

Influencia del nitrato sobre la producción de biomasa, pigmentos y proteínas de la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120

César Loreto¹, Roberta Mora¹, Eduardo Marco² y Ever Morales^{1*}

¹Laboratorio de Microorganismos Fotosintéticos. Departamento de Biología. Facultad Experimental de Ciencias, La Universidad del Zulia. Apartado 526 Maracaibo, Venezuela. ²Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid, España.

Recibido: 10-09-02 Aceptado: 30-04-04

Resumen

Se determinó el efecto de la concentración de nitrato sobre el crecimiento, contenido de pigmentos, proteínas y peso seco de la cianobacteria *Anabaena* sp PCC 7120. Los cultivos se realizaron con medio ALGAL a las concentraciones equivalentes de nitrato de sodio. En el primer experimento se evaluó a 2, 4, y 8 mM, y en el segundo a 0, 1, 2, 4 y 8 mM. Los cultivos por tres réplicas se mantuvieron con aireación constante, ciclo de luz:oscuridad 12:12 h, a una intensidad luminosa de $117 \mu\text{mol m}^2/\text{s}$ y a $28 \pm 2^\circ\text{C}$. El crecimiento fue seguido mediante turbidez a 750 nm y recuento celular hasta fase estacionaria. A 8 mM de nitrato, se produjeron los máximos valores de densidad celular, clorofila *a*, ficocianina y proteínas con $202,4 \pm 3 \times 10^6$ cel/mL, $17,41 \pm 1,20$; $174,28 \pm 16,19$ y $563,8 \pm 2,74 \mu\text{g/mL}$ respectivamente, con diferencia significativa ($P > 0,05$). Es decir, el crecimiento, contenido de ficocianina, clorofila *a* y de proteínas obtenido a 8mM fue de 3,3; 1,6; 2,0 y 1,6 veces superior a los cultivos iniciados con 2 mM. Estos resultados demostraron también que, *Anabaena* sp PCC 7120 puede crecer sin nitrógeno y que la producción de biomasa, peso seco, ficocianina, clorofila *a* y proteínas es estimulada con la concentración de nitrato en el medio de cultivo con el siguiente orden ascendente: $0 < 1 < 2 < 4 < 8$ mM.

Palabras claves: *Anabaena*; cianobacteria; nitrato; pigmentos; proteínas.

Effect of nitrate on biomass, pigment and protein production of the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120

Abstract

The effect of nitrate concentration on growth, pigment and protein content and dry weight of the cyanobacterium *Anabaena* sp PCC 7120 was determined. Cultures were carried out with Algal medium at equivalent concentrations of sodium nitrate. In the first experiment was evaluated at 2, 4, and 8 mM and in the second at 0, 1, 2, 4, and 8 mM. The cultures with three replicas was maintained with constant aeration, light:dark cycle 12:12 h light intensity of $117 \mu\text{mol m}^2/\text{s}$ and at $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Growth was followed by turbidity at 750 nm and cell count until stationary phase. The highest values of cell density, chlorophyll *a*, and phycocyanin of $202.4 \pm 3 \times 10^6$ cel/mL, 17.41 ± 1.20 , 174.28 ± 16.19 y $563.8 \pm 2.74 \mu\text{g/mL}$ respectively, were obtained at 8 mM

* Autor para la correspondencia. E-mail: everm@iamnet.com

nitrate with significant difference ($P > 0.05$). For example, the growth, phycocyanin, chlorophyll *a* and proteins obtained to 8mM were of 3.3, 1.6, 2.0 and 1.6 times higher than to 2 mM. These results demonstrated likewise that *Anabaena* sp PCC 7120 can be growth without nitrogen, and that the biomass production, dry weight, phycocyanin, chlorophyll and proteins is stimulated with nitrate concentration in the increase order: $0 < 1 < 2 < 4 < 8$ mM.

Key words: *Anabaena*; cyanobacterium; nitrate; pigments; proteins.

Introducción

Las cianobacterias constituyen un grupo de microorganismos fotosintéticos con características morfológicas y fisiológicas capaces de responder a cambios ambientales extremos de intensidad luminosa, salinidad y pH (1). De acuerdo a las condiciones de cultivos también pueden ser potencialmente fuente de pigmentos, proteínas y de exopolisacáridos (2).

El nitrógeno es el elemento que después del carbono contribuye con la producción de biomasa y composición bioquímica de las células microalgales. Varios resultados muestran que se produce gran variabilidad tanto en el crecimiento como en la composición bioquímica debido a las variaciones en la concentración de nitrógeno. Así mismo, las fuentes nitrogenadas varían en cuanto a la influencia que pueden ejercer sobre la fisiología microalgal (3, 4).

