



FACULTAD DE FARMACIA

Grado en Farmacia

CONTRIBUCIÓN DE FACTORES AMBIENTALES EN LA SÍNTESIS DE ESCITONEMINAS Y MICOSPORINAS, COMPUESTOS PROTECTORES DE LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA, EN LA CIANOBACTERIA *SCYTONEMA JAVANICUM* BORNET ET THURET EX BORNET ET FAHAULT.

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Área de Botánica

Departamento de Biología Aplicada

Curso académico 2014/2015

Autor: Diana Sánchez Torres

Modalidad: Experimental

Tutora: Antonia Dolores Asencio Martínez

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a varias personas la ayuda que me han prestado para la realización de este Trabajo de Fin de Grado.

En especial a mi profesora y tutora, Toñi, por su gran interés contagioso por las cianobacterias, inestimable ayuda y enseñanzas, sin las cuales este trabajo no habría salido a la luz.

A Rocío, técnico de laboratorio, por su predisposición a la hora de solucionar cualquier problema (que no fueron pocos), por su apoyo y atención.

A Natalia por haberme acompañado en todo el camino de la realización de este proyecto y habernos ayudado mutuamente.

Gracias a Álvaro, por ser mi gran apoyo y darme tanta fuerza. Por ser mi razón de querer crecer tanto profesional como personalmente. Y por hacerme tan feliz.

Agradecer a la gran familia que tengo, mis padres y mi hermano, por creer más en mí de lo que yo misma creo. Por ser mi enorme apoyo y empujarme a nunca rendirme para conseguir mis objetivos, por muy difícil que sea el camino, o por muy imposible que parezca. Sin ellos nunca hubiera llegado dónde estoy ni tendría las ganas que tengo de comerme el mundo. En especial a mi madre, la que me ayudó y pasó tantas horas en el laboratorio ayudándome. Gracias a Mimi por haber estado acompañándome y apoyándome durante las largas noches de estudios.

Gracias a mis amigas, que a pesar de la distancia y de recorrer caminos muy distintos, siempre hemos estado juntas en cualquier circunstancia. Y gracias a mis amigos y compañeros de carrera, con los que he compartido penas, alegrías y momentos inolvidables. El camino ha sido largo, y aunque parezca que llega a su fin, este es el principio de una nueva etapa.

Por último, dar gracias a la UMH, por darnos la oportunidad de crecer como profesionales, y realizar de cerca un trabajo, experimental en mi caso, para aprender cómo debemos proceder y cómo enfrentarnos a los problemas que van surgiendo.

ÍNDICE

RESUMEN Y PALABRAS CLAVE	4
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. Generalidades de las Cianobacterias	5
1.2. Cianobacterias y UV	7
1.3. Micosporinas- MAAs	8
1.4. Escitoneminas	9
2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1. Parámetros ambientales	13
3.2. Recolección, observación e identificación del material	14
3.3. Diseño experimental	15
3.4. Extracción y cálculo de Micosporinas (MAAs)	16
3.5. Extracción y cálculo de Escitoneminas	17
3.6. Análisis estadístico	19
4. RESULTADOS	20
4.1. Identificación taxonómica y registro de parámetros ambientales	20
4.2. Influencia de los factores ambientales en la síntesis de Micosporinas ...	21
4.2.1. Temperatura	21
4.2.1. Salinidad	21
4.2.2. Amonio	22
4.2.3. Radiación Ultravioleta	22
4.3. Influencia de los factores ambientales en la síntesis de Escitoneminas..	23
4.3.1. Temperatura	23
4.3.2. Salinidad	23
4.3.3. Amonio	24
4.3.4. Radiación Ultravioleta	24
5. DISCUSIÓN	27
6. CONCLUSIÓN Y PROYECCIÓN FUTURA	29
7. BIBLIOGRAFÍA	30

RESUMEN

Se ha determinado *Scytonema javanicum* Bornet et Thuret ex Bornet et Fahault y se han registrado los valores de los parámetros ambientales dónde se desarrolla en una zona del río Vinalopó a su paso por Elche. Se ha estudiado la capacidad de esta especie para sintetizar sustancias protectoras de la radiación ultravioleta denominadas micosporinas y escitoneminas y se ha investigado cuáles son los factores ambientales que influyen en su producción.

Los resultados indican que con la radiación aumenta significativamente la síntesis de micosporinas ($F = 16,187$; $p < 0,01$), y escitoneminas ($F = 6,465$; $p < 0,1$). De la misma forma, el aumento de salinidad favorece significativamente la producción tanto de micosporinas ($F = 13,390$; $p < 0,01$) como de escitoneminas ($F = 4,920$; $p < 0,05$). Otros parámetros que también se ha estudiado e influyen en la producción de micosporinas son la temperatura ($F = 4,231$; $p < 0,1$) y la cantidad de amonio ($F = 5,802$; $p < 0,05$) que afectan significativamente.

ABSTRACT

It has been determined *Scytonema javanicum* Bornet et Thuret ex Bornet et Fahault and recorded values of environmental parameters where it grows on Vinalopó River across Elche. We have studied the ability of this species for produce protective UV substances called mycosporin and scytonemin. It has been investigated what environmental factors influencing its synthesis.

The results indicate that with radiation significantly increases the synthesis of mycosporin ($F = 16,187$, $p < 0,01$), and scytonemin ($F = 6,465$; $p < 0,1$). Likewise, increased salinity significantly favors the production of both mycosporin ($F = 13,390$; $p < 0,01$) as scytonemin ($F = 4,920$; $p < 0,05$). Other parameters that have also studied and influence mycosporin are the temperature ($F = 4,231$; $p < 0,1$) and the amount of ammonium ($F = 5,802$; $p < 0,05$) significantly affected.

PALABRAS CLAVE/KEYWORDS: cianobacteria/cyanobacteria, micosporina/mycosporine, escitonemina/scytonemin, parámetros ambientales/environmental parameters, radiación ultravioleta/ultraviolet radiation, fotoprotección/ photoprotection.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Generalidades de las Cianobacterias.*

Las cianobacterias también llamadas cianofíceas o cianoprocariotas o algas verdeazuladas existen desde hace aproximadamente 3500 millones de años y figuran entre los organismos más importantes de la Tierra (García-Pichel et al., 2003). Son algas procariotas fotosintéticas Gram negativas (Richa et al., 2015) capaces de fijar nitrógeno a través de una estructura denominada heterocito.

La estructura celular de las cianoprocariotas presenta tanto caracteres de bacterias como de algas. Las propiedades bacterianas más importantes son la ausencia de orgánulos rodeados de membrana y la estructura de la pared celular. Comparte con las algas la presencia de clorofila *a*, la estructura de los tilacoides y la actuación como productores primarios en la naturaleza (Asencio, 1997).

Las cianofíceas (Figura 1) están constituidas por una capa externa mucilaginoso compuesta principalmente por mucopolisacáridos denominada vaina. Presenta un espesor variable ya que puede acumular agua en su interior evitando la desecación y manteniendo la actividad metabólica en condiciones de sequía. Esta capa puede aparecer coloreada debido a la presencia de pigmentos en su interior que actúan como filtros para disminuir la luz incidente. A continuación de la vaina aparece la pared celular Gram – constituida por mureina. Ya en el interior celular, en la periferia se sitúan los tilacoides que no están organizados en cloroplastos. Los pigmentos fotosintéticos están constituidos por clorofila *a*, carotenoides (carotenos y xantofilas) que se encuentran en el interior de los tilacoides y ficobilinas (ficocianina y ficoeritrina) adheridas a los tilacoides. En el interior celular aparecen los gránulos de cianoficina que acumulan sustancias nitrogenadas, los carboxisomas que contienen enzimas fotosintéticos, los gránulos de volutina que concentran gran cantidad de ATP, los gránulos de glucógeno que son los principales productos de la fotosíntesis y las vacuolas gasíferas que acumulan gas y les permite flotar. La mayoría de las algas verdeazuladas son inmóviles ya que carecen de flagelos pero existe un movimiento parecido a la reptación (Llimona et al., 1985).

