

## Uso de lectinas fluorescentes para la identificación de microalgas marinas

Use of fluorescent lectins for the identification of marine microalgae

Elena Hevia, Soledad Andújar, y Cristina Fenoy

Genética, Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense. 28040 Madrid, España

### ABSTRACT

Clones of microalgae from different genera and species of the classes Dinophyceae, Bacillariophyceae, Prymnesiophyceae, Chlorophyceae and Prasinophyceae, are studied to demonstrate that exist an easy and rapid way to their identification, by the use of fluorescent lectins. Those clones were treated with a battery of ten lectins and observed under fluorescent microscopy. Results show that lectins are an useful tool for the identification and separation of unicellular algae, because of their specificity to cell surface sugars. Results show that lectins are a useful tool for the identification of clones of the same species, and this would be very difficult to differentiate morphologically using light microscopy.

Key words: microalgae, fluorescent lectin, cell surface sugar, identification.

### RESUMEN

En este trabajo se estudian clones de microalgas pertenecientes a diferentes géneros y especies de las clases Dinophyceae, Bacillariophyceae, Prymnesiophyceae, Chlorophyceae y Prasinophyceae, con el objeto de demostrar que pueden ser fácil y rápidamente identificables mediante lectinas fluorescentes. Estos clones se trataron con una batería de diez lectinas y se observaron mediante un microscopio de fluorescencia. Los resultados muestran que las lectinas, por su gran especificidad de unión a azúcares de superficie de la membrana celular, son una herramienta muy útil, para la identificación de clones de una misma especie, que serían muy difíciles de diferenciar morfológicamente mediante microscopía óptica.

Palabras clave: microalgas, lectinas, azúcares de superficie, identificación.

### INTRODUCCION

La utilización de la morfología como principal herramienta para la identificación de especies de microalgas es, en muchos casos, insuficiente, razón por la cual parece oportuno el desarrollo de nuevas técnicas que complementen las tareas de reconocimiento, sobre todo en aquellos casos en los que la semejanza morfológica es tal que resultaría prácticamente imposible la diferenciación entre clones, especies e incluso géneros de microalgas. Por ejemplo, dentro del género

*Alexandrium* existe una gran controversia para diferenciar entre *A. minutum*, *A. lusitanicum* y *A. ibericum* (Balech 1985, 1989; Costas *et al.* 1995) o entre las especies del grupo "tamarensis" (Scholin & Anderson 1994, Scholin *et al.* 1994). En este trabajo se presenta la técnica de las lectinas, como una herramienta de laboratorio, útil para la identificación de microalgas.

Una lectina se define como una proteína o glicoproteína de origen no inmune que se conjuga específicamente a monosacáridos

u oligosacáridos simples. Las lectinas tienen al menos dos lugares de unión a carbohidratos presentes en la membrana celular, y son capaces de aglutinar células, precipitar glicoconjugados, o ambos (Goldstein *et al.* 1980, Slifkin & Doyle 1990) y su especificidad se expresa generalmente respecto a uno o varios monosacáridos u oligosacáridos simples.

El patrón de unión a lectinas es independiente de la temperatura, la intensidad de luz, la edad de los cultivos o la fase del ciclo celular en la que se encuentren las células (Costas & López-Rodas 1994).

Las lectinas, por sus propiedades, son reactivos muy útiles en la investigación de los receptores de superficie de bacterias, protozoos y organismos superiores. En este sentido, existen datos publicados de las interacciones de lectinas con protistas, como *Entamoeba histolytica* (Martínez-Palomo *et al.* 1973), trofozoitos de *Giardia lamblia* (Hill *et al.* 1981), *Trichomonas* (Capuccinelli *et al.* 1975, Warton & Honisberg 1980), así como en *Pneumocystis*, *Leishmania* y *Trypanosoma* (Dwyer 1974, 1976, Bretting & Schotellius 1978, Schotellius & Müller 1984; Ghosh *et al.* 1987; Cushion *et al.* 1988) donde han sido utilizadas con distintos fines siendo los principales la identificación y aglutinación celular.

