Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela. Univ. Oriente, 29 (1&2): 153-159 (1990), 6 figs.

EFECTO DE LA CONCENTRACION DE NaCl SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA MORFOLOGIA DE *SYNECHOCOCCUS* SP. A0185001PS (CYANOBACTERIA) AISLADO DE LA SALINA ARTIFICIAL DE ARAYA, ARAYA, VENEZUELA

JOSÉ RAFAEL DÍAZ RAMOS & GREGORIO R. REYES VÁSQUEZ.

Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente. Cumaná, Venezuela.

RESUMEN: Se ha observado que las cianobacterias responden a los cambios en la concentración de NaCl alterando su forma o produciendo envolturas mucilaginosas que en cierto modo las aislan del medio externo. En el presente trabajo se estudian los efectos de la concentración de NaCl sobre la cianobacteria *Synechococcus sp.* A018500PS aislada de la salina Artificial Araya (Araya, Sucre). Este es uno de los organismos que interfiere con la producción de sal, ya que produce sustancias mucilaginosas que previenen la formación de cristales grandes. Los cultivos se realizaron con agua de mar enriquecidas, concentraciones de NaCl de 0,5 a 3,0 M, iluminación constante de 50 ± 5 $\mu E\ m^{-2}.s^{-1}$, temperatura de 26 ±0,5 °C y aeración continua de 200 $ml.min^{-1}$. El crecimiento se evaluó mediante determinaciones diarias de la densidad poblacional utilizando una cámara de Petroff-Hauser. A medida que aumenta la concentración de NaCl de 0,5 a 3,0 M, la tasa de crecimiento disminuye de 1,3 a 0,5 $div.dia^{-1}$. Igualmente se encontró que la forma y el tamaño celular cambiaron de subesférica (6,3 x 5,6 µm) a cilíndrica (10,6 x 6,9 µm). Los resultados confirman la inconveniencia de la utilización exclusiva de caracteres morfológicos y morfométricos para identificar especies de cianobacterias.

ABSTRACT: It has been noted that cyanobacteria alter their shape or produce mucilaginous envelopes as a response to environmental changes in NaCl concentration. Such mucilaginous envelopes somehow isolate them from their surroundings. In this paper the effects of NaCl concentration on growth and morphology of Synechococcus sp. A0185001PS are studied. The organism was isolated from the artificial Solar Fields located at Araya in eastern Venezuela. It is believed that this cyanobacterium is one of the organisms that affect salt production. The phenomenon occurs when the organism produces great quantities of mucilage which prevent formation of large salt crystals. Cultures were made with enriched seawater at NaCl concentrations of 0,5 to 3,0 M; continuos light 50 ± 5 $\mu E\ m^{-2}s^{-1}$: temperature of 26 ± 0,5 °C: and constant aeration of 200 $ml.min^{-1}$. Growth was evaluated by daily determination of population density with a Petroff-Hauser counting chamber. Cell dimensions were estimated simultaneously. It was found that an increase in NaCl concentration from 0,5 to 3,0 resulted in a growth rate decrease from 1,3 to 0,5 $div.\ day^{-1}$. A change in shape and size from subspherical (6,3 x 5,5 µm) to cylindrical (10,6 x 6,9 µm) was also observed. The results confirm that morphological and morphometric parameters must not be used exclusively to indentify cyanobacterial species.

INTRODUCCION

Los ambientes hipersalinos (aguas continentales y salinas solares) se asemejan a las zonas desérticas por la escasez de agua. Esta observación parecería contradictoria ya que en los primeros los organismos están rodeados de agua. Lo que sucede es que la diferencia osmótica entre el medio externo y el interno es tal que los habitantes de estos ambientes deben poseer mecanismos para impedir el flujo de agua hacia el exterior. Es por esto que la diversidad de especies es baja y la trama trófica es simple. Los ambientes hipersalinos son ecosistemas frágiles. En ellos se encuentran casi todos los grupos del fitoplancton, pero las cianobacterias (algas verdes-azules) son los productores primarios dominantes (BAHA AL DEEN & BAHA AL DEEN, 1972: COHEN *et al.*, 1977: DAVIS, 1978: BOROWITZKA, 1981; DOR & HORNOFF, 1985). Ello obedece a la flexibilidad fisiológica de estos procariotes.

