

**PIGMENT VARIATIONS INDUCED BY THE OXYGEN LEVEL OF THE
MEDIUM IN A MARINE BACTERIUM *Alteromonas* sp.
(STRAIN CECT 4800)**

**VARIACIONES INDUCIDAS POR EL NIVEL DE OXÍGENO DEL MEDIO
EN LOS PIGMENTOS DE LA BACTERIA MARINA *Alteromonas* sp.
(CEPA CECT 4800)**

Manuel A. González-del Valle
Olimpio Montero
Ignacio Moreno-Garrido
Luis M. Lubián*

Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía (CSIC)
Polígono Río S. Pedro s/n
11510 Puerto Real, Cádiz, España
* E-mail: luis.lubian@icman.csic.es

Recibido en marzo de 1999; aceptado en septiembre de 1999

ABSTRACT

A red-pigmented bacterial strain was isolated from indoor cultures of the marine microalga *Tetraselmis suecica* Butcher (Prasynophyceae) and identified as belonging to the genus *Alteromonas* (strain CECT 4800). Pigment composition was analyzed by means of high-performance liquid chromatography (HPLC), and spectral characteristics of three major pigments with reddish and yellowish colorations were determined. Changes in pigment composition during growth in liquid medium containing either ferric citrate, sodium citrate, glucose or glucose plus iron, as well as in relation to the oxygen concentration in the liquid medium were investigated. Pigment production was found to be enhanced with culture aging, the highest enhancement occurring in iron-deprived cultures. An increase in the major pigment (a red pigment) content of 70% in relation to the initial one took place when a culture fed with ferric citrate was bubbled with molecular oxygen. In contrast, red pigment content decreased to about 50% of the initial content when the culture was sparged with nitrogen. Other pigments did not exhibit substantial modifications. Increase in the red pigment content was also observed after the different cultures were exposed to diverse oxygen concentrations for one hour. Similar results were obtained in cultures submitted to both strong aeration and agitation (5 mL min⁻¹ air and 500 rpm, respectively). Findings of this study suggest that pigment production by *Alteromonas* sp. (strain CECT 4800), in particular that of the red pigment, could rely on the oxygen concentration in the culture medium due to antioxidative reactions.

Key words: marine bacteria, *Alteromonas* sp., molecular oxygen, pigment, HPLC.

RESUMEN

Se ha aislado una cepa bacteriana de color rojo a partir de cultivos de laboratorio de la microalga marina *Tetraselmis suecica* Butcher (Prasynophyceae), siendo identificada taxonómicamente como perteneciente al género *Alteromonas* (cepa CECT 4800). Su composición pigmentaria fue analizada mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), y se determinaron las características espectrales de sus tres pigmentos mayoritarios, que presentaban coloraciones roja y amarilla. Asimismo, se investigaron los cambios pigmentarios durante el crecimiento en medio líquido que contenía ya sea citrato sódico, citrato férrico, glucosa o glucosa más hierro, así como en relación con la concentración de oxígeno disuelto en el medio líquido. Se observó que la producción de pigmento se incrementaba con la edad del cultivo, siendo las producciones más altas en cultivos carentes de hierro. Se detectó un incremento del 70% en el contenido del pigmento mayoritario (de color rojo) en relación con el contenido inicial cuando un cultivo suplementado con citrato férrico se burbujeaba con oxígeno molecular. Por el contrario, la concentración de pigmento rojo sufrió un descenso del 50% con relación a la concentración original cuando el cultivo fue burbujeado con nitrógeno. El resto de los pigmentos no mostraron variaciones substanciales. Asimismo, se produjo un incremento de la concentración del pigmento rojo tras la exposición de distintos cultivos a diversas concentraciones de oxígeno durante una hora. Resultados similares se obtuvieron en cultivos sometidos a aireación fuerte y agitación (5 mL min⁻¹ y 500 rpm, respectivamente). Los resultados de este estudio sugieren que la producción de pigmentos por parte de *Alteromonas* sp. (cepa CECT 4800), en particular la producción de pigmento rojo, podría estar relacionado con la cantidad de oxígeno disuelto debido a reacciones antioxidativas.

Palabras clave: bacterias marinas, *Alteromonas* sp., oxígeno molecular, pigmento, HPLC.

INTRODUCTION

Evidence exists on associations between algal and bacterial populations in both natural environments and cultures (Caldwell, 1977; Jones, 1982; Paerl and Pinckney, 1996) and the interactions involved in those associations have been shown to be mainly assimilation by bacteria of organic compounds released by algae (Bell, 1983), while bacteria might supply CO₂ to algae (Marshall, 1989). In fact, it has been found that a number of algae grow in bacteria-contaminated cultures better than in axenic ones (Berland *et al.*, 1970; Fitzsimons and Smith, 1984; Tranvik, 1990; Sundh, 1992). Molecular oxygen is the main product released by algae during photosynthetic activity, and consumption by associated bacteria of this photosynthetically produced oxygen has been proposed as an important factor in regulating

INTRODUCCIÓN

Existen evidencias acerca de la asociación entre algas y bacterias, tanto en ambientes naturales como en cultivos (Caldwell, 1977; Jones, 1982; Paerl y Pinckney, 1996) y se ha demostrado que las interacciones implicadas en tales asociaciones son principalmente la asimilación por parte de las bacterias de compuestos orgánicos liberados por las algas (Bell, 1983), mientras que las bacterias podrían proporcionar CO₂ a las algas (Marshall, 1989). De hecho, se ha comprobado que un gran número de algas crecen mejor en cultivos contaminados con bacterias que en cultivos axénicos (Berland *et al.*, 1979; Fitzsimons y Smith, 1984; Tranvik, 1990; Sundh, 1992). El oxígeno molecular es el principal producto excretado por las algas durante la actividad fotosintética y se ha propuesto que el consumo

photosynthesis of the alga due to reduction of oxygen tension within the microenvironment of the algal cells (Caldwell, 1977; Escher and Characklis, 1982; Mouget *et al.*, 1995). However, at higher rates of photosynthesis, oxygen could result harmful for the associated bacteria as well.

Species of the genus *Alteromonas* are common in the marine environment but appear to be rare or absent in most terrestrial habitats (Baumann *et al.*, 1984; Andrykovitch and Marx, 1988). They are chemoorganotrophs capable of respiratory but not fermentative metabolism with molecular oxygen as universal electron acceptor. Some species show pigmentation from lemon-yellow to violet. So, coloration is due to prodigiosin in *Alteromonas rubra* (Gerber and Gauthier, 1979), to violacein in *A. luteoviolacea* (Gauthier, 1976), to unidentified non-carotenoid pigments in *A. citrea* and *A. aurantia* (Gauthier and Breittmayer, 1979), and melanins in *A. hanedai*, *A. nigrifaciens* and the novel strain MMB-1 (CECT 4803) (Baumann *et al.*, 1984; Solano *et al.*, 1997). Species of *Alteromonas* have deserved attention because they are producers of compounds with antibiotic or inhibitory properties, including some of the aforementioned pigments (Gauthier and Flatau, 1976; Ballester *et al.*, 1977; Wratten *et al.*, 1977; Lemos *et al.*, 1985), and siderophores (Reid *et al.*, 1993; Riquelme, 1996). Interestingly, antibiotics and growth inhibitory compounds from species of the genus *Alteromonas* have been shown to act through increasing oxygen uptake, with concurrent deficient reduction and formation of radicals (Gauthier and Flatau, 1976; Austin, 1988).

