

La salinidad y la irradiancia modulan el crecimiento de la cianobacteria *Synechocystis minuscula* en cultivos discontinuos

Lorena Jonte, Néstor Rosales, Beltrán Briceño y Ever Morales

Laboratorio de Microorganismos Fotosintéticos, Departamento de Biología,
Facultad Experimental de Ciencias, La Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.

E-mail: everm@iamnet.com

Resumen

El crecimiento, producción de pigmentos y de proteínas en la cianobacteria *Synechocystis minuscula* fue evaluado en relación a la irradiancia (78, 156 y 238 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y a la salinidad (0, 15, 35, 70 y 100‰) en cultivos discontinuos. Todos los experimentos por triplicado se realizaron a una concentración de nutrientes equivalente a 8 mM NaNO_3 y mantenidos en aireación constante a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, iluminación unilateral y fotoperíodo 12:12h. Los cultivos a 238 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ alcanzaron la mayor densidad celular y tasa de crecimiento con $271,94 \pm 20,44 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$ y $0,67 \pm 0,01 \text{ d}^{-1}$ con diferencia significativa ($P < 0,05$). Entre 78 y 156 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ el crecimiento no varió ($P < 0,05$) en fase estacionaria. Sin embargo, a 78 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ se produjo el valor más elevado de clorofila *a*, de $60,08 \pm 6,38 \text{ fg cel}^{-1}$ ($P > 0,05$); aunque, el de carotenoides no varió con la irradiancia ($P < 0,05$). Asimismo, presentó un rango de crecimiento entre 0 y 35‰, pero con un óptimo a 15‰ e inhibición entre 70 y 100‰. El contenido de clorofila *a* fue superior entre 15 y 35‰, con $53,67 \pm 6,89$ y $52,67 \pm 4,45 \text{ fg cel}^{-1}$ respectivamente. La producción de biomasa de *S. minuscula* es estimulada a bajas salinidades hasta 15‰ y a 238 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Mientras que la de clorofila se optimiza entre 78 y 156 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Estos resultados sugieren que el crecimiento de esta cianobacteria halotolerante es modulado por la salinidad e irradiancia.

Palabras clave: Cianobacteria, crecimiento, irradiancia, salinidad, *Synechocystis*.

How salinity and irradiance modify the growth of *Synechocystis minuscula* cyanobacteria in discontinuous cropping

Abstract

Growth, pigmentation and protein production in cyanobacterium *Synechocystis minuscula* were tested in relation to irradiance (78, 156 and 238 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and

salinity (0, 15, 35, 70 and 100‰) in batch cultures. All test were in triplicate and were carried out to a nutrient concentration equivalent to 8 mM NaNO₃ and maintained in constant aeration, 28 ± 2°C, unilateral illumination and photoperiod 12:12h. Cultures at 238 μmol quanta m⁻² s⁻¹ reached the highest cell density and growth rate of 271.94 ± 20.44 x10⁶ cell mL⁻¹ y 0.67 ± 0.01 d⁻¹ with significant difference (P<0.05). There were no differences between 78 y 156 μmol quanta m⁻² s⁻¹ on growth (P<0.05) during the stationary phase. However, maximum values of chlorophyll *a* were reached at 78 μmol quanta m⁻² s⁻¹ with 60.08 ± 6.38 fg cel⁻¹ (P>0.05); though, there was no change in carotenoid content as a function of irradiance (P<0.05). Also, the cyanobacterium shown a range of growth between 0 y 35‰, but with optimal growth at 15‰ and inhibition between 70 and 100‰. Chlorophyll *a* content was higher at 15 and 35‰ with 53.67 ± 6.89 and 52.67 ± 4.45 fg cel⁻¹ respectively. Biomass production of *S. minuscula* is enhanced at low salinities (maximum 15‰) and to 238 μmol quanta m⁻² s⁻¹. Chlorophyll content was optimized between 78 and 156 μmol quanta m⁻² s⁻¹. These results suggest that the growth of this halotolerant cyanobacterium is modulated for salinity and irradiance.

Key words: Cyanobacteria, growth, irradiance, salinity, *Synechocystis*.

Recibido: 21-03-2003 . Aceptado: 29-04-2003

Introducción

Las cianobacterias son microorganismos fotosintéticos con una gran variabilidad morfológica y estructural, debido a que han desarrollado estrategias ecofisiológicas de adaptación a diferentes condiciones ambientales de temperatura, humedad, salinidad, irradiación solar y pH (Houmar, 1994; Mann, 1994; Whitton y Potts, 2000). De igual manera, estas características implican su amplia versatilidad metabólica; por lo cual le confieren interés en biotecnología como productoras de metabolitos de interés comercial (Guerrero, 1992; Otero *et al.*, 1997; Fábregas *et al.*, 1998).

