

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

“ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE LOS ÉSTERES METÁLICOS
DE LOS ÁCIDOS GRASOS DE *Anabaena* spp. EN UN
CULTIVO DE LABORATORIO.”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A :
NANCY GARCÍA ROA

DIRECTOR DE TESIS: DR. PEDRO RAMÍREZ GARCÍA



IZTACALA

LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MÉXICO

2005



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

MI AGRADECIMIENTO:

Al **Dr. Pedro Ramírez García**, por el apoyo y la confianza puesta en la realización de este proyecto. Gracias por permitirme integrarme a su equipo de trabajo.

Al **M. en C. Sergio Rosales Ledesma**, por compartir sus conocimientos en el área de Cromatografía de Gases, gracias por sus consejos y su tiempo en el trabajo de laboratorio.

A la **M. en C. Gloria Garduño Solórzano**, por su conocimiento, información proporcionada y sus oportunas aportaciones al trabajo, gracias por su tiempo.

Al **M. en C. Ángel Duran Díaz**, por su ayuda en el análisis de resultados así como las correcciones y consejos para el mejoramiento del trabajo.

A la **Bióloga Blanca N. Martínez Rodríguez**, por toda su ayuda desinteresada no solo en la revisión del trabajo, también por el tiempo que permanecí en el laboratorio, gracias por su paciencia.

Al proyecto **DGAPA-PAPIIT IN234602** por su apoyo económico.

ESPECIALMENTE A:

Mis Padres:

Celia Roa y **J. Félix García**, gracias por darme parte de su vida y ser un gran ejemplo, por estar siempre a mi lado, por su amor, apoyo, comprensión y confianza en mis decisiones, sin ustedes este logro no hubiera sido posible, los quiero mucho.

Mis Hermanos:

Elvia del Rocío, **Miguel Ángel** y **Catalina**, por enseñarme a construir con armonía mis metas, brindándome en todo momento su apoyo para hacerlas realidad y por ser mis amigos, gracias.

Mis Sobrinos:

Ximena del Rocío, **Sergio Alan** y **Oscar Alberto**, recuerden que son parte importante en este hogar, gracias por toda su alegría. Cuenten conmigo por siempre.

Son una familia maravillosa.

Gracias **Alejandro**, por todo tu apoyo tanto en el plano personal, como en el profesional, por tu ayuda y consejos en la realización de este trabajo. Gracias por tu compañía y el cariño brindado en todo momento, sabes que eres una parte muy importante y especial en mi vida, cuenta siempre conmigo, yo se que de igual manera cuento contigo. Te quiero mucho.

Diana, Alejandra, Yareli, María Elena, Beatriz, Antonio, Jesús Martínez, Ricardo Flores, Ricardo Vázquez, Gregorio, Bruno, Lepoldo, Jesús Acuña, Samuel, Mario, Alejandro Pigeon, Miguel, Oscar, gracias por ser parte de mi segundo hogar y haberme enseñado el valor de la amistad, los llevaré por siempre en mi corazón.

A **Margarita, Paloma, Rocío** por haber hecho más agradable el trabajo en el laboratorio.

A todos aquellos con los que tuve la oportunidad de convivir en todas las etapas de mi vida.

A la **Facultad de Estudios Superiores Iztacala-UNAM**, y a todos los profesores que durante mi instrucción académica me brindaron sus conocimientos logrando aún más mi respeto y admiración hacia la Biología.

*« Le rôle des infiniment petits m'apparaissait infiniment
grand »*

« El papel de lo infinitamente pequeño me parece infinitamente grande »

Louis Pasteur

ÍNDICE

Págs.

RESUMEN -----	1
I. INTRODUCCIÓN -----	1
II. ANTECEDENTES -----	5
III. MARCO TEÓRICO-----	9
III a. CROMATOGRAFÍA DE GASES-----	9
III b. ÁCIDOS GRASOS -----	11
III c. TAXONOMÍA DE <i>Anabaena</i> .-----	13
IV. OBJETIVOS-----	16
GENERAL-----	16
PARTICULARES -----	16
V. MATERIAL Y MÉTODOS -----	17
VI. RESULTADOS -----	22
VII. DISCUSIÓN-----	27
VIII. CONCLUSIONES -----	31
IX. RECOMENDACIONES -----	33
X. ANEXO-----	34
XI. REFERENCIAS -----	37

ÍNDICE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Ácidos grasos comunes en la naturaleza.....	111
Figura 1. <i>Anabaena</i> sp en cultivo unialgal • medio BG11 • A) Agregado de tricomas 20X, B-E) Tricomas solitarios presentando el pigmento característico del grupo, F) Tricoma con presencia de heterocito 40X.....	14
Figura 2. Estándar externo de ácidos grasos metil esterificados CP mix 10 mg/ml Supelco. Lote LB04445 y estándar interno C28 Chem service 0-227 n-Octacosane pureza 99% Lote 154-63 ^a	200
Figura 3. Estándar externo de ácidos grasos metil esterificados adicionando el ácido graso cis-6,9,12-octadecatrienoato y estándar interno C28 Chem service 0-227 n-Octacosane pureza 99%.....	211
Tabla 2. Ésteres metílicos del cultivo unialgal de <i>Anabaena</i>	22
Figura 4. Cromatograma de la muestra de <i>Anabaena</i> sp. que muestra los ácidos grasos identificados así como el estándar interno C28.....	233
Tabla 3. Medidas descriptivas de las áreas.....	24
Figura 5. Perfil cromatográfico de ácidos grasos de <i>Anabaena</i> sp.....	244
Tabla 4. Lista de ácidos grasos presentes en el cultivo, comparado con el estándar modificado.....	25

Págs.

Figura 6. Cromatograma de la muestra de *Anabaena* sp. identificando el ácido Linolénico (pico 20 cis-6,9,12-octadecatrienoato).....266

RESUMEN

En los últimos años se le ha dado un mayor énfasis al estudio de los cuerpos de agua, para lo cual se han realizado diversos estudios que integran los factores y comunidades, tanto animales como vegetales que interactúan en él, ya que representan el recurso de mayor importancia para el hombre debido a que son aprovechados como abastecimiento de agua, lugar de cultivo de algunas especies de peces, sin dejar a un lado el uso recreacional y turístico. Existen algunos géneros del fitoplancton que son utilizados como bioindicadores para la calidad del agua, entre ellos encontramos al grupo de las cianobacterias siendo el principal componente de florecimientos en cuerpos de agua eutrofizados. En los lagos y embalses en México se han presentado serios problemas en lo referente a su calidad de agua además de consecutivos florecimientos algales, como en el caso del lago de Zumpango, donde se encuentran diversos géneros de cianobacterias reportadas como tóxicas como es el caso de *Anabaena*. Su estudio en el laboratorio requiere de ciertas técnicas de cultivo, sin embargo en estos cultivos se pueden perder algunas características morfológicas importantes para su identificación taxonómica haciendo más difícil su determinación. Es por ello que se han complementado técnicas para facilitar su identificación como la determinación de ácidos grasos celulares (AGC) por Cromatografía de Gases. Debido a esto en el siguiente estudio se obtuvo un cultivo unialgal del género *Anabaena*, aislada del Lago de Zumpango y cultivada en Medio BG11, determinando su perfil de AGC por la técnica de Cromatografía de Gases, obteniendo como principales ácidos **Palmitoléico (16:1⁹)**, **Palmítico (16:0)**, **Linoléico (18:2^{9,12})** y **Elaidico (18:1⁹)** con 836, 729, 602, 451 ng/mg respectivamente. Además se identificaron dos ácidos importantes; el ácido **Mirístico (14:0)** que se encuentra relacionado con cepas hepatotóxicas y el ácido • **-Linoléico (cis-6, 9, 12-octadecatrienoato)**, el cual sirve como biomarcador para diferenciar entre bacterias y cianobacterias.

I. INTRODUCCIÓN

El fitoplancton de muchos lagos, especialmente aquellos con altos niveles tróficos está constituido por grandes colonias, que bajo determinadas condiciones ambientales formarán florecimientos de cianobacterias. Debido a su éxito en los sistemas de aguas continentales, las cianobacterias son el grupo de organismos fitoplanctónicos mejor estudiados en su ecología (Martín, 2000).

Las cianobacterias, son organismos procarióticos con un registro fósil que data de 3,500 millones de años y están considerados como una liga entre procariotes y eucariotes fotosintéticos (Caudales-Wells, 1992). No tienen flagelos, sin embargo presentan una velocidad y dirección de su movimiento dependiendo de la iluminación y de la temperatura en la que se encuentren. En determinadas condiciones pueden encontrarse en la célula aerotopos que ayudan a la flotación de algunas especies (Scagel *et al.*, 1980). En los ordenes Nostocales y Stigonematales, se observa a lo largo del tricoma, ya sea intercalares o terminales, células especializadas llamadas heterocitos, los cuales cuentan con una enzima fijadora de nitrógeno, la nitrogenasa, sensible al oxígeno y su número está regulado por la concentración de molibdeno y nitrógeno en el medio (Fogg *et al.*, 1978; Robin, 1987).

