

Influencia de la salinidad sobre crecimiento y composición bioquímica de la cianobacteria *Synechococcus* sp.

Influence of salinity on the growth and biochemical composition of the cyanobacterium *Synechococcus* sp.

Néstor Rosales

José Ortega

Roberta Mora

Ever Morales*

Departamento de Biología
Facultad Experimental de Ciencias
La Universidad del Zulia
Bloque A-1, Grano de Oro, Av. Universidad
Apartado 526
Maracaibo, Venezuela

* E-mail: everm@iamnet.com

Recibido en septiembre de 2004; aceptado en diciembre de 2004

Resumen

El estudio de cianobacterias aisladas de ambientes hipersalinos es de interés debido a su versatilidad metabólica y ecofisiológica para adaptarse a condiciones extremas de salinidad, temperatura, irradiancia y limitación de nutrientes. Se reporta el efecto de la salinidad a 0‰, 35‰, 70‰ y 100‰ sobre el crecimiento, masa seca y producción de pigmentos, proteínas, carbohidratos y lípidos de la cianobacteria *Synechococcus* sp. Los bioensayos fueron mantenidos con medio ALGAL equivalente a 8 mM NaNO₃, aireación constante, fotoperiodo 12:12 h, 28 ± 2°C y 156 μmol quanta m⁻² s⁻¹ de irradiancia. La cianobacteria fue capaz de crecer bajo todas las salinidades probadas. La densidad celular fue mejorada a 35‰, con 607.64 ± 14.35 cél mL⁻¹. A 100‰ se alcanzaron los máximos valores de masa seca, clorofila *a*, β-caroteno, zeaxantina, proteínas y carbohidratos con 3.87 ± 0.03 ng cél⁻¹; 41.86 ± 0.39 fg cél⁻¹; 9.03 ± 0.15 fg cél⁻¹; 9.74 ± 0.24 fg cél⁻¹; 1.95 ± 0.05 y 1.80 ± 0.05 pg cél⁻¹, respectivamente. Sin embargo, el mayor contenido de lípidos fue alcanzado a 0‰ con 0.45 ± 0.04 pg cél⁻¹. Esta cepa halotolerante de la cianobacteria *Synechococcus* muestra capacidad para modular la producción de biomasa enriquecida con pigmentos, proteínas, carbohidratos y lípidos en función de la salinidad.

Palabras clave: cianobacteria, crecimiento, HPLC, nutrientes, nitrato, pigmentos, exopolisacáridos, salinidad, *Synechococcus*.

Abstract

The study of cyanobacteria isolated from hypersaline environments is of interest because of their metabolic and ecophysiological versatility in adapting to extreme conditions of salinity, temperature, irradiance and nutrient availability. The effect of salinity at 0‰, 35‰, 70‰ and 100‰ on the growth, dry weight, and pigment, protein, carbohydrate and lipid production of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. was determined. Bioassays were kept in ALGAL medium equivalent to 8 mM NaNO₃, constant aeration, 12:12 h photoperiod, 28 ± 2°C and 156 μmol quanta m⁻² s⁻¹ of irradiance. The cyanobacterium was able to grow under all salinities tested. Cell density was optimized at 35‰, with 607.64 ± 14.35 cells mL⁻¹. The highest values of dry weight (3.87 ± 0.03 ng cell⁻¹), chlorophyll *a* (41.86 ± 0.39 fg cell⁻¹), β-carotene (9.03 ± 0.15 fg cell⁻¹), zeaxanthin (9.74 ± 0.24 fg cell⁻¹), proteins (1.95 ± 0.05 pg cell⁻¹) and carbohydrates (1.80 ± 0.05 pg cell⁻¹) were obtained at 100‰; however, the highest lipid content (0.45 ± 0.04 pg cell⁻¹) was reached at 0‰. This *Synechococcus* strain shows halotolerance and the capacity to modulate the production of enriched biomass with pigments, proteins, carbohydrates and lipids in terms of salinity.

Key words: cyanobacterium, growth, HPLC, nutrients, nitrate, pigments, exopolysaccharides, salinity, *Synechococcus*.

Introducción

Las cianobacterias son un grupo de microorganismos fotosintéticos con características fisiológicas y morfológicas

Introduction

Cyanobacteria are a group of photosynthetic microorganisms with specific physiologic and morphologic characteristics

específicas que les permiten adaptarse a cambios ambientales (Tandeau De Marsac y Houmard, 1993; Liotenberg *et al.*, 1996). Algunas especies son capaces de sobrevivir bajo condiciones ambientales extremas, como en desiertos, aguas termales y lagos alcalinos (Morvan *et al.*, 1997; Oren, 2000).

Las cianobacterias han sido descritas como fuentes útiles de clorofilas, carotenoides, ficobiliproteínas, exopolisacáridos, proteínas y otros metabolitos biológicamente activos (Borowitzka, 1995; Ventosa y Nieto, 1995; Lagarde *et al.*, 2000). Este potencial biotecnológico parece incrementarse en cepas que pueden tolerar condiciones extremas de salinidad para evitar parcialmente la competencia de otros organismos menos tolerantes. Así, los organismos halotolerantes son candidatos muy atractivos para su cultivo en masa en ambientes hipersalinos o áridos con gran radiación solar, que no serían utilizables para algún otro tipo de cultivo (Ben-Amotz y Avron, 1983; Rodríguez, 1992).