En condiciones de laboratorio es de suma importancia evaluar el perfil bioquímico y crecimiento de cianobacterias en relación a la irradiancia, salinidad y nutrientes; dada las condiciones en algunos casos extremas de estos factores en nuestros ambientes tropicales. Así por ejemplo, los organismos halotolerantes podrían ser utilizados para su cultivo en masa en medios marinos y/o áridos, con gran radiación solar que puedan ser utilizables para acuicultura (Ben-Amotz y Avron, 1983).

El efecto de factores ambientales en cianobacterias se ha reportado en *Plectonema*

boryanum UTEX 485, en la cual se encontró que tanto la temperatura como la irradiancia influyeron en el contenido de ácidos grasos insaturados; aunque, el crecimiento sólo fue modulado por la temperatura (Mińkiewicz *et al.*, 2000). Por otra parte, en *Pseudanabaena galeata* a bajas intensidades luminosas de hasta 60 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ se incrementó la producción de biomasa (Romo, 1994) y, en *Synechococcus* 6311 aislada de agua dulce adaptada posteriormente a salinidades hasta de 23‰, se logró un aumento en la síntesis de ficocianina y de proteínas (Blumwald y Tel-Or, 1984). Mientras que la producción de hepatotoxina en *Oscillatoria agardhii* fue estimulada en cultivos mantenidos a 25 °C, elevada concentración de nitrato y baja intensidad luminosa (Sivonen, 1990).

En este sentido, se ha estudiado el crecimiento, producción de pigmentos y de proteínas de una cepa de *Synechocystis minuscula* aislada de una laguna de estabilización, en relación a la irradiancia y salinidad en condiciones de laboratorio.

Materiales y métodos

Organismo

Se utilizó la cianobacteria *Synechocystis minuscula* aislada del complejo de lagunas de estabilización del Centro de Investigación del Agua (CIA) de La Universidad del Zulia, al norte de la ciudad de Maracaibo, estado Zulia, Venezuela. Dicha cepa es mantenida en la colección de microalgas del Departamento de Biología de la Facultad Experimental de Ciencias de La Universidad del Zulia.

Esta cianobacteria ha sido identificada de acuerdo a la clave taxonómica de Komárek y Anagnostidis (1999) y se caracteriza por ser unicelular, aisladas o en parejas, con células globulares verde-azulada y con una talla promedio de $2,15 \pm 0,13 \mu\text{m}$ de diámetro.

Condiciones de cultivo

Se utilizó agua potable y/o agua de mar estéril enriquecida con nutrientes inorgánicos ALGAL (Fábregas *et al.*, 1984) a una concentración equivalente a 8 mM de NaNO_3 . Todos los experimentos se realizaron por triplicado, a un volumen de 200 mL en frascos de vidrio autoclavables y mantenidos en aireación constante a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, iluminación unilateral a una intensidad luminosa de $156 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y fotoperíodo 12:12h.

Ensayos

Influencia de la irradiancia. El crecimiento de la cianobacteria fue evaluado a 78, 156

y $238 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$; y la irradiancia determinada mediante un luxímetro Lutron Lx-101. Este experimento se realizó con agua potable no destilada estéril. En este ensayo se realizó un análisis de regresión lineal para determinar posible correspondencia entre los valores de absorbancia y los de recuento celular durante la fase estacionaria de la cianobacteria.

Influencia de la salinidad. El crecimiento fue evaluado a 0, 15, 35, 70 y 100‰. Para ajustar las diferentes salinidades requeridas, se utilizó agua de mar estéril ajustándola con agua destilada o NaCl a las salinidades evaluadas y medidas con un refractómetro portátil modelo S2J-S. El cultivo a 0‰ se realizó con agua potable no destilada estéril.

Análisis de biomasa. El crecimiento fue seguido cada tres días hasta fase estacionaria y determinado mediante turbidez a una densidad óptica de 750nm y por recuento celular usando una cámara de Neübauer. La tasa de crecimiento (μ) se determinó en fase exponencial (Lobban *et al.*, 1988).

