# Caracterización espectrofotométrica y electroforética de los componentes polipeptídicos de ficobilisomas de ocho cepas de cianobacterias

#### ANGÉLICA MA. RODRÍGUEZ-DORANTES y MA. TERESA GARCÍA-CASTAÑEDA\*

Laboratorio de Fisiología Vegetal Departamento de Botánica Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN Prol. de Carpio y Plan de Ayala, Col. Santo Tomás Apartado Postal 42-186, 11340 México, D.F.

. RODRÍGUEZ-DORANTES, ANGÉLICA MA. y MA. TERESA GARCÍA-CASTAÑEDA, 1998. Caracterización espectrofotométrica y electroforética de los componentes polipeptídicos de ficobilisomas de ocho cepas de cianobacterias. An. Esc. nac. Cienc. biol., Méx., 44:117-125.

RESUMEN. Los ficobilisomas difieren en cuanto a su composición polipeptídica en relación con el organismo que los presenta, lo que los hace herramientas moleculares adecuadas para la caracterización bioquímica de cianobacterias.

En este trabajo se analizó la composición molecular y espectrofotométrica de los ficobilisomas de ocho cianobacterias procedentes de dos sitios. La caracterización morfológica de las cepas aisladas permitió identificarlas en varios géneros.

El análisis de los datos electroforéticos muestra que la similitud entre las ocho cianobacterias estudiadas no es mayor a un 80%. Sólo se pudo establecer relación entre cepas de la misma procedencia, pero no entre géneros determinados morfológicamente, por lo que esta caracterización molecular resultó adecuada para eliminar el manejo de cepas iguales pertenecientes al mismo género, permitiendo considerarlas (tentativamente) como cepas de diferentes especies.

## INTRODUCCIÓN

Las cianobacterias, igual que las algas rojas, presentan estructuras fotosintéticas características, que se agrupan en forma regular en las membranas tilacoidales y están relacionadas con la captación y transferencia de energía al fotosistema II: los ficobilisomas, arreglos supramoleculares de proteínas asociadas, o no, a un cromóforo, que es un pigmento lineal formado por cuatro tetrapirroles. Pequeñas variaciones en la estructura de dicho cromóforo hacen que sus máximos de absorción se localicen en tres regiones próximas al espectro visible: 560 nm (ficoeritrina), 620 nm (ficocianina) y hasta 650 nm (aloficocianina) (Glazer, 1988).

En cianobacterias, las ficobiliproteínas constituyen cerca del 80% del contenido proteico total, su peso molecular oscila entre 7 y 10 KDa, y están asociadas con 300-800 cromóforos.

<sup>\*</sup>Becario COFAA-IPN.

Como es de esperarse, el número y composición de polipéptidos origina que el arreglo interno de los ficobilisomas sea complejo, y se pueden encontrar tanto polipéptidos (con un peso molecular de 70-120 KDa) no asociados a cromóforos, así como polipéptidos asociados cuyo peso molecular varía de 25-35 KDa (Glazer, 1981).

Por otra parte, desde la década de los años setenta los microbiólogos encontraron que la identificación de especies de cianobacterias mediante el empleo de las características morfológicas utilizadas por los ficólogos, es muy subjetiva debido a la gran variación que sufre la mayoría de estos organismos al modificarse las condiciones ambientales, por ese motivo se empezaron a aplicar criterios de taxonomía microbiológica (Rippka, *et al.*, 1979 y Stanier, *et al.*, 1981).

Por todo lo anterior, y considerando que los diferentes géneros, especies y cepas de cianobacterias difieren en la composición polipéptídica de las ficobiliproteínas, se considera que éstas pueden ser idóneas como caracteres de identificación filogenética (Apt, 1995).

En este trabajo se caracterizaron, espectrofotométrica y electroforéticamente, los ficobilisomas aislados de ocho cepas de cianobacterias de orígenes diversos, pertenecientes a cinco géneros. Posteriormente se realizó el análisis fenético de los datos obtenidos, el cual agrupó a las cianobacterias estudiadas según el número y tipo de polipéptidos de sus ficobilisomas, los grupos resultantes formaron a su vez dos conjuntos, que se diferencian por su lugar de procedencia y sus propiedades de adaptación a diferentes condiciones de iluminación.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se cultivaron ocho cepas de cianobacterias, propiedad del cepario del Laboratorio de Fisiología Vegetal, cuyos géneros y procedencia se indican en la tabla I.

