

IDENTIFICAREA UNOR SPECII DE BACTERII VII PRIN METODA ÎMPRĂȘTIERII DIFERENȚIATE A LUMINII MONOCROMATICE

M. Olariu, dr. M. Péter, V. Filep

Dacă metoda împrăștierii diferențiate a luminii a fost larg utilizată în ultimii 20 de ani pentru studiul soluțiilor moleculare, în studiul polimerilor sau chiar al macromoleculilor biologice, extinderea acestei metode la studiul formațiunilor vii a fost încercată abia în ultimii patru ani, în special de Wyatt (1, 2, 3).

Teoria lui Mie (4, 5, 6) referitoare la fenomenul de împrăștiere a luminii de către particule aflate în suspensie și având diametrul $D > \frac{\lambda}{20}$, arată că cele mai mici diferențe legate de dimensiunea, forma sau indicele de refracție al particulelor difuzante, implică în mod sigur o modificare în aspectul diagramei de împrăștiere $I=f(\theta)$. Având în vedere această situație este de așteptat ca acele microorganisme care diferă fie prin aspectul lor geometric, fie prin structura lor biochimică, să împrăștie lumina în mod diferit. Cu alte cuvinte, diagrama $I=f(\theta)$ este o curbă caracteristică pentru fiecare model de microorganism. Forma matematică a acestei funcții, în lumină naturală, este dată de teoria *Rayleigh-Gans* (4, 5):

$$I(\theta) = \frac{4\pi^2 I_0}{\lambda^4 r^2} \left(\frac{n}{n_0} - 1 \right)^2 \cdot [F(\delta, \theta)]^2 \cdot (1 + \cos^2 \theta) \quad (1)$$

unde s-a notat:

I_0 = intensitatea luminii incidente,

$I(\theta)$ = intensitatea luminii împrăștiate la unghiul de observație θ ,

θ = unghiul pe care îl face direcția de observație cu direcția radiației incidente,

λ = lungimea de undă la care se lucrează,

r = distanța la care se măsoară intensitatea luminii împrăștiate față de volumul de împrăștiere,

n și n_0 = indicele de refracție al particulei difuzante și respectiv al mediului înconjurător,

$F(\delta, \theta)$ = o funcție care depinde de diferența de fază δ a două unde care provin de la elemente de volum diferite.

Funcția $F(\delta, \theta)$ depinde de forma și dimensiunile particulelor difuzante și ea a fost calculată pentru o serie de forme geometrice regulate, ca: sferă, disc, elipsoid, bastonaș etc. Din nefericire însă, în lumea microorganismelor avem forme geometrice mult mai variate și neregulate. Totuși, pentru o serie de specii forma bacteriilor poate fi aproximată la una din modelele amintite mai sus. Astfel de exemplu, pentru bacterii de formă sferică teoria *Rayleigh-Gans* dă expresia funcției $F(\delta, \theta)$:

$$F(\delta, \theta) = V \cdot G(U)$$

unde V este volumul sferei și funcția $G(U)$ are forma

$$G(U) = \frac{3}{U^3} (\sin U - U \cos U)$$

Prin U s-a notat expresia $2Ka \sin \frac{\theta}{2}$, a fiind raza sferei și $K=2\pi n_0/C$ — constanta de propagare.

Pentru bacterii a căror formă poate fi aproximată la un elipsoid, funcția $F(\delta, \theta)$ are aceeași formă, însă diferă prin valoarea volumului V , precum și prin forma funcției U care în acest caz este dată de expresia $2Kd \sin \frac{\theta}{2}$

unde $d=(a^2+b^2+c^2)^{\frac{1}{2}}$, a , b și c fiind semiaxele elipsoidului.

Un calcul mai precis va trebui să țină seama de faptul că membrana celulară are un alt indice de refracție decât acela al protoplasmei. Dacă notăm cu t grosimea membranei celulare, atunci putem considera că amplitudinea unei împrăștiate constă din suprapunerea a două efecte:

1. împrăștierea pe o sferă de rază a , având indicele de refracție dat de membrana celulară, și
2. împrăștierea pe o sferă interioară concentrică de rază $a-t$, având indicele de refracție dat de diferența dintre indicii membranei și acela al protoplasmei.

