

CRECIMIENTO Y COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA DE *Synechococcus* sp. MODULADOS POR NITRATO DE SODIO

Néstor Rosales, Lorena Jonte y Ever Morales*

Laboratorio de Microorganismos Fotosintéticos, Departamento de Biología,
Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia.
Maracaibo, Venezuela. Correo electrónico: everm@iamnet.com.
Fax: +58-261-7598107. Tel: +58-261-7598107 / 414-6338004

Resumen. Se evaluó el efecto de la concentración de NaNO_3 (0, 4, 8 y 12 mM) sobre el crecimiento y composición bioquímica de la cianobacteria marina *Synechococcus* sp., aislada de un medio ambiente hipersalino, en cultivos discontinuos. La mayor densidad celular se alcanzó a 12 mM NaNO_3 con $501,56 \pm 33,74 \times 10^6$ cel mL^{-1} ; y a esta misma concentración se obtuvieron los máximos contenidos de clorofila *a*, β -caroteno, zeaxantina, lípidos y proteínas con $22,73 \pm 2,99$; $1,93 \pm 0,06$; $2,08 \pm 0,06$; $172,72 \pm 3,09$ fg cel $^{-1}$ y $1,27 \pm 0,02$ pg cel $^{-1}$, respectivamente. El incremento del contenido de carbohidratos y de la producción de exopolisacáridos se observó a 4 mM con $1,80 \pm 0,02$ pg cel $^{-1}$ y $184,61 \pm 4,45$ $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Los valores máximos de masa seca se alcanzaron a 4 y 8mM NaNO_3 con $3,80 \pm 0,37$ y $3,66 \pm 0,31$ $\mu\text{g cel}^{-1}$, sin diferencias significativas ($p > 0,05$). Se reveló que *Synechococcus* sp. muestra un alto potencial para la producción de biomasa enriquecida con pigmentos, proteínas y lípidos a altas concentraciones de NaNO_3 , mientras que el contenido de carbohidratos y la producción de exopolisacáridos se incrementó en cultivos limitados de este nutriente.

Palabras clave: Cianobacteria, exopolisacáridos, nitrato de sodio, pigmentos, proteínas, *Synechococcus*.

* Autor para la correspondencia.

Recibido: 07 Julio 2005 / Aceptado: 30 Mayo 2006
Received: 07 July 2005 / Accepted: 30 May 2006

GROWTH AND BIOCHEMICAL COMPOSITION OF *Synechococcus* sp. MODULATED BY SODIUM NITRATE

Abstract. We assessed the effect of NaNO_3 concentrations (0, 4, 8 y 12 mM) on growth and biochemical composition of the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. isolated from a hypersaline environment, in batch cultures. Highest cell density was reached at 12 mM NaNO_3 with $501.56 \pm 33.74 \times 10^6$ cell mL^{-1} , as well as maximum concentrations of chlorophyll *a* (22.73 ± 2.99), -carotene (1.93 ± 0.06), zeaxanthin (2.08 ± 0.06), lipid (172.72 ± 3.09 fg cell⁻¹) and protein (1.27 ± 0.02 pg cell⁻¹) content. An increase in carbohydrate content and exopolysaccharide production was observed at 4 mM, with 1.80 ± 0.02 pg cell⁻¹ and 184.61 ± 4.45 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectively. Dry weight was highest at 4 and 8 mM NaNO_3 (3.80 ± 0.37 and 3.66 ± 0.31 $\mu\text{g cel}^{-1}$), but with no statistical differences ($p > 0.05$). *Synechococcus* sp. shows a high potential to produce biomass enriched with pigments, proteins and lipids at high NaNO_3 concentrations, whereas carbohydrate content and EPS production are enhanced in nitrate-limited cultures.

Key words: Cyanobacterium, exopolysaccharides, pigments, proteins, sodium nitrate, *Synechococcus*.

INTRODUCCIÓN

Las cianobacterias son microorganismos procariotas capaces de sintetizar clorofila *a*, ficobiliproteínas y carotenoides a fin de realizar fotosíntesis oxigénica o anoxigénica bajo determinadas condiciones ambientales. Su versatilidad metabólica está relacionada con su grado de adaptación a condiciones ambientales extremas de temperatura, pH, salinidad y limitación de nutrientes (Whitton y Potts 2000).