El cultivo se realizó en matraces Erlenmeyer de 1,000 ml con medio mineral BG-11 (Castenholz, 1988), con 50 ó 100% de la fuente de nitrógeno (NaNO<sub>3</sub>); con irradiación continua proporcionada por lámparas de luz de día, aireación del medio y a una temperatura de 37°C. La biomasa se cosechó cuando los cultivos se encontraban en la fase exponencial de su curva de crecimiento, a los ocho días.

#### Aislamiento y caracterización de ficobilisomas

Los ficobilisomas se aislaron según el método de Mortera (1994) y se obtuvieron los espectros de absorción de las muestras en un espectrofotómetro *Shimadzu* de UV-Vis, en el intervalo de 400 a 700 nm. Para determinar el índice molar ficocianina/aloficocianina (FC/AF) en los ficobilisomas, se aplicaron los coeficientes de absorción molar de Bryant *et al.* (1979) a las lecturas de absorbancia de 560, 620 y 650 nm.

La caracterización electroforética de los ficobilisomas se realizó en geles de poliacrilamida-SDS según el método de Hames (1987), y los polipéptidos separados fueron teñidos con azul de Coomassie G-250.

## Análisis fenético

Para establecer las relaciones entre las cepas bajo estudio, se utilizó el programa MULTIVAR (Sánchez-Colón et al., 1980). A los datos espectrofotométricos y electroforéticos se aplicaron los coeficientes de distancia euclidiana y el general de similitud de Gower, este último es un coeficiente útil para el manejo de datos cuantitativos, binarios y multiestado, de similitud flexible y especial para la información mezclada de caracteres (Dunn, *et al.*, 1982; Gower, 1971; Kohlmann, 1994; Rodríguez, 1998). Una vez obtenidos los valores de similitud y de distancia entre los ficobilisomas de las ocho cianobacterias, se construyeron los fenogramas respectivos utilizando el método de agrupamiento UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Arithmetic Averages*) del programa arriba mencionado, y se estableció la veracidad y confianza de los fenogramas a través de la aplicación del coeficiente cofenético de correlación producto-momento de Pearson (Sneath *et al.*, 1973).

CEPA	GÉNERO	PROCEDENCIA
FV 9	Pleurocapsa spp.	ruinas arqueológicas de Palenque, Chiapas
FV 8	Gloeocapsa spp.	
FV 3	Myxosarcina spp.	66 66
C 23	Fischerella spp.	arrozal de Zacatepec, Morelos
C 24	Fischerella spp.	" "
C 29	Nostoc spp.	" "
C 32	Fischerella spp.	ss ss
C 33	Fischerella spp.	۰٬ ۰٬

TABLA I. Géneros y procedencia de las cepas estudiadas.

# **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Se obtuvieron los espectros de absorción de las ocho cepas, con picos de absorción máxima en las regiones comprendidas entre 620 y 630 nm, a excepción de la cepa C-29 que tuvo un pico de absorción a los 612 nm, según se muestra en la tabla II.

TABLA	II.	Picos	de	absorción	máxima	de	los	ficobilisomas.
-------	-----	-------	----	-----------	--------	----	-----	----------------

CEPA	LONGITUD DE ONDA	As (máxima)
	(nm)	
FV 9	625.2	1.51
FV 8	626.0	2.09
FV 3	625.6	1.28
C 23	624.4	1.95
C 24	629.4	2.30
C 29	612.0	2.38
C 32	630.8	1.59
C 33	631.2	1.91

Las lecturas de As a 560, 620 y 650 nm, y los índices FC/AF ( $\mu M$ ), de cada cepa, se anotan en la tabla III.

CEPA	ALOFICOCIANINA	FICOCIANINA	FICOERITRINA	ÍNDICE FC/AF
FV 9	13.03	11.5	3.00	0.88
FV 8	31.27	33.8	9.47	1.08
FV 3	77.80	7.1	14.31	0.09
C 23	29.75	23.6	7.29	0.79
C 24	47.86	38.0	12.68	0.79
C 29	58.76	45.4	14.67	0.77
C 32	15.97	13.6	4.12	0.85
C 33	30.35	24.3	7.79	0.80

TABLA III. Determinación de la concentración de pigmentos en el ficobilisoma (micromoles).

La caracterización polipeptídica de los ficobilisomas de las ocho cepas, realizada en geles de poliacrilamida-bisacrilamida-SDS, mostró un número de polipéptidos mínimo de nueve y máximo de 15, del total de las cepas estudiadas, el polipéptido más común sólo alcanzó una frecuencia del 62.5%. Los polipéptidos más comunes entre las cepas y sus movilidades electroforéticas se muestran en las tablas IV y V.

