



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



**"ASPECTOS METODOLÓGICOS EN LA MEDICIÓN DE LA
ABSORCIÓN *IN VIVO* E *IN VITRO* DE FICOBILIPROTEÍNAS"**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

OCEANÓLOGO

PRESENTA:
ESPERANZA GUADALUPE VALDEZ SILVA

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA A MARZO DE 2017

"ASPECTOS METODOLÓGICOS EN LA MEDICIÓN DE LA ABSORCIÓN IN VIVO E IN VITRO DE FICOBILIPROTEÍNAS"

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

OCEANÓLOGO

PRESENTA:
ESPERANZA GUADALUPE VALDEZ SILVA

APROBADA POR:



Dra. Mary Carmen Ruiz de la Torre
Director de tesis



Dr. Helmut Maske Rubach



Dr. Jorge Manuel López Calderón

RESUMEN

Las cianobacterias se reconocen por su amplia distribución y por contribuir significativamente en la biomasa total de carbono y en la productividad primaria de los océanos. El rasgo característico de las cianobacterias son sus pigmentos, las ficobiliproteínas (FBP), basado en las propiedades de absorción, las ficobiliproteínas se dividen en tres clases: la ficocianina (610-620 nm), aloficocianina (650-655 nm) y la ficoeritrina (495, 540-570 nm). Existen varios métodos que han sido reportados para la cuantificación y análisis de las FBP, sin embargo todos difieren entre sí, es decir, no hay un protocolo estándar para la medición de FBP en cianobacterias oceánicas. El objetivo del presente trabajo es evaluar el método de extracción de ficobiliproteínas en solvente acuoso para medir la absorción *in vitro* y la absorción *in vivo* en cultivos estáticos de *Synechococcus sp.* Así como, comparar la extracción de ficobiliproteínas con filtros de diferente material (Acetato de celulosa, Durapore y Fibra de vidrio (GF/F)). En las mediciones *in vitro* las absorbancias del filtro de Durapore se encuentran por encima de las de acetato de celulosa. Por su parte el filtro GF/F no presenta los picos de absorbancia de los pigmentos, la señal observada posiblemente es por la presencia de partículas del filtro resultantes del rompimiento físico. En general tanto para *in vitro* como *in vivo*, en los extractos se observó una alta absorbancia alrededor de las longitudes de onda 495 y 540 nm, las cuales son características para la ficoeritrina. A su vez, estos mostraron absorciones que son aportadas por la clorofila, sobre todo en las mediciones *in vivo*, siendo consistente con picos visibles cerca de 415, 433 y 675 nm.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Marinas, por ser la casa de estudios en la que me formé, y ser mi segundo hogar.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) por permitir utilizar su infraestructura en Ecología de microbios marinos del departamento de Oceanografía Biológica.

A mi directora de tesis Dra. Mary Carmen Ruiz de la Torre por su apoyo, ilimitada paciencia, amistad y confianza, por haber sido guía para finalizar mi etapa de licenciatura con todos sus buenos consejos y todas las oportunidades que me brindó.

A mi sinodal Dr. Helmut Maske Rubach por compartir sus conocimientos, paciencia, su tiempo, laboratorio, equipos, materiales de trabajo; pero por sobre todo, sus consejos y experiencia.

A mi sinodal Dr. Jorge Manuel López Calderón por compartir su tiempo, conocimientos y consejos.

Al M.C. Arturo Ramírez Valdez por ser un ejemplo a seguir y siempre ayudarme, aconsejarme y escucharme; por su amistad, confianza y apoyo a lo largo de mi desarrollo profesional.

A los profesores de la Licenciatura en Oceanología, por ser un ejemplo y grandes seres humanos; por sus enseñanzas, consejos, momentos agradables. Por permitirme aprender de ustedes y transmitirme ese amor por el océano.

A mi familia por estar siempre presente, apoyarme y aconsejarme. A mis padres por permitirme estudiar esta carrera lejos de casa, por su esfuerzo, comprensión y amor; por sus consejos, confianza y apoyo, por creer en mí. Por impulsarme a ser mejor, porque son un ejemplo a seguir y mi más grande admiración. A mis hermanos por inspirarme a crecer y ser mejor cada día, por aguantarme y animarme en cada paso de mi desarrollo profesional.

A mis amistades por su apoyo y estar a mi lado en cada momento; por escucharme y aconsejarme. Por todos los momentos y experiencias juntos. Sobre todo a mis roomates por aguantarme tanto tiempo, por su amor y confianza.

A Eduardo por las aventuras y momentos juntos, por su apoyo incondicional a lo largo de esta etapa, por estar presente en todo momento.

ÍNDICE

Introducción.....	8
Antecedentes.....	11
Hipótesis.....	15
Objetivo general.....	15
Objetivos particulares.....	15
Metodología.....	16
Condiciones de cultivo.....	17
Cuantificación de células.....	17
Extracción de Clorofila.....	18
Extracción de ficobiliproteínas y su medición espectrofotométrica.....	19
Medición <i>in vivo</i>	20
Resultados.....	21
Discusión.....	30
Conclusiones.....	33
Literatura citada.....	35

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla I. Comparación de métodos de extracción de ficobiliproteínas de diversos artículos.....	12
Tabla II. Concentraciones de clorofila (mg/m^3) <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> para cada uno de los filtros tratados.....	29
Figura 1. Diagrama con el proceso para la medición de la absorción <i>in vitro</i> de ficobiliproteínas de cianobacterias del género <i>Synechococcus sp.</i>	16
Figura 2. Diagrama con el proceso para la medición de la absorción <i>in vivo</i> de ficobiliproteínas de cianobacterias del género <i>Synechococcus sp.</i>	17
Figura 3. Absorción <i>in vitro</i> de las ficobiliproteínas a diferentes tiempos de agitación (1, 3 y 5 minutos) en el Mini-Beadbeater.....	21
Figura 4. Absorción <i>in vitro</i> de ficobiliproteínas con filtros de membrana Durapore con replicas idénticas (D1, D2 y D3) y su promedio (Dprom) de un cultivo de <i>Synechococcus sp.</i>	22
Figura 5. Absorción <i>in vitro</i> de ficobiliproteínas extraídas con filtros de membrana de acetato de celulosa con replicas idénticas (A1, A2 y A3) y su promedio (Aprom) de un cultivo de <i>Synechococcus sp.</i>	23
Figura 6. Absorción <i>in vitro</i> de ficobiliproteínas extraídas con filtros de Polisulfon por con replicas idénticas (P1, P2 y P3) y su promedio (Pprom) de un cultivo de <i>Synechococcus sp.</i>	23
Figura 7. Absorción <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de ficobiliproteínas extraídas con filtro de fibra de vidrio (GF/F) con replicas idénticas (G1, G2 y G3) y su promedio (Gprom) de un cultivo de <i>Synechococcus sp.</i> (A: <i>In vivo</i> , B: <i>In vitro</i>) (FE: Ficoeritrina, FC: Ficocianina, Chl: Clorofila).....	24
Figura 8. Absorción <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de ficobiliproteínas extraídas con filtro de membrana de acetato de celulosa con replicas idénticas (A1, A2 y A3) y su promedio (Aprom) de <i>Synechococcus sp.</i> (A: <i>In vivo</i> , B: <i>In vitro</i>) (FE: Ficoeritrina, FC: Ficocianina, Chl: Clorofila).....	25
Figura 9. Absorción <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de ficobiliproteínas extraídas con filtro de membrana Durapore con replicas idénticas (D1, D2 y D3) y su promedio (Dprom) de	

Synechococcus sp. (A: *In vivo*, B: *In vitro*) (FE: Ficoeritrina, FC: Ficocianina, Chl: Clorofila).....26

Figura 10. Absorción *in vivo* promedio de ficobiliproteínas extraídas con filtros de membrana (acetato de celulosa y Durapore) y fibra de vidrio (GF/F) de *Synechococcus sp.* (FE: Ficoeritrina, FC: Ficocianian,Chl: Clorofila).... 27

Figura 11. Absorción *in vitro* promedio de ficobiliproteínas extraídas con filtros de membrana (acetato de celulosa y Durapore) y fibra de vidrio (GFF) de *Synechococcus sp.*..... 28

Figura 12. Densidad óptica (OD) *in vivo* e *in vitro* para las longitudes de onda específicas 495 y 545 nm, para los filtros de membrana (Acetato de celulosa y Durapore).....29

INTRODUCCIÓN

El fitoplancton marino se encuentra conformado por microorganismos fotoautótrofos esenciales en la cadena alimenticia. Su abundancia y distribución en la columna de agua varían de acuerdo a las condiciones ambientales, principalmente por factores como luz y disponibilidad de nutrientes. De acuerdo a su tamaño el grupo de mayor abundancia, es el picoplancton (0.5- 2 μ m), del cual las cianobacterias son el componente principal (Alves *et al.*, 2008; Miller Y Wheeler, 2012).

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 (Viskari y Colyer, 2003; Soni *et al.*, 2007). Cuentan con una variedad de estrategias que les permiten adaptarse a cambios en el ambiente, dentro de las cuales han desarrollado un incremento en la eficiencia para la captación de luz y composición pigmentaria. El rasgo característico de las cianobacterias es su antena captadora de luz, el ficobilisoma, un complejo supramolecular unido a la membrana tilacoide, que permite una mayor absorción efectiva y transferencia de energía luminosa (Sidler, 1994; Apt y Grossman, 1995; Viskari y Colyer, 2003; Soni *et al.*, 2007; Horvát *et al.*, 2013). El ficobilisoma se compone de complejos pigmentos-proteínas llamados ficobiliproteínas (FBP): agregados de proteínas solubles en agua unidas en forma covalente con cromóforos (Apt y Grossman, 1995; Alka y Sainis, 2009; Lawrenz *et al.*, 2011). Las FBP son pigmentos fotosintéticos que varían su concentración en respuesta a la irradiancia, permitiendo a los organismos extender su espectro de absorción y de esta manera asimilar aquella luz que no es absorbida eficientemente por la clorofila *a*. Otra de las funciones de las FBP es la transmisión de la energía excitada a los centros de reacción en las membranas fotosintéticas, en adición a su papel en la fotosíntesis, también son utilizadas como reserva de nitrógeno (Vernet *et al.*, 1990; Lantoine y Neveux, 1996; Viskari *et al.*, 2001; Viskari y Colyer, 2003). Basado en las propiedades de

absorción, las ficobiliproteínas se dividen en tres clases: la ficocianina, aloficocianina y la ficoeritrina. La ficocianina y la aloficocianina se conocen como los pigmentos azules, se encuentran en todas las cianobacterias y su máxima absorción se presenta a longitudes de onda largas de 610-620 y 650-655 nm respectivamente. Mientras que la ficoeritrina, presente solo en algunos organismos, se le denomina pigmento rojo y muestra su máxima absorción de luz a longitudes de onda menores, de 495 y 550-570 nm (Lantoine y Neveux, 1996; Richardson *et al.*, 2010; Lawrenz *et al.*, 2011; Horvát *et al.*, 2013).