În această situație, notind n_0 , n_1 și n_2 indicii de refracție pentru mediul înconjurător, pentru membrana celulară și respectiv pentru protoplasmă, prin însumarea celor două efecte intensitatea totală împrăștiată poate fi scrisă sub forma:

$$I(\theta) = \frac{4\pi^2 I_0}{\lambda^4 r^2} \left[\left(\frac{n_1 - n_0}{n_0} \right)^2 \cdot [F_1(\delta, \theta)]^2 + \left(\frac{n_2 - n_1}{n_0} \right)^2 \cdot [F_2(\delta, \theta)]^2 \right] \cdot (1 + \cos^2 \theta) \quad (2)$$

unde

$$F_1(\delta, \theta) = \frac{4\pi a^3}{3} \cdot G \left(2ka \sin \frac{\theta}{2} \right)$$

și

$$F_2(\delta, \theta) = \frac{4\pi (a-t)^3}{3} \cdot G \left[2K(a-t) \sin \frac{\theta}{2} \right]$$

Pentru alte modele raționamentul este asemănător însă funcția $F(\delta, \theta)$ ia forme mai complicate. Evident, un calcul riguros ar trebui să țină seama și de faptul că însăși formațiunile celulare nu au același indice de refracție cu protoplasma, ceea ce — deși într-o măsură mai mică — influențează modul în care lumina împrăștiată este distribuită în jurul probei. Un astfel de calcul însă deocamdată se neglijează, deși astăzi ar putea fi abordat deoarece avem la dispoziție calculatoarele digitale foarte rapide.

Analizând relația (2) înțelegem ușor de ce diagrama $I=f(\theta)$ trebuie să fie o curbă caracteristică pentru fiecare specie de bacterii; valoarea intensității împrăștiate depinde atât de mărimea indicilor de refracție ai protoplasmei și membranei celulare, cât și de funcția $F(\delta, \theta)$, adică de forma și dimensiunea acestor bacterii.

Instalația pe care am folosit-o pentru înregistrarea diagramei de împrăștiere a fost construită după modelul *Wippler-Scheibling* (7, 8), fiind totodată asemănătoare cu instalația de serie fabricată de firma franceză SOFICA. Ca sursă de lumină am folosit fie o lampă cu vapori de mercur tip SP 500 Philips, fie un laser He-Ne model LG-750.1 de fabricație I.F.A. București. Traductorul optico-electronic folosit a fost un fotoamplificator 150 AVP. Pentru înregistrarea semnalului electric am folosit un înregistrator TESLA, având o sensibilitate de 10^{-10} A/div. sau un galvanometru Multiflex cu sensibilitatea de $4 \cdot 10^{-10}$ A/div. Receptorul optic este rotit cu o

viteză constantă în jurul probei, astfel că pe hîrtia de pe înregistrator apare direct curba $I = f(\theta)$. Pentru verificarea instalației am înregistrat curbele de împrăștiere pentru o soluție molecularară pură (CCl_4) și pentru o bară de sticlă (BK7) șlefuită optic. Curbele au fost riguros simetrice față de $\theta = 90^\circ$, respectiv valorile factorului

de disimetrie $\frac{I(\theta)}{I(180-\theta)}$ au fost egale cu 1, pentru valorile unghiului de împrăștiere

cuprinse între 50° și 140° . Deci, în cazul instalației noastre, acesta este domeniul optim pentru efectuarea măsurătorilor absolute, deși curent noi am înregistrat diagrama de împrăștiere pentru valori θ cuprinse între 40° și 160° .

Experiențele noastre au fost efectuate pe un mediu apos format dintr-o suspensie de bacterii în ser fiziologic. Probele au fost preparate în aceleași condiții: speciile studiate au fost cultivate pe același mediu de cultură (geloză-singe), au avut același timp de creștere și suspensiile au fost aduse la aceeași concentrație ($9 \cdot 10^8$ bacterii/ml) printr-o comparație fotometrică cu scara de etaloane Brown.

