

Artículo original de investigación

Estudio de la radiosensibilidad a radiación gama de *Microcystis panniformis* (cianobacteria)

Erika Cavalcante-Silva^{1,3*}, Talita Carolina Hereman², Valter Arthur⁴, Rafael de Oliveira Andrette^{1,3}, Maria do Carmo Bittencourt-Oliveira², João Dias de Toledo Arruda-Neto^{3,5}

¹USP- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas. Avenida Prof. Lineu Prestes, 1730, Edf. IBC- IV. Ala Norte, sala 3, CEP 05508-9000, São Paulo, SP, Brasil

²USP, ESALQ-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP

³USP, Instituto de Física, São Paulo, SP

⁴USP, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba, SP

⁵FESP- Faculdade de Engenharia de São Paulo, São Paulo, SP

* Autor de correspondencia: erika.cavalcante@gmail.com

Resumen

La alta exposición de los organismos fotoautotróficos a la radiación ultravioleta y a la luz visible originó una selección de cianobacterias que desarrollaron un excelente mecanismo de reparación para los daños causados por la radiación ultravioleta sobre el ADN. Los estudios han demostrado que algunas cianobacterias son muy resistentes a altas y bajas dosis de radiación gamma. El objetivo de este trabajo fue investigar la radioresistencia de una cepa de *Microcystis panniformis* (Komárek *et al.* 2002) (Cyanobacteria) cuando se sometió a altas dosis de radiación gamma, al observar el comportamiento de la curva de supervivencia. El experimento consistió en la irradiación de *M. panniformis* cultivadas en tubos de ensayo. Las curvas de crecimiento (del control) y de supervivencia fueron obtenidas por conteo de células vía óptica microscópica convencional. En ambos casos, los conteos fueron realizados en los tiempos de 24 horas (1^{er} día), 48 horas (2^{do} día) y 120 horas (5^{to} día), cronometrados a partir del final de las irradiaciones. Las curvas de supervivencia fueron analizadas por la sustracción de los resultados a través de una estimación del número de células que se generaron en el tiempo de observación. En el caso de la población irradiada con 4 kGy, se obtuvieron para el 1^{er}, 2^{do} y 5^{to} día las siguientes tasas diarias de muerte celular: 9,92%, 20,27% y 76,40%, respectivamente. Los cultivos irradiados con 5 kGy tuvieron un declive en el número de células de 22,3% y 67% para el 1^o y 2^o día, respectivamente. Para la población irradiada con 6 kGy las tasas diarias de muerte celular fueron mayores, siendo de 88,14% para el 1^{er} día y de 99,94% en el 2^{do} día, para el 5^{to} día, no quedaba ninguna. Esos resultados muestran que la *M. panniformis* es una cianobacteria radioresistente.

Palabras clave: *Cianobacteria, control poblacional, radiación ionizante, radioresistencia, Microcystis.*

Abstract

The high exposition of phototrophics organisms to the ultraviolet radiation and the visible light created a selection of cyanobacterias that developed an excellent mechanism that repair the

damage caused by the ultraviolet radiation in the DNA. Researchs have shown that some cyanobacterias are very resistant to high and low shots of gamma radiation. This work aimed at the radiosensitivity investigation of the axenic strain *Microcystis panniformis* Komárek *et al.* 2002 when submitted to gamma radiation doses of 4, 5 and 6 kGy, by means of its survival curves. In this sense, *M. panniformis* samples from cultivation in tubes were irradiated throughout. Survival curves, and growth curves of the control samples, were obtained by cell counting with a conventional optical microscope. The counting were performed in samples after elapsed times of 24 h (1st day), 48 h (2nd day) and 120 h (5th day), since the end of the irradiations. The survival curves were analyzed after subtracting from each point an estimate of the number of cells, which aroused by reproduction after the observation times. In the case of cell populations irradiated with 4 kGy the following daily cell death rates were obtained: 9.92%, 20.27% and 76.40%, for the 1st, 2nd e 5th observation days, respectively. It was observed in samples irradiated with 5 kGy a decrease in the cell population size between the 1st and the 2nd days of 22.3% to 67%, respectively. For irradiations with 6 kGy, on the other hand, cell death was considerably higher, namely, 88.14% of the initial population in the 1st day, while in the 2nd day nearly the whole population have died (99.94%), and in the 5th day not a single cell was counted. All these results undoubtedly demonstrate that *M. panniformis* is a very radioresistant microorganism.