Presenta un color particular que es el verde azul aunque varía en coloraciones negras o pardas, debido a la presencia de varios pigmentos. Su estructura celular tiene características tanto de bacterias como de plantas, como lo es la ausencia de límites en plastidios y núcleo además de la estructura de la pared celular en el caso de las bacterias y la presencia de clorofila a, tilacoides y la función como productores primarios para el caso de plantas (Edward, 1989; Anagnostidis, 1985). Se encuentran en diferentes sustratos, en forma de manchas incrustadas, de almohadillas macroscópicas o en capas viscosas sobre las superficies mojadas de las rocas, del suelo, arena, árboles y en simbiosis con líquenes, hongos,

diatomeas, helechos, raíces y protozoarios. Una parte importante de ellas viven flotando libremente como formas planctónicas en los diferentes medios acuáticos (Scagel *et al.*, 1980).

La pared celular de las cianobacterias se forma de cuatro capas y una de sus características más importantes, es que a pesar de su estructura Gram-negativa, la capa de peptidoglucanos (mureína), es considerablemente más gruesa que las mismas bacterias Gram-negativas, además de tener otros componentes como carotenoides o el ácido graso β -hidroxipalmítico (Hoiczuk–Hansel, 2000).

Cuando los lagos se tornan eutróficos, la diversidad del fitoplancton disminuye, lo que lleva al cuerpo de agua a estar prácticamente dominado por cianobacterias. Entre las causas descritas para su dominio se encuentran temperaturas elevadas, entre 18 y 20° C, requisitos de luz-energía, siendo óptimas en las estaciones de primavera a otoño, la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, pH alto (6.5 a 8.5), tasa baja de filtración por el zooplancton y la formación de vesículas de gas (Martín, 2000). Dichos microorganismos se reconocen como el componente de los florecimientos algales dañinos (Blooms en lengua inglesa) en cuerpos de agua, los cuales tienen efectos perjudiciales en los usos domésticos, industriales y recreacionales a los que se destina el agua, así como también el afectar y en ocasiones producir la muerte a diversos organismos por la producción de metabolitos tóxicos (Hori *et al.*, 2002).

La diferenciación entre las especies tóxicas y no tóxicas no está del todo claro, por lo que es ilícito hablar de toxicidad a nivel de género. La toxicidad depende de las cepas y no de las especies, pudiendo coexistir en un mismo sitio cepas de la misma especie, tóxicas y no tóxicas (Pizzolon, 1996). Las toxinas pueden ser dañinas y depende principalmente de su concentración y su capacidad para originar efectos agudos y crónicos en el hombre, en vegetales y animales domésticos y silvestres. Los géneros considerados más tóxicos son *Anabaena*, *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Nostoc* y *Aphanizomenon* (Nhoato, 2001).

Los géneros *Anabaena* y *Oscillatoria*, producen una toxina llamada Anatoxina-a (antx-a), la cual es un despolarizante neuromuscular y agente bloqueador de la despolarización post-sináptica, el producto tóxico es de tipo órgano-fosforado natural con una estructura química similar a la que tienen los insecticidas sintéticos como el paratión-malatión (Carmichael, 1994).

La taxonomía de las cianobacterias se basa en características morfológicas, fisiológicas y ecológicas. Para el género *Anabaena* existen algunas dificultades en lo que se refiere a su identificación ya que la mayoría de las ocasiones se basa principalmente en características morfológicas como lo son la forma del tricoma y del acineto, tamaño de células y posición relativa de los heterocitos, sin embargo estas características pueden variar en su forma e incluso estar ausentes debido a las condiciones de cultivo. Aparentemente las especies planctónicas de *Anabaena* requieren más estudios taxonómicos a los que se les incorporan no solamente características morfológicas sino también factores fisiológicos, químicos y genéticos.

En el lago de Zumpango así como en otros cuerpos de agua que forman importantes sistemas de abastecimiento se presentan constantes florecimientos de cianobacterias y algunos de los géneros pueden ser utilizados como suplemento alimenticio, biofertilizantes o degradadores de petróleo. Sus metabolitos secundarios son estudiados como bactericidas (Østensvik *et al.*, 1998, Mundt *et al.*, 2003), sin embargo dichos metabolitos también se consideran tóxicos representando un problema latente para la salud así como para la calidad del agua, debido a esto se han desarrollado técnicas de aislamiento y cultivo para el estudio integral de las cianobacterias como es el caso del laboratorio de Bacteriología del proyecto Conservación y Mejoramiento del Ambiente (CyMA), dichas técnicas no solo han sido utilizadas en el campo ecológico si no también en lo referente a su composición química como herramienta para determinación taxonómica a partir de sus ácidos grasos celulares (AGC). Una herramienta importante para el análisis de los ácidos grasos es la Cromatografía de Gases de

alta resolución ya que es una técnica rápida para la determinación tanto cualitativa como cuantitativa de dichos componentes y la cual se utiliza en la taxonomía de diferentes grupos como bacterias (Holt, 1984) y levaduras (Paredes *et al.*, 2001); aunque en otros países dichas técnicas ya han sido desarrolladas y aplicadas para el grupo de las cianobacterias, en México existen pocos trabajos de este tipo. En nuestro país, estos organismos ya han provocado problemas en algunos cuerpos de agua, como se ha observado en el lago de Zumpango, Estado de México y por lo cual se le ha dado un enfoque mayor a su estudio. El género *Anabaena* ha sido uno de los principales componentes de cianobacterias en los lagos eutrofizados y algunas de las especies presentes en México son consideradas como tóxicas. Es por ello que este trabajo tiene como principal propósito el estudio del perfil cromatográfico de *Anabaena* sp. información que servirá para investigaciones posteriores en el campo de su toxicidad.

II. ANTECEDENTES

Para el mejor estudio de estos organismos se han desarrollado métodos de aislamiento y purificación, como se describe en el trabajo realizado por Carmichael (1986), en el cual realizó cultivos de cepas tóxicas entre las que se encuentran *Anabaena flos-aquae*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Microcystis aeruginosa* y *Oscillatoria agardhii*. Así mismo, Krishnamurthy y colaboradores en el mismo año, además del aislamiento de *Anabaena flos-aquae*, realizaron una caracterización y purificación de sus péptidos tóxicos.

Beasley *et al.* (1989), estudiaron los aspectos tóxicos más importantes de cianobacterias, identificando las principales toxinas y su efecto, entre las que destacan *Microcystis aeruginosa*, *M. viridis*, *Anabaena flos-aquae*, *Oscillatoria agardhii*, dichos géneros producen hepatotoxinas estas toxinas provocan hemorragias intrahepáticas, hipoglucemia resultando en una insuficiencia hepática principalmente en animales de casa y ganado, sin embargo existe un caso de hepatoenteritis en humanos registrado en la isla Palm en la costa noroeste de Australia causado por *Anabaena raciborski*.

Roset *et al.* (2001), realizaron una revisión para la detección de cianobacterias y sus toxinas, haciendo referencia a diversas publicaciones acerca de las primeras intoxicaciones de poblaciones humanas por el consumo de agua contaminada por cepas tóxicas descritas en Australia, Inglaterra, China, África y Brasil.

May (2002), dio a conocer un estudio, acerca de los florecimientos consecutivos de cianobacterias en Australia, encontrando como especie más abundante *Anabaena circinalis* estudiando los factores que afectan la toxicidad de este género.

Ramírez *et al.* (2002), estudiaron las variaciones de zooplancton en el embalse de Valle de Bravo, México y asociado a este estudio encontrando diversos géneros de cianobacterias consideradas como tóxicas: *Anabaena*, *Microcystis*, *Nostoc* y *Oscillatoria*.

Garduño *et al.* (2005), realizaron un trabajo bibliográfico acerca de algas epicontinentales de estudios realizados en embalses y lagos de 56 localidades del Estado de México, observando la presencia de 6 especies del género *Anabaena*, de las cuales *A. affinis*, *A. flosaquae* y *A. variabilis*, son reportadas como tóxicas.

Además de las investigaciones anteriormente mencionados se han expuesto en congresos diversos trabajos, en los que destacan la identificación de cianotoxinas Ramírez *et al.* (2001), Martínez *et al.* (2002) y Millán *et al.* (2002), estudiaron la presencia de cianobacterias y determinación de toxinas en fuentes de abastecimiento de agua además de las relaciones existentes entre fitoplancton y cianobacterias con la salud humana según Ramírez *et al.* (2004).

El conocimiento integral de estos organismos ha llevado a realizar diversos estudios en lo referente a su composición química. Según Zajic (1970), las primeras publicaciones sobre la composición de ácidos grasos de la pared celular de cianobacterias fueron realizadas por Mazur y Clarke en 1942 con el género *Gloeotrichia* sin embargo aún no estaba estandarizada la técnica de cromatografía de gases, separando solo los ácidos en saturados e insaturados; fue hasta 1964 con Levin y colaboradores, que se realizó la identificación de ácidos grasos por la técnica de Cromatografía de Gases (CG), en la cual fue examinada *Anabaena variabilis*.