Las cianobacterias, al igual que muchas especies de microalgas, se han propuesto como una alternativa para muchas aplicaciones biotecnológicas. También se ha comprobado su uso potencial para transformar la energía luminosa en formas renovables de productos de gran utilidad en industrias como la alimentaria y la farmacéutica (Tandeau de Marsac y Houmar 1993).

En las últimas décadas ha surgido un nuevo campo de explotación de las cianobacterias, debido al crecimiento del interés industrial hacia los polisacáridos de origen microbiano. Esto ha dado inicio a una intensa búsqueda de cepas capaces de producir exopolisacáridos (De Philippis y Vicenzini 1998).

El crecimiento de las cianobacterias en ambientes acuáticos está controlado por una variedad de factores, y para su cultivo, se requieren condiciones adecuadas de nutrientes, temperatura, pH e intensidad luminosa (Whitton y Potts 2000). El conocimiento de sus características fisiológicas y bioquímicas, a través de la determinación de parámetros como salinidad, iluminación, pH, nutrientes, entre otros, permite conocer su potencial biotecnológico e interpretar el crecimiento de estos microorganismos en su ambiente natural.

En la región noroccidental de Venezuela se han descrito diversos trabajos sobre crecimiento de cianobacterias autóctonas en función de varios parámetros de cultivo, entre ellos salinidad, intensidad luminosa y concentración de nutrientes en *Pseudanabaena galeata*, *Limnothrix* sp. (Mora et al. 2002), *Synechocystis minuscula* (Jonte et al. 2003) y *Synechococcus* sp. (Rosales et al. 2005).

El objetivo del presente trabajo es evaluar el crecimiento y la composición bioquímica de una cepa halotolerante de *Synechococcus*, a diferentes concentraciones de nitrato de sodio.

MATERIALES Y MÉTODOS

La cianobacteria marina *Synechococcus* sp. se aisló del pozo de agua Salina Rica (10° 47' N y 71° 38' O), ubicado al norte de la ciudad de Maracaibo, Venezuela. Esta cepa está constituida por células solitarias en forma de bacilos, en pares o formando tricomas de hasta diez células y con un tamaño celular de $3,57 \pm 0,12 \mu\text{m}$ de largo y $1,47 \pm 0,09 \mu\text{m}$ de ancho. Es de hábitat planctónico, de color verde azulado en cultivos líquidos y con capacidad halotolerante, creciendo hasta 10% de salinidad (Rosales et al. 2005).

La cianobacteria se cultivó en frascos de 350 mL con un volumen de 150 mL de agua de mar a 3,5% estéril y enriquecida con medio de cultivo ALGAL (Fábregas *et al.* 1984). Durante el bioensayo, por triplicado, se probaron cuatro concentraciones de nitrato de sodio (NaNO_3): 0, 4, 8 y 12 mM. Es importante acotar que, el aumento del resto de los componentes del medio fue proporcional al incremento de la concentración de nitrato de sodio; mientras que el tratamiento sin nitrógeno sólo incluyó los oligoelementos y el fosfato del mismo medio de cultivo comercial.

Antes del inicio de cada experimento, el inóculo con una densidad celular de 15×10^6 cel mL^{-1} y procedente de un cultivo en fase exponencial, se sometió a centrifugación y lavado con agua de mar estéril, con la finalidad de descartar el medio de cultivo remanente. Los cultivos se mantuvieron a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, con aireación constante de 5 mL s^{-1} , fotoperiodo luz/oscuridad 12:12 h e intensidad luminosa $156 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, proporcionada por lámparas fluorescentes en posición lateral a los cultivos.

La densidad celular se determinó por recuento en microscopio, cada tres días, hasta alcanzar fase estacionaria, usando un hematocitómetro Neübauer. Los análisis de biomasa se realizaron durante la fase estacionaria, y los cálculos de la velocidad de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (Td) se llevaron a cabo en fase exponencial, utilizando las ecuaciones propuestas por Lobban *et al.* (1988).