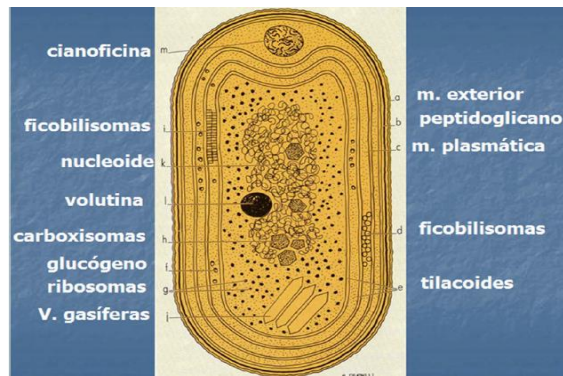


Figura 1.- Estructura general de una cianofíceas (Limona et al., 1985)

Estos organismos incluyen aproximadamente 150 géneros y 2000 especies entre las que se encuentran formas unicelulares, coloniales o filamentosas. Presentan una amplia distribución ecológica, desarrollándose en ambientes muy variados, tanto terrestres como acuáticos, e incluso en los más extremos debido a sus estrategias de supervivencia (Komárek & Anagnostidis 2005, Komárek 2013). Habitan generalmente en áreas dónde reciben radiación solar directa o indirecta y que a su vez quedan expuestas a niveles potencialmente dañinos de radiación ultravioleta (UVR). La temperatura óptima para el crecimiento de muchas cianobacterias es más alta que para las algas eucariotas (Castenholz & Waterbury 1989), fomentando así su éxito en climas más cálidos (Kosten et al. 2012). Las cianobacterias tienen una gran tolerancia a altos niveles de radiación UV así como a la desecación y un mayor éxito en entornos altamente salinos.

La capacidad de muchas especies a fijar nitrógeno atmosférico ofrece una ventaja cuando las concentraciones de nitrógeno en un ambiente son bajas (Asencio & Aboal 2011). En ambientes más oxigenados (condiciones de aerobiosis) y de agua dulce, las cianobacterias fijan el nitrógeno dentro del heterocito (Figura 2) (Wolk et al. 1994). El heterocito es una célula de pared gruesa que a menudo tiene un nódulo de cianoficina, (polímero de dos aminoácidos) en uno o ambos extremos de la célula. Sin embargo, las cianobacterias tienen estrategias fisiológicas que les permiten fijar nitrógeno atmosférico bajo condiciones bien oxigenadas incluso sin un heterocito, sobre todo en condiciones microóxicas, con menos del 5% de O_2 . En sitios como el Mar Báltico, dónde la salinidad es mucho menor que la de los océanos, la fijación de nitrógeno se produce sobre todo sin heterocitos.

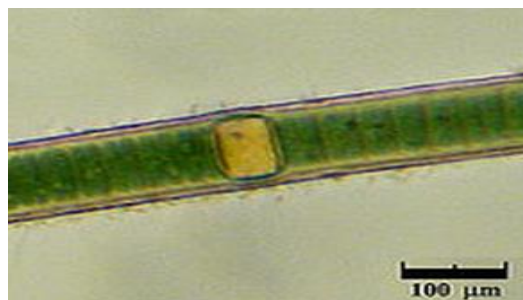


Figura 2.- Heterocito en *Scytonema* sp. (Ricardo Rico, 2009)

1.2. *Cianobacterias y UV.*

El continuo agotamiento de la capa de ozono de la estratosfera por contaminantes atmosféricos liberados como los clorofluorocarbonos (CFC), clorocarbonos (CC) y organobromuros (OB), se ha traducido en un aumento de la radiación ultravioleta (UVA, 315-400 nm; UVB, 280-315 nm; UVC, 100-280 nm) en la superficie de la Tierra (Crutzen, 1992). Esto ha generado una preocupación alarmante sobre el impacto negativo de la alta radiación UV-B sobre el mundo acuático y las formas de vida terrestres que van desde bacterias procariotas a eucariotas, plantas, animales, así como los seres humanos (Häder et al. 2011). Los altos flujos de radiación UVB producen un gran impacto en la fijación fotosintética de carbono por las plantas, la fijación de nitrógeno por los microorganismos y en consecuencia en el cambio climático mundial (Häder et al. 2011; Richa et al., 2015).

Las cianobacterias son conocidas por habitar en ambientes con intensa radiación solar. A menudo son los primeros colonizadores de las superficies rocosas y suelos. Bajo estas condiciones deben poseer mecanismos eficientes para prevenir o para contrarrestar los efectos nocivos de la fuerte radiación solar, incluidos los UV (García-Pichel et al., 1993).

Los rayos UV son altamente energéticos que alteran fácilmente el ADN, proteínas y otras moléculas biológicamente activas que tienen su máximo de absorción en el rango UV (Sinha et al. 1996). La radiación UV en las cianobacterias altera proteínas, ADN, las tasas de supervivencia, la pigmentación, la motilidad, el oxígeno, dióxido de carbono, la fijación de nitrógeno y contenido ficobiliproteína (Rahman et al., 2014).

Los mecanismos que contrarrestan los daños causados por UV han sido previamente demostrados por las cianobacterias incluyendo la reparación del ADN (Jagger, 1985), fotorreconstrucción, desintoxicación de enzimas, la muerte celular programada, la acción de los carotenoides como protectores (Fleming et al., 2007) y la producción de compuestos que absorben UVR (escitonemina y aminoácidos-micosporina) (García-Pichel et al., 1993). La capacidad de sintetizar ciertos compuestos de protección solar (García-Pichel et al., 1993) para prevenir el daño UV en cianobacterias, tales como aminoácidos tipo micosporina (MAA), que absorben principalmente en la región del espectro UVB y UVA, ayuda a que estos organismos crezcan y puedan sobrevivir en hábitats expuestos a la intensa radiación solar (Singh et al. 2010).

1.3. *Micosporinas* - MAAs.

MAAs son sustancias pequeñas (<400 Da), incoloras, solubles en agua compuestas de ciclohexenona o cromóforos de cyclohexenimina que conjugan con el sustituyente de nitrógeno de un aminoácido o su alcohol imino. Presentan una banda de absorción característica, única en el espectro UV entre 230 y 400 nm, con máximos que van de 310 a 360 nm. MAAs son sintetizadas por la vía Shikimato (procariotas) o por la vía fosfato-pentosa (eucariotas) (Rahman et al., 2014).

Más de 22 MAAs se han reportado taxonómicamente en diversos organismos que van desde bacterias heterótrofas, líquenes, cianobacterias, hongos, microalgas y macroalgas, así como varios animales (Sinha et al., 2007). Estos organismos han desarrollado la capacidad de sintetizar y acumular MAAs para la adaptación a un efecto perjudicial de la radiación UV solar (Shick et al., 2002; Gao et al., 2011). MAAs son conocidas por ser sintetizadas bajo estrés osmótico o estar presentes directamente (Oren et al., 2007; Singh et al., 2008).

El papel de los compuestos solubles en agua como filtros solares todavía no se ha determinado del todo pero la resistencia a varios factores de estrés abiótico apoya su papel fotoprotector. Las MAAs protegen a la célula mediante la absorción de la radiación UV y disipando la energía de la radiación absorbida en forma de calor sin generar especies reactivas de oxígeno (ROS) (Conde et al., 2007).

Debido a sus coeficientes altos de absorción UV y su capacidad para proteger la piel de los rayos UV, las MAAs son candidatas prometedores para su uso en aplicaciones farmacéuticas y cosmética (Waditee-Sirisattha et al., 2014).

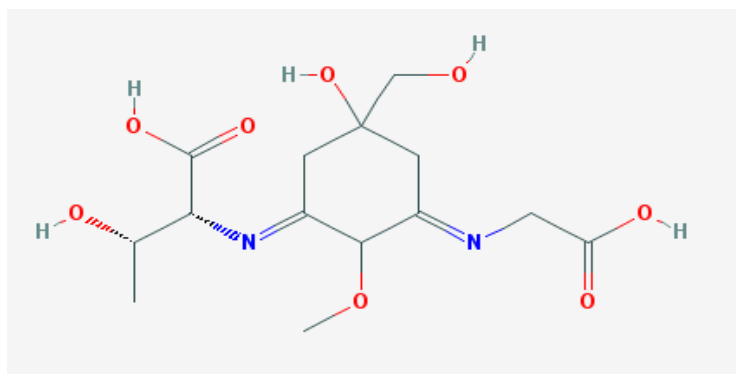


Figura 3.- Estructura química de MAAs: Porphyrin-334 (Scoglio, et al., 2010)

1.4. Escitoneminas.

Contrariamente a las MAAs, las escitoneminas se sintetizan exclusivamente por las cianobacterias (Garcia-Pichel y Castenholz, 1991). Es un compuesto dimérico pardo amarillento, soluble en lípidos, situado en la vaina como polisacárido extracelular de algunas cianobacterias y actúa como un protector solar pasivo contra la radiación UV (Proteau et al., 1993). Escitonemina existe en su forma oxidada (Mw 544 Da) o reducida (Mw 546 Da) que se forma dependiendo de las condiciones redox y ácido-base durante el proceso de extracción (Garcia-Pichel & Castenholz, 1991).