Se ha observado que las cianobacterias responden a los cambios de salinidad alterando su forma o produciendo envolturas mucilaginosas que en cierto modo las aislan del medio externo. Algunos autores han asignado valor taxonómico a estas modificaciones, dando origen a un aumento

considerable en el número de especies dentro de cada género. DROUET & DAILY (1956) hicieron una revisión del material existente en colecciones de herbarios y en cultivos, lo cual les permitió demostrar que tales variaciones no pasaban de ser modificaciones inducidas por cambios ambientales y por ende no tienen valor taxonómico para erigir nuevas especies.

En el presente trabajo se estudian los efectos de la salinidad sobre una cianobacteria aislada de las albercas concentradoras de la Zona Norte (Salinas de Araya, Sucre). Se sospecha que este organismo interfiere con la producción eficiente de sal al producir sustancias mucilaginosas que interfieren con la formación de cristales grandes.

Debido a la variabilidad morfológica de este organismo se le ha denominado *Coccochloris elabens* (DAVIS, 1978) y también *Aphanothece halophytica* (TINDALL *et al.*, 1978. YOPP *et al.* 1978. BOROWITZKA, 1981). Sin embargo, en este trabajo se utiliza el criterio establecido por RIPKA *et al.*, (1978) y se le designa como *Synechococcus sp.* A0185001PS. Este género se caracteriza por presentar células cuya división ocurre por fisión binaria, aisladas o en cadenas cortas y carentes de cubierta.

MATERIALES Y METODOS

El código que identifica a la cepa se forma de la siguiente manera: la letra inicial "A", indica que el organismo proviene de Araya; los dos primeros que siguen representan el mes y los últimos el año en que se colectó la muestra; las tres cifras siguientes indican el número asignado a la cepa en la secuencia de aislamiento; finalmente indica mediante letras si la especie es planctónica (P), y el nivel de la columna de agua donde se colectó (S = superficie).

La cianobacteria *Synechococcus sp.* A0185001PS fue aislada de una muestra de agua tomada en el concentrador ZB9 de la Zona Norte (Salinas de Araya, Sucre). Al inicio del proceso de aislamiento, la concentración de NaCl de la muestra era de aproximadamente 4 M (210×10^{-3}). La condición de monocultivo se logró mediante repiques alternos de las submuestras en medios de cultivo enriquecidos con Medio A 5X (10 ml^{-1}, KUWAMAZANA & MITSUI, 1981). Los cultivos se realizaron a una temperatura de 26 ± 0,5 °C, illuminación continua de 50 ± 5 $\mu E\ m^{-2}.s^{-1}$ aeración constante, 50 $ml.min^{-1}$. Las mediciones de salinidad, iluminación y flujo de aire se realizaron con los siguientes instrumentos: refractómetro (American Optional Association); fotómetro Li-Cor modelo LI 185A; y un medidor de flujo compacto Gilmont, respectivamente. Las lámparas flourescentes Philips TLI 4W/5440 y Life Line Sylvania F4812/D fueron empleadas para iluminar los cultivos.