În fig. nr. 1 prezentăm diagramele de împrăștiere obținute pentru speciile *Staphylococcus aureus* și *Serratia marcescens*. Fasciculul de lumină folosit a fost radiația laser de 6328 Å, curbele fiind trasate după valorile curenților citiți la galvanometrul Multiflex.

Observăm că pentru cele două specii, în intervalul $80^\circ < \theta < 160^\circ$, curbele se diferențiază foarte bine.

Folosind o sursă de lumină clasică, diferențele sînt mai mici în ceea ce privește disponerea grafică a curbelor. Astfel, curbele din fig. nr. 2a, care corespund speciilor *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* și *Sarcina lutea* au fost obținute pentru linia verde Hg 5460 Å. Reprezentînd grafic la o scară mai mare, în intervalul $130^\circ < \theta < 160^\circ$, așa cum se vede în fig. 2b, putem totuși observa că speciile studiate au o comportare diferită în ceea ce privește modul în care ele împrășteie lumina naturală.

În fig. nr. 3 avem curbele corespunzătoare pentru speciile *Escherichia coli* și *Staphylococcus albus*. Diagramele au fost înregistrate de data aceasta automat, folosind aceeași linie Hg 5460 Å, în lumină vertical polarizată.

Folosind aceeași frecvență de lucru, pentru unghiuri θ cuprinse între 50° și 170° , în fig. nr. 4 am înregistrat în lumină orizontal polarizată diagramele corespunzătoare speciilor *Staphylococcus aureus* și *Staphylococcus albus*. Disimetria curbelor este practic aceeași pentru ambele specii, singura deosebire fiind aceea că, intensitatea este ceva mai mare pentru specia *Staphylococcus aureus*. Deși curbele sînt foarte asemănătoare, ținînd seama de faptul că abaterile maxime în curent pentru aceste măsurători nu depășesc $0,5 \cdot 10^{-10}$ A, considerăm că diferența obținută este totuși semnificativă. În alte experiențe, în care curbele au fost trasate punct cu punct, folosind citirile de la galvanometrul Multiflex, am obținut aceeași disponere a curbelor.

Dacă o cultură de bacterii este suprainfectată cu o altă specie de microorganisme, se modifică imediat și forma diagramei de împrăștiere. Astfel, în fig. nr. 5 curbele „a” au fost trasate pentru doi germeni de *Staphylococcus aureus* de proveniență diferită, iar curba „b” a fost trasată pentru aceeași specie folosind tulpina clasică de *Staphylococcus Oxford*. Înregistrarea curbelor a fost făcută automat pentru valori θ cuprinse între 40° și 145° , fasciculul incident fiind radiația laser de 6328 Å. Diferența mare de disimetrie care apare, indică prezența unor particule difuzante care diferă prin formă sau dimensiune. Într-adevăr, observațiile noastre la microscopul electronic (fig. nr. 6) au confirmat prezența unor microorganisme în formă de bastonaș, care au infectat accidental tulpina Oxford.

În concluzie, prin înregistrarea diagramei de împrăștiere, avem la îndemnă o metodă fizică care permite identificarea diferitelor specii de bacterii

M. OLARIU ȘI COLAB: IDENTIFICAREA UNOR SPECII DE BACTERII VII
 PRIN METODA ÎMPRĂȘTIERII DIFERENȚIATE A LUMINII MONOCROMATICE

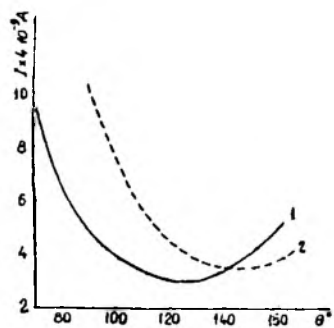


Fig. nr. 1: 1 - *Staphylococcus aureus*; 2 - *Serratia marcescens*

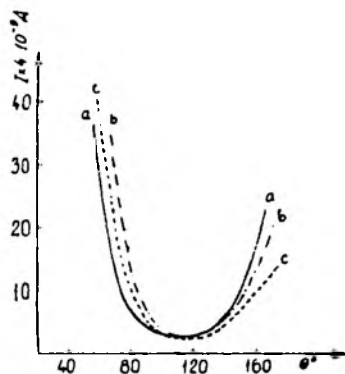


Fig. nr. 2a: a = *Bacillus subtilis*; b = *Candida albicans*; c = *Sarcina lutea*