Cohen *et al.* (1987, 1991) estudiaron la composición de ácidos grasos de la cianobacteria *Spirulina*, (actualmente muy utilizada como suplemento alimenticio en humanos) así como su variación en diferentes condiciones de cultivo. Al igual que este autor, Piorreck (1984), además toma en cuenta la producción de ácidos

grasos, proteínas totales y biomasa; así como clorofila entre las algas verdes y las cianobacterias en diferentes concentraciones de Nitrógeno y fases de crecimiento.

Caudales y Wells (1992), con base en la determinación de los ácidos grasos celulares de cianobacterias bentónicas en los géneros *Anabaena* y *Nostoc*, encontraron diferencias significativas entre estos dos géneros.

De acuerdo a la clasificación de cianobacterias a partir de sus ácidos grasos realizada por Kenyon (1972) y Kenyon *et al.* (1972), quién las dividió en cuatro grupos, divisiones confirmadas por Murata *et al.* (1992), Cohen en 1995, propone un quinto grupo posible, en el que agrupa a los ácidos grasos polinsaturados C₁₈ con no más de 2 dobles enlaces.

Vargas *et al.* (1998), determinaron el contenido de ácidos grasos de filamentos de cianobacterias fijadoras de nitrógeno, como lo es *Nostoc*, y *Anabaenopsis*, encontrando cambios en la composición durante las fases estacionaria y exponencial de crecimiento, presentándose altos niveles de ácidos grasos polinsaturados (PUFAs), así como de saturados (SAFAs) con valores de 45% y 31-52% respectivamente siendo bajos los ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs).

Li Renhui y Watanabe (2001), determinaron 7 especies de *Anabaena* mediante el análisis del contenido y perfil de ácidos grasos y lo compararon con las propiedades morfológicas de cada especie.

Gugger *et al.* (2002), analizaron el contenido de ácidos grasos celulares de 7 géneros de cianobacterias como *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Calothrix*, *Cylindrospermum*, *Nostoc*, *Microcystis* y *Planktothrix*, de acuerdo a los análisis realizados se determinaron tres grupos químicos con base en el contenido de sus ácidos grasos y las características morfológicas de estos organismos.

Hasta la fecha se han realizado diversas investigaciones en este grupo de organismos referente a su composición química, en diversos países, sin embargo, en México, a pesar de que el grupo de las cianobacterias es muy estudiado en conjunto con otros organismos como indicadores de la calidad del agua en lagos eutrofizados, no existen trabajos que se relacionen con el estudio de su composición química como herramienta taxonómica. Sin embargo existe una investigación realizada por González (1976), donde se determinó la composición de ácidos grasos por Cromatografía de Gases en *Nostoc*, aislada de las raíces de la cicadácea coraloide del género *Macrozamia*, este trabajo fue una colaboración con el Instituto de Ciencias Marinas de Port Arkansas, Texas, en donde se realizó el análisis cromatográfico.

III. MARCO TEÓRICO

III a. CROMATOGRAFÍA DE GASES

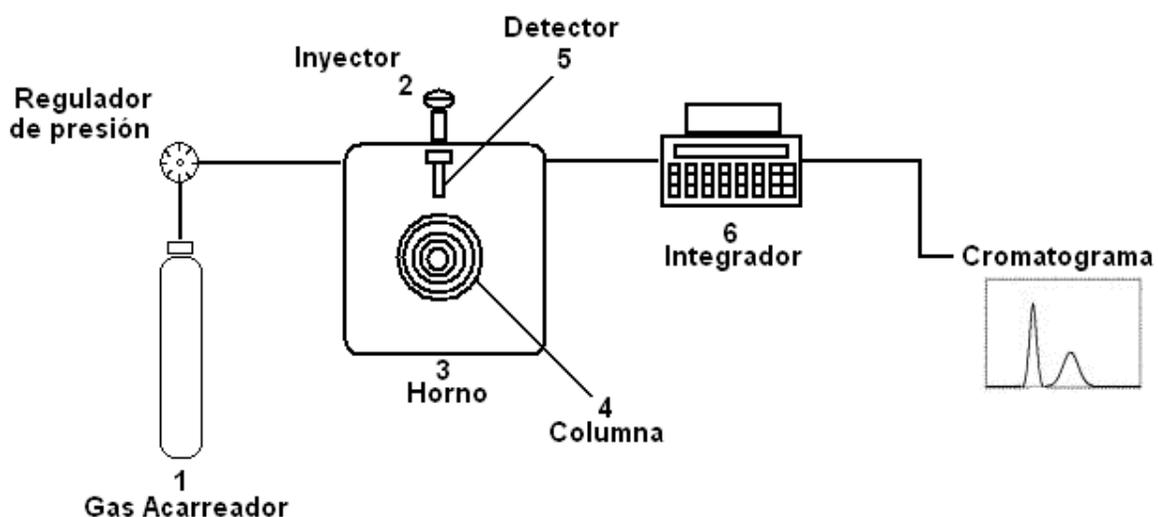
La cromatografía es única en la historia de los métodos analíticos y probablemente la más versátil y funcional técnica del análisis moderno, ya que separa una mezcla en sus componentes individuales además determina cuantitativamente la cantidad de cada componente (Scout, 1995). Su fundamento consiste en la separación de diferentes tipos de moléculas cuando descienden por una columna o atraviesan una delgada capa de material inerte, en ambos casos existe una sustancia que proporciona una elevada interacción superficial con el compuesto a analizar. Si las moléculas son absorbidas por la superficie se le denomina *cromatografía de adsorción* y si se disuelve en una delgada superficie líquida es *cromatografía de reparto* (Robinson, 1974).

Los primeros trabajos de cromatografía se realizaron en 1850 cuando F. Runge separó una mezcla de anilinas utilizando un filtro de papel y solvente para la separación de diversos colorantes. Tswet en 1906, utilizó columnas de gas empacadas para separar pigmentos vegetales, llamando a este proceso cromatografía de tintas (González, 1987).

Una de las ramas importante en la cromatografía es la cromatografía gas-líquido, la separación se basa en el reparto de los componentes entre dos fases, la *fase móvil* es un fluido que se usa como portador de la mezcla y posteriormente la separación. La *fase estacionaria* puede ser un sólido o un líquido dispuesto sobre un sólido que actúe como soporte, *la fase móvil* es la mezcla a resolver y un gas no retenible, llamado *Gas transportador*, que sirve para empujar dicha mezcla y los componentes después de su separación (De Gracia, 1975), está basada en el trabajo de investigación de James y Martín, en 1952 demostrando por primera vez el gran interés potencial de la cromatografía para la separación e identificación de

aminoácidos (Robinson, 1974), además de describir el primer cromatógrafo, la publicación del primer cromatograma fue hecha por Ray en 1954 (González, 1987).

El cromatógrafo de Gases consiste principalmente en: 1. Gas acarreador (con reguladores de presión y medidores de flujo), 2. Sistema de inyección, 3. Horno, 4. Columna de separación, 5. Detector, 6. Integrador (Willard *et al.*, 1991).



En la cromatografía de gases, la forma de trabajo más frecuente es la separación por elución y se desarrolla de la siguiente forma: el gas portador circula a lo largo de la columna de manera continua, es introducido en la corriente del gas portador una muestra de la mezcla a resolver en estado de vapor. El gas portador se comporta como un embolo y arrastra a los componentes a lo largo de la columna donde sucesivamente, se realizan los procesos de retención y liberación de los componentes de la mezcla a distintas velocidades estos datos son graficados en forma de picos gaussianos en un cromatograma donde se puede apreciar el tiempo de retención de la muestra (RT) y el área de cada pico la cual nos indica la cantidad de cada componente, observando así que ésta técnica es una herramienta analítica no solo cualitativa sino cuantitativa (De Gracia, 1975).

III b. ÁCIDOS GRASOS

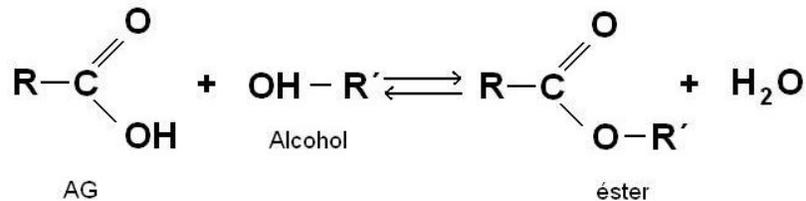
Los lípidos son un grupo heterogéneo de sustancias cuya característica común es ser insolubles o poco solubles en agua y solubles en disolventes orgánicos, los ácidos orgánicos monocarboxílicos, comúnmente llamados ácidos grasos forman parte de este grupo (Blanco, 1996).

Los ácidos grasos (AG) son parte importante de los organismos vivos, se encuentran en grandes cantidades como componentes de los lípidos saponificables, en células y tejidos, sin embargo en estado libre es decir, no esterificados, se encuentran en trazas. Poseen una cadena hidrocarbonada con un grupo carboxilo terminal. Se encuentran AG saturados e insaturados, con enlace sencillo y doble respectivamente, También enlaces triples aunque no son abundantes (Lehninger, 1991) (Tabla 1).

Tabla 1. Ácidos grasos comunes en la naturaleza, Voet (1995).