Para los experimentos se utilizaron como inóculos cultivos en fase exponencial de crecimiento. Las pruebas se realizaron con medios de cultivo (450 ml) enriquecidos con Medio A 5X (50 ml^{-1}) a concentraciones de NaCl de aproximadamente 0,5 (35×10^{-3}) a 3,0 M (160×10^{-3}). Las células se incubaron bajo las condiciones de iluminación y temperatura señaladas anteriormente y aeración constante de 200 $ml.min^{-1}$. La densidad celular al inicio de los bioensayos era de 3 a 8×10^4 cel $.ml^{-1}$. El crecimiento se evaluó mediante determinaciones diarias de la densidad poblacional usando para esto cámaras de Petroff-Hauser. Las dimensiones celulares (eje transversal y eje longitudinal) de organismos en fase exponencial de crecimiento tanto en interfase como al inicio de la división celular se determinaron utilizando un microscopio invertido y un micrómetro Wild-Heerbrug, modelos 118 V= 1 y 15 K, respectivamente. El análisis estadístico de los resultados morfométricos se realizó con un Análisis de Varianza Modelo I y las pruebas *a posteriori* SNK y de Scheffé (ZAR, 1974). En el tratamiento estadístico de los resultados de crecimiento se utilizó un análisis de covarianza para las pendientes de las líneas de regresión y un análisis de varianza y la prueba *a posteriori* SNK para determinar si existían diferencias entre las tasas de crecimiento de los distintos tratamientos (ZAR, 1974).

RESULTADOS

El aumento de la concentración de cloruro de sodio produce un aumento en el tamaño de *Synechococcus sp.* A0185001PS (Figs. 1 y 2). Los resultados obtenidos con cultivos incubados a 4,0 M de NaCl se incluyen para verificar las tendencias en variación morfológica causados por el incremento en la concentración de NaCl del medio). Sin embargo, la tasa de aumento del eje longitudinal para las células en interfase (1,8 $\mu m\ M^{-1}$) y las células en división (2,7 $\mu m\ M^{-1}$) es mayor que la tasa de aumento del eje transversal (0,7 y 1,0 $\mu m\ M^{-1}$, respectivamente). Los resultados obtenidos del análisis de varianza aplicado

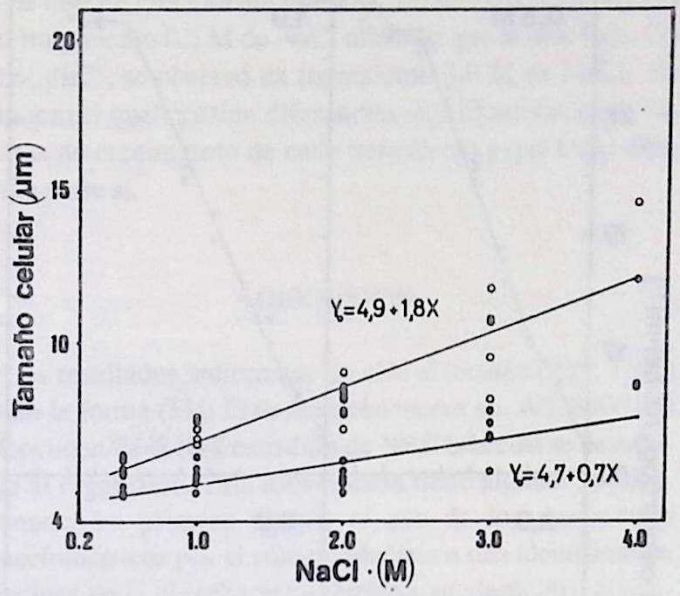


Fig. 1.- Variación del tamaño celular (µm) de *Synechoccus sp.* A0185001PS con respecto a la concentración de NaCl. Células en interfase. o, eje longitudinal: °, eje transversal. Cada punto es el promedio de 30 mediciones.