From diverse microalgae cultures, red bacterial colonies were isolated at our laboratory (González-del Valle, 1997) that were identified as belonging to the genus *Alteromonas*. In this paper, we report changes in pigment composition of one of them during its growth

de este oxígeno por parte de las bacterias asociadas es un factor importante en los procesos de regulación de la fotosíntesis, debido a la reducción de la tensión de oxígeno en el microambiente adyacente a las células algales (Caldwell, 1977; Escher y Charaklis, 1982; Mouget *et al.*, 1995). Sin embargo, a tasas altas de fotosíntesis el oxígeno puede resultar también perjudicial para las bacterias asociadas.

De entre las bacterias marinas pigmentadas, son comunes las especies del género *Alteromonas*, que parecen estar ausentes o encontrarse raramente en la mayoría de los hábitats terrestres (Baumann *et al.*, 1984; Andrykovitch y Marx, 1988). Son quimioorganotrofas con un metabolismo respiratorio pero no fermentativo, que utilizan el oxígeno como aceptor universal de electrones. Algunas especies muestran coloraciones desde amarillo hasta violeta. Así, la coloración se debe al pigmento prodigiosina en *Alteromonas rubra* (Gerber y Gauthier, 1979), a la violaceína en *A. luteoviolacea* (Gauthier, 1976), a pigmentos no carotenoides no identificados en *A. citrea* y *A. aurantia* (Gauthier, 1977; Gauthier y Breittmayer, 1979), y melaninas en *A. hanedai*, *A. nigrifaciens* y la cepa nueva MMB-1 (CECT 4803) (Baumann *et al.*, 1984; Solano *et al.*, 1997). Ciertas especies de *Alteromonas* han atraído la atención debido a su producción de compuestos con actividad antibiótica, incluyendo algunos de los pigmentos anteriormente mencionados (Gauthier y Flatau, 1976; Ballester *et al.*, 1977; Wratten *et al.*, 1977; Lemos *et al.*, 1985) y sideróforos (Reid *et al.*, 1993; Riquelme, 1996). Es interesante observar que tanto los antibióticos como los compuestos inhibidores del crecimiento obtenidos de especies del género *Alteromonas* actúan incrementando la incorporación de oxígeno, provocando una reducción deficiente y la formación de radicales (Gauthier y Flatau, 1976; Austin, 1988).

in culture and under different oxygen-involving treatments.

MATERIALS AND METHODS

Culture

The bacterium used in this study was identified as belonging to the genus *Alteromonas* (*Alteromonas* sp., strain CECT 4800) (González-del Valle, 1997), and was isolated from cultures of the marine microalgae *Tetraselmis suecica* (Prasinophyceae), which was obtained from the Microalga Culture Collection of the Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía (CSIC, Cádiz, Spain). A stock bacterial culture was kept at 4°C on marine agar 2216 medium (DIFCO) and renewed monthly. In all experiments, 2 L of liquid medium was inoculated with cells from the stock bacterial culture in the exponential growth phase. The medium was prepared in artificial seawater, with the following salt concentration (w/v): 2.43% NaCl, 0.01% CaCl₂, 0.40% MgCl₂, 0.007% NaBr, 0.06% KCl, 0.002% KHCO₃, and 0.63% MgSO₄, to which 0.1% yeast extract, 0.5% protease peptone and a carbon source were added. Bacterial cell density was achieved by determining the number of colony formation units (CFU), according to the methodology described by Buck (1979).

Experimental

Pigment content was determined during bacterial growth in cultures to which citrate, either as sodium or ferric salt, and glucose, either alone or implemented with iron (FeCl₃), were added as carbon source, all of them to a final concentration of 0.01% (w/v).

In order to verify the hypothesis on the existence of a relationship between oxygen saturation level and pigment content, three independent experiments were conducted in a

A partir de diversos cultivos de microalgas, en nuestro laboratorio se aislaron colonias de bacterias de color rojo (González-del Valle, 1997) que se identificaron como pertenecientes al género *Alteromonas*. En este trabajo se describen cambios en la composición pigmentaria de una de ellas, durante su crecimiento en cultivo y bajo distintos tratamientos, relacionados con la concentración de oxígeno en el medio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivos

La bacteria utilizada en este estudio se identificó como perteneciente al género *Alteromonas* (*Alteromonas* sp., cepa CECT 4800) (González-del Valle, 1997), y fue aislada a partir de cultivos de la microalga marina *Tetraselmis suecica* (Prasinophyceae), obtenida de la Colección de Microalgas Marinas del Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía (CSIC, Cádiz, España). Un cultivo bacteriano *stock* se mantuvo a 4°C en medio agar marino 2216 (DIFCO), sujeto a renovación mensual. Para todos los experimentos se inocularon 2 L de medio líquido con células obtenidas a partir del *stock* bacteriano en fase de crecimiento exponencial. El medio se preparó en agua de mar artificial con la siguiente composición salina (p/v): 2.43% NaCl, 0.01% CaCl₂, 0.40% MgCl₂, 0.007% NaBr; 0.06% KCl, 0.002% KHCO₃, y 0.63% MgSO₄, adicionada con 0.1% de extracto de levadura y 0.5% de proteasa peptona, además de una fuente de carbono. La concentración de bacterias se evaluó por determinación de las unidades formadoras de colonias (CFU), según el método mostrado en Buck (1979).

Experimentación

El contenido en pigmentos durante el crecimiento bacteriano se determinó en cultivos a

bench-top fermentor system equipped with a 2-L capacity cuvette. Temperature was maintained constant at 35°C (the optimal temperature for growth) by means of circulating water connected to a recirculation cooler. In a first experiment, a culture grown for 24 hours at a cell density of $5.0 \cdot 10^6$ cells mL⁻¹ was bubbled with oxygen at 100% saturation for one hour. A 250-mL sample was then taken for pigment analysis. Afterwards, the remaining culture was bubbled with N₂ for up to 24 hours and samples for pigment analysis were taken at time intervals of 2, 12 and 24 hours (cell densities were $5.7 \cdot 10^6$, $1.4 \cdot 10^8$ and $2.0 \cdot 10^8$ cells mL⁻¹, respectively). The aim of N₂ bubbling was to check whether removal of oxygen brought about a depletion in pigment content. In a second experiment, cultures fed with citrate and with glucose (see above) were exposed to a fixed saturation of oxygen, namely 20%, 50% and 100% for one hour, and induced-changes in pigments then determined. In a third experiment, two cultures were aerated with atmospheric air (air flows were 0.5 and 5 mL min⁻¹); two other cultures were maintained without aeration but agitated at 50 or 500 rpm; and, finally, a culture was submitted to an air flow of 0.5 mL min⁻¹ and agitated at 50 rpm (soft conditions), and another culture was submitted to 5 mL min⁻¹ of air flow and agitated at 500 rpm (strong conditions). A culture with neither aeration nor agitation was used as control. Pigment analysis was carried out after 48 hours of growth (about 10^8 cells mL⁻¹). In this latter experiment, cultures (2 L) were inoculated with an appropriate volume of the stock culture to yield a cell density of about 10^6 cells mL⁻¹. Oxygen saturation level and pH were measured on-line with an Ingold O₂ sensor and an Ingold 405-OPAS/200 electrode, respectively, immersed in the culture cuvette, and values registered every 15 minutes.

los que se añadió citrato, como sal sódica o sal férrica, o glucosa, tanto sola como suplementada con hierro (FeCl₃), como fuente de carbono, siempre a una concentración final de 0.01% (p/v).

