

Centro de Investigación Científica y de Educación  
Superior de Ensenada, Baja California



---

**Maestría en Ciencias  
en Ecología Marina**

---

**Extracción, absorción *in vivo* y monitoreo de cultivos de pico y  
nano plancton con ficobiliproteínas acondicionados a  
diferentes espectros de luz**

Tesis  
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias

Presenta:

**Esperanza Guadalupe Valdez Silva**

Ensenada, Baja California, México  
2019

Tesis defendida por  
**Esperanza Guadalupe Valdez Silva**

y aprobada por el siguiente Comité

---

**Dr. Helmut Maske Rubach**  
Director de tesis

Miembros del comité  
**Dra. Mary Carmen Ruiz de la Torre**

**Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez**

**Dr. Ernesto García Mendoza**



---

**Dr. Jorge Adrián Rosales Casián**  
Coordinador del Posgrado en Ecología Marina

---

**Dra. Rufina Hernández Martínez**  
Directora de Estudios de Posgrado

*Esperanza Guadalupe Valdez Silva © 2019*

*Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.*

Resumen de la tesis que presenta **Esperanza Guadalupe Valdez Silva** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ecología Marina.

**Extracción, absorción *in vivo* y monitoreo de cultivos de pico y nano plancton con ficobiliproteínas acondicionados a diferentes espectros de luz**

Resumen aprobado por:

---

Dr. Helmut Maske Rubach  
**Director de tesis**

Las cianobacterias marinas son un grupo abundante de fitoplancton importante ecológicamente en el océano debido a su contribución fototrófica. El rasgo característico de este organismo procarionte son las ficobiliproteínas (FBP), pigmentos fotosintéticos poco comunes en el océano. La importancia de FBP como pigmentos accesorios fotosintéticos, es su carácter espectral, dado que cubre un nicho espectral poco ocupado por pigmentos apolares. Asimismo, confieren una ventaja ecológica ya que las cianobacterias tienen la habilidad de cambiar la composición de FBP para adaptarse cromáticamente. Existen varios métodos que han sido reportados para la cuantificación y análisis de las FBP de cultivos en laboratorio, sin embargo, todos difieren entre sí y no hay un protocolo publicado para la medición fotométrica de FBP de cianobacterias en el océano. En este trabajo se ha buscado documentar cambios en la composición de FBP de cultivos de la cianobacteria *Synechococcus* mediante diferentes condiciones de crecimiento, luz de distintos colores e intensidades, utilizando diferentes métodos de medición de espectros fotométricos *in vivo* e *in vitro*. Asimismo, se ha estudiado como optimizar la eficiencia de extracción de FBP, lo que resulto en un método que aún requiere investigación para su optimización. Los experimentos con cultivos bajo diferentes irradiancias ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) mostraron tasas de crecimiento similares entre intensidades Radiación Fotosintéticamente activa (PAR) semejantes pero distintos colores: azul (510 nm) y verde (520 nm). El color naranja no favoreció el crecimiento de manera eficiente. Los espectros de extractos de FBP (*in vitro*) presentaron un coeficiente de absorción menor que los espectros *in vivo*. Una posible interpretación de la diferencia entre espectros *in vivo* e *in vitro* es que la extracción aún no es suficientemente eficiente, en consecuencia, el método aún requiere trabajo experimental para ser utilizado en muestras oceánicas.

**Palabras clave:** Ficobiliproteínas, cianobacterias, *Synechococcus*, absorción *in vitro*, absorción *in vivo*.

Abstract of the thesis presented by **Esperanza Guadalupe Valdez Silva** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Marine Ecology.

**Extraction, *in vivo* absorption and monitoring of pico and nano plankton culture containing phycobiliproteins conditioned to different light spectrums.**

Abstract approved by:

---

Dr. Helmut Maske Rubach  
Thesis Director

Cyanobacteria are an abundant group of ocean phytoplankton that contribute strongly to marine phototrophic production. The characteristic trait of this prokaryote organism are its photosynthetic accessory pigments, the phycobiliproteins (PBPs). PBPs are polar photosynthetic accessory pigments that are restricted to only a couple of phytoplankton groups, and their spectral character cover a spectral niche scarcely included by nonpolar pigments. PBPs also confer an ecological advantage since cyanobacteria have the ability to adapt chromatically by changing the cellular composition of PBPs. There are several methods that have been reported for the quantification and analysis of PBPs from laboratory cultures, however, they all differ from each other and there is no published protocol for the photometric measurement of PBPs of cyanobacteria in the ocean. This project has sought to document changes in the composition of PBPs in cultures of the cyanobacteria *Synechococcus* spec. through different growing conditions, light of different colors and intensities, utilizing different measurement methods of *in vivo* and *in vitro* photometric spectra. I intended to optimize the PBPs extraction efficiency, but the method still needs further development to optimize extraction efficiency. The cultures under different irradiances growth conditions showed similar growth rates for different colors (blue and green) and the same photosynthetic active radiation (PAR,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) except for orange irradiance that did not support growth. The spectra of PBP extracts (*in vitro*) had a lower absorption coefficient than *in vivo* spectra. A possible interpretation of the difference between *in vivo* and *in vitro* spectra is that extraction is not yet sufficiently efficient, but other explanations are possible however they need further research.

**Keywords:** phycobiliproteins, cyanobacteria, *Synechococcus*, *in vitro* absorption, *in vivo* absorption.

## Dedicatoria

*Por impulsarme a ser mejor, porque son mi más  
grande admiración, por creer en mí*

*A mis padres*

## Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico en la beca otorgada.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) por permitirme realizar mi posgrado en su institución.

Al Consejo de Programa de Posgrado en Ecología Marina y al Departamento de Oceanografía Biológica por el apoyo económico y logístico otorgados durante la realización de esta tesis.

A los miembros del laboratorio de Biología Algal y Ficotox de CICESE, por su tiempo y apoyo con los perfiles pigmentarios.

A los miembros del laboratorio de Ecología Pesquera de CICESE, particularmente a Carmen, por permitirme hacer uso de la máquina de hielo, por aguantar el sonido y ser pacientes.

Al personal del Departamento de Embarcaciones Oceanográficas de CICESE, particularmente a Ricardo, por su paciencia, tiempo y permitirme trabajar en su espacio.

A los miembros del laboratorio de Ecología de Microbios Marinos (MICMAR), por su apoyo y continua retroalimentación, por contribuir en mi desarrollo profesional. En particular a Cesar, por estar siempre pendiente y compartir sus experiencias.

A mis sinodales, Dra. Mary Carmen Ruiz de la Torre, Dr. Ernesto García y Dra. Rosa R. Mouriño. Por sus consejos, tiempo y contribuciones a lo largo de este proceso.

A mi mentor, Dr. Helmut Maske Rubach, por su paciencia, enseñanzas y consejos, por compartir sus experiencias, por permitirme aprender de usted y transmitirme su pasión por la ciencia. Gracias por contribuir en mi formación como científica.

A mis profesores de la maestría, por contribuir en mi desarrollo profesional y compartir su conocimiento.

A mis amigos y compañeros de CICESE, por los buenos momentos, por el apoyo, por ser parte de esta experiencia.

Al equipo de baloncesto de CICESE, en especial al equipo femenino y a los coaches. Gracias por escucharme, por las risas, por cada partido y entrenamiento, por hacer mucho más ameno este proceso.

A Paola, Adolfo, Ernesto, Diana, Daniela y Javier porque cada uno contribuyo en su propia y única forma, porque me brindaron consejos, apoyo y compañía. Gracias por el cariño y amistad.

A Ale, Juls, Maricza y Linda por estar para mí en todo momento, por su amistad y buenos consejos.

A Jaime, por su apoyo y cariño incondicional, por estar en todo momento. Por impulsarme en cada pequeña traba y ser mi sostén cada día. Porque a tu lado todo es una grata aventura.

Finalmente, a mi familia por estar siempre presente, apoyarme y aconsejarme. A mis padres por su esfuerzo, consejos, y confianza, por creer en mí. A mis hermanos por inspirarme a crecer y ser mejor.

## Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas.....	xii
<b>Capítulo 1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1 Introducción general.....	1
1.2 Antecedentes.....	3
1.2.1 Antecedentes de metodologías para la extracción de FBP.....	3
1.3 Hipótesis .....	7
1.4 Objetivos .....	7
1.4.1 Objetivos general .....	7
1.4.2 Objetivos específicos .....	7
<b>Capítulo 2. Metodología.....</b>	<b>9</b>
2.1 Calibración del radiómetro Ocean Optics .....	9
2.2 Cultivos y condiciones de crecimiento.....	9
2.2.1 Monitoreo del crecimiento de cultivos.....	10
2.3 Cuantificación de células.....	11
2.4 Descomposición espectral.....	12
2.5 Extracción de Ficobiliproteínas (FBP).....	12
2.5.1 Concentración de la muestra.....	12
2.5.2 Pretratamiento químico.....	13
2.5.3 Rompimiento físico de la célula.....	14
2.5.4 Separación de fracción de FBP.....	15
2.5.4.1 Modificaciones en la separación de fracciones.....	15
2.5.5 Reducción de pigmentos apolares.....	15

2.5.6 Medición de espectro de absorción/Cuantificación.....	15
2.6 Absorción <i>in vivo</i> del cultivo.....	16
2.6.1 Quantitative filter technique usando transmitancia.....	17
2.6.2 Quantitative filter technique usando esfera integradora.....	18
<b>Capítulo 3. Resultados.....</b>	<b>19</b>
3.1 Crecimiento de <i>Synechococcus</i> .....	19
3.1.1 Monitoreo no-destrutivo de cultivos con FoLiPAM .....	19
3.1.2 Tasas de crecimiento bajo diferentes condiciones de luz .....	21
3.1.3 Descomposición espectral.....	23
3.2 Extracción de ficobiliproteínas (FBP).....	25
3.2.1 Concentración de muestra por filtración.....	26
3.2.2 Extracción química de FBP.....	27
3.2.2.1 Aplicación de diferentes condiciones de EDTA y enzimas.....	27
3.2.3 Tratamiento con solventes orgánicos post-extracción.....	30
3.3 Comparación entre espectros de absorción <i>in vivo</i> en espectrofotómetro, esfera integradora (Ulbrich) y FoLiPAM .....	32
3.4 Comparación entre espectros de absorción <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> (extractos).....	33
<b>Capítulo 4. Discusión.....</b>	<b>36</b>
4.1 Serie de tiempo de espectros de pigmentos con FoLiPAM: tasa de crecimiento para diferentes pigmentos. ....	38
4.2 Descomposición espectral para identificación de picos de pigmentos.....	39
4.3 Aspectos metodológicos en la extracción de FBP.....	40
4.4 Relación entre espectros de absorción <i>in vivo</i> en espectrofotómetro, esfera integradora (Ulbrich) y FoLiPAM.....	42
4.5 Contribución de las FBP en espectros de absorción de pigmentos <i>in vivo</i> .....	43
<b>Capítulo 5. Conclusiones.....</b>	<b>44</b>

<b>Literatura citada</b> .....	45
<b>Anexos</b> .....	49
Anexo A. Diferentes métodos reportados de extracción de FBP en pico y nano-plancton.....	49
Anexo B. Máximos de absorción y FWHM para diferentes pigmentos encontrados en cianobacterias y reportados en la literatura.....	51
Anexo C. Máximos de absorción de pigmentos medidos en FoLiPAM, espectrofotómetro y esfera integradora.....	53
Anexo D. Concentraciones de EDTA, Lisozima y mutanolisina reportado en la literatura para extracciones de ADN y de pigmentos de diferentes organismos.....	54

## Lista de figuras

Figura	Página
1 Medición de la absorción <i>in vitro</i> de FBP, procedimiento para la extracción de FBP de cianobacterias del género <i>Synechococcus</i> . Modificado de Valdez-Silva (2017).....	5
2 Incubadoras individuales para cada color de LEDs con sus respectivos frascos Falcon. a) incubadoras de cultivos bajo LEDs 520 nm y b) 455 nm, c) Representación de incubadoras en bosquejo elaborado en programa Sketchup®: espejos laterales (1), espejo inferior (2), espejo superior (3), base de LEDs (4), frasco de cultivo (5), la estructura se cubre con otro espejo para homogenizar el campo de luz en cada cámara de incubación.....	10
3 Diagrama con el proceso general para la cuantificación y extracción de ficobiliproteínas de cianobacterias del género <i>Synechococcus</i> .....	12
4 Representación de configuración de medición de muestras <i>in vivo</i> para determinar la densidad optica. a) medición de transmitancia en espectrofotómetro convencional (T-mode) y b) método de esfera integradora con la muestra en el centro de la esfera (IS-mode). Flechas negras representan haz de luz esparcido, flecha blanca haz de luz incidente y triangulo gris detector. Modificado de Boss <i>et al.</i> (2018).....	17
5 Espectros de absorción <i>in vivo</i> de cultivos crecidos en incubadoras con LEDs de 520 nm a diferentes irradiancias y medidos en suspensión con FoLiPAM. La escala de colores muestra el transcurso de los últimos 5 días de monitoreo, siendo el color más oscuro el último día. (diferentes escalas en gráficos). a) Espectros de absorción de cultivos crecidos con flujo de fotones de $13 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . b) Espectros de absorción de cultivos crecidos con flujo de fotones de $3.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .....	20
6 Espectros de absorción <i>in vivo</i> de cultivos crecidos en incubadoras con LEDs de 510 nm a diferentes irradiancias y medidos en suspensión con FoLiPAM. La escala de colores muestra el transcurso de los últimos 5 días de monitoreo, siendo el color más oscuro el último día. (diferentes escalas en gráficos). a) Espectros de absorción de cultivos crecidos con flujo de fotones de $13 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . b) Espectros de absorción de cultivos crecidos con flujo de fotones de $3.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .....	20
7 Cinética de crecimiento con base al máximo de absorción de la clorofila <i>a</i> a 676 nm de mediciones <i>in vivo</i> con FoLiPAM de cultivos crecidos en incubadoras con LEDs de 510 nm a irradiancias de a) $13 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y b) $3.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Coeficiente de	

	absorción ( $m^{-1}$ ) de la clorofila <i>a</i> a 676 nm (circulo) y modelo de los datos de clorofila <i>a</i> a 676 nm con línea base (línea negra) (diferentes escalas en gráficos).....	21
8	Cinética de crecimiento con base al máximo de absorción de la FBP ficoeritrobilina 545 nm de mediciones <i>in vivo</i> con FoLiPAM de cultivos crecidos en incubadoras con LEDs de 520 nm a irradiancias de a) $13 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ y b) $3.8 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ . Coeficiente de absorción ( $m^{-1}$ ) de la clorofila <i>a</i> a 676 nm (circulo) y modelo de los datos de ficoeritrobilina con línea base (línea negra) (diferentes escalas en gráficos).....	22
9	Tasas de crecimiento ( $\mu$ ) con base a los máximos de absorción de la clorofila <i>a</i> a 676 y la FBP ficoeritrobilina 545 nm de mediciones <i>in vivo</i> con FoLiPAM de cultivos crecidos en incubadoras con LEDs de 520 nm a irradiancias altas Regresión lineal tipo 2: $\mu_{Clorofila} = 1.05 \mu_{ficoeritobilina} - 0.01$ , $R^2 = 0.99$ .....	22
10	Descomposición espectral de cultivo incubado a alta irradiancia en LEDs 520 nm y medido en suspensión en dispositivo FoLiPAM.....	23
11	Descomposición espectral de cultivo incubado a alta irradiancia en LEDs 520 nm y medido en filtro en espectrofotómetro.....	24
12	Descomposición espectral de cultivo incubado a alta irradiancia en LEDs 520 nm y medido en filtro en esfera integradora.....	25
13	Espectros de absorción de extractos de muestras colectadas con diferentes tipos de filtro, Durapore (T1, línea punteada) y GF/F (T2, línea continua). Se muestran los extractos antes de filtrar (línea negra) y después de ser filtrado (línea gris). El cultivo de la muestra tenía $6.12 \times 10^6$ células $mL^{-1}$ .....	26
14	Espectros de absorción de extractos de muestras con diferente temperatura de incubación de la lisozima. Incubación a temperatura ambiente (T1, línea punteada) y a $37^\circ C$ (T2, línea continua). Se muestra el extracto antes de filtrar (línea negra) y después de ser filtrado (línea gris). El cultivo de la muestra tenía $2.223 \times 10^7$ células $mL^{-1}$ .....	29
15	Espectros de absorción de extractos de muestras con diferente tiempo de incubación de la lisozima a $37^\circ C$ , variando de 30 min (Tratamiento uno, línea punteada) y de 60 min (Tratamiento dos, línea continua). Se muestra el extracto antes de filtrar (línea negra) y después de ser filtrado (línea gris). El cultivo de la muestra tenía $2.31 \times 10^7$ células $mL^{-1}$ .....	29
16	Espectros de absorción de extractos de muestras sin mutanolisina (línea negra) y con mutanolisina (línea gris). A su vez, se muestra el extracto después de ser filtrado para ambos tratamientos (líneas punteadas). El cultivo de la muestra tenía $1.64 \times 10^8$ células $mL^{-1}$ .....	30

17	Espectros de absorción de extractos de muestras tratadas con solventes orgánicos. La línea gris continua corresponde a la disolución tratada con propanol y la gris punteada con octanol. Asimismo, se muestra el extracto antes de filtrar (línea negra) y después de ser filtrado (línea gris). El cultivo de la muestra tenía $1.64 \times 10^7$ células $\text{mL}^{-1}$ .....	31
18	Espectros de absorción <i>in vivo</i> de cultivos crecidos en LEDs de 520 nm a alta irradiancia ( $13 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) medidos en suspensión con FoLiPAM (línea negra continua), y filtrados y medidos con espectrofotómetro (línea gris continua), y esfera integradora (línea negra punteada).....	32
19	Espectros de absorción <i>in vivo</i> de cultivos crecidos en LEDs de 510 nm a alta irradiancia ( $13 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) medidos en suspensión con FoLiPAM (línea negra continua), y filtrados y medidos con espectrofotómetro (línea gris continua), y esfera integradora (línea negra punteada).....	33
20	Espectros de absorción <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> (extracto de FBP) de cultivos crecidos en LEDs de 520 nm a baja irradiancia ( $3.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). a) Réplicas de mediciones <i>in vivo</i> medidos en suspensión con FoLiPAM (línea negra), y filtrados y medidos con espectrofotómetro (línea gris), y esfera integradora (línea negra punteada). b) Espectros de pigmentos extraídos sin mutanolisina (Tratamiento uno, línea negra) y con mutanolisina (Tratamiento dos, línea gris). A su vez, se muestra el extracto después de ser filtrado para ambos tratamientos (líneas punteadas). Los espectros <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> son corregidos por línea base.....	34
21	Espectros de absorción <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> (extracto acetona) de cultivos crecidos con luz de LEDs de 520 nm a baja irradiancia ( $3.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). a) Espectros de absorción <i>in vivo</i> medidos en suspensión con FoLiPAM (línea negra), y filtrados y medidos con espectrofotómetro (línea gris), y esfera integradora (línea negra punteada). b) Espectros absorción <i>in vitro</i> de pigmentos extraídos con acetona al 90%. Los espectros <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> son corregidos por línea base.....	35

## Lista de tablas

Tabla		Página
1	Diferentes métodos reportados de extracción de FBP en cianobacterias.....	49
2	Máximos de absorción y FWHM para diferentes pigmentos encontrados en cianobacterias y reportados en la literatura.....	51
3	Máximos de absorción de pigmentos medidos en FoLiPAM, espectrofotómetro y esfera integradora.....	53
4	Concentraciones de EDTA, Lisozima y mutanolisina reportado en la literatura para extracciones de ADN y de pigmentos de diferentes organismos.....	54

# Capítulo 1. Introducción

---

## 1.1 Introducción general

Las cianobacterias son reconocidas por su amplia distribución y por contribuir significativamente en la biomasa total de carbono y en la productividad primaria de los océanos (Ting *et al.*, 2002; Waterbury *et al.*, 1979). Dentro del conjunto de cianobacterias de importancia ecológica en el océano, se encuentra el género unicelular *Synechococcus* con algunas especies con la capacidad de reducir el gas nitrógeno. *Synechococcus* contribuye aproximadamente con el 16% de la producción primaria global (Flombaum *et al.*, 2013), se encuentran principalmente en la zona eufótica de todos los océanos y a baja intensidad de luz en donde presenta abundancias típicas de  $10^3$  a  $10^4$  células por mililitro (mL) y diámetros de 1.0 – 1.4  $\mu\text{m}$  (Carr y Mann, 1994; Partensky *et al.*, 1999).

El éxito ecológico de dicha picocianobacteria es atribuido a una variedad de estrategias que les permiten adaptarse a cambios en el ambiente, dentro de las cuales han desarrollado la capacidad de utilizar un rango espectral de luz poco aprovechado por otro fitoplancton, más específicamente la luz verde (~500-550 nm) que domina en el fondo de la zona eufótica, por medio de la síntesis de ficobiliproteínas (FBP) (Carr y Mann, 1994; Sanfilippo *et al.*, 2016; Sidler, 1994). A su vez, su tamaño y metabolismo le proporcionan ventajas para su desarrollo en condiciones de bajas concentraciones de nutrientes.

Por otro lado las cianobacterias cuentan con una pared celular de tipo Gram-negativa, pero con una estructura de peptidoglicano considerablemente más gruesa (~10 nm) que la de *Proteobacterias* Gram-negativas (Castenholz, 2015). Además, el peptidoglicano de las cianobacterias es complejo con enlaces altamente entrecruzados y polisacáridos específicos, de una manera similar al peptidoglicano de las bacterias Gram-positivas (Hoiczky y Hansel, 2000). Es por ello que el mayor obstáculo para la lisis celular de cianobacterias es la resistencia de su pared celular. La estructura de la pared celular influye en la ecofisiología de las cianobacterias y tiene repercusiones en las extracciones del contenido celular (Mehta *et al.*, 2015).