En la actualidad, el uso de lectinas está siendo ampliamente utilizado en algas unicelulares, y se ha podido comprobar que son herramientas muy útiles en lo que se refiere a la identificación y caracterización de microalgas morfológicamente similares y difíciles de identificar al microscopio óptico a partir de muestras fijadas con lugol. Además, se ha podido comprobar que llegan a ser útiles también en lo que se refiere a la identificación y separación de clones de la misma especie. Son muchos los datos disponibles acerca del uso de lectinas en microalgas,

como son los casos de dinoflagelados de los géneros *Alexandrium*, *Gymnodinium*, *Gyrodinium* y *Prorocentrum* (Costas & López-Rodas 1994) y especies y clones de distintos Phyla como Cyanophyta, Pyrrophyta y Conjugatophyta (Costas *et al.* 1993).

En este trabajo se presenta la identificación de clones de microalgas de diferentes géneros y especies de las Clases Dinophyceae, Bacillariophyceae, Prymnesiophyceae, Chlorophyceae y Prasinophyceae, mediante la técnica de lectinas.

## MATERIAL Y METODOS

Se partió de clones axénicos (Tabla 1) mantenidos en medio f/2 (Sigma), en cajas "corning" de cultivo celular (30 ml), a 20°C y 50  $\mu\text{mol photons. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (tubos fluorescentes Phillips daylight) bajo ciclos 12:12 h (luz: oscuridad) (más detalles en Costas *et al.* 1993). Los clones se mantuvieron en crecimiento exponencial mediante transferencias seriadas cada 15 días, y se testaron periódicamente mediante epifluorescencia, para comprobar la ausencia de bacterias (Costas 1990).

Cada clon se trató con 10 lectinas fluorescentes (conjugadas con isotiocianato de fluoresceína o FITC) (Tabla 2). Las células se recogieron mediante centrifugación (140 x g, 10 min) y se trataron alícuotas de  $10^5 \pm 10^3$  células con cada lectina fluorescente ( $100 \mu\text{g. mL}^{-1}$  durante 1 h a 20 °C) tal y como se describe en Costas & López-Rodas (1994). Posteriormente se lavaron las células con medio f/2 (Sigma) para recoger las lectinas no conjugadas. El mismo proceso se siguió con una alícuota de cada clon estudiado a la que no se le añadió lectina, para comprobar que no existe en ningún caso una fluorescencia natural que interfiera la producida por el FITC.

Tabla 1. Clones utilizados en el experimento.

Clase	Especies	Clones	Origen	Características	
Dinophyceae	<i>Colia monotis</i>	Cm 1V	NO España	Tecado	No tóxico
		Cm 2V	NO España	Tecado	No tóxico
		Cm 3V	NO España	Tecado	No tóxico
		Cm 4V	NO España	Tecado	No tóxico
		Cm 5V	NO España	Tecado	No tóxico
	<i>Glenodinium foliaceum</i>	GLEN	N Portugal	No tecado	No tóxico
	<i>Amphidinium carterae</i>	AMPH	NO España	No tecado	No tóxico
	<i>Scripsiella sp</i>	S2V	NO España	Tecado	No tóxico
		S3V	NO España	Tecado	No tóxico
<i>Prorocentrum rostratum</i>	PR 1V	NO España	Tecado	No tóxico	
Bacillariophyceae	<i>Chaetoceros calcitrans</i>	CHAET	NO España	Central	No tóxico
	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	THp	NO España	Central	No tóxico
		THw	NO España	Central	No tóxico
	<i>Thalassiosira weissfloggi</i>	THw	NO España	Central	No tóxico
	<i>Navicula sp</i>	NAV	NO España	Pennada	No tóxico
Prymnesiophyceae	<i>Isochrysis galbana</i>	ISO	NO España		No tóxico
	<i>Pavlova lutheri</i>	PAU	Francia		No tóxico
	<i>Prymnesium parvum</i>	PRYM	O Portugal		No tóxico
Raphidophyceae	<i>Heterosigma akashiwo</i>	HET	S Portugal		Tóxico
		Ha IV	NO España		Tóxico
		Ha IV	NO España		Tóxico
		Chaton	S Portugal		Tóxico
Chlorophyceae	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	DUN <sub>t</sub>	NO España		No tóxico
	<i>Dunaliella minuta</i>	DUN <sub>m</sub>	NO España		No tóxico
	<i>Dunaliella salina</i>	DUN <sub>s</sub>	NO España		No tóxico
Prasinophyceae	<i>Tetraselmis sp</i>	TETR	NO España		No tóxico