Con objeto de verificar la hipótesis de la existencia de una relación entre el nivel de saturación de oxígeno y el contenido en pigmentos, se desarrollaron tres experimentos independientes en un fermentador equipado con una cubeta de 2 L de capacidad. La temperatura se mantuvo constante a 35°C (temperatura óptima de crecimiento) mediante agua circulante conectada a un sistema refrigerante. En un primer experimento, un cultivo crecido durante 24 horas con citrato férrico a una densidad de $5.0 \cdot 10^6$ células mL⁻¹ se burbujeó con oxígeno hasta saturación durante una hora, después de la cual se tomó una alícuota de 250 mL para su análisis pigmentario. El resto del cultivo se burbujeó con N₂ durante 24 horas y se tomaron muestras para análisis pigmentario a las 2, 12 y 24 horas (las densidades celulares en esos tiempos fueron $5.7 \cdot 10^6$, $1.4 \cdot 10^8$ y $2.0 \cdot 10^8$ células mL⁻¹, respectivamente). El objeto de burbujear con nitrógeno fue comprobar si la remoción de oxígeno conllevaba una disminución en los contenidos pigmentarios. En un segundo experimento, cultivos suplementados con citrato y con glucosa (ver descripción anterior) se expusieron a una concentración fija de oxígeno (20%, 50% y 100% de saturación) durante una hora y se determinaron los cambios inducidos en los pigmentos. En un tercer experimento, se burbujearon dos cultivos con aire atmosférico con flujos de 0.5 y 5 mL min⁻¹, respectivamente; otros dos cultivos se mantuvieron sin aireación pero sujetos a agitación orbital de 50 y 500 rpm, respectivamente; y finalmente un cultivo se sometió a un flujo de aire de 0.5 mL min⁻¹ y agitación de 50 rpm (condiciones suaves), mientras que otro se sometió a un flujo de aire de 5 mL min⁻¹ y

Pigment analysis

For high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis of pigments, 250-mL samples of a 48-hour grown culture were centrifuged at 4500 rpm for 30 minutes; the supernatant was discarded and pellet sonicated with 2 mL chloroform for pigment extraction. After a new centrifugation, the supernatant was collected, solvent evaporated to dryness and pigments resuspended in an appropriate volume of methanol. Analyses were performed with a WATERS 600E Multisolute Delivery System, equipped with a RP-C18 column packed with Spherisorb ODS-2 (15 cm × 4 mm i.d. and 5- μ m particle size). Samples were filtered through a 0.22- μ m nylon membrane and 20 μ L then injected. Elution was according to the gradient system developed by Mínguez-Mosquera *et al.* (1992), at a constant flow of 1.0 mL min⁻¹ during 30 minutes. A Programmable Photodiode Array Detector (PDA, WATERS 991) was used for pigment detection, with data being acquired three-dimensionally (absorbance-time-wavelength) over the wavelength range of 350 to 750 nm.

Pigments were quantified using the specific extinction coefficients ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$) of 12.5 L g⁻¹ cm⁻¹ for pigments 1 (red pigment) and 2, and of 11.7 L g⁻¹ cm⁻¹ for pigments 3 (yellow pigment) and 4. These coefficients were determined spectrophotometrically from the slope of the linear regression between the absorbance of 100% acetone solutions containing a known amount of the red pigment and their concentration in percent (w/v).

RESULTS

HPLC and spectrophotometrical analyses of pigments

A typical HPLC-chromatogram of pigments from *Alteromonas* sp. (strain TSHR3,

agitación de 500 rpm (condiciones fuertes). Se usó un cultivo sin aireación ni agitación como control. Se llevó a cabo el análisis de pigmentos tras 48 horas de crecimiento (alcanzándose entonces una densidad celular de 10⁸ células mL⁻¹). En este último experimento, los cultivos de 2 L se inocularon con un volumen apropiado de cultivo *stock* para alcanzar una densidad celular de alrededor de 10⁶ células mL⁻¹. El nivel de saturación de oxígeno se midió polarográficamente mediante un sensor de O₂ Ingold y el pH se midió con un electrodo Ingold 405-OPAS/200, ambos sumergidos en la cubeta de cultivo, con registros de ambas variables a intervalos de 15 minutos.

Análisis de pigmentos

Para el análisis de pigmentos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), se centrifugó en cada caso una muestra de 250 mL de cultivo durante 30 minutos a 4500 rpm tras 48 horas de crecimiento. Se descartó el sobrenadante y el residuo sólido se sonicó con 2 mL de cloroformo para la extracción de los pigmentos. A continuación se volvió a centrifugar y una vez recogido el sobrenadante, se evaporó el disolvente a sequedad y los pigmentos se resuspendieron en un volumen apropiado de metanol. Los análisis se llevaron a cabo con un sistema multisolvente WATERS 600E, equipado con una columna RP-C18 empaquetada con Spherisorb ODS-2 (15 cm × 4 mm d.i. y 5 μ m de tamaño de partícula). Las muestras se filtraron por una membrana de nylon de 0.22 μ m de tamaño de poro, y después se inyectaron 20 μ L. La elución se llevó a cabo según un sistema en gradiente desarrollado por Mosquera *et al.* (1992), a un flujo constante de 1.0 mL min⁻¹ durante 30 minutos. Para la detección de los pigmentos se usó un detector PDA (Programmable Photodiode Array Detector, WATERS 991). Los datos se adquirieron de forma tridimensional

CECT 4800) is shown in figure 1a. A red pigment, corresponding to the chromatographic peak 1, always predominated in content over the other pigments. A second major pigment corresponding to the chromatographic peak 3 presented a yellow coloration. These pigments could not be identified. Spectra of these pigments and of pigment 2 (peak 2 in fig. 1a) are shown in figure 1b. Pigments 1 and 2, on the one hand, and pigments 3 and 4, on the other, presented similar spectral characteristics. Maximum absorption wavelengths of the red and yellow pigments in different solvents are given in table 1. The red pigment only exhibited a maximum at about 475 nm in every solvent, apart from in benzene and in chloroform, which was at 491 and 488 nm, respectively. In contrast, the yellow pigment spectrum exhibited three maxima, peaking at similar wavelengths in all solvents.

Pigment variations during culture growth

The contents (in $\text{pg} \cdot 10^6$ cells) of pigments 1, 2 and 3 at different time intervals during culture growth are depicted in figure 2 for the cultures fed with sodium citrate, ferric citrate, glucose and glucose plus iron. No significant ($P < 0.01$) differences in the growth pattern were observed among the diverse cultures (data not shown). In all of them, red and yellow pigment contents per cell rose to a maximum after an eight-hour time interval of growth, this rise coinciding with the onset of the log phase. The pigment contents then fell close to zero and, with culture aging, the pattern of evolution of each pigment was dependent on the culture type. So, after 48 hours of culture growth, the red pigment content augmented in all of them, the maximum value being obtained with sodium citrate and the minimum value with glucose plus iron; the yellow pigment content only rose in both iron-deprived cultures, and

(absorbancia-tiempo-longitud de onda) sobre el intervalo de longitudes de onda entre 350 y 750 nm.

Los pigmentos se cuantificaron aplicando los coeficientes específicos de extinción ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$) de $12.51 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para los pigmentos 1 y 2 (pigmento rojo), y de $11.7 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para los pigmentos 3 (pigmento amarillo) y 4. Estos coeficientes de extinción se determinaron espectrofotométricamente a partir de la pendiente de la regresión lineal entre la absorbancia de una cantidad conocida de pigmento disuelta en acetona y la concentración de pigmento expresada en porcentaje (p/v).