Keywords: *Cyanobacteria, population control, ionizing radiation, radioresistance, Microcystis.*

1. Introducción

Durante la era Proterozoica, el flujo de la radiación ultravioleta en la superficie de la Tierra fue probablemente alta y la composición espectral diferente. La razón fue la ausencia de la capa de ozono durante el Arqueano y probablemente para la mayoría del proterozoico (Rothschild, 1999). La alta exposición de los organismos fotoautotróficos sometidos a radiación ultravioleta y a la luz visible dio origen a una selección de cianobacterias que desarrollaron un excelente mecanismo de reparación de los daños causados por la radiación ultravioleta sobre el ADN (Sinha, 2008). Según Rothschild (1999), un papel importante de la radiación ultravioleta en la evolución, fue la inducción de efectos mutagénicos. Hay una diferencia entre “los daños al ADN” y “mutación”. “Los daños al ADN” se refieren, por ejemplo, a ruptura de los cromosomas, generación de fotoproductos, etc., llevando a una conformación innatural de la molécula. “Mutación” se refiere a los cambios en las secuencias de ADN, incluyendo reajustes,

sustituciones y supresiones (omisiones) de bases. En otras palabras, la mutación se hereda, mientras que los al ADN no.

Varios estudios han demostrado que algunas cianobacterias son muy resistentes a altas y bajas dosis de radiación gamma (Kraus, 1969; Billi *et al.*, 2000; Asato, 1971). La radiación gamma es una radiación electromagnética como los rayos X o la luz natural, pero con una frecuencia y energía más elevada. Por lo tanto, es una radiación muy penetrante, con aplicaciones en diversos segmentos que la ciencia y la tecnología demandan (Farooq *et al.*, 1993; Thompson and Blatchley, 2000; Sommer *et al.*, 2001; Imamura *et al.* 2002). La radiación provoca daños directos e indirectos en la molécula de ADN. Los efectos directos ocurren cuando el ADN es ionizado por la incidencia de la radiación, mientras que en los efectos indirectos, el ADN es ionizado por los radicales libres producidos por radiólisis del agua en el citosol (Jones *et al.*, 1994; Agarwal, 2008).

El organismo elegido para este estudio fue *Microcystis panniformis* Komárek et al. 2002 (Cyanobacteria, Chroococcales), que es una cianobacteria típica de regiones tropicales encontrada en la superficie de las masas de sistemas de aguas eutróficas.

Se tuvo por objetivo, mediante este trabajo, el investigar la radioresistencia de una cepa de *M. panniformis* al estar sometida a altas dosis de radiación gamma, observando el comportamiento de la curva de supervivencia.

2. Materiales y Métodos

Se recolectó una muestra de agua del embalse de Barra Bonita, ubicado en el estado de São Paulo (22° 32' 34,5" S, 48° 29' 26,4" W), que posee floraciones de *Microcystis panniformis*. El muestreo se realizó a través de un arrastre horizontal sobre la capa superficial del embalse, utilizando una red de plancton de 25 µm de abertura de malla. Una colonia de *M. panniformis* fue aislada en tubos que contienen 10 mL de medio BG-11 (Rippka et al., 1979), utilizando técnicas de micromanipulación con un microscopio (Nikon E200, Melville, NY, USA).

La cepa clonal, no axénica y tóxica de *M. panniformis*, pertenece a la Colección de Cianobacterias de la Universidad de São Paulo (BCCUSP100). La cepa creció en un medio BG-11, bajo condiciones controladas de cultivo en una cámara climatizada con 22 ± 1 °C de temperatura, fotoperíodo 14:10 claro:oscuro e intensidad luminosa de 30±1 µmol.photons.m⁻².s⁻¹ (fotómetro LI-COR, mod. LI-250, con sensor esférico subacuático).