Las cianobacterias han desarrollado un sistema de captación de luz complejo conformado de FBP. Hay una variedad de FBP con estructura protéica y composición de cromóforo variables que en conjunto definen las propiedades ópticas que permiten una variedad de FBP. La variedad espectral de FBP ha permitido que cianobacterias colonicen ambientes muy diversos en calidad y cantidad de luz. Las FBP son pigmentos accesorios fotosintéticos importantes, dado que su carácter espectral cubre un nicho espectral poco

ocupado por pigmentos apolares y por su habilidad para adaptarse cromáticamente, lo cual confiere una ventaja ecológica. La producción de FBP permite aprovechar al máximo la luz disponible para la fotosíntesis en la columna de agua mediante una mayor absorción efectiva dado que utilizan longitudes de onda que son poco utilizadas por la clorofilas o carotenoides (Bogorad, 1975; MacColl, 1998; Tandeau de Marsac, 1977). Las FBP son un grupo de pigmentos sintetizados por cianobacterias, criptofitas y algunas algas rojas y sirven como antenas ópticas para la fotosíntesis.

FBP son distintas de otros pigmentos fotosintéticos por su carácter polar, y el rango espectral que cubren (495 a 655 nm) (Abalde *et al.*, 1998; Alberte *et al.*, 1984b; Apt *et al.*, 1995; Bogorad, 1975; Tandeau de Marsac, 1977). Son componentes del aparato captador de luz del fotosistema II, el ficobilisoma, un complejo supramolecular asociado a la superficie de la membrana tilacoide. El ficobilisoma se compone de FBP: agregados de proteínas solubles en agua unidas en forma covalente con cromóforos. El ficobilisoma de la cianobacteria de mar abierto *Synechococcus* es uno de los más complejos, ya que posee cuatro tipos de FBP. Basado en sus propiedades espectrales y su posición en los ficobilisomas, las FBP se dividen en tres clases: ficocianina (FC), aloficocianina (AFC) y ficoeritrina (FE). La FC y AFC se conocen como los pigmentos azules, y su máxima espectral de absorción se presenta a longitudes de onda largas de 610-620 y 650-655 nm respectivamente. Mientras que FE, se le denomina pigmento rojo y muestra su máxima absorbancia de luz a longitudes de onda menores, de 495 y 545-570 nm. Las FBP de la cianobacteria *Synechococcus* presentan dos tipos FE en el ficobilisoma FE (I) y FE(II), que se conforman del cromóforo ficorubilina (495-500 nm) y ficoeritrobilina (545-560 nm), las cuales tienen su máxima absorción en la región azul-verde del espectro visible. La gran diversidad de este género de cianobacteria es debido a la variedad de FBP que constituyen el ficobilisoma y de acuerdo a las diferentes combinaciones de las mismas se establecen tres tipos. Por un lado, se encuentran el tipo uno, la cual sólo contienen el pigmento FC y el tipo dos que además de FC también presenta FE(I). Por su parte, el tipo tres se compone de FE(I) y FE(II), y de acuerdo a la proporción de sus cromóforos (ficorubilina y ficoeritrobilina) existen cuatro subtipos. La subdivisión del tipo tres se basa en la razón de la fluorescencia relativa de dichas FBP, obteniendo bajo (3a), medio (3b) o alto (3c). En el cuarto subtipo (3d) pertenecen aquellas células con capacidad de moldear la proporción de FBP en el ficobilisoma de acuerdo a la calidad y cantidad de luz. (Bogorad, 1975; Humily *et al.*, 2013; Ong y Glazer, 1987; Palenik, 2001; Six *et al.*, 2007).

La habilidad de aclimatación del ficobilisoma es un proceso complejo en el que varía la pigmentación en respuesta a la calidad de luz, al cual se le denomina adaptación cromática (MacColl, 1998; Tandeau de Marsac, 1977). La adaptación cromática en cianobacterias consiste en el cambio en la razón de los pigmentos FC a FE, por su parte en el caso la cianobacteria *Synechococcus* que presentan dos tipos FE (FE

(I) y FE(II)) es la variación entre la razón ficorubilina y el cromóforo ficoeritrobilina (MacColl, 1998; Mahmoud *et al.*, 2017; Tandeau de Marsac, 1977).

## 1.2 Antecedentes

Las FBP de cianobacterias han ganado importancia en el sector comercial dado su variedad de aplicaciones. Son utilizadas en la industria de alimentos, biotecnología y cosméticos debido a su color, fluorescencia y propiedades antioxidantes. El uso principal de estas moléculas es la de tinciones naturales *e.g.* la pigmentación de alimentos como remplazo de pigmentos sintéticos, así como en cosméticos como labiales y delineadores. Además, las FBP son ampliamente utilizadas en investigaciones de laboratorios clínicos e inmunológicos ya que fungen como marcadores de anticuerpos, receptores y otras moléculas biológicas para la citometría de flujo y microscopia fluorescente (Gupta y Sainis, 2010; Sekar y Chandramohan, 2008; Viskari y Colyer, 2003).

Las FBP son utilizadas para la medición de biomasa de taxones específicos a través de la estimación de las propiedades de absorción *in vivo* e *in vitro* (Alberte *et al.*, 1984b; Apt *et al.*, 1995; Méléder *et al.*, 2013). La medición de la absorción *in vivo* e *in vitro* de las FBP tiene aplicaciones en la detección e identificación de la composición pigmentaria y estructura de las comunidades, así como en la taxonomía y ecología de las cianobacterias (Apt *et al.*, 1995; Horváth *et al.*, 2013; Lantoine y Neveux, 1997; Lawrenz *et al.*, 2010; Méléder *et al.*, 2013; Tandeau de Marsac, 1977). A su vez, permitirá incorporar a mayor detalle la diversidad fitoplanctónica (picoplancton) en modelos biogeoquímicos oceánicos y la correlación de la reflectancia que define el color del océano con densidades de picoplancton *in situ* y la interpretación de datos sensores remotos (Flombaum *et al.*, 2013; Zimba, 2012).

### 1.2.1 Antecedentes de metodologías para la extracción de FBP

Existen varios métodos que han sido reportados para la cuantificación y análisis de FBP en cultivos de laboratorio ( $10^6$  a  $10^9$  células  $\text{mL}^{-1}$ ) (anexo A), sin embargo, todos difieren entre sí (Horváth *et al.*, 2013; Lantoine y Neveux, 1997; Lawrenz *et al.*, 2010; Sobiechowska-Sasim *et al.*, 2014) Varían desde la técnica de rompimiento de las células y la estimación de las absorbancias, hasta el medio de extracción de los

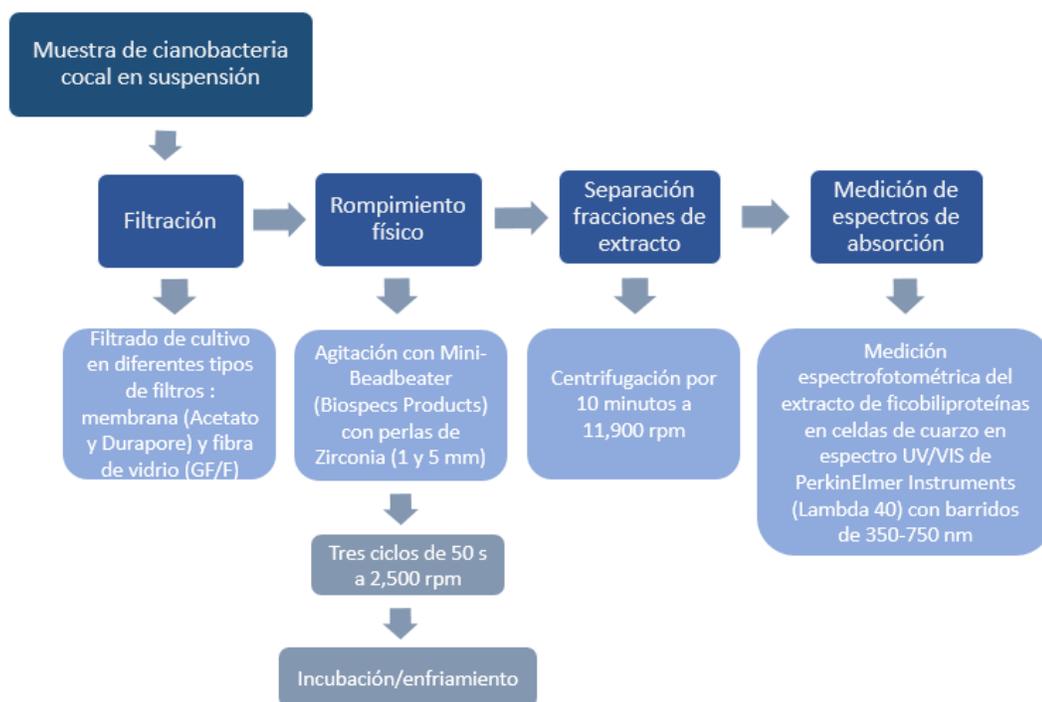
pigmentos. Algunos autores combinan una serie de técnicas como centrifugación, Vortex, congelamiento/descongelamiento y sonicación para ayudar con el rompimiento de las células; emplean buffers de fosfatos, mientras que otros recomiendan el uso de lisozimas o Asolectin-CHAPS. Por otro lado, la estimación de las FBP puede realizarse en espectrofotómetro o fluorómetro (Horváth *et al.*, 2013; Lantoine y Neveux, 1997; Lawrenz *et al.*, 2010; Sobiechowska-Sasim *et al.*, 2014; Viskari y Colyer, 2003; Yacobi *et al.*, 2015; Zimba, 2012). Sin embargo, aunque la fluorometría incrementa la sensibilidad del método de 10 a 100 veces, por ello es usado para muestras oceánicas, los datos fluorométricos tienen la desventaja de no proporcionar una propiedad física absoluta de los FBP porque depende de la eficiencia cuántica bajo las condiciones experimentales específicas. Además, requiere calibraciones del instrumento, a diferencia de un espectrofotómetro, y la calibración del fluorómetro para FBP es compleja, ya que existe una gran variedad de FBP con propiedades ópticas ligeramente diferentes.

No se ha publicado un protocolo para la medición de absorción *in vitro* de FBP de cianobacterias de muestras oceánicas. Por esta razón en oceanografía se usa comúnmente el pigmento zeaxantina como indicador de cianobacterias cocales, a su vez debido a que es fácil detectar en análisis de extractos con solventes orgánicos con HPLC. La zeaxantina no es pigmento específico para *Synechococcus*, sino que existe en concentraciones menores en otros grupos de fitoplancton (Jeffrey *et al.*, 1997).

Los métodos publicados no se prestan con muestras oceánicas por falta de sensibilidad (Lantoine y Neveux, 1997; Viskari y Colyer, 2003). Sobiechowska-Sasim y colaboradores en el 2014 concluyen que su metodología espectrofotométrica no es suficientemente sensible para producir una señal para muestras naturales marinas. Por su parte, Ruiz de la Torre (2007) reporto la falta de un método estándar para la estimación de la concentración de FE de cianobacterias para muestras naturales, a su vez, señala lo difícil de obtener una extracción eficiente dado el tamaño de la célula de cianobacterias y la resistencia de su pared celular.

El objetivo de este trabajo es avanzar en el desarrollo de un protocolo para medición espectrofotométrica de extractos de FBP de muestras del océano pelágico en términos de sensibilidad, precisión, exactitud, rapidez de análisis, manteniendo el costo bajo, de tal forma que pueda ser utilizado de manera rutinaria para el análisis de muestras naturales marinas.

En investigaciones previas se ha trabajado en un método para caracterizar FBP en cianobacterias oceánicas (figura 1) en donde se realizaron mediciones *in vitro* e *in vivo* de FBP en cepas de *Synechococcus*, con concentraciones aproximadas de  $4.7 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup> (Valdez-Silva, 2017).



**Figura 1.** Medición de la absorción *in vitro* de FBP, procedimiento para la extracción de FBP de cianobacterias del género *Synechococcus*. (Modificado de Valdez-Silva, 2017).

Como parte de los resultados se observó que el método permite trabajar con muestras a relativamente bajas concentraciones de cultivos de cianobacterias, sin embargo, aún no se ha definido si es posible aumentar la sensibilidad del método lo suficiente para utilizarlo con muestras oceánicas. A su vez, se compararon diferentes filtros para colecta de muestra: membrana (acetato de celulosa y Durapore) y fibra de vidrio (GF/F). Al comparar la extracción de FBP con filtros de diferente material se observó la presencia de la señal de las FBP en todos los filtros; la absorbancia del extracto de las FBP fue mayor con el filtro de Durapore, a diferencia de aquellas obtenidas por GF/F donde se obtuvo una señal tenue (Valdez-Silva, 2017). En el anexo A, se observa que la mayoría de los autores en sus metodologías utilizan filtros de GF/F para la colecta de muestras. Lawrenz *et al.*, (2010) encontraron que la colecta de muestra por centrifugación resulta en tres veces la concentración de FBP en comparación con muestras filtradas por GF/F. Sin embargo, estos resultados no se corroboraron con los obtenidos en este proyecto, es decir, no se observó diferencias entre diferentes filtros.

Otro aspecto metodológico que se ha identificado como importante en relación al proceso del rompimiento de las células es la proporción adecuada de la combinación de perlas de silicato de zirconio de 0.1  $\mu\text{m}$  y 0.5  $\mu\text{m}$  para el rompimiento físico de las células (Valdez-Silva, 2017). Dentro de las técnicas

para la extracción física de la célula se han reportado el uso de vortex (Sobiechowska-Sasim *et al.*, 2014), congelar-descongelar y sonicación (Lawrenz *et al.*, 2010; Pinto Rodrigues *et al.*, 2018; Zimba, 2012). Con respecto al medio de extracción, es importante mencionar el uso de Buffer de fosfatos como una opción alterna al Asolectin-CHAPS, como lo sugiere Zimba en el 2012 y, Viskari & Colyer en el 2003, aunque en comparación con este último el Buffer de fosfatos presenta ligeramente menor eficiencia, sin embargo, requiere un menor costo y es de fácil manejo.

El método trabajado por Valdez-Silva (2017) se basa en extracción con solvente polar (amortiguador) que excluye en gran parte a los pigmentos apolares (lipofílicos) como clorofilas y carotenoides. Sin embargo, esta separación no es 100% efectiva. Por esta razón, en el extracto se encuentran residuos de los pigmentos apolares, los cuales agregan sus huellas espectrales en la medición. Este problema es más evidente y de mayor magnitud en muestras naturales marinas, donde las cianobacterias constituyen solo una menor fracción de los organismos fotosintéticos (Jeffrey *et al.*, 1997). No obstante, se podrían separar los pigmentos polares de los apolares por fraccionamiento líquido-líquido, tratando el extracto acuoso con solventes orgánicos puesto que no se mezcla con el extracto y al mismo tiempo disuelve los pigmentos apolares. Chalker, Hernandez, & Schneider en el 2018 documentaron la extracción de clorofila y Ficocianina de las cianobacterias de agua dulce *Microcystis* y *Anabaena* mediante un sistema de extracción bifásico con agua-octanol. Estos autores sugieren que el octanol es responsable de la lisis celular y que la liberación del contenido celular se divide entre la capa superior hidrofóbica de octanol y la capa inferior acuosa. Se realizaron análisis siguiendo dicha metodología, sin embargo, no se obtuvieron resultados igual de efectivos a los reportados en dicho trabajo. No obstante, se realizaron ensayos integrando a la metodología de este proyecto el uso de solventes orgánicos (octanol y propanol) para la remoción de pigmentos apolares.

Los métodos publicados hasta ahora no son suficientemente sensibles para mediciones de muestras oceánicas. El objetivo de este trabajo es el desarrollo de un método que permita documentar cuantitativamente cambios en la composición de FBP y que sea sensible para muestras oceánicas. Para lograr dicho objetivo se tienen que abordar diferentes conceptos del método. Asimismo, para tener una referencia y amplia interpretación de los espectros de absorción de las FBP se realizaron a la par de las extracciones de FBP, mediciones de la absorción *in vivo* de las muestras. Al comienzo del trabajo experimental se presentó dificultad en la colecta de cultivos, debido a que cuando los cultivos discontinuos (de lote) llegan a la fase estacionaria y se encuentran limitados por el micronutriente nitrógeno, las células reducen su contenido celular de FBP, de forma que la proteína actúa como fuente de nitrógeno (Allen y Smith, 1969; Collier y Grossman, 1992; Gombos y Vigh, 1986; Richaud *et al.*, 2001). Por lo anterior resultado

necesario monitorear no destructivamente el desarrollo de los cultivos y su contenido de FBP, con este fin se construyó un dispositivo óptico.

Para documentar diferentes composiciones de FBP en las muestras se mantuvieron cultivos a irradiancias de diferentes colores espectrales e intensidades, y de esta forma inducir adaptación cromática. A su vez, de esta manera se podrán comparar las características espectrales *in vivo* e *in vitro*.

### **1.3 Hipótesis**

Los coeficientes de absorción *in vitro* de ficobiliproteínas en conjunto con los espectros de absorción *in vivo*, permiten documentar cuantitativamente diferentes tipos de ficobiliproteínas de extractos de pico- y nano-plancton oceánico.

### **1.4 Objetivos**

#### **1.4.1 Objetivo general**

Usando cultivos de *Synechococcus* como modelo experimental se documentará la composición de ficobiliproteínas bajo diferentes condiciones de crecimiento utilizando espectros fotométricos *in vivo* e *in vitro* con métodos sensibles para pico- y nano-plancton oceánico.

#### **1.4.2. Objetivos específicos**

- Extraer ficobiliproteínas de cianobacterias cocales de cultivos de laboratorio y muestras ambientales marinas de forma práctica y reproducible para la medición de espectros de absorción.

- Desarrollar una metodología para la medición de la absorción *in vitro* de ficobiliproteínas de cianobacterias cocales con sensibilidad para aplicación potencial a muestras ambientales marinas con abundancias típicas de  $10^3$  a  $10^4$  células mL<sup>-1</sup>.
- Documentar cambios en la composición de ficobiliproteínas en respuesta a diferentes condiciones de luz espectral en cultivos de laboratorio.
- Monitorear desarrollo de cultivos aclimatados a diferentes condiciones espectrales de luz mediante sus tasas de crecimiento celular y composición de ficobiliproteínas.

## Capítulo 2. Metodología

---

### 2.1 Calibración del radiómetro Ocean Optics

Para mediciones de flujo de fotones se calibró el radiómetro Ocean Optics 2000 con una fibra óptica terminada con difusor esférico. Se realizaron mediciones de la radiación fotosintéticamente activa (PAR) en el exterior y parte alta de un edificio. Las mediciones se hicieron con Ocean Optics, cuidando la reflexión de la luz solar proveniente del edificio, ventanas u otros objetos para facilitar la comparación con modelo numérico de luz solar. Los espectros del Ocean Optics se compararon con un modelo numérico de la irradiancia solar en un día despejado para el día del año y la hora específica (ZENITHA, Cullen y Lewis 1997, modificado de Bird y Riordan, 1986). También comparó con un radiómetro PAR (Biospherical QSL). La Radiación Fotosintéticamente Activa (PAR) tiene un rango espectral de radiación solar de 400 a 700 nm y es utilizada por organismos fotosintéticos para el proceso de fotosíntesis. Comúnmente para describir el flujo de fotones en la PAR se utilizan los micromoles por metro cuadrado por segundo ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), se basan en el número de fotones a una cierta longitud de onda incidente por unidad de área y por unidad de tiempo, *i.e.*,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}(\Delta \lambda)^{-1}$ , donde  $\Delta \lambda$  es 1 nm.

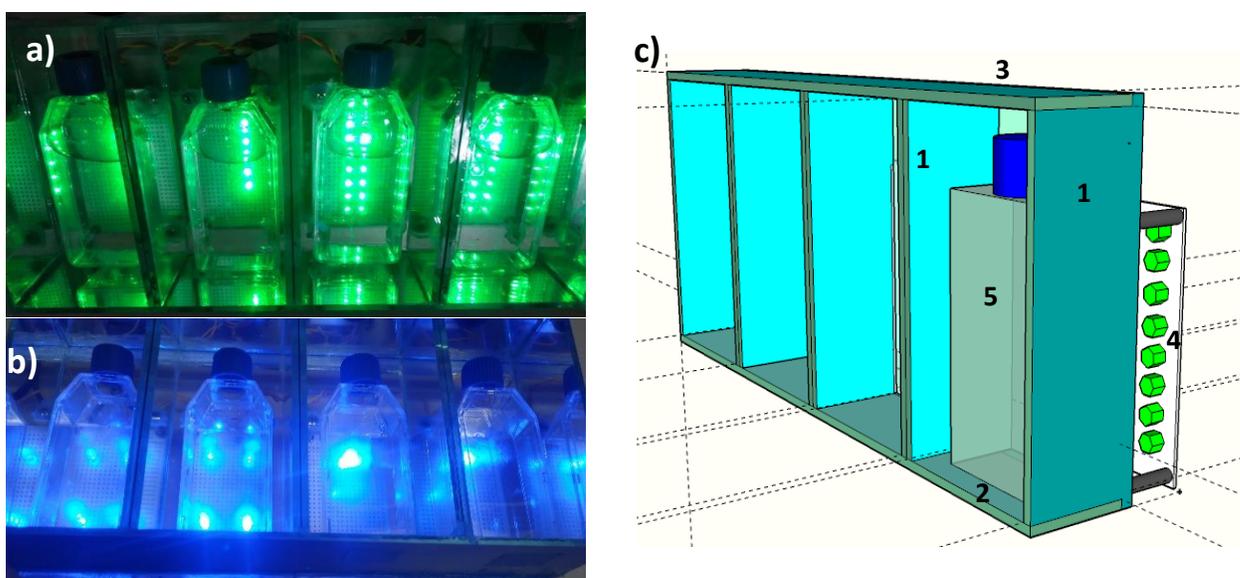
### 2.2 Cultivos y condiciones de crecimiento

Se utilizó una cepa de *Synechococcus Sp.* CCMP 3074 del cepario del centro nacional de microalgas de Bigelow, EUA, originalmente aislado de aguas costeras del sur de California. Los cultivos se mantuvieron en agua de mar envejecida y enriquecida en medio de cultivo f/2 de acuerdo a Guillard y Ryther en 1962 y a Guillard en 1975. Se confirmó el carácter del cultivo como cianobacteria utilizando la composición de pigmentos polares usando HPLC (Laboratorio Ficotox, CICESE).