Dentro del conjunto de cianobacterias de importancia ecológica en el océano, se encuentra *Synechococcus sp.* Estas son unicelulares y tienen un diámetro de 1.0 – 1.4 µm. Una característica que las distingue es su pigmento accesorio ficoeritrina, la cual genera el color típico naranja de estas células al ser excitado. Las poblaciones de *Synechococcus* presentan dos tipos de ficoeritrina en el ficobilisoma PE (I) y PE(II), en donde la principal es el grupo PE (II), presenta en mayor proporción la forma ficourubilina (495-500 nm) que el cromóforo ficoeritrobilina (535-560 nm), las cuales tienen su máxima absorción en la región azul-verde del espectro visible (Lantoine y Neveux, 1996; Marsac, 2003; Soni *et al.*, 2007; Horvát *et al.*, 2013).

Debido a que no todos los grupos de fitoplancton presentan FBP, estas son utilizadas para la medición de biomasa de taxones específicos a través de la estimación de las propiedades de absorción *in vivo* (es decir, en células intactas) e *in vitro* (pigmentos extraídos por solvente). 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, incluyendo aquellas que generan florecimientos algales nocivos. (Hoepffner y Sathyendranath, 1991; Apt y Grossman, 1995; Gregor *et al.*, 2007; Richardson *et al.*, 2010; Méléder *et al.*, 2013).

La determinación de la absorción de partículas con bajas concentraciones en agua de mar requiere métodos sensibles, debido a que la capacidad de las partículas para esparcir luz negativamente afecta a las mediciones (Röttgers y Gehnke, 2012). La mayoría de las técnicas de laboratorio para determinar absorción es simple y puede llevarse a cabo utilizando un espectrofotómetro de doble haz. Las muestras colectadas del medio natural se encuentran en bajas concentraciones por lo que requieren ser concentradas para tener suficiente densidad óptica, para esto se realizan filtraciones, técnica conocida como filtro cuantitativo (Quantitative Filter Technique, QFT). Variaciones de QFT utilizan una esfera integradora para la medición de luz, así mismo se utiliza la técnica de "transmitancia-reflectancia" de Tassan y Ferrari (2002), donde la atenuación por las partículas encontradas en el filtro se debe a la diferencia entre la luz reflejada y transmitida a través de filtro. Este método permite la corrección de errores inducidos por retrodispersión debido al filtro y las partículas. Además, considera la dispersión interna del filtro y la distribución de la muestra en este, es decir, no solo las partículas encontradas en la superficie (Nelson y Prézelin, 1993; Tassan y Ferrari, 2002; Röttgers y Gehnke, 2012).

ANTECEDENTES

Existen varios métodos que han sido reportados para la cuantificación y análisis de FBP (Tabla I. Concentración de métodos de extracción de ficobiliproteínas de diversos artículos), sin embargo todos difieren entre sí, no hay un protocolo estándar para la medición de FBP en cianobacterias oceánicas como *Synechococcus sp.* Varían desde el método de extracción de los pigmentos y la estimación de las absorbancias, hasta el tipo de material a utilizar (filtros, buffers, técnica de rompimiento de las células). Algunos autores combinan una serie de técnicas como centrifugación, filtración, emplean buffers de fosfatos, mientras que otros recomiendan el uso de enzimas, a su vez, la estimación de las absorbancias puede realizarse en espectrofotómetro, fluorómetro o cromatografías (Zhu *et al.*, 2007; Zimba, 2012; Horvát *et al.* 2013). Por otro lado, otros autores utilizan el rompimiento mecánico de células a través de sonicación u homogenizadores (Soni *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2007; Lawrenz *et al.* 2011; Horvát *et al.* 2013). El protocolo para la extracción de FBP debe de ser confiable, de rápido análisis y bajo costo, de tal forma que pueda ser utilizado de manera rutinaria para el análisis de muestras (Horvát *et al.* 2013; Lawrenz *et al.* 2011; Soni *et al.*, 2007).

Tabla I. Comparación de métodos de extracción de ficobiliproteínas de diversos artículos.

Autores	Año	Tipo de muestra		Método de extracción			Método de lectura y espectro nm
		Especies evaluadas	Condiciones	Filtros	Buffer, pH	Rompimiento de células	
Sobiechowska <i>et al.</i>	2014	<i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Aphanizomenon flosaquae</i> , <i>Nodularia spumigena</i> , <i>Synechococcus sp.</i>	Incubados a 22 °C ±0.5 bajo iluminación continua de 10 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$	GF/F Whatman 0.7- μm tamaño de poro y 25 mm diámetro	Buffer de extracción pH 5.5: Trizma base 0.25-M (Sigma-Aldrich), hydrated 10-mM disodium EDTA (2H ₂ O) y lysozyme (Merck).	vortex para cada vial, incubado en baño en seco y centrifugación.	Espectrofotómetro UV/Vis de doble haz y Espectrofotómetro de fluorescencia de lámpara xenón. Barrido de 400–800 nm y emisión fluorescente 500–700 nm
Horváth <i>et al.</i>	2013	<i>Cylindrospermopsis raciborski</i> , <i>Anabaena spiroides</i> , <i>Aphanizomenon flosaquae</i> , <i>Aphanizomenon issatschenkoi</i>	Incubados a 24°C en 14:10 h ciclo de luz-oscuridad. Intensidad de luz 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Medio BG-11 modificado (Fe-citrate en vez de Fe(NH ₄)citrate) sin NaNO ₃	GF/C (Whatman)	Buffer de fosfatos 0.05M pH = 6.8	A: ciclos congelar-descongelar B: colectadas por centrifugación y homogenizadas en mortero C: concentradas por filtración y rompimiento de células por sonicación D: colectadas por centrifugación y homogenizada con Polytron a diferentes periodos de tiempo. E: ciclos congelar-descongelar combinado con el homogeneizador ultrasonico.	Espectrofotómetro: 615 nm y 652 nm
Lawrenz E. <i>et al.</i>	2011	<i>Rhodomonas salina</i> , <i>Synechococcus bacillaris</i>	24±1°C medio f/2 (cryptophyte) y L1 (cyanobacterium). Intensidad de luz ~70 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por lámparas fluorescentes de luz de día natural con 14:10 h ciclos de luz/oscuridad.	Whatman GF/F	0.1 mol L ⁻¹ Buffer de fosfatos (pH=6)	A: concentradas por filtración, método congelar-descongelar después sonicación o pulverización. B: concertadas por filtración y rompimiento de células por liofilización C: colectadas por centrifugación, método congelar-descongelar, centrifugación, sonicación. D: centrifugación y extracción. E: centrifugación, método 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>	Cultivos en medio BG11 en fotoperiodos de 16:8 a 25 °C con 35 mmol fotones m ⁻² s ⁻¹	0.7 mm porosidad; 47 mm diámetro GF/F Whatman	Buffer de fosfatos, pH 6.7; Buffer Asolectin-CHAPS, pH 3.75; Buffer Asolectin-CHAPS pH 6.7	Ciclos de sonicación, congelar-descongelar. Método para cada buffer	Espectrofotómetro (750, 652, 645, 615, 562 nm) y fluorómetro (641, 615 nm)
Zhu et al.	2007	<i>S. platensis</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>Enterobacter gergoviae</i> <i>Klebsiella oxytoca</i>	Cultivos en medio estándar Zarrouks'		Lisozimas; Buffer de fosfatos 0.001 M; pH 7	Sonicación y homogenizador; lisozimas o ciclos alternados congelar-descongelar	Espectrofotómetro (400-700 nm) y fluorómetro
Soni et al.	2006	<i>Oscillatoria quadripunctulata</i>	Medio ASN III ciclos de 12-h light/12-h oscuridad bajo 36 W de iluminación por una lámpara de luz fluorescente (130 mmol fotones m ⁻² s ⁻¹) a 27 °C.	---	1 MTris-Cl buffer (pH 8.1).	Colectadas por centrifugación, ciclos de congelar-descongelar con cambios de temperatura.	Espectrofotómetro 250–820 nm
Sampath & Neefus	2007	<i>Porphyra umbilicalis</i> ; <i>P. purpurea</i>	Se removieron 2.0 cm de discos de las hojas de Porphyra y se enbotellaron en seco	---	Buffer de fosfatos pH 6.8	Molidas utilizando un mortero, un pestle y arena. Posterior centrifugación.	Espectrofotómetro UV-visible de doble haz de luz (Helios Alpha) 455, 565, 592, 618, 645, and 730 nm.
Alka & Sainis	2009	<i>Anacystis nidulans</i> BD1; <i>Synechococcus</i> 7942; <i>Synechocystis</i> 6803	Medio BG 11 (Rippka et al. 1979) a 26±2°C, iluminación por luces blancas fluorescentes con intensidad de 21 W·m ⁻² .	---	HEPES buffer pH 8.0	Colectadas por centrifugación e incubación, rompimiento de células por liofilización y centrifugación	Espectrofotómetro a 650 nm y 620 nm

