Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela, Univ. Oriente 31 (1 & 2): 45-50 (1992); 3 figs., 2 tabs.

SYNECHOCOCCUS SP. A0185001PS (CYANOBACTERIA), II, EFECTOS DE LA CONCENTRACION DE NACL, IRRADIACION Y TEMPERATURA SOBRE EL CRECIMIENTO DE UNA CEPA AISLADA DE LA SALINA ARTIFICIAL DE ARAYA, VENEZUELA

José Rafael Díaz Ramos & Gregorio R. Reyes Vásquez

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

Resumen: La cianobacteria *Synechococcus* sp. A018500PS, proveniente de la Salina Artificial de Araya (Araya, Sucre) experimenta cambios morfológicos al ser incubada a diferentes concentraciones de NaCl. En este trabajo se estudia el efecto de la concentración de NaCl, la iluminación y la temperatura sobre el crecimiento y la producción de mucílago sobre este organismo. Las pruebas se realizaron con medios de cultivo (450 ml) enriquecidos con Medio A 5X (50 ml · l^{-1}) a concentraciones de NaCl de 0,5 a 3,0 M, irradiación continua de 50 y 78 µE · m^{-2} · s^{-1}, temperatura de 26, 30 y 35 °C y aeración constante de 200 ml · min^{-1}. La concentración de NaCl, la irradiación y la temperatura ejercieron una influencia significativa sobre la densidad poblacional de la cianobacteria. La tasa de crecimiento más elevada (1,7 div · $día^{-1}$), se observó en los organismos incubados bajo iluminación continua de 78 ± 13 µE · m^{-2} · s^{-1}, temperatura de 26 ± 0,5 °C y concentración de NaCl de 0,5 M. Bajos las condiciones experimentales empleadas, la cianobacteria no produjo sustancias mucilaginosas en exceso.

Abstract: The cyanobacterium *Synechococcus* sp. A0185001PS isolated from the Artificial Solar Salt pans of Araya (Araya, Sucre) undergoes morphological changes when it is incubated at different NaCl concentrations. In this paper, the effects of NaCl concentration, light intensity, and temperature on growth and mucilage production in *Synechococcus* sp. A0185001PS are studied. Bioassays were carried out under the following conditions: culture media (450 ml · l^{-1}) enriched with Medium A (50 ml · l^{-1}); NaCl concentration from 0.5 to 3.0 M; continuous irradiance, 50 and 78 µE · m^{-2} · s^{-1}; temperature of 26, 30 and 35 °C; and constant aeration, 200 ml · min^{-1}. It was found that the concentration of NaCl as well as light intensity and temperature had a significant influence on the population density of the cyanobacterium. The highest growth rate, 1.7 div · day^{-1} occurred in organisms cultured under the following conditions: continuous irradiance of 0,5 M. The cyanobacterium did not produce mucilage under any of the experimental conditions.

INTRODUCCION

Bajo ciertas condiciones, aún no determinadas, la cianobacteria *Synechococcus* sp. A0185001PS produce sustancias mucilaginosas que interfieren con la producción de cloruro de sodio en el complejo salinero establecido en la Península de Araya, Edo. Sucre, el cual es el más grande de Venezuela. El mucílago afecta la producción de dos maneras: promueve la formación de cristales frágiles; y crea condiciones anaeróbicas en el lecho de las albercas al degradarse. Sin embargo, cuando este mucílago se produce en cantidades reducidas provoca el cierre de los fondos porosos en las albercas, impidiendo la pérdida de salmuera a través de filtraciones (Davis, 1978; Borowitzka, 1981).

Los estudios realizados por Diaz-Ramos & Reyes-Vásquez (1990) con *Synechococcus* sp. A0185001PS mostraron que la concentración de NaCl afecta tanto su morfología como su crecimiento. A bajas concentraciones de NaCl (0,5 M) las células tienden a ser pequeñas (6 × 5,5 µm) y subesféricas mientras que a concentraciones altas (3,0 M) son grandes (11 × 7 µm) y presentan forma elipsoidal. En cuanto al crecimiento, estos autores encontraron que la tasa de división del organismo disminuía al aumentar la concentración de NaCl. En el presente trabajo se estudian los efectos de la concentración de NaCl, la irradiancia y la temperatura sobre el crecimiento y la producción de sustancias mucilaginosas de *Synechococcus* sp. A0185001PS.