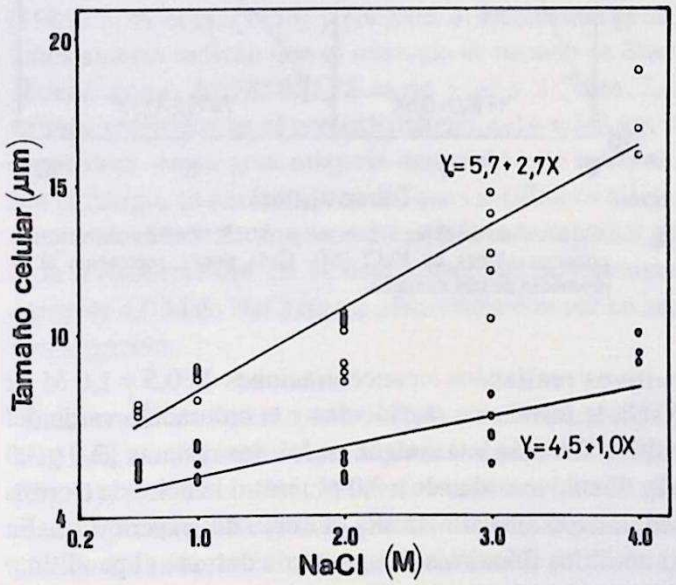


Fig. 2.- Variación del tamaño celular (mm) de *Synechococcus sp.* A0185001PS con respecto a la concentración del NaCl. Células al inicio de la división celular. °, eje longitudinal, eje transtransversal. cada punto es el promedio de 30 mediciones.

indican que la relación lineal existente entre la longitud de ambos ejes y la concentración de sal es altamente significativo (0,001).

En cuanto a la relación que existe entre la razón eje transversal/eje longitudinal se puede notar que en ambos tipos de células (Figs. 3 y 4). Se produce una disminución de la razón, es decir, un aumento del eje longitudinal con respecto al eje transversal entre las concentraciones de 0,5 y 2,0 M de NaCl; en las células cultivadas a concentraciones de 2,0 a 4,0 M de NaCl se observa que este parámetro

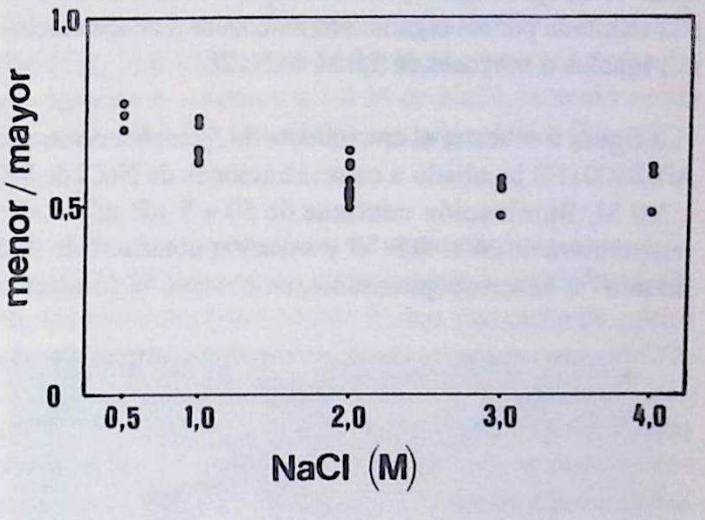


Fig. 3.- Variación de la razón eje transversal/eje longitudinal en *Synechococcus sp.* A0185001PS con respecto a la concentración de NaCl. Células en interfase. Cada punto es el cociente del promedio de 30 mediciones para cada eje.

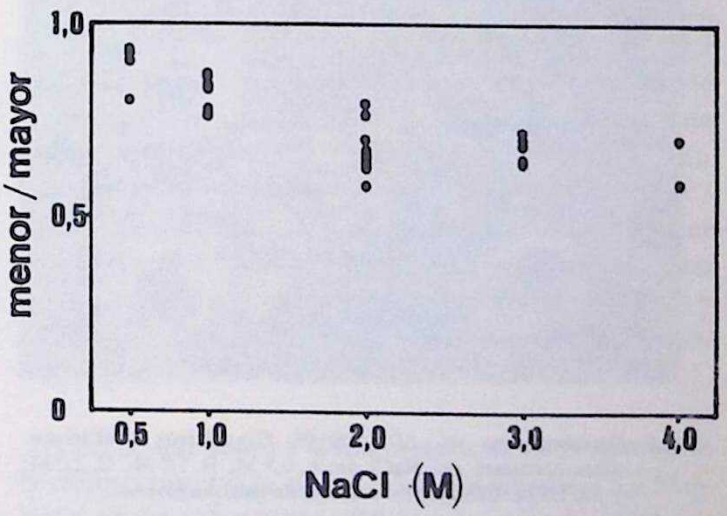


Fig. 4.- Variación de la razón eje transversal/eje longitudinal en *Synechococcus sp.* A0185001PS con respecto a la concentración de NaCl. Células al inicio de la división. Cada punto punto representa el cociente del promedio de 30 mediciones para cada eje.