El inóculo fue cultivado en matraces Erlenmeyer y al llegar a la fase de crecimiento exponencial, 40 mL se trasladaron a tubos de ensayo, un día antes

de cada tratamiento. Después de la transferencia a los contenedores, los cultivos se sometieron por triplicado a los siguientes tratamientos: a) irradiación gamma con dosis de 4 kGy durante 6 horas y 27 minutos, equivalente a una tasa de dosis de 0,591 kGy/h; b) irradiación gamma con dosis de 5 kGy durante 8 horas y 3 minutos; y c) irradiación con dosis de 6 kGy durante 9 horas y 41 minutos. Todas las irradiaciones se realizaron en la fuente de Cobalto (⁶⁰Co) modelo Gamma-cell 220, MDS Nordion, Ottawa, Canadá, ubicada en CENA (*Centro de Energia Nuclear na Agricultura*), en la Universidad de São Paulo.

Las muestras fueron recolectadas periódicamente en el tiempo 0 (equivalente a la colecta de la muestra 1 hora antes del tratamiento), 1°, 2° y 5° día. Las mismas se conservaron en una solución de lugol aséptico al 4%. La densidad de las células utilizadas en las curvas de crecimiento y la supervivencia se estimó a partir de haberlas contado en un hemocitómetro *Fuchs Rosenthal* con la ayuda de un microscopio binocular Olympus. Estos resultados se expresaron como número de células por mililitro. El hemocitómetro contiene dos redes de conteos (cuadrantes) donde, para cada red, se establecieron un mínimo de 400 células contadas en tres repeticiones, con el fin de obtener un error de aproximadamente un 10%, con un nivel de confianza del 95% (Guillard, 1973).

Todos los resultados mostrados en las gráficas de cada tratamiento, para el "número de células por mL", fueron normalizados (NC), lo que significa que los resultados obtenidos fueron divididos por los valores en t = 0, el día en que se colectaron las muestras sin la aplicación de los tratamientos (irradiación). Así, los gráficos muestran para t = 0 el valor NC = 1.

3. Resultados

En la Figura 1 se presenta una curva típica de crecimiento de *M. panniformis* en ausencia de estrés, es decir, dosis cero ($D = 0$) y temperatura de 22°C ($T = 22^{\circ}\text{C}$). Las curvas de crecimiento obtenidas por la acción de uno o más estrés se denominaron “curvas de supervivencia”.

Los resultados se exponen en las Figuras 2 y 3, señalando que el tiempo $t = 0$ (medido en días) es el momento en que la muestra fue trasladada a la prueba de tubos, que en este momento no hay exposición a la radiación gamma. Los tratamientos se aplicaron un día después de la transferencia de las células y se realizaron en los días posteriores ($t = 1, 2$ y 5). Se efectuaron tres tipos de tratamientos,

adoptándose la siguiente nomenclatura para los tubos: A - Cultivos irradiados con 4 kGy (durante 6 horas y 27 minutos); B - Cultivos irradiados con 5 kGy (durante 8 horas e 03 minutos); y C - Cultivos irradiados con 6 kGy (durante 9 horas e 41 minutos). La tasa de dosis correspondiente a estas dosis aplicadas fue $0,591 \text{ kGy/h}$. La elección de las dosis superiores o iguales a 4 kGy se debió al hecho de que ya existían resultados con 3 kGy con la misma cepa de *M. panniformis* (BCCUSP100). También se observó que para las dosis más bajas a 3 kGy, el número de muertes de células no es significativa (Arruda-Neto *et al.*, 2009).

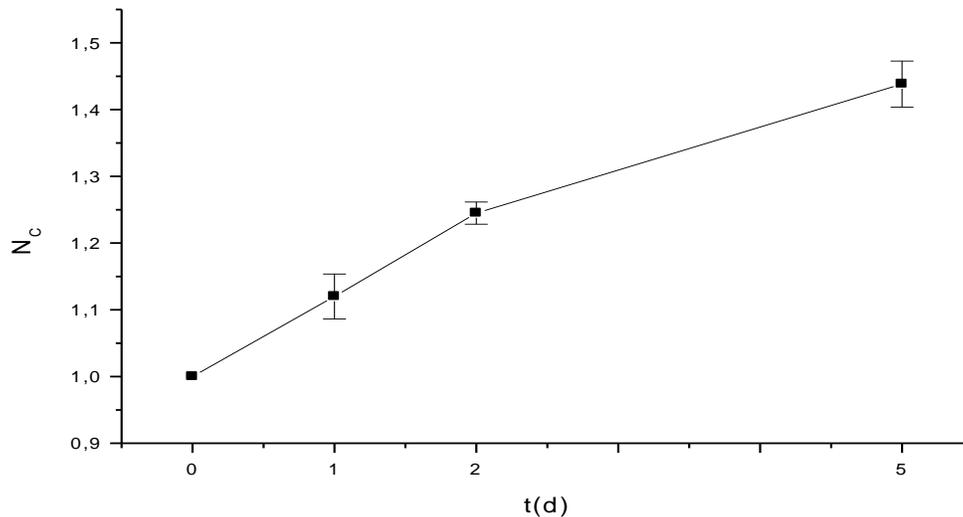


Figura 1. Curva de crecimiento típica de *Microcystis panniformis* en ausencia de estrés ($D=0$).