La determinación de pigmentos fue realizada con la biomasa fresca cosechada por centrifugación; mientras que la de proteínas (Herbert *et al.*, 1971) fue realizada con biomasa previamente congelada. Los pigmentos fueron extraídos en metanol al 99% y determinados espectrofotométricamente utilizando las ecuaciones propuestas para clorofila *a* (Marker *et al.*, 1980) y carotenoides totales (Strikland y Parsons, 1972).

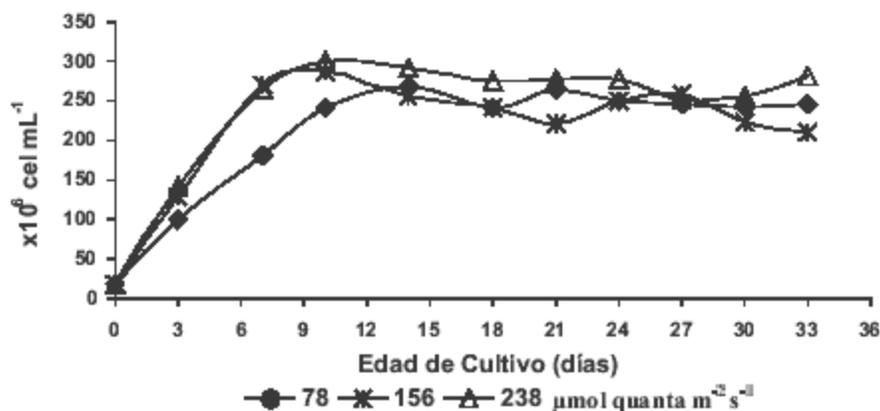
Análisis estadístico. Los valores de densidad celular, pigmentos y proteínas en fase estacionaria fueron comparados mediante análisis de varianza de una vía (StaMost for Windows versión 3,0). Se realizó la prueba de rangos múltiples de Scheffé a un nivel de significancia del 95%.

Resultados y discusión

Influencia de la irradiancia

Los cultivos con una intensidad luminosa de $238 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, alcanzaron la mayor densidad celular y tasa de crecimiento con $271,94 \pm 20,44 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$ y $0,67 \pm 0,01 \text{ d}^{-1}$ con diferencia significativa ($P < 0,05$). En cambio, entre 78 y $156 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ el crecimiento no varió ($P < 0,05$) en fase estacionaria; aun cuando a $156 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ la tasa de crecimiento fue mayor (FIG. 1a) Estos resultados coinciden con el crecimiento óptimo de *Synechocystis salina* logrado también a $238 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Ávila y Morales, 2002).

Es necesario destacar que, la manera como incide la intensidad luminosa sobre el crecimiento de las cianobacterias varía de un género a otro e incluso entre especies. De tal forma, que cada cepa tiene un rango de crecimiento óptimo en función de la irradiancia. Por ejemplo, Nordin y Stein (1980), han encontrado en condiciones de laboratorio que de 16 cepas de *Nodularia* aisladas en lagos canadienses presentaron un patrón de respuesta diferente en cuanto a intensidades luminosas entre 5 y 117 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Así mismo, en una cepa de *Anabaena* el crecimiento aumentó a partir de 7 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para luego estabilizarse en 90 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Martín Trillo, 1995).



Las tasas de crecimiento (μ) alcanzadas para 78, 156 y 238 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fueron de $0,56 \pm 0,01$; $0,64 \pm 0,01$ y $0,67 \pm 0,01 \text{ d}^{-1}$ respectivamente.

Figura 1a. Crecimiento ($\text{DO}_{750\text{nm}}$) de la cianobacteria *Synechocystis miruscula* en función de la irradiancia ($\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

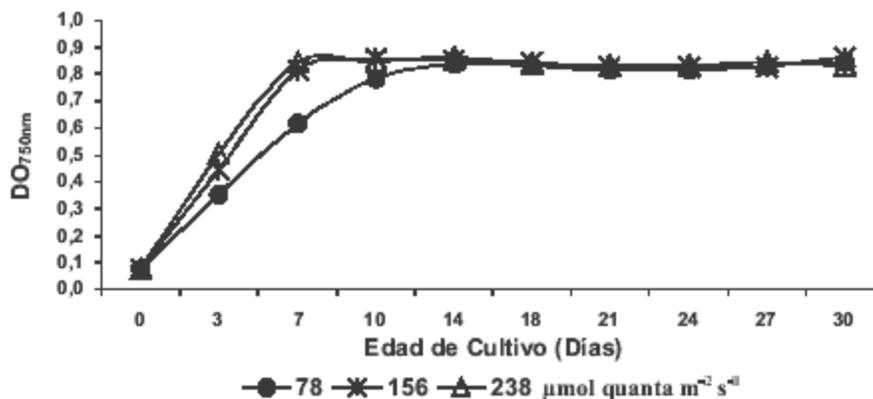


Figura 1b. Crecimiento ($\times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$) de la cianobacteria *Synechocystis miruscula* en función de la irradiancia ($\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

