

Artículo original

Crecimiento de la cianobacteria marina *Oscillatoria* sp. MOF-06 en relación al pH en cultivos discontinuos

Gisela Fuenmayor, Lorena Jonte, Néstor Rosales-Loaiza, Ever Morales*

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

Recibido 30 de abril de 2008; aceptado 20 de abril de 2009

Resumen: Se evaluó el crecimiento, contenido de pigmentos, carbohidratos, exopolisacáridos y proteínas en la cianobacteria marina *Oscillatoria* sp. a pH 6,7,8 y 9 en cultivos discontinuos. Todos los cultivos se realizaron por triplicado en medio de cultivo ALGAL, a 3,5% de salinidad, aireación constante, a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, iluminación a $156 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y fotoperiodo 12:12h. Los cultivos a pH 9 y controles (pH 9-11), alcanzaron los valores más elevados de turbidez y masa seca. El contenido de clorofila *a* fue superior en fase exponencial, a pH 9 y control, con los valores más bajos a pH 6. La concentración de ficocianina también fue superior a pH 9 y en el control; mientras que a pH 6 y 7 se detectaron los valores más bajos. La concentración de proteínas y de carbohidratos también aumentó con el pH, en el siguiente orden control>9>8>7>6. En cambio, *Oscillatoria* produjo más exopolisacáridos a pH entre 6 y 8. Estos resultados demuestran que la cianobacteria marina *Oscillatoria* sp. MOF-06 incrementa la producción de biomasa, contenido de clorofila, proteínas y carbohidratos en condiciones alcalinas; mientras que, se induce una disminución en la producción de exopolisacáridos; pero sin afectar el contenido de carotenoides.

Palabras claves: *Oscillatoria* sp., crecimiento, pH, pigmentos, exopolisacáridos

Growth of the marine cyanobacteria *Oscillatoria* sp MOF-06 in relation to pH in discontinuous cultures

Abstrac: Growth, pigment content, carbohydrates, exopolysaccharides and proteins were evaluated in the marine cyanobacteria *Oscillatoria* sp. in discontinuous cultures at pH 6, 7, 8 and 9. All cultures were done in triplicate in ALGAL culture medium, at 3.5% salinity, constant airing, $28 \pm 2^\circ\text{C}$, $156 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ illumination, and 12:12h photoperiod. Cultures at pH 9 and controls (pH 9-11), reached the highest turbidity and dry mass values. The *a* chlorophyll content was higher in the exponential phase, at pH 9 and control, while the lowest values were detected at pH 6 and 7. Protein and carbohydrate content also increased with pH in the following order: control>9>8>7>6. On the other hand, *Oscillatoria* produced more exopolysaccharides at pHs between 6 and 8. These results show that the marine cyanobacteria *Oscillatoria* sp. MOF-06 increases its biomass production, and chlorophyll, protein and carbohydrate content under alkaline conditions, while this pH induces a decrease of exopolysaccharide production, but without affecting the carotenoid content.

Keywords: *Oscillatoria* sp., growth, pH, pigments, exopolysaccharides

* Correspondencia:
E-mail: evermster@gmail.com

Introducción

Las cianobacterias son organismos procariotas fotosintéticos, con una gran variabilidad morfológica y fisiológica, pudiendo adaptarse a diferentes tipos de ambientes, a cambios de temperatura, humedad, salinidad, irradiación solar y pH [1,2].

Las cianobacterias presentan una alta tasa de crecimiento y un metabolismo variable que responde rápida-

mente a los cambios de las condiciones ambientales, lo cual es de gran valor ya que continuamente se amplía la búsqueda de nuevas fuentes naturales para la obtención de compuestos para múltiples aplicaciones [3].

Existe gran interés en el desarrollo de técnicas de cultivo de cianobacterias, ya que es conocido que estos microorganismos tienen gran valor en la industria alimenticia, ambiental y farmacológica por ser fuente de sustancias de interés biotecnológico [4]. Sin embargo, cada

cepa y tipo de producto requiere procesos diseñados para el incremento de la producción de biomasa enriquecida [5].

El efecto de ciertos factores ambientales en cianobacterias puede mejorar el crecimiento y por tanto, su eficiencia para la producción de pigmentos, proteínas y otros metabolitos, lo cual puede ser ensayado en condiciones de laboratorio en función de los diversos parámetros ambientales [6].