Méléder et al.	2013	<i>Dunaliella tertiolecta</i> <i>Entomoneis paludosa</i> <i>Spirulina platensis</i> <i>Porphyridium cruentum</i>	<i>E. paludosa</i> , <i>P. cruentum</i> y <i>D. tertiolecta</i> medio f/2. <i>S. platensis</i> en medio Zarrouk. Temperatura 14 ± 1°C, 14/10 h ciclo de luz/oscuridad	GF/C, 25 mmØ, 1.2 lmporosity	---	Colectadas por filtración; medición <i>in vivo</i>	Espectroradiómetro (mW cm ² nm ² sr ⁻¹) 400–1000 nm
Yacobi et al.	2015	<i>Synechococcus</i> sp. <i>Anabaenopsis</i> sp. <i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Aphanizomenon ovalisporum</i>	Medio BG-11 medium, a 17 °C, luz continua de 35 μmol m ⁻² s ⁻¹ .	Filtro de fibra de vidrio (Whatman GF/F)	(1) 50 mM buffer de fosfato de acuerdo a Sarada <i>et al.</i> (1999). (2) medio de extracción lizozoma De acuerdo a Stewart y Farmer (1984).	A: (1) Centrifugación por 3 min a 1100 g, (2) Filtración en filtro de fibra de vidrio (Whatman GF/F). (3) Filtración en Durapore VR 5μm (Millipore). B: Rompimiento utilizando un mortero y pestle.	Espectrofotómetro UV/VIS de doble haz de luz, barridos de 400 a 750 nm

Ruiz de la Torre en el 2007 documentó las diferencias espectrales entre las poblaciones de cianobacterias a través del carácter espectral de las ficobiliproteínas. Este trabajo evidencía la presencia de diferentes razones entre FBP a través de imágenes de fluorescencia con microscopia confocal, sin embargo, no se logró documentar la concentración de la FBP a través de mediciones *in vitro* debido a que las muestras filtradas por filtro de fibra de vidrio y extraídas con buffer de fosfatos no mostraban señal alguna después de extraer los pigmentos. Moore *et al.* (1995) sugiere una sobrestimación de la absorción *in vivo* de *Synechococcus sp.* en donde las diferencias son causadas por células de menor tamaño embebidas en la matriz del filtro de fibra de vidrio y no solo en la superficie. Yacobi *et al.* (2015) menciona que la filtración en filtro GF/F reduce la concentración de ficocianina, sin importar el medio de extracción ni la especie de cianobacteria tratada.

Por lo anterior para este trabajo de tesis se plantean la siguiente hipótesis y objetivos:

HIPÓTESIS

HO= Existen diferencias significativas entre la extracción de FBP en filtros de membrana y filtros de fibra de vidrio.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el método de extracción de ficobiliproteínas para medir la absorción *in vitro* y la absorción *in vivo* en cultivos estáticos de *Synechococcus sp.*

OBJETIVOS PARTICULARES

- Cultivar y mantener cultivos estacionarios de cianobacterias del género *Synechococcus*.
- Comparar la extracción de ficobiliproteínas con filtros de diferente material.
- Medir la absorción *in vivo* de ficobiliproteínas con filtros de diferentes

materiales.

- Medir la absorción *in vitro* de ficobiliproteínas extraídas con filtros de diferentes materiales.

METODOLOGÍA

En la **Figura 1** y **2** se muestra un diagrama de la metodología para realizar la medición de la absorción *in vivo* e *in vitro* de las ficobiliproteínas de cianobacterias del género *Synechococcus*.

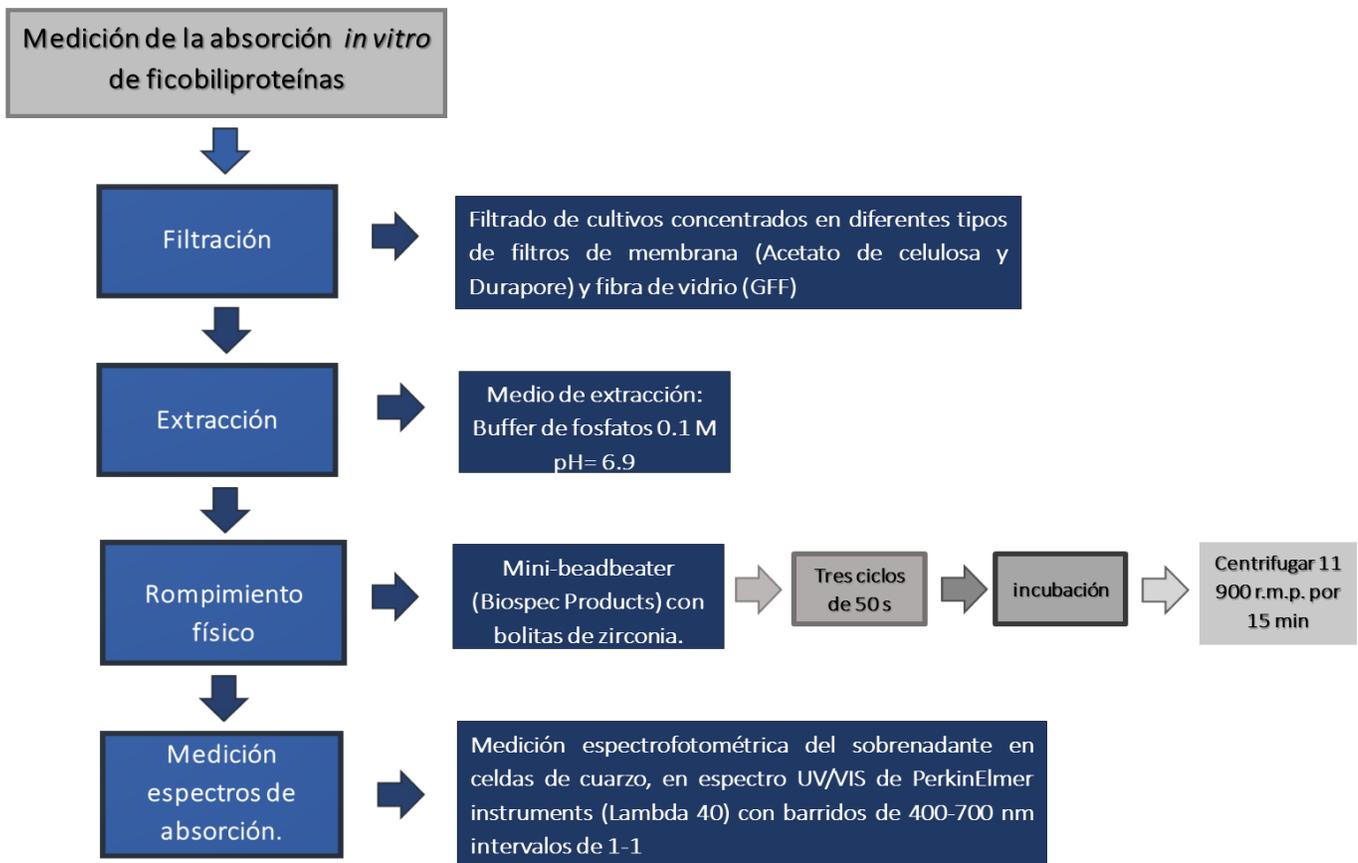


Figura 1. Diagrama con el proceso para la medición de la absorción *in vitro* de ficobiliproteínas de cianobacterias del género *Synechococcus*.

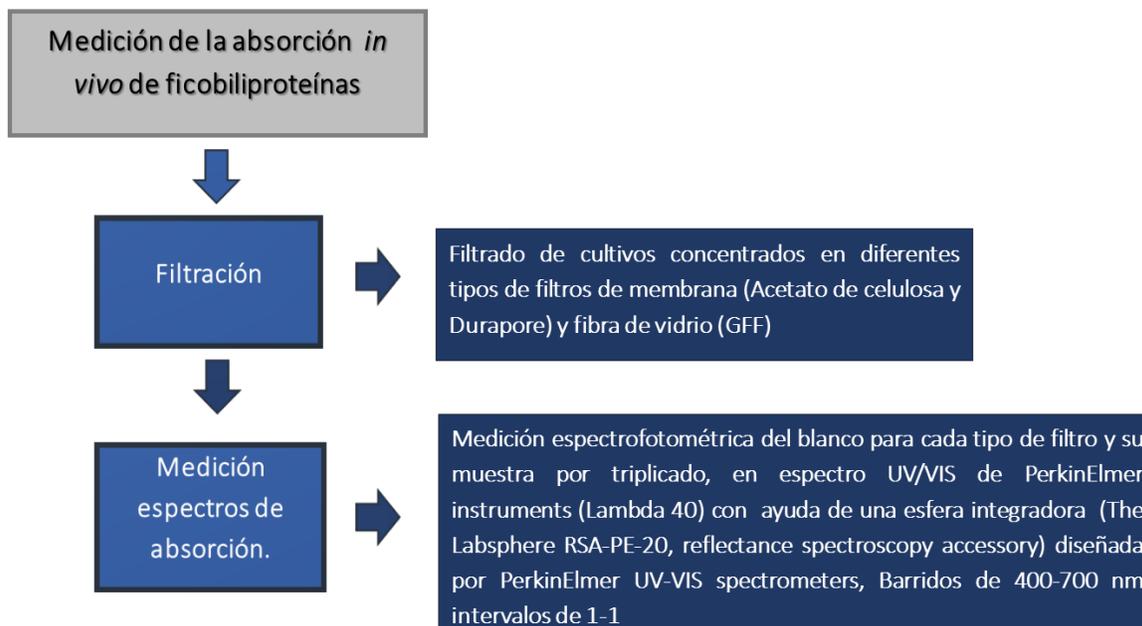


Figura 2. Diagrama con el proceso para la medición de la absorción *in vivo* de ficobiliproteínas de cianobacterias del género *Synechococcus*.

1. Cultivos estacionarios y condiciones de crecimiento

Se utilizaron cepas de *Synechococcus sp.* CCMP 3074 obtenidas del cepario del centro nacional de microalgas de Bigelow, EUA. Los cultivos se desarrollaron en matraces de vidrio de 1 L con agua de mar envejecida y enriquecida en medio de cultivo f/2 (Guillard y Ryther, 1962; Guillard, 1975). Se mantuvieron en un incubador con temperatura controlada a 20 °C y a una intensidad de luz de 100 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con fotoperiodo de 12:12 h (luz:oscuridad). Los cultivos se mantuvieron por varias generaciones antes de iniciar el experimento. Los cultivos utilizados tenían 7-10 días.