En cambio, cianobacterias filamentosas de hábitat preferiblemente bentónicos como *Anabaena* sp. PCC7120 y *Oscillatoria agardhii* presentan un óptimo crecimiento a bajas o moderadas intensidades luminosas de 78, 12-95 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ respectivamente (Baldía *et al.*, 1991; Sivonen, 1990).

El análisis de regresión lineal realizado con los valores obtenidos de recuento celular (FIG. 1a) y de turbidez (FIG. 1b) indicaron una correlación positiva ($r = 0,9990$); lo cual significa que durante la fase exponencial los valores de absorbancia pueden extrapolarse con el correspondiente valor de densidad celular expresado en $\times 10^6$ cel mL⁻¹. Por ejemplo, un inóculo de la cianobacteria en fase exponencial con una absorbancia (DO_{750}) de 0,08 corresponde a una densidad celular de $20,0 \times 10^6$ cel mL⁻¹. En cultivos de *Synechococcus* sp. SH-94-5 también se encontró correlación positiva entre DO_{750} y densidad celular en fase exponencial (Miller *et al.*, 2002).

Cabe destacar que la densidad óptica a 750nm, ha sido ampliamente utilizada para el monitoreo del crecimiento de las cianobacterias ya que en esta longitud de onda no hay posible interferencia de los pigmentos fotosintéticos en la absorbancia (Reddy *et al.*, 1996).

En relación al efecto de la irradiancia sobre el contenido de pigmentos también se encontró que la clorofila *a* disminuyó con la intensidad luminosa. A $78 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ se produjeron los valores más elevados por volumen de cultivo y por contenido celular y con diferencia significativa ($P > 0,05$) con $15,42 \pm 0,91 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $60,08 \pm 6,38 \text{ fg cel}^{-1}$ respectivamente. Sin embargo, no hubo cambios en el contenido de carotenoides ($P < 0,05$) con la intensidad luminosa (TABLA 1). Esto implica que esta cianobacteria no presenta capacidad carotenogénica, al menos en función de la irradiancia, con la finalidad de proteger a la célula de la fotooxidación. Tal característica, ha sido descrita en otras cianobacterias como por ejemplo en *Planktothrix agardhii* (Rücker *et al.*, 1995) y *Plectonema boryanum* (Mińkiewicz *et al.*, 2000).

El descenso de la relación clorofila *a*/carotenoides con la irradiancia indicó un decrecimiento de la clorofila en relación a los carotenoides. Tal efecto, se apreció con el cambio de la coloración verde-azulada a verde-amarillenta de los cultivos mantenidos a la mayor irradiancia (TABLA 1).

La disminución del contenido de pigmentos fotosintéticos en especial de la clorofila *a*, al aumentar la irradiancia parece ser una característica común en diversas cianobacterias (Fernández Valiente y Leganés, 1989; Martín Trillo, 1995).

Estos resultados demuestran que *S. minuscula* tiene un óptimo de intensidad luminosa para el crecimiento y producción de pigmentos diferente, coincidiendo con Oh y Rhee (1991), quienes sugieren que la demanda de luz para la fotosíntesis y para el crecimiento no es la misma puesto que existen otros factores que también participan como la respiración y el metabolismo basal.

En cuanto al contenido de proteínas, se registró un incremento progresivo con la intensidad luminosa por volumen de cultivo. Los valores más altos se registraron entre 156 y 238 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con $352,34 \pm 13,04$ y $356,25 \pm 5,84 \mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente, sin diferencia significativa ($P < 0,05$). Asimismo, tampoco hubo diferencia en cuanto al contenido celular de proteínas (TABLA 1). Estos resultados sugieren que la irradiancia parece no influenciar en el contenido de proteínas; quizás debido a que los cultivos fueron realizados con una concentración de nutrientes suficiente que permita una asimilación eficiente de nitrógeno para la síntesis de proteínas independientemente de la irradiancia. Sin embargo, en otras cianobacterias se ha descrito la influencia de la intensidad luminosa sobre el contenido de proteínas (Loreto, 2002). Por otra parte, es importante reconocer que la asimilación de nitrógeno es dependiente de la luz, debido a que es necesaria la participación de ATP obtenida en la fotosíntesis para el transporte activo de nitrato (Rajasekaran *et al.*, 1981).