Las cianobacterias son únicas, dentro del gran grupo de procariotas, debido a su incapacidad de crecer a bajos valores de pH. Su crecimiento parece ser completamente inhibido en hábitats con valores de pH por debajo de 5, con óptimos entre 7,5 y cerca de 10, por lo cual pueden ser considerados como alcalófilos [7].

Esto puede estar relacionado con el hecho de que el pH determina la solubilidad del dióxido de carbono y de los minerales en los cultivos, influyendo directa o indirectamente en su metabolismo [8]. En estudios más recientes, se ha establecido la deficiencia de los sistemas de transporte de membrana Na^+/H^+ y K^+/H^+ cianobacterianos y la importancia del ion Ca^{2+} en los procesos homeostáticos a pH reducidos [7,9].

El género *Oscillatoria*; perteneciente a la clase Oscillatoriales de la división Cyanobacteria; se caracteriza por estar formada por largos filamentos de células aplanadas y sin vaina mucilaginosas de color verde oscuro, muy comunes en los tapetes microbianos en ambientes tanto marinos como dulceacuicolas, y sobre todo en presencia de altas cargas orgánicas.

Muchos géneros de cianobacterias, entre ellas *Oscillatoria*, 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 [1].

Debido a todo esto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el crecimiento y producción de metabolitos de una cepa autóctona de *Oscillatoria* sp. MOF-06, en relación al pH del medio de cultivo en condiciones de laboratorio, con miras a su posible uso para la producción de metabolitos de interés biotecnológico.

Materiales y Métodos

Microorganismo en estudio: La cianobacteria marina *Oscillatoria* sp. MOF-06 [10], fue aislada en un sistema de cultivos de camarones situada en Tocópero, Estado Falcón-Venezuela (11° 29' 26" N, 69° 12' 06" O) y mantenida en la colección de microalgas y cianobacterias del Laboratorio de Microorganismos Fotosintéticos, Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias de la Universidad del Zulia en Maracaibo, Venezuela.

Condiciones de cultivo: Los cultivos por triplicado fueron iniciados con un inóculo equivalente a una absorbancia de 0,08 a 750 nm (DO_{750}) en frascos de 350 mL con

150 mL de agua de mar enriquecida con nutrientes a una relación N:P de 20:1 [11]. Todos los cultivos permanecieron a $27 \pm 2^\circ\text{C}$, con iluminación unilateral a una intensidad luminosa de $156 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperiodo luz-oscuridad de 12:12 h y aireación constante de 5 mL s^{-1} .

El efecto del pH fue monitoreado sin el uso de amortiguadores [12] y ajustado con NaOH y HCl 0,5 M a pH 6, 7, 8 y 9, antes de iniciar cada cultivo. A fin de mantener la estabilidad de cada pH se procedió a su ajuste dos veces al día. Por su parte, el pH del cultivo control no fue ajustado durante el experimento.

Análisis de biomasa: El crecimiento fue seguido cada tres días hasta fase estacionaria y determinado mediante turbidez a una densidad óptica de 750 nm. La biomasa fue cosechada por centrifugación a $8 \times 10^3 \text{ g}$ por 15 min. Para los análisis bioquímicos se utilizó biomasa congelada a -20°C , excepto para el contenido de pigmentos y masa seca, para los cuales se usó biomasa fresca.

Los pigmentos liposolubles, clorofila *a* y carotenoides, fueron medidos por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) utilizando el método descrito por Vidussi *et al.* [13]. El cromatógrafo estaba equipado con una columna Agilent Hypersil MOS (4.6 x 100 mm, 5 μm de tamaño de partícula), y utilizando estándares para la identificación y cuantificación de clorofila *a*, β -caroteno y zeaxantina. El pigmento hidrosoluble, ficocianina, fue extraído por el método de choque osmótico [14] y determinado según la fórmula de Bennet y Bogorad [15].

Los carbohidratos fueron medidos por el método de fenol-ácido sulfúrico [16] y los exopolisacáridos (EPS) cuantificados por precipitación del sobrenadante con metanol (1:1) [17]. El contenido de proteínas determinado por el método de Lowry *et al.* [18] modificado por Herbert *et al.* [19]. La masa seca fue determinada mediante el método descrito por Utting [20] usando un sistema de filtración Millipore® con filtros de fibra de vidrio de 0,45 μm de tamaño de poro.