2. Cuantificación de células

Se realizaron conteos directos al microscopio de epifluorescencia Axiovert100 (Carl Zeiss, inc. New Cork, N.Y.) y análisis digitales de imágenes, para detectar la

fluorescencia de los pigmentos de *Synechococcus sp.* (Ficobiliproteínas). Esto consistió en filtrar el cultivo en filtros de policarbonato de 0.2 μm de tamaño de poro y fijarlos con glicerol para incrementar su fluorescencia natural. Las condiciones para la captura de imágenes de fluorescencia fueron: filtro de excitación de 488 y 543 nm, filtros de banda de emisión 552-584 nm, 627-659 nm, 659-713 nm y lente objetivo Plan-Neoflur 100x/1.3. Al mismo tiempo se desarrollaron conteos en hematocímetro, para posteriormente contar en microscopio (objetivo 100X y ocular 10 X) visualmente.

3. Extracción de clorofila *a*

Los pigmentos se extrajeron en filtros de fibra de vidrio Whatman GF/F y con ayuda de una bomba de vacío de 5kPa (inHg Vac). Se filtraron 10 mL del cultivo por triplicado y se transfirieron a un vial de 20 mL con acetona al 90%, para su posterior incubación a -20 °C por aproximadamente 20 h en oscuridad. El contenido se centrifugó (DYNAC II centrifuge. Clay Adams division of Becton, Dickinson and Company) por 10 min a 3500 r.p.m. y el extracto se analizó en un espectrofotómetro UV/VIS de PerkinElmer instruments (Lambda 40) con barridos de 400-700 nm, intervalos de 2 nm, ranura de 2 mm y una velocidad de lectura de 240 nm/min.

La clorofila *a* se obtuvo mediante la expresión:

$$\frac{\text{mg de pigmento}}{\text{m}^3} = \frac{C}{V}$$

Dónde:

- C es un valor obtenido a partir de la siguiente ecuación:

$$C = \text{Clorofila } a = 11.6 (E_{665}) - 0.14 (E_{630}) - 1.31 (E_{645})$$

- E es la extinción o absorbancia medida a la longitud de onda que indica el subíndice.

Ecuaciones obtenidas de Holm *et al.* 1965.

4. Extracción de FBP, medición *in vitro* – buffer de fosfatos

La preparación del buffer de fosfatos sódico 0.1M pH=6.8 requirió como reactivos: fosfato de sodio monobásico anhídrido (NaH_2PO_4) peso molecular 119.98 gr (SIGMA) y fosfato de sodio dibásico ACS anhídrido (Na_2HPO_4) peso molecular 141.96 gr (SIGMA). Se preparó una solución stock (A) con el fosfato monobásico al 0.2 M agregando 12 gr y aforando a 500 mL con agua destilada. Una solución stock (B) con el fosfato dibásico al 0.2 M agregando 14.2 gr aforando a 500 mL con agua destilada. Se mezclaron 56.25 mL (A) + 68.75 mL (B) y se ajustó el pH a 6.8, posteriormente se aforó a 250 mL con agua destilada.

La extracción de ficobiliproteínas se realizó mediante el filtrado al vacío de 20 mL de cultivos concentrados de *Synechococcus* sp., en diferentes tipos de filtros: membrana (acetato de celulosa y Durapore) y fibra de vidrio (GF/F) por triplicado, utilizando una bomba de vacío de 5kPa (inHg Vac). Cada filtro se colocó en un microvial de acero de 2 mL, al mismo tiempo se le agregaron perlas de zirconia de 0.5 y 0.1 mm de diámetro en proporción 50/50 y 1.5 mL de buffer de fosfatos 0.1 M pH=6.8. Posteriormente se realizó el rompimiento de las células mediante el Mini-Beadbeater (Biospec Products), se efectuaron tres ciclos de 50 s a una velocidad de agitación de 25 revoluciones por minuto (r.p.m.). Entre cada ciclo el micro vial se enfrió a 4°C por 60 s para evitar la degradación térmica de las ficobiliproteínas. Una vez acabados los ciclos, los micro viales con el extracto se congelaron a -20°C por 60 min como tiempo de extracción, para su posterior centrifugación (Fisher Scientific instrument, Marathon 16 km) a 11 900 r.p.m. por 10 min. La medición espectrofotométrica del sobrenadante se realizó en celdas de cuarzo, en un espectrofotómetro UV/VIS de PerkinElmer instruments

(Lambda 40) con barridos de 400-700 nm, intervalos de 2 nm y una velocidad de lectura de 240 nm/min, se utilizó buffer de fosfatos como blanco.

5. Medición *in vivo*

Se realizaron filtraciones de 20 mL de cultivos concentrados de *Synechococcus* sp. en diferentes tipos de filtros: membrana (acetato de celulosa y Durapore) y fibra de vidrio (GF/F) por triplicado, utilizando una bomba de vacío de 5kPa (inHg Vac). La medición espectrofotométrica de los filtros se efectuó con ayuda de una esfera integradora (The Labsphere RSA-PE-20, reflectance spectroscopy accessory) diseñada por PerkinElmer UV-VIS spectrometers, para mayor sensibilidad en la detección de las absorbancias, con barridos de 400-700 nm, intervalos de 2 nm y una velocidad de lectura de 240 nm/min. Empleando como blanco cada tipo de filtro humedecido con agua de mar filtrada por 0.2 μm .

RESULTADOS

Pruebas preliminares:

Temperatura y Beadbeater

Se realizaron pruebas con diferentes tiempos de agitación en el Mini-Beadbeater, en busca de cambios en la señal de las ficobiliproteínas por cambio en la temperatura, lo anterior, se corroboró analizando la altura de los picos para determinar si había cambios en la señal. Se observaron cambios en la señal de las ficobiliproteínas al probar tres diferentes tiempos de agitación en Mini-Beadbeater 1, 3 y 5 min, siendo el de 1 min el más efectivo (Figura 2).

Para la reducción del aumento de temperatura se combinó la agitación (Mini-Beadbeater) con baños fríos, realizando ciclos alternados. El baño frío consistió en hielo y agua para mejorar la transferencia de calor hacia la muestra.

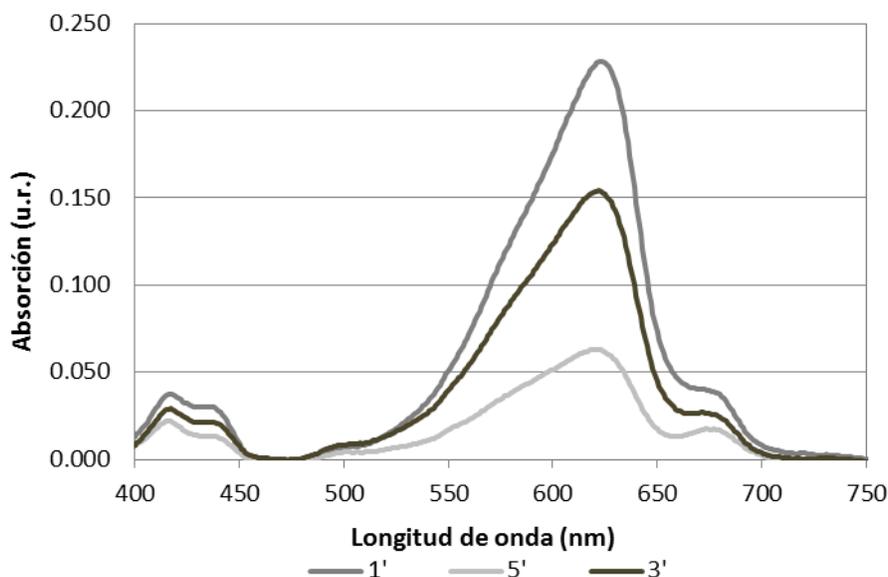


Figura 3. Absorción *in vitro* de las ficobiliproteínas a diferentes tiempos de agitación (1, 3 y 5 minutos) en el Mini-Beadbeater de un cultivo de *Synechococcus sp.*

Comparación entre filtros:

De manera preliminar se compararon diferentes filtros para probar si se obtenía señal de FBP. 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 con excepción del filtro GF/F.

La absorbancia de FBP fue mayor en el filtro de Durapore con un promedio máximo de 0.315 unidades relativas (u.r.) a los 620 nm, seguido del de Acetato de celulosa con 0.258 u.r. y Polisulfon con 0.172 u.r. en la misma longitud de onda (Figuras 3 a 5).

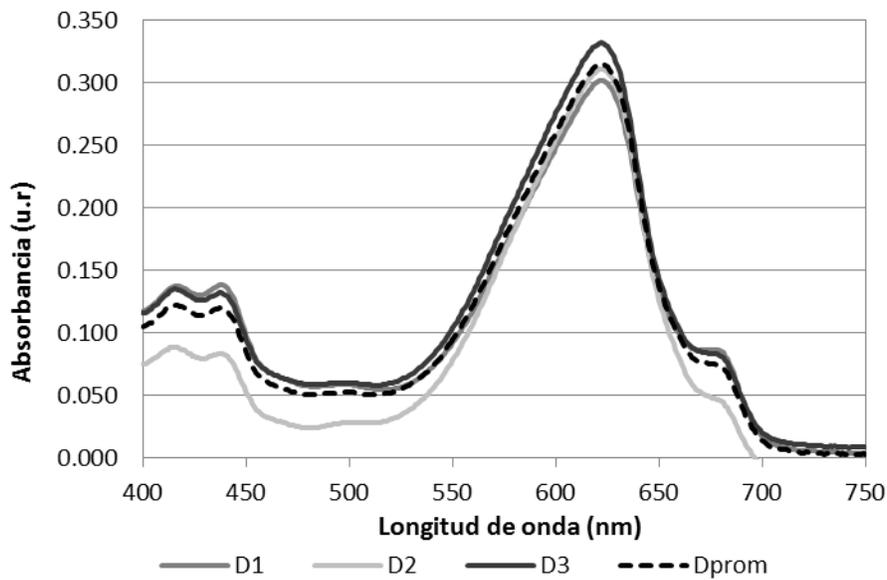


Figura 4. Absorción *in vitro* de ficobiliproteínas con filtros de membrana Durapore con replicas idénticas (D1, D2 y D3) y su promedio (Dprom) de un cultivo de *Synechococcus sp.*