RESULTADOS

Análisis espectrofotométrico y por HPLC de los pigmentos

Un cromatograma típico de los pigmentos de *Alteromonas* sp. (CECT 4800) obtenido mediante HPLC se muestra en la figura 1a. El pigmento de color rojo, que corresponde al pico cromatográfico 1, siempre fue mayoritario respecto al resto de los pigmentos. El segundo en importancia desde el punto de vista cuantitativo corresponde al pico cromatográfico 3 y mostró un color amarillo. Ninguno de los dos pigmentos pudo ser identificado. Los espectros de estos dos pigmentos, así como el correspondiente al pico 2, se muestran en la figura 1b. Los pigmentos 1 y 2 presentaron características espectrales similares y, aunque no se ha representado el espectro correspondiente al pico 4, su espectro de absorción es muy similar al del pico 3. Los máximos de absorción para los pigmentos rojo y amarillo en diferentes disolventes se muestran en la tabla 1. El pigmento rojo presentó un único pico sobre 476 nm en los solventes ensayados excepto en benceno y cloroformo, en los que los máximos de absorción fueron a 491 y 488 nm, respectivamente. Por el

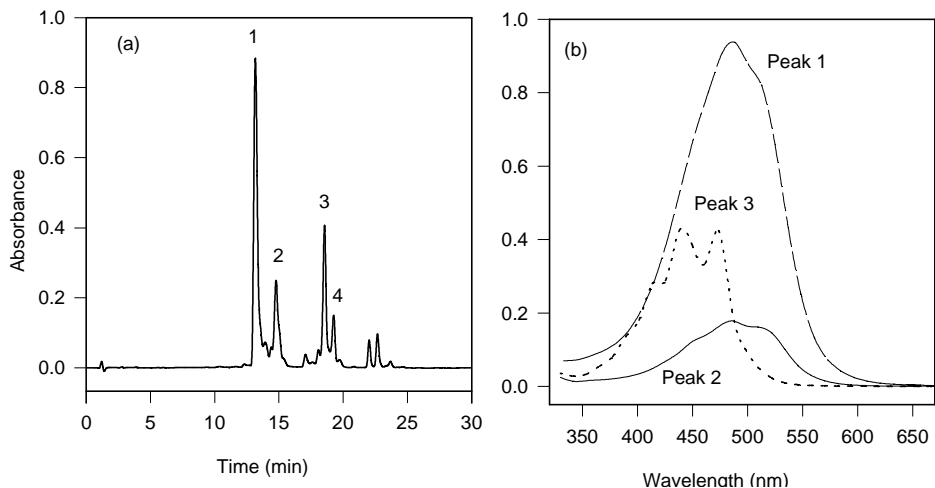


Figure 1. (a) Chromatographic and (b) spectrophotometric characteristics of pigments from *Alteromonas* sp. (strain CECT 4800). (For details see text.)

Figura 1. Características (a) cromatográficas y (b) espectrofotométricas de los pigmentos de *Alteromonas* sp. (cepa CECT 4800). (Ver texto.)

Table 1. Maximum absorption wavelengths (nm) in different solvents of the two major pigments (peaks 1 and 3 in the chromatogram of fig. 1) from *Alteromonas* sp. (strain CECT 4800).

Tabla 1. Máximos de absorción (nm) en diferentes disolventes de los dos pigmentos mayores (picos 1 y 3 en el cromatograma de la fig. 1) de *Alteromonas* sp. (cepa CECT 4800).

Solvent	Peak 1	Peak 3
Trichloromethane	488	-
Diethyl ether	476	444/470/502
n-Hexane	476	-
Bencene	491	-
Acetone	477	448/473/505
Ethanol	477	442/472/503
Methanol	475	446/469/500

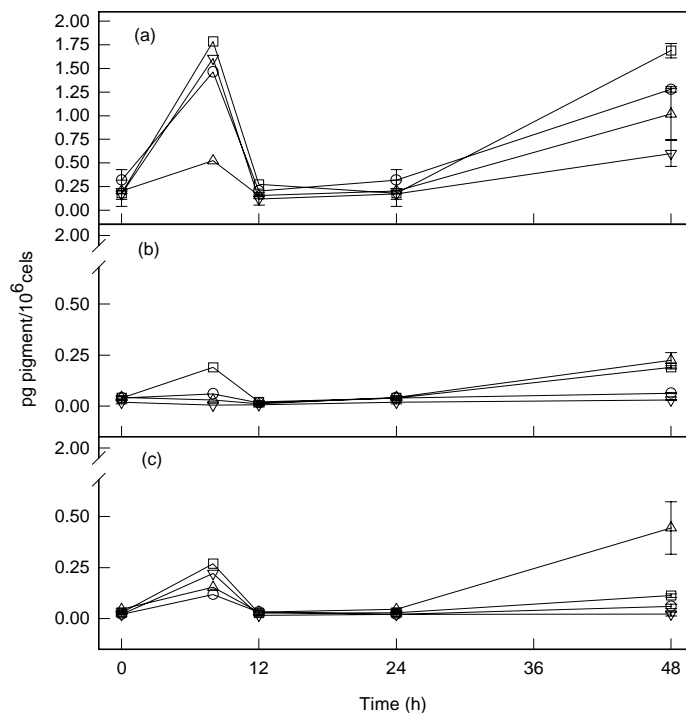


Figure 2. Changes in main pigment contents during 48 hours of growth of cultures of *Alteromonas* sp. (strain CECT 4800) in liquid medium and fed with sodium citrate (square), ferric citrate (circle), glucose (triangle) or glucose plus iron (inverted triangle). (a) Peak 1 (red pigment) in figure 1, (b) peak 2 in figure 1 and (c) peak 3 (yellow pigment) in figure 1. Values are the mean of three independent experiments. (Note the different y-axis scales.)

Figura 2. Cambios en los contenidos de los pigmentos principales de *Alteromonas* sp. (cepa CECT 4800) durante 48 horas de crecimiento en medio líquido suplementado con citrato sódico (cuadrado), citrato férrico (círculo), glucosa (triángulo) o glucosa más hierro (triángulo invertido). (a) Pico 1 (pigmento rojo) en la figura 1, (b) pico 2 en la figura 1 y (c) pico 3 (pigmento amarillo) en la figura 1. Los valores representan la media de tres experimentos independientes. (Nótese la diferencia de escala en las ordenadas.)

pigment 3 content rose in the glucose-fed culture.

Oxygen-induced variations in pigment contents

Red pigment content (expressed in $\text{pg} \cdot 10^{-6}$ cells) rose with increasing oxygen concentrations in all the experiments. In the first experiment, after sparging with molecular oxygen for

contrario, el espectro del pigmento amarillo mostró tres picos a longitudes de onda similares en todos los disolventes utilizados.

Variaciones de los pigmentos durante el crecimiento del cultivo

Los contenidos (en $\text{pg} \cdot 10^6$ células) de los pigmentos 1, 2 y 3 en diferentes intervalos de tiempo durante el crecimiento del cultivo se

one hour, the red pigment content had risen about 1.7-fold in relation to the initial content (fig. 3). Even though a minimal increase in the red pigment content was still detected after two hours of nitrogen bubbling, it dropped to about 15% and 9% of the initial content following 12 and 24 hours, respectively, of bubbling with nitrogen. Pigment 3 did not augment with oxygen but dropped after bubbling with nitrogen for 12 hours. Pigment 2 underwent similar variations to those of the red pigment, though to a lesser extent.

Figure 4 illustrates the results of the second experiment. The oxygen saturation level in the cultures before the treatment ranged between 8% and 12%. Initial contents of the red pigment were in the order of 1.83 ± 0.22 pg pigment $\cdot 10^{-6}$ cells. Increases in the red pigment content were related to the increase in oxygen levels in both glucose-fed cultures, but they did not differ substantially in the citrate-fed cultures among the three oxygen saturations assayed.