Análisis estadístico: Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa SPSS 10.0 para Windows, utilizando un análisis de varianza de una vía (ANOVA). Cuando se determinaron diferencias significativas entre los tratamientos, se aplicó la prueba Scheffé de comparaciones múltiples entre medias [21].

Resultados

La figura 1 muestra el crecimiento de *Oscillatoria* sp. a los diferentes tratamientos de pH. Los máximos valores de absorbancia se observaron a pH 9 y en el control con $0,94 \pm 0,07$ y $0,93 \pm 0,04$; respectivamente, sin diferencias significativas entre ellos ($p > 0,05$), pero con diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto a pH 6, 7 y 8 (Tabla 1).

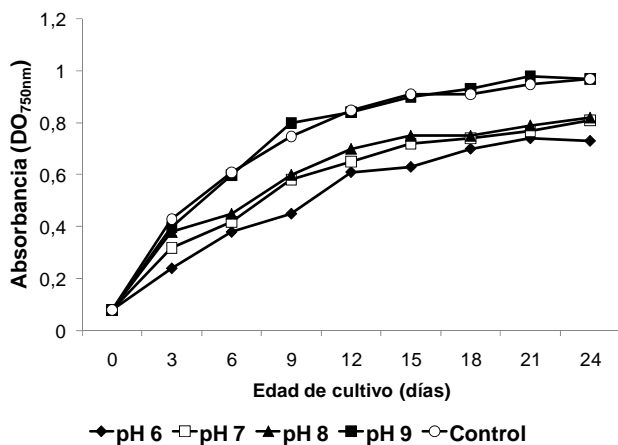


Figura 1: Curva de crecimiento de la cianobacteria *Oscillatoria* sp. a diferentes pH del medio de cultivo.

La masa seca mostró una relación proporcional con el pH, y con máximos en el cultivo control de $9,98 \pm 0,18$ mg mL⁻¹, con diferencias significativas ($p < 0,05$), seguido por el tratamiento pH 9 con $9,28 \pm 0,04$ mg mL⁻¹ (Tabla 1).

El contenido de pigmentos liposolubles; clorofila *a* y carotenoides, no fue afectado por los diferentes pH probados. El máximo valor de clorofila *a*, de $21,32 \pm 0,56$ µg mL⁻¹, fue obtenido a pH 9; mientras que el máximo de

carotenoides, de $6,04 \pm 0,44$ µg mL⁻¹ fue obtenido en el cultivo control, sin diferencias significativas en cuanto a los valores hallados en el resto de los tratamientos ($p > 0,05$) (Tabla 2).

Los máximos valores de ficocianina se hallaron entre los tratamientos de pH 7, 8 y 9, con $125,71 \pm 4,11$; $126,36 \pm 4,46$ y $125,82 \pm 3,88$ µg mL⁻¹, respectivamente y sin diferencias significativas entre ellos ($p > 0,05$), mientras que el valor más bajo se halló a pH 6 con $61,80 \pm 7,51$ µg mL⁻¹ (Tabla 2).

El contenido de proteínas fue mayor a los tratamientos de pH más altos y sin ajuste de pH con valores de $486,07 \pm 26,78$; $455,07 \pm 29,34$ y $473,48 \pm 24,75$ µg mL⁻¹ para control, pH 8 y pH 9, respectivamente y sin diferencia significativa ($p > 0,05$).

Por otra parte, el contenido de carbohidratos mostró valores estables entre todos los tratamientos, con alrededor de 6 µg mL⁻¹, exceptuando el tratamiento pH 6, donde se observó una clara disminución con un valor de $3,25 \pm 0,23$ µg mL⁻¹. El máximo se halló a pH 7 con $6,91 \pm 0,11$ µg mL⁻¹ y con diferencias significativas ($p < 0,05$, tabla 2).

Los exopolisacáridos se mantuvieron estables entre los tratamientos de pH 6 y 7 con entre $3,26$ y $3,54$ mg mL⁻¹, mientras que se obtuvo la mayor producción a pH 8 con $4,05 \pm 0,28$ mg mL⁻¹ ($p < 0,05$) y una notable disminución a pH 9 y en el cultivo control no ajustado.