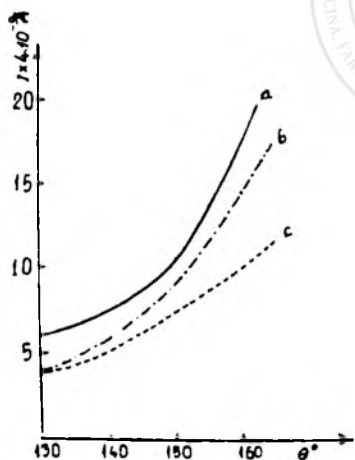


Fig. nr. 2b: a - *Bacillus subtilis*; b - *Candida albicans*; c - *Sarcina lutea*

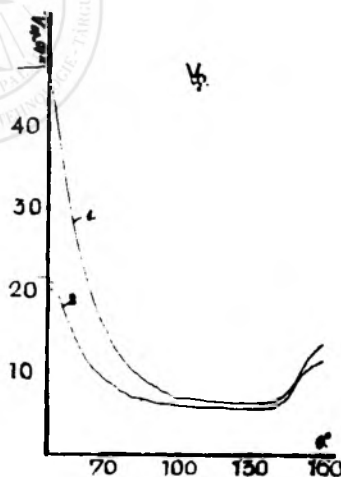


Fig. nr. 3: 1 = *Escherichia coli*; 2 = *Staphylococcus albus*

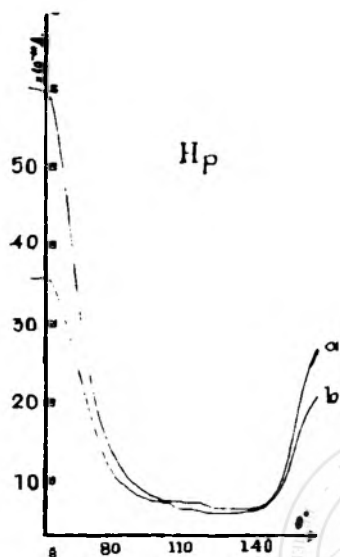


Fig. nr. 4: a = Staphylococcus aureus; b = Staphylococcus albus

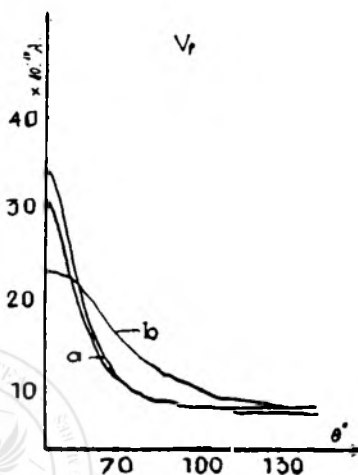


Fig. nr. 5: a = Staphylococcus aureus; b = Staphylococcus aureus, tulpină standard de Oxford suprainfectată



Fig. nr. 6: Staphylococcus aureus — mărime 10 000 — tulpină standard de Oxford suprainfectată

în baza unor diagrame înregistrate anterior. Metoda permite totodată verificarea purității unei culturi de bacterii.*

Sosit la redacție: 8 martie 1972.

Bibliografie

1. WYATT P. J.: Appl. Optics (1968), 7, 1879;
2. WYATT P. J.: Nature (1969), 221, 5187, 1257;
3. WYATT P. J.: Nature (1970), 226, 5242, 227;
4. VAN de HULST H. C.: Light Scattering by Small Particles, John Wiley, New York, 1957;
5. STACEY K. A.: Light Scattering in Physical Chemistry, Butterworths Scientific Publications, London, 1956;
6. KERKER M.: Electromagnetic Scattering, Pergamon Press, Oxford-London-New York-Paris, 1963;
7. WIPPLER C., SCHEIBLING G.: J. Chim. (1954), 51, 201;
8. GHIȚĂ L., GHIȚĂ C.: Studii și cercetări de fizică (1963), 5, 725.