The contents of pigments 1 and 2, as well as the sum of both pigments, in a glucose-fed culture under different regimes of aeration and agitation are shown in figure 5. The higher contents were obtained in the experiment combining agitation and aeration; however, under soft conditions (0.5 mL min⁻¹ of air flow and agitation at 50 rpm), it was about 50% of the content under strong conditions (5 mL min⁻¹ of air flow and agitation at 500 rpm), where the red pigment content accounted for more than 95% of the total. In general, aeration raised the pigment pool content more than agitation.

Evolutions of oxygen saturation and pH of the medium over the course of these experiments are displayed in figure 6. From initial levels of 90% to 100%, oxygen saturation levels soon fell to zero in cultures without or soft aeration, while in cultures submitted to

detallan en la figura 2 para los cultivos suplementados con citrato sódico, citrato férrico, glucosa y glucosa más hierro. No se observaron diferencias significativas ($P < 0.01$) entre los parámetros de crecimiento de los diferentes cultivos (datos no mostrados). En todos ellos, el contenido de los pigmentos rojo y amarillo por célula creció durante las primeras ocho horas, coincidiendo con el inicio de la fase logarítmica. A continuación los contenidos en pigmentos disminuyeron hasta casi cero y, a partir de las 24 horas, conforme envejece el cultivo, la variación de cada pigmento dependió del tipo de cultivo. Así, tras 48 horas de crecimiento, el pigmento rojo aumentó en todos ellos, obteniéndose el valor máximo en medios suplementados con citrato sódico, mientras que el mínimo se obtuvo en medios suplementados con glucosa más hierro. El contenido en el pigmento correspondiente al pico 2 sólo aumentó en los cultivos carentes de hierro y el contenido del pigmento amarillo lo hizo en los cultivos suplementados con glucosa.

Variaciones en los pigmentos inducidas por el oxígeno

En todos los experimentos realizados, el contenido del pigmento rojo (expresado en pg $\cdot 10^{-6}$ células) aumentó con el incremento de la concentración del oxígeno. En el primer experimento, tras burbujear el cultivo con oxígeno molecular durante una hora, el contenido celular de pigmento rojo aumentó alrededor de 1.7 veces en relación con el contenido inicial (fig. 3). A partir de este momento se burbujearon con nitrógeno y aunque se detectó un pequeño incremento tras dos horas, la concentración celular del pigmento disminuyó hasta el 15% y el 9% respecto al contenido inicial al cabo de 12 y 24 horas, respectivamente. El pigmento correspondiente al pico 3 no aumentó con el oxígeno, pero cayó tras 12 horas de burbujear

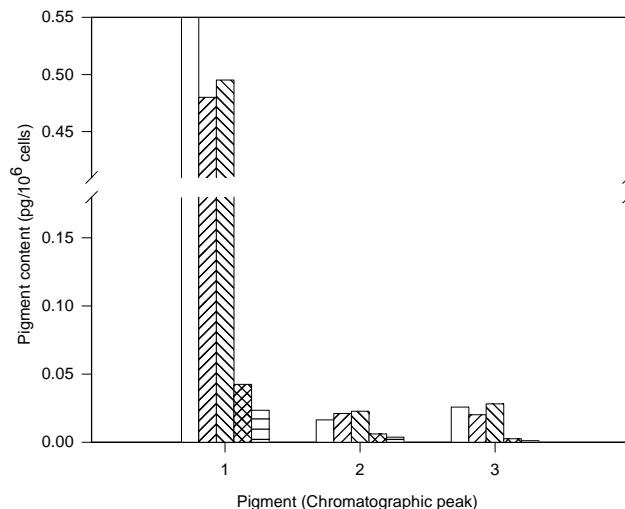


Figure 3. Changes in major pigment contents induced by bubbling the culture with molecular oxygen for one hour and with nitrogen for up to 24 hours. Pigment number corresponds to the peak number in figure 1.

Figura 3. Cambios en los contenidos de los pigmentos mayoritarios inducidos por el burbujeo de oxígeno molecular al medio durante una hora y de nitrógeno durante 48 horas. Los números de los pigmentos corresponden a los números de los picos en la figura 1.

strong aeration (5 mL min^{-1}) oxygen dropped initially but rose to about 90% saturation with prolonged treatment. In cultures without aeration, as in control cultures, pH values always kept below 7 during the experimental period, while pH values gradually rose to about 8.0 in cultures with aeration.

DISCUSSION

Despite the important number of reports on *Alteromonas* species isolated from natural marine waters, few deal with *Alteromonas* species inhabiting indoor cultures of microalgae. In addition, little information exists on pigments from *Alteromonas* species apart from prodigiosin, violacein and melanin (Harwood and Russell, 1984; Margalith, 1992). Unidentified non-carotenoid pigments were also

con nitrógeno. El pigmento 2 siguió variaciones similares a las del pigmento rojo aunque en menor medida.

La figura 4 muestra los resultados obtenidos en el segundo experimento. El nivel de saturación de oxígeno en los cultivos antes del tratamiento se hallaba entre 8% y 12%. El contenido inicial de pigmento rojo fue de $1.83 \pm 0.22 \text{ pg de pigmento} \cdot 10^{-6} \text{ células}$. Los aumentos en los contenidos de pigmento se relacionaron con el incremento de los niveles de oxígeno en los dos cultivos suplementados con glucosa, pero no difirieron substancialmente en los cultivos suplementados con citrato en las tres saturaciones de oxígeno ensayadas.

Los contenidos de los pigmentos 1 y 2, así como la suma de ambos pigmentos en un cultivo con glucosa bajo diferentes regímenes de aireación y agitación se muestran en la figura 5.

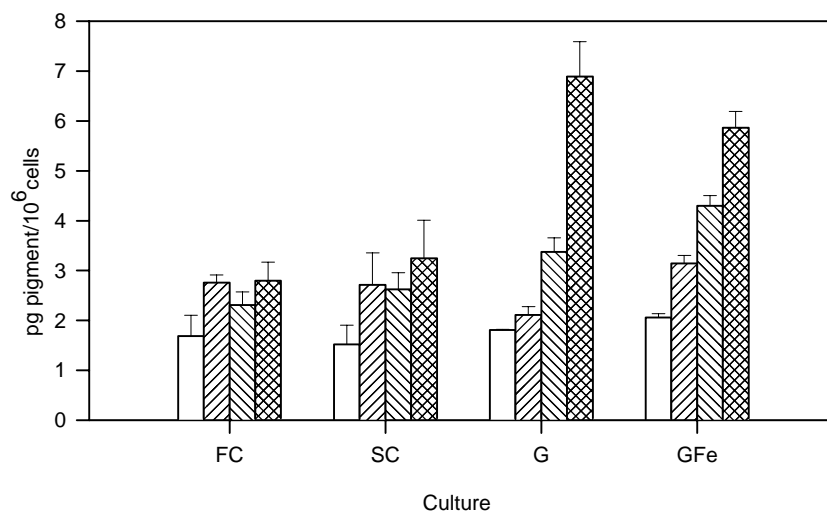


Figure 4. Sum of pigments 1 and 2 contents in $\text{pg} \cdot 10^{-6}$ cells (mean value \pm standard deviation with $n = 3$) from *Alteromonas* sp. (strain CECT 4800) in cultures fed with ferric citrate (FC), sodium citrate (SC), glucose (G) and glucose plus iron (GFe), and submitted to different oxygen saturation levels (20%, 50% and 100%). Oxygen saturation in the initial cultures ranged between 8% and 12%. Pigments 1 and 2 correspond to peaks 1 and 2, respectively, in figure 1.