La biomasa se cosechó por centrifugación a 14×10^3 g por 15 min, y luego de congelada y almacenada -20°C , se usó para todos los análisis bioquímicos, excepto para el contenido de pigmentos y masa seca, donde se utilizó biomasa fresca. La masa seca se determinó mediante un sistema de filtración Millipore[®], con filtros de fibra de vidrio de $0,45 \mu\text{m}$ de poro y de acuerdo al método de Utting (1985).

El contenido de proteínas se estimó por el método de Lowry-Folin (Lowry *et al.* 1951). Los pigmentos se analizaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), obtenidos por extracción metanólica y con las condiciones de corrida descritas por Vidussi *et al.* (1996). Para ello se utilizó una columna Agilent

Hypersil MOS ($4,6 \times 100$ mm, $5 \mu\text{m}$ de tamaño de partícula), con estándares para la calibración y cuantificación de los pigmentos.

Los carbohidratos y exopolisacáridos (EPS) se midieron por el método de fenol-ácido sulfúrico (Kochert 1978). Para la cuantificación de EPS se utilizó el sobrenadante de los cultivos en fase estacionaria. El contenido de lípidos se determinó por el método de carbonización simple (Marsh y Weisntein 1966).

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa SPSS 10,0 para Windows, utilizando un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Sheffé para examinar las diferencias en la densidad celular y la composición bioquímica entre los diferentes tratamientos.

RESULTADOS

Synechococcus sp. demostró dependencia del nitrógeno para su crecimiento, debido a que en su ausencia exhibió una disminución significativa de la población inicial (Fig. 1) ($p < 0,05$). Cuando la cianobacteria se expuso a un medio sin nitrógeno, se mantuvo sin cambios en la densidad celular durante los primeros 6 días de cultivo. A partir del noveno día de cultivo, se observó la pérdida de la coloración o clorosis en los cultivos y pérdida de la pigmentación característica. Sin embargo, cuando dichos cultivos fueron resuspendidos en medio con nutrientes, a una concentración equivalente a 4 mM NaNO_3 y a baja iluminación, se produjo crecimiento y regeneración del color verdeazulado en un periodo de 10 días.

En los cultivos con nitrógeno, en contraste, se produjo un incremento de la densidad celular proporcional a la concentración de nutrientes. Así, los máximos valores de densidad celular se obtuvieron a 12 mM NaNO_3 , con $501,56 \pm 53,74 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$, la cual duplicó a la obtenida a 4 mM NaNO_3 y con diferencia significativa ($p < 0,05$) (Figura 1). La velocidad de crecimiento fue mayor en los cultivos iniciados a 12 mM NaNO_3 , con $0,62 \text{ div día}^{-1}$, mientras que el tiempo de duplicación fue similar en todas las concentraciones de nu-

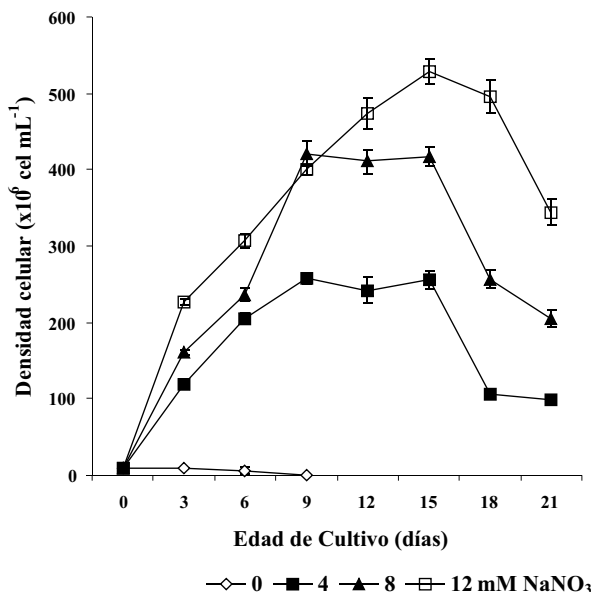


FIGURA 1. Crecimiento de *Synechococcus* sp. a diferentes concentraciones de nitrato de sodio.

trientes, con valores de 1,12; 1,21 y 1,28 días⁻¹ para 4, 8 y 12 mM NaNO₃, respectivamente.