Tabla 2. Datos referentes a las lectinas usadas. Abreviaturas y especificidades (Silfkin y Doyle 1990). Gal= Galactosa, Glc= Glucosa, GalNAc= N-Acetilgalactosamina, GalcNAc= N-Acetilglucosamina,

Man= Manosa, Fuc=Fucosa.

Lectina	Abreviatura	Especificidad
<i>Canavalia ensiformis</i>	Con A	Man, Glc
<i>Erythrina cristagali</i>	ECA	Gal, GalNAc
<i>Phaseolus limensis</i>	PHA	Complex
<i>Triticum vulgare</i>	WGA	GLcNAC
<i>Pisum sativum</i>	PEA	Man, Glc
<i>Arachis hypogea</i>	PNA	Gal, GalNH <sub>2</sub>
<i>Glycine maxima</i>	SBA	Gal, GalNAc, Gal
<i>Dolichos biflorus</i>	DBA	Gal, GalNAc, Gal
<i>Limulus polyphemus</i>	LPA	Acido siálico
<i>Ulex europea</i>	UEA-I	Fuc

Se midió el marcaje de las lectinas de forma cualitativa (positivo (+), si aparecía marcaje; negativo (-), si no aparecía) y cuantitativa (dentro de los positivos se distinguieron tres gradaciones: +++, si era un marcaje intenso; ++, si era menos intenso y +, cuando era de baja intensidad), según se describe en Costas & López-Rodas (1994) y más "in extenso" en Hevia (1995), mediante un microscopio de epifluorescencia Zeiss-Axiovert equipado con un filtro 450-490 nm de excitación y 520-560 nm emisión, que corresponde a la excitación y emisión del FITC por epifluorescencia. En todos los casos se cultivaron y midieron 4 replicados de cada clon.

## RESULTADOS

Los resultados obtenidos para cada clon son tantos como lectinas utilizadas. Así, en este trabajo, obtenemos diez resultados por cada especie o clon observado. A este conjunto de resultados se le llama "patrón característico" por definir a la especie o cepa en estudio. De

este modo, un determinado clon se diferencia de otro por comparación de sus patrones característicos, pudiendo existir diferencias cualitativas (cuando una lectina marca a uno pero no a otro) y cuantitativas (cuando lo que existe es una diferencia en la intensidad de marcaje). Si dos cepas tienen patrones diferentes, podemos afirmar que realmente son diferentes, pero si tienen patrones iguales pueden ocurrir dos cosas: que sean la misma cepa, o bien, que las lectinas utilizadas no sean las apropiadas para diferenciarlas.

En la Tabla 3 se muestra el patrón de marcaje con lectinas. Se puede comprobar que a nivel de clase los resultados no son muy relevantes, apareciendo un marcaje de casi todas las especies estudiadas con la lectina *Canavalia ensiformis* (Con A), excepto en los clones de las clases Chlorophyceae y Prasinophyceae, lo que demuestra que es frecuente la presencia de glucosa y manosa como azúcares de superficie en la membrana celular de las microalgas estudiadas.

Tabla 3. Patrón de marcaje con diferentes lectinas. Los (+) indican la presencia de marcaje fluorescente y la intensidad de éste, y los (-) la ausencia de marcaje.