Las cianobacterias sufren cambios en la estructura y metabolismo celular y la expresión de genes en respuesta a la limitación de nitrógeno. Los primeros cambios implican la degradación de las ficobiliproteínas, las cuales constituyen fuente importante de nitrógeno (5, 6).

El estudio de la influencia de diversas condiciones ambientales sobre la producción de compuestos de interés biotecnológico, tales como ficocianina y proteínas en cianobacterias es de gran utilidad; con lo cual se logra optimizar las condiciones de cultivo para estimular la producción de estos productos (7). Por ejemplo, en cultivos semicontinuos de *Anabaena* PCC 7120 mantenidos a una suficiencia de nitrato de 8mM, se logró un aumento de clorofila *a*, ficocianina y de

exopolisacáridos cuando no era adicionado CO_2 al sistema de cultivo. Mientras que, la adición del mismo no influyó en el crecimiento, actividad fotosintética y contenido de carotenoides (8).

Es necesario estudios relacionados con el efecto de la concentración de nitrógeno y de otros nutrientes sobre la composición bioquímica o producción de metabolitos en cianobacterias de interés económico. En este sentido, se reporta el efecto del nitrato sobre el crecimiento, peso seco y contenido de clorofila, ficocianina, carotenoides y proteínas de la cianobacteria *Anabaena* PCC 7120 en cultivos discontinuos.

Materiales y Métodos

Organismo y condiciones de cultivo

La cianobacteria *Anabaena* PCC 7120 corresponde una cepa con potencial en la producción de ficocianina y exopolisacáridos y para lo cual fue seleccionada en el presente estudio. Se cultivó en frascos de vidrio autoclavables de 400 mL de capacidad con un volumen de 200 mL utilizando el medio de cultivo comercial ALGAL (8) a un pH inicial de 8,0.

Se realizaron dos experimentos, en el primero de los cuales se utilizó nitrato de sodio a la concentración de 2, 4 y 8 mM y en el segundo a las de 0, 1, 2, 4, y 8 mM. El medio de cultivo ALGAL, se utilizó a las concentraciones equivalentes de nitrato para cada tratamiento. Para ambos experimentos se utilizó un cultivo de *Anabaena* en fase exponencial como inóculo inicial; el cual fue adicionado al medio de cultivo a una absorbancia de 0,08 medida a 750 nm.

Todos los cultivos por triplicado se mantuvieron con aireación constante, fotoperíodo de 12:12 h, a una intensidad luminosa de $117 \mu\text{mol m}^2/\text{s}$ y a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ hasta fase estacionaria.

Determinación del crecimiento

El crecimiento de cada cultivo por triplicado se siguió diariamente mediante el método de turbidez a 750 nm en un espectrofotómetro Hitachi U-2000 y por recuento celular en cámara de Neubauer. Para ello, se centrifugaron 0,5 mL del cultivo, y la biomasa colectada fue homogenizada para fragmentar los filamentos y luego realizadas diluciones apropiadas para el recuento celular.

Para la determinación del peso seco se extrajeron 3 mL de cada réplica por duplicado, luego las muestras se filtraron al vacío utilizando papel de filtro Whatman GF/C de 25 mm de diámetro previamente lavados con agua destilada, secados en la estufa a 100°C por 48 horas y pesados en una balanza analítica. El proceso de filtración se realizó en un Manifold que permite la filtración de varias membranas a la vez. Una vez filtradas las muestras, se guardaron en la estufa y se pesaron cada 48 horas hasta obtener un peso constante (9).

Determinación de pigmentos

Para la extracción de clorofila α y carotenoides se centrifugó 1 mL de cultivo a 14000 r.p.m. durante 10 min en tubos eppendorf. El sedimento se resuspendió en 1 mL de metanol y se mantuvo en oscuridad durante 24 h a 4°C . El sobrenadante se analizó a 665 nm y la concentración se determinó utilizando el coeficiente de extinción molar según Marker (10). El contenido de carotenoides se determinó en la misma extracción a 480 nm y aplicando la ecuación de Britton (11).