Por su parte, los máximos valores de masa seca se alcanzaron a 4 y 8 mM NaNO₃ con $3,80 \pm 0,37$ y $3,66 \pm 0,31$ $\mu\text{g cel}^{-1}$ respectivamente y sin diferencias estadísticas entre ambos valores ($p > 0,05$) (Fig. 2).

La composición de pigmentos liposolubles de *Synechococcus* sp., mostró un aumento proporcional a la concentración de nutrientes. Los máximos valores para clorofila *a*, -caroteno y zeaxantina se obtuvieron a 12 mM NaNO₃ (Tabla 1). La relación clorofila *a*/ -caroteno se incrementó a 8 mM NaNO₃, en relación con el resto de los cultivos. Sin embargo, la relación -caroteno/zeaxantina disminuyó 2,5 veces entre la menor y la mayor concentración de nutrientes (Tabla 1).

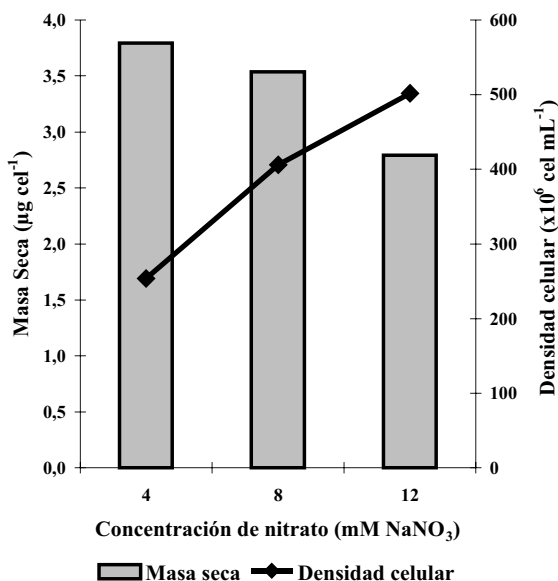


FIGURA 2. Densidad celular y masa seca de *Synechococcus* sp. a diferentes concentraciones de nitrato de sodio.

TABLA 1. Contenido de clorofila *a*, β -caroteno y zeaxantina y relación clorofila *a*: β -caroteno y β -caroteno: zeaxantina de *Synechococcus* sp. a diferentes concentraciones de nitrato de sodio.

| | 4 mM | 8 mM | 12 mM |
|-----------------------------|--------------|--------------|--------------|
| Clorofila <i>a</i> | 14,07 ± 2,09 | 18,45 ± 3,08 | 22,73 ± 2,99 |
| β -caroteno | 1,11 ± 0,05 | 1,29 ± 0,05 | 1,93 ± 0,06 |
| Zeaxantina | 0,91 ± 0,05 | 1,36 ± 0,06 | 2,08 ± 0,06 |
| Clo <i>a</i> / β -car | 12,67 | 14,30 | 11,77 |
| β -car/Zeaxan | 1,21 | 0,94 | 0,48 |

Todos los valores en fg cel⁻¹.

De igual forma, los contenidos máximos de proteínas y lípidos se obtuvieron a 12 mM NaNO₃, con $1,27 \pm 0,02$ pg cel⁻¹ y $172,72 \pm 3,09$ fg cel⁻¹, respectivamente y con diferencias significativas ($p < 0,05$) (Fig. 3).

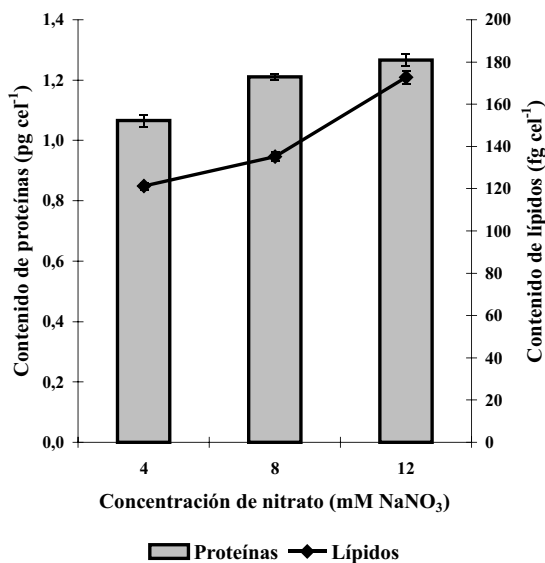


FIGURA 3. Contenido de proteínas y lípidos de *Synechococcus sp.* a diferentes concentraciones de nitrato de sodio.