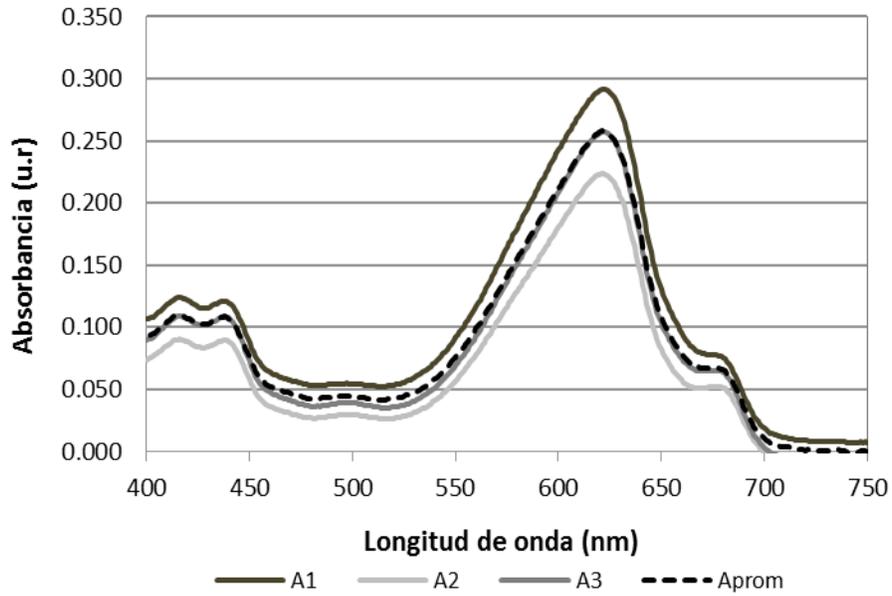


Figura 5. Absorción *in vitro* de ficobiliproteínas extraídas con filtros de membrana de acetato de celulosa con replicas idénticas (A1, A2 y A3) y su promedio (Aprom) de un cultivo de *Synechococcus sp.*

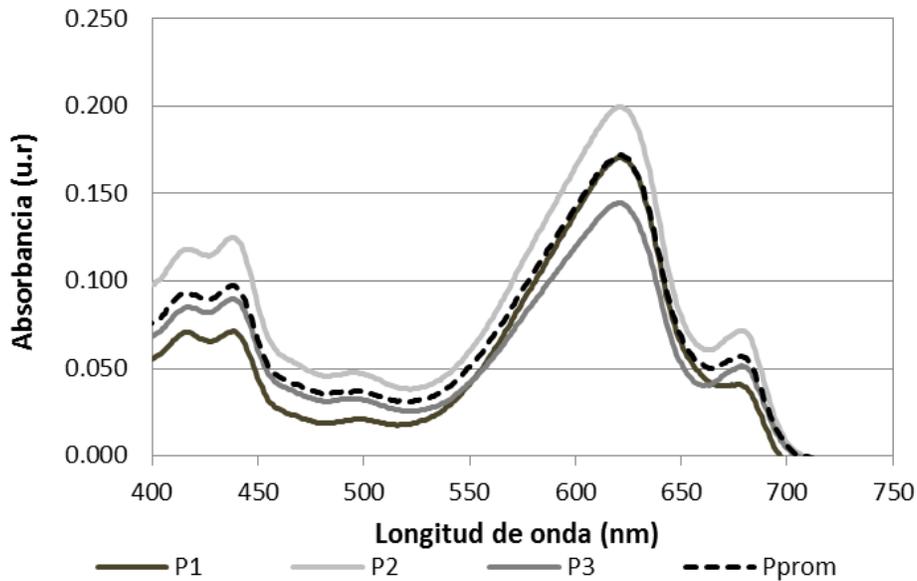


Figura 6. Absorción *in vitro* de ficobiliproteínas extraídas con filtros de Polisulfon por con replicas idénticas (P1, P2 y P3) y su promedio (Pprom) de un cultivo de *Synechococcus sp.*

Medición de la absorción *in vivo* vs *in vitro* de las ficobiliproteínas.

Una vez que se definió el método más efectivo, se realizó la comparación de la absorción de las FBP en los filtros de fibra de vidrio (GF/F) y filtros de membrana (Acetato de celulosa y Durapore), tanto *in vivo* como *in vitro*.

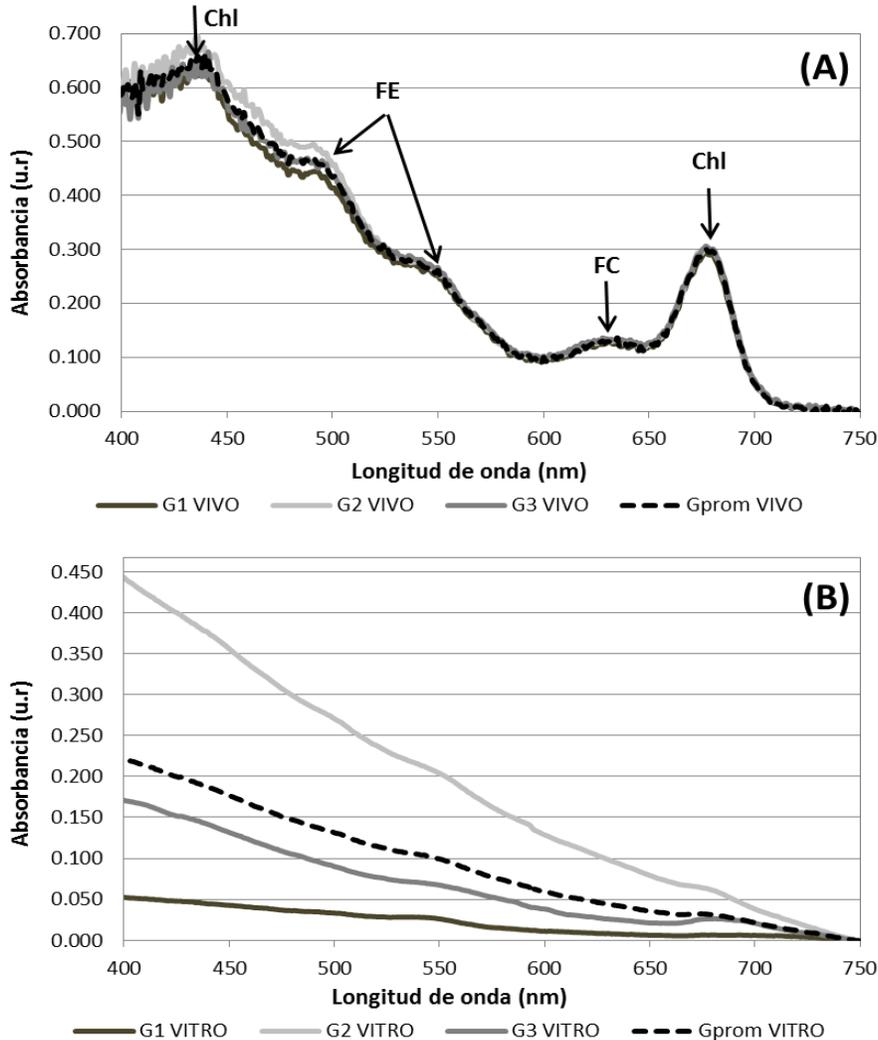


Figura 7. Absorción *in vivo* e *in vitro* de ficobiliproteínas extraídas con filtro de fibra de vidrio (GF/F) con replicas idénticas (G1, G2 y G3) y su promedio (Gprom) de un cultivo de *Synechococcus sp.* (A: *In vivo*, B: *In vitro*) (FE: Ficoeritrina, FC: Ficocianina, Chl: Clorofila).

En la figura 6-A se observa un pico de absorción promedio que sobresale a los 436 nm con absorbancia de 0.659 u.r., otro pico en el rango de las longitudes de onda corta, alrededor de los, 677nm con un valor de 0.300 u.r. correspondientes a los espectros de

absorción de la clorofila *a*. A su vez, se percibe un hombro a los 538 nm con valor de 0.279 u.r. y a los 493 nm con absorción de 0.458 u.r., longitudes de onda características de la ficoeritrina (FE). Por su parte la ficocianina (FC) se distingue a longitudes de onda alrededor de los 620 nm, la cual se observa con absorancias de 0.123u.r.

Por otro lado en la figura 6-B no se perciben picos de absorbancia correspondientes a los espectros de absorción de las FBP, las absorancias observadas son debido a las señales de fondo provenientes de partículas del filtro resultantes del rompimiento físico, variaciones relacionadas con atributos biofísicos de la sustancia al momento de la medición.