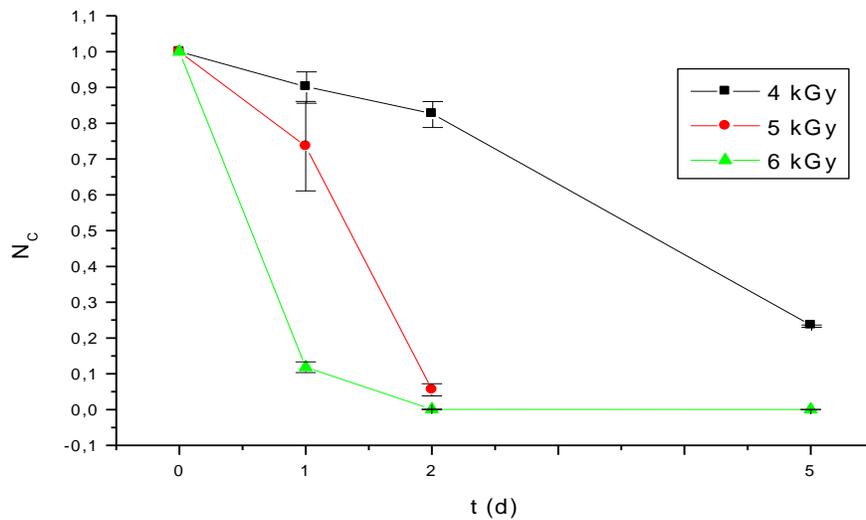


Figura 2. Curva de supervivencia media de los grupos irradiados con dosis de 4kGy, 5kGy y 6kGy.

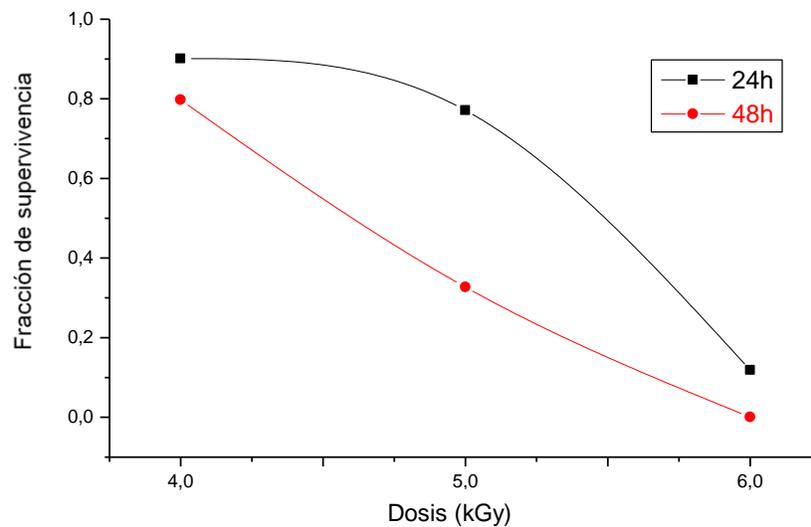


Figura 3. Curva de supervivencia media a radiación con gama con dosis 4, 5 y 6 kGy.

En la figura 2 se muestra el comportamiento de los cultivos después de los 3 tipos de tratamientos con radiación gamma. Veinticuatro horas ($t = 1$) después de la aplicación del tratamiento A se obtuvo 10% de mortalidad, mientras que en el tratamiento B y C esta se elevó por encima del 22,9% y 88,1% respectivamente. Este número aumentó 48 h después de la aplicación del tratamiento ($t=2$), presentándose una mortalidad de 20,3%, 67,3% e 99,9% de muertes para las dosis de 4 kGy, 5 kGy e 6

kGy, respectivamente. La mortalidad aumentó con el paso del tiempo. En el 5° día el tratamiento con 4 kGy mostró un índice de mortalidad de 76,40%, llegando a 99,81% en el 15° día (dato no informado). En el 5° día de tratamiento con 6 kGy el número de muertes fue de 99,99%, y en el 15° día no había evidencias de células vivas. Los cultivos relacionados con el experimento de 5 kGy presentaron la muerte de las células después del 2° día.