MATERIALES Y METODOS

El código que identifica a la cepa así como su origen y aislamiento han sido descritos previamente por Díaz-Ramos & Reyes-Vásquez (1990). El cultivo madre fue mantenido a una temperatura de 26 ± 0,5 °C, irradiancia de 50 ± 5 µE · m^{-2} · s^{-1} y concentración de NaCl de 1 M en una cámara ambiental termorregulada (Forma Scientific). Para los experimentos se utilizaron inóculos tomados de cultivos en fase exponencial de crecimiento. Las mediciones de salinidad, irradiancia y flujo de aire se realizaron con los siguientes instrumentos: refractómetro manual (American Optical Association), fotómetro Li-Cor modelo LI 185A y un medidor de flujo compacto Gilmont.

Las pruebas se realizaron con medios de cultivo (450 ml) enriquecidos con Medio A 5X (50 ml · l^{-1}) Kumazawa & Mitsui (1981) a concentraciones de NaCl de aproximadamente 0,5, 1,0, 2,0 y 3,0 M, irradiancia constante de 50

± 5 y 78 ± 13 µE · m^{-2} · s^{-1}, temperaturas de $26 \pm 0,5$, 30 y 35 ± 1 °C y flujo continuo de aire de aproximadamente 200 ml · min^{-1}. Los cultivos realizados a $26 \pm 0,5$ °C se incubaron en la cámara ambiental termorregulada mientras que los restantes fueron incubados utilizando un baño circulante (Forma Scientific modelo 2006).

La densidad celular al inicio de los bioensayos era de 3 a 8×10^{-3} cel · ml^{-1}. Las muestras se tomaron de forma aséptica y se fijaron con lugol. El crecimiento se evaluó mediante determinaciones diarias de la densidad poblacional durante la fase exponencial de crecimiento con cámaras de PETROFF-HAUSSER. Se realizaron tres réplicas para cada tratamiento. La constante de crecimiento (K_e) se calculó utilizando la fórmula.

$$K_e = \frac{\log_2\left(\frac{N_1}{N_0}\right)}{t_1 - t_0}$$

donde N es la densidad celular (org · ml^{-1}) y t, es el tiempo (GUILLARD, 1973). A las líneas de regresión obtenidas para las réplicas, se les aplicó un análisis de covarianza (ZAR, 1974) para determinar si existían diferencias significativas entre ellas. También se calculó el tiempo generacional (hrs) utilizando la fórmula (GUILLARD, 1973):

$$\text{Tiempo generacional} = \frac{1}{K_e}$$

Se utilizó un Análisis de Varianza de tres factores con réplica, modelo I (ZAR, 1974), para determinar cuál de los factores tenía mayor influencia sobre el crecimiento de *Synechococcus* sp A0185001PS.

RESULTADOS:

El aspecto macroscópico de los cultivos sometidos a los diferentes tratamientos varió de acuerdo a la salinidad y la temperatura. En casi todos, excepto los incubados a 3,0 M de NaCl, se observó la formación masiva de flóculos durante el primer día del ensayo; los mismos persistieron hasta el penúltimo o hasta el último día de la fase exponencial de crecimiento. La formación de estos agregados fue débil o nula en los cultivos realizados a 3,0 M de NaCl sin importar las condiciones de iluminación y temperatura. La coloración de los cultivos durante la fase exponencial de crecimiento fue verde, exceptuando a aquellos incubados a 78 ± 13 µE · m^{-2} · s^{-1} y 35 ± 1 °C. En estos últimos se observó un color amarillo, clorosis, durante la fase exponencial de crecimiento. Así mismo, esta fue la coloración normal de todos los cultivos una vez alcanzada la fase estacionaria de crecimiento.