La extracción de ficocianina se realizó mediante el método del choque osmótico modificado de Wyman y Fay (12). Al concentrado celular proveniente de 1 mL de cultivo se le añadió un volumen de 100 μL de glice-

rol. La mezcla se homogeneizó y se mantuvo a 4°C en oscuridad durante 30 min. Luego se añadió 1 mL de agua destilada y se centrifugó 13000 r.p.m. durante 10 min. El sobrenadante se analizó a 652 y a 615 nm en un espectrofotómetro. La concentración de ficocianina se determinó según la ecuación de Bennet y Bogorad (13). El contenido de todos los pigmentos en la cianobacteria *Anabaena* se expresó en $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Determinación de proteínas

Las proteínas totales se determinaron según el método de Lowry (14) modificado por Herbert *et al.* 1971(15). Las muestras fueron analizadas a 750 nm y el contenido se determinó según la curva estándar usando albúmina sérica bovina (0-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se expresaron como los promedios \pm desviación estándar de las replicas de cada tratamiento. Las diferencias entre los tratamientos se determinaron por el análisis de varianza de una vía, previa confirmación de la normalidad de los datos. Las diferencias entre tratamientos individuales se determinaron utilizando la prueba de Scheffé. Los cálculos estadísticos se realizaron usando el programa Statmost for Windows (Versión 3.0).

Resultados y Discusión

Efecto del nitrato sobre el crecimiento

Densidad celular

La densidad celular de *Anabaena* PCC 7120 aumentó con la concentración creciente de nitrato de sodio presente en el medio. La mayor densidad celular se obtuvo a 8 mM, con $202,43 \pm 29,91 \times 10^6$ cel/mL, con diferencia significativa ($P > 0,05$). Mientras que a 2 y 4 mM fueron de $60,49 \pm 13,99$ y $96,16 \pm 17,16 \times 10^6$ cel/mL respectivamente (Tabla 1). Estos resultados coinciden con el crecimiento seguido mediante turbidez, ya que de igual manera se produjo un incremento de la absorbancia como indicativo del aumento de la bio-

Tabla 1
Crecimiento ($\times 10^6$ cel/mL), contenido de pigmentos, proteínas y peso seco ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de la cianobacteria *Anabaena* PCC 7120 en función del nitrato de sodio (mM)

[NO ₃ Na]	2	4	8
Densidad celular	60,49±13,99	96,16±17,16	202,43±29,91
Ficocianina	78,88±6,42	92,86±10,68	124,98±20,36
Clorofila <i>a</i>	9,24±0,72	14,60±0,85	18,63±1,64
Carotenoides	3,45±0,01	4,03±0,16	4,23±0,10
Peso seco	0,48±0,18	0,56±0,11	0,60±0,18
Proteínas	269,64±9,89	280,64±0,0	433,51±51,58

Datos correspondientes al experimento I.

masa de la cianobacteria con la concentración de nitrato. Sin embargo, entre 2 y 4 mM no se registró diferencia a 750 nm (Figura 1). No obstante, cuando se realizaron cultivos entre 0 y 8 mM de nitrato, también se demostró el mayor crecimiento con la concentración de este nutriente, con el siguiente orden ascendente de $0 < 1 < 2 < 4 < 8$ mM de nitrato al final de la fase exponencial.; aun cuando en fase estacionaria los cultivos iniciados entre 2 y 8 mM exhibieron valores similares de absorbancia (Figura 2).

Los resultados obtenidos en los cultivos de *Anabaena* PCC 7120 sugieren que las concentraciones menores a 4 mM de nitrato son insuficientes para obtener un buen crecimiento de la cianobacteria (Figura 1). Varios estudios han mostrado que las concentraciones de nitrato de 1 y 2 mM son limitantes para el crecimiento de cianobacterias tales como *Oscillatoria agardhii*, *O. redekei* (16) y *O. rubescens* y *Spirulina platensis* (17)

Los mayores valores de peso seco obtenidos a 4 y 8 mM de nitrato, con $0,56 \pm 0,11$ y $0,60 \pm 0,18$ mg /mL corroboran la influencia que tiene el nitrato en la producción de biomasa; la cual está relacionada con las mayores densidades celulares alcanzadas a estas concentraciones de nutrientes.

Producción de pigmentos

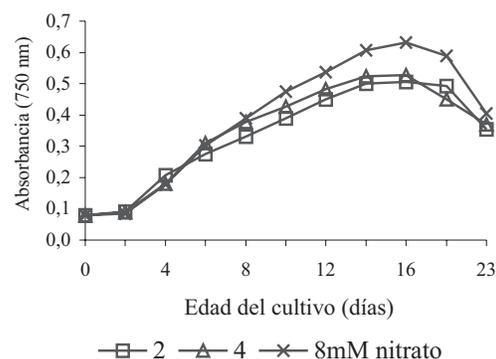


Figura 1. Efecto de la concentración de nitrato de sodio (2, 4 y 8mM) sobre el crecimiento (750nm) de *Anabaena* PCC