El crecimiento de cianobacterias en ambientes acuáticos está controlado por una variedad de factores ambientales y, para su cultivo, son necesarias condiciones adecuadas de nutrientes, temperatura, pH e iluminación (Abalde *et al.*, 1995; Kebede y Ahlgren, 1996). El conocimiento de sus características fisiológicas y bioquímicas en cultivos de laboratorio, en un amplio rango de parámetros, puede ayudar no sólo a determinar su potencial biotecnológico sino también a determinar e interpretar de manera más eficiente los resultados adquiridos del crecimiento de estos microorganismos en su ambiente natural.

Es de interés la evaluación de la posible capacidad halotolerante o el comportamiento halofílico en cianobacterias aisladas de ambientes marinos. Por ejemplo, las cianobacterias capaces de crecer tanto en medios salinos como no salinos, muestran una mayor probabilidad de colonizar diversos ambientes acuáticos, comparados con aquellos que son estrictamente de aguas dulces o halófilos.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el crecimiento, masa seca y producción de pigmentos, proteínas, carbohidratos y lípidos de una cepa de *Synechococcus*, aislada de un ambiente hipersalino a diferentes salinidades en condiciones de laboratorio.

Materiales y métodos

Material biológico

La cianobacteria marina *Synechococcus* sp. (Komárek y Anagnostidis, 1999) fue aislada del pozo de agua Salina Rica, ubicado en las coordenadas geográficas 10°47' N y 71°38' O al norte de la ciudad de Maracaibo, Venezuela. Dicho cuerpo de agua se caracteriza por ser hipersalino, de muy baja profundidad y por ser utilizado para la recolección de sal en época de sequía. Esta cepa de *Synechococcus* se presenta en células solitarias ovoides o cilíndricas, con $3.57 \pm 0.12 \mu\text{m}$ de largo y $1.47 \pm 0.09 \mu\text{m}$ de ancho, o formando tricomas de hasta 10 células.

that allow them to adapt to environmental changes (Tandeau de Marsac and Houmard, 1993; Liotenberg *et al.*, 1996). Some species are able to survive under extreme environmental conditions like deserts, thermal waters and alkaline lakes (Morvan *et al.*, 1997; Oren, 2000).

Cyanobacteria have been described as useful sources of chlorophyll, carotenoids, phycobiliproteins, exopolysaccharides, proteins and other biologically active metabolites (Borowitzka, 1995; Ventosa and Nieto, 1995; Lagarde *et al.*, 2000). This biotechnological potential seems to increase in strains that can tolerate extreme saline conditions to partially avoid competition from other, less tolerant organisms. Thus, halotolerant organisms are very attractive candidates for their mass culture in hypersaline or arid environments with great solar radiation, otherwise not usable for other types of cultures (Ben-Amotz and Avron, 1983; Rodríguez, 1992).

The growth of cyanobacteria in aquatic environments is controlled by a variety of environmental factors, and appropriate nutrient, temperature, pH and light conditions are necessary for their culture (Abalde *et al.*, 1995; Kebede and Ahlgren, 1996). Knowledge of their physiological and biochemical characteristics in laboratory cultures, in a wide range of parameters, not only helps to determine their biotechnological potential, but also to determine and interpret in a more efficient way the results of the growth of these microorganisms in their natural environment.

It is interesting to evaluate the possible halotolerant capability or halophilic behavior in cyanobacteria isolated from marine environments. For example, cyanobacteria capable of growing in both non-saline and saline waters show a higher probability of colonizing different aquatic environments, compared to those that are strictly freshwater or halophile organisms.

The aim of this work was to evaluate the growth, dry weight, and pigment, protein, carbohydrate and lipid production of a *Synechococcus* strain, isolated from a hypersaline environment, at different salinities under laboratory conditions.

Materials and methods

Biological material

The marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. (Komárek and Anagnostidis, 1999) was isolated from the Salina Rica pond (10°47' N, 71°38' W) in the north of Maracaibo, Venezuela. This body of water is hypersaline and very shallow, and is used to gather salt in the dry season. This strain of *Synechococcus* occurs in oval or cylindrical solitary cells, $3.57 \pm 0.12 \mu\text{m}$ long and $1.47 \pm 0.099 \mu\text{m}$ wide, or forming trichomes with 2–4 (10) cells.

Culture conditions

Cultures, in triplicate, were maintained in 350-mL flasks, containing 150 mL of ALGAL culture medium with a nitrate

Condiciones de cultivo

Los cultivos por triplicado se realizaron en frascos de 350 mL, con 150 mL de medio de cultivo ALGAL, a una concentración de nitrato de 8 mM (Fábregas *et al.*, 1984). Los frascos fueron inoculados a una densidad celular de 15×10^6 cél mL⁻¹, equivalente a una absorbancia de 0.08 a 750 nm, y mantenidos a $29 \pm 2^\circ\text{C}$, con aireación constante de 5 mL s⁻¹, fotoperiodo luz/oscuridad 12:12 h y 156 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiancia con lámparas fluorescentes.