y B) predominante a las concentraciones de 0,5 y 1,0 M de NaCl es sustituido progresivamente por el morfotipo elipsoidal (Figs 5C y D), el cual predomina a concentraciones mayores o iguales a 2,0 M de NaCl. Esta observación queda evidenciada por los resultados del análisis de varianza y la prueba de Sheffé a un nivel de 0,05. Las pruebas indicaron que los organismos incubados a concentraciones de 0,5 a 1,0 M de NaCl exhibían una razón eje transversal/eje longitudinal similar y que esta era diferente a la exhibida por los organismos incubados a concentraciones iguales o mayores de 2,0 M de NaCl.

La figura 6 muestra el crecimiento de *Synechococcus* sp. A0185001PS incubado a concentraciones de NaCl de 0,5 a 3,0 M, iluminación continua de 50 ± 5 $\mu E\ m^{-2}\ .s^{-1}$, temperatura de 26 ± 0,5 °C y aeración constante de 200 $ml.min^{-1}$. Macroscópicamente, se observó la formación

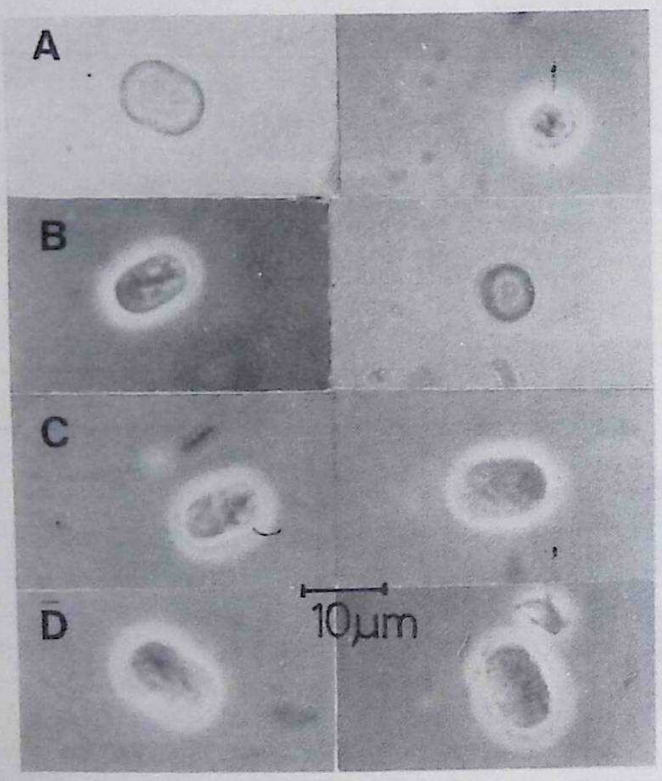


Fig. 5.- *Synechococcus sp.* A0185001PS. Organismos incubados a concentraciones de NaCl de: A, 0,5 M; B, 1,0 M; C, 2,0 M; y D, 3,0 M. Células provenientes de cultivos jóvenes.

de flóculos durante el día 0 en todos los tratamientos. Bajo el microscopio dichos "filamentos" o flóculos estaban constituidos por agregados amorfos de células los cuales se mantenían unidos por una matriz mucilaginosa. En los