La Tabla 1 muestra el número de sobrevivientes por mililitro (cél/mL) de los

tres experimentos realizados en esta prueba y el control.

Tabla 1 - Número de células por mL del control e de los experimentos con 4, 5 y 6 kGy y sus respectivas desviaciones estándar (entre paréntesis).

Tratamiento	Día 1	Día 2	Día 5
Control	6723889 células/mL (0.0337)	7400833 células/mL (0.0167)	8329444 células/mL (0.0345)
Irradiación 4 kGy	5636666 células/mL (0.0437)	4988889 células/mL (0.0362)	1476667 células/mL (0.0030)
Irradiación 5 kGy	6600000 células/mL (0.1250)	2800000 células/mL (0.0170)	-----
Irradiación 6 kGy	1017222 células/mL (0.0149)	0.005052 células/mL (0.0007)	0.000156 células/mL (-----)

4. Discusión

La cepa *Microcystis panniformis* presenta una alta radioresistencia en comparación con otras bacterias y cianobacterias. De hecho, Kraus (1969) observó la resistencia a la radiación de algunas especies de bacterias y cianobacterias, proponiendo el establecimiento de tres categorías relacionadas con LD₉₀: “Sensibles”, “Moderadamente Resistentes” y “Altamente Resistentes”. En la categoría de “Sensibles”, que son las especies que murieron en dosis inferior a 4 kGy, se encuentra la *M. aeruginosa* Kützing. Este resultado contrasta con el resultado obtenido en este trabajo con la *M. panniformis* porque el número de muertes al llegar al LD₉₀ se obtuvieron con la dosis de 6 kGy, 24 horas después de la aplicación de la radiación gamma.

Según la clasificación de Kraus (1969), la cianobacteria aquí estudiada está inmersa en la categoría de “Moderadamente Resistente”, donde la LD₉₀ varía de 4 kGy a 12 kGy. El “hombro de reparación” observado en la Figura 3, durante las 24 horas después del tratamiento con 4 kGy, indica que las

cianobacterias tiene un mecanismo de reparación eficaz. Los mecanismos eficaces de reparación de las cianobacterias eran esperados, puesto sus predecesores se desarrollaron en una atmósfera de radiación ultravioleta (UV) sin restricciones por la falta de la capa de ozono durante la era pre Cambriana (Asato, 1972).

El aumento de las muertes celulares 48 horas después de aplicada la radiación gamma en los tres cultivos lleva a creer que la difusión pasiva de los radicales libres, debido a la hidrólisis del agua causada por la radiación (Alpen, 1991), podría ser uno de los principales responsables de la aparición de mayores daños en las células y, por consiguiente, la continuidad de las muertes después de los tratamientos.

Las dosis aplicadas en la muerte de la *M. panniformis* son consideradas altas, en comparación con los otros organismos procariotas. Estas poseen una alta radioresistencia cuando son comparadas a *Deinococcus radiodurans*, que resiste extraordinariamente a las altas dosis de radiación ionizante, 9 kGy, sin sufrir ningún tipo de mutación (Daly, 1994). Las dosis

más bajas que 3 kGy se han probado previamente en la misma cepa de *M. panniformis* y no mostraron ninguna interferencia en la curva de crecimiento de las cianobacterias (Cavalcante-Silva, 2006).

5. Conclusiones

Microcystis panniformis es una cianobacteria radioresistente. Más concretamente, este microorganismo resiste bien y presenta una alta recuperación a dosis de hasta 4 kGy. Dosis más altas que 4 kGy son eficientes para el control de *M. panniformis*.

6. Reconocimientos

Este estudio fue financiado con los de la FAPESP (06/60096-8 para Cavalcante-Silva, 07/57508-5 para Hereman), CNPq (300794/2004-5 para Bittencourt-Oliveira, 301.613/2008-7 para Arruda-Neto).