Figura 4. Suma de los contenidos de los pigmentos 1 y 2 expresados en $\text{pg} \cdot 10^{-6}$ células (valores medios \pm desviación típica con $n = 3$) extraídos de *Alteromonas* sp. (cepa CECT 4800) en cultivos con citrato férrico (FC), citrato sódico (SC), glucosa (G) y glucosa con hierro (GFe), y sometidos a distintos niveles de saturación de oxígeno (20%, 50% y 100%). Los niveles de saturación de oxígeno en los cultivos iniciales variaron entre 8% y 12%. Los pigmentos 1 y 2 corresponden a los picos 1 y 2, respectivamente, en la figura 1.

reported for *A. citrea* and *A. aurantia* (Gauthier and Breittmayer, 1979). In this study, spectrophotometrical and chromatographic characteristics of the major pigments from *Alteromonas* sp. are shown, even though they do not coincide with those reported in the literature for known pigments and pigments could not be thereby identified. Similarity in these characteristics between pigments 1 and 2, on the one hand, and between pigments 3 and 4, on the other, suggests that they could be related chemically and, perhaps, biosynthetically.

Pigment production was always found to increase with enhanced oxygen concentration in the medium, while the red pigment content dropped when oxygen was removed from the medium by bubbling with nitrogen. Hence, it

Los contenidos más altos se obtuvieron en los experimentos que combinaban agitación y aireación, pero bajo condiciones suaves los contenidos de pigmentos fueron de un 50% respecto a los obtenidos bajo condiciones fuertes, en las cuales el contenido de pigmento rojo correspondió a más del 95% del total. En general, la aireación incrementó el contenido pigmentario más que la agitación.

Las evoluciones de la saturación de oxígeno y del pH en el medio durante el curso de estos experimentos se muestran en la figura 6. Desde niveles iniciales de 90% a 100%, los niveles de saturación de oxígeno pronto cayeron a cero en cultivos sin aireación o con aireación débil, mientras que en cultivos sometidos a aireación fuerte, el oxígeno cayó

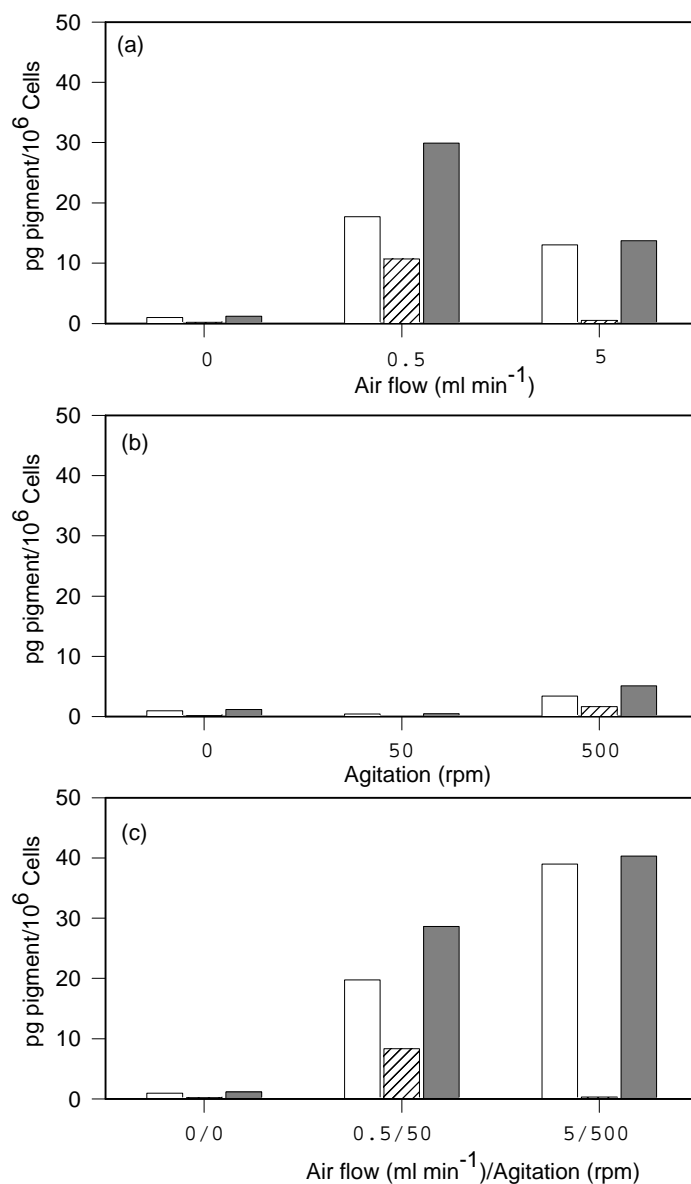


Figure 5. Changes in pigments 1 (white bars) and 2 (hatched bars) (peaks 1 and 2 in the chromatogram of fig. 1) and in the sum of both pigments (dark bar) from *Alteromonas* sp. cells under different treatments with aeration and/or agitation: **(a)** aeration, **(b)** agitation, and **(c)** aeration + agitation.

Figura 5. Cambios en los pigmentos 1 (blanco) y 2 (rayado) (picos 1 y 2 en la fig. 1) y en la suma de ambos pigmentos (sombreado) obtenidos de células de *Alteromonas* sp. bajo diferentes tratamientos de aireación y/o agitación: **(a)** aireación, **(b)** agitación y **(c)** aireación + agitación.