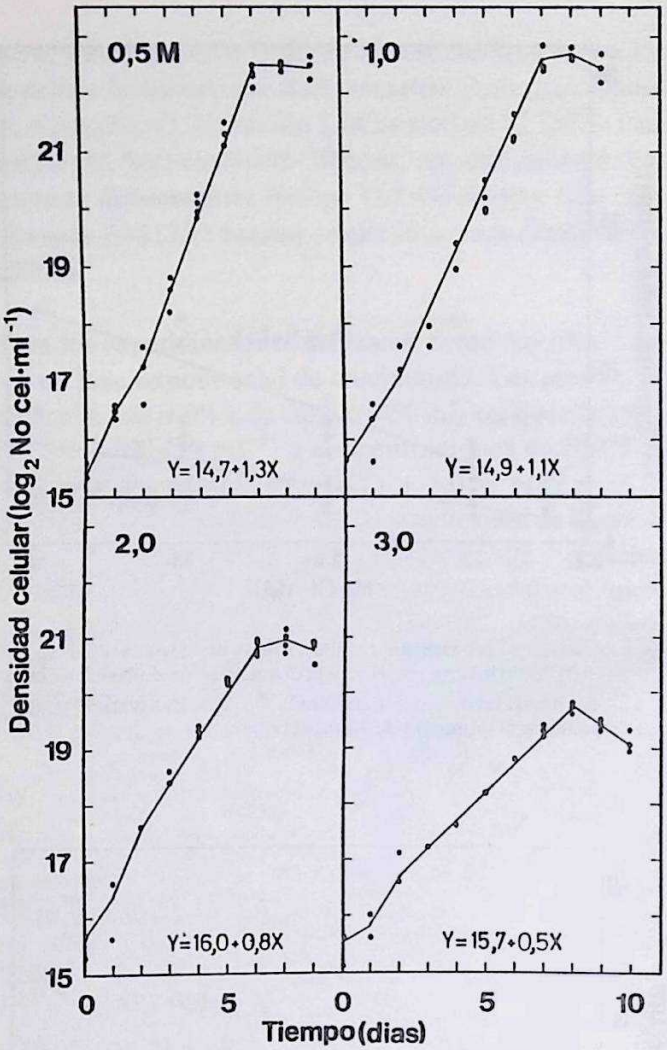


Fig. 6.- Crecimiento de *Synechococcus sp.* A0185001PS a diferentes concentraciones de NaCl (M). Cada punto representa el promedio de tres contajes.

cultivos realizados a concentraciones de 0,5 y 1,0 M de NaCl, la formación de flóculos y la coloración verde del cultivo fue más intensa que en los dos restante (2,0 y 3,0 M). El cultivo realizado a 3,0 M mostró indicios de clorosis (coloración amarilla) desde el inicio del experimento. En general los flóculos se disgregaron durante el penúltimo día (día 5) de la fase exponencial de crecimiento (día 2-6) para los tratamientos 0,5; 1,0 y 2,0 M de NaCl y durante el día 6 para el tratamiento 3,0 M de NaCl. Una vez alcanzada la fase estacionaria de crecimiento los cultivos se tornaron cloróticos. El análisis de covarianza aplicado reveló que las pendientes de las líneas de regresión de las réplicas de cada tratamiento no diferían significativamente.

La tasa de crecimiento más alta, 1,3 div. dia^{-1}, ocurrió en el tratamiento 0,5 M de NaCl mientras que la más baja, 0,5 div .$día^{-1}$, se observó en tratamiento 3,0 M de NaCl. Se encontró que existían diferencias significativas entre las tasas de crecimiento de cada tratamiento y que todas diferían entre sí.

DISCUSION

Los resultados indican que no sólo el tamaño (Figs. 1 y 2) sino la forma (Fig. 5) de *Synechococcus* sp. A0185001PS dependen de la concentración de NaCl a la cual se desarrolla el organismo. Esta aseveración tiene algunas implicaciones. La primera es que el uso de los parámetros morfométricos por si sólo conduciría a una identificación errónea de la cianobacteria debido a su plasticidad morfológica. Las células incubadas a concentraciones bajas de NaCl (0,5 M) tienden a ser pequeñas, 6 x 5,5 μm, y subesféricas mientras que las desarrolladas a concentraciones altas (3,0 y 4,0 M de NaCl son grandes, 11 x 7 μm, y presentan forma elipsoidal. En general los resultados coinciden con las observaciones hechas por BOROWITZKA (1981) YOPP *et al*. (1978) y por DOR & HORNOFF (1985). Estos autores indican que el intervalo de tamaño de *Synechococcus* sp. A0185001PS es de 3-18 x 2-7 μm. Los valores obtenidos en el presente trabajo, 6-14 x 5-9 μm se encuentran en su gran mayoría dentro de este intervalo. Sin embargo, es necesario señalar que los cilindros alargados y en cadenas de dos a cuatro células encontrados por DOR & HORNOFF (*op. cit.*) a concentraciones de aproximadamente 4,0 M de NaCl fueron observados rara vez en esta investigación.