Se cree que la producción de escitoneminas en algunas cianobacterias es el primer mecanismo desarrollado de protección UV, más antiguo incluso que los flavonoides o melaninas (Singh et al., 2010) con amplia absorción en las longitudes de onda UV y visible (280 a 450 nm).

Existen tres nuevos derivados de pigmentos de escitoneminas tales como dimethoxyscytonemin, tetramethoxyscytonemin, y scytonin se han registrado en *Scytonema* sp. (Bultel-Ponc et al., 2004).



Figura 4.- Escitonemina en la vaina de *Scytonema* sp. (Proteau, 1993)

La escitonemina purificada tiene una máxima de absorción UV a 384 nm (Rajesh et al., 2014). Es un nuevo pigmento indólico-fenólico dimérico, que absorbe más o menos de manera significativa en 252, 278, 300 y 386 nm en las regiones UV-A, UV-B y UV-C del espectro de energía solar (Rajesh et al., 2014). Se ha estudiado que escitonemina puede prevenir hasta el 90% de la radiación UV incidente que entra en la célula, y puede mantener la eficiencia fotosintética por la reducción del fotoblanqueo de un pigmento fotosintético como es la clorofila (García-Pichel & Castenholz, 1991).

Es un pigmento altamente estable frente diferentes factores de estrés abióticos (Rastogi & Incharoensakdi, 2014). Debido a su compleja estructura (Figura 5) en anillo y sus dobles enlaces conjugados (Fleming & Castenholz, 2008) hacen de la escitonemina un compuesto particularmente estable frente a factores estresantes como las altas temperaturas y la fuerte radiación (Brenowitz & Castenholz, 1997). Se cree que la escitonemina se sintetiza a partir del metabolismo de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos y puede ser inducida por la alta tasa de fluencia de fotones (García-Pichel & Castenholz, 1991). Además, debido a su potencial/función de detección, la actividad antioxidante absorbente de UV (Matsui et al, 2012; Takamatsu et al, 2003), así como no tóxico y propiedades antiproliferativas (Stevenson et al., 2002), escitonemina puede ser explotada por biotecnología farmacéutica y cosmética (Rastogi & Sinha, 2009). Este pigmento se excreta y deposita en las vainas extracelulares de algunas cianobacterias.

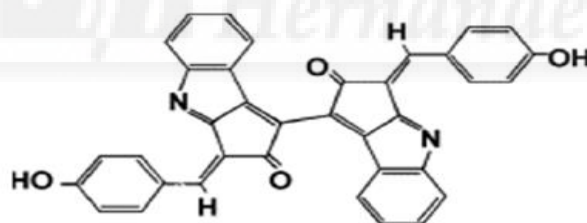


Figura 5. - Estructura química de la escitonemina (Sinha & Häder, 2008).

Además del papel protector frente a la radiación ultravioleta, la escitonemina puede tener funciones adicionales como la de proteger a la cianobacteria del ataque de patógenos, de la descomposición bacteriana o de ser ingerida por herbívoros.

Se ha demostrado que la escitonemina es un agonista de calcio (Helms et al., 1988) y un inhibidor de la proteína quinasa, lo que le confiere fuertes propiedades antiinflamatorias y antiproliferativas que pueden ser muy valiosas terapéuticamente en trastornos como la leucemia. Asimismo, las propiedades antiinflamatorias y antiproliferativas combinadas con su propiedad fotoprotectora hace de la escitonemina un excelente candidato para ser usado como cosmético natural frente a las radiaciones ultravioleta para humanos (Sinha & Häder 2008) y en el tratamiento de trastornos hiperproliferativos (Stevenson et al., 2002).

2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

2.1. Antecedentes.

Las cianobacterias han creado diferentes estrategias para desarrollarse en condiciones extremas como la salinidad, elevadas temperaturas, desecación, radiación ultravioleta que incluyen procesos como acumulación de agua en las vainas mucilaginosas, formación de osmolitos y síntesis de micosporinas y escitoneminas (Garcia-Pichel & Castenholz, 1991).

La producción de compuestos protectores de la radiación ultravioleta puede ser inducida por parámetros como altas temperaturas, estrés oxidativo, deficiencia de elementos específicos, alta intensidad luminosa y estrés ocasionado por la desecación estacional que, combinada con la radiación ultravioleta, tienen un efecto sinérgico en la producción de micosporinas (Portwich & Garcia-Pichel, 1999). De este modo, la inducción de micosporinas puede ser regulada a través de diferentes señales ambientales.

Scytonema javanicum es una cianobacteria subaerofítica, filamentosa que se desarrolla en un ambiente semiárido con temperaturas extremas y períodos de desecación que se enfrenta, además de a las condiciones de estrés mencionadas anteriormente, a la exposición de niveles altos de radiación ultravioleta que puede ser especialmente perjudicial para los organismos fotosintéticos (Vicent & Roy, 1993, Häder et al., 1998).

La mayoría de los estudios realizados con *Scytonema javanicum* se concentraron en cómo afecta la luz y la temperatura a su crecimiento (Wu L. et al., 2014) y solo unos pocos investigaron su tolerancia a la radiación ultravioleta como Rao et al. (2012) que estudiaron los efectos de la radiación ultravioleta B en el ADN de *Scytonema javanicum*. Sin embargo, se desconoce si condiciones ambientales tales como la temperatura, la salinidad, la radiación ultravioleta y el amonio afectan la síntesis de micosporinas y escitoneminas o si existe alguna relación sinérgica entre ellas.

2.2. *Objetivos.*

Debido a la creciente disminución de la capa de ozono, cada día cobra más importancia la necesidad de conocer distintas sustancias que nos puedan preservar de la radiación ultravioleta. Algunas cianobacterias tienen la capacidad de producir compuestos cuya función natural es la de proteger de la radiación ultravioleta. Dos tipos de estos compuestos se denominan micosporinas y escitoneminas.

En este trabajo se pretende conocer el efecto de factores ambientales en la síntesis de micosporinas y escitoneminas por una cianobacteria seleccionada. Para ello se plantearon los siguientes objetivos parciales:

- Determinar la especie seleccionada para este estudio y comprobar si es capaz de sintetizar tanto micosporina como escitonemina.
- Comprobar si parámetros ambientales como la radiación, temperatura, salinidad y amonio afectan a la síntesis de micosporina y escitonemina en la especie seleccionada.
- Analizar si los efectos de todos los factores ambientales correlacionados influyen en el aumento de la síntesis de micosporina y escitonemina en la especie seleccionada con el fin de optimizar su producción.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio comprende tanto trabajo de campo como de laboratorio. El trabajo de campo se centró en seleccionar el tipo de muestra a recoger y registrar los valores de los parámetros ambientales bajo los cuales se desarrollaba. En el laboratorio se realizó la determinación de la especie, extracciones de los pigmentos y todos los procesos que acompañaban este estudio para determinar la influencia de los factores ambientales en la síntesis de micosporinas y escitoneminas.

3.1. *Parámetros ambientales.*

Con el fin de conocer los parámetros ambientales iniciales de nuestras muestras, medimos en el lugar de recogida de éstas: humedad, temperatura, radiación ultravioleta A y B (UVA y UVB) y la radiación activa fotosintética (RAF). El material se recolectó en una pendiente poco pronunciada del Río Vinalopó debajo del puente del Bimilenario a su paso por Elche.

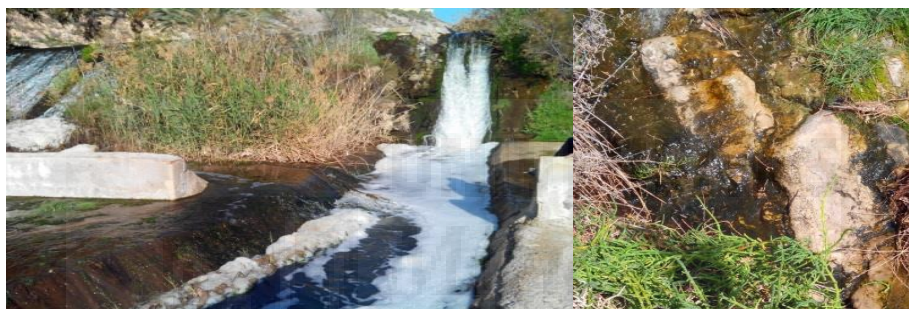


Figura 6.- Lugar de recogida de las cianobacterias en el río Vinalopó, Elche (Alicante)

Dichas medidas fueron registradas puntualmente en primavera del 2015. Para ello se utilizó un Termohigrómetro Delta Ohm HD 8501 H (Figura 7) y un Fotorradiómetro Delta Ohm Do 9721 (Figura 8) colocando los electrodos en el suelo entre la muestra objeto de estudio.