Los cultivos no salinos fueron llevados a cabo con agua destilada y los cultivos salinos con agua de mar, a los cuales se les ajustó la salinidad con agua destilada o NaCl (Baker) a las salinidades probadas de 0‰, 35‰, 70‰ y 100‰.

Los cultivos se mantuvieron durante 24 días, utilizando como inóculo células crecidas a 35‰ y sin adaptación previa al resto de las salinidades. La toma de muestras se realizó el día 12 de cultivo para los tratamientos de 0–70‰ y a los días 12 y 21 para el tratamiento de 100‰, durante la fase estacionaria.

Análisis de la biomasa

La densidad celular fue determinada por recuento en microscopio, usando un hematocitómetro Neübauer. La biomasa fue cosechada por centrifugación a $18 \times 10^3 g$ por 15 min. La biomasa congelada, almacenada a -20°C , fue usada para todos los análisis bioquímicos, excepto para el contenido de pigmentos, donde se utilizó biomasa fresca. La masa seca fue determinada utilizando un sistema de filtración Millipore®, con filtros de fibra de vidrio de 0.45 μm de poro, por el método de Utting (1985).

Análisis bioquímico

El contenido de proteína fue determinado por el método de Lowry-Folin (Lowry *et al.*, 1951) modificado por Herbert *et al.* (1971). Los pigmentos fueron determinados por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) usando el método descrito por Vidussi *et al.* (1996). Se utilizó para ello una columna Agilent Hypersil MOS (4.6 $\times$ 100 mm, 5 μm de tamaño de partícula), con estándares para la calibración y cuantificación de los pigmentos (clorofila *a* y β -caroteno de Sigma; zeaxantina de DHI Water & Environment). El solvente utilizado fue una mezcla de metanol (A) y acetato de amonio al 75% (B), con una elusión por gradiente con la siguiente relación: min 1, 50% de A y 50% de B; min 15, 100% de B; min 18, 100% de B; y min 19, 75% de A y 25% de B.

Los carbohidratos fueron medidos por el método de fenol-ácido sulfúrico (Kochert, 1978). El contenido de lípidos fue determinado por el método de carbonización simple (Marsh y Weinstein, 1966) luego de una extracción lipídica (Bligh y Dyer, 1959).

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo con el programa SPSS para Windows versión 11.0, usando un análisis de

concentración de 8 mM (Fábregas *et al.*, 1984). Flasks were inoculated at a cell density of 15×10^6 cells mL⁻¹, equivalent to an absorbance of 0.08 at 750 nm, and maintained at $29 \pm 2^\circ\text{C}$, constant aeration of 5 mL s⁻¹, 12:12 h light/dark photoperiod and 156 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of irradiance with fluorescent lamps.

Non-saline cultures were carried out using distilled water and saline cultures with seawater; they were adjusted with distilled water or NaCl (Baker) to the tested salinities of 0‰, 35‰, 70‰ and 100‰.

Cultures were maintained for 24 days, using as inoculum cells grown at 35‰ and without previous adaptation to the other salinities. Samples were taken on day 12 of culture for the 0‰, 35‰ and 70‰ treatments, and on days 12 and 21 for the 100‰ treatment, during stationary phase.

Biomass analyses

Cell density was determined by microscope counting using an improved Neübauer haematocytometer. Biomass was harvested by centrifugation at $18 \times 10^3 g$ for 15 min. Frozen biomass samples, stored at -20°C , were used for all the biochemical analyses, except for pigment content, for which fresh biomass samples were used. Dry weight was determined using a Millipore® filtration system, with 0.45- μm fiberglass filters, according to the method of Utting (1985).

Biochemical analyses

Protein content was determined by the Folin-Lowry method (Lowry *et al.*, 1951) modified by Herbert *et al.* (1971). Pigments were measured by high performance liquid chromatography (HPLC) using the method described by Vidussi *et al.* (1996). An Agilent Hypersil MOS column (4.6 $\times$ 100 mm, 5- μm particle size) was used, with standards for the identification and quantification of pigments (chlorophyll *a* and β -carotene from Sigma, and zeaxanthin from DHI Water & Environment). The solvent used was a mixture of methanol (A) and ammonium acetate to 75% (B), with a gradient elution as follows: min 1, 50% A and 50% B; min 15, 100% B; min 18, 100% B; and min 19, 75% A and 25% B.

Carbohydrates were measured by the phenol-sulfuric acid method (Kochert, 1978). Lipid content was determined by the charring method (Marsh and Weinstein, 1966) after lipid extraction (Bligh and Dyer, 1959).

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using SPSS for Windows 11.0, using analysis of variance (ANOVA) and Sheffé's test to examine differences between different salinities.

Results and discussion

This strain of *Synechococcus* grew at all salinities tested, even in non-saline medium (fig. 1). In stationary phase, the

varianza (ANOVA) y la prueba de Sheffé para examinar las diferencias entre los tratamientos.