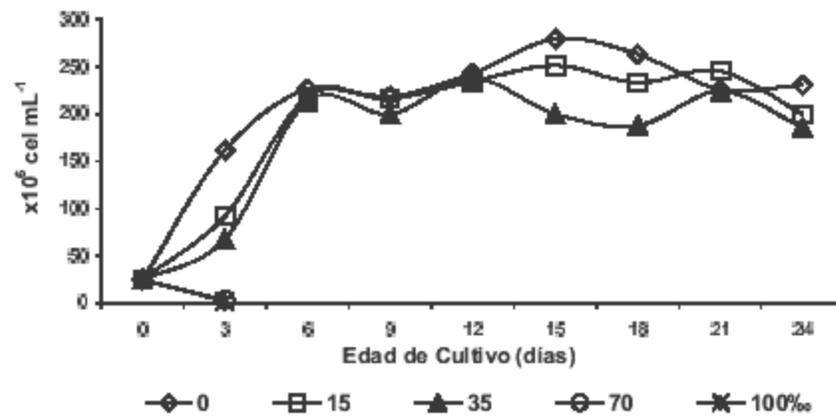
Tabla 1. Producción de pigmentos, relación clorofila a / carotenoides y producción de proteínas en función de la irradiancia ($\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) de *Synechocystis minuscula*.

I*	Clorofila a		Carotenoides		Chlo a/Car	Proteínas	
	$\mu\text{g mL}^{-1}$	fg cel^{-1}	$\mu\text{g mL}^{-1}$	fg cel^{-1}		$\mu\text{g mL}^{-1}$	pg cel^{-1}
78	$15,42 \pm 0,91$	$60,08 \pm 6,38$	$4,79 \pm 0,30$	$19,09 \pm 1,69$	3,18	$318,75 \pm 14,90$	$1,29 \pm 0,07$
156	$13,45 \pm 1,09$	$54,95 \pm 6,31$	$5,01 \pm 0,25$	$20,40 \pm 1,43$	2,61	$352,34 \pm 13,04$	$1,36 \pm 0,05$
238	$10,57 \pm 1,13$	$37,77 \pm 4,58$	$5,00 \pm 0,27$	$19,68 \pm 1,70$	1,92	$356,25 \pm 5,84$	$1,37 \pm 0,03$

*I: Intensidad Luminosa ($\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Chlo a/Car: clorofila a/carotenoides.

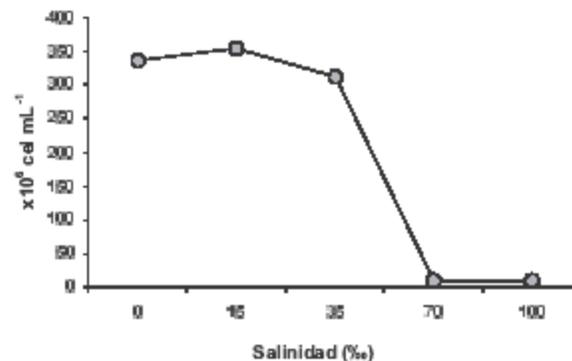
Influencia de la salinidad

S. minuscula fue capaz de crecer entre 0 y 35‰, con una óptima entre 0 y 15‰ ($P < 0,05$), y con mayor tasa de crecimiento a 15‰ (FIG. 2). No obstante, entre 70 y 100‰ disminuyó drásticamente la densidad celular a los tres días de iniciado el cultivo (FIGS. 2, 3 y 4). De acuerdo a los resultados indicados, esta cepa de cianobacteria aislada de un sistema de aguas residuales se comporta como un organismo halotolerante hasta 35‰ (Hellebust, 1985).



Las tasas de crecimiento (μ) alcanzadas para 0, 15 y 35‰ fueron de $0,32 \pm 0,03$; $0,40 \pm 0,02$ y $0,22 \pm 0,06$ d^{-1} respectivamente.

Figura 2. Crecimiento ($\times 10^6$ cel mL^{-1}) de la cianobacteria *Synechocystis minuscula* a diferentes salinidades (‰).



*Tasas de crecimiento para el día 3 de cultivo

Figura 3. Efecto de la salinidad (‰) sobre el crecimiento ($\times 10^6$ cel mL^{-1}) de la cianobacteria *Synechocystis minuscula*.