TABLA IV. Número de polipéptidos resueltos de los ficobilisomas, por cepas.

CEPA	No. de polipéptidos	Movilidad (cm/volt)
C 33	13	1.2,1.55,1.85,2.25,2.4,2.7,2.9,3.05,3.2,(3.3-3.4),3.6,3.85.
FV 3	12	1.7,1.85,2.0,2.1,2.35,2.5,3.7,3.9,4.1, 4.3,4.5,4.7.
C 32	14	1.2,1.5,1.7,1.8,2.1,2.3,2.4,2.55,2.65, 2.75,2.8,2.95,3.6,3.9.
FV 8	11	1.7,1.9,2.1,2.4,2.55,3.3,3.85,4.0,4.3, 4.5,4.8.
FV 9	15	1.7,1.9,2.0,2.2,2.45,2.55,2.6,3.7,3.8, 3.9,4.0,4.2,4.3,4.6,4.9.
C 23	9	1.7,1.9,2.4,2.55,2.65,2.8,4.0,4.7,4.9
C 24	13	1.2,1.45,1.75,2.0,2.1,2.25,2.8,3.1, 3.2,3.45,3.85,4.0,4.2.
C 29	9	1.2,1.5,1.6,1.8,2.0.2.2,2.4,4.1,4.3.

TABLA V. Matriz de polipéptidos comunes entre las cepas.

	C 33	FV 3	C 32	FV 8	FV 9	C 23	C 24
FV 3	1						
C 32	3	3					
FV 8	3	4	4				
FV 9	0	5	3	5			
C 23	1	2	5	5	4		
C 24	4	2	3	3	3	2	
C 29	2	3	4	2	3	1	2

120

Rodríguez-Dorantes, A. Ma. et al. CARACTERIZACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA Y ELECTROFORÉTICA 121

En las tablas VI y VII se anotan, respectivamente, las matrices de distancia y disimilitud obtenidas del análisis de la relación entre las cepas estudiadas, y en las figuras 1 y 2 se muestran los fenogramas obtenidos. Los valores de correlación cofenética fueron de: 0.96 y 0.85, respectivamente.

	FV 9	FV 8	FV 3	C 23	C 24	C 29	C 32	C 33
FV 9	0							
FV 8	1.67	0						
FV 3	1.03	2.25	0					
C 23	1.32	2.26	1.97	0				
C 24	4.52	3.80	4.38	5.04	0			
C 29	13.39	14.15	13.88	12.47	17.41	0		
C 32	5.63	5.15	5.29	6.45	2.05	18.92	0	
C 33	6.08	5.45	5.80	6.80	1.95	19.25	0.86	0

TABLA VI. Matriz de distancias (distancia euclidiana) de las características espectroscópicas entre las cepas.



FIG. 1. Fenograma de distancias de las ocho cepas. Datos espectrofotométricos.

	FV 9	FV 8	FV 3	C 23	C 24	C 29	C 32	C 33
FV 9	0							
FV 8	0.63	0						
FV 3	0.61	0.68	0					
C 23	0.60	0.56	0.72	0				
C 24	0.70	0.66	0.74	0.67	0			
C 29	0.72	0.71	0.71	0.70	0.66	0		
C 32	0.69	0.68	0.70	0.59	0.68	0.67	0	
C 33	0.78	0.63	0.74	0.68	0.54	0.66	0.64	0

## TABLA VII. Matriz de disimilitud (Gower) de las movilidades electroforéticas de los polipéptidos, entre las cepas.



FIG. 2. Fenograma de disimilitud de las ocho cepas. Datos espectrofotométricos y electroforéticos.

122

Rodriguez-Dorantes, A. Ma. et al. CARACTERIZACIÓN ESPECTROFOTOMETRICA Y ELECTROFORÉTICA 123

La caracterización espectrofotométrica de los ficobilisomas muestra que los picos de absorción máxima de los cromóforos pertenecientes a los polipéptidos coloridos (ficobiliproteínas) quedan comprendidos entre las longitudes de onda de 560, 620 y 650 nm.

Durante la caracterización de estas muestras de ficobilisomas, se encontraron picos de absorción entre 625 y 630 nm, que corresponden a regiones características de la absorción del cromóforo ficocianina; a excepción de la cepa C 29, cuyo máximo de absorción se presentó a los 612 nm, este valor fotométrico no se considera muy representativo de la cepa, ya que no se observó un pico bien definido, lo que pudo deberse a contaminación de la muestra de ficobilisomas utilizada.