El intervalo de tamaño de las células en división (Fig. 2), 7-16 μm, es más amplio que el de las células en interfase (Fig. 1), y es una indicación de fisión binaria en un solo plano típico de este género (ALLEN 1966, RIPKA *et al*. 1979). Cuando la célula va a dividirse se produce un aumento del eje longitudinal mientras que el eje transversal no experimenta variación.

La segunda implicación está relacionada con la razón eje transversal/eje longitudinal que a su vez esta relacionada con la razón superficie/volumen. MARGALEF (1978), SOURNIA (1982) han discutido sobre la importancia de este parámetro en el desarrollo de las poblaciones planctónicas. La razón superficie/ volumen influye tanto sobre la velocidad de hundimiento de las células y por tanto sobre su permanencia en la zona fótica como sobre el intercambio de iones con el medio externo. En células redondeadas la razón se encuentra entre 1 y 1,1 mientras que para células alargadas la razón es de 1,5 MARGALEF *(op. cit.)*. En las figuras 3 y 4 se observa que tanto las células en interfase como las que se encuentran al inicio de la división exhiben las razones eje transversal/eje longitudinal más altas. En el caso de las células en interfase incubadas a 0,5 M de NaCl, la razón es mayor de 0,8 y las células tienden a la esfericidad (Fig. 5) mientras que en las incubadas a concentraciones iguales o mayores a 2,0 M de NaCl, la razón oscila alrededor de 1,7 y las células son elipsoidales (Figs. 5C y D).

En ambientes hipersalinos, el aumento de la concentración de NaCl tiene como consecuencia la precipitación de ciertos minerales (como óxido férrico, carbonato de calcio) y la reducción en la solubilidad de gases como el CO_2 (BOLD & WINNE, 1978, GOLUBIC, 1980, TINDALL *et al.*, 1978), es decir, el empobrecimiento del medio. Podría pensarse que la tendencia a la forma elipsoidal a concentraciones de NaCl mayores a 1,0 M responde a la necesidad de incrementar la superficie celular para absorber algunos iones nutrientes que por efecto de la elevada salinidad presentan una solubilidad muy baja. Sería importante realizar pruebas experimentales para comprobar esta hipótesis.

La capacidad de *Synechococcus* sp. A0185001PS para crecer en medios cuya concentración de NaCl varía de 0,5 a 3,0 M (Fig. 6) evidencia la naturaleza eurihalina de este organismo. Sin embargo, el hecho que su máxima tasa de crecimiento, 1,3 div $día^{-1}$ ocurra a 0,5 M de NaCl no implica que esta sea la concentración de NaCl óptima para su desarrollo. Es necesario estudiar el comportamiento de parámetros fisiológicos como la tasa fotosintética, contenido de clorofila, proteínas y carbohidratos para determinar cual es la concentración de NaCl óptima para el crecimiento.

Un hecho que recalca la importancia de estos estudios es la clorosis observada en las células incubadas a 3,0 M de NaCl. Dicha coloración indica que los organismos se encuentran en condiciones desfavorables. REYES-VÁSQUEZ (1985) señala que en cultivos de *Synechococcus* sp. Miami BGII6S en fase exponencial, la clorosis es causada por la interacción de varios factores y no como respuesta a

intensidades lumínicas elevadas. En cultivos senescentes, el autor antes mencionado atribuye este fenómeno cambios en el pH del medio de cultivo.

CONCLUSIONES

1.- La variabilidad morfológica de *Synechococcus* sp. A0185001PS causada por el cambio en la concentración de NaCl en el medio hace necesario el uso de otros criterios además de los morfológicos para su clasificación.