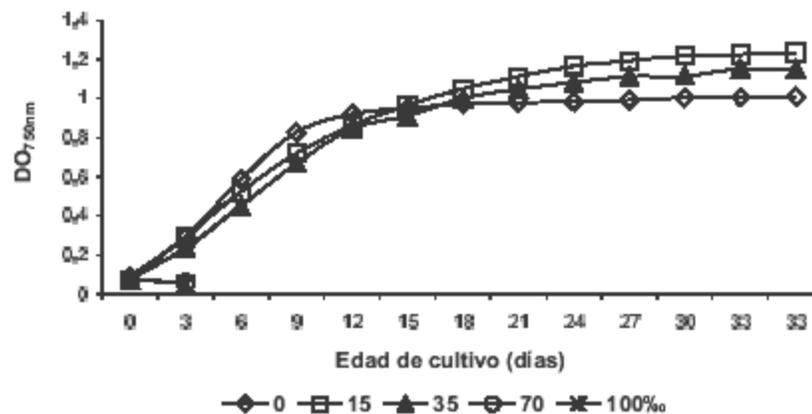


Figura 4. Crecimiento (DO_{750nm}) de la cianobacteria *Synechocystis minuscula* en función de la salinidad (‰).

La respuesta de las cianobacterias ante cambios de salinidad es diversa, y al igual que la irradiancia, nutrientes y temperatura, va a depender de la interrelación de estos parámetros, del tipo de especie y las condiciones existente en su hábitat natural.

Los cultivos mantenidos entre 15‰ produjeron los mayores contenidos de clorofila *a* y carotenoides por volumen, con $18,62 \pm 1,60$ y $6,33 \pm 0,07 \mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente y con diferencia significativa ($P < 0,05$). Mientras que, el contenido celular de clorofila *a* fue superior entre 15 y 35‰, con $53,67 \pm 6,89$ y $52,67 \pm 4,45 \text{ fg cel}^{-1}$ respectivamente y sin diferencia significativa ($P < 0,05$). La relación clorofila *a* /carotenoides mantuvo el mismo valor de aproximadamente tres moléculas de clorofila *a* por una de carotenoides (TABLA 2).

Tabla 2. Producción de pigmentos, relación clorofila *a* / carotenoides y producción de proteínas en función de la salinidad (‰) de *Synechocystis minuscula*.

‰	Clorofila <i>a</i>		Carotenoides		Chlo <i>a</i> /Car	Proteínas	
	$\mu\text{g mL}^{-1}$	fg cel^{-1}	$\mu\text{g mL}^{-1}$	fg cel^{-1}		$\mu\text{g mL}^{-1}$	pg cel^{-1}
0	$15,05 \pm 1,27$	$48,30 \pm 6,76$	$5,17 \pm 1,10$	$18,58 \pm 3,42$	2,60	$463,89 \pm 3,09$	$1,38 \pm 0,12$
15	$18,62 \pm 1,60$	$53,67 \pm 6,89$	$6,33 \pm 0,71$	$21,70 \pm 6,10^*$	2,47	$413,05 \pm 6,78$	$1,25 \pm 0,06$
35	$16,71 \pm 1,40$	$52,49 \pm 4,45$	$5,15 \pm 0,57$	$17,32 \pm 3,60$	3,03	$402,20 \pm 7,91$	$1,27 \pm 0,06$

Chlo *a*/Car: clorofila *a*/carotenoides.

En *Synechocystis* sp. PCC 6803, sometida a estrés salino tampoco se modificó sustantivamente el contenido de pigmentos. Pero, cuando era sometida a una mutación en el gen *gcp*, que codifica la resistencia a la salinidad, fue apreciable una disminución en el contenido de clorofila *a* y ficocianina, y un incremento de los carotenoides (Zuther *et al.*, 1998). En cambio, en la cianobacterias halotolerante *Pseudanabaena galeata*, un aumento de la salinidad produjo disminución de la clorofila *a* (Mora *et al.*, 2002). Así mismo, Blumwald y Tel-Or (1982) reportaron en *Nostoc muscorum*, un descenso del contenido de clorofila *a* y de carotenoides a salinidades superiores a 23‰, comparado a los cultivos mantenidos en medio no salino.

El contenido de proteínas en los cultivos fue inversamente proporcional a la salinidad, presentándose la mayor cantidad tanto por volumen de cultivo como por célula a 0‰, con $463,89 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $1,38 \text{ pg cel}^{-1}$ (TABLA 2).