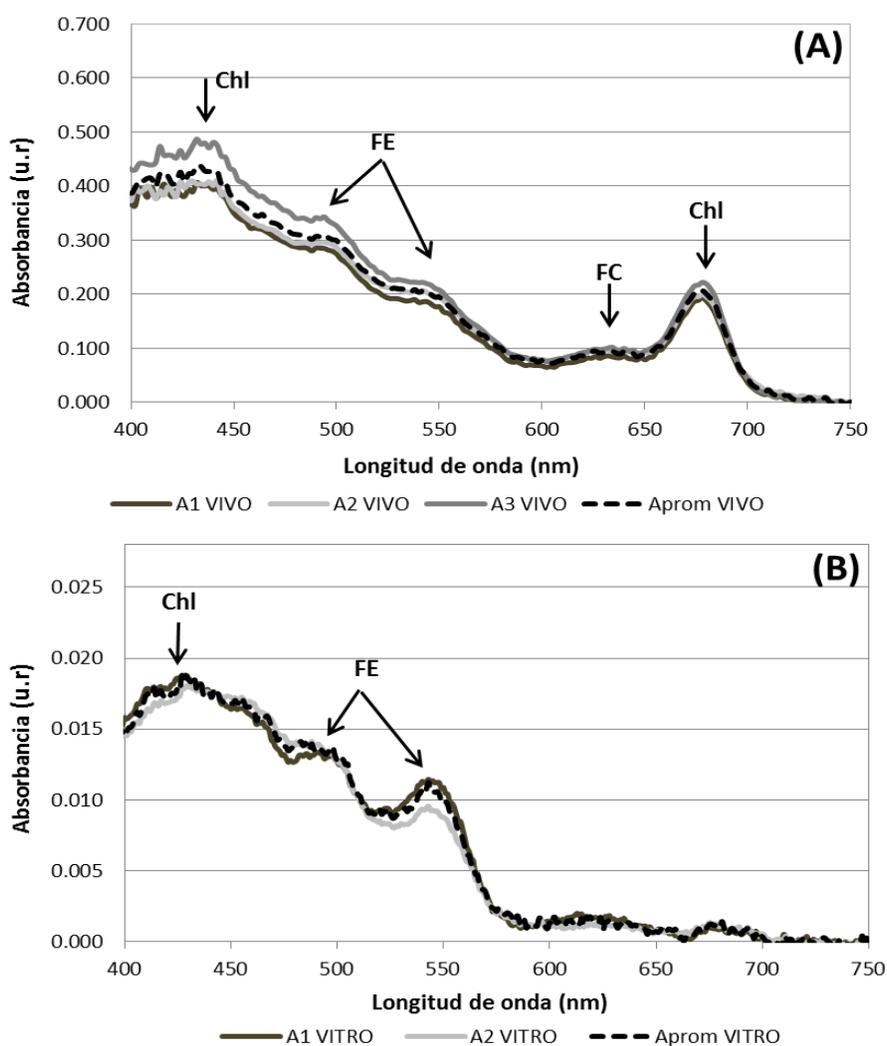


Figura 8. Absorción *in vivo* e *in vitro* de ficobiliproteínas extraídas con filtro de membrana de acetato de celulosa con replicas idénticas (A1, A2 yA3) y su promedio (Aprom) de *Synechococcus sp.* (A: *In vivo*, B: *In vitro*) (FE: Ficoeritrina, FC: Ficocianina, Chl: Clorofila).

En el filtro de membrana acetato de celulosa (figura 7-A), a las longitudes de onda 674 y 436 nm sobresalen los picos de absorbancia promedio de la clorofila *a* con valores de 0.201 y 0.428 u.r., respectivamente. A su vez, se observa la señal de las FBP a los 538 y 496 nm con absorbancias de 0.208 y 0.304 u.r. para el pigmento ficoeritrina. Por su parte la ficocianina se percibe a los 624 nm con una absorbancia de 0.093 u.r. En la Figura 7-B la señal de FBP sobresale de la clorofila *a*, no presentan los mismos niveles de absorbancia que en las mediciones *in vivo*, para apreciar las curvas de absorbancia la escala del eje ordenado fue modificada. En esta destaca el pigmento ficoeritrina a los 496 y 544 nm con absorbancias de 0.013 y 0.010 u.r. respectivamente. Así mismo se observa la clorofila *a* a los 429 nm con valor de 0.018 u.r.

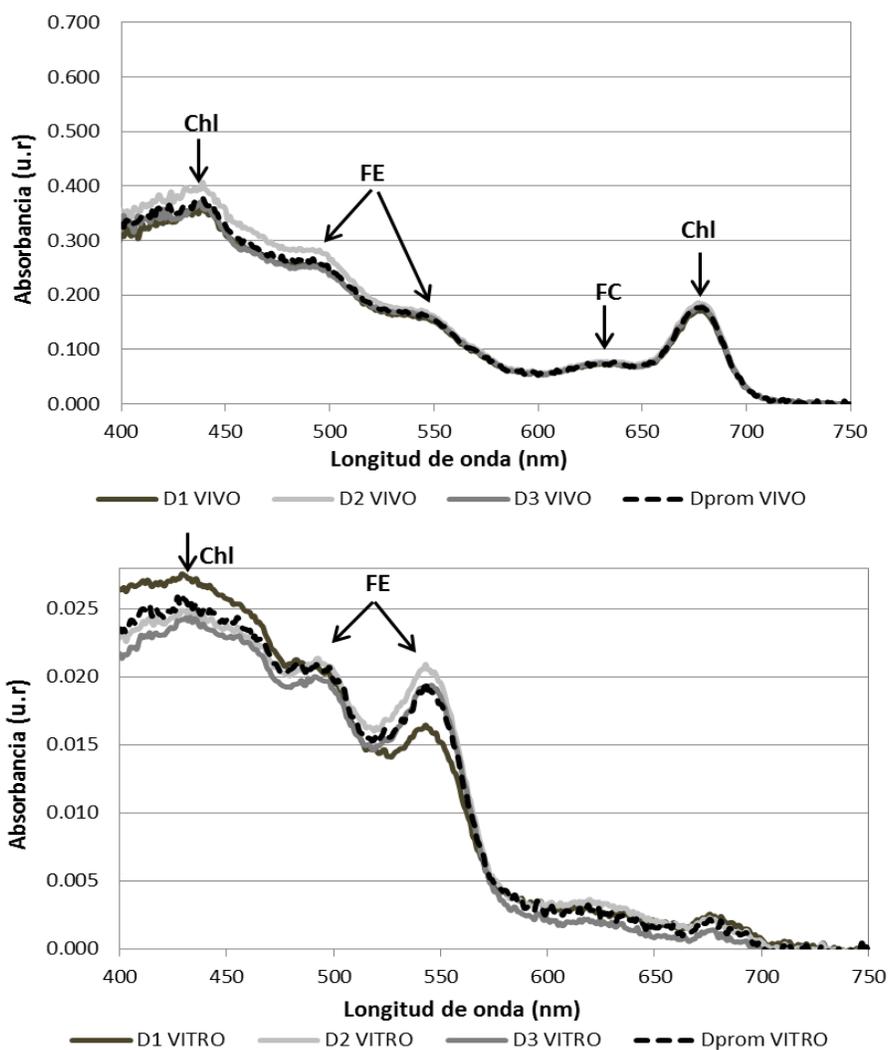


Figura 9. Absorción *in vivo* e *in vitro* de ficobiliproteínas extraídas con filtro de membrana Durapore con replicas idénticas (D1, D2 y D3) y su promedio (Dprom) de *Synechococcus sp.* (A: *In vivo*, B: *In vitro*) (FE: Ficoeritrina, FC: Ficocianina, Chl: Clorofila).

La figura 8-A muestra la absorción promedio *in vivo* de las FBP con tratamiento en filtro Durapore, a las longitudes de onda 679 y 439 nm se observan picos de absorbancia con valores de 0.177 y 0.378 u.r., respectivamente, correspondientes a la clorofila *a*. A su vez, se percibe el pigmento ficoeritrina en sus longitudes de onda características 492 y 540 nm con absorbancias de 0.266 y 0.167u.r., respectivamente. Por su parte las mediciones *in vitro* (Figura 8-B) no presentan los mismos niveles de absorbancia que en las muestras *in vivo* (al igual que en acetato de celulosa) por lo que para apreciar las curvas de pigmentos se ha modificado la escala del eje Y. En la figura 8-B destaca el pigmento ficoeritrina a las longitudes de onda 492 y 542 nm con absorbancias de 0.020 y 0.010 u.r., respectivamente; el pico de la clorofila *a* se observa a 431 nm con una absorbancia de 0.025 u.r.

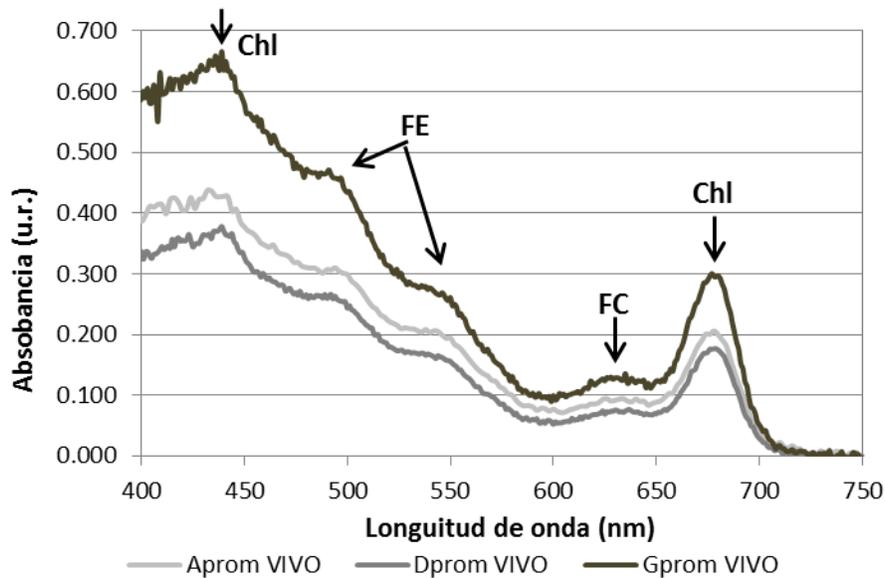


Figura 10. Absorción *in vivo* promedio de ficobiliproteínas extraídas con filtros de membrana (acetato de celulosa y Durapore) y fibra de vidrio (GF/F) de *Synechococcus sp.* (FE: Ficoeritrina, FC: Ficocianina, Chl: Clorofila).

El filtro que presenta mayor absorbancia es el de fibra de vidrio (GF/F) en comparación a los de membrana (Figura 9), todos los filtros presentan picos de absorbancia en las longitudes de onda características del pigmento ficoeritrina (495 y 540 nm) y ficocianina (620 nm) así como para la clorofila *a* (430 y 675 nm).