Resultado necesario monitorear diariamente el desarrollo de los cultivos y su pigmentación para relacionar los pigmentos con el estado de desarrollo del cultivo. Por lo que se construyó un dispositivo denominado FoLiPAM (Folded Light Path Absorption Monitor), este dispositivo permite estimar la atenuación de luz espectral usando una fuente de luz policromática y un espectroradiómetro. Para incrementar la sensibilidad de medición de atenuación se utilizó un diseño para ampliar el largo de haz de luz. Las mediciones de atenuación espectral se pueden efectuar directamente con el cultivo en su frasco, aquí se

han usado frascos Nunclon de 50 mL. Con apoyo de la Dirección de Impulso a la Innovación y el Desarrollo se está realizando el análisis de potencial de protección por patente del dispositivo (denominado FoLiPAM) desarrollado en este trabajo, por lo anterior y dado que el objetivo de este proyecto no era lograr el dispositivo, una descripción detallada del FoLiPAM no se incluye en el presente trabajo.

Los cultivos se desarrollaron en frascos Falcon de 50 mL y se mantuvieron en incubadoras individuales (figura 2) construidos con celdas reflectoras con espejos caseros de vidrio de tres milímetros de espesor. La iluminación de cada celda se realizó por LEDs (diodos emisores de luz) de diferentes colores (610, 455, 520 y 510 nm) con diferentes flujos de fotones de 3.8 y de 13  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  definidos en este trabajo como alto y bajo respectivamente, con fotoperiodo de 12:12 h (luz:oscuridad) y temperatura ambiente de laboratorio de aproximadamente 23 °C. Se realizaron pruebas del posible calentamiento de los cultivos por iluminación y se encontró un aumento de la temperatura de solo 0.5 °C.



**Figura 2.** Incubadoras individuales para cada color de LEDs con sus respectivos frascos FALCON. Incubadoras de cultivos bajo LEDs a) 520 nm y b) 510 nm. c) Representación de incubadoras en bosquejo elaborado en programa Sketchup®: espejos laterales (1), espejo inferior (2), espejo superior (3), base de LEDs (4), frasco de cultivo (5), la estructura se cubre con otro espejo para homogenizar el campo de luz en cada cámara de incubación.

### 2.2.1 Monitoreo del crecimiento de cultivos

El crecimiento de los cultivos es comúnmente documentado con base a conteo de células con microscopia de autofluorescencia, sin embargo, no resultó óptimo este método para un monitoreo diario de cultivos

axénicos dado al esfuerzo de la colecta de muestras diarias de manera estéril y el gasto de volumen de cultivo. El método estándar par monitoreo de cultivos fotótrofos es la medición de fluorescencia de clorofila *in vivo*, sin embargo, el problema con este método es que el volumen del cultivo es limitado por el tamaño del tubo de ensayo que entra al fluorómetro. Para facilitar el monitoreo rápido y no-destrutivo de cultivos de mayor volumen se construyó un dispositivo óptico (FoLiPAM) basado en atenuación de la luz.

Se realizaron mediciones diarias de los cultivos en suspensión incubados en diferentes colores de luz por medio del dispositivo FoLiPAM, se utilizó agua destilada como blanco para conocer la absorción dada por el agua del medio de cultivo. Una vez definida la etapa de desarrollo del cultivo, y al encontrarse en etapa exponencial se finalizaba el monitoreo y se procedía a realizar los respectivos análisis.

### 2.3 Cuantificación de células

Se realizaron conteos directos al microscopio de epifluorescencia Axiovert100 (Carl Zeiss, inc. New Cork, N.Y.), para detectar la fluorescencia de los pigmentos de FBP de *Synechococcus Sp.* Los cuales presentan un color de emisión naranja que es distinguido fácilmente de la emisión de clorofila de otro picofitoplancton. Se colecto cultivo sobre filtros Whatman de policarbonato negro con tamaño de poro de 0.2  $\mu\text{m}$  y 25 mm de diámetro. El filtro se ha montado sobre un portafiltro, agregando glicerol para incrementar la autofluorescencia de las FBP. La preparación fue observada en un microscopio de epifluorescencia Carl Zeiss con un aumento de 100X utilizando aceite de inmersión de baja fluorescencia. Se seleccionaron campos al azar hasta contar  $\geq 300$  células por muestra. La abundancia celular se estimó de acuerdo con la ecuación 1.

$$\text{Abundancia} = C \times \left( \frac{D/A}{V} \right) \quad (1)$$

**Abundancia** (células  $\text{mL}^{-1}$ ); **V** (mL), volumen de muestra filtrada; **D** ( $\text{cm}^2$ ), área de filtración efectiva; **A** ( $\text{cm}^2$ ), área microscopio utilizado para el conteo; **C** (células), número de células contadas.

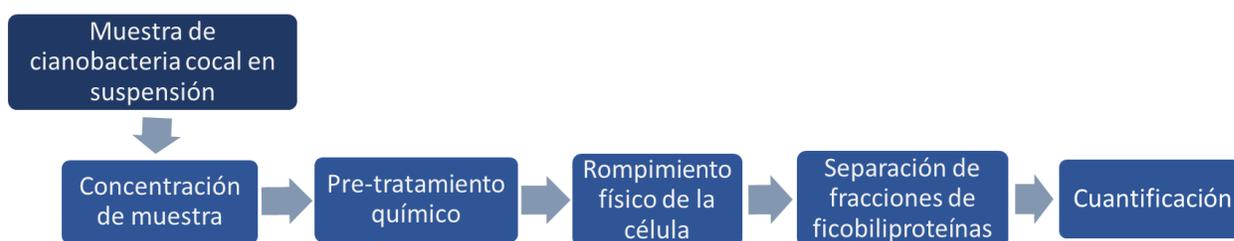
## 2.4 Descomposición espectral

Se realizó una aproximación de descomposición espectral por medio del programa Peakfit (Systat Software Inc.). Para esto, se utilizaron anchos de banda (Full Width at Half Maximum, FWHM) y máximos de absorción reportados numéricamente o calculados de espectros en la literatura para cada pigmento (anexo B), asimismo, se asumió una distribución Gaussiana para cada pico de pigmentos.

Los pigmentos considerados para la descomposición espectral fueron aquellos definidos en la literatura como los principales en el sistema fotosintético para *Synechococcus*, dentro de los cuales se encuentran las FBP (ficoeritrina, ficocianina y aloficocianina), clorofila *a* y zeaxantina.

## 2.5 Extracción de FBP

En la figura 3 se muestra un diagrama de la metodología general para realizar la medición de la absorción *in vitro* de las ficobiliproteínas de cianobacterias del género *Synechococcus*.



**Figura 3.** Diagrama con el proceso general para la cuantificación y extracción de ficobiliproteínas de cianobacterias del género *Synechococcus*.

### 2.5.1 Concentración de la muestra

Se realizó el filtrado al vacío de 15 mL de cultivos concentrados de *Synechococcus sp.* acondicionados a diferentes espectros de luz, en membrana Durapore por duplicado, utilizando una bomba con vacío de 0.015 MPa. Para ciertos experimentos se han utilizado filtros de fibra de vidrio y/o de ambos tipos de filtro de diferente diámetro 13 o 25 mm.

## 2.5.2 Pretratamiento químico

Después de diferentes ensayos experimentales se definió el siguiente protocolo: Se colocó el filtro con la muestra concentrada sobre papel secante para minimizar el contenido de medio de cultivo del filtro. Se removió el papel secante y en seguida se agregó 100  $\mu\text{L}$  de la solución EDTA sobre el filtro, se trabajó con concentraciones de EDTA de 10 mM y 20 mM, esto con el fin de buscar como optimizar la extracción, una vez colocado el EDTA se mantuvo la muestra en oscuridad por 10 min. Posteriormente, se colocó nuevamente papel secante debajo del filtro para minimizar residuos de la solución EDTA. Después se retiró el papel secante. En algunos experimentos se adicionó mutanolisina previo al uso de lisozima, para esto se colocó el filtro tratado con EDTA en caja de Petri y se agregó 100  $\mu\text{L}$  de solución mutanolisina [ $50 \text{ UL}^{-1}$ ] sobre el filtro, en seguida se incubó a 37 °C por 30 minutos en oscuridad. Una vez transcurrido este tiempo, se colocó el filtro sobre papel secante para minimizar residuos. Después se agregó 50  $\mu\text{L}$  de solución Lisozima (las concentraciones de lisozima fueron diferentes en ciertos experimentos con 2  $\text{mg mL}^{-1}$  o 15  $\text{mg mL}^{-1}$ ) sobre el filtro para incubar nuevamente a 37 °C por 30 minutos en oscuridad, (en algunos experimentos se ha incubado a temperatura ambiente  $\sim 23 \text{ }^\circ\text{C}$  o a 37 °C). Posterior de la incubación se colocó papel secante debajo del filtro para minimizar residuos de la solución de lisozima.

Solución de EDTA: Se preparó una solución de 5 mL a pH=8.18 de EDTA [10 mM]. Se agregaron 14.612 mg de EDTA en 5 mL de agua destilada. Se ajustó el pH (8.2) con la adición de solución de NaOH [1 M].

mutanolisina M9901 1 KU en 0.25 mg de proteína: agregar 1 mL de diluido enzimático al frasco de mutanolisina para solución stock [1 U/mL].

Diluido enzimático (50 mM TES con 1 M Cloruro de Magnesio, pH= 7.0 a 37 °C): Disolver 39.4 mg de TES (Catalog No. T1375) en 4 mL de agua ultra pura y después agregar 5  $\mu\text{L}$  de 1 M solución de Cloruro de Magnesio. Se ajustó el pH a 7.0 a 37 °C utilizando 1 M NaOH y después se adicionó agua ultra pura hasta llegar a un volumen de 5 mL. Almacenar en frío (2-8 °C)

Solución Lisozima: Se preparó una solución de 2 mL de Lisozima a un pH= 5.2. La concentración más frecuentemente utilizada [ $2 \text{ mg mL}^{-1}$ ] se preparó de la siguiente manera: Se agregaron 4 mg de Lisozima de clara de huevo de Sigma Aldrich a 2 mL de Tris-HCl [10 mM], pH 8.0. Se almacenaron en frío en viales Eppendorf estériles, para tener la solución en porciones de menor volumen ( $\sim 0.2 \text{ mL}$ ) para evitar la degradación y contaminación de la solución de lisozima por congelar y descongelar en cada uso.

Medio de extracción: se utilizó buffer de fosfatos sódico 0.1 M pH=6.8, el cual consiste de fosfato de sodio monobásico anhídrido ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) peso molecular 119.98 gr (SIGMA) y fosfato de sodio dibásico ACS anhídrido ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) peso molecular 141.96 gr (SIGMA). Su preparación consiste en una solución stock (A) con fosfato monobásico al 0.2 M se agregó 12 g y se aforó a 500 mL con agua destilada. Una solución stock (B) con fosfato dibásico al 0.2 M agregando 14.2 g y se aforó a 500 mL con agua destilada. Se mezclaron 56.25 mL (A) + 68.75 mL (B) y se ajustó el pH a 6.8, para posteriormente aforar a 250 mL con agua destilada. Las porciones agregadas de cada solución química se determinaron mediante la ecuación 2.

$$g = M * PM * V \quad (2)$$

$g$  (g), gramos;  $M$  ( $\text{mol L}^{-1}$ ), molaridad;  $PM$  ( $\text{g Mol}^{-1}$ ), Peso Molecular;  $V$  (L), volumen.

### 2.5.3 Rompimiento físico de la célula

El método usado más frecuentemente para la desintegración de las células utiliza un tratamiento con Mini-Beadbeater que agita a alta frecuencia perlas de silicato de zirconio dentro del recipiente con la muestra. Esto con el objetivo de que las perlas golpeen las células para romperlas. Para este procesamiento se colocó el filtro en vial, agregando 1.7 mL de amortiguador de fosfatos pH= 6.8 y mezcla de perlas de silicato de zirconio de 0.5 y 0.1 mm.

Se utilizó el equipo Mini-Beadbeater (Biospec Products) con tres ciclos de 30 segundos a una velocidad de agitación de 4,800 revoluciones por minuto (rpm) intercalado con enfriamientos a  $\sim 4$  °C por 60 segundos para evitar la degradación térmica de las FBP.

En algún momento se compararon diferentes técnicas de rompimiento de células con el método de Mini-Beadbeater realizando pruebas con Vortex en conjunto con congelamiento/descongelamiento y osmosis. Debido que las alternativas no resultaron en un mejoramiento de extracción de FBP, no se continuo con ensayos de estos métodos alternos.

## **2.5.4 Separación de fracción de FBP**

La obtención del sobrenadante fue por medio de centrifugación (Fisher Scientific Instrument, Marathon 16 km) a 11,900 rpm por 10 min. Asimismo, se probó la técnica de filtración directa del extracto a la celda para la obtención del sobrenadante y una combinación de ambas técnicas (centrifugación, filtración y centrifugación-filtración).

### **2.5.4.1 Modificaciones en la separación de fracciones**

Un problema encontrado con el método estándar era que parte del extracto no se podía recuperar por el alto volumen de las perlas de silicato de zirconio. Para recuperar esta parte del extracto se realizaron ensayos con lavados, es decir, se tomó 1 mL de sobrenadante y se colocó en un vial limpio. En seguida se adicionó 0.4 mL de amortiguador de fosfatos al vial con perlas, y se agito nuevamente en Mini-Beadbeater por un ciclo de 30 s a 4,800 rpm. Posteriormente se centrifugó por 10 min a 11,900 rpm y se tomó ~0.4 mL del sobrenadante. Se repitió el ciclo dos veces para tener un total de 0.8 mL de extracto recolectado de lavados. En seguida se juntaron los dos extractos de 0.4 mL colectados de los lavados y el extracto de 1 mL almacenado en frío resultando en 2.5 mL de extracto final.

### **2.5.5 Reducción de pigmentos apolares**

En varias ocasiones se hizo una extracción líquido-líquido y se adicionó 0.2 mL de octanol a 0.8 mL de extracto. Posteriormente se agitaron los viales en Vortex por 10 s y se centrifugó por 2 min a 11,900 rpm.

### **2.5.6 Medición de espectro de absorción/Cuantificación**

La medición espectrofotométrica del sobrenadante se realizó en micro celdas de cuarzo de 10 mm en un espectrofotómetro UV/VIS de PerkinElmer instruments (Lambda 40) con barridos de 350-750 nm,

intervalos de 1 nm, ranura 1 nm y una velocidad de lectura de 240 nm min<sup>-1</sup>. Se utilizó amortiguador de fosfatos como blanco.

Los espectros se procesaron al restar a la absorbancia (A) el promedio de la absorbancia de 720-750 nm para restar el efecto de esparcimiento y absorción por sustancias no pigmentarias. Estos espectros fueron convertidos a el coeficiente de absorción ( $\alpha$ ; m<sup>-1</sup>) de acuerdo a la ecuación 3.

$$\alpha = A \times 2.302 \times \frac{V_e}{V} \times 100 \quad (3)$$

$\alpha$  (m<sup>-1</sup>), coeficiente de absorción; **A** (Densidad óptica, OD), absorbancia; **V<sub>e</sub>** (mL), volumen del extracto; **V** (mL), volumen filtrado, el factor 100 para convertir de cm<sup>-1</sup> a m<sup>-1</sup>.

De los espectros de absorción medidos se ha restado una línea base establecida mediante una ecuación exponencial de tres parámetros con un ajuste iterativo de mínimos cuadrados (Levenberg-Marquardt).

## 2.6 Absorción *in vivo* del cultivo

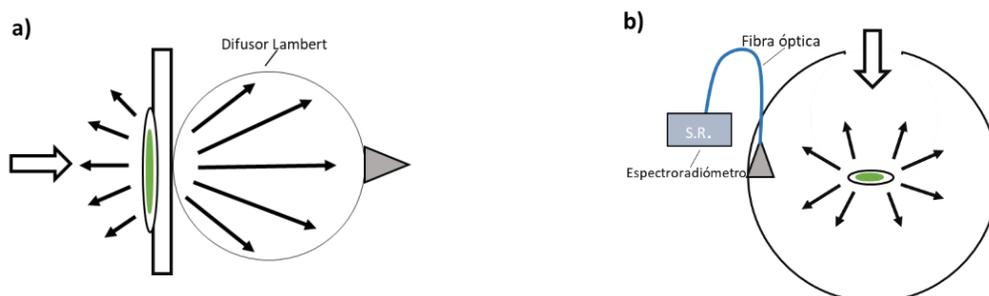
Para comparar los espectros de absorción de FBP en extractos con la contribución de las FBP a la absorción *in vivo* de las cianobacterias se tomaron muestras simultáneamente tanto para la medición de absorción *in vivo* con el protocolo del “Quantitative filter method” (Boss *et al.*, 2018) como para la medición de absorción *in vitro* (extracción). Estos espectros fueron convertidos al coeficiente de absorción ( $\alpha$ ) mediante la ecuación 3 dividida por el largo efectivo de la columna de muestra (ecuación 4).

$$L_e = \frac{V/A}{100} \quad (4)$$

**L<sub>e</sub>** (m), largo efectivo de la columna de muestra; **V** (cm<sup>3</sup>), volumen de muestra; **A** (cm<sup>2</sup>), área efectiva del filtro.

Se han usado dos variaciones del método de medición cuantitativa de absorción *in vivo* con filtros (Quantitative filter technique) (Boss *et al.*, 2018). Se ha usado la medición de transmitancia en espectrofotómetro convencional y el método de esfera integradora con la muestra en el centro de la esfera (Figura 4). Ambas mediciones se hicieron con la misma muestra filtrada sobre filtros de GF/F de 25 mm.

También se midieron las mismas muestras decoloradas para estimar la contribución de atenuación de la luz por sustancias no pigmentarias. La decoloración consiste en agregar Clorox (Clorox Chemical Co.) incubar por 5 min y después enjuagar el filtro con agua destilada. Este método supone que los pigmentos fotosintéticos se decoloran de manera más rápida que la otra materia orgánica particulada de la muestra. La diferencia entre los espectros de los coeficientes de absorción de la muestra antes y después de la decoloración se define como los espectros de los pigmentos fotosintéticos.



**Figura 4.** Representación de configuración de medición de muestras *in vivo* para determinar la densidad óptica. **a)** medición de transmitancia en espectrofotómetro convencional (**T-mode**) y **b)** método de esfera integradora con la muestra en el centro de la esfera (**IS-mode**). Flechas negras representan haz de luz esparcido, flecha blanca haz de luz incidente y triángulo gris detector. Modificado de (Boss *et al.*, 2018).

### 2.6.1 Quantitative filter technique usando transmitancia

El método muestra una ampliación de la señal de absorbancia ( $\beta$ , Path length amplification, ingl.). El  $\beta$  se ha corregido de acuerdo a Boss y colaboradores en el 2018, según la ecuación 5.

$$\text{T-mode:} \quad OD_s = 0.670 \times (OD_f)^{1.280} \quad (5)$$

La densidad óptica  $OD_s$ , representa la absorbancia de partículas corregida por el factor de amplificación  $\beta$ ;  $OD_f$ , se define como la densidad óptica de las partículas en el filtro después de las correcciones del efecto de esparcimiento y absorción por sustancias no pigmentarias.

## 2.6.2 Quantitative filter technique usando esfera integradora

La esfera integradora se adaptó de una esfera para el método de PSICAM (Point Source Integrating Cavity Absorption Meter) de 90 mm de diámetro de cerámica. La fuente de luz es una lámpara de halógeno (ZEUTEC 3900, ILLUMINATION TECHNOLOGIES) conectada a una fibra óptica, la cual ilumina toda el área efectiva de la muestra filtrada colocada en el centro de la esfera. El radiómetro espectral que a su vez tiene la función de detector (Ocean Optics USB2000), recibe la luz de la pared de la esfera a través de una fibra óptica. El método muestra una ampliación de la señal de absorbancia diferente del método de la medición de transmitancia ( $\beta$ , Path length amplification, ingl.). Este  $\beta$  se ha corregido de acuerdo a Boss y colaboradores en el 2018 en la ecuación 6.

IS-mode: 
$$OD_s = 0.323 (OD_f)^{1.0867} \quad (6)$$

Las densidades ópticas  $OD_s$  y  $OD_f$  representan los mismo que en la ecuación 5.

## Capítulo 3. Resultados

---

### 3.1 Crecimiento de *Synechococcus*

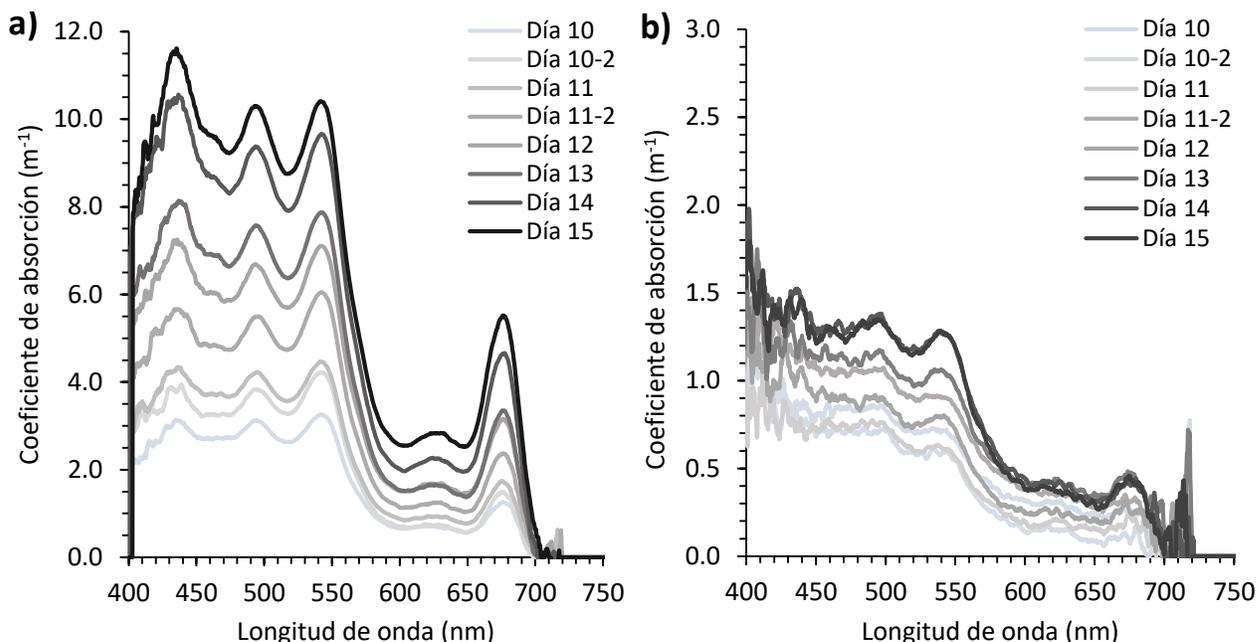
#### 3.1.1 Monitoreo no-destructivo de cultivos con FoLiPAM

Como parte de la optimización de las condiciones de extracción y para tener diferentes concentraciones de pigmentos, así como monitorear no destructivamente los cultivos se inventó un dispositivo denominado FoLiPAM por sus siglas en inglés (Folded Light Path Attenuation Monitor). Asimismo, se construyeron incubadoras compuestas de diferentes colores de Diodos Emisores de Luz (LEDs) para estimular diferentes tipos de pigmentación. Aquí sólo se muestran los espectros de absorción del último experimento realizado, en el cual se trabajó con incubadoras con LEDs de 520 nm y 510 nm, sin embargo, también se utilizaron incubadoras con LEDs de 455 y 610 nm. Se trabajaron con dos niveles de irradiancia para cada tipo LED, una irradiancia alta y una baja. Se denominó irradiancia alta a un flujo de fotones de  $13 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , mientras que  $3.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  es referencia a irradiancia baja.