En *Synechocystis* PCC6803 la síntesis de proteínas disminuyó a concentraciones salinas superiores a 40‰ (Hagemann *et al.*, 1991). En *Cyanothece* sp. el incremento de la salinidad desde 29‰ hasta 117‰ reduce también la producción de proteínas por volumen de cultivo (De Philippis *et al.*, 1993). Sin embargo, en cianobacterias halófilas como *Synechococcus* sp. 6311 y *Aphanothece* sp., el aumento de la salinidad significa un aumento de la producción de proteínas tanto celular como por volumen de cultivo (Berland *et al.*, 1989; Blumward y Tel-Or, 1984).

En el presente trabajo se destaca que *Synechocystis minuscula* es capaz de crecer entre 0 y 35‰. Mientras que, para lograr niveles óptimos de pigmentos y proteínas se requieren bajas salinidades hasta 15‰. Sin embargo, su crecimiento es estimulado y el contenido de proteínas es estimulado a $238 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$; con la condición de que para obtener cultivos enriquecidos con clorofila es necesario mantenerlos entre 78 y 156 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Agradecimientos

Los autores agradecen al FONACIT por el apoyo financiero a través del proyecto S1-2000000786.

Referencias bibliográficas

1. ÁVILA, O.; MORALES, E. (2002). Influencia del nitrato y la Intensidad luminosa sobre el crecimiento, producción de pigmentos y proteínas de la cianobacteria autóctona *Synechocystis* sp. VIII Congreso Latinoamericano y II Congreso Colombiano de Botánica. Cartagena de Indias, Colombia.
2. BALDIA, S.; NISHIJIMA, T.; HATA, Y. (1991). Effects of physico-chemical factors and nutrients on the growth of *Spirulina platensis* isolated from Lake Kojima, Japan. **Nippon-Suisan-Gakkaishi-Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.** 57: 481-490.
3. BEN – AMOTZ, A.; AVRON, M. (1983). Accumulation of metabolites by halotolerant algae and its industrial potential. **Ann. Rev. Microbiol.** 37:95-119.
4. BERLAND, B.; LE CAMPION, T.; CAMPOS BAETA NEVES, 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.). **Botánica Marina** 32: 317-329.
5. BLUMWALD E.; TEL-OR, E. (1982). Osmoregulation and cell composition in salt-adaptation of *Nostoc muscorum*. **Archives of Microbiology** 132: 168-172.
6. BLUMWALD, E.; TEL-OR, E. (1984). Salt adaptation of the cyanobacterium *Synechococcus* 6311 growing in a continuous culture (Turbidostat). **Plant Physiology** 74: 183-185.
7. DE PHILIPPIS, R.; MARGEHERI, M.; PELOSI, E.; VENTURA, S. (1993). Exopolysaccharide production by a unicellular cyanobacterium isolated from a

- hypersaline habitat. **Journal of Applied Phycology** 5: 387-394.
8. FÁBREGAS, J.; ABALDE, J.; HERRERO, C.; CABEZAS, B.; VEIGA, M. (1984). Growth of marine microalgae *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentration. **Aquaculture** 42: 207-215.
9. FÁBREGAS, J.; MORALES, E.; ARÁN, J.; OTERO, A. (1998). Germinated *Solanum tuberosum*: An Agricultural Product for marine microalgae culture. **Bioresource Technology** 66:19-24.
10. FERNÁNDEZ VALIENTE, E.; LEGANÉS, F. (1989). Regulatory effect of pH and incident irradiance on the levels of nitrogenase activity in the cyanobacterium *Nostoc* UAM205. **Journal of Plant Physiology** 135: 623-627.
11. GUERRERO, M. (1992). Productos y usos prácticos de cianobacterias (algas verde-azuladas). IV Congreso Nacional y I Congreso Hispano-Luso de Biotecnología. Santiago de Compostela, España.
12. HAGEMANN, M.; TECHEL, D.; RENSING, L. (1991). Comparison of salt- and heat-induced alterations of protein synthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. **Archives of Microbiology** 155: 587-592.
13. HELLEBUST, J. (1985). Mechanisms of response to salinity in halotolerant microalgae. **Plant And Soil** 89: 69-81.
14. HERBERT, D.; PHIPPS, P.; STRONOE, R. (1971). Chemical analysis of microbial cells. En: Norris, J.; Ribbons, D. (Eds). **Methods in Microbiology**. Academic Press, New York.
15. HOUMAR, J. (1994). Gene transcription in filamentous cyanobacteria. **Microbiology** 140: 433-441.
16. KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. (1999). Cyanoprokaryota: 1. Teil Chroococcales. En: Ettl, H.; Gärtner, G.; Heynig, H.; Mollenhauer, D. (Eds). **Süwasserflora von Mitteleuropa**. Editorial Gustav Fisher.
17. LOBBAN, C.; CHAPMAN, D.; KREMER, B. (1988). **Experimental Phycology: A Laboratory Manual**. Cambridge University Press, New York.
18. LORETO, C. (2002). Optimización de la producción de biomasa y de metabolitos de

interés económico de la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120. Tesis de Licenciatura. La Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