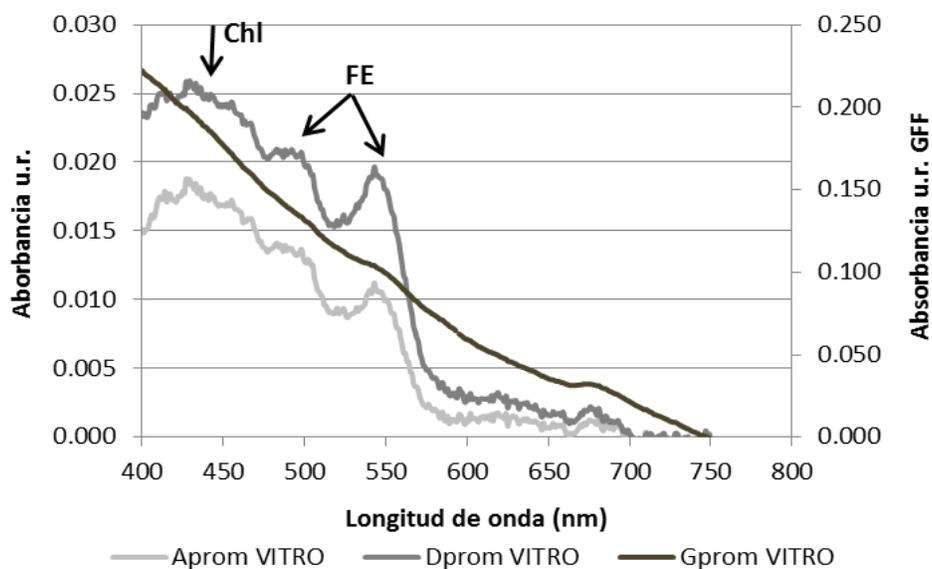


Figura 11. Absorción *in vitro* promedio de ficobiliproteínas extraídas con filtros de membrana (acetato de celulosa y Durapore) y fibra de vidrio (GF/F) de *Synechococcus sp.* (FE: Ficoeritrina, Chl: Clorofila).

Las absorbancias del filtro de Durapore se encuentran por encima de las de acetato de celulosa, en ambos filtros se observan los picos del pigmento ficoeritrina alrededor de las longitudes de onda 495 y 540 nm y de la clorofila *a* (430 nm). Por su parte el filtro GF/F no presenta los espectros de absorbancia de pigmentos, la señal observada son el resultado de variaciones relacionadas con atributos biofísicos de la sustancia al momento de la medición.

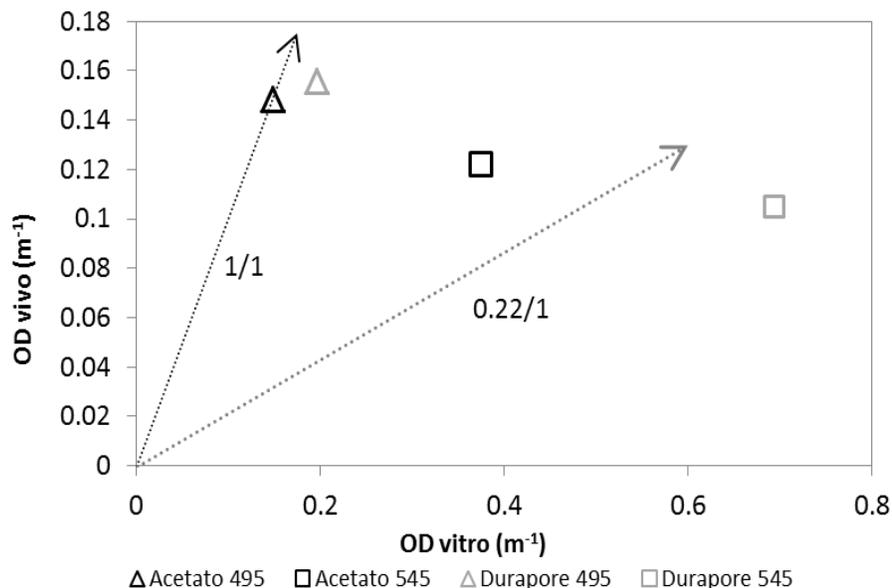


Figura 12. Densidad óptica (OD) *in vivo* e *in vitro* para las longitudes de onda específicas 495 y 545 nm, para los filtros de membrana (Acetato de celulosa y Durapore).

En la figura 12 se observa que para la longitud de onda 495 nm hay una relación de densidad óptica (OD) de 1/1, tanto para el filtro de Acetato de celulosa OD *in vivo* (0.1485 m⁻¹) y OD *in vitro* (0.1484 m⁻¹), así como para el filtro de Durapore OD *in vivo* (0.1558 m⁻¹) y OD *in vitro* (0.1916 m⁻¹). Por otro lado, las OD para la longitud de onda 545 nm presenta una relación de 0.22/1, en donde las mediciones *in vitro* son mayores en comparación con las *in vivo*, el filtro de acetato de celulosa con OD *in vivo* (0.1220 m⁻¹) y OD *in vitro* (0.3748 m⁻¹) y Durapore con OD *in vivo* (0.1050 m⁻¹) y OD *in vitro* (0.6938 m⁻¹).

Tabla II. Concentraciones de clorofila *a* (mg/m³) *in vitro* e *in vivo* para cada uno de los filtros tratados.

Filtro	Medición	Chl <i>a</i> (mg/m ³)			Chl <i>a</i> promedio (mg/m ³)	Desviación estándar
		0.274	3.316	1.074		
GFF	<i>in vitro</i>	0.274	3.316	1.074	1.555	1.288
GFF	<i>in vivo</i>	11.276	11.460	11.703	11.480	0.175
Acetato de celulosa	<i>in vitro</i>	0.005	0.031	---	0.018	0.013
Acetato de celulosa	<i>in vivo</i>	7.683	8.293	8.915	8.297	0.503
Durapore	<i>in vitro</i>	0.075	0.073	0.035	0.061	0.018
Durapore	<i>in vivo</i>	6.312	6.824	6.538	6.558	0.209

La tabla I contiene las concentraciones de clorofila *a* (mg/m^3) *in vitro* e *in vivo* para cada uno de los filtros tratados. En esta destacan aquellas mediciones hechas *in vivo* para todos los filtros, siendo las de más alto valor la del filtro de fibra de vidrio (GF/F) con $11.480 \text{ mg}/\text{m}^3$, seguido por el acetato de celulosa con $8.297 \text{ mg}/\text{m}^3$ y Durapore con $6.558 \text{ mg}/\text{m}^3$. Por su parte en la clorofila *a* medida *in vitro* se obtuvieron valores de $1.555 \text{ mg}/\text{m}^3$ para el filtro de fibra de vidrio (GF/F) presentando el valor más alto, 0.061 para Durapore y 0.018 para acetato de celulosa. Los conteos de cultivos concentrados utilizados de *Synechococcus sp.* muestran un promedio de 9.3×10^6 cel/mL.

DISCUSIÓN

La composición pigmentaria y estructura de las comunidades, así como la taxonomía y ecología de las cianobacterias depende en gran parte de su adaptación cromática, como lo proponen autores como Everroad *et al.* en el 2006, Palenik en el 2001 y Six *et al.* en el 2007. Para comprender esta adaptación es necesario conocer el papel de las FBP y la capacidad de los organismos para aclimatarse a diferentes condiciones de calidad de luz. Lo cual es posible a través de la medición de la absorción *in vivo* e *in vitro* de las FBP.

Existen varios métodos para la extracción de FBP, sin embargo todos difieren entre sí, es decir, no hay un protocolo estándar para la medición de FBP en cianobacterias oceánicas como *Synechococcus sp.* El método a utilizar para cualquier laboratorio dependerá del propósito de las muestras, la disponibilidad o especialidad del equipo, así como el tiempo y costos asociados con cada uno de los métodos. Algunos autores combinan diferentes técnicas, sin embargo en general utilizan equipo avanzado y de alto costo. La importancia del método tratado en este trabajo recae en elaborar un método relativamente sencillo y rápido, que utilice equipo de fácil y común acceso.

Las mediciones *in vivo* de las FBP en filtro de membrana no presentan absorbancias tan

altas como en GF/F, pero de igual forma se aprecian los picos de absorbancia de las FBP (Figura 9). Los valores de absorbancia más altos en el filtro de fibra de vidrio (GF/F) se pueden atribuir a la distribución de las partículas dentro del filtro, cabe mencionar que de acuerdo a Röttgers y Gehnke (2012), en las muestras *in vivo* hay una amplificación óptica, sobre todo en los filtros de fibra de vidrio, debido a la dispersión interna y al hecho de que las partículas se distribuyen en la profundidad del filtro, no solo en la superficie. Lo que, a su vez, explica las diferencias en absorbancias entre las muestras *in vivo* e *in vitro*. La absorción *in vitro* en los filtros de membrana (figura 11) corresponde a las señal de FBP principalmente Ficoeritrina y Ficocianina, sin embargo en filtros de fibra de vidrio no se observa la señal de FBP en los espectros de absorción. Yacobi *et al.* (2015) mencionan que la filtración en filtro GF/F consistentemente reduce la concentración de ficocianina, sin importar el medio de extracción ni la especie de cianobacteria de la que es extraída. Con base a esto y a lo observado en los resultados, se cree que el filtro GF/F interactúa de alguna manera con las FBP afectando su señal, posiblemente debido a una adsorción.

En general en los extractos se observa una alta absorbancia alrededor de las longitudes de onda 495 y 545 nm, las cuales son características para la ficoeritrina, pigmento accesorio en cianobacterias. A su vez, los espectros muestran absorciones asociadas con la clorofila *a*, sobre todo en las mediciones *in vivo*, siendo consistente con picos visibles cerca de 415, 433 y 675 nm. Estas absorbancias coinciden con lo documentado por Six *et al.*, 2007 en donde encuentran los máximos de absorción de FE a los 495 y 550 nm correspondientes a los dos tipo de ficoeritrina en cianobacterias. La cepa utilizada en el presente trabajo tiene picos de absorbancia que coinciden con la cepa WH7803, la cual es clasificada como tipo 3a basado en su composición pigmentaria y el contenido de los cromóforos FC, PEI and PEII (Six, *et al.*,2007).

Con la finalidad de obtener una mejor comparación de los picos de pigmentos entre mediciones *in vivo* e *in vitro* se calculó la absorción específica para las longitudes de

onda 495 y 545 nm (longitudes de onda de las FBP). En esta se considera principalmente los picos de máxima absorbancia y el factor de amplificación en las muestras *in vivo* con lo cual se obtiene lo que se conoce como densidad óptica (OD) para cada una de las muestras filtradas y en las longitudes de onda mencionadas. Se observó que los picos a la longitud de onda de 545 nm son mayores en OD para las mediciones *in vitro* en comparación con las *in vivo* (Figura 12); esto resulta en una relación de 0.22/1, que sugiere que hay un posible efecto paquete en las mediciones *in vivo* para la FBP presentes en esa longitud de onda específica. Al realizar las mediciones de absorbancias, se filtra la misma cantidad de muestra tanto para muestras *in vivo* como *in vitro* por lo que se espera tener una relación 1/1 de OD a una longitud de onda dada, como los observados para la longitud de onda 495 nm.