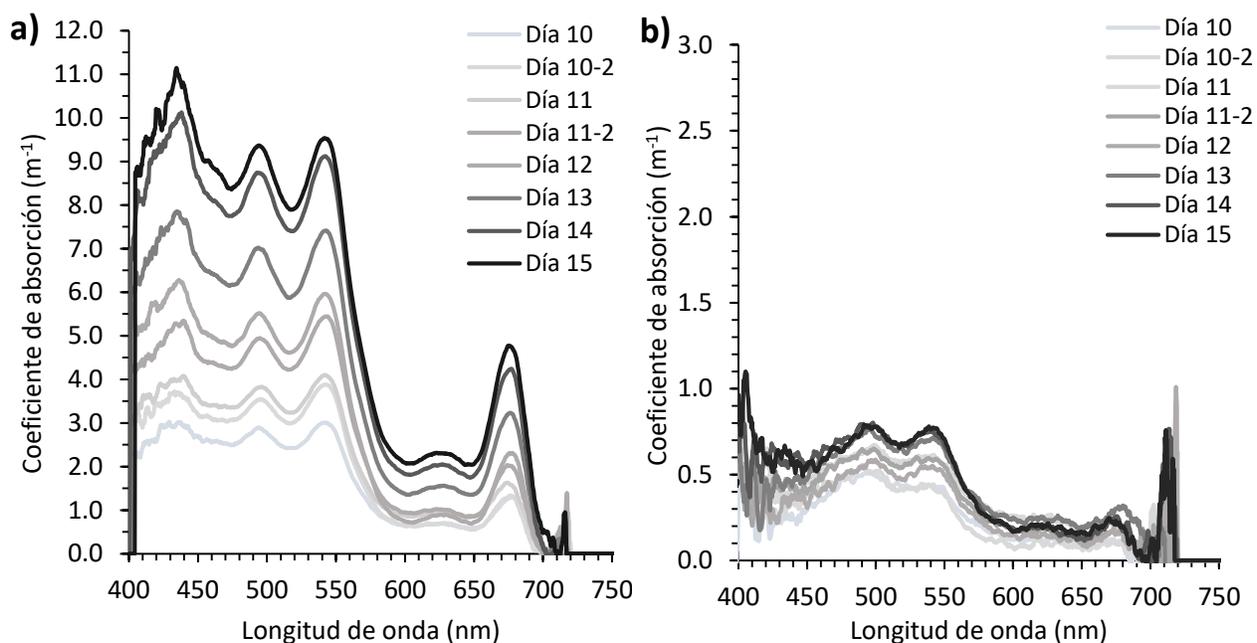
Se monitorearon con FoLiPAM cultivos en suspensión hasta llegar a su etapa exponencial, lo cual se puede observar en los espectros de absorción *in vivo* de pigmentos en el momento que este deja de presentar cambios en su coeficiente de absorción, de esta manera poder realizar extracciones de FBP previo a la etapa de decaimiento del cultivo dado que se ha reportado que las células hacen uso de las FBP como fuente de nitrógeno cuando se encuentra con limitación de nutrientes (Allen y Smith, 1969; Collier y Grossman, 1992; Gombos y Vigh, 1986; Richaud *et al.*, 2001). Por otro lado, no se observaron diferencias en tipos de pigmentación de acuerdo a diferentes condiciones de luz dadas por los diferentes LEDs en las incubadoras, solo se percibieron diferencias en las tasas de crecimiento.

Con el monitoreo de cultivos se observaron diferentes tasas de crecimientos de acuerdo a los flujos de fotones, esto tanto con cultivos incubados con LEDs de 510 nm (figura 6) como de 520 nm (figura 5). A su vez, para ambos tipos de LEDs se muestra crecimiento en los dos niveles de irradiancias:  $3.8$  y  $13 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , sin embargo, el crecimiento es menor a bajas irradiancias ( $3.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Por otro lado, no se observan diferencias pronunciadas entre cultivos crecidos con LEDs 510 y 520 nm. Asimismo, se observa el cambio en el coeficiente de absorción *in vivo* de los espectros de pigmentos, en donde a mayores días transcurridos se observa un mayor coeficiente de absorción *in vivo*. Esto es consistente con el incremento

de la biomasa celular del cultivo. En todos los cultivos se encuentra un aumento de absorbancia arriba de 700 nm, esta absorbancia es resultado la absorbancia del agua.



**Figura 5.** Espectros de absorción *in vivo* de cultivos crecidos en incubadoras con LEDs de 520 nm a diferentes irradiancias y medidos en suspensión con FoLiPAM. La escala de colores muestra el transcurso de los últimos 5 días de monitoreo, siendo el color más oscuro el último día. (**diferentes escalas en gráficos**). **a)** Espectros de absorción de cultivos crecidos con flujo de fotones de  $13 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . **b)** Espectros de absorción de cultivos crecidos con flujo de fotones de  $3.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

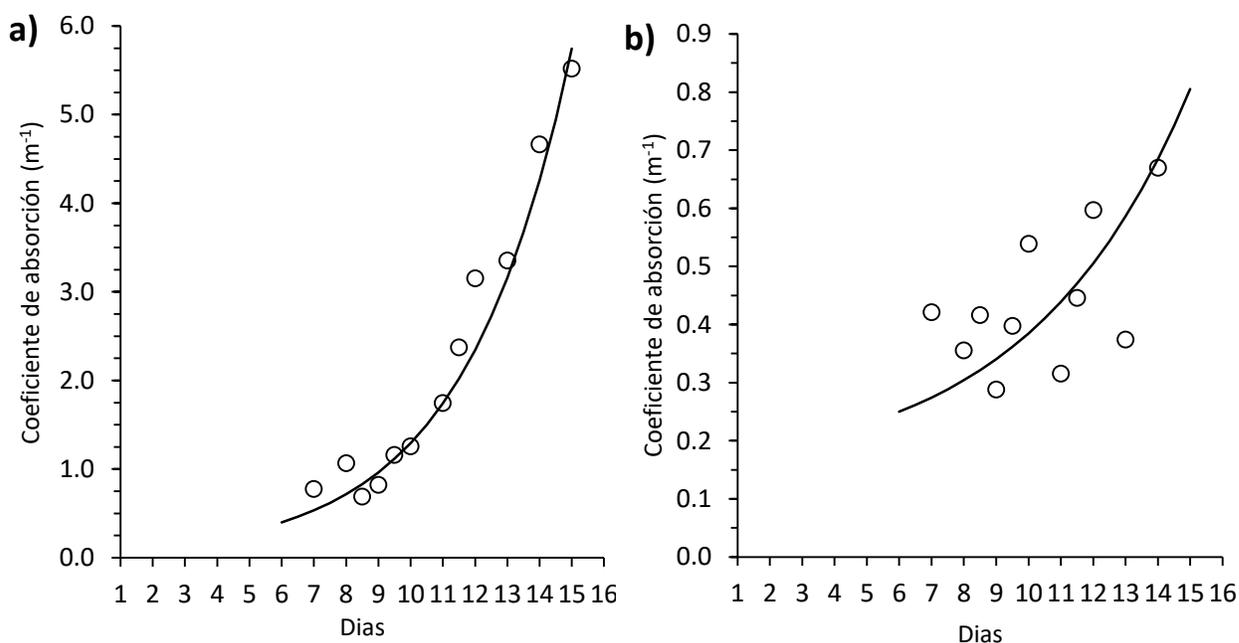


**Figura 6.** Espectros de absorción *in vivo* de cultivos crecidos en incubadoras con LEDs de 510 nm a diferentes irradiancias y medidos en suspensión con FoLiPAM. La escala de colores muestra el transcurso de los últimos 5 días de monitoreo, siendo el color más oscuro el último día. (**diferentes escalas en gráficos**). **a)** Espectros de absorción de cultivos crecidos con flujo de fotones de  $13 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . **b)** Espectros de absorción de cultivos crecidos con flujo de fotones de  $3.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

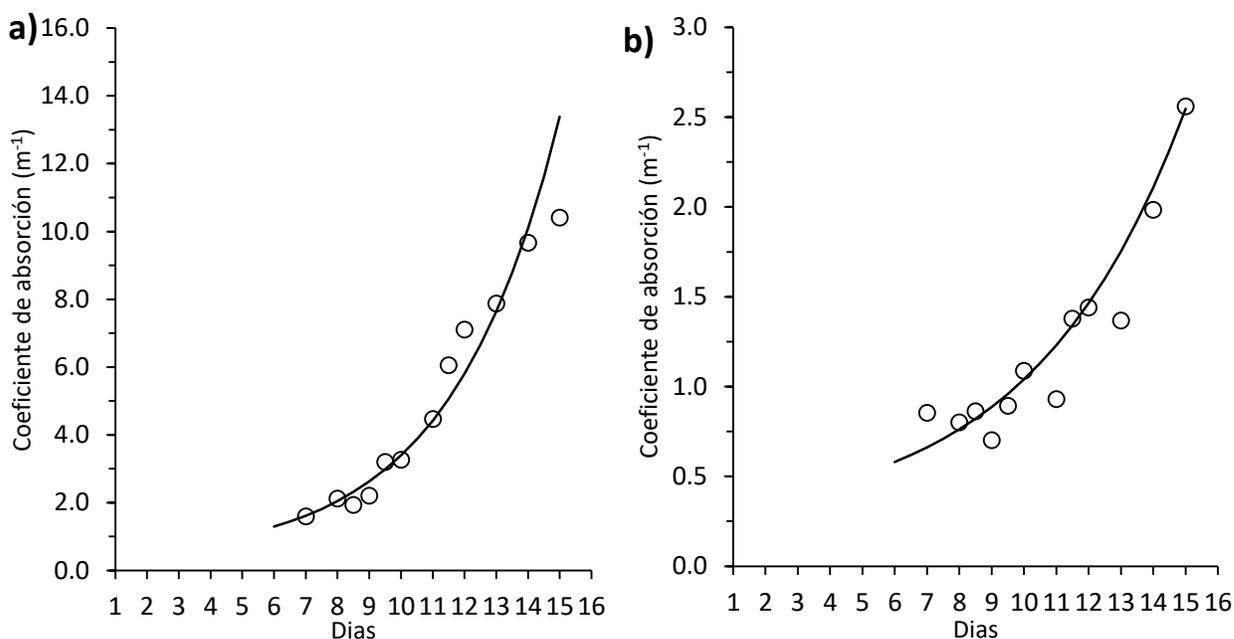
### 3.1.2 Tasas de crecimiento bajo diferentes condiciones de luz

Adicionalmente al monitoreo no-destructivo de cultivos en suspensión con FoLiPAM, se calcularon las tasas de crecimiento específico ( $\mu$ ; día<sup>-1</sup>) para el crecimiento exponencial y el tiempo de generación por día basado en el coeficiente de absorción *in vivo* del pico de clorofila *a* (676 nm), asimismo se utilizó el pico de la FBP ficoeritrobilina (545 nm), esto tanto para cultivos incubados en LEDs de 520 nm como para aquellos incubados en LEDs de 510 nm.

En la figura 7a se observa que para el último día de monitoreo (día 15) en cultivos bajo LEDs de 510 nm el pico de clorofila *a* (676 nm) presenta un coeficiente de absorción de 5.51 m<sup>-1</sup> en altas irradiancias, mientras que para bajas irradiancias (figura 7b) es de 0.67 m<sup>-1</sup>. Por su parte, el coeficiente de absorción *in vivo* en el pico de la FBP fieritrobilina (545 nm) de cultivos incubados en LEDs de 520 nm en el día 15 del experimento en irradiancias altas es de 9.53 m<sup>-1</sup> (figura 8a), en cambio para irradiancias bajas es de 1.8 m<sup>-1</sup> (figura 8b).

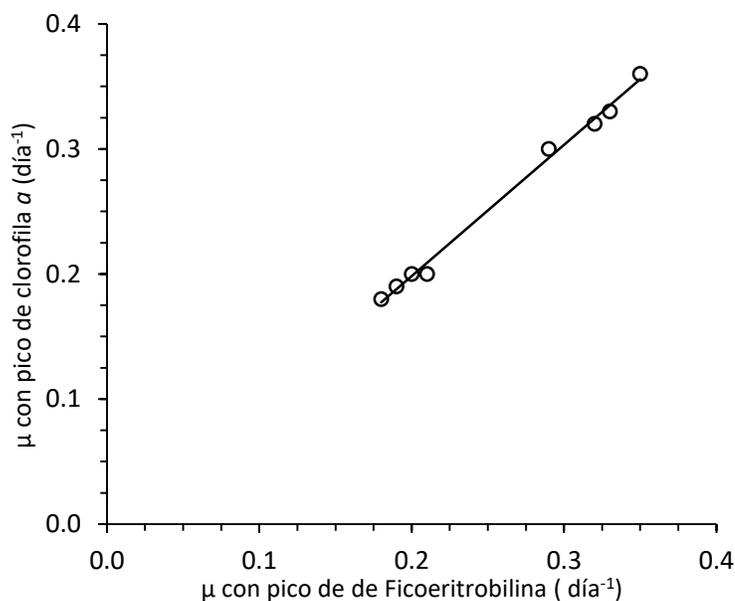


**Figura 7.** Cinética de crecimiento con base al máximo de absorción de la clorofila *a* a 676 nm de mediciones *in vivo* con FoLiPAM de cultivos crecidos en incubadoras con LEDs de 510 nm a irradiancias de **a) 13 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>** y **b) 3.8 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>**. Coeficiente de absorción (m<sup>-1</sup>) de la clorofila *a* a 676 nm (circulo, o) y modelo de los datos de clorofila *a* a 676 nm con línea base (línea negra) (**diferentes escalas en gráficos**).



**Figura 8.** Cinética de crecimiento con base al máximo de absorción de la FBP ficoeritrobilina 545 nm de mediciones *in vivo* con FoLiPAM de cultivos crecidos en incubadoras con LEDs de 520 nm a irradiancias de **a) 13 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>** y **b) 3.8 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>**. Coeficiente de absorción (m<sup>-1</sup>) de la FBP ficoeritrobilina a 545 nm (circulo) y modelo de los datos de ficoeritrobilina con línea base (línea negra) (**diferentes escalas en gráficos**).

Al comparar  $\mu$  (día<sup>-1</sup>) de los dos pico de pigmentos (Figura 9), es decir, las tasas de crecimiento calculadas con cada pigmento para las diferentes niveles de irradiancia, se observa la correlación que hay entre sus tasas de crecimiento. Esta resulta muy cercana a uno (0.99), lo que significa que las tasas de crecimiento comparadas son similares.



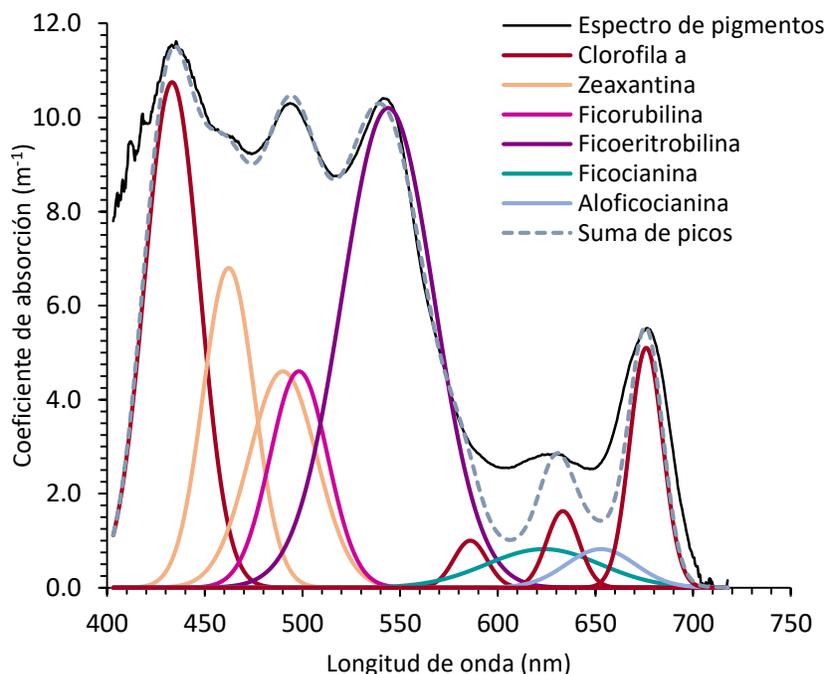
**Figura 9.** Tasas de crecimiento ( $\mu$ ) con base a los máximos de absorción de la clorofila *a* a 676 y la FBP ficoeritrobilina 545 nm de mediciones *in vivo* con FoLiPAM de cultivos crecidos en incubadoras con LEDs de 520 nm a irradiancias altas. Regresión lineal tipo 2:  $\mu_{\text{Clorofila}} = 1.05 \mu_{\text{ficoeritrobilina}} - 0.01$ ,  $R^2 = 0.99$ .

### 3.1.3 Descomposición espectral

Los espectros de absorción *in vivo* pueden ser utilizados para identificar diferentes pigmentos al compararlos con datos de la literatura. En este trabajo se realizó una aproximación de descomposición espectral, con este fin se utilizaron anchos de banda (Full Width at Half Maximum, FWHM) y máximos de absorción reportados numéricamente o calculados de espectros en la literatura (anexo B).

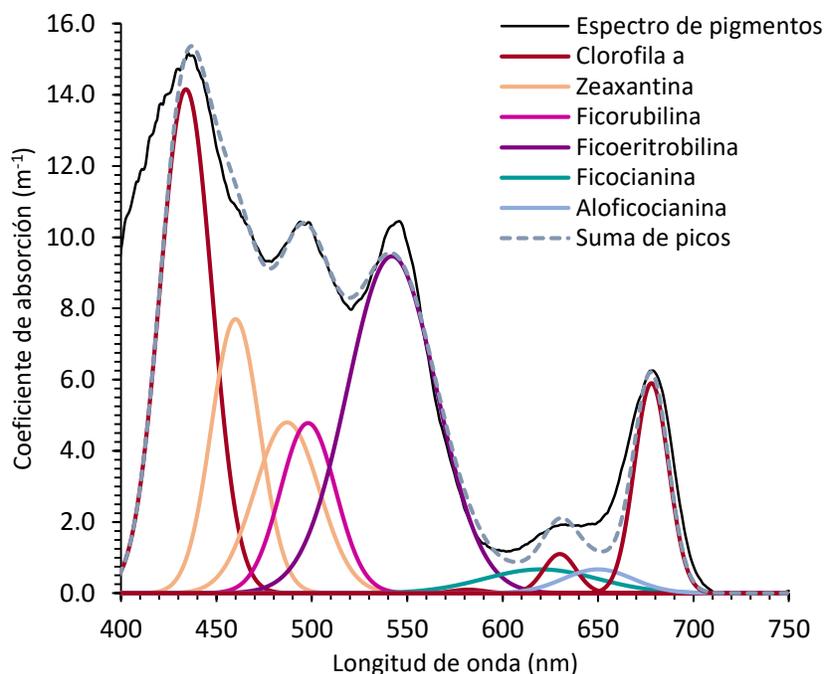
Se definieron cuáles serían los pigmentos de acuerdo a lo reportado en la literatura para *Synechococcus*, así como lo observado en los espectros de absorción *in vivo* del cultivo. Se consideraron los pigmentos principales en el sistema fotosintético, dentro de los cuales se encuentran las FBP (ficoeritrina, ficocianina y aloficocianina), clorofila *a* y zeaxantina. Para el análisis numérico se ha usado el programa Peakfit (Systat Software Inc.).

Los resultados muestran los picos de cada pigmento considerado, así como el espectro de absorción de pigmentos medido y el espectro total compuesto de la suma de los diferentes picos de pigmentos. En la figura 10 se observa que el espectro de absorción medido en FoLiPAM tiene diferencias con el espectro calculado por la suma de los diferentes picos de pigmentos. Estas diferencias son evidentes en las longitudes de onda cercanas a los 600 nm, donde se encuentran los pigmentos ficocianina, aloficocianina y clorofila *a*.



