

Efecto de la temperatura sobre la sensibilidad de células vegetativas de *Bacillus licheniformis* RI 75-1 a cuantos gamma

O. Fernández—Larrea Vega, F. Ríos Brito,
M. Márquez Álvarez y E. Padrón Soler

Centro de Estudios Aplicados al Desarrollo Nuclear
La Habana, Cuba

Resumen

Se conoce que en E. Coli con genotipo salvaje de reparación, el incremento de la temperatura a 42°C–45°C en el momento de la irradiación con cuantos gamma va acompañado de aumentos en la radiorresistencia. A estas temperaturas disminuye significativamente el rendimiento de rompimientos dobles del ADN.

Ha sido reportado que el incremento en la radiorresistencia por aumento de la temperatura de irradiación se debe al estado de la membrana celular.

El presente trabajo estudia el efecto de la temperatura sobre la sensibilidad a cuantos gamma de células vegetativas del Bacillus licheniformis RI 75–1. En esta experiencia fueron empleadas temperaturas de 42°C y 60°C durante la irradiación con cuantos gamma. Se encontró un incremento en la resistencia a 42°C, de acuerdo con las curvas dosis/efecto. Sin embargo, a 60°C se pudo apreciar una depresión de la viabilidad.

El tratamiento térmico previo a la irradiación demostró un aumento de colonias resistentes al compararlas con el control.

Effects of Temperature on Sensitivity of *Bacillus licheniformis* RI 75–1 Vegetative Cells at Gamma Quantum

Abstract

It is known that strains of E. Coli with wild genotype for reparation, when are irradiated at temperature between 42°C and 45°C, shown an increase of radioresistance. At then given temperature the number of double strands breaks of DNA decrease.

Some authors report that the radioresistance increased is due to the elevation of the irradiation temperature is related to the cell membrane status.

The present paper includes reports on the effects of increased temperature on the sensitivity—at gamma quantum—of Bacillus licheniformis RI 75–1 vegetative cells. Temperatures of 42°C and 60°C during irradiation were employed. An increased in radioresistance was found when the temperature of irradiation was increased to 42°C. However, a decrease in viability was observed.

Heat treatment prior to irradiation showed an increase in the number of radioresistance colonies when compared,

INTRODUCCION

Se ha demostrado que la irradiación con rayos gamma en *E. coli* con genotipo salvaje de reparación a temperaturas entre 40°C y 45°C conduce a un incremento de la radiorresistencia a causa, según Bresler y col. [1], de una disminución significativa de los rompimientos dobles en el ADN asociado a la membrana celular. De igual forma, se reportan aumentos en la radiorresistencia en cultivos de *E. coli* irradiados con rayos X a temperaturas inferiores a 0°C [2, 3], lo cual se debe, según estos autores, a una inmovilización de los radicales tóxicos producidos durante la irradiación.

Zhestyanikov [4] encuentra que la reparación a 44°C en cultivos de *E. coli* irradiados con rayos gamma resulta más eficiente a temperaturas entre 25°C y 35°C. Esto con-

cuerda con lo reportado por Pallas y col. [5] en cultivos de *Staphylococcus aureus* y células vegetativas de *Bacillus subtilis* irradiados con rayos gamma, los cuales fueron más resistentes cuando la irradiación se llevó a cabo a temperaturas entre 35°C y 45°C que cuando se efectuó entre 25°C y 35°C.

Una relación directa entre la radiorresistencia y la termorresistencia se ha hallado en diferentes cepas de microorganismos [6, 7, 8]. Esto ha sido empleado en la inducción de capas de microorganismos más radiorresistentes, aplicando choques térmicos previos a la irradiación [9, 10].

Diversos autores relacionan la radiorresistencia termoinducida con el genotipo reparativo de la cepa en cuestión. Bresler y col. [1] plantean que este efecto fue disminuido en cepas deficientes en reparación por recombinación y

excisión, y eliminado totalmente en mutantes rec A^- , lo que concuerda con Samoilenko [11] cuando, al irradiar *M. radiodurans* y células vegetativas de *Bacillus subtilis*, las cepas salvajes para la reparación fueron más resistentes a la temperatura que los mutantes deficientes en algún sistema reparativo.

A diferencia de los autores anteriormente citados, Okazawa [12] reporta que el incremento de la radiosensibilidad por calentamiento simultáneo a temperaturas superiores a 60°C fue independiente del genotipo reparativo.

En el presente trabajo se estudia el efecto de la temperatura sobre la radiosensibilidad del *Bacillus licheniformis* RI 75-1 con genotipo salvaje de reparación.

MATERIALES Y METODOS

Microorganismo y su cultivo. Fue empleada la cepa de *Bacillus licheniformis* RI 75-1 con genotipo salvaje de reparación. Los cultivos de células vegetativas se obtuvieron en caldo nutriente, después de 18 horas de incubación a 37°C.

Los cultivos así logrados fueron centrifugados a 6000 rpm durante 20 minutos. Los *pellets* se lavaron dos veces con solución salina de NaCl al 0,85%.