Clones	ConA	PEA	ECA	DBA	SBA	PNA	WGA	LPA	UEA-I	PHA
Cm1V	++	-	-	-	-	+	++	-	-	-
Cm3V	+	-	-	-	-	++	-	-	-	-
Cm4V	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cm5V	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+
Cm2V	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLEN	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
AMPH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2V	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S3V	++	+	-	-	+	-	+	-	+	-
Pr1V	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CHAET	-	-	-	-	-	-	++	-	-	+++
THp	+++	++	-	-	-	-	+	-	-	-
THw	+++	+	-	+	-	+	++	-	+	+++
NAV	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
ISO	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PAU	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
PRYM	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HET	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ha1V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ha2V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Chaton	+++	++	-	-	-	-	-	-	-	-
DUNt	-	-	-	-	++	+++	-	-	-	-
DUNm	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DUNs	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TETR	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

Sin embargo, los resultados son bastante más precisos cuando se comparan los diferentes géneros y las especies de un mismo género, encontrándose reacciones más específicas. Por ejemplo, en la clase Bacylariophyceae, se pueden diferenciar las especies *Thalassiosira* del resto de los géneros mediante el uso de la lectina *Canavalia ensiformis* (Con A), que marca de forma muy intensa a éstas últimas y no a las especies del género *Chaetoceros* o *Navicula*.

Respecto a la comparación entre diferentes especies, las tinciones fluorescentes con lectinas mostraron resultados de un alto grado de especificidad, en las especies *T. pseudonana* y *T. weissfloggi*, que pueden ser claramente diferenciadas con *Phaseolus limensis* (PHA), que marca intensamente a *T. weissfloggi* y no marca a *T. pseudonana*.

Dentro de la clase Chlorophyceae, observamos que de las tres especies estudiadas del género *Dunaliella*, solo *D. tertiolecta* se marca de forma intensa con la lectina procedente *Arachis hypogea* (PNA) y con intensidad media con la procedente de *Glycine maxima* (SBA), mientras en ninguna otra aparece fluorescencia.

Las lectinas se han mostrado muy eficaces para diferenciar entre clones pertenecientes a una misma especie. Esto demuestra la existencia de distintos azúcares de superficie en la membrana celular en cada uno de los clones. Un ejemplo ilustrativo es el de *H. akashiwo* (clon Chaton), que es intensamente marcado por la lectina *Canavalia ensiformis* (Con A) y en menor medida por *Pisum sativum* (PEA), que no marcan a ninguno de los otros clones de la especie.

Otra muestra de la utilidad de las lectinas para discriminar entre clones es la ofrecida por los cinco clones de *Colia monotis* aquí estudiados, utilizando tan solo

seis lectinas: Con A, SBA, PNA, WGA, UEA-I y PHA. La lectina procedente de *Canavalia ensiformis*, Con A, diferenciaría claramente el clon Cm5V de los demás.

## DISCUSION

Las características de las lectinas de unirse de forma no covalente a azúcares simples y polisacáridos ha interesado a los taxónomos microbiológicos y las interacciones de las lectinas con microorganismos han sido ampliamente aplicadas en la clasificación de bacterias y protistos (Slifkin & Doyle 1990). También han demostrado ser de gran interés en la clasificación de microalgas, como ya se ha demostrado con los géneros *Chroococcus*, *Prorocentrum*, *Spyrogyra* y *Zygnema* (Costas et al. 1993) y en *Alexandrium*, *Prorocentrum* y *Gymnodinium* (Costas & López-Rodas 1994).

Por otro lado, las lectinas también presentan un interés práctico, precisamente por ese elevado grado de especificidad, ya que son capaces de distinguir especies de morfología similar y que resultan difíciles de diferenciar mediante las técnicas tradicionales de microscopía óptica a partir de muestras fijadas en lugol. Este es el caso de *Gymnodinium catenatum* y *Gyrodinium impudicum*, de morfología muy similar pero con características de toxicidad muy diferente, ya que mientras la primera es un potente productor de toxicidad PSP, la segunda es totalmente inocua (Costas & López-Rodas 1994, Hevia 1995).