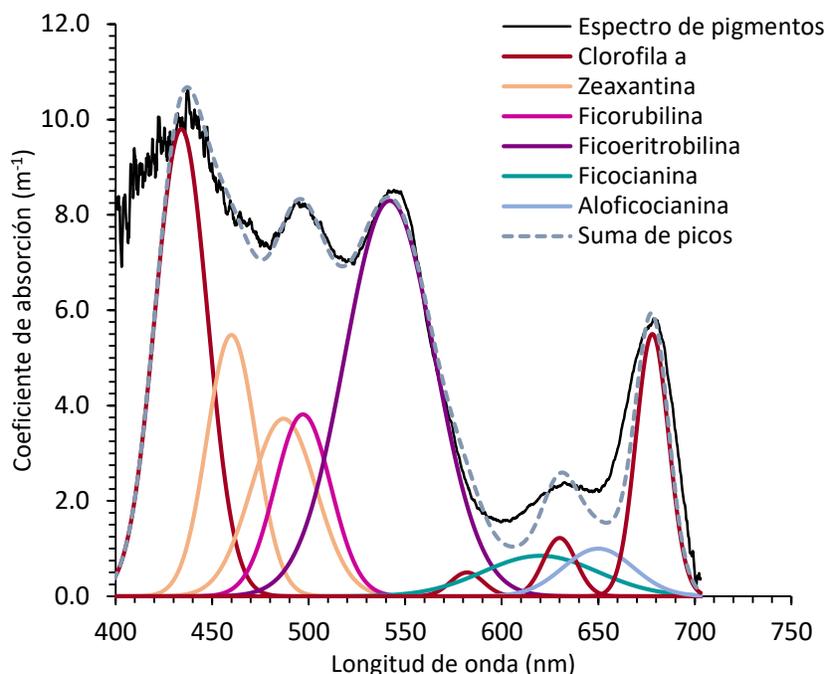
**Figura 10.** Descomposición espectral de cultivo incubado a alta irradiancia en LEDs 520 nm y medido en suspensión en dispositivo FoLiPAM.

Por su parte en la figura 11 se perciben los diferentes picos de pigmentos y la suma de dichos picos es ligeramente diferente a la del espectro de absorción medido en espectrofotómetro, específicamente en las longitudes de onda donde se encuentran las FBP ficocianina y aloficocianina, y la clorofila  $a$ .



**Figura 11.** Descomposición espectral de cultivo incubado a alta irradiancia en LEDs 520 nm y medido en filtro en espectrofotómetro.

Al igual que en la figura 11, los resultados observados en la figura 12 muestran diferencias en los espectros de absorción de pigmentos medidos y los obtenidos por la suma de picos de pigmentos. Estos se perciben principalmente en longitudes de onda entre 580 y 650 nm.



**Figura 12.** Descomposición espectral de cultivo incubado a alta irradiancia en LEDs 520 nm y medido en filtro en esfera integradora.

### 3.2 Extracción de Ficobiliproteínas.

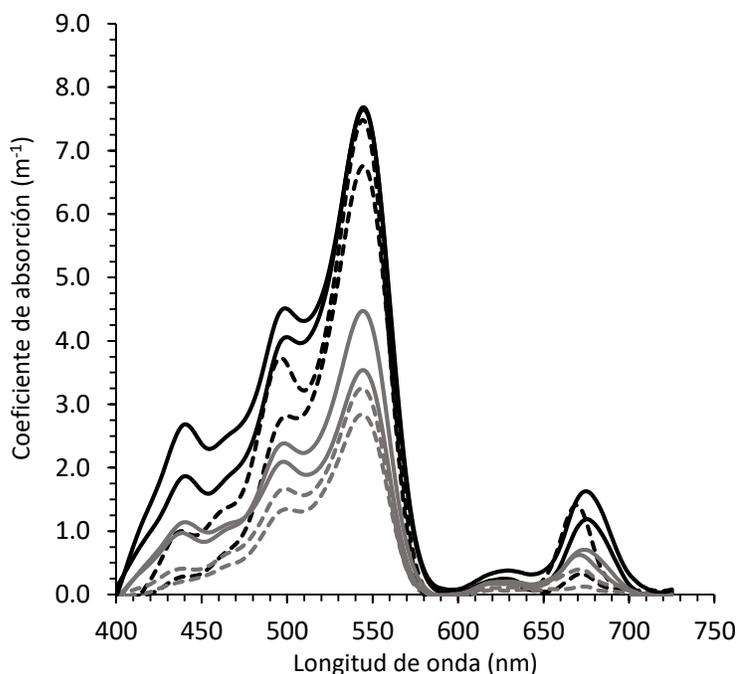
El proceso de extracción se ha estudiado en sus diferentes pasos, desde filtración, extracción química y física, hasta su medición. La estrategia para mejorar la eficiencia de extracción fue dividir en diferentes pasos el proceso de extracción, por experiencia en ensayos previos a este proyecto se realizó el rompimiento mecánico con agitación con perlas de silicato zirconio en Mini-Beadbeater, específicamente en la extracción química.

Adicionalmente, una vez obtenido el extracto y para remover partículas del filtro y perlas de silicato de zirconio se probó filtrar el extracto una vez centrifugado, asimismo para ver la posibilidad de utilizar filtración en vez de centrifugación para la limpieza del extracto, esto debido a la elevación de la temperatura durante la centrifugación y la posibilidad de degradación de las proteínas por incremento de temperatura.

### 3.2.1 Concentración de muestra por filtración

En trabajos previos a este proyecto por Valdez-Silva en el 2017 se obtuvo en ensayos experimentales una pérdida de la señal de FBP al concentrar la muestra en filtros de fibra de vidrio, GF/F, es por ello que se decidió probar concentrar las muestras en filtros de membrana Durapore (tratamiento uno, T1) y de fibra de vidrio GF/F (tratamiento dos, T2). La comparación se hizo con el siguiente tipo de extracción: se utilizó EDTA [20 mM], lisozima [ $2 \text{ mg mL}^{-1}$ ] y octanol [20%]. El octanol se ha utilizado para la eliminación de pigmentos apolares. En la figura 13 se observa la presencia de pigmentos para ambos tratamientos, es decir, tanto para muestras filtradas por Durapore como GF/F. Por otro lado, los picos entre 496, 545 y 620 nm se identifican como absorción de FBP.

A su vez, en esta figura se percibe la reducción de la señal de pigmentos entre el extracto limpiado por centrifugación y después de la filtración del mismo extracto. Se observa una reducción de 45% de la absorbancia para el tratamiento uno y 52% para el tratamiento dos del extracto después de ser filtrado. La reducción relativa es igual en los dos picos principales de FBP, ficorubilina (496 nm) y ficoeritrobilina (545 nm). Es notable el pico de clorofila *a* a 678 nm.



**Figura 13.** Espectros de absorción de extractos de muestras colectadas con diferentes tipos de filtro, Durapore (T1, línea punteada) y GF/F (T2, línea continua). Se muestran los extractos antes de filtrar (línea negra) y después de ser filtrado (línea gris). El cultivo de la muestra tenía  $6.12 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ .

### 3.2.2 Extracción química de FBP

La extracción se dividió en diferentes pasos para reducir la posibilidad de interferencia entre diferentes componentes del extracto y de esta manera aplicar tratamientos con más alta concentraciones. Entre cada tratamiento se minimiza el volumen del componente químico anterior, al final la solución del extracto es el puro amortiguador de fosfatos, sin detergentes ni enzimas empleadas para facilitar la extracción. Aquí se mostrará solo los resultados de los últimos experimentos con mayor margen de éxito.

#### 3.2.2.1 Aplicación de diferentes condiciones de EDTA y enzimas

La membrana externa de las bacterias gram negativas se compone de lipopolisacáridos, complejos macromoleculares que funcionan como un recubrimiento hidrofílico. Las moléculas de lipopolisacáridos se encuentran electrostáticamente unidas por cationes divalentes (*e. g.* Mg<sup>+2</sup> y Ca<sup>+2</sup>), los cuales contribuyen significativamente en la resistencia ante agentes antimicrobianos hidrofóbicos. Los cationes divalentes encontrados en la región del núcleo de lipopolisacáridos son esenciales para la estabilidad de la estructura de la membrana externa. Existen algunos agentes químicos (*e. g.* EDTA y antibióticos) que permeabilizan la membrana exterior de tal forma que libera lipopolisacáridos y resulta en una barrera menos efectiva a solutos (Clifton *et al.*, 2015; Sahalan *et al.*, 2013; Voss, 1967).

Con la finalidad de mejorar la eficiencia de extracción se incorporó EDTA y enzimas a la metodología. EDTA es un agente quelante que interfiere con la estabilidad de la membrana externa al capturar y remover de sus sitios de unión a los cationes divalentes (*e. g.* Mg<sup>+2</sup>, Ca<sup>+2</sup> y Fe<sup>+2</sup>). De esta forma hacer permeable la membrana y facilitar la introducción de enzimas al interior.

Por la parte de enzimas se utilizó mutanolisina y lisozima, estas son péptidoglicano hidrolasas. El péptidoglicano es uno de los principales constituyentes de la pared celular de las bacterias, el cual determina la forma de la célula y provee resistencia a presión osmótica. La red de péptidoglicanos consiste en filamentos de glicanos compuestos de forma alterna de N-acetil-glucosamina y N-acetil-murámico reticulados por péptidos de diversas composiciones. Existen diversas péptidoglicano hidrolasas, las cuales son reconocidas por alterar la red tridimensional de la pared celular, estas son enzimas capaces de romper los enlaces covalentes en el péptidoglicano. Las tipo  $\beta$ -N-acetil-muramidasa, como lo son mutanolisina y

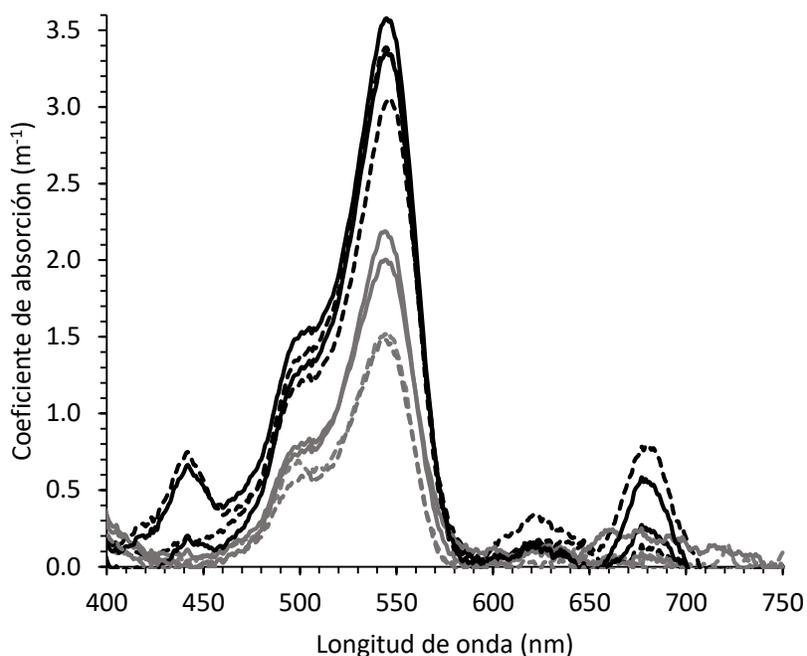
lisozima, hidrolizan específicamente los enlaces 1-4  $\beta$  entre el N-acetil-murámico y N-acetil-glucosamina, es decir el polímero péptidoglicano-polisacárido (Najjari *et al.*, 2016).

En la figura 14 se presenta el coeficiente de absorción *in vitro* ( $a_{vitro}$ ) de pigmentos extraídos mediante la metodología estándar con modificaciones en el pre-tratamiento químico, en dicha extracción se colectó la muestra con filtros Durapore y se utilizó EDTA [10 mM] más detergente triton-X100 al 2% y lisozima [2 mg mL<sup>-1</sup>]. Para este tratamiento probaron diferentes temperaturas de incubación de la lisozima, con incubación de 30 min a temperatura ambiente (tratamiento uno, T1) y a 37 °C (tratamiento dos, T2). A su vez, para comprobar que la señal observada era del extracto libre de partículas se realizaron filtrado de los extractos. En la figura 14, ambos tratamientos presentan señal de pigmentos después de la filtración de los extractos, los picos entre 496, 545 y 620 nm se identifican como absorción de FBP. Sin embargo, también hay presencia de otros pigmentos como clorofila *a* (440 y 678 nm) y xantofilas (440 nm). En esta figura se observa claramente una reducción de alrededor de 55% de la señal de FBP después de ser filtrado el extracto para ambos tratamientos. La disminución de los picos de clorofila *a* y xantofilas era proporcionalmente más grande, lo que sugiere que estaban asociadas con las partículas. La disminución de absorción de la curva de pigmentos en los extractos filtrados en comparación a los sin filtrar sugiere hay una disolución parcial de pigmentos y el resto se encuentra todavía intracelularmente o asociado a remanentes celulares.

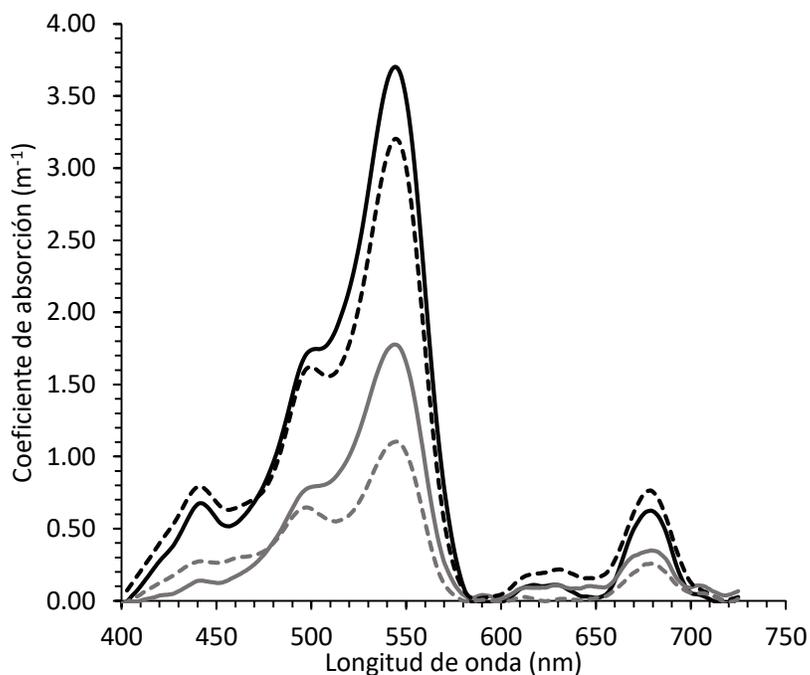
Por otro lado, se aprecia una muy ligera diferencia en el coeficiente de absorción entre tratamientos, lo que sugiere que la incubación a 37 °C podría favorecer la extracción de FBP.

Adicionalmente a las pruebas con diferentes temperaturas de incubación de la lisozima, y dado a los resultados obtenidos (figura 14) se experimentó con tiempos de incubación de la lisozima: incubación de 30 min y 60 min ambas a 37 °C. En dicha extracción se utilizó EDTA [10 mM] más detergente triton-X100 al 2% y lisozima [2 mg mL<sup>-1</sup>]. En la figura 15 se presentan los resultados de esta prueba y se observa una señal del extracto antes y después de ser filtrado, en la cual, al igual que en la figura 14 es clara la disminución de la señal de pigmentos después de la filtración del extracto con un 58% para el tratamiento uno y 47% para el tratamiento dos. En ambos tratamientos se observa señal de pigmentos, tanto de FBP en los picos entre 496, 545 y 620 nm, identificados como ficorubilina, ficoeritrubilina y ficocianina respectivamente. Todavía se encuentran pigmentos apolares, clorofila *a* y xantofilas en el extracto. Aunque el coeficiente de absorción del tratamiento dos con tiempo de incubación de 60 min es

ligeramente mayor al tratamiento uno, no se aprecian diferencias con los coeficientes de absorción de la figura 14, en dónde los tiempos de incubación fueron de 30 min.

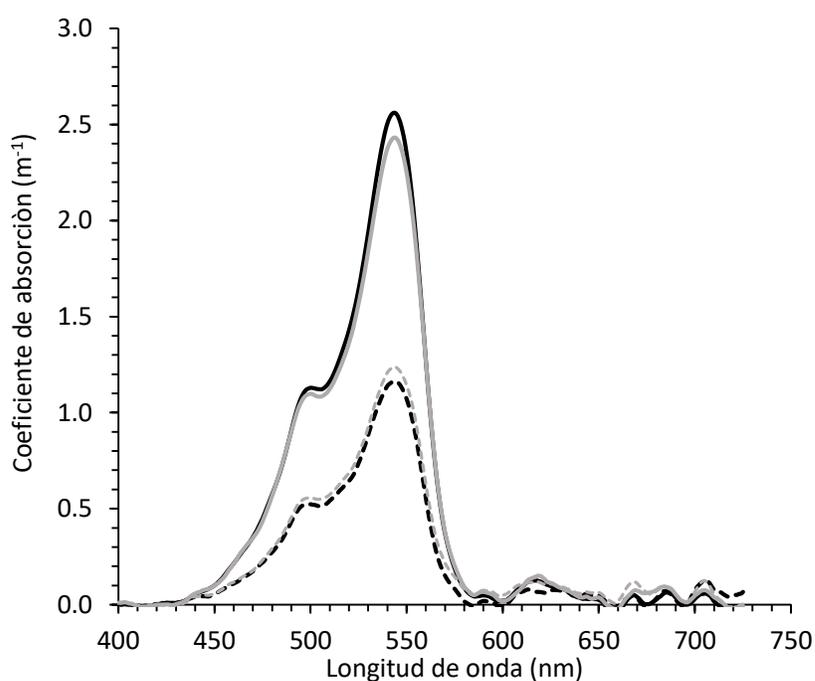


**Figura 14.** Espectros de absorción de extractos de muestras con diferente temperatura de incubación de la lisozima. Incubación a temperatura ambiente (T1, línea punteada) y a 37 °C (T2, línea continua). Se muestra el extracto antes de filtrar (línea negra) y después de ser filtrado (línea gris). El cultivo de la muestra tenía  $2.223 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup>.



**Figura 15.** Espectros de absorción de extractos de muestras con diferente tiempo de incubación de la lisozima a 37 °C, variando de 30 min (Tratamiento uno, línea punteada) y de 60 min (Tratamiento dos, línea continua). Se muestra el extracto antes de filtrar (línea negra) y después de ser filtrado (línea gris). El cultivo de la muestra tenía  $2.31 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup>.

Se realizaron extracciones de FBP con modificaciones en la parte de pre-tratamiento químico de la metodología estándar, en la que se incorporó la enzima mutanolisina [ $50 \text{ U L}^{-1}$ ] y se incrementó la concentración de lisozima de  $2 \text{ mg mL}^{-1}$  a  $15 \text{ mg mL}^{-1}$ , asimismo se utilizó EDTA [ $20 \text{ mM}$ ]. En las muestras que fueron tratadas con mutanolisina no se observó mejora en la extracción. La extracción continúa con el problema de que al filtrar el extracto se reduce alrededor del 50% la absorbancia (figura 16). Es notable que no se perciben pigmentos polares como en extractos anteriores, sin embargo, todavía es fuerte la reducción de la absorción del extracto después de ser filtrado, lo que sugiere que las FBP solo están disueltas parcialmente en el extracto. A su vez, el coeficiente de absorción en los picos de FBP es menor a tratamientos previos donde no se ha utilizado mutanolisina. Al igual que en extracciones de FBP mostradas anteriormente, se observan los picos identificados como FBP a 496, 545 y 620 nm, sin embargo, ahora no se perciben los pigmentos apolares a 430-450 y 680 nm.

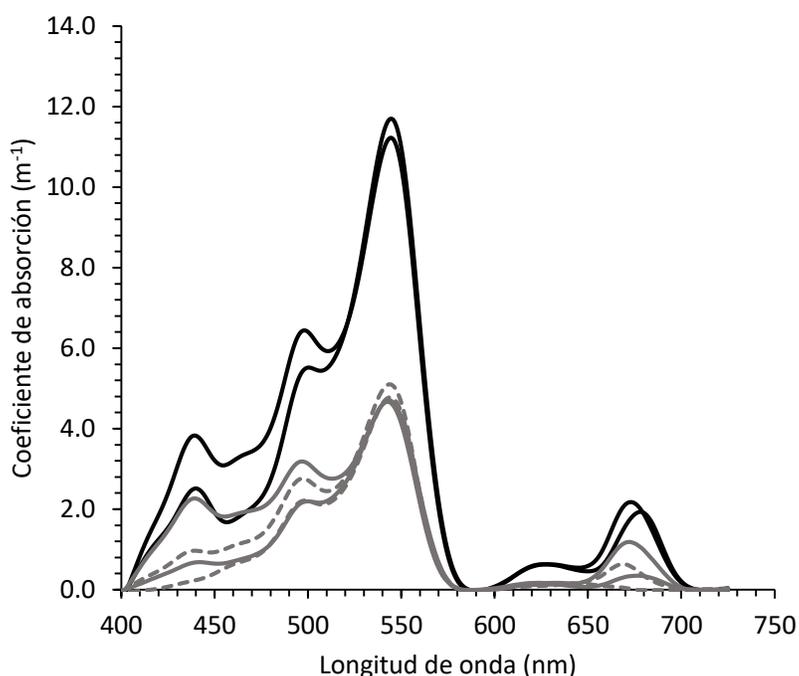


**Figura 16.** Espectros de absorción de extractos de muestras sin mutanolisina (línea negra) y con mutanolisina (línea gris). A su vez, se muestra el extracto después de ser filtrado para ambos tratamientos (líneas punteadas). El cultivo de la muestra tenía  $1.64 \times 10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$ .