La suspensión final se obtuvo resuspendiendo los *pellets* en solución salina de NaCl al 0,85%, hasta obtener una concentración final de 10^6 células/ml.

Irradiación. La irradiación se llevó a cabo en una fuente gamma Co^{60} modelo MRX- γ -25 M de fabricación soviética con una potencia de dosis de 0,32 Gy/seg (según dosimetría de Frickie). Las temperaturas de 42°C y 60°C se consiguieron mediante un baño termostático acoplado a la fuente. Se emplearon tubos de irradiación de volumen y geometría iguales, y se añadió a cada uno 2 ml de suspensión de células.

Las dosis utilizadas fueron de 0,13; 0,26; 0,76; 1,2 y 1,8 kGy.

Conteo de viables. Se realizó por medio de diluciones seriadas y siembra a profundidad en agar nutriente. Las colonias fueron contadas después de 48 horas de incubación a 37°C.

Resistencia a temperatura. Se determinó la resistencia a temperatura tratando suspensiones de células vegetativas en solución salina de NaCl al 0,85%, 42°C y 60°C durante 30 y 90 minutos, para lo cual se empleó un baño termostático. La sobrevivencia de las suspensiones se logró por conteo de viables.

Determinación de radorresistencia. Se prepararon placas con agar nutriente y se sembraron 50 colonias por placa con palillos estériles. Las placas se incubaron a 37°C duran-

te 18 horas. Las colonias crecidas se replicaron aplicando pana estéril a placas de agar nutriente, las cuales fueron irradiadas con una dosis de 5 kGy antes de incubarse a 37°C durante 24 horas. Se determinó el porcentaje de colonias crecidas.

Choque térmico. Se trataron suspensiones de 10^6 cél/ml en solución salina de NaCl al 0,85% durante 15 minutos. Las suspensiones se resuspendieron en 50 ml de caldo nutriente y se incubaron a 37°C durante 18 horas. Alícuotas del cultivo obtenido se sembraron por diseminación con espátula de Drygalsky en placas con agar nutriente. Se incubaron a 37°C durante 24 horas.

Análisis de resultados. Se realizó el ajuste de las curvas por mínimos cuadrados. Los valores D_{10} y FDD_{10} se determinaron según Kulinsky (1982).

RESULTADOS Y DISCUSION

La figura 1 muestra las curvas dosis/efecto al irradiarse con cuantos gamma cultivos de células vegetativas del *Bacillus licheniformis* RI 75-1 a temperatura ambiente entre 26°C y 28°C.

En la tabla 2 se dan valores D_{10} y FDD_{10} (factor de disminución de la dosis) para cada caso.

Existen incrementos en la resistencia cuando la temperatura de irradiación aumenta a 42°C, lo cual concuerda con lo reportado por Zhestyanikov [4] y Bresler y col. [13] en cultivos de *E. coli*, así como con lo encontrado por Pallas [5] en *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*.

Sin embargo, el incremento de la temperatura de irradiación a 60°C solo influye ligeramente en la respuesta de esta cepa a los rayos gamma, lo que se demuestra por la tendencia de la figura 1 así como por el valor del FDD_{10} que es cercano a 1.

Okazawa [12] plantea que por encima de 60°C la radiosensibilidad se ve aumentada en microorganismos expuestos a radiaciones ionizantes, independientemente del genotipo reparativo que posean. En nuestro caso, a la temperatura de 60°C no hallamos ese efecto.

Teniendo en cuenta lo reportado por Casalari [6], Samoilenko [7] y Gaumuillina [8] con relación a que cepas de microorganismos termorresistentes muestran una elevada resistencia a las radiaciones ionizantes, sometimos la cepa de estudio a temperaturas de 42°C y 60°C durante 30 y 90 minutos. Encontramos que a 42°C se mantiene el crecimiento, mientras que a 60°C solo se da una disminución del 20% de la viabilidad después de 90 minutos de tratamiento. Estos resultados indican que las células vegetativas de dicha cepa son termorresistentes, ya que se emplean temperaturas entre 60°C y 80°C durante 15-30 minutos para eliminar

totalmente células vegetativas en cultivos esporulados de diferentes especies del género *Bacillus* [14, 15].

El tratamiento a 60°C previo a la irradiación de una dosis de 3 kGy, permitió un incremento de 30% en el número de colonias radorresistentes obtenidas. Estos resultados pueden verse en la tabla 2.

Tratamientos térmicos previos a la irradiación han sido empleados por Mitchel [9, 10] para la selección de cepas de levaduras más resistentes a radiaciones ionizantes.

Trabajos encaminados a determinar el papel de las membranas celulares en el efecto combinado de irradiación gamma y temperatura en nuestra cepa, no fueron realizados; sin embargo, el hecho de que la cepa de *Bacillus licheniformis* RI 75-1 presente genotipo salvaje de reparación y de que los resultados obtenidos por nosotros concuerden con lo encontrado por Samoilenko [11] y Bresler y col. [13] en otras especies microbianas, nos hacen pensar que estos mecanismos pueden resultar comunes para aquellas especies microbianas que poseen mecanismos de reparación completos.