La Fig. 1 muestra el crecimiento de *Synechococcus* sp. A0185001PS en cultivos con concentraciones de NaCl de 0,5 a 3,0 M, irradiancia de 78 ± 13 µE · m^{-2} · s^{-1} y 26 ± 1 °C. Este fue el tratamiento donde se observó la tasa de crecimiento más elevada, 1,7 div · $día^{-1}$. No obstante es

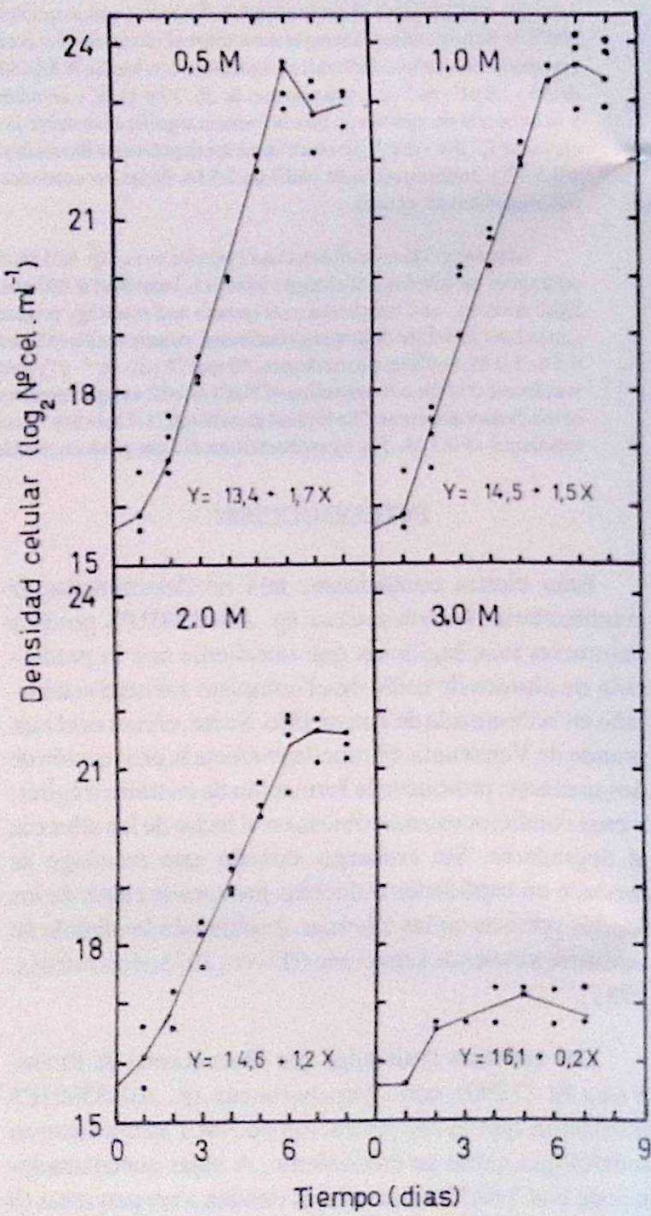


Fig. 1. Crecimiento (log_2 N° cel · ml^{-1} de *Synechococcus* sp. A0185001PS incubado a las concentraciones de NaCl de 0,5 a 3,0 M, irradiancia continua de 78 ± 13 µE · m^{-2} · s^{-1} temperatura de $26 \pm 0,5$ °C y aeración constante de 200 ml · min^{-1}. Cada punto representa el promedio de tres contajes.

notorio como se redujo la tasa de crecimiento a medida que aumentó las salinidad del medio de cultivo.

La tabla 1 muestra las tasas de crecimiento registradas para *Synechococcus* sp. A0185001PS bajo las diferentes condiciones de cultivo. En los ensayos realizados con una irradiación continúa de 50 ± 5 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ la tasa de división más elevada ($1,3$ div $\cdot$ día^{-1}) se observó en los organismos incubados a 0,5 M de NaCl y $26 \pm 0,5$ °C. Al aumentar la temperatura se produjo un desplazamiento de la tasa de división máxima ($1,2$ div $\cdot$ día^{-1}) hacia las concentraciones intermedias de NaCl. En estos ensayos las tasas de división más bajas (0,1 a 0,7 div $\cdot$ día^{-1}) se encontraron en los cultivos realizados a 3,0 M de NaCl.