Resultados y discusión

La cepa de *Synechococcus* creció a todas las salinidades evaluadas, aún en medio no salino (fig. 1). En fase estacionaria, la mayor densidad celular de $607.64 \pm 14.35 \times 10^6$ cél mL⁻¹ se obtuvo a 35‰, y la menor a 100‰ con $192.7 \pm 13.58 \times 10^6$ cél mL⁻¹ con diferencias significativas ($P < 0.05$); aunque, la fase estacionaria de estos cultivos fue más larga (fig. 1). Estos resultados muestran que el crecimiento de la cianobacteria en función de la salinidad, sigue este orden: 35‰ > 70‰ > 0‰ > 100‰.

Aunque esta cepa de cianobacteria, aislada de un pozo hipersalino, ha sido mantenida a 35‰ y sin exposición previa a un ambiente no salino, alcanzó una densidad celular de $411.84 \pm 9.39 \times 10^6$ cél mL⁻¹ en agua dulce; lo cual representa el 67.6% de la salinidad óptima de 35‰. Por otro lado, los tratamientos de 0‰ y 70‰ no mostraron una fase de adaptación, mientras que el tratamiento de 100‰ no mostró una fase logarítmica bien diferenciada, alcanzando la fase estacionaria el día 12 de cultivo. El resto de los tratamientos iniciaron su fase estacionaria el día 9 de cultivo (fig. 1).

El hecho de que *Synechococcus* sp. muestre un excelente crecimiento en agua dulce sugiere una alta eficiencia para colonizar ambientes no salinos. Sin embargo, el que alcance una máxima producción de biomasa en un ambiente marino puede ser un indicador de un requerimiento de las sales inherentes al agua de mar.

El amplio rango de salinidad bajo el cual puede crecer esta cepa puede estar relacionado con la variación de salinidad en su hábitat, de acuerdo a las estaciones seca y húmeda. Por ejemplo, 16 aislados de la cianobacteria *Nodularia*, aisladas de algunos lagos de la Columbia Británica, crecieron entre 1‰ y 60‰ de salinidad con un máximo en 5–10‰; sugiriendo que ellas están restringidas a lagos salobres con cambios extremos de salinidad, de acuerdo a la estación (Nordin y Stein, 1980). En *Aphanothece* sp. se ha descrito una rápida adaptación a la salinidad entre 34‰ y 174‰ debido a su capacidad halotolerante (Berland *et al.*, 1989).

La mayor masa seca fue obtenida en los cultivos a 100‰ y con diferencias significativas ($P < 0.05$; fig. 2). El efecto de elevadas salinidades sobre la masa seca se ha reportado en *Synechococcus* sp., aislada de las salinas de Araya, Venezuela; con un incremento del volumen celular y disminución de la tasa de crecimiento con una concentración de NaCl de hasta 175‰ (Díaz y Reyes, 1990, 1992).

De igual forma, un incremento en la salinidad produce una disminución en la tasa de crecimiento hasta 0.25 d^{-1} para 100‰, lo cual corresponde a una reducción del 50% en relación con la tasa de crecimiento máxima alcanzada a 35‰ (fig. 2). Así, bajo estas condiciones, las células tienden a poseer un mayor tamaño y una mayor producción y acumulación de metabolitos, aunque no son capaces de crecer tan rápido (Rosales *et al.*, 2004).

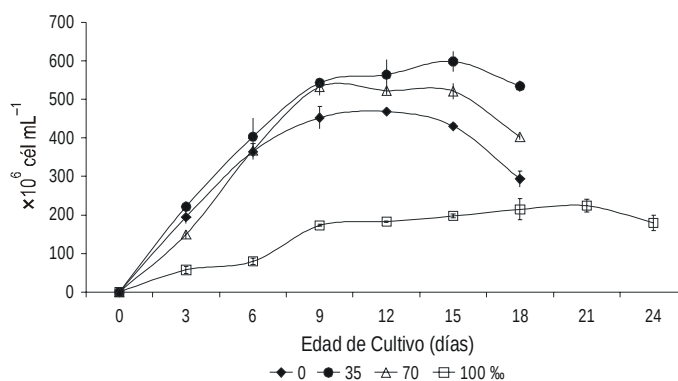


Figura 1. Curva de crecimiento ($\times 10^6$ cél mL⁻¹) de la cianobacteria *Synechococcus* sp. a diferentes salinidades.

Figure 1. Growth ($\times 10^6$ cells mL⁻¹) of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. at different salinities.

greatest cell density of $607.64 \pm 14.35 \times 10^6$ cells mL⁻¹ was obtained at 35‰, and the lowest of $192.7 \pm 13.58 \times 10^6$ cells mL⁻¹ at 100‰, with significant differences ($P < 0.05$); however, the stationary phase of the latter cultures was longer (fig. 1). These results show that growth of the cyanobacterium in terms of salinity follows this order: 35‰ > 70‰ > 0‰ > 100‰.

Even though this strain of cyanobacterium, isolated from a hypersaline pond, was maintained at 35‰ and without previous exposure to a non-saline environment, it reached a cell density of $411.84 \pm 9.39 \times 10^6$ cells mL⁻¹ in freshwater; this represents 67.6% of the optimum saline level of 35‰. On the other hand, the 0‰ and 70‰ treatments did not show a phase of adaptation, while the 100‰ treatment did not show a noticeable logarithmic phase, reaching the stationary phase on day 12 of culture. The rest of the treatments began the stationary phase on day 9 of culture (fig. 1).