Símbolo	Nombre común	Nombre sistemático	Estructura	*P.F. (°C)
<i>Ácidos grasos saturados</i>				
12:0	Láurico	Dodecanoico	$\text{CH}_3 \bullet (\text{CH}_2)_{10} \bullet \text{COOH}$	44.2
14:0	Mirístico	Tetradecanoico	$\text{CH}_3 \bullet (\text{CH}_2)_{12} \bullet \text{COOH}$	52
16:0	Palmitico	Hexadecanoico	$\text{CH}_3 \bullet (\text{CH}_2)_{14} \bullet \text{COOH}$	63.1
18:0	Esteárico	Octadecanoico	$\text{CH}_3 \bullet (\text{CH}_2)_{16} \bullet \text{COOH}$	69.6
20:0	Araquídico	Eicosanoico	$\text{CH}_3 \bullet (\text{CH}_2)_{18} \bullet \text{COOH}$	75.4
22:0	Behenico	Docosanoico	$\text{CH}_3 \bullet (\text{CH}_2)_{20} \bullet \text{COOH}$	81
24:0	Lignocérico	Tetracosanoico	$\text{CH}_3 \bullet (\text{CH}_2)_{22} \bullet \text{COOH}$	84.2
*P.F. — Punto de fusión				
<i>Ácidos grasos insaturados (Los dobles enlaces son cis)</i>				
16:1	Palmitoléico	9-Hexadecenoico	$\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_5 \text{CH}=\text{CH} (\text{CH}_2)_7 \text{COOH}$	-0.5
18:1	Oleico	9-Octadecenoico	$\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_7 \text{CH}=\text{CH} (\text{CH}_2)_7 \text{COOH}$	13.4
18:2	Linoléico	9,12-Octadecadienoico	$\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_4 (\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2 (\text{CH}_2)_6 \text{COOH}$	-9
18:3	•-Linoléico	9,12,15-Octadecatrienoico	$\text{CH}_3 \text{CH}_2 (\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3 (\text{CH}_2)_6 \text{COOH}$	-17
18:3	• -Linoléico	6,9,12-Octadecatrienoico	$\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_4 (\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3 (\text{CH}_2)_3 \text{COOH}$	
20:4	Araquidónico	5,8,11,14-Eicosatetraenoico	$\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_4 (\text{CH}=\text{CHCH}_2)_4 (\text{CH}_2)_2 \text{COOH}$	-49.5
20:5	EPA	5,8,11,14,17-Eicosapentenoico	$\text{CH}_3 \text{CH}_2 (\text{CH}=\text{CHCH}_2)_5 (\text{CH}_2)_2 \text{COOH}$	-54
24:1	Nervónico	15-Tetracosenoico	$\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_7 \text{CH}=\text{CH} (\text{CH}_2)_{13} \text{COOH}$	39

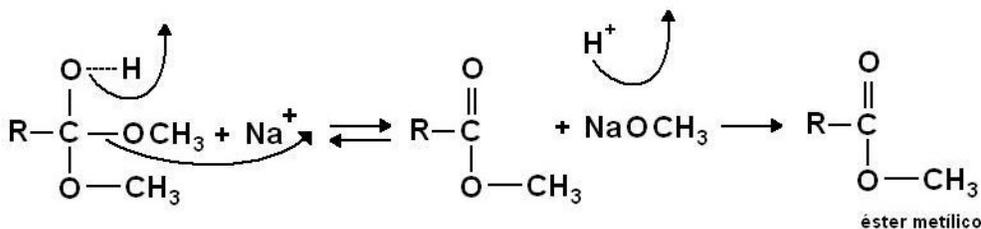
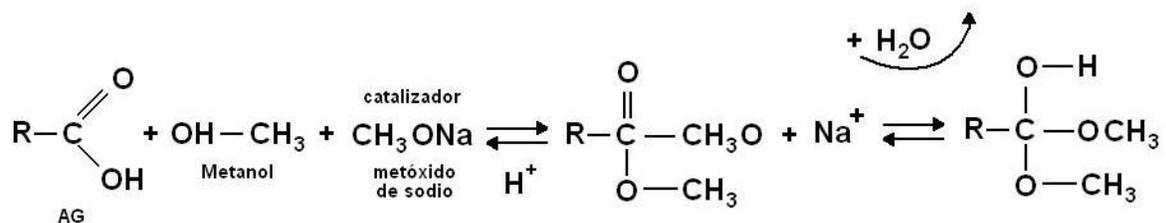
Debido a que los AG se encuentran en pequeñas cantidades en estado libre (no esterificado), es necesario realizar una esterificación para conocer que tipos se encuentran en un microorganismo. La esterificación consiste en hacer reaccionar un ácido carboxílico con un alcohol para formar un éster, eliminando agua en la reacción. (Alcántara, 1979).



La esterificación se presenta de la siguiente forma:

- 1) Protonación del oxígeno del grupo carboxilo del ácido orgánico.
- 2) Ataque nucleofílico por parte del alcohol sobre el ácido protonado.
- 3) Pérdida de un protón.
- 4) Protonación del intermediario.
- 5) Pérdida de una molécula del agua.
- 6) Pérdida de un protón para dar el éster y regenerar el catalizador.

(Beyer, 1987)



III c. TAXONOMÍA DE *Anabaena*.

Las cianobacterias son procariontes fototrópicos que tradicionalmente son estudiados como algas. Su sistemática tradicional se basa principalmente en caracteres morfológicos, citológicos y ecofisiológicos. Algunos autores utilizan diferentes términos para denominar a las cianobacterias, dependiendo el tipo de nomenclatura utilizada (Anagnostidis, 1985).

En la clasificación sistemática de algas son consideradas como cyanoprocariontes. El género *Anabaena* se encuentra en el orden Nostocales y en la Familia Nostocaceae y se describe de la siguiente manera:

- Tricomatos típicos con una fila de células.
- Tricomatos solitarios o colonias mucilaginosas.
- Presencia de heterocitos y/o acinetos, intercalares o terminales.
- Ausencia de ramificaciones (falsas o verdaderas).
- Ausencia de zonas meristemáticas limitadas.
- Reproducción por hormogonia móvil u hormocitos en el cuál los tricomatos se desintegran (Komárek, 1989)

El género *Anabaena* tiene tricomatos más o menos rectos reunidos en talos de color verde azulado, rodeados por una envoltura gelatinosa apenas visible. Células casi esféricas. Los tricomatos presentan heterocitos y acinetos. Los heterocitos son células de contenido casi incoloro, con pared muy engrosada, cuya función es fijar Nitrógeno atmosférico. Los acinetos son, sin embargo, células vegetativas, más grandes que las anteriores, con paredes engrosadas ricas en sustancias de reserva, que, después de un periodo de latencia, germinan dando lugar a un nuevo tricomato. Soporta condiciones climáticas extremas (temperaturas de 73°C) (Streble, 1987) (Figura 1).

