; BULL, R.K., 1987, *Solid State Nuclear Track Detection, Principles, Methods and Applications*, Pergamon Books Ltda., Oxford.

KNOLL, G. F., 1973, *Radiation Detection and Measurement*. John Wiley & Sons, Nova Iorque.

WACHA, R., 1999, “Detecção de Mi-

croorganismos em Meios de Cultura pela Técnica de Neutronografia”, Tese de Mestrado, PEN/COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro.

WALKER, J., 1975, *Radiography with Neutrons*, In: Proceedings of the Conference Radiography with Neutrons, pp. 1-6, University of Birmingham, London, Sep.