Tabla 1: Crecimiento medido por turbidez (DO₇₅₀) y masa seca (mg mL⁻¹) de la cianobacteria *Oscillatoria* sp. a diferentes pH del medio de cultivo.

	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9	Control
Turbidez (750 nm)	$0,64 \pm 0,11^b$	$0,71 \pm 0,08^b$	$0,74 \pm 0,08^b$	$0,90 \pm 0,09^a$	$0,89 \pm 0,08^a$
Masa seca (mg mL ⁻¹)	$7,05 \pm 0,07^b$	$7,98 \pm 0,17^b$	$8,57 \pm 0,04^b$	$9,28 \pm 0,04^b$	$9,98 \pm 0,18^a$

^a, ^b, grupos similares estadísticamente

Tabla 2: Contenido de pigmentos liposolubles, ficocianina, proteínas, carbohidratos totales y producción de exopolisacáridos de la cianobacteria *Oscillatoria* sp. a diferentes pH del medio de cultivo.

	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9	Control
Clorofila <i>α</i> (µg/mL)	$20,70 \pm 1,90^a$	$20,08 \pm 1,07^a$	$20,44 \pm 1,10^a$	$21,32 \pm 0,56^a$	$20,94 \pm 0,54^a$
Carotenoides (µg/mL)	$5,57 \pm 0,45^a$	$5,72 \pm 0,52^a$	$5,66 \pm 0,63^a$	$5,92 \pm 0,18^a$	$6,04 \pm 0,44^a$
Ficocianina (µg/mL)	$61,80 \pm 7,51^b$	$125,71 \pm 4,11^a$	$126,36 \pm 4,46^a$	$125,82 \pm 3,88^a$	$115,36 \pm 4,82^b$
Proteínas (µg/mL)	$405,33 \pm 36,94^b$	$447,06 \pm 27,93^b$	$455,07 \pm 29,34^a$	$473,48 \pm 24,75^a$	$486,07 \pm 26,78^a$
Carbohidratos (µg/mL)	$3,25 \pm 0,23^c$	$6,91 \pm 0,11^a$	$6,05 \pm 0,10^b$	$6,35 \pm 0,05^b$	$6,59 \pm 0,39^b$
Exopolisacáridos (mg/mL)	$3,54 \pm 0,08^b$	$3,26 \pm 0,18^b$	$4,05 \pm 0,28^a$	$2,47 \pm 0,05^c$	$2,39 \pm 0,21^c$

^a, ^b, grupos similares estadísticamente

Discusión

La cianobacteria *Oscillatoria* sp. creció en un rango de amplio de pH. Sin embargo, el mayor crecimiento, seguido tanto por turbidez como por masa seca, fue a pH 9 y en los cultivos control, donde a pesar de que no hubo

ajuste de pH, éstos alcanzaron una estabilización del pH entre 9 y 11. Estos resultados demuestran la preferencia de las cianobacterias de crecer en ambientes alcalinos [22].

Resultados similares han sido reportados en estudios realizados con *Synechocystis minuscula* [23] donde el

mayor crecimiento se obtuvo en los cultivos a pH 9 y en los controles sin ajuste de pH. En estudios realizados con *Anabaena* sp. PCC 7120 se observó que la cianobacteria incrementó el crecimiento, en función de la turbidez, con el aumento de pH, con un óptimo a pH 8 (8), y aumento de la masa seca en un rango de pH de 5,4 a 7,5 [7].

En aislados de diversas cianobacterias se ha observado la inhibición de la fotosíntesis de hasta 60% a pH por debajo de 6, debido posiblemente a su incapacidad de mantener un pH intracelular constante en relación al pH externo, con lo cual se induce un desequilibrio de las actividades metabólicas relacionado con la división celular [24].

El contenido de clorofila *a* y carotenoides por parte de esta cepa de *Oscillatoria*, parece no estar relacionado con los cambios en el pH. Trabajos previos con *Anabaena* PCC 7120 y *Synechocytis minúscula* han mostrado la estabilización del contenido de clorofila *a* y carotenoides en un rango de pH desde 6 a 9 [12,23].

En otros microorganismos fotosintéticos se ha observado que no sólo la variación del pH no ejerce influencia sobre el contenido de pigmentos liposolubles, sino que tampoco influencia la eficiencia fotosintética, la tasa máxima de fotosíntesis y la tasa de respiración [25].