En el resto de las muestras, el pico máximo de absorción fue muy claro. Las lecturas realizadas a 560, 620 y 650 nm, muestran la abundancia de pigmentos que absorben en la región de los cromóforos de ficocianina, aloficocianina y, en baja proporción, ficoeritrina.

Con respecto a los coeficientes de extinción micromolar, éstos indican que en las cianobacterias estudiadas la concentración de ficocianina fue, en la mayoría de los casos, menor que la de aloficocianina; sin embargo, es necesario considerar que, bajo las condiciones de trabajo, los polipéptidos de unión se asocian específicamente con las diferentes ficobiliproteínas y, por ello, sus propiedades espectrales pueden modificarse; esto es, la absorción máxima para ficocianina puede variar y dar valores de absorción máxima entre 610 y 615 nm.

No obstante lo anterior, se observaron espectros muy parecidos entre C 23 y C 33 y entre las C 32, FV 9, C 24 y FV 8, quedando fuera la cepa FV 3, con un pico característico, lo mismo que la C 29.

Analizando los valores de la resolución electroforética, es posible distinguir entre nueve y 15 polipéptidos totales, que incluyen a los polipéptidos no coloridos de los grupos I y II, así como los correspondientes a ficobiliproteínas y a otros polipéptidos, posiblemente producto de contaminación durante el proceso de extracción.

De los polipéptidos resueltos, sólo uno de ellos, el de movilidad igual a 1.7, se presentó en un 75% de las cepas estudiadas (FV3, FV8, FV9, C23 y C32), mientras que los polipéptidos restantes sólo se presentaron en un 25, 37.5 y 75% de las cepas; por ese motivo, éste se puede identificar como uno de los polipéptidos de unión del Grupo I, relacionado con el ensamblaje de las ficobiliproteínas dentro del ficobilisoma.

Las cepas FV3, FV9, C24 y C29 presentan en común a los polipéptidos de movilidad de 2.0 ó 2.1, mientras que las cianobacterias FV3, C32, FV8 y C24 tienen en común los polipéptidos 2.4 y 2.55. Tanto los polipéptidos de movilidad 2.0 ó 2.1, como los de 2.4 y 2.55 corresponden a los polipéptidos de unión del grupo II, no coloridos y asociados también con el ensamblaje de las ficobiliproteínas; mientras que los que presentan movilidades de 4.0 y 4.3 se relacionan con componentes de las ficobiliproteínas.

Del análisis fenético, que asoció las características espectroscópicas de los ficobilisomas aislados, se obtuvieron tres grupos, dos de ellos asociados entre sí y un tercero asociado a ellos (Fig. 1).

El par de grupos lo constituyen el grupo de las cianobacterias C32, C33 y C24, del género *Fischerella* y el conformado por las cepas FV9, FV3, C23 y FV8 (FV9 asociada con FV3, ambas con C23 y las tres, en conjunto, con FV8), que integran un grupo heterogéneo. Estos dos grupos se asocian con el constituido por la cepa C29, que queda como un grupo aparte.

El fenograma que representa las relaciones de similitud entre sus caracteres electroforéticos y espectrofotométricos (Fig. 2), también muestra tres grupos: dos asociados entre sí (el grupo constituido por las cepas FV9 y FV3 y el conformado por las cepas FV8 y C23 asociadas con la cianobacteria C32) que se asocian, a su vez, con un tercero, formado por las cepas C24 y C33 asociadas con C29. En este caso, las asociaciones se dan con base en un buen número de datos de presencia/ausencia de polipéptidos resueltos, que conforman 27 caracteres, y sólo siete datos espectrofotométricos.

Desde el punto de vista de la relación fenética entre los ejemplares de *Fischerella* estudiados, las cepas C24, C32 y C33 resultaron ser más parecidas entre sí, con respecto a sus características espectrofotométricas, que a la C23, que se asocia con las cepas de cianobacterias unicelulares FV9, FV8 y FV3: *Pleurocapsa, Gloeocapsa y Myxosarcina*; mientras que la cepa C29, *Nostoc*, una especie filamentosa fijadora de nitrógeno, quedó completamente aparte.

La interpretación más factible de esta agrupación es que se deba, en parte, al sitio de origen o procedencia de las cepas, un grupo proveniene del arrozal y el otro de las ruinas arqueológicas, ya que en cada sitio los requerimientos de luz son diferentes.

Con respecto a los datos moleculares, se estableció una asociación en tres grupos, aunque parecidos sólo en un 50%, según la siguiente relación: el grupo conformado por las cepas C24 y C33 asociadas con la C29, que corresponden a dos cianobacterias del género *Fischerella* con *Nostoc* provenientes del arrozal; y el grupo FV8 y C23 con C32, constituido por *Gloeocapsa* con dos *Fischerella*, y un tercer grupo formado por *Pleurocapsa* FV9 y *Myxosarcina* FV3.