La identificación morfológica al microscopio óptico de especies del plancton proporciona una información más amplia que la facilitada por la técnica molecular de lectinas, pero ésta puede ser un valioso complemento a la microscopía, sobre todo para diferenciar especies morfológicamente similares y para detectar de forma rápida (por su

corta duración y por poder realizarse directamente sobre muestras de agua y en barcos dotados con el equipo necesario) y fiable, la presencia de posibles especies tóxicas.

La gran problemática establecida en los últimos tiempos sobre la determinación de algas tóxicas tanto en aguas dulces como marinas, debido al gran auge de la acuicultura, las pesquerías y el turismo, hace que sea necesario el desarrollo de técnicas de laboratorio específicas y rápidas, que permitan la identificación de microalgas por personal que no se encuentre tan entrenado como el que se requiere para la identificación morfológica, y que incluso puedan ser utilizadas como pruebas de campo.

Respecto a los resultados aquí obtenidos, no solapan los patrones de lectinas de las especies estudiadas, salvo en los casos en que no aparece marcaje ante ninguna de las lectinas aquí seleccionadas. Si queremos diferenciarlas, tendremos que probar con otra batería de lectinas diferentes y comprobar si existen diferencias.

En la tabla 3 de resultados, observamos que utilizando tan solo seis lectinas: Con A, SBA, PNA, WGA, UEA-I y PHA, podríamos diferenciar los cinco clones de *Colia monotis* aquí estudiados. Las dos especies de *Thalassiosira* se diferencian claramente con una sola lectina, la procedente de *Phaseolus limensis* (PHA), que marca intensamente a *T. weissfloggi* pero no marca a *T. pseudonana*. Para diferenciar el clon Chaton del resto de clones estudiados de *Heterosigma akashivo* la lectina de elección sería Con A, que lo marca con máxima intensidad

frente a la ausencia de marcaje en los otros. La lectina procedente de *Arachis hypogaea* (PNA) diferencia la *Dunaliella tertiolecta* de la *D. minuta* y la *D. salina*, sin embargo no es posible diferenciar entre estas dos últimas con las lectinas empleadas y deberíamos probar con otras diferentes.

En los resultados se observa como las lectinas son útiles para identificar y diferenciar entre especies y clones. Entre especies, como es el caso de las especies *T. pseudonana* y *T. weissfloggi*, en las que mediante la lectina procedente de *Phaseolus limensis* (PHA), la primera se marca intensamente mientras la segunda carece de marcaje. Y entre clones, destacar los resultados de *Colia* y *H. akashivo*.

Hasta el momento todos los trabajos con lectinas en microalgas se han realizado sobre células vegetativas haploides (Costas *et al.* 1993, Costas & López-Rodas 1994, Hevia 1995). Sin embargo, sería interesante estudiar los cambios en la superficie celular cuando estas células forman gametos, cigotos o quistes.

La principal ventaja del uso de lectinas es, sin duda, su rapidez; además se trata de una técnica de sencilla manipulación no excesivamente cara.

Pensamos que las lectinas, junto con otras técnicas moleculares (hibridación celular, análisis del genoma, etc.), pueden complementar el estudio de algas unicelulares y también de muchos otros organismos, de forma más rápida y posiblemente más eficiente que con otras técnicas de identificación.

#### AGRADECIMIENTOS

A.M.A. Sampayo y a I. Bravo por habernos facilitado las especies y los clones para este trabajo. Trabajo financiado por la DGICYT proyecto PB 93-0433 y por la Fundación Ramón Areces.