Por su parte las concentraciones de clorofila *a* (mg/m^3) *in vitro* e *in vivo* para cada uno de los filtros tratados no son consistentes entre replicas, lo que sugiere que al momento de la filtración de la muestra no fueron correctamente homogenizados, la presión no era suficiente o no se extrajo completamente la muestra. Las muestras *in vitro* son en las que se observa una mayor variación entre ellas, indicando una posible pérdida de muestra, ya sea al ser transferidas a la celda espectrofotométrica para su medición o al momento de realizar el rompimiento de células durante la agitación. La absorbancia *in vivo* sobre filtros GF/F es aproximadamente dos veces la absorbancia real (factor de amplificación). De acuerdo a la tabla II los otros filtros tienen un factor de amplificación mucho menor que posiblemente es resultado de una menor reflectancia del filtro.

En este trabajo se observó la importancia de tener una rutina que permita mantener las muestras bajo condiciones de temperatura óptimas, para evitar la desnaturalización de las FBP y perder la señal en las mediciones. Esto tomando los cuidados necesarios en el rompimiento de las células para prevenir aumentos en la temperatura, como por el uso excesivo del Mini-BeadBeater.

Por otro lado también es relevante considerar el uso y proporción adecuada de la combinación de perlas de zirconia de 0.1 μm y 0.5 μm para el rompimiento físico de las células. Es importante mencionar el uso de Buffer de fosfatos como medio de extracción para FBP como una opción alterna al Asolectin-CHAPS, como lo sugiere Zimba en el 2012 y Viskari y Colyer en el 2001, aunque en comparación con este último el Buffer de fosfatos presenta menor eficiencia, sin embargo requiere un menor costo y fácil manejo.

CONCLUSIONES

Existen diferencias en la extracción *in vitro* de FBP entre filtros de membrana (Acetato de celulosa y Durapore) y filtros de fibra de vidrio (GF/F). Se propone es debido a una posible adsorción de las FBP en el filtro GF/F, sin embargo es necesario realizar otro tipo de pruebas para afirmar lo sugerido. Cabe mencionar que el filtro que se utiliza comúnmente para las mediciones de pigmentos es el filtro GF/F, por lo que es importante continuar pruebas para comprobar lo propuesto y utilizar como opción alterna los filtros de membrana.

Se requieren hacer más pruebas con el filtro GF/F para encontrar la causa de la posible retención o pérdida de señal de las FBP y de esta manera descartar o comprobar una posible adsorción de las FBP en el filtro.

Las diferencias entre la absorción *in vivo* e *in vitro* son principalmente debido a la amplificación óptica que existe en las mediciones *in vivo*.

La relación observada en la OD *in vivo* y OD *in vitro* para la longitud de onda 545 nm tanto para Acetato de celulosa como para Durapore sugiere que hay un efecto paquete en las mediciones *in vivo*.

El método utilizado en el presente trabajo es una alternativa para la medición de la

absorción *in vivo* e *in vitro* de ficobiliproteínas, en donde se utiliza equipo de fácil o común acceso, como un espectrofotómetro, el material y tiempo invertido permite que sea utilizado de manera rutinaria para el análisis de muestras. A su vez, se observó que los filtros de membrana son una opción alterna al método tradicional (GF/F) para la medición de pigmentos.

Como recomendación para futuros experimentos es importante ver los límites de detección y sensibilidad del método propuesto para la medición de la absorción *in vivo* e *in vitro* de ficobiliproteínas.

LITERATURA CITADA

Alka G. y Sainis JK. 2009. Isolation of C-phycoerythrin from *Synechococcus sp.*, (*Anacystis nidulans* BD1). *Journal of Applied Phycology* 22: 231–233

Alves C., Gonza MT. e Iriarte JL. 2008. Functional groups in marine phytoplankton assemblages dominated by diatoms in fjords of southern Chile. *Journal of Plankton Research* 11 (30): 1233–1243

Apt EK., Collier JL. y Grossman AR. 1995. Evolution of the Phycobiliproteins. *Journal of Molecular Biology* 248: 79–96

Everroad C., Six C., Partensky F., Thomas JC., Holtzendorff J., Wood AM. 2006. Biochemical bases of type IV chromatic adaptation in marine *Synechococcus spp.* *J Bacteriol*, 188:3345-3356.

Gregor J., Maršálek B. y Šípková H. 2007. Detection and estimation of potentially toxic cyanobacteria in raw water at the drinking water treatment plant by *in vivo* fluorescence method. *Water Res* 41:228–234

Guillard R.R.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. pp 26-60. In Smith W.L. and Chanley M.H (Eds.) *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Plenum Press, New York, USA.

Guillard R.R.L. y Ryther J.H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Can. J. Microbio* 8: 229-239.

Hoepffner N. y Sathyendranath S. 1991. Effect of pigment composition on absorption properties of phytoplankton. *Marine Ecology – Progress Series*: (73)11–23.

Holm-Hansen, O., C.J. Lorenzen, R. W. Holmes y J. D. H. Strickland (1965). Fluorometric Determination of Chlorophyll. *J. Cons. int. Explor. Mer* 30 (1): 3-15. doi: 10.1093/icesjms/30.1.3

Horváth H., Kovács AW., Riddick C. y Présing M. 2013. Extraction methods for phycoerythrin determination in freshwater filamentous cyanobacteria and their application in a shallow lake. *European Journal of Phycology* 48(3): 278–286

Lantoiné F. y Neveux J. 1996. Spatial and seasonal variations in abundance and spectral characteristics of phycoerythrins in the tropical northeastern Atlantic Ocean. *Deep-Sea Research I*. 2(44):

223-246.

Lawrenz E., Fedewa J.E. y Richardson T.L. 2011. Extraction protocols for the quantification of phycobilins in aqueous phytoplankton extracts. *Journal of Applied Phycology*, 23: 865–871.

Marsac NT. 2003. Phycobiliproteins and phycobilisomes: the early observations. *Photosynthesis Research* 76: 197–205

Méléder V., Laviale M., Jesus B., Mouget JL., Lavaud J., Kazemipour F., Launeau P. y 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 (2013) 115–124

Miller CB. Y Wheeler PA. 2012. Biological Oceanography. United States of America. Wiley-Blackwell. Second edition. Pp 459.

Milton JS. y Tsokos JO. 1989. Estadística para biología y ciencias de la salud. Madrid: Interamericana-McGraw Hill.

Moore, LR., Goericke, R., Chisholm, SW., 1995. Comparative physiology of *Synechococcus* and *Prochlorococcus*: influence of light and temperature on growth, pigments, fluorescence and absorptive properties. *Mar. Ecol.: Prog. Ser.* 116, 259–275.

Nelson NB. y Prézelin BB. 1993. Calibration of an integrating sphere for determining the absorption coefficient of scattering suspension. *Appl. Opt.* 32: 6710–6717.

Palenik B. 2001. Chromatic adaptation in marine *Synechococcus* strains. *Appl Environ Microbiol*, 67:991-994.

Richardson TL., Lawrenz E., Pinckney JL., Guajardo RC., Walker EA., Paerl HW. y MacIntyre HL. 2010. Spectral fluorometric characterization of phytoplankton community composition using the Algae Online Analyser. *Water Res* 44:2461–2472

Röttgers R. y Gehnke S. 2012. Measurement of light absorption by aquatic particles: improvement of the quantitative filter technique by use of an integrating sphere approach. *Applied Optics* 51(9): 1336-1351

Ruiz de la Torre, MC. 2007. Microbios fotótrofos en la zona de transición del Pacífico mexicano,

búsqueda de diferencias espectrales, crucero FU/0205. Tesis para obtener el grado maestría en ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, México.

Sidler WA. 1994. Phycobilisome and phycobiliprotein structures. In *The molecular biology of cyanobacteria*. Bryant, D.A., editor. Kluwer, Dordrecht.

Six C., Thomas JC., Garczarek L., Ostrowski M., Alexis Dufresne A., Blot N., Scanlan DJ. y Partensky F. 2007. Diversity and evolution of phycobilisomes in marine *Synechococcus spp.*: a comparative genomics study. *Genome Biology*, 8:R259 (doi:10.1186/gb-2007-8-12-r259)

Soni B., kalavadia B., Trivedi, U. y Madamwar, D. 2006. Extraction, purification and characterization of phycocyanin from *Oscillatoria quadripunctulata* –isolated from the rocky shores of Bet-Dwarka, Gujarat, India. *Process Biochemistry* 41: 2017–2023

Tassan S. y Ferrari GM. 2002. A sensitivity analysis of the ‘transmittance-reflectance’ method for measuring light absorption by aquatic particles. *J. Plankton Res.* 24: 757–774.

Vernet M., Mitchell BG. y Holm O. 1990. Adaptation of *Synechococcus* in situ determined by variability in intracellular phycoerythrin-543 at a coastal station off the Southern California coast, USA. *Marine Ecology Progress Series* 63: 9-16.

Viskari PJ. y Colyer CL. 2003. Rapid extraction of phycobiliproteins from cultured cyanobacteria samples. *Anal Biochem.*

Viskary PJ., Kinkade CS. y Colyer CL. 2001. Determination of phycobiliproteins by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis* 22: 2327-2335

Yacobi Y. Z., Köhler J., Leunert F. y Gitelson A. 2015. Phycocyanin-specific absorption coefficient: Eliminating the effect of chlorophylls absorption. *Limnol. Oceanogr.: Methods*, (13) 157–168

Zhu Y., Chen X.B., Wang K.B., Li Y.X., Bai K.Z., Kuang, T.Y. y Ji H.B. 2007. A simple method for extracting C-phycocyanin from *Spirulina platensis* using *Klebsiella pneumonia*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74: 244–248

Zimba P.V. 2012. An improved phycobillin extraction method. *Harmful Algae*, 17: 35–39