Estudios encaminados a confirmar el papel de la reparación en el efecto de la temperatura durante la irradiación de la especie *Bacillus licheniformis*, deben abordarse empleando variantes deficientes para la reparación.

CONCLUSIONES

1. La cepa *Bacillus licheniformis* RI 75-1 muestra incrementos en la resistencia a rayos gamma cuando se irradia a 42°C. A 60°C se observa una ligera disminución de la sobrevivencia.
2. El tratamiento previo a la irradiación gamma con temperatura de 60°C durante 15 minutos, permite un aumento en el porcentaje de colonias radorresistentes del *Bacillus licheniformis* RI 75-1.

Tabla 1

Resultados obtenidos durante el tratamiento previo a la irradiación
Valores D_{10} y $FDD_{D_{10}}$ obtenidos 42°C-60°C

Tratamiento	D_{10}	$FDD_{D_{10}}$
Temperatura ambiente (26°C ± 2°C)	1,41 kGy	—
42°C	4,38 kGy	3,10
60°C	1,43 kGy	1,01

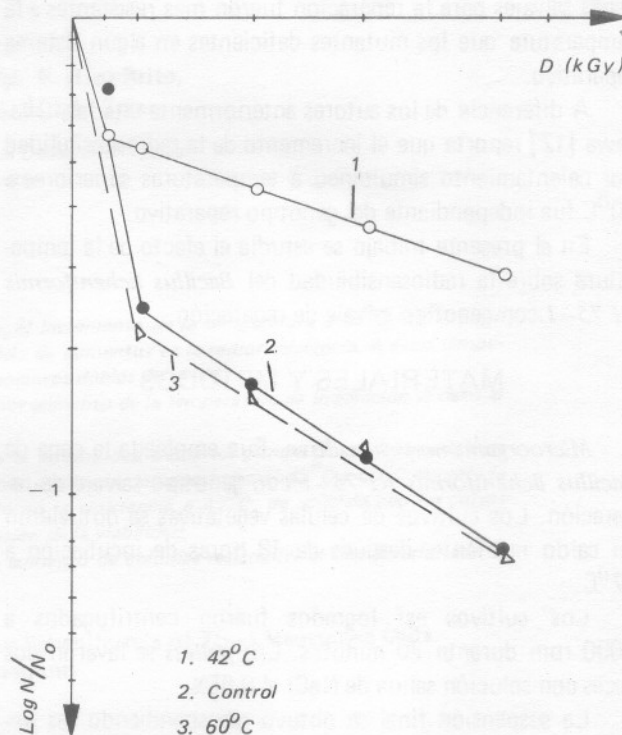


Fig. 1. Curvas dosis/efecto al irradiar células vegetativas de *Bacillus licheniformis* RI 75-1 con rayos gamma a diferentes temperaturas.

Tabla 2

Resultado de inducción de radorresistencia por tratamiento térmico a 60°C, durante 15 minutos

	Total de colonias	Colonias resistentes (3 kGy)	Porcentajes
Control	500	280	56
Con tratamiento térmico	500	436	87,3

BIBLIOGRAFIA

- [1] BRESLER, S. E., BEKETOVA, A. G., *Radiobiologiya* 24, 5 (1984) 579.
- [2] SANNER, T., PIAL, A., *Radiat. Res.* 37 (1969) 216.
- [3] DIGILOVA, S., RABILSKAYA, G., *Radiobiologiya*, 22, 1 (1982) 120.
- [4] ZHESTYANIKOV, V. D., VIZDALOVA, M., *Stud. Biophys.*, 59, 2 (1976) 101.
- [5] PALLAS, J. E., HAMDY, M. K., *Appl. Environ. Microbiol.*, 32, 2 (1976) 250.
- [6] CASALARI, A., CAMPANINI, M., *Ind. Conserve.*, 44, 3 (1969) 199.
- [7] SAMOILENKO, I. I., IVANOV, K., *Zh. Mikrobiol. Epidemiol.*, 2 (1972) 113.
- [8] GAIMUILLINA, S. M., *Radiobiologiya*, 28, 6 (1978) 910.
- [9] MITCHEL, R. E., MORRISON, A. P., *Radiat. Res.*, 90, 2 (1982) 284.
- [10] MITCHEL, R. E., MORRISON, A. P., *Radiat. Res.*, 96, 1 (1983) 95.
- [11] SAMOILENKO, I. I., *Radiobiologiya*, 23, 1 (1983) 21.
- [12] OKAZAWA, Y., MATSUYAMA, A., *Variation of Combined Heat Irradiation Effects on Cells. IAEA. Proceedings Series, ISBN 92-0-012786 (1978).*
- [13] BRESLER, S. E., BEKETOVA, A. G., *Radiobiologiya*, 24, 5 (1984) 584.
- [14] CYR, H. W., POLLARD, C., *Radiat. Res.*, 52 (1972) 409.
- [15] KULINSKY, V. T., *Radiobiologiya*, 22, 3 (1982) 323.