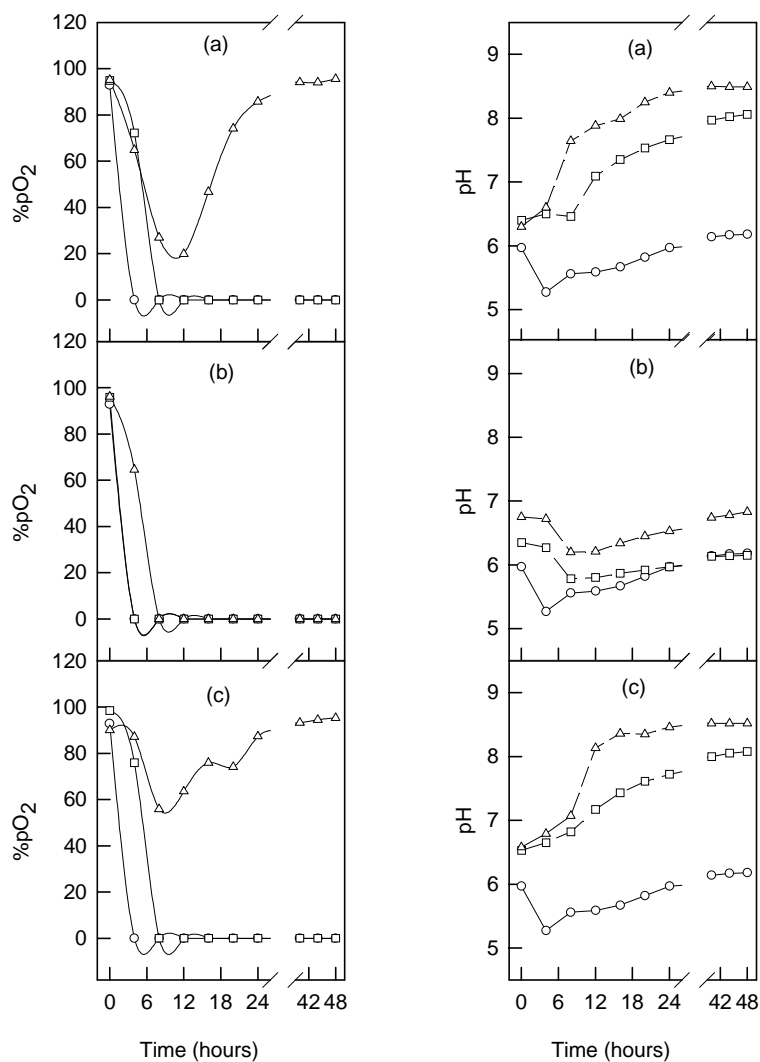


Figure 6. Evolution of oxygen saturation level (left panel) and pH (right panel) in the culture medium during the agitation/aeration treatments. (a) Aeration: circle = control, square = 0.5 mL air min⁻¹, and triangle = 5.0 mL air min⁻¹. (b) Agitation: circle = control, square = 50 rpm, and triangle = 500 rpm. (c) Aeration + agitation: circle = control, square = 0.5 mL air min⁻¹ + 50 rpm, and triangle = 5.0 mL air min⁻¹ + 500 rpm.

Figura 6. Evolución de los niveles de saturación de oxígeno (panel izquierdo) y de pH (panel derecho) en el medio de cultivo durante los tratamientos de agitación/aireación. (a) Aireación: círculo = control, cuadrado = 0.5 mL de aire min⁻¹, y triángulo = 5.0 mL de aire min⁻¹. (b) Agitación: círculo = control, cuadrado = 50 rpm, y triángulo = 500 rpm. (c) Aireación + agitación: círculo = control, cuadrado = 0.5 mL de aire min⁻¹ + 50 rpm, y triángulo = 5.0 mL de aire min⁻¹ + 500 rpm.

seems likely that pigment production by *Alteromonas* cells is related to an enhancement in oxygen concentration. Respiratory capacity has been shown to decrease strongly during the senescence growth phase as compared with that during the exponential growth phase (Packard *et al.*, 1996), and Kjeldgaard (1963) pointed out that biosynthetic abilities diminish with the growth rate. Therefore, higher pigment content with culture aging seems to be bound to oxygen oversaturation inside the cell during late growth stages as a consequence of a reduced metabolic capacity and, consequently, sub-optimal substrate metabolization. Otherwise, since one of the known mechanisms of dissolved organic removal implies hydroxylation of substrate in cell membrane lipid through the action of membrane bound oxygenases (Button, 1994), the observed differences in pigment content between the cultures fed with glucose and with citrate suggest that pigment formation could be related to substrate intake. Indeed, cultures in solid medium also exhibited deep reddish coloration after seven days of growth.

Molecular oxygen may inhibit nutrient metabolization and oxidize membrane lipids (Krieg and Hoffman, 1986; Fay, 1992; Paerl and Pinckney, 1996); consequently, survival in the aquatic environment may rely on the ability to ameliorate the harmful potentialities of oxic conditions. Indeed, the function of non-photosynthetic pigments seems to be defense against oxidants and free radicals (Harwood and Russell, 1984; Margalith, 1992). So, taking into account that bacteria associated with microalgae may have to cope with excessive oxic conditions due to oxygen released in photosynthesis, the red pigment could be the result of a mechanism to avoid a possible damage from those oxic conditions, either as a direct agent or as a secondary metabolite.

In conclusion, our results show that the red pigment production by *Alteromonas* sp. (strain

inicialmente pero se incrementó hasta cerca de 90% de saturación tras prolongarse el tratamiento. En cultivos sin aireación, los valores de pH siempre se mantuvieron por debajo de 7 durante el periodo experimental, al igual que en los cultivos control, mientras que los valores de pH se incrementaron gradualmente hasta cerca de 8.0 en cultivos con aireación.

DISCUSIÓN

A pesar de que existe un número importante de informes acerca de especies del género *Alteromonas* aisladas a partir de muestras de agua de mar natural, pocos trabajos se ocupan de especies del citado género que crezcan en cultivos microalgales de laboratorio. Además, existe poca información acerca de los pigmentos producidos por *Alteromonas*, a excepción de la prodigiosina, la violaceína y la melanina (Harwood y Russell, 1984; Margalith, 1992). También se ha citado la presencia de pigmentos no carotenoides sin identificar en *A. citrea* y *A. aurantia* (Gauthier y Breittmayer, 1979). En este estudio se muestran las características espectrofotométricas y cromatográficas de los pigmentos mayoritarios para *Alteromonas* sp., si bien no coinciden con ninguno de los descritos en la bibliografía y no han podido ser identificados. Las similitudes entre los pigmentos 1 y 2, por un lado, y entre los pigmentos 3 y 4, por otro, sugieren que podrían estar relacionados químicamente y, tal vez, biosintéticamente.

Cuando se elevaron los niveles de oxígeno del medio se incrementó la producción de pigmento rojo, mientras que su contenido decreció cuando se retiró el oxígeno del medio mediante burbujeo con nitrógeno. Así, parece que la producción de pigmentos por *Alteromonas* está relacionada con un incremento de la concentración de oxígeno. Se ha observado un fuerte detrimento de la capacidad respiratoria durante la fase de envejecimiento en comparación

CECT 4800) depends upon the oxygen concentration in the medium, which leads to enhanced production with culture aging. Therefore, pigment formation is interpreted in terms of deficiencies during substrate metabolization and/or uptake. On the other hand, the red pigment could be involved in a protective mechanism against excessive oxic conditions. Elucidation of its chemical structure by means of instrumental analysis techniques may help to clarify this issue; however, one of the main problems that we encountered is the achievement of the purity grade necessary to accomplish these analyses.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by the Agriculture and Fisheries Regional Council (Junta de Andalucía) in a collaboration program with the Spanish Council of Scientific Research (CSIC).

REFERENCES

- Andrykovitch, G. and Marx, Y. (1988). Isolation of a new polysaccharide-digesting bacterium from salt marsh. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54: 1061–1062.
- Austin, B. (1988). *Marine Microbiology*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, 222 pp.
- Ballester, M., Ballester, J.M. and Belaich, J.P. (1977). Isolation and characterization of a high molecular weight antibiotic produced by a marine bacterium. *Microbial Ecol.*, 3: 289–303.
- Baumann, P., Gauthier, M.J. and Baumann, L. (1984). Genus *Alteromonas*. In: N.R. Krieg and J.G. Holt (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 342–352.
- Bell, W.H. (1983). Bacterial utilization of algal extracellular products. 3. The specificity of algal-bacterial interaction. *Limnol. Oceanogr.*, 28: 1131–1143.
- Berland, B.R., Bonin, D.J. and Maestrini, S.Y. (1970). Study of bacteria associated with marine con la que se mide durante la fase exponencial de crecimiento (Packard *et al.*, 1996), y Kjeldgaard (1963) ya apuntó que las capacidades biosintéticas disminuyen con la tasa de crecimiento. Por lo tanto, contenidos más altos de pigmentos parecen estar ligados a una sobresaturación de oxígeno dentro de la célula durante las fases más tardías de crecimiento como consecuencia de una capacidad metabólica reducida y, consecuentemente, una metabolización subóptima de los substratos. Por otra parte, ya que uno de los mecanismos conocidos para la eliminación de compuestos orgánicos disueltos implica la hidroxilación de los substratos en los lípidos de la membrana celular mediante la acción de las oxigenasas ligadas a membrana (Button, 1994), las diferencias observadas en los contenidos pigmentarios entre los cultivos suplementados con citrato y con glucosa, así como las diferencias encontradas entre los cultivos suplementados y carentes de hierro sugieren que la producción de pigmentos puede estar relacionado con la incorporación de los substratos. De hecho, cultivos en medio sólido también mostraron una intensa coloración roja tras siete días de crecimiento.
- El oxígeno molecular puede inhibir el metabolismo de nutrientes y oxidar los lípidos de membrana (Krieg y Hoffman, 1986; Fay, 1992; Paerl y Pinckney, 1996), de modo que la supervivencia en el medio acuático podría estar relacionada con la capacidad para atenuar la toxicidad potencial de las condiciones óxicas. De hecho, la función de los pigmentos no fotosintéticos parece ser la defensa contra oxidantes y radicales libres (Harwood y Russell, 1984; Margalith, 1992). Así, teniendo en cuenta que las bacterias asociadas con microalgas podrían tener que enfrentarse a unas condiciones óxicas excesivas debidas al aporte de oxígeno fotosintético, el pigmento rojo podría ser el resultado de un mecanismo encaminado a prevenir un posible daño causado por la sobresaturación de oxígeno, bien