### 3.2.3 Tratamiento con solventes orgánicos post-extracción

Dado la inesperada presencia de clorofila *a* en las extracciones de FBP, se realizaron pruebas con solventes orgánicos, como octanol y propanol, para reducir la concentración de clorofila *a* y otros posibles pigmentos

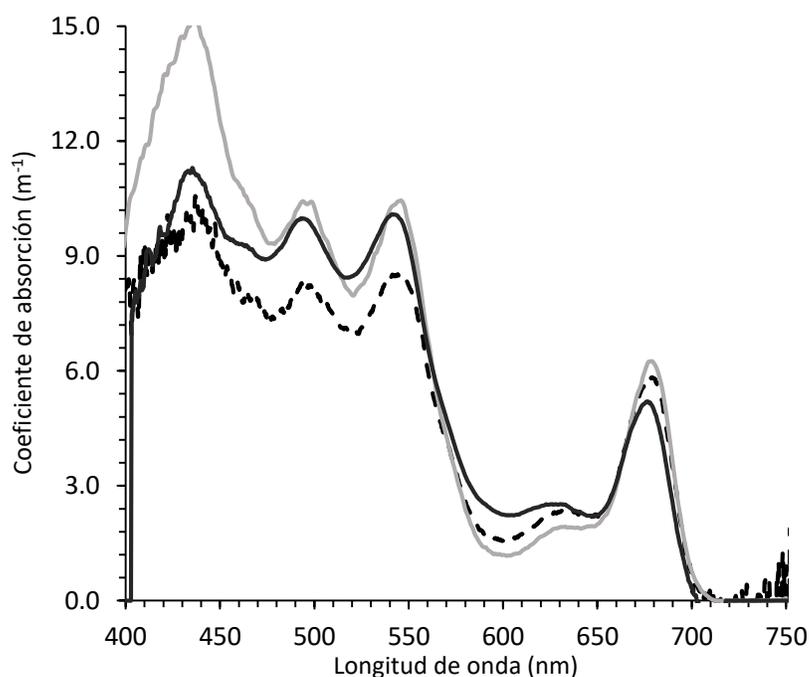
apolares en los extractos. Para este fin, se analizó el extracto en espectrofotómetro después del rompimiento físico y químico. Una vez medido el extracto, este se filtró y se adicionaron los solventes orgánicos para extracción líquido-líquido. La fase apolar con las FBP se midió nuevamente en espectrofotómetro. En la figura 17 se presenta el coeficiente de absorción de pigmentos extraídos mediante el uso de EDTA [20 mM] y lisozima [2 mg mL<sup>-1</sup>]. Para este tratamiento se ha integrado la extracción líquida con el uso de solventes orgánicos, octanol y propanol. En dicha figura, ambos tratamientos presentan señal de pigmentos después de la filtración de los extractos, sin embargo, se percibe una reducción evidente de la señal de pigmentos después de ser filtrado el extracto, en donde se observa una disminución del 52% de la señal de absorción del extracto sin filtrar para el tratado con octanol y 41% con propanol. Los hombros entre 495, 545 y 620 nm se identifican como absorción de FBP. A su vez, con el uso de solventes post-extracción se observa una reducción en la presencia de pigmentos apolares como clorofila *a*, y posiblemente zeaxantina y otros carotenoides.



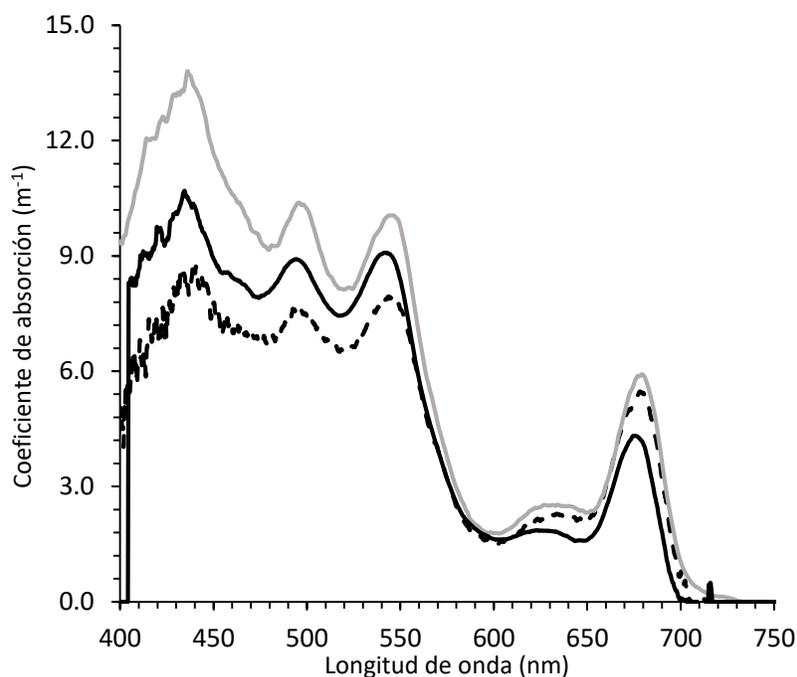
**Figura 17.** Espectros de absorción de extractos de muestras tratadas con solventes orgánicos. La línea gris continua corresponde a la disolución tratada con propanol y la gris punteada con octanol. Asimismo, se muestra el extracto antes de filtrar (línea negra) y después de ser filtrado (línea gris). El cultivo de la muestra tenía  $1.64 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup>.

### 3.3 Comparación entre espectros de absorción *in vivo* en espectrofotómetro, esfera integradora (Ulbrich) y FoLiPAM.

En este trabajo se han utilizado tres diferentes métodos para documentar espectros de absorción *in vivo*: **A)** espectrofotómetro (Quantitative Filter Technique) con corrección de absorción de materia orgánica excluyendo pigmentos, restando el coeficiente de absorción de la muestra tratado con chlorox, y de “pathlength elongation” (Boss *et al.*, 2018) **B)** Medición del mismo filtro usado para método A en esfera integradora (Ulbrich) con corrección de la muestra decolorada, y de “pathlength elongation” (Boss *et al.*, 2018) **C)** FoLiPAM con cultivo en suspensión en medio, sin correcciones. Los tres métodos resultan espectros relativamente similares (figura 18 y 19). Se identifican los picos de pigmentos de 495, 545 y 620 nm como absorción de FBP, asimismo, se observan pigmentos apolares como clorofila *a* y carotenoides.



**Figura 18.** Espectros de absorción *in vivo* de cultivos crecidos con luz de LEDs de 520 nm a alta irradiancia ( $13 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) medidos en suspensión con FoLiPAM (línea negra continua), y filtrados y medidos con espectrofotómetro (línea gris continua), y esfera integradora (línea negra punteada).

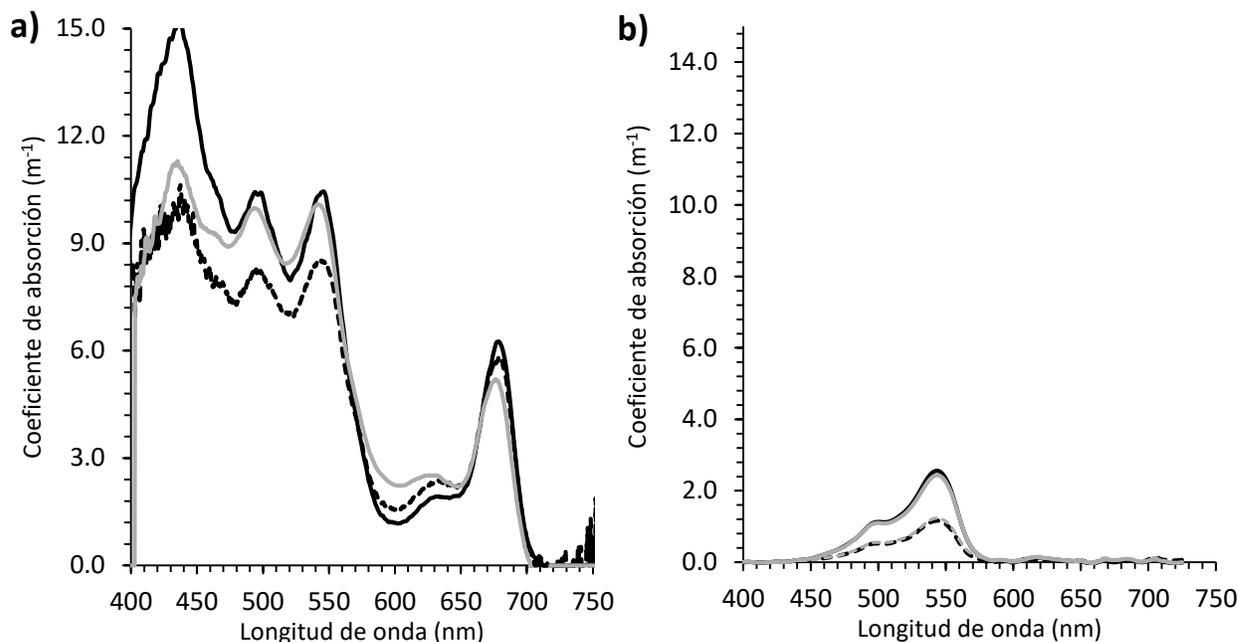


**Figura 19.** Espectros de absorción *in vivo* de cultivos crecidos con luz de LEDs de 510 nm a alta irradiancia ( $13 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) medidos en suspensión con FoLiPAM (línea negra continua), y filtrados y medidos con espectrofotómetro (línea gris continua), y esfera integradora (línea negra punteada).

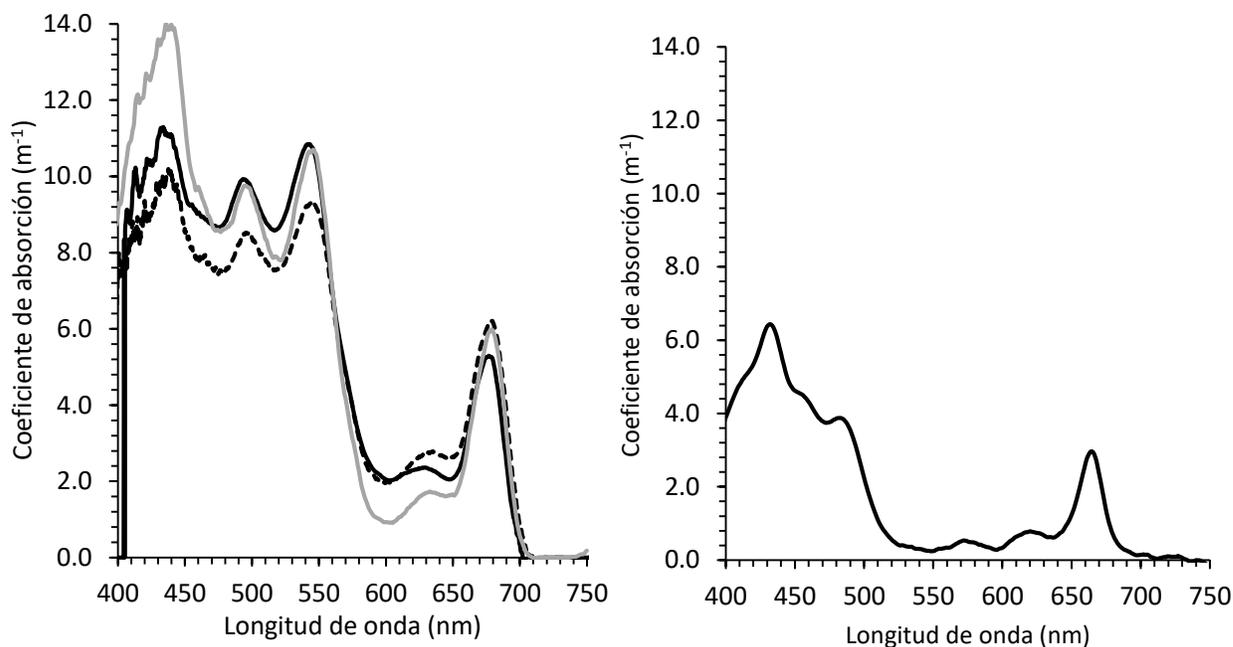
### 3.4 Comparación entre espectros de absorción *in vivo* e *in vitro* (extractos)

Como parte de la identificación de pigmentos y para estimar la contribución de las FBP en las mediciones de absorción *in vivo*, se hace una comparación entre mediciones *in vitro* (extracto) e *in vivo* de espectrofotómetro, esfera integradora (Ulbrich) y FoLiPAM. Se observa en cada medición que la absorción *in vitro* de los picos de FBP (figura 20b) es menor que la absorción *in vivo* (figura 20a), asimismo, se percibe un ligero desplazamiento de los máximos de absorción, en donde para la extracción el máximo de absorción de la ficoeritrobilina se encuentra a 545 nm y la ficorubilina a 497 nm, mientras que para las mediciones *in vivo* se observa a los 542 nm y a 490 nm respectivamente. La diferencia entre la absorción *in vivo* e *in vitro* y el desplazamiento de los máximos de absorción también se observa en extractos de pigmentos apolares (figura 21). La clorofila *a* presenta el máximo de absorción a 434, 580, 630 y 667 nm en los extractos *in vitro* y a 432 y 676 nm *in vivo* medido con FoLiPAM, mientras que para espectrofotómetro y esfera integradora se encuentran a 434 y 678 nm. En las mediciones *in vivo* es difícil

identificar el máximo de absorción de la clorofila *a* que se observa *in vitro* a 580 y 630 nm, ya que a esas longitudes de onda hay contribución de FBP.



**Figura 20.** Espectros de absorción *in vivo* e *in vitro* (extracto de FBP) de cultivos crecidos con luz de LEDs de 520 nm a alta irradiancia ( $3.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). **a)** Espectro de absorción *in vivo* medidos en suspensión con FoLiPAM (línea negra), y filtrados y medidos con espectrofotómetro (línea gris), y esfera integradora (línea negra punteada). **b)** Espectros de absorción *in vitro* de pigmentos extraídos con modificaciones en el pre-tratamiento químico de la metodología, adicionando en ambos tratamientos EDTA [20 mM] y lisozima [ $15 \text{ mg mL}^{-1}$ ] pero con la diferencia en la añadidura de mutanolisina, sin mutanolisina (Tratamiento 1, línea negra) y con mutanolisina (Tratamiento 2, línea gris). A su vez, se muestra el extracto después de ser filtrado para ambos tratamientos (líneas punteadas). Los espectros *in vivo* e *in vitro* son corregidos por línea base.



**Figura 21.** Espectros de absorción *in vivo* e *in vitro* (extracto acetona) de cultivos crecidos con luz de LEDs de 520 nm a baja irradiancia ( $3.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). **a)** Espectros de absorción *in vivo* medidos en suspensión con FoLiPAM (línea negra), y filtrados y medidos con espectrofotómetro (línea gris), y esfera integradora (línea negra punteada). **b)** Espectros absorción *in vitro* de pigmentos extraídos con acetona al 90%. Los espectros *in vivo* e *in vitro* son corregidos por línea base.

## Capítulo 4. Discusión

---

El grupo de cianobacterias es reconocido por su amplia distribución, abundancia y contribución en la producción primaria global. Presentan una diversidad única en pigmentos fotosintéticos, debido a sus pigmentos accesorios, las FBP, los cuales le permiten habitar un amplio rango de nichos en el océano, especialmente las zonas ligeramente más profundas donde la luz que predomina es la azul-verde. (Alberte *et al.*, 1984; Grébert *et al.*, 2018). Sin embargo, la información desarrollada sobre FBP en el océano es relativamente escasa, esto dado a que no se ha encontrado una manera eficiente de extraerlas de muestras naturales marinas (Lawrenz *et al.*, 2010; Sobiechowska-Sasim *et al.*, 2014; Zimba, 2012). El conocimiento de propiedades ópticas de FBP *in situ* permitiría investigar procesos como la importancia relativa de esta clase de pigmentos fotosintéticos, el potencial que tienen en espectros de reflectancia superficial del océano, absorciones específicas o en general el potencial para captar fotones para la fotosíntesis (eficiencia cuántica de fotosíntesis) y procesos de aclimatación a los espectros de luz en el océano (Sobiechowska-Sasim *et al.*, 2014; Yacobi *et al.*, 2015).

Las FBP son pigmentos polares, es decir, hidrofílicas, por lo que su extracción requiere solventes acuosos, por lo tanto, no pueden cuantificarse en conjunto con la clorofila y carotenoides, los cuales usualmente son extraídos con solventes orgánicos (Jeffrey *et al.*, 1997; Lawrenz *et al.*, 2010). Para obtener una extracción eficiente se requiere hacer lisis celular, sin embargo, la lisis celular de cianobacterias no es sencilla; el problema de la extracción eficiente también existe para pigmentos como clorofila y xantofilas porque la extracción de los pigmentos lipófilicos con acetona al 90% es incompleta a diferencia de con otro fitoplancton. Para cianobacterias es necesario la adición de DMSO:acetona 90% (Diaz y Maske, 2000) o metanol (Jeffrey *et al.*, 1997) en especial para células de *Synechococcus*, ya que están protegidas por paredes celulares gruesas y complejas, compuesta de una capa gruesa de péptidoglicano altamente reticulada, y una cobertura de proteínas polimerizadas y exopolisacáridos (Golecki, 1979; Hoiczky y Hansel, 2000; Mehta *et al.*, 2015). En la búsqueda de una extracción eficiente se ha probado diferentes estrategias, dentro de las cuales se encuentra tratamiento de congelación y descongelación, rompimiento físico (agitación con Mini-BeadBeater), desintegración de la membrana por medio de diferentes enzimas (lisozima, mutanolisina), permeabilización con EDTA al debilitar la formación de las estructuras electrostáticas con Calcio.

En el trabajo experimental se ha buscado optimizar la colecta del cultivo por medio de monitoreo óptico no-destructivo del desarrollo de los cultivos con mediciones diarias, esto para hacer la toma de muestras de cultivo para extracción durante la etapa de crecimiento exponencial, ya que se ha reportado el

blanqueamiento y disminución en el contenido de FBP en *Synechococcus* bajo condiciones de limitación de nutrientes, específicamente nitrógeno (Allen y Smith, 1969; Collier y Grossman, 1992; Gombos y Vigh, 1986; Richaud *et al.*, 2001). El dispositivo FoLiPAM permite ver cambios en el espectro de absorción con el tiempo, lo cual permite calcular tasas de crecimiento de pigmentos. Cabe mencionar que este método de monitoreo de cultivos se encuentra en proceso de patentar, de modo que no se incluye una descripción del dispositivo en la parte públicamente accesible de este trabajo. Al mismo tiempo de la colecta de muestras del cultivo para extracción se han tomado muestras para mediciones *in vivo*, esto permite la comparación de la absorción cuantitativa con la absorción de los extractos. La absorción *in vivo* se midió por dos métodos bien establecidos (quantitive filter methods) y los resultados muestran similitud con los espectros obtenidos con el monitoreo mediante el dispositivo FoLiPAM.

Los espectros obtenidos en los últimos experimentos muestran cuantitativamente su carácter espectral pero los picos de pigmentos en la absorción *in vitro* solo comprenden el 60% de la absorción *in vivo* de clorofila, y alrededor de 50% de la absorción en las bandas de FBP que muestra la absorción *in vivo*. Existen diferentes explicaciones posibles de la baja absorbancia *in vitro*: Se infiere había destrucción de pigmentos durante el proceso de extracción, el cual incluye péptidoglicano hidrolasas (lisozima y mutanolisina), quienes posiblemente tienen el potencial destructivo para las FBP. También el coeficiente específico de los FBP pueden ser menor *in vitro* considerando que los pigmentos fotosintéticos *in vivo* son acomodados en complejos moleculares, rompiendo estos complejos cambia las propiedades ópticas, por ejemplo, la longitud de onda del máximo del pico.

La investigación de este proyecto se enfocó en encontrar un método eficiente para extracción de FBP en muestras oceánicas. Con el último protocolo de extracción se observó que el extracto ya no presenta pigmentos polares como la clorofila y xantofilas, sin embargo, actualmente todavía no se tiene un método que pueda ser recomendado para ser utilizado en muestras naturales marinas. El problema en la extracción probablemente no solo aplica en las FBP, sino también a otros componentes celulares como material genético. En futuros ensayos para mejorar el método de extracción de FBP, se sugiere la disminución en concentración del uso de péptidoglicano hidrolasas (lisozima y mutanolisina) y que el proceso de extracción se enfoque más en diferentes métodos de rompimiento físicos, desde ultra sonido hasta en presión con prensa francesa. Este proyecto de investigación ha logrado desarrollar un dispositivo para el monitoreo no-destructivo de cultivos de microbios con base a propiedades de atenuación de la luz, que evita el problema de la dependencia de la autofluorescencia del estado fotofisiológico del organismo durante el día.

#### 4.1 Serie de tiempo de espectros de pigmentos con FoLiPAM: tasa de crecimiento para diferentes pigmentos.

Los pigmentos accesorios, FBP, son muy variables en relación a la biomasa de las cianobacterias. La abundancia de sus pigmentos y otros componentes en el sistema fotosintético varía con las condiciones ambientales, como lo son la calidad y cantidad de luz, así como la presencia de nutrientes. El crecimiento con limitación de nutrientes en cianobacterias no fijadoras de nitrógeno induce una serie de respuestas, incluyendo la disminución en la división celular y alteraciones morfológicas y fisiológicas, como la pérdida de membranas fotosintéticas y pigmentos (Collier y Grossman, 1992; Richaud *et al.*, 2001).

En relación con lo anterior se calcularon las tasas de crecimiento y tiempo de generación por día basado en el coeficiente de absorción *in vivo* del pico de clorofila *a* (676 nm), asimismo se utilizó el pico de la FBP ficoeritrobilina (545 nm), para cultivos incubados en LEDs de 520 nm y LEDs de 510 nm. Las tasas de crecimiento basadas en el pico de clorofila *a* y ficoeritrobilina resultaron similares, lo cual se puede interpretar como que los cultivos se encontraban en etapa de crecimiento exponencial en el último día de monitoreo, esto dado a que se ha reportado el uso de FBP como fuente de nitrógeno cuando el cultivo está en decaimiento, es decir, en limitación del micronutriente nitrógeno, de forma que la tasa de crecimiento basada en el pico de la FBP ficoeritrobilina en un cultivo en decaimiento en teoría sería menor a la tasa de crecimiento calculada con base a el pico de clorofila *a*, ya que la clorofila *a* no es utilizada como fuente de nitrógeno, a diferencia de las FBP.

Las tasas de crecimiento tanto para cultivos incubados en LEDs de 510 nm como de 520 nm presentaron valores de  $0.32 \text{ d}^{-1}$  crecidas en flujos de fotones de  $13 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  y de  $0.15 \text{ d}^{-1}$  crecidas en flujos de fotones de  $3.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Por otro lado, los tiempos de generación para los cultivos incubados a altas irradiancias ( $13 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) resultaron de 1.8 días, por su parte en bajas irradiancias ( $3.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) fue de 2.5 días, esto para cultivos en ambas incubadoras (LEDs de 510 y 520 nm). Estos tiempos de generación son congruentes con lo reportado por otros autores para *Synechococcus* (Richaud *et al.*, 2001).