The fact that *Synechococcus* sp. shows excellent growth in freshwater suggests a high efficiency in colonizing non-saline environments. However, the fact that it attains maximum biomass production in a marine environment may be an indication of a requirement of inorganic salts inherent to seawater.

The wide range of salinity under which this strain of cyanobacterium can grow may be related to the variation of salinity in the habitat depending on the rainy or dry season. For instance, 16 strains of the cyanobacterium *Nodularia*, isolated from some lakes of British Columbia, grew in salinities between 1‰ and 60‰, with maximum in 5–10‰. This suggests that they are restricted to brackish lakes with extreme changes in salinity, according to the season (Nordin and Stein, 1980). A rapid adaptation to salinity between 34‰ and 174‰ has been described for *Aphanothece* sp. due to its halotolerant capability (Berland *et al.*, 1989).

Highest dry weight was obtained in cultures at 100‰, with significant differences ($P < 0.05$; fig. 2). The effect of high salinities on dry weight has been reported for *Synechococcus* sp. isolated from the Araya saltworks, Venezuela, with an

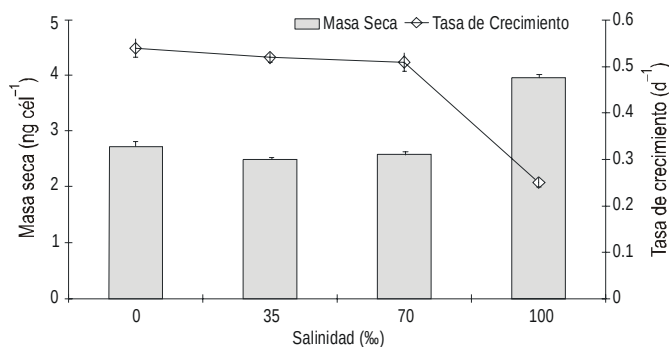


Figura 2. Variaciones en la masa seca (ng cél^{-1}) y tasa de crecimiento (d^{-1}) de *Synechococcus* sp. a diferentes salinidades.

Figure 2. Variations in dry weight (ng cél^{-1}) and growth rate (d^{-1}) of *Synechococcus* sp. under different salinities.

La salinidad a 100‰ también produjo los mayores contenidos de pigmentos con 41.9 ± 0.39 , 9.0 ± 0.15 y 9.7 ± 0.24 fg cél^{-1} para clorofila *a*, β -caroteno y zeaxantina, respectivamente, y con diferencias significativas ($P < 0.05$), en relación con las otras salinidades (fig. 3). El aumento de la síntesis de carotenoides a esta salinidad, reflejada en la relación clorofila *a*/carotenoides, disminuyó de 3.74 a 2.20 entre 0‰ y 100‰.

Los mayores valores de proteínas y carbohidratos se produjeron a 100‰ con 2.0 ± 0.05 y 1.8 ± 0.05 pg cél^{-1} (fig. 4), lo que sugiere un cambio metabólico en las células cuando se cultivan a altas salinidades. El aumento de la salinidad de 29‰ a 117‰ en *Cyanothece* 16Som2, reduce la producción de proteínas y carbohidratos (De Philippis *et al.*, 1993). Sin embargo, en *Aphanothece* sp. el aumento de la salinidad produce un aumento de la producción proteica, tanto celular como por volumen de cultivo (Berland *et al.*, 1989).

Es posible que esta cepa de *Synechococcus* estimule la síntesis de carbohidratos y proteínas relacionadas con la osmoregulación a altas salinidades (Galindo, 1985). De igual

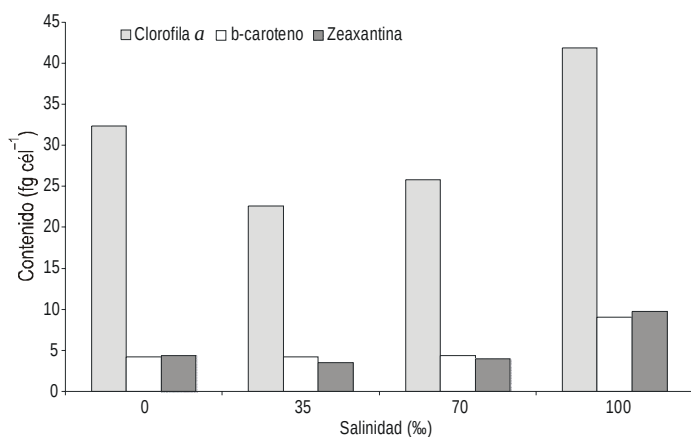


Figura 3. Contenido de zeaxantina, β -caroteno y clorofila *a* (fg cél^{-1}) de *Synechococcus* sp. a diferentes salinidades.

Figure 3. Zeaxanthin, β -carotene and chlorophyll *a* contents (fg cél^{-1}) of *Synechococcus* sp. at different salinities.

increase in cellular volume and decrease in growth rate using NaCl concentrations up to 175‰ (Díaz and Reyes, 1990, 1992).