Figura 7.-

Termohigrómetro Delta Ohm HD 8501 H



Figura 8.-

Fotorradiómetro Delta Ohm Do 9721

3.2. Recolección, observación e identificación del material.

La recolección del material se realizó manualmente y de forma aleatoria, recogiendo por zonas y almacenando cada muestra individualmente en sobres de plástico y manteniendo el material en frío.

Para la identificación se utilizó en primer lugar una lupa binocular LAN OPTICS (Figura 9) con el fin de discriminar diferentes texturas y coloraciones. Posteriormente, se realizaron una serie de preparaciones extrayendo el material con pinzas de relojero y depositándolo en un portaobjetos en el que se había vertido una gota de agua destilada. Cada preparación se observó con un microscopio óptico OLYMPUS BX41 (Figura 10).

Se realizó un barrido completo con el objetivo de 20 aumentos para situar la presencia de células, pasando después al de 40 y finalmente al de 100 aumentos utilizando aceite de inmersión. A la vez que se realizaba el barrido de la preparación se hacían microfotografías de las células algales, lo cual facilitó enormemente el proceso de identificación de la muestra. Para ello se utilizó la cámara fotográfica digital OLYMPUS CAMEDIA C-5060 que tiene acoplada el microscopio y, a su vez, conectada a una televisión (Figura 11). Con el fin de mejorar la visualización de las muestras también se usó ácido acético y ácido etildiaminotetraacético (EDTA) para eliminar la materia orgánica y el carbonato.



Figura 9.-
Lupa binocular.



Figura 10.-
Microscopio óptico.



Figura 11.-
Microscopio óptico acoplado a una cámara digital y a una televisión.

Para identificar el género y la especie de nuestro material se usaron los textos de Geitler (1932) y Komárek (2013).

3.3. *Diseño experimental.*

El material recolectado se lavó varias veces con agua estéril y se repartió en 150 placas Petri manteniendo una superficie de 2,5 x 2,5 cm² en todas las placas que se incubaron en una cámara de crecimiento (Ing. Climas, modelo GROW).

Las placas estuvieron expuestas a 93,1 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ de luz visible proporcionada por el tubo F36W/54-765-TB, a 6,44 W/m² de luz ultravioleta A proporcionada por el tubo FL-PHP-40W/09 y a 1,51 W/m² de luz ultravioleta B proporcionada por el tubo TL-40W/12-RS con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad cambiando la posición de las placas diariamente para eliminar cualquier efecto de localización. En el caso de la luz ultravioleta B solo incidía sobre las placas durante 4 horas al día. Con el fin de que las placas recibiesen la luz adecuada se cubrían con filtros.

Las placas que solo debían recibir luz visible se cubrían con filtros RAF 226 lee, las placas que debían recibir luz visible y ultravioleta A se cubrían con filtros PA 130 lee y las placas que debían recibir luz visible, ultravioleta A y ultravioleta B se cubrían con filtros PAB 216 lee de acetato de celulosa.

Una vez el material puesto en cada placa Petri, rotulado correctamente y con su filtro correspondiente, se añadió 1 mL de medio de cultivo BG11 (Stanier et al., 1971). Cerramos las placas con parafilm y se colocaron en las cámaras de cultivo con las distintas temperaturas, cubriéndolas por arriba y por abajo con los filtros correspondientes. Todas las muestras se introdujeron en las cámaras de cultivo el día 0. Ese mismo día se midieron las primeras muestras (3 de micosporinas y 3 de escitoneminas).

Seguidamente se sacaron las muestras pertinentes a los 4 días y posteriormente las que quedaban a los 8 días para analizarlas. Para el análisis de las escitoneminas, había que sacarlas el día correspondiente, pero esperar 24 horas en la oscuridad para poder realizar la extracción.

	Total muestras	Nombre	Filtro	Medio de Cultivo
Día 0	3	Día 0	Ninguno	BG 11
Día 4	3	RAF	226 Lee	BG 11
	3	UVA	130 Lee	BG 11
	3	UVB	216 Lee	BG 11
	3	Salinidad baja (3731 $\mu\text{S/cm}$)	226 Lee	BG 11
	3	Salinidad alta (5207 $\mu\text{S/cm}$)	226 Lee	BG 11
	3	Salinidad muy alta (7360 $\mu\text{S/cm}$)	226 Lee	BG 11
	3	NH_4Cl (0 μM)	226 Lee	BG 11
	3	NH_4Cl (50 μM)	226 Lee	BG 11
	3	NH_4Cl (300 μM)	226 Lee	BG 11
	3	20°C	226 Lee	BG 11
	3	30°C	226 Lee	BG 11
	3	40°C	226 Lee	BG 11
	Día 8	3	RAF	226 Lee
3		UVA	130 Lee	BG 11
3		UVB	216 Lee	BG 11
3		Salinidad baja (3731 $\mu\text{S/cm}$)	226 Lee	BG 11
3		Salinidad alta (5207 $\mu\text{S/cm}$)	226 Lee	BG 11
3		Salinidad muy alta (7360 $\mu\text{S/cm}$)	226 Lee	BG 11
3		NH_4Cl (0 μM)	226 Lee	BG 11
3		NH_4Cl (50 μM)	226 Lee	BG 11
3		NH_4Cl (300 μM)	226 Lee	BG 11
3		20°C	226 Lee	BG 11
3		30°C	226 Lee	BG 11
3		40°C	226 Lee	BG 11
Muestras totales		75		

Tabla 1.- Total de muestras a realizar con los medios y filtros correspondientes para una especie. Este proceso había que realizarlo por duplicado, es decir, para micosporinas y para escitoneminas.

3.4. Extracción y cálculo de Micosporinas (MAAs).

Transcurridos los días pertinentes para cada muestra se retiró el material de las placas correspondientes (Tabla 1) y se introdujo en unos tubos eppendorf previamente pesados en una balanza Sartorius CP64 (Figura 12).

Posteriormente se pesaron de nuevo y se calculó el peso húmedo y el peso seco de cada una de las muestras. A partir de este momento se trabajó siempre en oscuridad. Se trituró el material con un Potter-Elvehjem (Sigma) y se añadió 1 ml de metanol puro a cada uno de los eppendorf que se guardaron en un baño P Selecta Unitronic OR (Figura 13) a 45 °C durante 1 hora. Posteriormente se centrifugó a 5000 x g durante 5 minutos en una centrífuga Eppendorf Centrifuge 5415 R (Figura 14).

Los extractos se recogieron con una jeringuilla acoplada a un filtro GF/F (Figura 15) estériles y se midieron con un espectrofotómetro UV/Visible Modelo Zuzi 4201/50 (Figura 16), dónde se registraron valores de absorbancia a 2 longitudes de onda diferentes, a 260 nm y a su máximo de absorbancia, 332 nm ($\lambda_{\text{máx}}$). Se cuantificaron las microsporinas con la siguiente ecuación:

$$A\lambda^* = A_{\lambda_{\text{máx}}} - A_{260} (1,85 - 0,005 * \lambda_{\text{máx}})$$

Dónde $A\lambda^*$ = el valor corregido del máximo de absorbancia, $A_{\lambda_{\text{máx}}}$ es el valor del máximo de absorbancia y $\lambda_{\text{máx}}$ es la longitud de onda en nanómetros de la máxima absorbancia. Los contenidos específicos se expresan en unidades de absorbancia normalizadas al peso seco ($A\lambda/\text{mg}$). Estas unidades representan la absorbancia de 1mg de peso seco de material extraído en 1 ml de metanol en una cubeta de 1 cm (García-Pichel y Castenholz, 1993).

Para determinar el máximo de absorción que se debía usar, se realizó con una muestra más, a la que se le realizó el mismo proceso para la extracción de microsporinas, y se midieron las absorbancias a diferentes longitudes de onda de 310 a 360 nm, una a una, y se seleccionó la que mayor absorbancia daba, es decir a 332 nm.