Por otro lado, el contenido de carbohidratos y la producción de exopolisacáridos (EPS) fue mayor a la menor concentración de nutrientes de 4 mM NaNO₃, con valores de $1,80 \pm 0,02$ pg cel⁻¹ y $184,61 \pm 4,45$ µg mL⁻¹, respectivamente y con diferencias significativas ($p < 0,05$) (Fig. 4).

DISCUSIÓN

El incremento de la densidad celular de *Synechococcus sp.* con la concentración de nitrato (Fig. 1) se ha descrito para otras cepas de esta cianobacteria, en las cuales se demostró una correlación positiva entre el crecimiento y el aumento de nutrientes en el medio de cultivo, además del efecto positivo sobre la velocidad de crecimiento (Hu *et al.* 2000). De igual manera, en cultivos de *Oscillatoria agardhii* y de *O. redekei* se ha reportado un incremento del crecimiento hasta 10 mM NaNO₃ (Foy 1993).

Por otra parte, la pérdida de la coloración de los cultivos a 0 mM NaNO₃, podría relacionarse con la degradación de las ficobili-

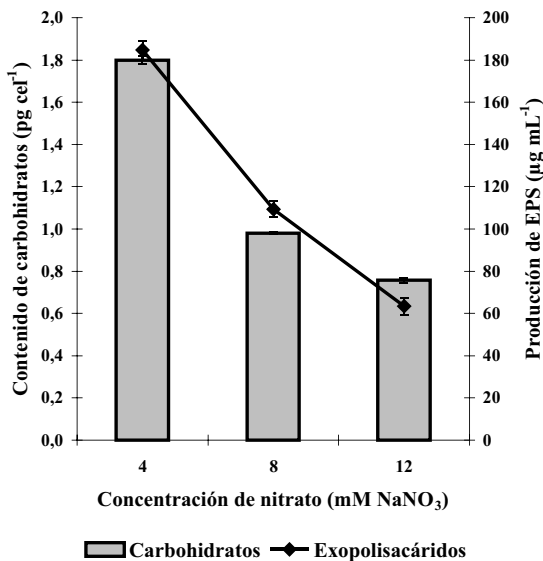


FIGURA 4. Contenido de carbohidratos y producción de exopolisacáridos de *Synechococcus* sp. a diferentes concentraciones de nitrato.

proteínas utilizadas como fuente de reserva de nitrógeno, y a la disminución de la síntesis de clorofila *a* en respuesta a la deficiencia de nutrientes, especialmente nitrógeno (Görl *et al.* 1998).

En cepas de *Synechococcus* se ha verificado que el último paso del proceso de clorosis, consiste en la diferenciación en células no pigmentadas capaces de sobrevivir prolongados periodos de limitación de nutrientes, y que pueden volver a su estado normal al mejorar las condiciones nutricionales (Görl *et al.* 1998). Este efecto se observó cuando dichas células de *Synechococcus* se resuspendieron en medio fresco con nutrientes equivalente a 4 mM NaNO₃.

Este efecto fisiológico demuestra la incapacidad de *Synechococcus* sp. de exhibir crecimiento diazotrófico y por lo tanto de fijar nitrógeno en un medio carente de este nutriente. En general, la limitación de nitrógeno produce una disminución marcada del crecimiento, como lo demuestran trabajos realizados con *Oscillatoria agardhii* (Sivonen 1990).

Los valores de masa seca, al contrario que los correspondientes a la densidad celular, disminuyen al incrementarse la concentración de nitrato de sodio (Fig. 2). Este comportamiento es debido principalmente a la menor velocidad de crecimiento y al mayor tiempo de duplicación que presentaron los cultivos a las menores concentraciones de nutrientes. En estas condiciones, las células mantienen unas dimensiones superiores que las correspondientes a una elevada tasa de crecimiento y también tienden a acumular mayor cantidad de metabolitos (Bermúdez *et al.* 2004).