Likewise, the increase in salinity caused a decrease in growth rate at 0.25 d^{-1} for 100‰, which corresponds to a reduction of 50% in relation to the highest growth rate obtained at 35‰ (fig. 2). Thus, under these conditions, cells tend to have a larger size and greater production and accumulation of metabolites, though they are unable to grow as fast (Rosales *et al.*, 2004).

Salinity at 100‰ also produced the highest pigment contents, with 41.86 ± 0.39 , 9.03 ± 0.15 and 9.74 ± 0.24 fg cél^{-1} for chlorophyll *a*, β -carotene and zeaxanthin, respectively, and with significant differences ($P < 0.05$) in regard to other salinities (fig. 3). The increased carotenoid synthesis at this salinity indicated a decrease in the chlorophyll *a*/carotenoid ratio, decreasing from 3.74 to 2.20 between 0‰ and 100‰.

The highest protein and carbohydrate values were obtained at 100‰, with 1.95 ± 0.05 and 1.80 ± 0.05 pg cél^{-1} (fig. 4), suggesting a metabolic change in cells when they are cultured at high salinities. In *Cyanothece* 16Som2, an increase in salinity from 29‰ to 117‰ also reduced protein and carbohydrate production (De Philippis *et al.*, 1993). In *Aphanothece* sp., however, increased salinity resulted in an increase in protein production, both cellular and by culture volume (Berland *et al.*, 1989).

It is possible that this strain of *Synechococcus* stimulates the synthesis of carbohydrates and proteins involved in osmoregulation at high levels of salinity (Galindo, 1985). Likewise, excretion of polysaccharides under unfavorable nutrient conditions and under high light and salinity conditions has been recorded (Brüll *et al.*, 2000).

Lipids showed a clear tendency to decrease with salinity, reaching maximum values of 0.45 ± 0.04 pg cél^{-1} at 0‰, which are almost twice as much as those obtained at 100‰ (fig. 4). Previous studies on other cyanobacteria, such as *Scytonema*

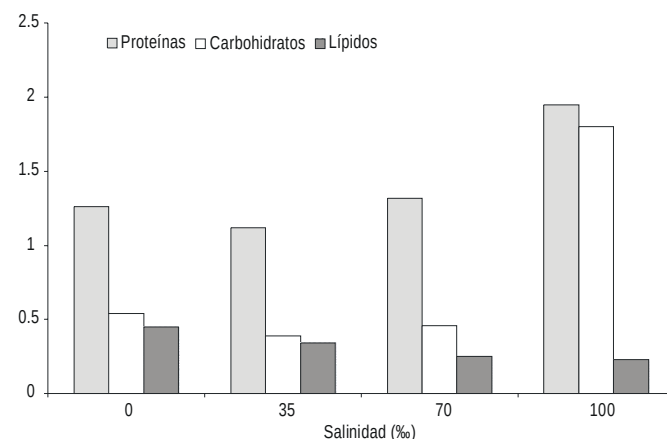


Figura 4. Contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos (pg cél^{-1}) de la cianobacteria *Synechococcus* sp. a diferentes salinidades.

Figure 4. Protein, carbohydrate and lipid contents (pg cél^{-1}) of *Synechococcus* sp. at different salinities.

forma, se ha registrado la excreción de polisacáridos bajo condiciones desfavorables de nutrientes y bajo altas condiciones de salinidad e iluminación (Brüll *et al.*, 2000).

Los lípidos mostraron una clara tendencia a disminuir con la salinidad, alcanzando los valores máximos a 0‰ con 0.5 ± 0.04 pg cél⁻¹, siendo casi el doble de lo obtenido a 100‰ (fig. 4). Estudios previos en cianobacterias como *Scytonema geitleri* muestran una disminución de la producción de lípidos al aumentar la salinidad (Singh *et al.*, 2002). Existen muchos reportes que sugieren que los lípidos están relacionados con la protección contra altas salinidades (Hufleijt *et al.*, 1990; Ritter y Yopp, 1993). La exposición a altas concentraciones salinas produce una disminución de los lípidos y un aumento en la relación ácidos grasos desaturados:saturados (Tasaka *et al.*, 1996; Allakhverdiev *et al.*, 2001).

En muchas otras cianobacterias se han reportado resultados similares a los hallados con esta cepa de *Synechococcus*, entre ellas *Microcoleus* (López y Tovar, 1992), *Synechocystis* (Zuther *et al.*, 1998), *Aphanothece* (Berland *et al.*, 1989), otras cepas de *Synechococcus* (Díaz y Reyes, 1990, 1992; Roux, 1996), *Spirulina* (Vonshak *et al.*, 1996), *Nostoc* (Blumwald y Tel-Or, 1984) y *Cyanothece* (De Philippis *et al.*, 1993).

Estos resultados sugieren que el crecimiento y el contenido de metabolitos de *Synechococcus* sp. está determinado por la salinidad, con lo cual se ha demostrado su capacidad halotolerante entre 0‰ y 100‰ y con una salinidad óptima de crecimiento de 35‰. Por otro lado, esta cepa exhibe competencia fisiológica en medio hipersalino debido a su capacidad de alcanzar los mayores contenidos celulares de clorofila *a*, carotenoides, proteína y carbohidratos a 100‰ y en condiciones de suficiencia de nutrientes.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por FONACIT, Venezuela, a través del proyecto # S1-2000000786.