3.5. Extracción y cálculo de Escitoneminas.

Transcurridos los días pertinentes para cada muestra (Tabla 1), se retiró el material de las placas correspondientes y se introdujo en unos tubos eppendorf previamente pesados en una balanza Sartorius CP64 (Figura 12). Posteriormente se pesaron de nuevo y se calculó el peso húmedo y el peso seco de cada una de las muestras. A partir de este momento se trabajó siempre en oscuridad. Se trituró el material con un Potter-Elvehjem (Sigma) y se añadió 1 ml de acetona pura a cada uno de los tubos que se guardaron en oscuridad y a 4 °C durante 24 horas. Posteriormente se centrifugó a 6000 rpm durante 30 minutos en una centrífuga Eppendorf Centrifuge 5415 R (Figura 14). Los extractos se recogieron con una jeringuilla acoplada a un filtro GF/F estériles (Figura 15) y se midieron con un espectrofotómetro UV/Visible Modelo Zuzi 4201/50 (Figura 16) donde se registraron valores de absorbancia a 3 longitudes de onda diferentes 384 nm, 490 nm y 663 nm. Se cuantificaron escitonemina, clorofila *a* y carotenoides totales con las siguientes ecuaciones tricromáticas:

$$A_{384}^* (\text{Escitonemina}) = 1,04 * A_{384} - 0,79 * A_{663} - 0,27 * A_{490}$$

$$A_{663}^* (\text{Clorofila } a) = 1,02 * A_{663} - 0,027 * A_{384} + 0,01 * A_{490}$$

$$A_{490}^* (\text{Carotenoides}) = 1,02 * A_{490} - 0,08 * A_{384} - 0,026 * A_{663}$$

Dónde A_{384}^* (Escitonemina) indica la absorbancia a 384 contribuida por escitonemina; A_{663}^* (Clorofila a) indica la absorbancia a 663 contribuida por clorofila a y A_{490}^* (Carotenoides) indica la absorbancia a 490 contribuida por carotenoides totales.

Los contenidos específicos se expresan en unidades de absorbancia normalizadas al peso seco ($A\lambda$ /mg). Estas unidades representan la absorbancia de 1mg de peso seco de material extraído en 1ml de acetona en una cubeta de 1cm (Garcia-Pichel & Castenholz, 1991).



Figura 12.-
Balanza Sartorius CP64.

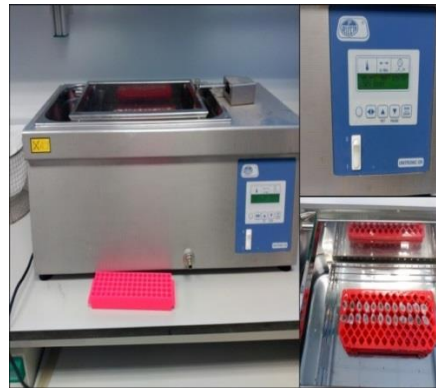


Figura 13.-
Baño P Selecta Unitronic OR.



Figura 14.-
Centrífuga Eppendorf Centrifuge 5415 R.



Figura 15.-
Jeringuillas estériles con su filtro acoplado.



Figura 16.-
Espectofotómetro Zuzi Model 4201/05.



Figura 17.-
Preparación de muestras.

3.6. *Análisis estadístico.*

El análisis de los datos obtenidos en este estudio se realizó con ayuda del programa informático Microsoft Excel Starter 2010 y del programa estadístico SPSS Statistics v17.0. Para determinar si las diferencias entre el control (día 0) y los días 4 y 8 sometidos a diferentes condiciones de radiación, temperatura, salinidad y amonio eran significativas o no, se llevó a cabo un análisis de varianza ANOVA de medidas repetidas (RM ANOVA). El nivel de significación estadística que se estableció fue Sig < 0,1.



4. RESULTADOS

Se presenta la descripción de la especie seleccionada, los valores de radiación activa fotosintética (RAF), de radiación ultravioleta A y B, de temperatura y de humedad relativa correspondientes a la zona donde se desarrolla, así como la influencia de los factores ambientales en la síntesis de micosporinas y escitoneminas.

4.1. Identificación taxonómica y registro de parámetros ambientales.

Se trata de la especie *Scytonema javanicum* Bornet et Thuret ex Bornet et Fahault 1887 que se caracteriza por formar talos postrados de 2mm de grosor, de color verde azulado o pardo amarillento (Figuras 7, 8, 19). *Scytonema javanicum* (Figura 18) forma filamentos entre 11-15 μ m de anchura con falsas ramificaciones y vainas amarillentas o hialinas. Presenta tricomas constituidos por células más cortas que anchas, 6-8 x 8-10 μ m de color verde claro. Además posee heterocitos esféricos, intercalares o terminales, de 7-9 μ m.

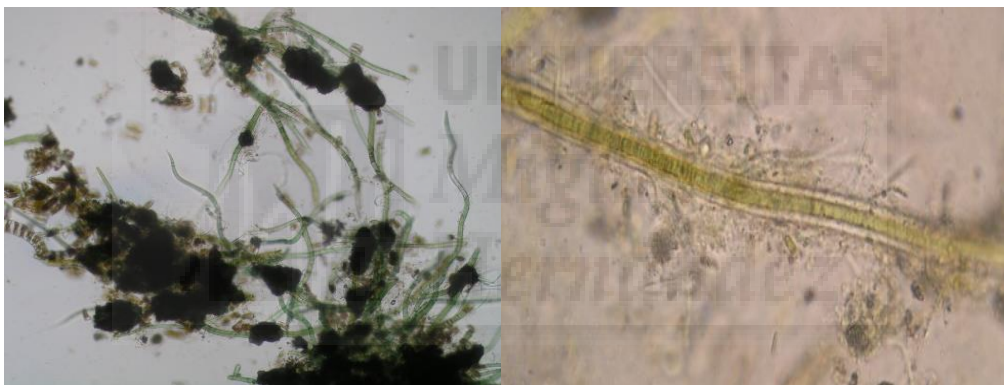


Figura 18.- Filamentos de *Scytonema javanicum* juntos en la muestra y aislado.



Figura 19.- Cianobacterias conservadas en placa.

Las muestras se recogieron en el río Vinalopó a la altura de Elche bajo el puente del Bimilenario. *Scytonema javanicum* soporta en primavera una radiación activa fotosintética (RAF) de 1630-1650 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, una radiación ultravioleta A de 4,5-5 W/m^2 , una radiación ultravioleta B de 0,14-0,17 W/m^2 , una humedad relativa entre 50-55% y una temperatura de 22-23 °C.

4.2. Influencia de los factores ambientales en la síntesis de Micosporinas.

En general, se observó un cambio significativo del contenido en micosporinas ($p < 0,1$) en células expuestas a tratamientos estresantes. Los efectos de los tratamientos individuales (temperatura, salinidad, amonio y radiación ultravioleta) variaron y se exponen a continuación.

4.2.1. Temperatura.

Se realizó un experimento en el cual *Scytonema javanicum* fue expuesta a distintas temperaturas 20°C, 30°C y 40°C, bajo radiación visible, sin amonio y con una salinidad de 3731 $\mu\text{S}/\text{cm}$ que es la que posee el medio de cultivo BG11.

La mayor producción de micosporinas se registró a 20°C, seguido de 30°C y de 40°C, a los 4 días. La síntesis de micosporinas a los 8 días disminuye a medida que aumenta la temperatura (Tabla 2). Se evaluó el efecto de la temperatura y los días de exposición en el contenido en micosporinas con un ANOVA de medidas repetidas y se observó una influencia significativa ($F=4,231$; $p < 0,1$) (Tabla 3).

En resumen, los valores de micosporinas disminuyeron a medida que aumentaban la temperatura. En todos los casos, el descenso del contenido de micosporinas iba acompañado por una estabilidad en el contenido celular de clorofila *a* y de carotenoides (Tabla 2).

4.2.2. Salinidad.

Se realizó un experimento en el cual *Scytonema javanicum* fue expuesta a distintas salinidades 3731 $\mu\text{S}/\text{cm}$, 7360 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y 5207 $\mu\text{S}/\text{cm}$ bajo radiación visible, sin amonio y con una temperatura de 20°C.

La mayor producción de micosporinas se registró a 3731 $\mu\text{S}/\text{cm}$ seguido de 7360 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y de 5207 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a los 4 días. La síntesis de micosporinas a los 8 días disminuye a medida que aumenta la salinidad (Tabla 2). Se evaluó el efecto de la salinidad y los días de exposición en el contenido en micosporinas con un ANOVA de medias repetidas y se observó un efecto significativo ($F=13,390$; $p < 0,01$) (Tabla 3).

En resumen, la salinidad afecta ligeramente a la producción de micosporinas, produciendo mayor cantidad a menor salinidad. En todos los casos, el descenso del contenido de micosporinas iba acompañado por una estabilidad en el contenido celular de clorofila *a* y de carotenoides (Tabla 2).

4.2.3. Amonio.

Se realizó un experimento en el cual la especie fue expuesta a distintas concentraciones de amonio 0 μM NH_4Cl , 50 μM NH_4Cl y 300 μM NH_4Cl bajo radiación visible, 20°C y con una salinidad de 3731 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

La mayor producción de micosporinas se registró sin amonio, seguido de 300 μM NH_4Cl y de 50 μM NH_4Cl a los 4 días. La síntesis de micosporinas a los 8 días disminuye a medida que aumenta la concentración de amonio salvo en la mayor concentración (Tabla 2).