En los ensayos realizados a la irradiancia de 78 ± 13 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ (Tabla 1), se observó un resultado similar. Es decir, la tasa de división más alta, 1,7 div $\cdot$ día^{-1}, se registró en los ensayos realizados a 0,5 M de NaCl y $26 \pm 0,5$ °C. Al aumentar la temperatura, la tasa máxima de división, 1,5 a 1,6 div $\cdot$ día^{-1}, ocurrió a la concentración de 1,0 de NaCl. A estas condiciones de irradiancia y temperatura se observaron las mayores densidades poblacionales, superiores a 1×10^7 cel $\cdot$ ml^{-1}. Las tasas de división más bajas, 0,1 a 0,2 div $\cdot$ día^{-1}, a este nivel de iluminación se determinaron en los ensayos realizados a 3,0 M de NaCl y $26 \pm 0,5$ y 35 ± 1 °C.

TABLA 1.- TASAS DE DIVISIÓN DE *SYNECHOCOCCUS* SP A0185001PS OBTENIDAS BAJO LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS. LOS VALORES REPRESENTAN EL PROMEDIO DE TRES RÉPLICAS.

Irradiancia	Temperatura	Concentración de NaCl (M)			
($\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$)	(°C)	0,5	1,0	2,0	3,0
50 ± 5	$26 \pm 0,5$	1,3	1,1	0,8	0,5
	30 ± 1	0,8	0,8	0,9	0,1
	35 ± 1	1,0	1,2	1,2	0,7
78 ± 13	$26 \pm 0,5$	1,7	1,5	1,2	0,2
	30 ± 1	1,5	1,6	1,3	0,9
	35 ± 1	0,6	1,6	1,5	0,1

El análisis de varianza (Tabla 2) indica que la concentración de NaCl, irradiancia y temperatura y sus interacciones ejercen una influencia significativa sobre el

TABLA 2.- RESUMEN DEL ANÁLISIS DE VARIANZA DE TRES FACTORES, MODELO I CON RÉPLICA ($4 \times 3 \times 3$) DEL CRECIMIENTO (LOG_2 Nº CEL $\cdot$ Ml^{-1}) DE *SYNECHOCOCCUS* SP. DURANTE EL DÍA 4.

Fuente de Variación	GL	SS	MS	F_{exp}	$F_{0,05}$
Concentración NaCl	3	100,6602	33,5534	961,082*	3,40
Irradiancia	1	18,9551	18,9551	542,937*	5,36
Temperatura	2	0,9258	0,4629	13,259*	3,99
Con. NaCl x irradiancia	3	7,0820	2,3607	67,618*	3,40
Con. NaCl x temperatura	6	16,2344	2,7057	77,501*	2,68
Irradiancia x temperatura	2	30,1230	15,0615	431,413*	3,99
Con. NaCl x irradiancia x temperatura	6	2,6230	0,4372	12,522*	2,68
Error	48	1,6758	0,0349		

crecimiento de *Synechococcus* sp. A0185001PS.

No se observó la producción de mucílago en grandes cantidades; dicha sustancia estaba presente como aglutinante en los cultivos durante la fase exponencial de crecimiento, pero al final de ésta, las células quedaban aisladas y el mucílago desaparecía. En algunos casos se observó que el cultivo madre, el cual era mantenido sin aireación en tubos de ensayo, formaba mucílago. Ocasionalmente, se notó la generación de sustancias mucilaginosas al agregar medio de cultivo fresco a un cultivo senescente.