19. MANN, N. (1994). Protein phosphorylation in cyanobacteria. **Microbiology** 140: 3207-3215.
20. MARKER, A.; NUSCH, E.; RAI, H.; RIEMANN, B. (1980). The measurement of photosynthetic pigments in freshwater and standarization of methods: conclusions and recommendations. **Archives of Hydrobiology, Egebn. Limnol.** 14: 91-106.
21. MARTÍN TRILLO, M. (1995). Afloramientos masivos (Blooms) de cianobacterias en los arrozales valencianos: seguimiento de su desarrollo y caracterización de dos estirpes formadoras. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Madrid, España.
22. MILLER, S.; MARTIN, M.; TOUCHTON, J.; CASTENHOLZ, R. (2002). Effects of nitrogen availability on pigmentation and carbon assimilation in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. SH-94-5. **Archives of Microbiology** 177: 392-400.
23. MIĘKIEWICZ, E.; IVANOV, A.; WILLIAMS, J.; KHAN, M.; FALK, S.; HUNER, N. (2000). Photosynthetic acclimation of the filamentous cyanobacterium, *Plectonema boryanum* UTEX 485, to temperature and light. **Plant Cell Physiology** 41: 767-775.
24. MORA, R.; ORTIZ, N.; CLEMENTE, Y.; BERMÚDEZ, J.; AVENDAÑO, D.; MORALES, E. (2002). Efecto del nitrato, irradiancia y salinidad sobre la producción de clorofila-*a* de microalgas cultivadas y aisladas en la región Nororiental de Venezuela. **Oceánides** 17 (2): 73-83.
25. NORDIN, R.; STEIN, J. (1980). Taxonomic revision of *Nodularia* (Cyanophyceae /Cyanobacteria). **Canadian Journal of Botany** 58: 1211-1224.
26. OH, H.; RHEE, G. (1991). A comparative study of microalgae isolated from flooded rice paddies: Light-limited growth, C fixation, growth efficiency and relative N and P requirements. **Journal of Applied Phycology** 3: 211-220.
27. OTERO, A.; GARCÍA, D.; MORALES, E.; ARÁN, J.; FABREGAS J. (1997). Manipulation of the biochemical composition of the eicosapentanoic acid-rich microalga *Isochrysis galbana* in semicontinuous cultures. **Biotechnology and**

Applied Biochemistry 26: 171-177.

28. RAJASEKARAN, T.; SOMASEKARAN, T.; VENKATAMARAN, L. (1981). Standardized procedures for pilot plant scale. Cultivation of *Spirulina platensis* under Indian condition. **Archives of Hidrobiologia** 22: 114-126.
29. REDDY, K.; SOPER, B.; TANG, J.; BRADLEY, R. (1996). Phenotypic variation in exopolysaccharide production in the marine, aerobic nitrogen-fixing unicellular cyanobacterium *Cyanothece* sp. **World Journal of Microbiology & Biotechnology** 12.
30. ROMO, S. (1994). Growth parameters of *Pseudanabaena galeata* Böcher in culture under different light and temperature conditions. **Algological Studies** 7: 239-248.
31. RÜCKER, J.; KOHL, J.; KAISER, K. (1995). Responses of carotenoids and to variations of growth-limiting factors in three filamentous blue-green algae. **Algological Studies** 77: 51-65.
32. SIVONEN, K. (1990). Effects of light, temperature, nitrate, orthophosphate, and bacteria on growth of and hepatoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains. **Applied and Environmental Microbiology** 56: 2658-2666.
33. STRICKLAND, J.; PARSONS, T. (1972). A practical handbook of seawater analysis. **Fisheries Research Board of Canada**. Bulletin 167 (2nd Edition). Ottawa, Canada.
34. WHITTON, B.; POTTS, M. (2000). **The Ecology of Cyanobacteria**. Kluwer Academy Publisher. Netherlands.
35. ZUTHER, E.; SCHUBERT, H.; 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. PCC 6803. **Journal of Bacteriology** 1715-1722.