En este caso se evaluó el efecto del amonio y los días de exposición en el contenido en micosporinas con un ANOVA de medidas repetidas ($F=5,802$; $p<0,05$) (Tabla 3) y se observó un efecto muy significativo. En todos los casos, el descenso del contenido de micosporinas va acompañado por una estabilidad en el contenido celular de clorofila *a* y de carotenoides (Tabla 2).

4.2.4. Radiación.

Se realizó un experimento en el cual *Scytonema javanicum* fue expuesta a distintas radiaciones de luz visible, UVA, UVB, sin amonio, con una temperatura de 20°C y con una salinidad de 3731 $\mu\text{S}/\text{cm}$ que es la que posee el medio de cultivo BG11.

La mayor producción de micosporinas se registró con luz visible, seguido de UVA y de UVB a los 4 días mientras que la mayor síntesis de micosporinas a los 8 días se registró con luz visible, seguido de UVB y de UVA (Tabla 2).

En este caso se evaluó el efecto de la radiación y los días de exposición en el contenido en micosporinas con un ANOVA de medidas repetidas ($F=16,187$; $p<0,01$) (Tabla 3) y se observó un efecto muy significativo. En todos los casos, el descenso del contenido de micosporinas va acompañado por una estabilidad en el contenido celular de clorofila *a* y de carotenoides (Tabla 2).

4.3. Influencia de los factores ambientales en la síntesis de Escitonemina.

En general, se observó un cambio significativo del contenido en escitoneminas ($p < 0,1$) en células expuestas a tratamientos estresantes. Los efectos de los tratamientos individuales (temperatura, salinidad, amonio y radiación) variaron y se exponen a continuación.

4.3.1. Temperatura.

Se realizó un experimento en el cual *Scytonema javanicum* fue expuesta a distintas temperaturas 20°C, 30°C y 40°C, bajo radiación visible, sin amonio y con una salinidad de 3731 $\mu\text{S/cm}$ que es la que posee el medio de cultivo BG11.

La mayor producción de escitoneminas se registró a 30 °C, seguido de 20°C y de 40°C, a los 4 días. La síntesis de escitoneminas a los 8 días fue mayor a los 40°C, seguido de 20°C y de 30°C (Tabla 2). Se evaluó el efecto de la temperatura y los días de exposición en el contenido en escitoneminas con un ANOVA de medidas repetidas y no se observó una influencia significativa (Tabla 3).

En todos los casos, el descenso del contenido de escitoneminas iba acompañado por una estabilidad en el contenido celular de clorofila a y de carotenoides (Tabla 2).

4.3.2. Salinidad.

Se realizó un experimento en el cual *Scytonema javanicum* fue expuesta a distintas salinidades 3731 $\mu\text{S/cm}$, 7360 $\mu\text{S/cm}$ y 5207 $\mu\text{S/cm}$ bajo radiación visible, sin amonio y con una temperatura de 20°C.

La mayor producción de escitoneminas se registró a 7360 $\mu\text{S/cm}$ seguido de 3731 $\mu\text{S/cm}$ y de 5207 $\mu\text{S/cm}$ a los 4 y 8 días (Tabla 2). Se evaluó el efecto de la salinidad y los días de exposición en el contenido en escitoneminas con un ANOVA de medias repetidas y se observó un efecto significativo ($F=4,920$; $p < 0,05$) (Tabla 3).

En resumen, la salinidad afecta a la producción de escitoneminas, produciendo mayor cantidad a mayor salinidad. En todos los casos, el descenso del contenido de escitoneminas va acompañado por una estabilidad en el contenido celular de clorofila a y de carotenoides (Tabla 2).

4.3.3. Amonio.

Se realizó un experimento en el cual la especie fue expuesta a distintas concentraciones de amonio 0 μM NH_4Cl , 50 μM NH_4Cl y 300 μM NH_4Cl bajo radiación visible, 20°C y con una salinidad de 3731 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

La mayor producción de escitoneminas se registró sin amonio, seguido de 300 μM NH_4Cl y de 50 μM NH_4Cl a los 4 días. La síntesis de escitoneminas a los 8 días aumenta a medida que aumenta la concentración de amonio (Tabla 2).

En este caso se evaluó el efecto del amonio y los días de exposición en el contenido en escitoneminas con un ANOVA de medidas repetidas y se observó un efecto no significativo (Tabla 3).

En todos los casos, el aumento del contenido de escitoneminas va acompañado por una estabilidad en el contenido celular de clorofila *a* y de carotenoides (Tabla 2).

4.3.4. Radiación.

Se realizó un experimento en el cual *Scytonema javanicum* fue expuesta a distintas radiaciones de luz visible, UVA, UVB, sin amonio, con una temperatura de 20°C y con una salinidad de 3731 $\mu\text{S}/\text{cm}$ que es la que posee el medio de cultivo BG11.

La mayor producción de escitoneminas se registró con luz visible, seguido de UVB y de UVA a los 4 días mientras que la mayor síntesis de escitoneminas a los 8 días se registró con UVB, seguido de luz visible y de UVA (Tabla 2).

En este caso se evaluó el efecto de la radiación y los días de exposición en el contenido en escitoneminas con un ANOVA de medidas repetidas ($F=6,465$; $p<0,1$) (Tabla 3) y se observó un efecto significativo.

En todos los casos, el descenso del contenido de escitoneminas va acompañado por una estabilidad en el contenido celular de clorofila *a* y de carotenoides (Tabla 2).

Tratamiento	Sustancias							
	Micosporinas (A_{λ^*})		Escitoneminas (A_{384^*})		Clorofila a (A_{663^*})		Carotenoides (A_{490^*})	
Día 0	0,32 ± 0,06		0,09 ± 0,03		0,37 ± 0,13		0,30 ± 0,10	
Recogida	Día 4	Día 8	Día 4	Día 8	Día 4	Día 8	Día 4	Día 8
20°C	0,57±0,18	0,31±0,07	0,10±0,03	0,08±0,05	0,37±0,13	0,39±0,12	0,32±0,09	0,34±0,07
30°C	0,53±0,12	0,28±0,06	0,11±0,03	0,06±0,04	0,33±0,17	0,39±0,14	0,23±0,12	0,25±0,06
40°C	0,32±0,06	0,28±0,11	0,10±0,04	0,12±0,04	0,37±0,13	0,37±0,14	0,31±0,09	0,31±0,12
3731 μ S/cm	0,57±0,18	0,31±0,07	0,10±0,03	0,08±0,05	0,37±0,13	0,39±0,12	0,32±0,09	0,34±0,07
5207 μ S/cm	0,50±0,09	0,30±0,07	0,09±0,05	0,07±0,02	0,34±0,12	0,39±0,13	0,32±0,09	0,32±0,10
7360 μ S/cm	0,56±0,12	0,29±0,06	0,11±0,04	0,09±0,03	0,35±0,12	0,39±0,13	0,24±0,09	0,33±0,10
0 μ M	0,57±0,18	0,31±0,07	0,10±0,03	0,08±0,05	0,37±0,13	0,39±0,12	0,32±0,09	0,34±0,07
50 μ M	0,40±0,04	0,28±0,06	0,07±0,03	0,10±0,03	0,37±0,12	0,39±0,14	0,31±0,09	0,34±0,11
300 μ M	0,46±0,12	0,34±0,06	0,08±0,03	0,14±0,05	0,40±0,14	0,40±0,13	0,33±0,11	0,32±0,10
RAF	0,57±0,18	0,31±0,07	0,10±0,03	0,08±0,05	0,37±0,13	0,39±0,12	0,32±0,09	0,34±0,07
UVA	0,53±0,04	0,30±0,06	0,08±0,05	0,08±0,05	0,36±0,12	0,40±0,14	0,31±0,09	0,34±0,11
UVB	0,52±0,09	0,31±0,06	0,08±0,05	0,08±0,04	0,37±0,12	0,38±0,13	0,30±0,08	0,32±0,09

Tabla 2.- Contenido de sustancias en *Scytonema javanicum* en diferentes tratamientos y diferentes días de extracción.

Los datos se expresan en unidades de absorbancia, representando la media y la desviación estándar (n=3).

Efecto	Micosporinas		Escitoneminas	
	Df	F ratio	Df	F ratio
Temperatura	2	4,231*	2	ns
Salinidad		13,390***		4,920**
Amonio		5,802**		ns
Radiación		16,187***		6,465*
Error	8		8	

* $p < 0,1$, ** $p < 0,05$, and *** $p < 0,01$; ^{ns} no significativo.

Tabla 3.- Análisis estadístico realizado para ANOVA con medidas repetidas.