Aunque existe una gran variedad de pigmentación y diferentes genotipos adaptados a diversos niveles de irradiancia en células marinas de *Synechococcus*, estos pueden clasificarse en tres tipos de acuerdo a la composición de FBP. La cepa utilizada en este proyecto se clasifica dentro de las tipo tres, las cuales contienen los dos tipos de FE, y varían la proporción de sus cromóforos, ficorubilina y ficoeritrobilina, en

el ficobilisoma de acuerdo a la calidad y cantidad de luz (Bogorad, 1975; Humily *et al.*, 2013; Ong y Glazer, 1987; Palenik, 2001; Six *et al.*, 2007).

## 4.2 Descomposición espectral para identificación de picos de pigmentos

En soluciones y suspensiones las propiedades ópticas, como absorción, se suman linealmente hasta una cierta concentración, definida por la concentración límite del esparcimiento de un solo por fotón. Dentro de este rango, los espectros de absorción de diferentes pigmentos se suman, y este permite descomponer un espectro multi-pigmentario restando cada pigmento individualmente. La medición de la absorción de fitoplancton se realiza mediante células en suspensión o partículas concentradas en filtros de fibra de vidrio. La absorción específica *in vivo* de un pigmento es calculada por la división de la absorción a una longitud de onda específica por la concentración del pigmento en cuestión. En el caso de la clorofila *a* es más sencillo que con otros pigmentos, esto es debido a que el pico de absorción de la clorofila *a* se encuentra alejado espectralmente de otros pigmentos, y solamente está influenciado ligeramente por detritus y materia orgánica disuelta. La determinación de la contribución de otros pigmentos diferentes a la clorofila *a* es más complejo, dado el traslape entre varios pigmentos (Yacobi *et al.*, 2015).

Para aislar numéricamente los diferentes picos de diferentes pigmentos y determinar la contribución relativa de cada pigmento del espectro de absorción total, es necesario hacer una descomposición del espectro de absorción. Existen varias aplicaciones para la descomposición de espectros, en este trabajo se ha utilizado el programa Peakfit® (Systat Software, Inc) como lo reportado por Subramaniam y colaboradores en 1999 para la cianobacteria *Trichodesmium*. La descomposición de los espectros de absorción se realizó asumiendo distribución Gaussiana de cada pico y definiendo los parámetros de máximos de absorción y anchos de banda (Full Width at Half Maximum, FWHM) para cada pigmento. Pigmentos como las clorofilas tienen más de una banda de absorción. Se consideraron los pigmentos principales en el sistema fotosintético de *Synechococcus*, clorofila *a*, carotenoides y FBP. En las mediciones *in vivo* para el pigmento clorofila *a* se consideraron cuatro máximos de absorción, 435, 580, 630 y 676, mientras que para carotenoides dos máximos de absorción a 460 y 487 nm, por su parte las FBP presentan 4 cromóforos diferentes, ficoroubilina (495 nm), ficoeritrobilina (545 nm), FC (620 nm) y aloficocianina (650 nm) cada uno con su respectivo máximo de absorción. Los máximos de absorción y FWHM se definieron de acuerdo a lo encontrado en la literatura, asimismo, los FWHM también fueron calculados de espectros de absorción obtenidos de la literatura y resumidos en el anexo B.

Es notable que en la literatura existen diferencias en los máximos de absorción y las proporciones entre los diferentes máximos de absorción en los espectros de cada pigmento. Estos datos usualmente se encuentran disponibles en pigmentos extraídos con solventes, cada solvente cambia el carácter espectral de los pigmentos, a su vez, existen diferencias entre espectros *in vivo* e *in vitro*.

Los resultados de descomposición espectral mostraron máximos de absorción con ligeras diferencias a lo encontrado en la literatura, *e.g.* para el espectro de absorción medido en FoLiPAM, la ficorubilina presentó su máximo de absorción a 495 nm, mientras que la ficoeritrobilina a 540 nm, asimismo, los carotenoides a 460 y 487 nm. Es importante mencionar que estas diferencias entre los resultados obtenidos y la literatura se encuentran relacionadas con A) diferencias entre espectros *in vivo* e *in vitro* y B) el carácter espectral de los pigmentos dado el solvente o método de extracción utilizado.

### **4.3 Aspectos metodológicos en la extracción de FBP**

La extracción de FBP de células de cianobacterias es complejo dado su tamaño pequeño y su pared celular extremadamente gruesa y su estructura compuesta de múltiples capas (Kannaujiya *et al.*, 2017). Las extracciones de FBP pueden ser complejas y procesos largos, influenciados por la temperatura, tiempo de extracción, buffer y pH. Algunos protocolos para la cuantificación de FBP de fitoplancton han sido publicados anteriormente, sin embargo, todos difieren entre sí, en consecuencia, no existe un método estándar para cuantificar los extractos de pigmentos de microalgas (Lawrenz *et al.*, 2010; Sobiechowska-Sasim *et al.*, 2014; Viskari y Colyer, 2003; Zimba, 2012). En este trabajo para optimizar el método de extracción de FBP, de modo que sea rápido, eficiente y reproducible, se analizaron diferentes métodos de rompimiento celular, tanto físicos como químicos.

En el método trabajado por Valdez-Silva (2017) se documentó en extracciones de FBP la pérdida de la señal de pigmentos al utilizar filtros de fibra de vidrio. Con base a lo anterior en este trabajo se realizaron pruebas para comparar extracciones con diferentes filtros, membrana y fibra de vidrio, para esto se hicieron concentraciones de muestras de cultivos en filtros Durapore y GF/F (figura 13), sin embargo, no se obtuvieron resultados que implicaran la pérdida de señal de pigmentos entre los diferentes filtros. No se logró comprobar la eliminación de FBP cuando se concentra la muestra sobre filtros de GF/F como en ensayos de extracciones de FBP previas, dado que se obtuvo señal de pigmentos para ambos tipos de filtro (GF/F y Durapore).

Uno de los problemas asociados con extracción de FBP es la dificultad para romper la pared celular de cianobacterias, para esto se combinaron diferentes métodos químicos, dentro de los cuales se encuentran el uso de EDTA y enzimas (lisozima y mutanolisina). Con la finalidad de utilizar concentraciones más altas y que no tuvieran un efecto de dilución al mezclarse con el amortiguador, se realizaron incubaciones individuales para cada químico, es decir, se adicionaban por separado al filtro con muestra. Se definieron las concentraciones de acuerdo a lo reportado en la literatura para extracciones de ADN y proteínas, así como de pigmentos de diferentes organismos (anexo D) en donde la concentración comúnmente utilizada para EDTA es de 10 mM, mientras que para Lisozima se encuentra entre 1 y 2 mg mL<sup>-1</sup>.

Los análisis con EDTA mostraron una extracción más eficiente con concentraciones de 20 mM en comparación a 10 mM observados en las figuras 14 y 15, obteniendo alrededor del doble del coeficiente de absorción en muestras tratadas a 20 mM (figura 13 y 17), lo cual sugiere una mejor permeabilización de las células a mayor concentración de EDTA.

Adicionalmente se realizaron pruebas con lisozima, estas consistieron en diferentes temperaturas de incubación, 37 °C y ~23 °C (temperatura ambiente), las cuales resultaron en un coeficiente de absorción ligeramente mayor para las muestras incubadas a mayor temperatura mostrados en la figura 14, esto es congruente con la teoría de la energía de activación, en donde a mayor temperatura la velocidad de reacción incrementa. Sin embargo, resulta en diferencias entre ensayos de extracciones de este proyecto y previos, en donde en el método trabajado por Valdez-Silva (2017) se encontró una alta sensibilidad de FBP extraídas a temperaturas de ~30 °C. Debido a los resultados positivos obtenidos con temperaturas elevadas de incubación, se probaron extracciones con lisozima incubada a 37 °C con incremento en el tiempo de incubación de 30 a 60 min (figura 15). No se observó gran diferencia entre muestras incubadas por 30 y 60 min, y debido al objetivo de tener un método rápido y eficiente se continuaron los experimentos con incubaciones de 30 minutos.

Por su parte en las muestras tratadas con mutanolisina no se observó la clorofila *a*, asimismo, la señal de FBP no es tan alta como en pruebas previas, lo que sugiere una posible destrucción de FBP por las proteasas. Cabe mencionar que, aunque los tratamientos con y sin mutanolisina mostrados en la figura 16 resultan en coeficientes de absorción similares, en estas pruebas además de incluir mutanolisina dentro de la metodología se incrementó la concentración de lisozima de 2 mg mL<sup>-1</sup> a 15 mg mL<sup>-1</sup>, esto sugiere que se utilizaron concentraciones demasiado altas y se perdieron parte de las propiedades de las FBP en ambos tratamientos. Es notable la ausencia de clorofila *a* en este último análisis, en comparación a extractos previos, sin embargo, no podemos explicar el resultado con respecto a la clorofila *a*.

Con base a los resultados obtenidos con la presencia continua de pigmentos apolares, más específicamente clorofila  $a$ , se integró al método de extracción solventes orgánicos, con la finalidad de disminuir su presencia en los espectros de absorción. Los análisis se realizaron con octanol y propanol, estos se adicionaron una vez obtenido el extracto. Se redujo la presencia de clorofila  $a$  en los extractos, sin embargo, el tratamiento no elimina completamente la presencia de los pigmentos apolares.

Como parte la optimización de la extracción una vez obtenido el extracto y para remover partículas del filtro y perlas de silicato de zirconio se probó filtrar el extracto en vez de centrifugarlo, esto debido a la elevación de la temperatura durante la centrifugación y la posibilidad de degradación de las proteínas por incremento de temperatura. Sin embargo, al medir el extracto centrifugado, filtrarlo y volverlo a medir se obtuvo una menor señal de absorción de pigmentos. Se infiere que las FBP se encuentran asociadas a partículas en suspensión en el extracto. Por lo que cuando dicho extracto en suspensión es filtrado, en el filtrado se encuentran FBP disueltas, pero a concentraciones reducidas hasta aproximadamente la mitad.

En trabajos de extracciones de ficobiliproteínas no se ha considerado comparaciones con espectros *in vivo* o reportado el efecto de filtración del extracto. La falta de esta información en la literatura hace difícil la comparación de los resultados obtenidos con la literatura. En el filtro del extracto filtrado de las muestras se observan partículas, las cuales se infiere que son partes de células con ficobilisomas asociados. Se considera que el extracto previo a la filtración representa las ficobiliproteínas extraídas que pueden ser comparadas con lo que es reportado en la literatura, ya que los métodos publicados no filtran el extracto, sino que solamente lo centrifugan.

#### **4.4 Relación entre espectros de absorción *in vivo* en espectrofotómetro, esfera integradora (Ulbrich) y FoLiPAM.**

La medición de la absorción de fitoplancton se realiza mediante células en suspensión o partículas concentradas en filtros de fibra de vidrio. (Yacobi *et al.*, 2015). En este trabajo se han utilizado tres diferentes métodos para documentar espectros de absorción *in vivo*, FoLiPAM con células en suspensión en medio de cultivo, sin correcciones; filtración del cultivo en suspensión en filtros de fibra de vidrio y medición en espectrofotómetro (Quantitative Filter Technique) con corrección de “pathlength elongation” (Boss *et al.*, 2018) y medición del mismo filtro usado para método en espectrofotómetro en esfera integradora (Ulbrich) con corrección de “pathlength elongation” (Boss *et al.*, 2018). Estas mediciones

también son corregidas por el filtro de muestra blanqueado por chlorox después de su medición inicial. El tratamiento con chlorox elimina la absorción de orgánicos que no son pigmentos. Los métodos en espectrofotómetro y esfera integradora son métodos destructivos (cultivo utilizado para muestras filtradas), a diferencia de FoLiPAM, el cual es un método no-destructivo de la suspensión de cultivo. La comparación de resultados de espectros de absorción de los tres diferentes métodos resulta en espectros similares, con ligeras diferencias en máximos de absorción.

Adicionalmente se observan diferencias entre mediciones con los diferentes métodos utilizados en este trabajo. El espectro de absorción de pigmentos medidos en FoLiPAM, presentó máximos de absorción diferentes a los espectros de absorción medidos en espectrofotómetro y esfera integradora (anexo C). Las FBP ficorubilina y ficoeritrobilina tiene su máximo de absorción a 495 y 540 nm respectivamente, en mediciones en FoLiPAM, mientras que para mediciones en espectrofotómetro y esfera integradora se encuentran a 497 y 542 nm. Asimismo, la clorofila  $\alpha$  se observa con un máximo de absorción a 432 nm en mediciones con FoLiPAM y a 434 nm en mediciones con espectrofotómetro y esfera integradora.

#### **4.5 Contribución de las FBP en espectros de absorción de pigmentos *in vivo*.**

Se observa en cada medición que la absorción *in vitro* de los picos de ficobiliproteínas y pigmentos apolares es menor que la *in vivo*. Asimismo, hay un ligero desplazamiento de los máximos de absorción. Se ha considerado diferentes explicaciones: **A)** ajustes de una línea base recta entre 470 y 580 nm para estimar la contribución de los ficobiliproteínas a la absorción *in vivo*. **B)** Eficiencia de extracción menor de 100%. **C)** Reducción del coeficiente de absorción específica con el cambio de *in vivo* a *in vitro*. **D)** Degradación del cromóforo de los ficobiliproteínas durante la extracción.

Asimismo, en los extractos de pigmentos apolares se observan picos inesperados, a 580 y 630 nm, dado las características pigmentarias de la cepa utilizada en este trabajo y a el perfil pigmentario realizado en HPLC, se le atribuyen a picos de la clorofila  $\alpha$ . Esto es consistente con lo reportado por Morel y colaboradores en el 1993, quienes hacen una comparación de propiedades ópticas de *Synechococcus* y *Prochlorococcus*, al realizar una extracción en acetona y definen tres picos típicos de clorofila  $\alpha$  a 580, 620 y 664 nm.

## Capítulo 5. Conclusiones

---

En experimentos con cultivos de *Synechococcus* se logró un mejoramiento gradual de la extracción de FBP y se observó el efecto del tipo de filtros o sensibilidad a la temperatura en la eficiencia de extracción. Filtraciones de los extractos y comparación con espectros de absorción *in vivo* sugieren que el método aún requiere estudios experimentales para ser utilizado con muestras oceánicas. Los espectros de extractos de FBP (*in vitro*) mostraron un coeficiente de absorción mucho menor que los espectros *in vivo*, y un desplazamiento de los máximos de los picos de absorción. Para explicar dicho comportamiento se pueden considerar diferentes explicaciones: **A)** Contribución de pigmentos excluyendo FBP en el rango espectral entre 470 y 580 nm. Restando estos otros pigmentos se puede reducir la absorción *in vivo* de las FBP. **B)** Eficiencia de extracción menor de 100%. **C)** Reducción del coeficiente de absorción específica con el cambio de *in vivo* a *in vitro*. **D)** Degradación del cromóforo de las ficobiliproteínas durante la extracción.

Los experimentos con cultivos a distintas irradiancias ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) mostraron diferencia entre la irradiancia azul (510 nm), verde (520 nm) y naranja (610 nm, datos no presentados), con esta última sin favorecer el incremento del crecimiento de manera eficiente. No se han encontrado diferencias en tasas de crecimiento o composición pigmentaria en los espectros de absorción entre irradiancias azul y verde con los mismos niveles de irradiancia PAR. Las tasas de crecimiento con  $3.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fueron tasas de crecimiento específico dos veces más lentas en comparación a  $13 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Cabe mencionar que estos niveles de irradiancia corresponden a la luz encontrada en el límite inferior de la zona eufótica.

Se ha encontrado que la medición no-destrucciona de la atenuación de luz por los cultivos en suspensión permite el monitoreo del desarrollo de cultivos. La atenuación a longitudes de onda interpretadas como clorofila *a* y el pico principal que representa las FBP resultaron en estimaciones de tasas específicas de crecimiento similares.

## Literatura citada

---

- Abalde, J., Betancourt, L., Torres, E., Cid, A., Barwell, C. 1998. Purification and characterization of phycocyanin from the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. IO9201. *Plant Science*, 136(1), 109–120. doi:10.1016/S0168-9452(98)00113-7
- Alberte, R. S., Wood, A. M., Kursar, T. A., Guillard, R. R. L. 1984a. Novel Phycoerythrins in marine *Synechococcus* spp. : Characterization and evolutionary and ecological implications. *Plant Physiology*, 75(3), 732–739. doi:10.1104/pp.75.3.732
- Alberte, R. S., Wood, A. M., Kursar, T. A., Guillard, R. R. L. 1984b. Novel Phycoerythrins in Marine *Synechococcus* spp. : Characterization and Evolutionary and Ecological Implications. *Plant Physiology*, 75(3), 732–739. doi:10.1104/pp.75.3.732
- Allen, M. M., Smith, A. J. 1969. Nitrogen chlorosis in blue-green algae. *Archiv für Mikrobiologie*, 69(2), 114–120. doi:10.1007/BF00409755
- Apt, K. E., Collier, J. L., Grossman, A. R. 1995. Evolution of the phycobiliproteins. *Journal of Molecular Biology*, 248(1), 79–96. doi:10.1006/jmbi.1995.0203
- Bird, R. E., Riordan, C. 1986. Simple solar spectral model for direct and diffuse irradiance on horizontal and tilted planes at the earth's surface for cloudless atmospheres. *Journal of Climate & Applied Meteorology*, 25(1), 87–97. doi:10.1175/1520-0450(1986)025<0087:SSSMFD>2.0.CO;2
- Bogorad, L. 1975. Phycobiliproteins and Complementary Chromatic Adaptation. *Annual Review of Plant Physiology*, 26(1), 369–401. doi:10.1146/annurev.pp.26.060175.002101
- Boss, E., Sa, E. J. D., Freeman, S., Fry, E., Mueller, J. L., Pegau, S., Reynolds, R. A., Roesler, C., Rottgers, R., Stramski, D., Twardowski, M., Zaneveld, J. R. V, Boss, E., Sa, E. J. D., Fry, E., Mueller, J. L., Roesler, C., Rottgers, R., ... Zaneveld, J. R. V. 2018. *Ocean Optics & Biogeochemistry Protocols for Satellite Ocean Colour Sensor Validation. Volume 1 : Inherent Optical Property Measurements and Protocols : Absorption Coefficient (  $\mu_{\text{v}}$  ) (Vol. 1; A. R. Neeley, A. Mannino, Eds.)*. doi:10.25607/OBP-119
- Carr, N. G., Mann, N. H. 1994. The Oceanic Cyanobacterial Picoplankton. En D. A. Bryant (Ed.), *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers. pp. 27–48.
- Castenholz, R. W. 2015. General Characteristics of the Cyanobacteria . *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1–23. doi:10.1002/9781118960608.cbm00019
- Chalker, C., Hernandez, E., Schneider, J. E. J. 2018. Selectivity of lysis by Octanol-Water; application to harmful algae. *East Georgia State College, Swainsboro, GA 30401*. 3 pp.
- Clifton, L. A., Skoda, M. W. A., Le Brun, A. P., Ciesielski, F., Kuzmenko, I., Holt, S. A., Lakey, J. H. 2015. Effect of divalent cation removal on the structure of gram-negative bacterial outer membrane models. *Langmuir*, 31(1), 404–412. doi:10.1021/la504407v
- Collier, J. L., Grossman, A. R. 1992. Chlorosis Induced by Nutrient Deprivation in *Synechococcus* sp. Strain PCC 7942 : Not All Bleaching Is the Same. 174(14), 4718–4726.
- Diaz, C., Maske, H. 2000. Abundance of coccoid cyanobacteria, hydrographic parameters and the possible underestimation of *in situ* chlorophyll a in the northern Gulf of California and the Mexican California current. *Ciencias Marinas*, 26(3), 441–461.
- Flombaum, P., Gallegos, J. L., Gordillo, R. a, Rincón, J., Zabala, L. L., Jiao, N., Karl, D., Li, W., Lomas, M., Veneziano, D., Vera, C., Vrugt, J. a, Martiny, a C. 2013. Present and future global distributions of the