La síntesis de ficocianina parece estar más regulada por el pH en mayor medida que la síntesis de clorofila *a* y carotenoides bajo nuestras condiciones de estudio, siendo el contenido de dicho pigmentos de naturaleza proteica estable entre pH 7 y 9, disminuyendo a pH 6 y en el control. En otras cianobacterias ha sido descrito que la síntesis de ficocianina es estimulada a elevados pH, como en *Gloeotrichia natans* [26] y *Anabaena* sp. PCC 7120 [12].

El contenido de proteínas también pareció estar influenciado por el pH, con las máximas a pH alcalinos. El pH parece no sólo afectar el contenido proteico, sino también su composición; como se ha observado en *Anabaena* sp. PCC 7120 donde se hallaron amplias variaciones del perfil de bandas en SDS-PAGE [7].

La mayoría de los trabajos publicados sobre el efecto de diferentes factores de estrés ambiental en el contenido y composición de proteínas se han enfocado principalmente en choques térmicos y osmóticos [27]. La respuesta cianobacteriana al estrés de pH parece tener algunas características en común con estos otros tipos de estrés, sobre todo en el cambio de tipo de proteínas producidas, dependiendo del pH en el cual crezca el microorganismo [7,23].

Los mayores valores de producción de exopolisacáridos se observaron a pH de ácidos a alcalinos, entre 6 y 8, disminuyendo a pH 9 y en el control (condiciones alcalinas entre 9 y 11). En cultivos de *Cyanothece* sp. se obtuvo una alta producción de EPS entre 7,5-7,8 [28], mientras que con *Anabaena*, se han obtenido mejores resultados a pH 9 y 10 [12,22]. Sin embargo, hasta el presente la información sobre la influencia del pH sobre la producción de EPS es limitada. Para cultivos de bacterias productoras de EPS se conoce que la producción mejora a pH neutros y ligeramente alcalinos, mientras que se observa una disminución por debajo de pH 6 [29].

Conclusiones

Los resultados obtenidos demuestran que la cianobacteria *Oscillatoria* sp. MOF-06, es capaz de mantener su crecimiento a un pH controlado entre 6 y 9. Sin embargo, en cultivos controles a pH no regulados, puede estabilizarse su crecimiento, incluso hasta pH 11; pero con un mayor incremento de la biomasa y de pigmentos a pH 9. La excepción a este comportamiento es la producción de EPS, que mejora a pH neutro y ligeramente ácido. En general el pH parecer no ser uno de los factores primordiales que estimulan la producción de metabolitos secundarios de interés biotecnológico en esta cepa autóctona de *Oscillatoria*.

Referencias

1. Tandeau De Marsac N, Houmard J. Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps towards molecular mechanisms. FEMS Microbiol Rev. 1993; 104: 119-90.
2. Whitton B, Potts M. Introduction to cyanobacteria. En: Whitton B, Potts M, editores. The ecology of cyanobacteria. Dordrecht, Países Bajos. Kluwer Academic Publishers; 2000. pp. 281-306.
3. Domínguez A. Obtención de pigmentos a partir de microalgas. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela, España. 1999.
4. Matsunaga T, Takeyama H, Miyashita H, Yokoushi H. Marine microalgae. Adv Biochem Engin/Biotechnol. 2005; 96: 165-88.
5. Fábregas J, Patiño M, Arredondo B, Tobar J, Otero A. Renewal rate and nutrient concentrations as tools to modify productivity and biochemical composition of cyclostat cultures of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta*. Appl Microbiol Biotechnol. 1995; 44: 287-92.
6. Hoffmann M, Travieso L, O'Farril N. Comportamiento de *Anabaena cilíndrica* en diferentes medios de cultivo. Revista CENIC Cien Biol. 1998; 29: 89-92.
7. Giráldez-Ruiz N, Mateo P, Bonilla I, Fernández-Piñas F. The relationship between intracellular pH, growth characteristics and calcium in the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120 exposed to low pH. New Phytol. 1997; 137: 599-605.
8. Moronta R., Mora R., Morales E. Respuesta de la microalga *Chlorella sorokiniana* al pH, salinidad y temperatura en condiciones axénicas y no axénicas. Revista de la Facultad de Agronomía LUZ 2006; 23(1): 28-43.
9. Pomati F., Burns B., Neilan B. Use of Ion-Channel Modulating Agents to Study Cyanobacterial Na⁺-K⁺ Fluxes. Biol. Proced. Online 2004; 6(1): 137-43.
10. Rippka R, Deruelles J, Waterbury J, Herdman M, Stanier R. Generic assignments, strain histories and properties of pure culture of cyanobacteria. J Gen Microbiol. 1979; 111: 1-61.
11. Fábregas J, Abalde J, Herrero C, Cabezas B, Veiga M. Growth of marine microalgae *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentration. Aquaculture. 1984; 42: 207-45.
12. Morales E, Rodríguez M, García D, Loreto C, Marco E. Crecimiento, producción de pigmentos y exopolisacáridos de la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120 en función del pH y CO₂. Interciencias. 2002; 27: 373-8.