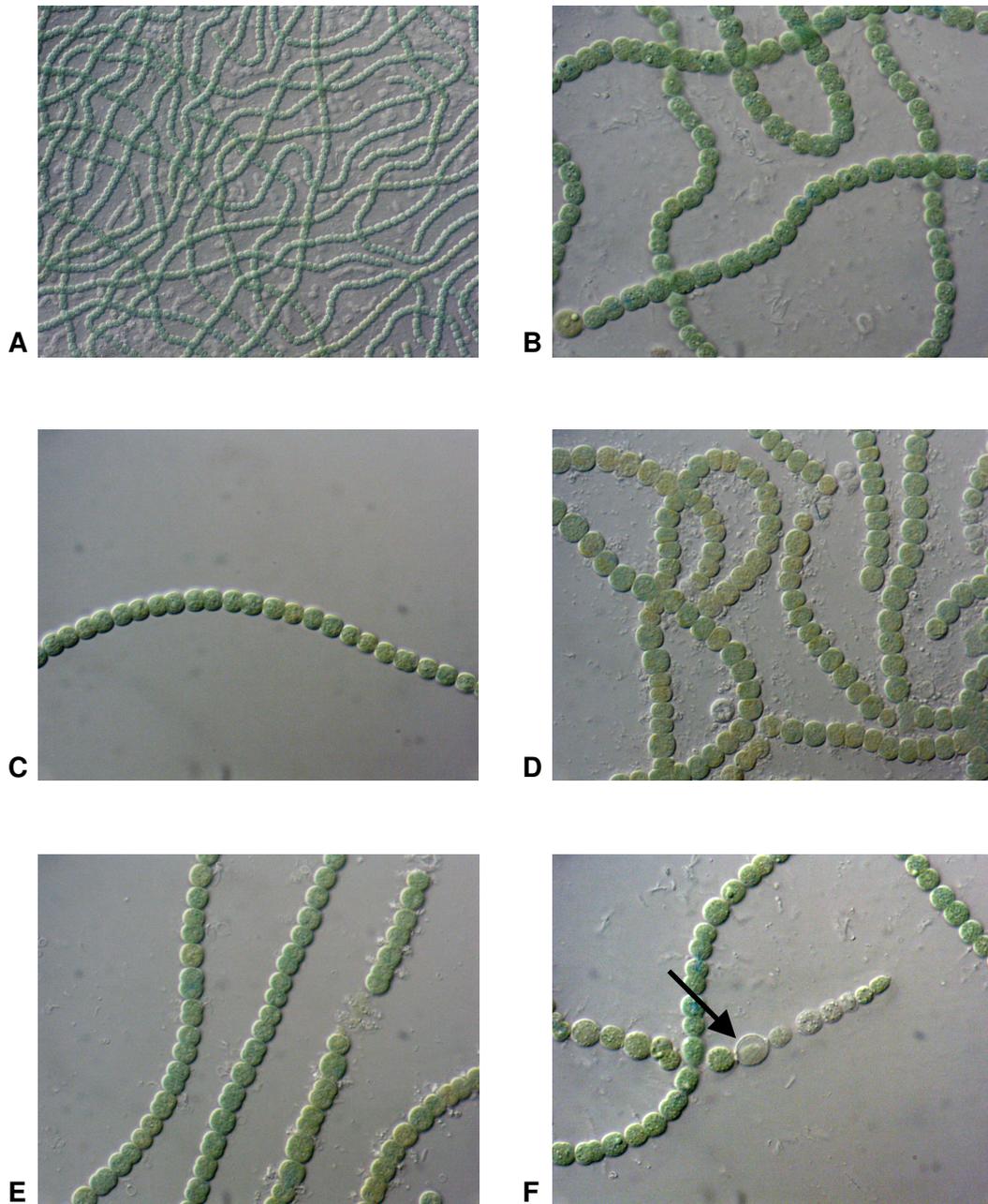


Fig. 1. *Anabaena* sp en cultivo unialgal □ medio BG11 □ A) Agregado de trichomas 20 X, B-E) Trichomas solitarios presentando el pigmento característico del grupo, F) Tricoma con presencia de heterocito 40 X (microfotografías: Nancy García Roa)

Debido a que las cianobacterias pueden ser clasificadas en la nomenclatura botánica también es importante su clasificación en el punto de vista bacteriológico.

	Komárek, 1989		Manual de Bergey, 2001
División:	Cyanoprocarionte	Dominio:	Bacteria
Clase:	Cyanophyceae	Phylum BX:	Cianobacteria
Subclase:	Hormogonophycideae	Clase I:	Cianobacteria
Orden:	Nostocales	Subsección IV	
Familia:	Nostocaceae	Familia I	
Subfamilia:	Anabaenoideae	Forma de género I:	<i>Anabaena</i>
Género:	<i>Anabaena</i>		

IV. OBJETIVOS

GENERAL

- Determinar los ácidos grasos de *Anabaena* spp. en un cultivo unialgal.

PARTICULARES

- Aislar del lago de Zumpango y cultivar —en medio BG11— *Anabaena* spp.
- Determinar los ácidos grasos de *Anabaena* spp. por la técnica de cromatografía de gases de alta resolución.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

VII a. Aislamiento y cultivo.

El muestreo se realizó en el Lago de Zumpango, Estado de México, a una altura de 2,400 msnm. Las coordenadas geográficas del municipio son: 19°43'12" y 99°55'00" latitud norte, 98°58'13" y 99°11'35" longitud oeste. Se tomaron un total de cinco muestras (muestra viva) durante 6 meses, por medio de filtrado en una red para plancton de 40 μ . Las muestras se separaron por centrifugación y aislamiento de tricomas con pipetas pasteur. *Anabaena* se cultivó en medio BG-11 solución 50X para cianobacterias (SIGMA) (Anexo), a una temperatura ambiente de 28 ± 2 °C (Allen y Stainer, 1968) e iluminación continua con dos lámparas de 20W de luz fría a una distancia de 15 cm entre el matraz y la lámpara en una cámara de acrílico.

VII b. Preparación de la muestra para esterificación (Haüsler, 1987).

Una vez obtenido un crecimiento óptimo (30 días), se realizó la recolección de la biomasa para su posterior centrifugación a 15,000 rpm a 4°C durante 10 minutos en una centrífuga refrigerada Sorvall RC-5B, posteriormente se separó el sobrenadante y se le agregó 5 ml de solución fisiológica al 0.85% volviendo a centrifugar en las mismas condiciones dos veces más. Una vez terminado este proceso la pastilla obtenida se liofilizó aproximadamente durante 10 hrs. a -50°C en una liofilizadora Lyph Lock 4.5 modE2M5.

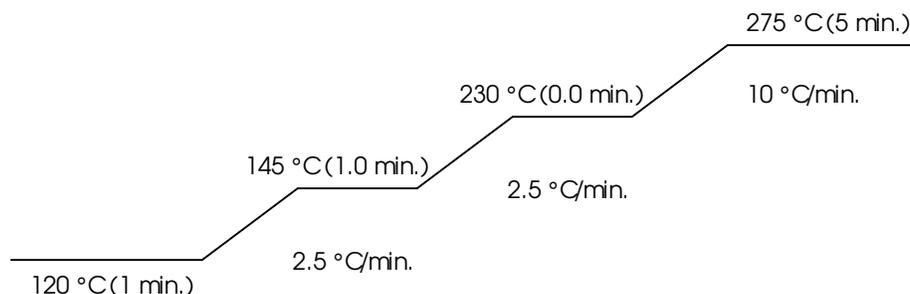
VII c. Esterificación (Glass, 1971).

De la biomasa liofilizada se pesaron 20 mg distribuyéndose en tubos de ensaye, agregando posteriormente 1 ml de metóxido de sodio, solución A (anexo*) agitando durante 5 minutos, posteriormente se agregó 0.7 ml de metanol saturado con gas cloro, solución B*, agitando durante 30 minutos y por último, 2 ml de

solución C* agitando durante 7 minutos. Una vez transcurridos estos tiempos se agregó 1 ml de hexano agitando durante 5 minutos para extraer los ésteres metílicos de los ácidos grasos, este procedimiento se repite dos veces, depositando la capa transparente donde se encuentran los ésteres metílicos en tubos de ensaye con sulfato de sodio anhidro para eliminar rastros de humedad, una vez realizado esto, se separan en viales de microreacción para evaporar con nitrógeno (grado cromatográfico) y concentrar hasta llegar a un volumen de 10 μ l.

Del concentrado se tomó 1 μ l para inyectar en el cromatógrafo. Todo el material utilizado debe estar libre de grasas, para lo cual se realizó una limpieza previa del material de vidrio con acetona, metanol y hexano destilados y secados a 150 °C durante toda la noche.

La identificación, separación y cuantificación de los ácidos orgánicos, se realizó en un cromatógrafo de gases con ionización de flama Hewlett Packard modelo 5890 A. El tipo de inyección fue de modo split. Para su separación se utilizó una rampa de temperatura programada como se aprecia a continuación:



La temperatura del detector fue de 270 °C, y 270 °C del inyector, la máxima cantidad de área bajo la curva se obtuvo con un radio de partición de 20:1 y con un flujo de arrastre de 30 ml/min. Se utilizó como gas acarreador Nitrógeno. Para la identificación de los ácidos orgánicos se utilizó un estándar externo de ácidos grasos metil esterificados CP mix 10 mg/ml Supelco Lote LB04445, además de un estándar de un éster metílico adicional cis-6,9,12-octadecatrienoato (• -Linolénico)

Alltech pureza 99%. Para asegurar la precisión de la inyección, se utilizó el C28 como estándar interno (Chem service 0-227 n-Octacosane pureza 99% Lote 154-63^a) (Figuras 2 y 3).

Una vez obtenidos los cromatogramas y ya identificados los picos contra el estándar externo, se realizó la normalización de los datos obtenidos (tiempos de retención y áreas de los picos), seleccionando el pico con mayor cantidad, asignándole el 100% comparándolo con los demás picos y obteniendo de estos también su porcentaje. A partir de esto se obtuvieron las siguientes medidas descriptivas: Media, Error estándar, Desviación estándar, Coeficiente de variación, Mínimo y Máximo. Posteriormente, las áreas de cada pico fueron analizadas con la hoja de cálculo Excel, para determinar cuantitativamente los ácidos grasos presentes en el cultivo unialgal de *Anabaena*.