El efecto de las diferentes condiciones de cultivo sobre el tiempo generacional de *Synechococcus* sp. A0185001PS está ilustrado en las figuras 2 y 3. En las células incubadas bajo iluminación continua de $50 \pm 5\ \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ se observa que los organismos incubados a 35 ± 1 °C muestran en conjunto los tiempos generacionales más elevados. En general, los tiempos generacionales más rápidos se presentan a concentraciones de NaCl menores o iguales a 2,0 M a las diferentes temperaturas utilizadas. La Fig. 3 muestra una tendencia similar; sin embargo, en este caso

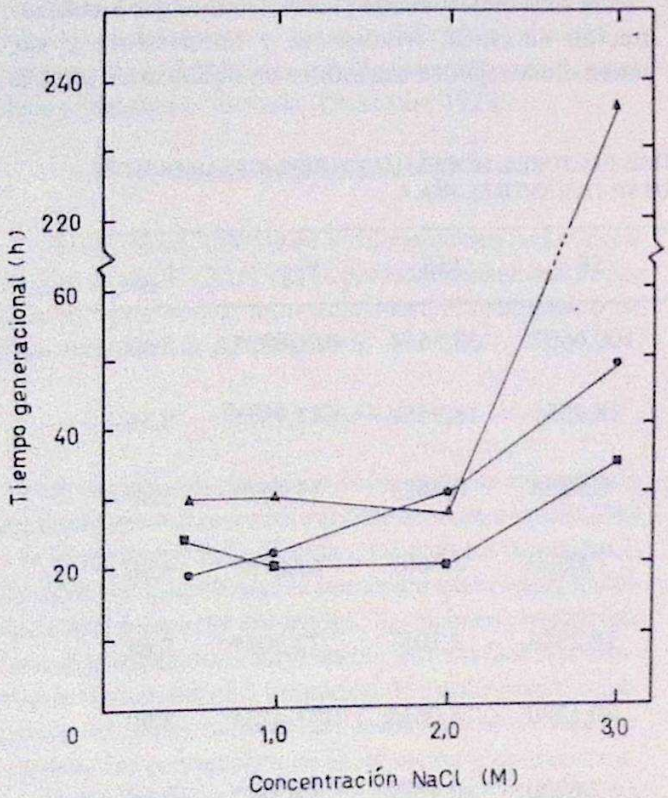


Fig. 2. Tiempo generacional de *Synechococcus* sp. A0185001PS incubado bajo irradiancia continua de $50 \pm 5\ \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, concentración de NaCl de 0,5 a 3,0 M y temperatura de: 26 ± 0,5 °C; 30 ± 1 °C; 35 ± 1 °C. Cada punto representa el promedio de tres réplicas.

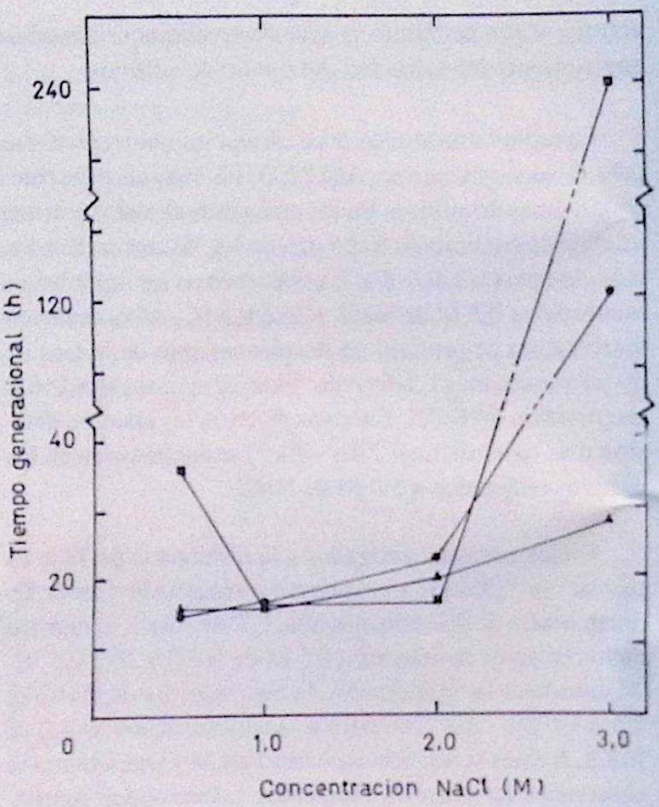


Fig. 3. Tiempo generacional de *Synechococcus* sp. A0185001PS incubado bajo irradiancia continua de $78 \pm 13\ \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, concentración de NaCl de 0,5 a 3,0 M y temperatura de: 26 ± 0,5 °C; 30 ± 1 °C; 35 ± 1 °C. Cada punto representa el promedio de tres réplicas.