- algae in culture. III. Organic substrates supporting growth. *Mar. Biol.*, 5: 68–76.
- Buck, J.D. (1979). The plate count in aquatic microbiology. In: S.W. Costerton and R.R. Colwell (eds.), *Native Aquatic Bacteria: Enumeration, Activity and Ecology*. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp. 19–28.
- Button, D.K. (1994). The physical base of marine bacterial ecology. *Microbial Ecol.*, 28: 273–285.
- Caldwell, D.E. (1977). The planktonic microflora of lakes. In: A. Laskin and H. Le Chevalier (eds.), *CRC Critical Reviews in Microbiology*. CRC Press, Cleveland, pp. 305–370.
- Escher, A. and Characklis, W.G. (1982). Algal-bacterial interactions within aggregates. *Biotechnol. Bioeng.*, XXIV: 2283–2290.
- Fay, P. (1992). Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. *Microbiol. Rev.*, 54: 340–373.
- Fitzsimons, A.G. and Smith, R.V. (1984). The isolation and growth of axenic cultures of planktonic blue-green algae. *Brit. Phycol. J.*, 19: 157–162.
- Gauthier, M.J. (1976). Morphological, physiological, and biochemical characteristics of some violet-pigmented bacteria isolated from seawater. *Can. J. Microbiol.*, 22: 138–149.
- Gauthier, M.J. and Flateau, G.N. (1976). Antibacterial activity of marine violet-pigmented *Alteromonas* with special reference to the production of brominated compounds. *Can. J. Microbiol.*, 22: 1612–1619.
- Gauthier, M.J. and Breittmayer, V.A. (1979). The genera *Alteromonas* and *Marinomonas*. In: M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Truper, A. Balows and H.G. Shlegel (eds.), *The Prokaryotes*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 3046–3070.
- Gerber, N.N. and Gauthier, M.J. (1979). New prodigiosin-like pigment from *Alteromonas rubra*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 37: 1176–1179.
- González-del Valle, M.A. (1997). Caracterización y crecimiento de las poblaciones bacterianas asociadas a cultivos de microalgas marinas. Producción de compuestos de potencial interés. Tesis de doctorado, Universidad de Sevilla, Sevilla, España, 159 pp.
- como agente principal o como un metabolito secundario.
- En conclusión, nuestros resultados muestran que la producción de pigmento rojo por *Alteromonas* sp. (cepa CECT 4800) depende de la concentración de oxígeno en el medio, lo que lleva a un incremento de la producción con el envejecimiento del cultivo. Por lo tanto, la formación de pigmento rojo es interpretada en términos de deficiencias durante la metabolización o incorporación del sustrato. Por otra parte, el pigmento rojo podría estar involucrado en un mecanismo protector contra condiciones óxicas excesivas. La determinación de su estructura química mediante técnicas de análisis instrumental puede ayudar a clarificar estas cuestiones, si bien uno de los problemas principales que hemos encontrado es la obtención del grado de pureza necesaria para realizar estos análisis.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por la Consejería Regional de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía (España), en un programa de colaboración con el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Traducido al español por los autores.

-
- Harwood, J.L. and Russell, N.J. (1984). *Lipids in Plants and Microbes*. George Allen & Unwin, London, 162 pp.
- Jones, A.K. (1982). The interaction of algae and bacteria. In: A.T. Bull and J.H. Slater (eds.), *Microbial Interactions and Communities*. Academic Press, New York, pp. 189–247.
- Kjeldgaard, N.O. (1963). Endogenous metabolism with special reference to bacteria. *Annual N.Y. Acad. Sci.*, 102: 515–793.
- Krieg, N.R. and Hoffman, P.S. (1986). Microaerophily and oxygen toxicity. *Annual Rev. Microbiol.*, 40: 107–130.

- Lemos, M.L., Toranzo, A.E. and Barja, J.L. (1985). Antibiotic activity of epiphytic bacteria isolated from intertidal seaweeds. *Microbial Ecol.*, 11: 149–163.
- Margalith, P.Z. (1992). *Pigment Microbiology*. Chapman and Hall, London, 156 pp.
- Marshall, K.C. (1989). Cyanobacterial-heterotrophic bacteria interactions. In: Y. Cohen and E. Rosenberg (eds.), *Microbial Mats: Physiological Ecology of Benthic Microbial Communities*. American Society of Microbiology, Washington DC, pp. 239–245.
- Mínguez-Mosquera, M.I., Gandul-Rojas, B. and Gallardo-Guerrero, M.L. (1992). Rapid method of quantification of chlorophylls and carotenoids in virgin olive oil by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 40: 60–63.
- Mouget, J.L., Dakhama, A., Lavoie, M.C. and de la Noüe, J. (1995). Algal growth enhancement by bacteria: Is consumption of photosynthetic oxygen involved? *FEMS Microbiol. Ecol.*, 18: 35–44.
- Packard, T.T., Berdalet, E., Blasco, D., Roy, S.O., St-Amand, L., Lagacé, B., Lee, K. and Gagné, J.-P. (1996). Oxygen consumption in the marine bacterium *Pseudomonas nautica* predicted from ETS activity and bisubstrate enzyme kinetics. *J. Plankton Res.*, 18: 1819–1835.
- Paerl, H.W. and Pinckney, J.L. (1996). A mini-review of microbial consortia: their roles in aquatic production and biogeochemical cycling. *Microbial Ecol.*, 31: 225–247.
- Reid, T.R., Live, D.H., Faulkner, D.J. and Butler, A. (1993). A siderophore from a marine bacterium with an exceptional ferric ion affinity constant. *Nature*, 366: 455–458.
- Riquelme, M. (1996). Fungal siderophores in plant-microbe interactions. *Microbiología SEM*, 12: 537–546.
- Solano, F., García, E., Pérez de Egea, E. and Sánchez-Amat, A. (1997). Isolation and characterization of strain MMB-1 (CECT 4803), a novel melanogenic marine bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(9): 3499–3506.
- Sundh, I. (1992). Biochemical composition of dissolved organic carbon derived from phytoplankton and used by heterotrophic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 2938–2947.
- Tranvik, L.J. (1990). Bacterioplankton growth on fractions of dissolved organic carbon of different molecular weights from humic and clear waters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 1672–1677.
- Wratten, S.J., Wolfe, M.S., Anderson, R.J. and Faulkner, D.J. (1977). Antibiotic metabolites from a marine pseudomonad. *Antimicrobial Agents Chemother.*, 11: 411–414.