Referencias

- Abalde, J., Cid, A., Fidalgo, P., Torres, E. y Herrero, C. (1995). Microalgas: Cultivo y Aplicaciones. Monogr. No. 3. Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de La Coruña, España, 210 pp.
- Allakhverdiev, S., Kinoshita, N., Inaba, M., Susuki, I. and Murata, N. (2001). Unsaturated fatty acids in membrane lipids protect the photosynthetic machinery against salt induced damage in *Synechococcus*. *Plant Physiol.*, 125: 1842–1853.
- Ben-Amotz, A. and Avron, M. (1983). Accumulation of metabolites by halotolerant algae and its industrial potential. *Ann. Rev. Microbiol.*, 37: 95–119.
- Berland, B., Le Campion, T. and Campos, H. (1989). Interaction de la salinité et de la température sur la morphologie, la croissance et la composition cellulaire d'une cyanobactérie halotolerante (*Aphanothece* sp.). *Bot. Mar.*, 32: 317–329.
- Bligh, E. and Dyer, J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37: 911–917.
- Blumwald, E. and Tel-Or, E. (1984). Salt adaptation of the cyanobacterium *Synechococcus* 6311 growing in a continuous culture (Turbidostat). *Plant Physiol.*, 74: 183–185.
- geitleri, show that lipid production decreases when salinity increases (Singh *et al.*, 2002). Many reports suggest that lipids are related to the protection against high salinities (Hufleijt *et al.*, 1990; Ritter and Yopp, 1993). Exposure to high saline concentrations produces a decrease in lipids and an increase in the desaturated:saturated fatty acids relation (Tasaka *et al.*, 1996; Allakhverdiev *et al.*, 2001).
- Results similar to those obtained with this strain of *Synechococcus* have been reported for many other cyanobacteria, including *Microcoleus* (López and Tovar, 1992), *Synechocystis* (Zuther *et al.*, 1998), *Aphanothece* (Berland *et al.*, 1989), other strains of *Synechococcus* (Díaz and Reyes, 1990, 1992; Roux, 1996), *Spirulina* (Vonshak *et al.*, 1996), *Nostoc* (Blumwald and Tel-Or, 1984), and *Cyanothece* (De Philippis *et al.*, 1993).
- These results suggest that the growth and metabolite content of *Synechococcus* sp. is determined by salinity, demonstrating its halotolerant capacity between 0‰ and 100‰, with an optimum salinity of 35‰. On the other hand, this strain shows physiologic competence in hypersaline medium as a result of its ability to attain high cell contents of chlorophyll *a*, carotenoids, protein and carbohydrates at 100‰ and in conditions of nutrient sufficiency.

Acknowledgements

This work was supported by FONACIT, Venezuela, through project # S1-2000000786.

English translation by the authors.

- Borowitzka, M. (1995). Microalgae as a source of pharmaceuticals and other biologically active compounds. *J. Appl. Phycol.*, 7: 3–15.
- Brüll, L., Huang, Z., Thomas-Oates, J., Paulsen, B., Cohen, E. and Michaelsen, T. (2000). Studies of polysaccharides from three edible species of *Nostoc* (Cyanobacteria) with different colony morphologies: Structural characterization and effect on the complement system of polysaccharides from *Nostoc commune*. *J. Phycol.*, 36: 871–881.
- De Philippis, R., Margheri, M., Pelosi, E. and Ventura, S. (1993). Exopolysaccharide production by a unicellular cyanobacterium isolated from an hypersaline habitat. *J. Appl. Phycol.*, 5: 387–394.
- Díaz, J. y Reyes, G. (1990). *Synechococcus* sp. A0185001PS (Cyanobacteria). I. Efectos de la concentración de NaCl sobre el crecimiento y morfología de una cepa aislada de la salina artificial (Araya, Sucre). *Bol. Inst. Oceanogr. Univ. Oriente*, 30(1 y 2): 153–159.
- Díaz, J. y Reyes, G. (1992). *Synechococcus* sp. A0185001PS (Cyanobacteria). II. Efectos de la concentración de NaCl, irradiación y temperatura sobre el crecimiento de una cepa aislada de la salina artificial de Araya, Venezuela. *Bol. Inst. Oceanogr. Univ. Oriente*, 31 (1 y 2): 45–50.
- Fábregas, J., Abalde, J., Herrero, C., Cabezas, B. and Veiga, M. (1984). Growth of marine microalgae *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentration. *Aquaculture*, 51: 237–243.
- Galindo, E. (1985). Polisacáridos microbianos. En: R. Quintero (ed.), *Perspectiva de la Biotecnología en México*. Fundación Javier Sierra, CONACYT, México, pp. 65–92.