los tiempos generacionales más rápidos aparecen a la temperatura de 30 ± 1 °C. Las células cultivadas a 3,0 M de NaCl y 26 ± 0,5 y 35 ± 1 °C exhiben un descenso abrupto en este parámetro poblacional, 120 y 240 horas, respectivamente.

DISCUSION

Los niveles de irradiación utilizados en este trabajo, 50 y 78 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, se encuentran dentro del intervalo óptimo (40-120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) estimado para algunos miembros del género *Synechococcus* (HEALY, 1985 y REYES-VÁSQUEZ, 1985). Así, los cultivos realizados a 78 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ registraron las densidades celulares más elevadas y las tasas de crecimiento más altas. Esto no implica que la tasa fotosintética máxima ocurra también a este nivel. MORRIS & GLOVER (1981) determinaron que el nivel de iluminación óptimo de 120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, para la fotosíntesis en dos cepas de *Synechococcus* era dos

veces superior a aquel donde ocurría la tasa de crecimiento más alta.

La tasa de crecimiento máxima, 1,5 -1,7 div · día^{-1} a 78 µE · m^{-2} · s^{-1}, se registró a concentraciones de NaCl bajas (0,5 M) a 26 °C y a concentraciones intermedias (1,0 y 2,0 M) a 30 y 35 °C; lo que indica una preferencia por medios con concentraciones de NaCl relativamente bajas. Dor & Hornoff (1985), trabajando con una población mixta de cianobacterias cocoidales, aislada de una laguna hipersalina en Israel (cuya temperatura excede 50 °C), hallaron que la tasa de crecimiento máxima, 4,2 div · día^{-1}, ocurrió a 1,9 M de NaCl, 30 °C, y entre 2 y 2,5 M de NaCl a 50 °C.

Si bien, la concentración de NaCl, irradiancia, temperatura y sus interacciones ejercían una influencia significativa sobre la densidad poblacional de *Synechococcus* sp. A0185001PS, se desconoce cómo afectan estos factores otros parámetros fisiológicos y bioquímicos. Un ejemplo de la necesidad de estos estudios es la clorosis observada bajo ciertas condiciones. Aún cuando los cultivos realizados a 1,0 y 2,0 M de NaCl, 78 µE · m^{-2} · s^{-1}, y 35 °C mostraron las tasas de crecimiento más elevadas (Tabla 1), la coloración amarilla indica que los organismos se encuentran bajo condiciones desfavorables. Algo similar se ha observado en la alberca ZB9 de la Salina Artificial de Araya durante los períodos en los cuales se produce mucílago en exceso y también en la salina natural situada en las inmediaciones de Playa Copei (Carúpano, Sucre). En el primer caso, la alberca presentaba un aspecto turbio y un color pardo rojizo y el organismo dominante era *Symechococcus* sp A0185001Ps, mientras que en el caso de la salina, ésta tenía un color amarillo parduzco y el organismo dominante era *Cyanogastrum variabile*.

En *Aphanothece halophytica* (*Synechococcus*), cultivada a temperaturas e iluminaciones superiores a 43 °C y 4240 l/x (aproximadamente 250 µE · m^{-2} · s^{-1}). Tindall *et al.*, (1978) encontraron que la clorosis era consecuencia de la reducción de la razón ficiocianina/clorofila *a*. Reyes-Vásquez (1985) señala que en cultivos en fase exponencial, la clorosis es causada por la interacción de varios factores (y no por intensidades lumínicas elevadas) en cultivos senescentes, principalmente, por cambios en el pH del medio de cultivo.