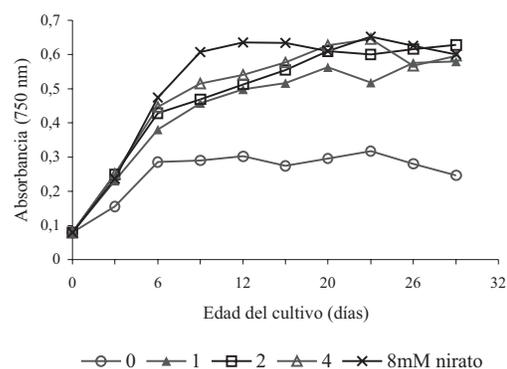


Figura 2. Efecto de la concentración de nitrato de sodio (0, 1, 2, 4 y 8mM) sobre el crecimiento (750nm) de *Anabaena* PCC 7120 en función de la edad del cultivo.

El contenido de ficocianina y de clorofila se incrementó significativamente ($P > 0,05$) con la concentración de nitrato en el medio de cultivo. Sin embargo, en carotenoides solo se presentó diferencia ($P < 0,05$) entre los cultivos a 1 mM de nitrato y los crecidos sin nitrato adicional.

En cuanto a la ficocianina, el análisis estadístico (ANOVA de una vía, Prueba de Scheffe), reveló diferencias significativas ($P > 0,05$) entre todos los tratamientos, excepto entre 2 y 4 mM para los dos experimentos (Tabla 1 y 2). A 8 mM de nitrato, el contenido fue de $174,28 \pm 16,19 \mu\text{g/mL}$. Mientras que para los cultivos con 1 mM y sin nitrato fueron de $82,23 \pm 4,51$ y de $20,01 \pm 7,01 \mu\text{g/mL}$ respectivamente. Esto representa un incremento de 8,7 y 2,1 veces para cada uno de estos dos tratamientos. Los resultados obtenidos a 8 mM indican que la producción de ficocianina es mayormente estimulada a esta concentración de nitrato.

En medios de cultivos deficientes en nitrógeno se ha demostrado la disminución de la síntesis de ficocianina. En las cianobacterias *Anacystis nidulans* (18) y *Synechococcus* sp. IO9201, se produjeron valores de ficocianina muy bajos a concentraciones de 1 y 2 mM de nitrato en comparación con concentraciones suficientes en nitrógeno (19)

La clorofila *a* también es progresivamente acumulada con la concentración del nitrato con diferencia significativa ($P > 0,05$) y con la edad del cultivo en ambos experimen-

tos. Sin embargo, en el segundo ensayo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos 2 y 4 mM (Tabla 2). En este, los cultivos crecidos sin la adición de nitrato, el contenido fue de $3,98 \pm 0,92 \mu\text{g/mL}$; mientras que a 2 mM alcanzó a $13,9 \pm 1,18$ y a 8 mM se incrementó hasta $17,4 \pm 1,20 \mu\text{g/mL}$. En cultivos discontinuos de *Spirulina platensis* también se ha descrito un incremento de la clorofila *a* con la concentración de urea hasta 500 mg/mL (20).

Los carotenoides presentaron una tendencia a la acumulación hacia el final de la fase estacionaria y presentaron el mismo patrón general que los pigmentos anteriores. Parece no existir una elevada diferencia entre las concentraciones evaluadas de nitrato. Aunque, entre 2 y 4 mM no hubo diferencia significativa ($P > 0,05$).

La concentración de pigmentos está en relación con la concentración de nitrógeno. En condiciones de limitación de nitrógeno las cianobacterias son capaces de degradar la ficocianina como un mecanismo de movilización de nitrógeno hacia aquellos procesos de crecimiento celular y metabolismo. Es decir que, este pigmento funciona como reserva de nitrógeno en las cianobacterias (20).

Contenido de proteínas

El incremento del contenido de proteínas conforme aumenta el nitrato también refleja la influencia de este nutriente en el metabolismo primario. En el primer experimento se produjo un aumento de 1,6 veces

Tabla 2
Contenido de pigmentos y de proteínas ($\mu\text{g/mL}$) de la cianobacteria *Anabaena* PCC 7120 en función del nitrato de sodio (mM)

[NO ₃ Na]	0	1	2	4	8
Ficocianina	20,01±7,01	82,23±14,51	122,24±11,77	132,80±17,35	174,28±16,19
Clorofila <i>a</i>	3,98±0,92	10,40±0,68	13,91±1,18	14,78±1,26	17,41±1,20
Carotenoides	1,24±0,30	3,02±0,13	3,68±0,37	3,93±0,51	4,57±0,39
Proteínas	211,44±23,44	409,0±9,91	506,6±73,34	532,8±9,91	563,8±2,74