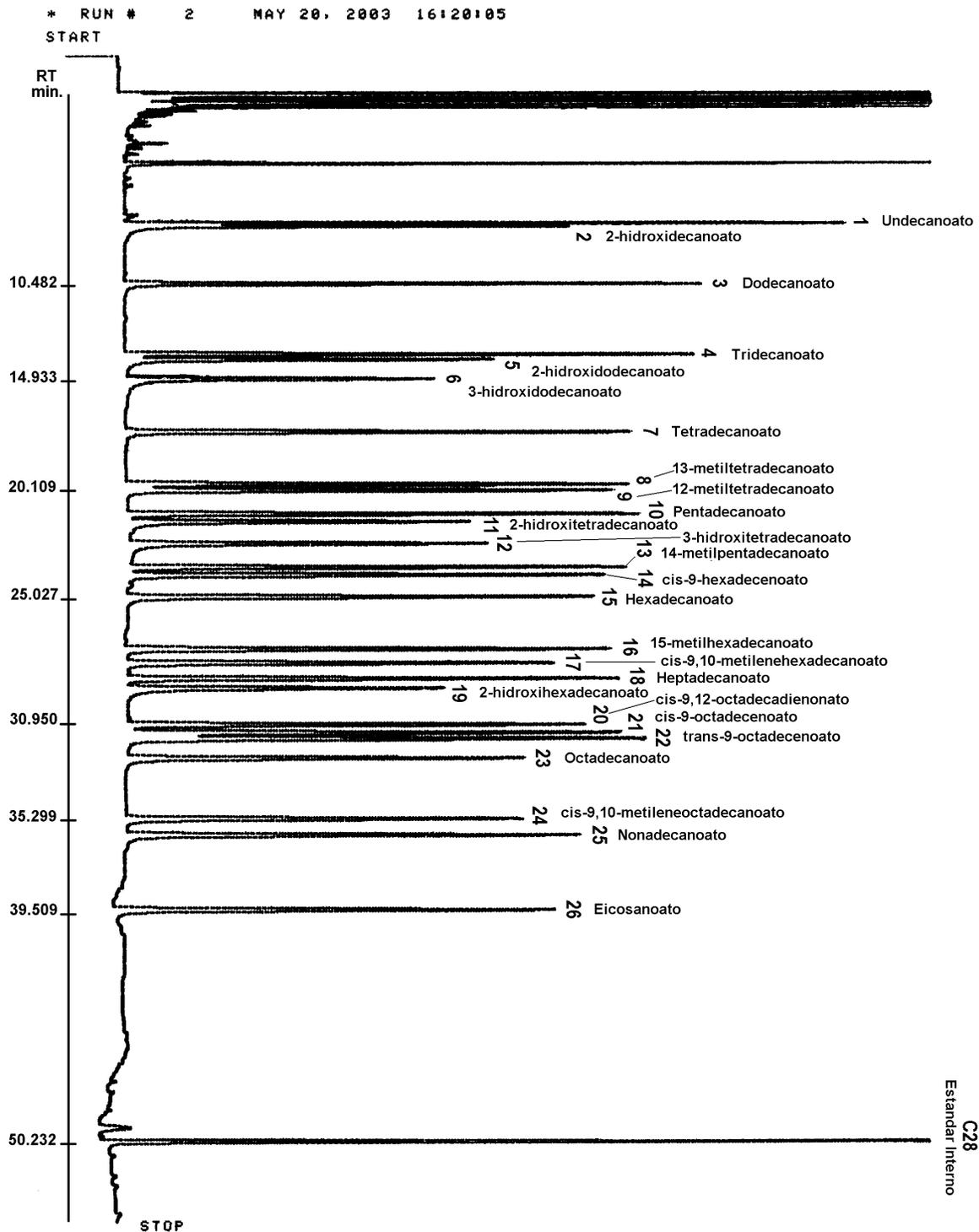


Figura 2. Estándar externo de ácidos grasos metil esterificados CP mix 10 mg/ml Supelco. Lote LB04445 y estándar interno C28 Chem service 0-227 n-Octacosane pureza 99% Lote 154-63^a.

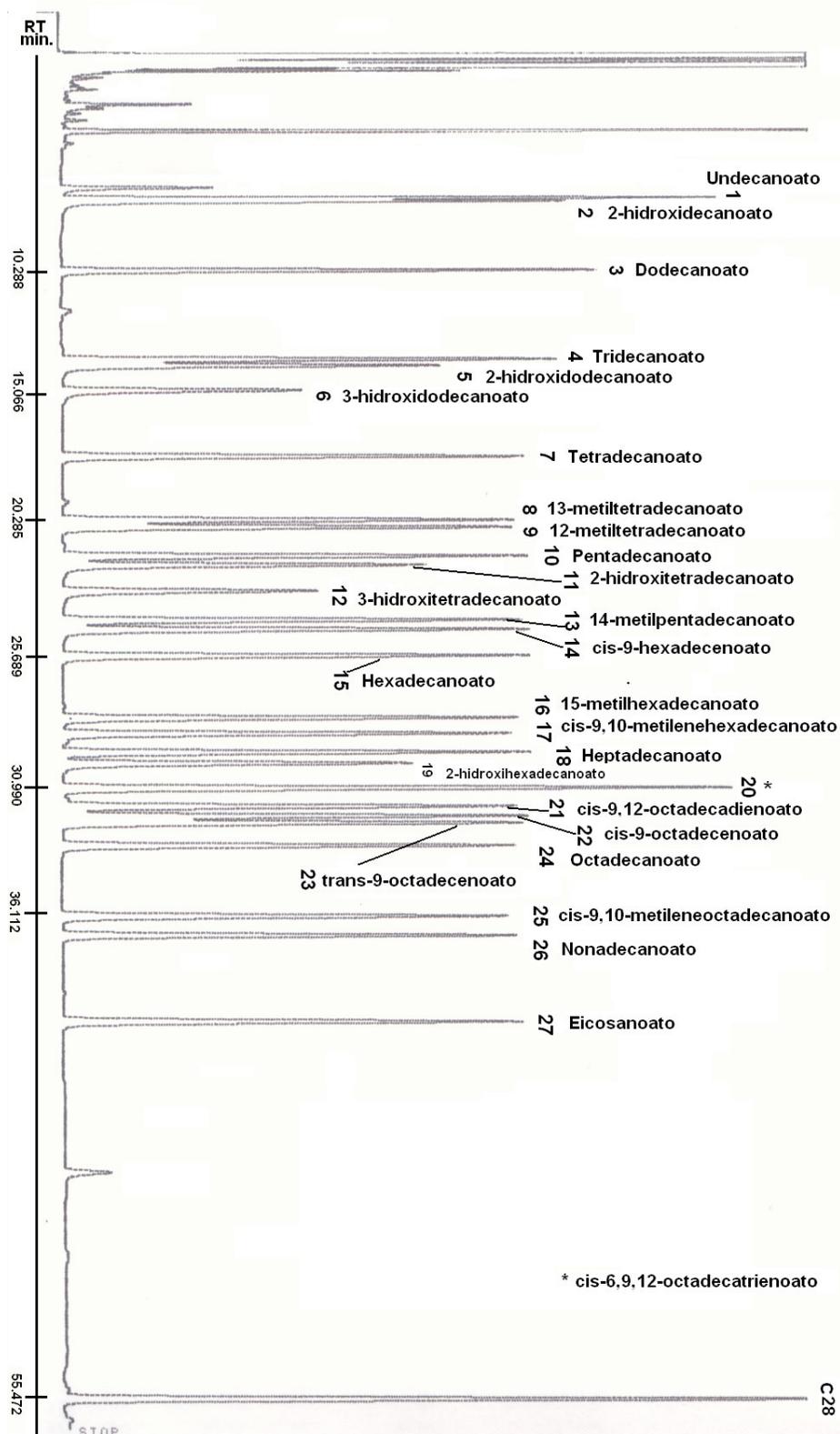


Figura 3. Estándar externo de ácidos grasos metil esterificados adicionando el ácido graso cis-6,9,12-octadecatrienoato y estándar interno C28 Chem service 0-227 n-Octacosane pureza 99%.

VI. RESULTADOS

En total se realizaron 60 corridas cromatográficas de las cuales se seleccionaron un total de 41 cromatogramas que resultaron ser los más representativos, se determinaron 11 ácidos grasos, cuyos ésteres en orden de elución fueron los siguientes: Tetradecanoato (14:0), 3-hidroxitetradecanoato (14:0 3-OH), cis-9-hexadecenoato (16:1⁹), Hexadecanoato (16:0), 15-metilhexadecanoato (i-17:0), 2-hidroxihexadecanoato (16:0 2-OH), cis-9, 12-octadecadienoato (18:2^{9,12}), cis-9-octadecenoato (18:1⁹), trans-9-octadecenoato (18:1⁹), Octadecanoato (18:0) y cis-9, 10-metileneoctadecanoato (19:0*) (Tabla 2, Figura 4).

Tabla 2. Ésteres metílicos del cultivo unialgal de *Anabaena*.