La producción de mucílago por parte de *Synechococcus* sp. puede ser considerada como una estrategia para mantener su nicho y eliminar competidores (permitiendo la fijación de N_2 o la fotosíntesis anoxigénica) o como una respuesta ante una condición desfavorable para su crecimiento. La producción de sustancias mucilaginosas fue observada bajo aireación continua sólo durante la fase de crecimiento exponencial, siendo un fenómeno transitorio, o en cultivos sin aireación en los cuales el mucílago excretado no desaparecía al entrar en fase de senescencia. Podría especularse que estas sustancias protegen a las células en fase exponencial de crecimiento de alguna condición desfavorable, hasta que el «acondicionamiento del medio» producto del incremento de la población elimine al elemento perturbador. Al considerar que el mucílago no desaparece en los cultivos sin aeración se infiere que la aeración está involucrada en el proceso. El acondicionamiento del medio, aún cuando tenga nutrientes en exceso, es un proceso necesario para el desarrollo de las poblaciones fitoplanctónicas. Barber & Ryther (1969) han señalado que en áreas de surgencia ricas en nutrientes éstos son utilizados efectivamente por el fitoplancton, luego de un proceso de maduración o acondicionamiento que involucra agentes quelantes.

Dor & Hornoff (1985) encontraron que la producción de mucílago en cianobacterias cocoidales aumentaba cuando la temperatura a la cual eran incubados los organismos superaba los 40 °C. Sin embargo, se cree que la producción de estas sustancias depende de otro factor y no de la temperatura ya que Carrasquero (datos no publicados) ha informado que la temperatura en las diferentes albercas que conforman la salina artificial de Araya oscila entre 27 y 34 °C durante el día y la producción de mucílago es alta.

La elucidación de los factores o del factor que ocasionan la producción de mucílago en *Synechococcus* sp. A0185001PS amerita un trabajo de campo ligado a cultivos de laboratorio donde se estudie la interacción de los parámetros físicos, químicos y biológicos que rigen el crecimiento de este organismo. Algunos de los primeros estudios a realizar serían el efecto de diferentes niveles de pH y los requerimientos nutricionales de metales como hierro.

CONCLUSIONES

1.- Los niveles de concentración de NaCl, irradiancia y

temperatura utilizados en esta investigación influyen de modo significativo en la densidad poblacional y la tasa de crecimiento de *Synechococcus* sp. A0185001PS.

2.- Los niveles de concentración de NaCl, irradiancia y temperatura empleados en esta investigación no promueven la formación de mucílago en *Synechococcus* sp. A0085001PS.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado a través del Proyecto CONICIT SI-1801. Los autores quieren expresar su agradecimiento a Elvira Ferráz-Reyes, Esther Fernández Alvarez, José A. Véliz y José de Jesús García cuya colaboración hizo posible la realización de este trabajo. También quieren agradecer sus atinadas observaciones a un revisor anónimo.

REFERENCIAS

BARBER, R. T. & J. H. RYTHER. 1969. Organic chelator: factors affecting primary production in the Cromwell Current upwelling. *J. exp. Mar. Ecol., 3*:191-199.

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

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

DÍAZ RAMOS, J. R. & G. REYES VÁSQUEZ. 1990. *Synechococcus* sp. A0185001PS (Cyanobacteria), I, efectos de la concentración de NaCl sobre el crecimiento y la morfología de una cepa aislada de la Salina Artificial de Araya (Araya, Sucre). *Bol. Inst. Oceanogr. Univ. Oriente, 30* (1 y 2): 153-159.

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

GUILLARD, R. R.L. 1973. División Rates. In: *Handbook of Phycological Methods.* J. R. Stein (ed.) Cambridge University Press. London. pp. 290-311.

HEALY, F. P. 1985. Interacting effects of light and nutrient limitation on the growth rate of *Synechococcus linearis* (Cyanophyceae). *J. Phycol. 21*:134-146.

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

MCLACHLAN, J. 1973. Growth media-marine. *In: Handbook of Phycological Methods.* J. R. Stein (ed.). Cambridge University Press. pp. 26-49.

MORRIS, I. & H. GLOVER. 1981. Physiology of photosinthesis by marine coccoid cyanobacteria - Some ecological implications. *Limnol. Oceanogr., 26* (5):957-961.

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

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

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