## LITERATURA CITADA

- Balech, E. 1985. The genus *Alexandrium* or *Gonyaulax* of the tamarensis group. In: Anderson, D.M., White, A. W. & Baden, D. G. (eds.). Toxic dinoflagellates. Elsevier Science Publishing, New York, p. 33-38.
- Balech, E. 1989. Redescrpción of *Alexandrium minutum* Halim (Dinophyceae), type species of the genus *Alexandrium*. Phycologia 28:206-211.
- Bretting, H. & J. Schottelius. 1978. Immunofluoreszenzmikroskopische Unterscheidung zwischen *T. cruzi*, *T. cruzilike* Stammen, *T. conorhini* and *T. rangeli* mit dem Protekin des Schwammes. Aaptos Papillata. Z. Parasitenknd 57:213-219.
- Capuccinelli, P.; Cagliani, I. & G. Cavallo. 1975. Involvement of a surface concanavalin A-binding glycoprotein in the adhesion of *Trichomonas vaginalis* to substrates. Experientia 31: 1157-1159.
- Costas, E. 1990. Genetic variability in growth rates of marine dinoflagellates. Genética 83:99-102
- Costas, E.; González-Chavarri, A.; Aguilera, A.; González-Gil, S. & V. López-Rodas. 1993. Use of lectins to recognize and differentiate unicellular algae. Botánica Marina 36:1-4.
- Costas, E. & V. López-Rodas. 1994. Identification of marine dinoflagellates using fluorescent lectins. Journal of Phycology 30:987-990.
- Costas, E.; Zardoya, R.; Bautista, J.; Garrido, A.; Rojo, C. & V. López-Rodas. 1995. Morphospecies Vs. Genospecies in toxic marine dinoflagellates: an analysis of *G. catenatum*/*G. impudicum* and *A. minutum*/*A. lusitanicum* using antibodies, lectins and gene sequences. Journal of Phycology 31:801-807.
- Cushion, M. T.; DeStefano, J.A. & P.D. Walzer. 1988. *Pneumocystis carinii* surface reactive carbohydrates detected by lectin probes. Experimental Parasitology 67:137-147.
- Dwyer, D. M. 1974. Lectin binding saccharides of a parasitic protozoan. Science 184: 471-473.
- Dwyer, D. M. 1976. Cell surface saccharides of *Trypanosoma lewisi* II. Lectin mediated agglutination of fine-structure cytochemical detection of lectin binding sites. Journal of Cellular Science 22: 1-19.
- Ghosh, D. K.; A. K. & A. Battacharya. 1987. Differentiation of *Leishmania* strains of Indian origin by lectin mediated agglutination. Tropical Medical Parasitology 38:331-332.
- Goldstein, I.J.; Hughes, R. C.; Monsigny, M.; Osawand, T. & N. Sharon. 1980. What should be called a lectin? Nature (London) 285:66.
- Hevia, E. 1995. Caracterización de microalgas mediante lectinas fluorescentes: un test rápido para detectar fitotoxicidad en acuicultura. Tesina de licenciatura. Facultad de Veterinaria de Córdoba. 80 p.
- Martínez-Palomo, A.; González-Robles, A. & M. de la Torre. 173. Selective agglutination of pathogenic strains of *Entamoeba histolytica* induced by concanavalin A. Nature (London). New Biology 245:186-187.
- Scholin C. A.; Herzog, M.; Sogin, M. & D. M. Anderson. 1994. Identification of group and strain-specific genetic markers for globally distributed *Alexandrium* (Dinophyceae) II. Sequence analysis of a fragment of the LSU rRNA genes. Journal of Phycology 30:999-1011.
- Scholin C. A. & D. M. Anderson. 1994. Identification of group and strain specific genetic markers for globally distributed *Alexandrium* (Dinophyceae) I. RFLP analysis of SSS rRNA genes. Journal of Phycology 30:744-754.
- Schottelius, J. & V. Müller. 1984. Interspecific differentiation of *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma conorhi* and *Trypanosoma rangeli* by lectin in combination with complement lysis. Acta Tropical 41: 29-38.



- Slifkin, M. & R. J. Doyle. 1990. Lectins and their application to clinic microbiology. *Clinic Microbiology Reviews* 3: 197-218.
- Warton, A. & B. M. Honisberg. 1980. Lectin analysis of surface saccharides in two *Trichomonas vaginalis* strains differing in pathogenicity. *Journal of Protozoology* 27:410-419.

*Manuscrito recibido en diciembre de 1995 y aceptado en septiembre de 1996.*