Datos correspondientes al experimento II.

en los cultivos iniciados con 8 mM con respecto a los crecidos con 2 mM. Mientras que, en el segundo realizado a 0, 1, 2, 4, y 8 mM se demostró igualmente que la suficiencia en nitrógeno favorece la producción de proteínas. Es decir, a 8 mM se obtuvo un contenido de proteínas de 2,6 veces al producido cuando la cianobacteria era cultivada sin ninguna fuente de nitrógeno. Sin embargo, es de indicar que, el crecimiento y producción de proteínas obtenidos en ausencia de nitrógeno obedece a la capacidad que presenta *Anabaena* de fijar nitrógeno y de mantener su crecimiento, al menos con una baja tasa de duplicación ante la carencia externa de nitrógeno (21).

Conclusiones

El crecimiento y síntesis de clorofila, ficocianina y proteínas en *Anabaena* sp PCC 7120 está en función de la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo. Es decir, cuando *Anabaena* PCC 7120 fue crecida a la concentración mas elevada de nitrato se estimuló el crecimiento y la producción de ficocianina, clorofila *a*, carotenoides y proteínas. Así como también se demostró un crecimiento sostenido aún bajo una limitación o ausencia de nitrógeno y un incremento del mismo con la concentración del nitrato, en el siguiente orden ascendente: 0 < 1 < 2 < 4 < 8 mM.

Agradecimientos

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia, a través del Proyecto CONDES 1902-99 por su cofinanciamiento para desarrollar la presente investigación.

Referencias Bibliográficas

1. WHITTON B. *Photosynthetic Procarriotes* (Eds. Mann N. H; Carr N. G.) Plenum Press, New York (USA), pp 1-51, 1992.
2. RODRIGUEZ H., GUERRERO M. *Profiles in Biotechnology* (Eds. Villa, T., Abalde, J.) Servicio de publicaciones de la Universidad

de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela (España), pp: 247-260, 1992.

3. BOUSSIBA S., RICHMOND A. *Arch Microbiol* 125: 143-147, 1980.
4. COHEN Z. *Handbook of Microalgal Mass Culture* (Ed. Richmond, A.), CRC Press Inc, Boca Raton Florida (USA), pp. 421-454, 1986.
5. TANDEAU DE MARSAC N., HOUMAR J. *FEMS Microbiol Rev* 104: 119-190, 1993.
6. LIOTENBERG S., CAMPBELL D., RIPPKA R., HOUMAR J. TANDEAU DE MARSAC N. *Microbiology* 142: 611-622, 1996.
7. GROBBELAAR J. *J Appl Phyco* 3: 201-206, 2000.
8. MORALES E., RODRÍGUEZ M., GARCÍA D., LORETO C., MARCO E. *Interciencia* 27: 373-378, 2002.
9. FÁBREGAS J., ABALDE J., HERRERO C., CABEZAS B., VEIGA M. *Aquaculture* 42: 207-215, 1984.
10. FÁBREGAS J., ARÁN J., MORALES E., LAMELA T., OTERO A. *Phytochemistry* 46: 1189-1191, 1997.
11. MARKER A. *Fresh Biol* 2: 361-385, 1972.
12. BRITTON G. *Methods Enzymol* 111: 113-158, 1985.
13. WYMAN M., FAY P. Underwater light climate and the growth and pigmentation of planktonic blue-green algae (cyanobacteria) I. The influence of light quality. *Proceedings of the Royal Society of London*. London (England), pp 367-380, 1986.
14. BENNET A., BOGORAD L. *J Cell Biol* 58: 419-435, 1973.
15. LOWRY O., ROSEBROUG H., FARR A., RANDALL R. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951.
16. HERBERT D., PHIPPS P., STRANGE R. *Methods in Microbiology* (Eds. Norris J. Ribbons D.) volume 5, Academic Press, London (England), pp209-344, 1971.
17. FOY R. *J Plank Res* 15: 1263-1276, 1993.

-
18. BECKER E. **Microalgae. Biotechnology and Microbiology**, Cambridge University Press, Cambridge, 1994.
 19. LAU R., MACKENZIE M., DOOLITTLE W. **J Bact** 132: 771-778, 1977.
 20. BETANCOURT L. Producción, purificación y caracterización de la ficocianina de *Synechococcus* sp IO9201 aislada en aguas de Cuba (Tesis Doctoral), Universidad de la Coruña, la Coruña (España), pp. 187, 1997.
 21. LEWITUS A., CARON D. **Mar Ecol Prog Ser** 61:171-181, 1990.
 22. MISHRA A. **Cytobios** 89:173-182, 1997.