El incremento en la producción de pigmentos y proteínas, proporcional al incremento de la concentración de nitrato, observado para *Synechococcus* (Tabla 1, Fig. 3), también se ha descrito en *Chroococciopsis* sp. (Billi y Grilli 1996) y *Anabaena* sp. PCC 7120 (Loreto *et al.* 2003).

La disminución del contenido de carotenoides en *Synechococcus* sp. con la limitación de nitrógeno (Tabla 1) sugiere también reducción de su actividad fotosintética (Rücker *et al.* 1995). Se ha reportado una disminución del contenido relativo de carotenoides hasta un 5% en condiciones de limitación de nutrientes (Miller *et al.* 2002).

Las elevadas densidades celulares obtenidas a altas concentraciones de nutrientes (Fig. 1) producen un efecto de sombra en el cultivo, y en consecuencia un aumento de los pigmentos liposolubles y de la cantidad de membranas tilacoides con la finalidad de mejorar la eficiencia fotosintética a bajas intensidades luminosas, lo que se traduce en un aumento no sólo de los pigmentos *per se*, sino también de los lípidos con la concentración de nutrientes (Fig. 3) (Osborne y Raven 1986).

Las condiciones óptimas para la producción de exopolisacáridos por *Synechococcus* sp. (Fig. 4), obtenidas en esta investigación, no coinciden con los altos valores de crecimiento (Fig. 1). De hecho, la liberación de EPS tiene lugar principalmente en condiciones de limitación de nutrientes (Moreno *et al.* 1998). Se han reportado resultados similares para otras microalgas y cianobacterias no fijadoras de nitrógeno, en las cuales la producción de EPS se correlaciona de

forma inversa con la cantidad de nitrógeno combinado presente en el medio (De Philippis y Vicenzini 1998).

Se ha sugerido que la síntesis de EPS en microorganismos, incluyendo a las cianobacterias, juega un importante papel en la protección celular en hábitats extremos y de otras condiciones de estrés (Moreno *et al.* 1998). Muchos estudios se han enfocado en la capacidad de algunas cianobacterias, productoras de EPS, de superar el estrés producido por desecación, baja actividad de agua y limitación de nutrientes en desiertos o ambientes salinos (Moreno *et al.* 1998).

CONCLUSIONES

El crecimiento de *Synechococcus* sp. se estimuló en condiciones de saturación de nutrientes, alcanzando los máximos de pigmentos, proteínas y lípidos a 12 mM NaNO₃. Además, cultivos discontinuos de *Synechococcus* a bajas concentraciones de nitrógeno, se pueden utilizar para la producción de EPS.

AGRADECIMIENTOS

Al FONACIT, a través del proyecto # S1-2000000786, por el financiamiento otorgado para la realización de esta investigación.

LITERATURA CITADA

- BERMUDEZ J., N. ROSALES, C. LORETO, B. BRICEÑO y E. MORALES. 2004. Exopolysaccharide, pigment and protein production by the marine microalga *Chroomonas* sp. in semicontinuous cultures. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 20: 179-183.
- BILLI D. y M. GRILLI M. 1996. Effects of nitrogen limitation and starvation on *Chroococcidiopsis* sp. (Chroococcales). *New Phytol.* 133: 563-571.
- DE PHILIPPIS R. y M. VINCENZINI. 1998. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. *FEMS Microbiol. Rev.* 22: 151-175.