No. de Pico	Fórmula	Nombre IUPAC	Nombre común
7	14:0	Tetradecanoato	Mirístico
12	14:0 3-OH	3-hidroxitetradecanoato	
14	16:1 ⁹	cis-9-hexadecenoato	Palmitoléico
15	16:0	Hexadecanoato	Palmítico
16	i-17:0	15-metilhexadecanoato	
19	16:0 2 OH	2-hidroxihexadecanoato	
20	18:2 ^{9,12}	cis-9, 12-octadecadienoato	Linoléico
21	18:1 ⁹ _{cis}	cis-9-octadecenoato	Oleico
22	18:1 ⁹ _{trans}	trans-9-octadecenoato	Elaidico
23	18:0	Octadecanoato	Esteárico
24	19:0*	cis-9, 10-metileneoctadecanoato	

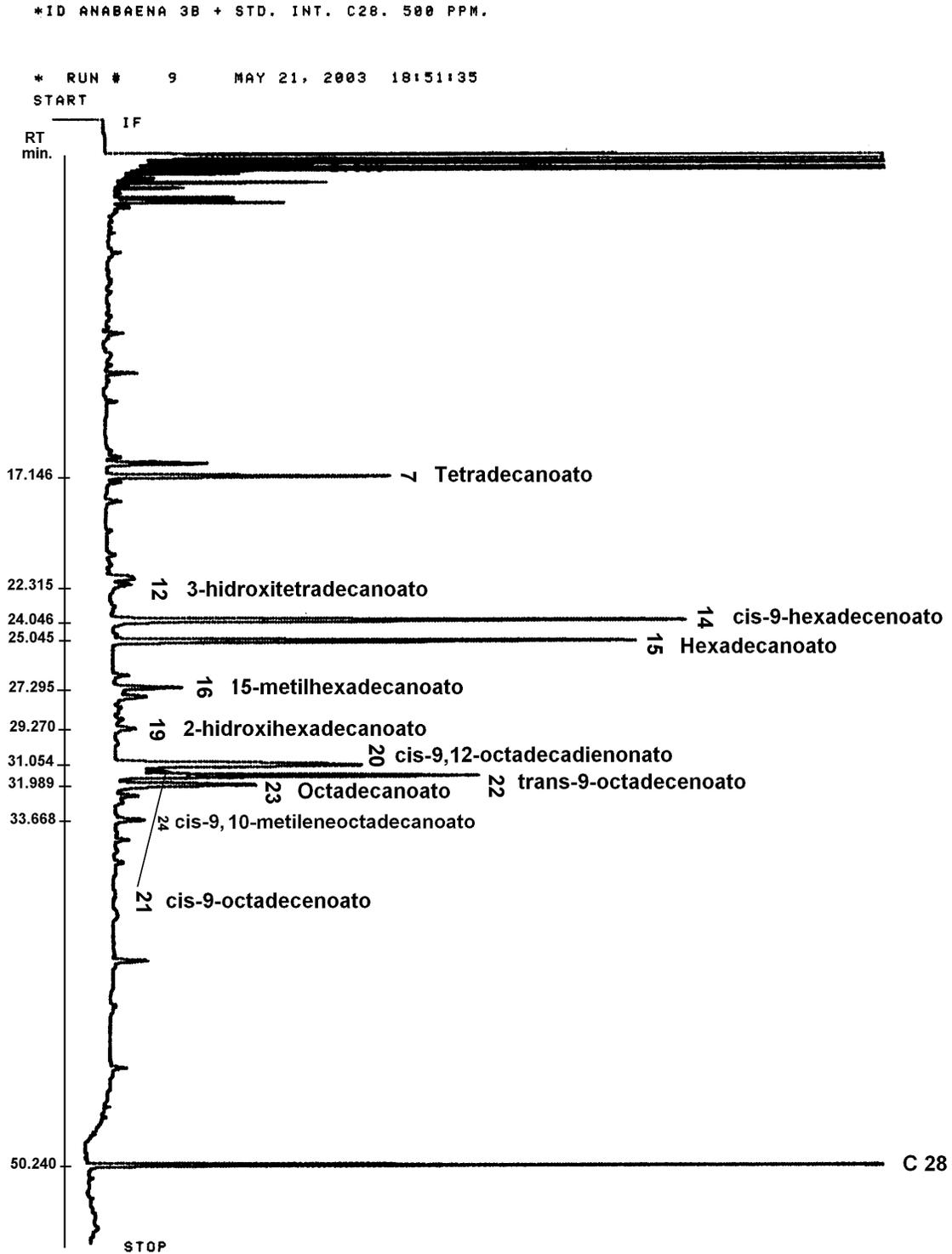


Figura 4. Cromatograma de la muestra de *Anabaena* sp. que muestra los ácidos grasos identificados así como el estándar interno C28.

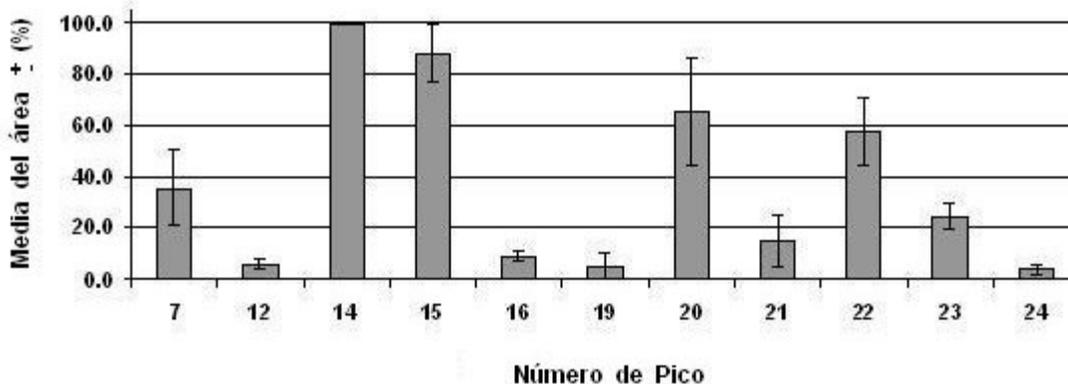
La normalización de los datos se realizó seleccionando el pico del ácido graso con el valor más alto bajo la curva, asignándole el 100% y siendo éste, el pico 14 (cis-9-hexadecenoato). Posteriormente se realizó una comparación con los demás picos para así obtener el porcentaje de área de cada uno. Una vez registrados estos datos se realizó el cálculo de las medidas descriptivas de las áreas (Tabla 3) y gráfica del perfil cromatográfico (Figura 5).

El ácido graso más abundante se encontró en el pico 14, posteriormente el pico 15 con una media de área normalizada de 88 %, el pico 20 con 65.3%, el pico 22 con 57.4%, el pico 7 con 35.5%, el pico 23 con 24.4%, el pico 21 con 14.9%, el pico 16 con 9.1%, el pico 12 con 6.1%, el pico 19 con 5.4% y por último el pico 24 con 4%.

Tabla 3. Medidas descriptivas de las áreas.

Nº de pico	7	12	14	15	16	19	20	21	22	23	24
Media	35.5	6.1	100.0	88.0	9.1	5.4	65.3	14.9	57.4	24.4	4.0
Error estándar	2.2	0.3	0.0	1.7	0.3	0.8	3.2	1.6	2.0	0.7	0.3
Desviación estándar	14.5	1.9	0.0	11.1	1.9	5.2	21.1	10.2	13.3	4.6	1.8
Coefficiente de variación	40.7	31.2	0.0	12.6	20.3	95.6	32.3	68.6	23.1	19.0	46.1
Mínimo	15.9	2.7	100.0	66.3	6.6	3.6	38.9	6.4	35.0	10.2	1.6
Máximo	62.7	11.7	100.0	100.0	14.1	38.2	100.0	40.2	83.9	33.3	7.7

Figura 5. Perfil cromatográfico de ácidos grasos de *Anabaena sp.*



Debido a que el estándar externo (mezcla de 26 ácidos grasos) utilizado para la identificación de los ácidos grasos de *Anabaena* no contenía el ácido graso • - Linolénico 18:3^{6,9,12} (cis-6,9,12-octadecatrienoato) y el cual, de acuerdo a bibliografía es característico del grupo de cianobacterias se adicionó al estándar externo que contiene la mezcla de ácidos grasos metil esterificados. Cabe señalar que en los primeros 41 cromatogramas analizados, se presentó el ácido graso • - Linolénico, pero no se pudo determinar su tiempo de retención y área hasta que se adicionó al estándar externo. Con este estándar modificado se obtuvieron 20 cromatogramas, en donde se presentó en el lugar del pico 20 del estándar externo (Tabla 4), con lo cual se pudo corroborar tanto su presencia como cuantificarlo en los organismos del cultivo (Figura 6).

Los resultados finales en cuanto a presencia y cantidad de cada ácido graso determinado, con base en la totalidad de los cromatogramas analizados fueron los siguientes:

Tabla 4. Lista de ácidos grasos presentes en el cultivo, comparado con el estándar modificado.