2.- *Synechococcus* sp. A0185001PS responde a la perturbación creada por el aumento en la concentración de NaCl del medio aumentando la razón superficie/volumen de las células.

3.- La capacidad de *Synechococcus* sp. A0185001PS para crecer a concentraciones de 0,5 a 3,0 M de NaCl evidencia la naturaleza eurihalina de este organismo.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue financiado a través del Proyecto Conicit S1–1801. Los autores quieren expresar su agradecimiento a ELVIRA FERRAZ REYES, ESTHER FERNÁNDEZ ALVAREZ, JOSÉ A. VÉLIZ y JOSÉ DE JESÚS GARCÍA cuya colaboración hizo posible la realización de este trabajo.

REFERENCIAS

ALLEN, M. A. M. 1966. Studies on the properties of some blue–green algae. *Diserción Doctoral. UCLA, Berkeley*, pp. 158.

BAHAL AL DEEN, B. & A. H. BAHA AL DEEN. 1972. Posible efecto de las microalgas en la forma de cristalización del cloruro de la salina de Araya. *Bol. Inst. Oceanogr. Univ. Oriente*, 11(1):3-38.

BOLD, H. C. & M. J. WYNNE. 1978. Introduction to the algae. Prentice-Hall, INC, Englewoods Cliffs, N. J. pp. xiii + 706.

BOROWITZKA, L. J. 1981. The microflora: adaptations to life in extremely saline lakes. *Hydrobiologia,* 81:33-46.

COHEN, Y., W. E. KRUMBEIN & M. SHILO. 1977. Solar Lake (Sinai). 2. Distribution of photosynthetic microorganisms and primary production. *Limnol. Oceanogr.,* 22:609-620.

DAVIS, J. S. 1978. Biological communities in an enriched salina. *Aquat. Bot.*, 4:23-42.

DOR, I., & M. HORNOFF. 1985. Salinity-temperature relations and morphotypes of a mixed populations of coccoid cianobacteria from a hypersaline pond in Israel. *Mar. Ecol.*, 6(1): 13-25.

DROUET, F. & W. A. DAILY, 1956. Revision of the coccoid Myxophyceae. *Butler Univ. Stud.,* 12:1-218.

GOLUBIC, S. 1980. Halophily and halotolerance in cyanophytes. *Origins of Life,* 10: 169-183.

KUMAZAWA, S. & A. MITSUI. 1981. Characterization and optimization of hydrogen photoproduction by a salt water blue-green alga. *Oscillatoria* sp. Miami BG 7. I. Enhancement through limiting the supply of nitrogen. *Int. J. Hydrogen Energy,* 6:339-348.

MARGALEF, R. 1978. Life forms of phytoplankton as survival alternatives in an unstable environment. *Oceanol. Acta,* 1(4): 493-509.

REYES-VÁSQUEZ, G. R. 1985. Effects of environmental factors on the biosynthesis of hemolytic toxins by the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. Miami BGII6S. *Disertación Doctoral. Univ. Miami. Coral Gables, Florida.* pp. 99.

RIPKA, R. J., J. DERUELLES, J. B. WATERBURY, M. HERDMANN & R. Y. STANNIER. 1979. Generic assignements, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol., 111:1-61.*

SOURNIA, A. 1982. Form and function in marine

phytoplankton. *Biol. Rev.,* 57: 347-394.

TRINDALL, D. R., J. H. YOPP, D. M. MILLER & W. E. SCHIMID. 1978. Physico-chemical parameters governing the growth of *Aphanothece halophytica* (Chroococcales) in hypersaline media. *Phycologia,* 17:179-185.

YOPP, J. H., D. R. TINDALL, D. M. MILLER & W. E., SCHMIDT. 1978. Isolation, purification and evidence for the halophilic nature of the blue-green alga Aphanothece halophytica Fremy (Chroococcales). *Phycologia*, 17(2): 172-178.

ZAR, J. H. 1974. Biostatistical Analysis. Prentice Hall, INC. Englewood Cliffs, N. J. pp xiv + 620.