- FÁBREGAS J., J. ABALDE, C. HERRERO, B. CABEZAS y M. VEIGA. 1984. Growth of marine microalgae *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentration. *Aquaculture* 42: 207-215.
- FOY R. 1993. The phycocyanin to chlorophyll *a* ratio and cell components as indicators of nutrient limitation in two planktonic cyanobacteria subjected to low-light exposure. *J. Plank. Res.* 15: 1263-1276.
- GÖRL M., J. SAUER, T. BAIER y K. FORCHHAMMER. 1998. Nitrogen starvation-induced chlorosis in *Synechococcus* PCC 7942: Adaptation to long-term survival. *Microbiology* 144: 2449-2458.
- HU Q., P. WESTERHOFF y W. VERMAAS. 2000. Removal of nitrate from groundwater by cyanobacteria: Quantitative assessment of factors influencing nitrate uptake. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(1): 133-139.
- JONTE L., N. ROSALES, B. BRICEÑO y E. MORALES. 2003. La irradiancia y la salinidad modulan el crecimiento de la cianobacteria *Synechocystis minuscula* en cultivos discontinuos. *Multiciencias* 3(1): 7-14.
- KOCHERT G. 1978. Carbohydrate determination by the phenol-sulfuric acid method. *En: Handbook of Phycological Methods. Physiological and Biochemical Methods.* J. Hellebust y J. Craigie (eds.), Cambridge University Press, Cambridge, R.U. pp. 95-97.
- LOBBAN C., D. CHAPMAN y B. KREMER. 1988. *Experimental Phycology: A laboratory manual.* Cambridge University Press, New York. 295 pp.
- LORETO C., N. ROSALES, J. BERMÚDEZ y E. MORALES. 2003. Producción de pigmentos y proteínas de la cianobacteria *Anabaena* PCC 7120 en relación a la concentración de nitrógeno e irradiancia. *Gayana Bot.* 60(2): 83-90.
- LOWRY O., H. ROSENBOUGH, A. FARR y R. RANDALL. 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Biochem.* 193: 265-275.
- MARSH J. y D. WEINSTEIN. 1966. Simple charring method for determination of lipids. *J. Lipid Res.* 7: 574-576.
- MILLER S., M. MARTIN, J. TOUCHTON y R. CASTENHOLZ. 2002. Effects of nitrogen availability on pigmentation and carbon assimilation in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain SH-94-5. *Arch. Microbiol.* 177: 392-400.

- MORA R., N. ORTÍZ, Y. CLEMENTE, J. BERMÚDEZ, D. AVENDAÑO y E. MORALES. 2002. Efecto del nitrato, irradiancia y salinidad sobre la producción de clorofila *a* de microalgas cultivadas y aisladas de la región noroccidental de Venezuela. *Oceánides* 17(2): 73-83.
- MORENO J., M. VARGAS, H. OLIVARES, J. RIVAS y M. GUERRERO. 1998. Exopolysaccharide production by the cyanobacterium *Anabaena* sp. ATCC 33047 in batch and continuous culture. *J. Biotechnol.* 60: 175-182.
- OSBORNE B. y J. RAVEN. 1986. Growth level light and photon absorption by cells of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae, Volvocales), *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae, Chlorococcales) and *Euglena viridis* (Euglenophyceae, Euglenales). *Briol. Phycol. J.* 21(3): 303-313.
- ROSALES N., J. ORTEGA, R. MORA y E. MORALES. 2005. La salinidad como factor modulador del crecimiento y composición bioquímica de la cianobacteria *Synechococcus* sp. *Ciencias Marinas* 31(2): 349-355.
- RÜCKER J., J. KOHL y K. KAISER. 1995. Response of carotenoids to variations of growth-limiting factors in three filamentous blue-green algae. *Algol. Studies* 77: 51-65.
- SIVONEN K. 1990. Effects of light, temperature, nitrate, orthophosphate, and bacteria on growth of and hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2658-2666.
- TANDEAU DE MARSAC N. y J. HOUMARD. 1993. Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps towards molecular mechanisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 104: 119-190.
- UTTING S. 1985. Influence of nitrogen availability on the biochemical composition of three unicellular marine algae of commercial importance. *Aquacul. Engin.* 4: 175-190.
- VIDUSSI F., H. CLAUSTRÉ, J. BUSTILLOS, C. CAILLIAU y J. MARTY. 1996. Determination of chlorophylls and carotenoids of marine phytoplankton: separation of chlorophyll *a* from divinyl-chlorophyll *a* and zeaxanthin from lutein. *J. Plankton Res.* 18: 237-282.
- WHITTON B. y M. POTTS. 2000. Introduction to cyanobacteria. *En: The ecology of cyanobacteria.* B. Whitton y M. Potts (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Países Bajos. pp. 1-11.