7. Referencias

- Agarwal, R., Rane, S.S., Sainis, J.K. 2008. Effects of ^{60}Co γ radiation on thylakoid membrane functions in *Anacystis nidulans*. *J Photochem Photobiol B: Biol.* 91(1):9-19.
- Alpen, E.L. 1991. *Radiation Biophysics*. Prentice-Hall, New Jersey, USA.
- Arruda-Neto, J.D.T., Friedberg, E.C., Bittencourt-Oliveira, M.C., Cavalcante-Silva, E., Schenberg, A.C.G., Rodrigues, T.E., Garcia, F., Louvison, M., Paula, C.R., Mesa, J., Moron, M.M., Maria, D.A. and Genofre, G.C. 2009. Static electric fields interfere in the viability of cells exposed to ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 85: 314-321.
- Asato, Y. 1971. Photorecovery of Gamma Irradiated Cultures of Blue-Green Alga, *Anacystis nidulans*. *Radiat Bot* 11:313-316.
- Asato, Y. 1972. Isolation and characterization of ultraviolet light-sensitive mutants of the blue-green alga *Anacystis nidulans*. *J Bacter* 110(3):1058-1064.
- Billi, D., Fridmann, E.I., Hofer, K.G., Caiola, M.G., Ocampo-Friedmann, R. 2000. Ionising-radiation resistance in the desiccation-tolerant *Cyanobacterium Chroococidiopsis*. *App Environ Microbiol* 66:1489-1492.
- Daly, M.J., Ouyang, L., Fuchs, P., Minton, K.W. 1994. *In vivo* damage and RECA dependent repair of plasmid and chromosomal DNA in the radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *J Bacteriol* 176: 3508-3517.
- Cavalcante-Silva, E. 2006. Controle populacional de *Microcystis panniformis* (cianobacteria) utilizando radiações ionizantes e outros agentes físicos exógenos. Tesis de Maestria (Biotecnologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Brasil 62 pp.
- Farooq, S., Kuruckz, C.N., Waite, D.W., Cooper, W. 1993. Disinfection of waste water: High energy electron vs gamma irradiation. *Water Res* 27(7):1177-1184.
- Guillard, R.R.L. 1973. Division rates. In: Stein, J.R. (ed.) *Handbook of Phycological Methods: Culture methods and growth measurements*. Cambridge University Press, London, UK. 2289 pp.
- Imamura, M., Sawada, S., Kasahara-Imamura, M., Harima, K., Harada, K. 2002. Synergistic cell-killing effect of a combination of hyperthermia and heavy ion beam irradiation: in expectation of a breakthrough in the treatment of refractory cancers. *Int J Mol Medicine* 9:11-18
- Jones, G.D.D., Boswell, T. V., Lee, J., Milligan, J.R., Ward, J.F., Weinfeld, M.A. 1994. Comparison of DNA damages produced under conditions of direct and indirect

- action of radiation. *Int J Radiat Biol* 66 (5):441-445.
- Komarek, J., Kormakova-Legnerova, J., Sant'anna, C.L.M., Azevedo, C.T., Senna, P.S. 2002. Two common *Microcystis* species (Chroococcales, Cyanobacteria) from tropical America, including *M. Panniformis* sp nov. *Cryptogamie Algologie* 23(2):159-177.
- Kraus, M. Resistance of Blue-Green Algae to ⁶⁰CO Gamma Radiation. 1969. *Radiat Bot* 9: 481- 489.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M., Stanier, R.Y. 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J Gen Microbiol*, 111:1-61.
- Rothschild, L.J. 1999. The influence of radiation on protistan evolution. *J Eukaryot Microbiol* 46(5):548-555.
- Sinha, R. P., Hader, D. P. 2008. UV-Protectants in cyanobacteria. *Planet Sci* 174:278-289.
- Sommer, R., Pribil, W., Appelt, S., Gehringer, P., Eschweiler, H., Leth, H., Cabaj, A., Haider, T. 2001. Inactivation of bacteriophages in water by means of non-ionizing (UV-253-7nm) and ionizing (gamma) radiation: A comparative approach. *Water Res* 35(13):3109-3116.
- Thompson, J.A. Blatchley, E.R. 2000. Gamma irradiation for inactivation of *C. parvum*, *E. coli*, and *Coliphage MS-2*. *J Environ Eng* 126(8):761-768.