### CONCLUSIONES

La caracterización, espectrofotométrica y electroforética, de los ficobilisomas de cianobacterias permitió distinguir diferentes cepas del mismo género.

Esta metodología permitió identificar especies de cianobacterias, difíciles de diferenciar por las metodologías tradicionales.

El análisis electroforético aportó datos que agrupan a las cepas en dos conjuntos que tienen en común el lugar de procedencia (condiciones ambientales) más que la relación taxonómica entre los géneros.

Finalmente, puede concluirse que los ficobilisomas son una evidencia útil en la distinción entre cepas aisladas del mismo sitio y que pertenecen al mismo género.

## SUMMARY

The many differences observed among the polypeptide composition of  $\rho$ hycobilisomes, make them excellent molecular tools for the biochemical characterization of cyanobacterial strains.

In this work, we analyzed the molecular composition and spectrophotometrics of phycobilisomes of eight cyanobacteria from two locations.

Morphological characteristics from the isolated strains, allowed us to identify various genera.

Rodríguez-Dorantes, A. Ma. et al. caracterización espectrofotométrica y electroforética 125

The analysis of electrophoretic data showed that these strains are similar no more than 80%. We could only establish a close relationship among strains from the same location, but not among those strains morphologically related. Therefore, the molecular characterization was of great value, since we could identify different strains, which could not be identified as such by means of morphological characterization.

## Bibliografía

- APT, K. E., J. L. COLLIER & A. R. GROSSMAN, 1995. Evolution of phycobiliproteins. J. Mol. Biol., 248:79-96.
- BRYANT, D. A., G. GUGLIELMI, N. TANDEAU DE MARSAC, A. M. CASTETS & G. COHEN, 1979. The structure of cyanobacterial phycobilisomes: a model. Arch. Microbiol., 123:113.
- CASTENHOLZ, N. R., 1988. Culturing methods for Cyanobacteria. in: Parker, L. & A. N. Glazer (Eds.). Methods in Enzymology, 167:1:81.
- DUNN, G. & B. S. EVERITT, 1982. An introduction to Mathematical Taxonomy. Cambridge: Cambridge Univ. Press.
- GLAZER, N. A., 1981. Photosynthetic accessory proteins with bilin prosthetic groups. In: Conn & Stumpf (Eds.). The Biochemistry of Plants. Academic Press, Inc. 8:51-95.
- \_\_\_\_\_, 1988. Phycobilisomes. In: Parker, L. & A. N. Glazer (Eds.). Methods in Enzymology, 167, 32:304.
- GOWER, J. C., 1971. A general coefficient of similarity and some of its properties. *Biometrics*. 27:857-871.
- HAMES, D., 1987. An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis. in: Hames, D. & Rickwood (Eds.). Gel Electrophoresis of Proteins. IRL. Press. Oxford, Washington.
- KOHLMANN, B., 1994. Algunos aspectos de la taxonomía numérica y sus usos en México. En: Llorente, J. y Luna, I. (eds.) Taxonomía Biológica, F.C.E., México, D.F.
- Mortera, Z. M. S., 1994. Establecimiento del cultivo de dos cepas de cianobacterias y su caracterización bioquímica y fisiológica. Tesis profesional. ENCB, IPN. México.
- RIPPKA, O., J. DERVELLES, J. B. WATERBURY, M. HERDMAN, & P. Y. STANIER, 1979. Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. J. Gen. Microbiol., 111:1-61.
- RODRÍGUEZ, D. A., 1998. Estudio de la variación molecular de algunos representantes de las familias: Caricaceae, Fouquieriaceae y Passifloraceae. Tesis de maestría. ENCB, IPN. México.
- SÁNCHEZ-COLÓN, S. & J. L. ORNELAS de Anda, 1980. *MULTIVAR*: paquete de programas para Análisis Multivariado Aplicado a la Ecología. Lab. de Ecología Vegetal, ENCB, IPN.
- SNEATH. P. H. & R. R. SOKAL, 1973. Numerical Taxonomy: the principles and practice of numerical classificaction. Freeeman, San Francisco.
- STANIER, R., PFENNIG & TRÜPER, 1981. Introduction to the Phototrophic Prokaryotes. Chapter 7. In: Starr, M. et al. (Eds.). The Prokaryotes. A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria. vol. I. Springer-Verlag, New York, USA.