13. Vidussi F, Claustré H, Bustillos J, Cailliau C, Marty J. Determination of chlorophylls and carotenoids of marine phytoplankton: separation of chlorophylls a from divinyl-chlorophyll a and zeaxanthin from lutein. *J Plankton Res.* 1996; 18: 237-82.
14. Wyman M, Fay P. Underwater light climate and the growth and pigmentation of planktonic blue-green algae (Cyanobacteria). Influence of light quantity. *Proc Royal Soc Lond.* 1986; 227: 367-80.
15. Bennet A, Bogorad L. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *J Cell Biol.* 1973; 58: 419-35.
16. Kochert G. Carbohydrate determination by the phenol-sulfuric acid method. En Hellebust J, Craigie J, editores. *Handbook of Phycological Methods. Physiological and Biochemical Methods.* Cambridge, Reino Unido. Cambridge University Press; 1978. pp. 95-7.
17. Shah V, Ray A, Garg N, Madamwar D. Characterization of the Extracellular Polysaccharide Produced by a marine Cyanobacterium, *Cyanothece* sp. ATCC 51142, and its Exploitation Toward Metal Removal from Solutions. *Current Microbiol.* 2000; 40: 274-8.
18. Lowry O, Rosenbrough H, Farr A, Ryall R. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193: 265-75.
19. Herbert D, Phipps P, Strange R. Chemical analysis of microbial cells. En Norris J, Ribbons D, editores. *Methods in Microbiology.* Londres, Reino Unido. Academic Press; 1971. pp 209-344.
20. Utting S. Influence of nitrogen availability on the biochemical composition of three unicellular marine algae of commercial importance. *Aquacul Engin.* 1985; 4: 175-90.
21. Sokal R, Rohlf F. *The principles and practice of statistics in biological research.* Nueva York, Estados Unidos. W. H. Freeman; 1985.
22. Moreno J, Rodríguez H, Vargas A, Rivas J, Guerrero G. Nitrogen-fixing cyanobacteria as source of phycobiliproteins pigments, composition and growth performance of ten filamentous heterocystous strains. *J Appl Phycol.* 1995; 7: 17-23.
23. Jonte L. Crecimiento de la cianobacteria *Synechocystis minuscula* en respuesta a diversos parámetros de cultivos. Trabajo Especial de Grado para optar el Título de Licenciada en Biología. Universidad del Zulia. 2003. 156 pp.
24. Reddy P. Influence of pH on sporulation, spore germination and germling survival in blue-green algae. *Acta Hydrochim Hydrobiol.* 1984; 12: 411-9.
25. Dorling M, McAuley P, Hodge H. Effect of pH on growth and carbon metabolism of maltose-releasing *Chlorella*. *Eur J Phycol.* 1997; 32: 19-24.
26. Querijero-Palacpac N, Martínez M, Boussiba S. Mass cultivation of nitrogen-fixing cyanobacterium *Gloetrichia natans*, indigenous to rice-fields *J Appl Phycol.* 1990; 2: 319-25.
27. Bhagwat A, Apte S. Comparative analysis of proteins induced by heat shock, salinity, and osmotic stress in the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain L-31. *J Bacteriol.* 1989; 171: 5187-9.
28. De Philippis R, Margheri M, Pelosi E, Ventura S. Exopolysaccharide production by a unicellular cyanobacterium isolated from a hypersaline habitat. *J Appl Phycol.* 1993; 5: 387-94.
29. Gamar L, Blondeau K, Simonet J. Influence of cultura conditions on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83. *J Appl Microbiol.* 1998; 85: 664-72.