- Herbert, D., Phipps, P. and Stronoe, P. (1971). Chemical analyses of microbial cells. In: J. Norris and D. Ribbons (eds.), *Methods in Microbiology*. Academic Press (5B), pp. 209–344.
- Hufleijt, M., Tremolieres, A., Pineau, B., Lang, J., Hatheway, J. and Packer, L. (1990). Changes in membrane lipid composition during saline growth of the fresh water cyanobacterium *Synechococcus* 6311. *Plant Physiol.*, 96: 738–744.
- Kebede, E. and Ahlgren, G. (1996). Optimum growth conditions and light utilization efficiency of *Spirulina platensis* (= *Arthrospira fusiformis*) (Cyanophyta) from Laka Chitu, Ethiopia. *Hydrobiologia*, 332: 99–109.
- Kochert, G. (1978). Carbohydrate determination by the phenol-sulfuric acid method. In: J. Hellebust and J. Craigie (eds.), *Handbook of Phycological Methods. Physiological and Biochemical Methods*. Cambridge Univ. Press, London, pp. 95–97.
- Komárek, J. and Anagnostidis, K. (1999). Cyanoprokaryota: 1. Teil Chroococcales. In: H. Ettl, G. Gärtner, H. Heynig and D. Mollenhauer (eds.), *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Gustav Fisher Edit, 348 pp.
- Lagarde, D., Beuf, L. and Vermaas, W. (2000). Increased production of zeaxanthin and other pigments by application of genetic engineering techniques to *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(1): 64–72.
- Liotenberg, S., Campbell, D., Rippka, R., Houmard, J. and Tandeau de Marsac, N. (1996). Effect of the nitrogen source on phycobiliprotein synthesis and cell reserves in a chromatically adapting filamentous cyanobacterium. *Microbiology*, 142: 611–622.
- López, A. and Tovar, D. (1992). Population changes in cyanobacterial mats and the role of NaCl on β -carotene production in *Microcoleus* strain CS7B9002-1. *Geomicrobiol. J.*, 10: 115–123.
- Lowry, O., Rosenbrough, H., Farr, A. and Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Biochem.*, 193: 265–275.
- Marsh, J. and Weinstein, D. (1966). Simple charring method for determination of lipids. *J. Lipid Res.*, 7: 574–576.
- Morvan, H., Gloaguen, V., Verbret, L., Joset, F. and Hoffmann, L. (1997). Structure-function investigations on capsular polymers as a necessary step for new biotechnological applications: The case of the cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. *Plant Physiol. Biochem.*, 35(9): 671–683.
- Nordin, R. and Stein, J. (1980). Taxonomic revision of *Nodularia* (Cyanophyceae/Cyanobacteria). *Can. J. Bot.*, 58(11): 1211–1224.
- Oren, A. (2000). Salts and brines. In: A. Whitton and M. Potts (eds.), *The Ecology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 281–306.
- Ritter, D. and Yopp, J. (1993). Plasma membrane lipid composition of the halophilic cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. *Arch. Microbiol.*, 159: 435–439.
- Rodríguez, F. (1992). Biotechnological potential of halobacteria. In: M. Danson, D. Hough and G. Lunt (eds.), *The Archaeobacteria: Biochemistry and Biotechnology*. Portland Press, London, pp. 135–147.
- Rosales, N., Loreto, C., Bermúdez, J. and Morales, E. (2004). Intermediate renewal rates enhance the productivity of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. in semicontinuous cultures. *Cryptogamie: Algol.*, 25(2): 207–216.
- Roux, J. (1996). Production of polysaccharide slime by microbial mats in the hypersaline environment of a western Australian solar saltfield. *Int. J. Salt Lakes Res.*, 5 (2): 103–130.
- Singh, S., Sinha, R. and Häder, D. (2002). Role of lipids and fatty acids in stress tolerance in cyanobacteria. *Acta Protozool.*, 41: 297–308.
- Tandeau de Marsac, N. and Houmard, J. (1993). Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: New steps towards molecular mechanisms. *FEMS Microbiol. Rev.*, 104: 119–190.
- Tasaka, Y., Gombos, Z., Nishiyama, Y., Mohanty, P., Ohba, T., Okhi, K. and Murata, N. (1996). Targeted mutagenesis of acyl-lipid desaturases in *Synechocystis*: Evidence for the important roles of polyunsaturated membrane lipids in growth, respiration and photosynthesis. *EMBO J.*, 15: 6416–6425.
- Utting, S. (1985). Influence of nitrogen availability on the biochemical composition of three unicellular marine algae of commercial importance. *Aquacult. Eng.*, 4: 175–190.
- Ventosa, A. and Nieto, J. (1995). Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganism. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 11: 85–94.
- Vidussi, F., Claustré, H., Bustillos, J., Cailliau, C. and Marty, J. (1996). Determination of chlorophylls and carotenoids of marine phytoplankton: Separation of chlorophyll *a* from divinyl-chlorophyll *a* and zeaxanthin from lutein. *J. Plankton Res.*, 18: 237–282.
- Vonshak, A., Kancharaksa, N., Bunnag, B. and Tanticharoen, M. (1996). Role of light and photosynthesis on the acclimation process of the cyanobacterium *Spirulina platensis* to salinity stress. *J. Appl. Phycol.*, 8(2): 119–124.
- Zuther, E., Schubert, H. and Hagemann, M. (1998). Mutation of a gene encoding a putative glycoprotease leads to reduced salt tolerance, altered pigmentation and cyanophycin accumulation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.*, 180(7): 1715–1722.