- marine Cyanobacteria *Prochlorococcus* and *Synechococcus*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 110(24), 9824–9829. doi:10.1073/pnas.1307701110/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1307701110
- Golecki, J. R. 1979. Ultrastructure of cell wall and thylakoid membranes of the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus lividus* under the influence of temperature shifts. Archives of Microbiology, 120(2), 125–133. doi:10.1007/BF00409098
- Gombos, Z., Vigh, L. 1986. Primary Role of the Cytoplasmic Membrane in Thermal Acclimation Evidenced in Nitrate-Starved Cells of the Blue-Green Alga, *Anacystis nidulans*. Plant Physiology, 80(2), 415–419. doi:10.1104/pp.80.2.415
- Grébert, T., Doré, H., Partensky, F., Farrant, G. K., Boss, E. S., Picheral, M., Guidi, L., Pesant, S., Scanlan, D. J., Wincker, P., Acinas, S. G., Kehoe, D. M., Garczarek, L. 2018. Light color acclimation is a key process in the global ocean distribution of *Synechococcus* cyanobacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1–10. doi:10.1073/pnas.1717069115
- Gupta, A., Sainis, J. K. 2010. Isolation of C-phycoyanin from *Synechococcus* sp., (*Anacystis nidulans* BD1). Journal of Applied Phycology, 22(3), 231–233. doi:10.1007/s10811-009-9449-2
- Hernandez, E., Chalker, C., Schneider, J. E. J. 2018. Stability Of Chlorophyll And Phycocyanine Extracted From Cyanobacteria With Octanol:Water Hernandez , Esmeralda ; Chalker , Cameron ; and Schneider , J. E. J., Jr ., East Georgia State College. 3 pp.
- Hoiczuk, E., Hansel, A. 2000. Cyanobacterial cell walls: News from an unusual prokaryotic envelope. Journal of Bacteriology, 182(5), 1191–1199. doi:10.1128/JB.182.5.1191-1199.2000
- Horváth, H., Kovács, A. W., Riddick, C., Présing, M. 2013. Extraction methods for phycocyanin determination in freshwater filamentous cyanobacteria and their application in a shallow lake. European Journal of Phycology, 48(3), 278–286. doi:10.1080/09670262.2013.821525
- Humily, F., Partensky, F., Six, C., Farrant, G. K., Ratin, M., Marie, D., Garczarek, L. 2013. A gene island with two possible configurations is involved in chromatic acclimation in marine *Synechococcus*. PLOS ONE, 8(12), 1–16. doi:10.1371/journal.pone.0084459
- Jeffrey, S. W., Mantoura, R. F. C., Wrigth, S. W. 1997. Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods. United Nations Educational Scientific and Cultural Organization: Paris.
- Kannaujiya, V. K., Sundaram, S., Sinha, R. P. 2017. Phycobiliproteins : Recent Developments and Future Applications. doi:https://doi.org/10.1007/978-981-10-6460-9 Library
- Lantoine, F., Neveux, J. 1997. Spatial and seasonal variations in abundance and spectral characteristics of phycoerithrins in the tropical northeastern Atlantic Ocean. Deep-Sea Research I, 44(2), 223–246.
- Lawrenz, E., Fedewa, E. J., Richardson, T. L. 2010. Extraction protocols for the quantification of phycobilins in aqueous phytoplankton extracts. Journal of Applied Phycology, 23(5), 865–871. doi:10.1007/s10811-010-9600-0
- Lawrenz, E., Fedewa, E. J., Richardson, T. L. 2011. Extraction protocols for the quantification of phycobilins in aqueous phytoplankton extracts. Journal of Applied Phycology, 23(5), 865–871. doi:10.1007/s10811-010-9600-0
- MacColl, R. 1998. Cyanobacterial phycobilisomes. Journal of Structural Biology, 124(2–3), 311–334. doi:10.1006/jsbi.1998.4062
- Mahmoud, R. M., Sanfilippo, J. E., Nguyen, A. A., Strnat, J. A., Partensky, F., Garczarek, L., El Kassem, N. A.,

- Kehoe, D. M., Schluchter, W. M. 2017. Adaptation to blue light in marine *Synechococcus* requires MpeU, an enzyme with similarity to phycoerythrobilin lyase isomerases. *Frontiers in Microbiology*, 8(FEB), 1–10. doi:10.3389/fmicb.2017.00243
- Mehta, K. K., Evitt, N. H., Swartz, J. R. 2015. Chemical lysis of cyanobacteria. *Journal of Biological Engineering*, 9(1). doi:10.1186/s13036-015-0007-y
- Méléder, V., Laviale, M., Jesus, B., Mouget, J. L., Lavaud, J., Kazemipour, F., Launeau, P., Barillé, L. 2013. *In vivo* estimation of pigment composition and optical absorption cross-section by spectroradiometry in four aquatic photosynthetic micro-organisms. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 129, 115–124. doi:10.1016/j.jphotobiol.2013.10.005
- Morel, A., Yu-Hwan Ahn, Partensky, F., Vaultot, D., Claustre, H. 1993. *Prochlorococcus* and *Synechococcus*: a comparative study of their optical properties in relation to their size and pigmentation. *Journal of Marine Research*, 51(3), 617–649. doi:10.1357/0022240933223963
- Najjari, A., Amairi, H., Chaillou, S., Mora, D., Boudabous, A., Zagorec, M., Ouzari, H. 2016. Phenotypic and genotypic characterization of peptidoglycan hydrolases of *Lactobacillus sakei*. *Journal of Advanced Research*, 7(1), 155–163. doi:10.1016/j.jare.2015.04.004
- Ong, L. J., Glazer, A. N. 1987. R-Phycocyanin II, a New Phycocyanin Occurring in Marine *Synechococcus* Species. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(13), 6323–6327.
- Palenik, B. 2001. Chromatic Adaptation in Marine *Synechococcus* Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(2), 991–994. doi:10.1128/AEM.67.2.991
- Partensky, F., Blanchot, J., Vaultot, D. 1999. Differential distribution and ecology of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* in oceanic waters: a review. *Bull. Inst. Oceanogr.*, 19(1999), 457–475.
- Pinto Rodrigues, R. D., de Castro, F. C., Santiago-Aguiar, R. S. de, Ponte Rocha, M. V. 2018. Ultrasound-assisted extraction of phycobiliproteins from *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* using protic ionic liquids as solvent. *Algal Research*, 31(March), 454–462. doi:10.1016/j.algal.2018.02.021
- Richaud, C., Zabulon, G., Joder, A., Thomas, J. C. 2001. Nitrogen or sulfur starvation differentially affects phycobilisome degradation and expression of the *nblA* gene in *Synechocystis* strain PCC 6803. *Journal of Bacteriology*, 183(10), 2989–2994. doi:10.1128/JB.183.10.2989-2994.2001
- Ruiz de la Torre, M. C. 2007. EN ECOLOGÍA MARINA PACÍFICO MEXICANO , BÚSQUEDA DE DIFERENCIAS que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS Presenta : MARY CARMEN RUIZ DE LA TORRE. CICESE. 82 pp.
- Sahalan, A. Z., Abdul, A. H., Lian, H. H., Mohamed, M. K. 2013. Divalent CATIONS (Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>) protect bacterial outer membrane damage by polymyxin B. *Sains Malaysiana*, 42(3), 301–306.
- Sanfilippo, J. E., Nguyen, A. A., Karty, J. A., Shukla, A., Schluchter, W. M., Garczarek, L., Partensky, F., Kehoe, D. M. 2016. Self-regulating genomic island encoding tandem regulators confers chromatic acclimation to marine *Synechococcus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(21), 6077–6082. doi:10.1073/pnas.1600625113
- Sekar, S., Chandramohan, M. 2008. Phycobiliproteins as a commodity: Trends in applied research, patents and commercialization. *Journal of Applied Phycology*, 20(2), 113–136. doi:10.1007/s10811-007-9188-1
- Sidler, W. A. 1994. Phycobilisome and Phycobiliprotein Structures. *The Molecular Biology of Cyanobacteria*, 139–216.

- Six, C., Thomas, J. C., Garczarek, L., Ostrowski, M., Dufresne, A., Blot, N., Scanlan, D. J., Partensky, F. 2007. Diversity and evolution of phycobilisomes in marine *Synechococcus* spp.: A comparative genomics study. *Genome Biology*, 8(12). doi:10.1186/gb-2007-8-12-r259
- Sobiechowska-Sasim, M., Stoń-Egiert, J., Kosakowska, A. 2014. Quantitative analysis of extracted phycobilin pigments in cyanobacteria—an assessment of spectrophotometric and spectrofluorometric methods. *Journal of Applied Phycology*, 26(5), 2065–2074. doi:10.1007/s10811-014-0244-3
- Subramaniam, A., Carpenter, E. J., Falkowski, P. G. 1999. Bio-optical properties of the marine diazotrophic cyanobacteria *Trichodesmium* spp. II. A reflectance model for remote sensing. *Limnology and Oceanography*, 44(3 I), 618–627. doi:10.4319/lo.1999.44.3.0618
- Tandeau de Marsac, N. 1977. Occurrence and nature of chromatic adaption in cyanobacteria. *Journal of bacteriology*, 130(1), 82–91.
- Ting, C. S., Rocap, G., King, J., Chisholm, S. W. 2002. Cyanobacterial photosynthesis in the oceans: The origins and significance of divergent light-harvesting strategies. *Trends in Microbiology*, 10(3), 134–142. doi:10.1016/S0966-842X(02)02319-3
- Valdez-Silva, E. 2017. Aspectos Metodológicos En La Medición De La Absorción *in vivo* E *in vitro* De Ficobiliproteínas. Universidad Autónoma de Baja California. 30 pp.
- Viskari, P. J., Colyer, C. L. 2003. Rapid extraction of phycobiliproteins from cultured cyanobacteria samples. *Analytical Biochemistry*, 319(2), 263–271. doi:10.1016/S0003-2697(03)00294-X
- Voss, J. G. 1967. Effects of organic cations on the gram-negative cell wall and their bactericidal activity with ethylenediaminetetra-acetate and surface active agents. *Journal of general microbiology*, 48(3), 391–400. doi:10.1099/00221287-48-3-391
- Waterbury, J. B., Watson, S. W., Guillard, R. R. L., Brand, L. E. 1979. Widespread occurrence of a unicellular, marine, planktonic, cyanobacterium. *Nature*, 277, 293–294.
- Yacobi, Y. Z., Köhler, J., Leunert, F., Gitelson, A. 2015. Phycocyanin-specific absorption coefficient: Eliminating the effect of chlorophylls absorption. *Limnology and Oceanography: Methods*, 13(4), 157–168. doi:10.1002/lom3.10015
- Zimba, P. V. 2012a. An improved phycobilin extraction method. *Harmful Algae*, 17(May 2012), 35–39. doi:10.1016/j.hal.2012.02.009
- Zimba, P. V. 2012b. An improved phycobilin extraction method. *Harmful Algae*, 17(July), 35–39. doi:10.1016/j.hal.2012.02.009

## Anexos A

**Tabla I.** Diferentes métodos reportados de extracción de FBP en pico y nano-plancton

Autores	Especies evaluadas	Método de extracción			Método de lectura
		Filtros	Medio de extracción	Rompimiento de células	
Viskari & Colyer, 2003	<i>Synechococcus</i>	Milipore	Buffer Asolectin-CHAPS Y 250mM Trizma/10mM EDTA/2 mg mL <sup>-1</sup> lisozima	Descompresión por nitrógeno	Electroforesis capilar con detección de laser fluorescente, electroferogramas
Gupta y Sainis (2010)	<i>Anacystis nidulans</i> <i>Synechococcus</i> <i>Synechocystis</i>	centrifugación	HEPES buffer pH 8.0	Liofilización y centrifugación	Espectrofotómetro y emisión espectral de <b>fluorescencia</b> .
Lawrenz et al., 2010	<i>Rhodomonas salina</i> <i>Synechococcus</i> <i>Bacillaris</i>	Whatman GF/F centrifugación	Buffer de fosfatos 0.1 M	A: Método congelar-descongelar después sonicación o pulverización. B: Liofilización C: colectadas por centrifugación, congelar-descongelar, centrifugación y sonicación. D: Centrifugación y extracción. E: congelar-descongelar y centrifugación. F: centrifugación y pulverización.	Espectrofotómetro UV/VIS de doble haz de luz, barridos de 400 a 750 nm
Zimba, 2012	<i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Raphidiopsis brookii</i>	Whatman GF/F	Buffer de fosfatos Buffer Asolectin-CHAPS	Ciclos de sonicación, congelar-descongelar.	Espectrofotómetro (750, 652, 645, 615, 562 nm) y <b>fluorómetro</b> (641, 615 nm)
Sobiechowska-Sasim et al., 2014	<i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Aphanizomenon</i> <i>Nodularia spumigena</i> <i>Synechococcus</i> .	Whatman GF/F	Buffer de extracción (0.25-M) y Lisozima	Vortex e incubación en baño en seco y centrifugación.	Espectrofotómetro UV/Vis de doble haz y <b>Espectrofotómetro de fluorescencia</b> de lámpara xenón.

Yacobi et al., 2015	<i>Synechococcus</i> , <i>Anabaenopsis sp.</i> , <i>Microcystis aeruginosa</i> , <i>Aphanizomenon</i>	Whatman GF/F y Durapore	50 mM buffer de fosfato y lisozima.	A: químicos y centrifugación B: Rompimiento utilizando un mortero y pestle.	Espectrofotómetro UV/VIS de doble haz de luz, barridos de 400 a 750 nm
Pinto Rodrigues, de Castro et al. 2018	<i>Spirulina platensis</i>	Whatman GF/F	Líquidos iónicos proticos (PILs) y buffer de fosfatos	Sonicación y centrifugación	Espectrofotómetro

## Anexo B.

**Tabla 2.** Máximos de absorción y FWHM para diferentes pigmentos encontrados en cianobacterias y reportados en la literatura.

Autor	Pigmento	Full width at half maximum (nm)	Máximo de absorción (nm)
Maksimov <i>et al.</i> 2013	Alofococianina	43	650
Hoepffner y Sathyendranath, 1991	Clorofila <i>a</i>	32.1	435
	Clorofila <i>a</i>	21.6	676
	carotenoides	45.4	490
Subramaniam <i>et al.</i> 1999. <b>FWHM calculados por gráfico</b>	carotenoides	31	463
	Ficorubilina	34	496
	Ficoeritrobilina	58	545
	Ficocianina	76	621
	Alofococianina	---	640
	Clorofila <i>a</i>	30	676
Six <i>et al.</i> 2007 <b>FWHM calculados por gráfico</b>	Ficorubilina	35	495
	Ficoeritrobilina	55	550
	Ficocianina	75	621
Sanfilippo <i>et al.</i> 2019 <b>FWHM calculados por gráfico</b>	Clorofila <i>a</i>	---	440
	Ficorubilina	30	495
	Clorofila <i>a</i>	---	680
chase <i>et al.</i> 2013	Clorofila <i>a</i>		435.00
	Ficoeritrina	desviación estándar	550.00
	Clorofila <i>a</i>		675
Hoge <i>et al.</i> 1998	Ficorubilina	--	495
	Ficoeritrobilina	--	565
	Ficoeritrobilina	---	550
Shukla <i>et al.</i> 2012	Ficorubilina	--	495
	Ficoeritrobilina	---	550
Six <i>et al.</i> 2004	Ficorubilina	---	495
	Ficoeritrobilina	---	545.00
	Clorofila <i>a</i>	---	440
	Ficocianina	---	630-640
	Clorofila <i>a</i>	---	680
Toledo <i>et al.</i> 1999	Ficorubilina	---	495
	Ficoeritrobilina	---	545.00
	Clorofila <i>a</i>	---	680
Uysal 2000	Ficoeritrobilina	---	570
	Clorofila <i>a</i>	---	680
	Clorofila <i>a</i>	---	440
Uysal 2001	Clorofila <i>a</i>	---	435-442
	Ficoeritrobilina	---	570
	Clorofila <i>a</i>	---	681

Stomp 2014	Ficocianina	---	620-630
	Ficoeritrina	---	560-570
	Clorofila <i>a</i>	---	680
	Clorofila <i>a</i>	---	430
Wood <i>et al.</i> 1999	Ficorubilina	---	495
	Ficoeritrobilina	---	550
	Clorofila <i>a</i>	---	680
Wood <i>et al.</i> 1985	Clorofila <i>a</i>	---	430-440
	Clorofila <i>a</i>	---	680
	Ficorubilina	---	500
	Ficoeritrobilina	---	540.00
	Ficocianina	---	630
Moore <i>et al.</i> 1995	Zeaxantina	---	445-480
	B-caroteno	---	445-480
	Clorofila <i>a</i>	---	680
	Clorofila <i>a</i>	---	438
	Ficorubilina	---	494
	Ficoeritrobilina	---	544.00
Kana <i>et al.</i> 1988	Clorofila <i>a</i>	---	680
	Clorofila <i>a</i>	---	430-440
	Carotenoides	---	470-490
Tandeau & Houmard 1988	Ficoeritrina	---	565
	Ficocianina	---	620
	Aloficocianina	---	650
Alberte <i>et al.</i> 1984	Ficocianina y Aloficocianina	---	600-650
	Ficorubilina	---	500
	Ficoeritrobilina	---	550
	Clorofila <i>a</i>	---	436
	Clorofila <i>a</i>	---	681
Bigigare <i>et al.</i> 1989	Zeaxantina	---	460
	Ficorubilina	---	495
	Ficoeritrobilina	---	550.00
	Clorofila <i>a</i>	---	440
	Clorofila <i>a</i>	---	675
stadnichuk 1995	Aloficocianina	---	650
	Ficorubilina	---	495
	Ficoeritrobilina	---	550
	Ficocianina	---	620

## Anexo C.

---

**Tabla 3.** Máximos de absorción de pigmentos medidos en FoLiPAM, espectrofotómetro y esfera integradora.

<b>Pigmento</b>	<b>Máximo de absorción FoLiPAM</b>	<b>Máximo de absorción Espectrofotómetro</b>	<b>Máximo de absorción Esfera integradora</b>
Clorofila <i>a</i>	432	434	434
Zeaxantina	460	460	460
Zeaxantina	487	487	487
Ficorubilina	495	497	497
Ficoeritobilina	540	542	542
Clorofila <i>a</i>	582	582	582
Ficocianina	620	620	620
Clorofila <i>a</i>	630	630	630
Aloficocianina	650	650	650
Clorofila <i>a</i>	676	678	678

## Anexo D.

**Tabla 4.** Concentraciones de EDTA, Lisozima y mutanolisina reportado en la literatura para extracciones de ADN y de pigmentos de diferentes organismos.

Autor	Detergente concentración	EDTA concentración	Lisozima	Mutanolisina	Organismo
Schnaitman, 1971	2% Triton X100	5 mM	---	---	<i>Escherichia coli</i>
Boussiba y Richmond, 1980	--	100 mM	100 $\mu\text{g mL}^{-1}$		<i>Spirulina platensis</i>
Morriset y Kremer, 1984	---	1 mM	---	---	<i>Anabaena cylindrical</i> <i>Anacystis nidulans</i>
Stewart y Farmer, 1984	--	10 mM	2mg $\text{mL}^{-1}$		<i>Synechococcus sp.</i> <i>Porphyridium purpureum.</i> <i>Chroomonas salina.</i> <i>Cryptomonas sp.</i> <i>Anacystis marinus.</i> <i>Porphyridium aeruginum.</i>
Masschalk, 2001	---	---	1 mg $\text{mL}^{-1}$	---	<i>E. coli</i> <i>Pseudomonas fluorescens.</i> <i>Salmonella enterica.</i> <i>Shigella flexneri.</i>
Singh <i>et al.</i> , 2010	--	200 mM	---	---	<i>Anabaena sp.</i> <i>Synechocystis sp.</i> <i>Synechococcus sp.</i>
Gupta y Sainis, 2010	---	1 mM	1 mg $\text{mL}^{-1}$	---	<i>Anacystis nidulans</i>
Thein <i>et al.</i> , 2010	2% Triton X100	1 mM y 5 mM	1 mg $\text{mL}^{-1}$ y 5 mg $\text{mL}^{-1}$	---	<i>Escherichia coli</i>
Hemlata <i>et al.</i> , 2011	---	10 mM	100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	---	<i>Anabaena sp.</i>
Sobiechowska-Sasim <i>et al.</i> 2014	---	10 mM	2 mg $\text{cm}^{-3}$	---	<i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Aphanizomenon flosaquae</i> <i>Nodularia spumigena</i> <i>Synechococcus sp.</i>
Yacobi <i>et al.</i> , 2015	---	10 mM	2 mg $\text{mL}^{-1}$	---	<i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Aphanizomenon ovalisporum</i> <i>Anabaenopsis sp.</i> <i>Synechococcus sp.</i>
Yuan <i>et al.</i> , 2012	---	---	---	25 KU $\text{mL}^{-1}$	<i>Escherichia coli</i> ; <b><i>Staphylococcus aureus</i></b> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <b><i>Streptococcus agalactiae</i></b> ; <i>Corynebacterium</i>

Yuan <i>et al.</i> , 2012	---	---	10 mg mL <sup>-1</sup> +lysostaphin 4000 U mL <sup>-1</sup>	25 KU mL <sup>-1</sup> )	<i>tuberculostearicum</i> ; <i>Enterococcus faecalis</i> ; <i>Lactobacillus iners</i> ; <i>Lactobacillus crispatus</i> ; <i>Atopobium vaginae</i> ; <i>Gardnerella vaginalis</i> ; <i>Propionibacterium acnes</i> .
Hillebrand <i>et al.</i> , 2014	---	---	---	15 U	Bacterias en sedimento y hielo
Kampfer 1995	---	---	---	1000 U mL <sup>-1</sup>	<b>Bacterias GRAM POSITIVO</b> <i>Listeria monocytogenes</i> ; <i>Listeria ivanovii</i> ; <i>Listeria seeligeri</i> ; <i>Listeria welshimeri</i> ; <i>Corynebacterium glutamicum</i> ; <i>Corynebacterium callunae</i> ; <i>Corynebacterium lillum</i> ; <i>Clavibacter michiganensis</i> ; <i>Brevibacterium linens</i> ; <i>Micrococcus roseus</i> ; <i>Staphylococcus epidermidis</i> ; <i>Bacillus subtilis</i> ; <i>Curtobacterium pusillum</i> ; <i>Aureobacterium barkeri</i> ; <i>Cellulomonas biazotea</i> ; <i>Arthrobacter oxydans</i>
Brahamsha 1996	---	1 mM	5 mg mL <sup>-1</sup>	---	<i>E. coli</i> ; <i>Synechococcus sp.</i> (WH7803);
Wood y Townsend 1990	0.5% 75uL Triton	2 mM	2 mg mL <sup>-1</sup>	---	<i>Synechococcus sp.</i> (WH7803);
Rocap <i>et al.</i> , 2002	---	---	---	---	<i>Prochlorococcus</i> ; <i>Synechococcus sp.</i>
Tai y Palenik 2009	---	20 mM	12 mg mL <sup>-1</sup>	---	<i>Synechococcus sp.</i>
Fuller <i>et al.</i> , 2003	---	0.1 mM	10 mg mL <sup>-1</sup>	---	<i>Synechococcus sp.</i>
Neilan <i>et al.</i> , 1995	---	5 mM	1 mg mL <sup>-1</sup> + proteinas K 10 mg mL <sup>-1</sup>	---	Cultivos de cianobacterias; 44 cepas de cianobacteria de los generos: <i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Microcystis</i> , <i>Nodularia</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Pseudanabaena</i> , y <i>Synechococcus</i> .
Vetriani <i>et al.</i> , 1999	---	100 mM	100 mg mL <sup>-1</sup>	5000 U mL <sup>-1</sup>	Sedimentos del fondo marino
De Vries <i>et al.</i> , 2004	---	10 mM	5 mg mL <sup>-1</sup>	26 U mL <sup>-1</sup>	<i>L. plantarum</i>