5. DISCUSIÓN

Las cianobacterias están expuestas a menudo a condiciones ambientales extremas (Gabani & Singh, 2013) en todas las épocas del año. En periodos extremadamente secos, las cianobacterias están probablemente inactivas fisiológicamente durante largos periodos de tiempo y solo se vuelven activas cuando se humedecen (Gabani & Singh 2013, Williams et al. 2014). Por ello, presentan periodos limitados de actividad durante los cuales crecen, se dividen y sintetizan pigmentos protectores frente a la radiación ultravioleta. La especie estudiada en este trabajo fue recolectada sobre una roca con poca pendiente en la zona cercana de una cascada del río Vinalopó, ambiente caracterizado por recibir un suplemento de agua intermitente además de la humedad atmosférica. *Scytonema javanicum* está normalmente expuesta a la desecación y a las variaciones de temperatura además de a una intensa radiación. El principal objetivo de este trabajo es averiguar si existe relación entre las variables ambientales y la producción de los mencionados pigmentos protectores.

El estudio realizado por Dillon et al. (2002) con *Chroococciopsis* sp, muestra que esta cianobacteria produce mayor cantidad de micosporinas y escitoneminas cuando son expuestas a valores elevados de temperatura con radiación ultravioleta, coincidiendo con *Scytonema javanicum*. Este aumento en la síntesis de micosporinas y escitoneminas a altas temperaturas probablemente no esté relacionado con un aumento del metabolismo debido a que no se corresponde con un aumento en el contenido de otros pigmentos como clorofila *a* y carotenoides que se mantienen constantes al incrementar la síntesis de escitonemina.

En *Scytonema javanicum* al aumentar la salinidad se observa mayor síntesis de escitoneminas coincidiendo con el estudio de Rath et al. (2012) con otra cianobacteria denominada *Lyngbya aestuarii*. Rungaroon & Hakuto (2014) confirmaron que las micosporinas se sintetizaban a niveles altos de salinidad de acuerdo con nuestros resultados. Al comprobar que el contenido más elevado de escitonemina se registraba a 7360 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y se correspondía con valores estables de clorofila *a* y carotenoides, confirma que este aumento en la síntesis de escitonemina bajo altos valores de salinidad probablemente no esté relacionado con un aumento del metabolismo.

En general, al aumentar la concentración de amonio disminuye la producción de escitoneminas y micosporinas por *Scytonema javanicum* coincidiendo con Manfred & Donat (2008) y Fleming & Castenholz (2008), Teniendo en cuenta que el amonio es una de las fuentes de nitrógeno que requiere menor coste energético, al añadir niveles elevados de este compuesto se esperaría un incremento en la síntesis de escitoneminas y micosporinas.

García-Pichel & Castenholz (1991) y Rastogi & Incharoensakdi (2014) verificaron que la síntesis de pigmentos protectores en cianobacterias se relacionaba con la radiación ultravioleta A. De hecho, la síntesis de escitoneminas no se producía cuando no estaban expuestas a radiación ultravioleta A, a pesar de cambiar factores ambientales como las temperaturas extremas y los valores elevados de pH. Nuestros resultados también demuestran que la temperatura, la salinidad y el amonio pueden jugar un importante papel en el contenido de los pigmentos sintetizados por *Scytonema javanicum*. Por otro lado, Rajesh & Rastogi (2014) demostraron que la radiación ultravioleta tenía efectos estimulantes en la producción escitonemina en *Scytonema* sp coincidiendo con nuestros resultados en *Scytonema javanicum*. Además, los resultados de nuestro estudio, indicaron la posible función del pigmento escitonemina como fotoprotector natural contra la insolación solar de alta energía.

Los diversos resultados obtenidos por los tipos de estrés como son temperatura, salinidad, amonio y la exposición a radiación ultravioleta A y B en la síntesis de micosporinas y escitoneminas indican la complejidad de respuestas a diferentes cambios ambientales producidas en cianobacterias. La síntesis tanto de micosporinas como de escitoneminas no puede ser considerada solamente como respuesta a la radiación ultravioleta sino también formando parte de un mecanismo de defensa frente a factores ambientales. Al exponer a las cianobacterias a diferentes factores estresantes como señales, estas algas pueden ser capaces de responder rápidamente a las variaciones de las condiciones ambientales e incrementan la supervivencia (Asencio & Hoffmann 2013).

6. CONCLUSIÓN Y PROYECCIÓN FUTURA

A raíz de los objetivos propuestos al inicio de este estudio, que pretendía conocer el efecto de factores ambientales en la síntesis de micosporinas y escitoneminas por una especie seleccionada, se determinaron las siguientes conclusiones:

1. La especie *Scytonema javanicum* Bornet et Thuret ex Bornet et Fahault localizada en Elche, concretamente en el río Vinalopó, produce unas sustancias de protección contra la radiación ultravioleta denominadas micosporinas y escitoneminas.
2. Parámetros ambientales como la temperatura, la salinidad, el amonio y la radiación afectan la síntesis de micosporinas y escitoneminas en *S. javanicum*.
3. En *S. javanicum*, factores ambientales como la temperatura, la salinidad, el amonio y la radiación influyen en la síntesis de micosporinas, mientras que en la producción de escitoneminas sólo afecta la radiación y la salinidad.

Partiendo de los resultados obtenidos que indican que la síntesis de micosporinas se ve optimizada en *Scytonema javanicum* mediante la aplicación de altas temperaturas, radiación ultravioleta B y concentraciones intermedias de amonio y que la síntesis de escitoneminas se ve optimizada con altos niveles de salinidad y radiación ultravioleta, sería interesante ampliar esta investigación para determinar la combinación adecuada de parámetros ambientales que optimice la síntesis de estos pigmentos fotoprotectores naturales y su posible aplicación en distintos campos, como en farmacología o en cosmética. De este modo, se avanzaría en el futuro desarrollo farmacéutico de la escitonemina y micosporina por parte de la industria que, debido al creciente deterioro de la capa de ozono, sería interesante ampliar la investigación ya que estas sustancias, además de proteger de la radiación ultravioleta, poseen propiedades terapéuticas adicionales.

7. BIBLIOGRAFÍA

Asencio, A.D. Flora algal y condiciones ambientales de las cuevas y abrigos con pinturas ruprestres de la Región de Murcia. Tesis Doctoral. 1997. Universidad de Murcia.

Asencio, A.D., Aboal, M. In situ nitrogen fixation by cyanobacteria at the andragulla cave, Spain. *Journal of Cave and Karst Studies*. 2011; 73: 130-136.

Asencio, A.D., Hoffmann, L. Chemosystematic evaluation of the genus *Scytonema* (Cyanobacteria) based on occurrence of phycobiliproteins, scytonemin, carotenoid and mycosporine-like amino acid compounds. *European Journal of Phycology*. 2013; 48(4): 331-44.

Brenowitz, S., Castenholz, R. W. Long-term effects of UV and visible irradiance on natural populations of a scytonemin-containing cyanobacterium (*Calothrix* sp.). *FEMS microbiology ecology*. 1997; 24(4): 343-52.

Bultel-Ponce V, Felix-Theodore F, Sarthon C, Ponge J-F & Bodo B. New pigments from the terrestrial cyanobacterium *Scytonema* sp. collected on the Mitaraka Inselberg, French Guyana. *J Nat Prod*. 2004; 67: 678–81.

Castenholz RW, Waterbury JB. Cyanobacteria. In: Staley JT, Bryant MP, Pfennig N, Holt JG (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 1989; 3. Williams & Wilkins, Baltimore, pp 1710–27.

Conde FR, Churio MS & Previtali CM. Experimental study of the excited-state properties and photostability of the mycosporine-like amino acid palythine in aqueous solution. *Photochem Photobiol Sci*. 2007; 6: 669–74.

Crutzen PJ. Ultraviolet on the increase. *Nature*. 1992; 356:104–05.

Dillon, J. G., Tatsumi, C. M., Tandingan, P. G., Castenholz, R. W. Effect of environmental factors on the synthesis of scytonemin, a UV-screening pigment, in a cyanobacterium (*Chroococcidiopsis* sp.). *Archives of microbiology*. 2002; 177 (4): 322-331.

Fleming E.D., Castenholz R. W. Effects of periodic desiccation on the synthesis of the UV-screening compound, scytonemin, in cyanobacteria. *Environmental Microbiology*. 2007; 9(6): 1448–55.

- Fleming, E. D., Castenholz, R. W. Effects of nitrogen source on the synthesis of the UV-screening compound, scytonemin, in the cyanobacterium *Nostoc punctiforme* PCC 73102. *FEMS microbiology ecology*. 2008; 63 (3): 301-08.
- Gabani, P., Singh, O.V. Radiation-resistant extremophiles and their potential in biotechnology and therapeutics. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013; 97 (3): 993-1004.
- Gao Q, Garcia-Pichel F. Microbial ultraviolet sunscreens. *Nat. Rev. Microbiol.* 2011; 9:791–802.
- Garcia-Pichel F & Castenholz RW. Characterization and biological implications of scytonemin, a cyanobacterial sheath pigment. *J Phycol.* 1991; 27: 395–409.
- Garcia-Pichel F., Castenholz R. W. Occurrence of UV-Absorbing, Mycosporine-Like Compounds among Cyanobacterial Isolates and an Estimate of Their Screening Capacity. *Applied and Environmental Microbiology*. 1993; 59 (1): 163-9.
- Garcia-Pichel F, Belnap J, Neuer S, Schanz F. Estimates of global cyanobacterial biomass and its distribution. *Algol Stud.* 2003; 109:213–27.
- Geitler, L. (1932). Cyanophyceae. In *Cyanophyceae*. Johnson.
- Häder, D. P., Kumar, H. D., Smith, R. C., Worrest, R. C. Effects on aquatic ecosystems. *Journal of Photochemistry and photobiology B: Biology*. 1998; 46 (1): 53-68.
- Häder D-P, Helbling EW, Williamson CE, Worrest RC. Effects of UV-radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change. *Photochem Photobiol Sci.* 2011;10:242–60.
- Jagger, J. *Solar-UV Actions of Living Cells*. New York, NY, USA: Praiger Publishers. 1985.
- Komárek J., Anagnostidis K. Cyanoprokaryota 19/2: Oscillatoriales. In: Büdel B, Gärtner G, Krienitz L, Schagerl M. *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Elsevier, Spektrum Akademischer Verlag. 2005.
- Komárek, J. Cyanoprokaryota 19/3: Heterocystous genera. *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Heidelberg, Springer Spektrum. 2013.

- Kosten S, Huszar VLM, Bécares E, Costa LS, Van Donk E, Hansson L-A, et al. Warmer climates boost cyanobacterial dominance in shallow lakes. *Glob Change Biol.* 2012; 18:118–26.
- Llimona, Ballesteros, Brugués M., Comín F.A., Cros R.M., et al. 1985. Història natural dels països catalans. 4, Plantes inferiors. Enciclopèdia Catalana. Barcelona.
- Manfred K., Donat-PH. Mycosporine-Like Amino Acids and Marine Toxins – The Common and the Different. *Mar. Drugs.* 2008; 6: 147-63.
- Matsui, K., Nazifi, E., Hirai, Y., Wada, N., Matsugo, S., Sakamoto, T. The cyanobacterial UV-absorbing pigment scytonemin displays radical scavenging activity. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 2012; 58, 137–44.
- Oren A, Gunde-Cimerman N. Mycosporines and mycosporinelike amino acids: UV protectants or multipurpose secondary metabolites? *FEMS Microbiol. Lett.* 2007; 269:1–10.
- Portwich, A., Garcia-Pichel, F. Ultraviolet and osmotic stresses induce and regulate the synthesis of mycosporines in the cyanobacterium *Chlorogloeopsis* PCC 6912. *Archives of microbiology.* 1999; 172 (4): 187-92.
- Proteau PJ, Gerwick WH, Garcia-Pichel F & Castenholz R. The structure of scytonemin, an ultraviolet sunscreen pigment from the sheaths of cyanobacteria. *Experientia.* 1993; 49: 825–29.
- Rahman Md A., Sinha S., Sachan S., Kumar G., Kumar Singh S., et al. Analysis of proteins involved in the production of MAA's in two Cyanobacteria *Synechocystis* PCC 6803 and *Anabaena cylindrical*. *Biomedical informatics.* 2014; 10(7): 449-53.
- Rajesh P. Rastogi, Ravi R., Datta Madamwar. The high-energy radiation protectant extracellular sheath pigment scytonemin and its reduced counterpart in the cyanobacterium *Scytonema* sp. R77DM. *Bioresource Technology.* 2014; 171: 396–400.
- Rao BQ, Li H, Xiong Y, Lan SB, Li DH, et al. Response of the artificial cyanobacterial crusts to low temperature and light stress and the micro-structure changes under laboratory conditions. *Huan Jing Ke Xue.* 2012; 33(8):2793-803.
- Rastogi, R.P., Sinha, R.P. Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* 2009; 27, 521–39.

- Rastogi P.Rajesh, Incharoensakdi A. Characterization of UV-screening compounds, mycosporine-like amino acids, and scytonemin in the cyanobacterium *Lyngbya* sp. CU2555. *Microbiol Ecol* 87. 2014; 244–56.
- Rath, J., Mandal, S., Adhikary, S. P. Salinity induced synthesis of UV-screening compound scytonemin in the cyanobacterium *Lyngbya aestuarii*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2012; 115: 5-8.
- Richa, Rajeshwar P. Sinha. Biochemical characterization of sunscreens mycosporine-like amino acids from two *Nostoc* species inhabiting diverse habitats. *Protoplasma*. 2015; 252: 199–208.
- Rungaroon W., Hakuto K., Warangkana S., Yoshito T., Teruhiro T. Identification and Upregulation of Biosynthetic Genes Required for Accumulation of Mycosporine-2-Glycine under Salt Stress Conditions in the Halotolerant Cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2014; 80 (5): 1763–9.
- Scoglio, Stefano, et al. Extracts of aphanizomenon flos aquae and nutritional, cosmetic and pharmaceutical compositions containing the same. United States Patent Application. 2010.
- Shick JM, Dunlap WC. Mycosporine-like amino acids and related gadusols: biosynthesis, accumulation, and UV-protective functions in aquatic organisms. *Annu. Rev. Physiol*. 2002; 64:223–62.
- Singh SP, Klisch M, Sinha RP, Häder DP. Effects of abiotic stressors on synthesis of the mycosporine-like amino acid shinorine in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* PCC 7937. *Photochem. Photobiol*. 2008; 84:1500–5.
- Singh SP, Häder D-P, Sinha RP. Cyanobacteria and ultraviolet radiation (UVR) stress: mitigation strategies. *Ageing Res Rev*. 2010; 9:79–90.
- Sinha RP, Singh N, Kumar A, Kumar HD, H der M, H der D-P. Effects of UV irradiation on certain physiological and biochemical processes in cyanobacteria. *J Photochem Photobiol B Biol*. 1996; 32:107–13.
- Sinha RP, Singh SP & Header D-P. Database on mycosporines and mycosporine-like amino acids (MAAs) in fungi, cyanobacteria, macroalgae, phytoplankton and animals. *J Photochem Photobiol*. 2007; 89: 29–35.

- Sinha, R.P., Häder, D. P. UV-protectants in cyanobacteria. *Plant Science*. 2008; 174: 278-89.
- Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M., Cohen-Bazire, G. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order *Chroococcales*). *Bacteriological reviews*. 1971; 35 (2): 171.
- Stevenson, C. S., Capper, E. A., Roshak, A. K., Marquez, B., Grace, K., et al. Scytonemin-a marine natural product inhibitor of kinases key in hyperproliferative inflammatory diseases. *Inflammation Research*. 2002; 51(2): 112-114.
- Takamatsu, S., Hodges, T.W., Rajbhandari, I., Gerwick, W.H., Hamann, M.T., Nagle, D.G. Marine natural products as novel antioxidant prototypes. *J. Nat. Prod*. 2003; 66, 605–8.
- Vincent, W. F., Roy, S. Solar ultraviolet-B radiation and aquatic primary production: damage, protection, and recovery. *Environmental Reviews*. 1993; 1 (1): 1-12.
- Waditee-Sirisattha R, Kageyama H, Sopun W, Tanaka T, Takabea T. Identification and Upregulation of Biosynthetic Genes Required for Accumulation of Mycosporine-2-Glycine under Salt Stress Conditions in the Halotolerant Cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2014; 80(5): 1763–9.
- Williams, W. J., Büdel, B., Reichenberger, H., Rose, N. Cyanobacteria in the Australian northern savannah detect the difference between intermittent dry season and wet season rain. *Biodiversity and Conservation*. 2014; 1-18.
- Wolk CP, Ernst A, Elhai J. Heterocyst metabolism and development. In: Bryant DA (ed) *The Molecular biology of cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 1994; pp 769–823, 669 pp.
- Wu L, Zhang GK, Chen XG, Lan SB, Zhang DL, et al. Development and succession of biological soil crusts and the changes of microbial biomasses. *Huan Jing Ke Xue*. 2014; 35(4):1479-85.
- Imagen de heterocito en *Scytonema* sp. por Ricardo Rico: <https://www.flickr.com/photos/r-rico/sets/72157602263817390>