Número de pico	Fórmula	Nombre común	ng/mg
7	C 14:0	Mirístico	236
12	C 14:0 3-OH	3-hidroxitetradecanoato	44
14	C 16:1 ⁹	Palmitoléico	836
15	C 16:0	Palmítico	729
16	C 17:0-i	15-metilhexadecanoato	72
19	C 16:0 2-OH	2-hidroxihexadecanoato	42
20	C 18:3 ^{6,9,12}	• -Linolénico	119
*21	C 18:2 ^{9,12}	Linoléico	602
22	C 18:1 ⁹ _{cis}	Oléico	87
23	C 18:1 ⁹ _{trans}	Elaídico	451
24	C 18:0	Estearico	204
25	C 19:0 ^Ä	cis-9,10 metileneoctadecanoato	36

*El pico 20 del estándar externo se desplazó al pico 21 cuando se utilizó el estándar modificado (adicionado con el ácido • -Linolénico)

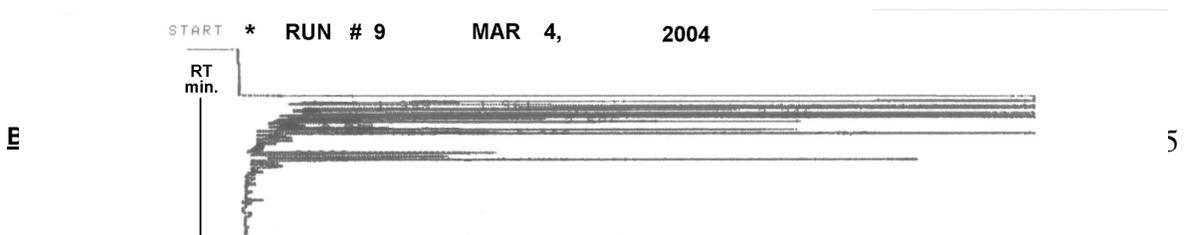


Figura 6. Cromatograma de la muestra de *Anabaena* sp. identificando el ácido Linolénico (pico 20 cis-6,9,12-octadecatrienoato).

VII. DISCUSIÓN

Las cianobacterias es un grupo que se ha identificado como el principal componente de los florecimientos o “blooms” en los cuerpos de agua, aunque su estudio se ha enfocado en su ecología, existen otras propiedades que hacen que diversos investigadores presenten un interés particular en estos organismos como es el caso del estudio de metabolitos secundarios, los cuales presentan cierta actividad bactericida o bacteriostático e incluso antiviral (Østensvik *et al.*, 1998, Singh *et al.*, 2002, Mundt *et al.*, 2003).

Debido a esto se ha recurrido a la obtención de cepas para su estudio integral, sin embargo las técnicas de cultivo presentan cierta dificultad al momento de realizar una identificación taxonómica basándose solo en características morfológicas del organismo, debido a que el manejo de los cultivos en el laboratorio puede afectar sus atributos taxonómicos (Kantz, *et al.*, 1985), estas técnicas de identificación pueden ser conjugadas con una técnica de identificación a partir de sus ácidos grasos celulares como lo es la cromatografía de gases, la cual, permite obtener información consistente para formar una base de datos que pudiera ser tanto de bacterias patógenas como en este caso de cianobacterias.

El perfil cromatográfico del género *Anabaena* en nuestro cultivo unialgal presentó en su mayoría ácidos grasos insaturados, de los cuales, **cis-9-hexadecenoato (16:1⁹)**, **cis-9-octadecenoato (18:1⁹)** y **trans-9-octadecenoato (18:1⁹)** corresponden a ácidos grasos **monoinsaturados (MUFAs)** y de los ácidos grasos **polinsaturados (PUFAs)** se presentan **cis-6,9,12-octadecatrienoato (18:3^{6,9,12})** y **cis-9, 12-octadecadienoato (18:2^{9,12})**, de ácidos grasos **saturados** corresponden **Tetradecanoato (14:0)**, **Hexadecanoato (16:0)** y **Octadecanoato (18:0)**. Lo anterior concuerda en que las cianobacterias presentan en su membrana, ácidos grasos con dos o más enlaces dobles en la cadena

hidrocarbonada a diferencia de los demás procariotes que poseen solo ácidos grasos saturados (Welch, 1991).

De igual manera fueron determinados los ácidos **3-hidroxitetradecanoato (14:0 3-OH)**, **5-metilhexadecanoato (i-17:0)**, **2-hidroxihexadecanoato (16:0 2-OH)** y **cis-9, 10-metilenoctadecanoato (19:0')** este último le confiere flexibilidad a la membrana celular y es parte estructural de la misma.

Las cianobacterias, también llamadas cianofitas, presentan ciertas relaciones con las bacterias Gram-negativas, como su capa de peptidoglucanos, también algunos ácidos grasos componentes celulares de los lipopolisacáridos, están presentes en estos dos grupos –como es el caso del ácido **3-hidroxitetradecanoato (14:0 3-OH)**, el cual, es un marcador general para las bacterias Gram-negativas y es indicativo del Lípido A (que está relacionado con la virulencia de bacterias). En el caso de las cianobacterias el ácido **Linolénico (cis-6,9,12-octadecatrienoato)** es el ácido graso representativo del grupo y este no se encuentra en bacterias (González, 1976).

El coeficiente de variación es elevado en la mayoría de los picos obtenidos (mayor al 25%) a excepción de los picos **15 (hexadecanoato)**, **16 (15-metilhexadecanoato)**, **22 (trans-9-octadecenoato)** y **23 (octadecanoato)**, estos resultados se podrían deber a los cambios de temperatura y luz dentro de la cámara ya que no eran muy constantes, esto se puede observar en estas bacterias fotosintéticas debido a que tienen la capacidad de modificar el grado de saturación de sus ácidos grasos, lo que representa un mecanismo adaptativo frente a cambios de temperatura modificando la proporción entre ácidos grasos insaturados y saturados, con objeto de mantener un estado de fluidez adecuado en la membrana: a temperaturas altas, aumenta la proporción de ácidos grasos saturados (Cohen 1987, 1991), y a temperaturas bajas aumenta la de los insaturados. De igual manera la iluminación es importante, observando que los bajos niveles de ácidos grasos insaturados son atribuidos a bajos niveles de

iluminación (Sato *et al.*, 1988). Otro importante factor de variación se refiere a las fases de crecimiento de las cianobacterias, ya que al no contar con una cámara de cultivo el tiempo de cosecha varía con las condiciones de temperatura en el laboratorio.

El estudio presenta datos cualitativos y cuantitativos demostrando que los picos **14 Palmitoléico (cis-9-hexadecenoato)**, **15 Palmítico (Hexadecanoato)**, **21 Linoléico (cis-9, 12-octadecadienoato)** y **23 Eláidico (trans-9-octadecenoato)** son los ácidos grasos más abundantes con 836, 729, 602 y 451 ng/mg respectivamente, de acuerdo a diversos autores estos ácidos son representativos del género, sin embargo en la mayoría de los casos el ácido **Palmítico (Hexadecanoato)**, es el que se presenta como componente predominante, lo contrario de nuestro caso, que el ácido más abundante es el **Palmitoléico (cis-9-hexadecenoato)** esto se relaciona con lo mencionado anteriormente acerca de la temperatura de cultivo, pues el ácido con mayor área es un insaturado y es decir que la temperatura de cultivo estuvo por arriba de los 30 °C recomendados en la literatura. (Caudales-Wells, 1992; Murata, 1992; Li-Watanabe, 2001; Gugger *et al.*, 2002).

Los ácidos **Mirístico (Tetradecanoato)**, **Estearico (Octadecanoato)** y **Linolénico (cis-6,9,12-octadecatrienoato)**, se determinaron en un rango de 119-236 ng/mg. Los valores bajos, de 36-87 ng/mg, se observaron en el **Oléico (cis-9, 12-octadecadienoato)**, **15-metilhexadecanoato**, **3-hidroxitetradecanoato**, **2-hidroxihexadecanoato** y **cis-9, 10-metileneoctadecanoato**. El ácido **Mirístico** y **Palmítico** se encuentran en todos los microorganismos siendo este último común en casi todos los organismos vivos al igual que el estearico (Bronz, 2002). La presencia del ácido **Mirístico** está presente en muestras de *Anabaena* hepatotóxicas y ausente en neurotóxicas y no tóxicas (Gugger *et al.* 2002). Esto es coincidente con Gugger, ya que en nuestro cultivo de laboratorio se presentaron en cantidades intermedias tanto el **Estearico (18:0)** como el **Mirístico (14:0)**, 204 y 236 ng/mg respectivamente y ambos se relacionan con cepas que producen

hepatotoxinas. Asimismo, el **Palmítico** que se refiere como el de mayor área en las cianobacterias, se presentó en el cultivo uniagal como el segundo más abundante con 729 ng/mg y también está relacionado con cepas hepatotóxicas. Estos hallazgos nos indican otra posible utilidad del análisis cromatográfico para determinar o diferenciar cepas hepatotóxicas, que presentan los ácidos grasos mencionados de cepas neurotóxicas que no presentan ninguno de ellos.

La presencia de ácidos grasos en diversas concentraciones y aún en mínimas cantidades son importantes para la determinación taxonómica, ejemplo de ello es la presencia del ácido **Palmitoléico** y **Linolénico** que se presentan en altos niveles en el género *Nostoc*, (Vargas,1998), así como la identificación de géneros en cultivo los cuales presentan cierta dificultad debido a la pérdida de características morfológicas, como se ha observado al diferenciar *Anabaena* y *Nostoc* a partir del porcentaje del ácido **Palmítico**, el cual se observa por arriba del 27% en *Anabaena* y menor a 27% en *Nostoc* (Sato *et al.*,1988).

Tomando en cuenta esta proporción, nuestros datos presentan al ácido **Palmítico** con un 87.2% lo que permite confirmar que este ácido más otros reportados, concuerdan con los determinados por cromatografía y con el análisis morfológico realizado al microscopio para identificar al género.

Las variaciones de los ácidos grasos proporcionan datos importantes para la determinación tanto a nivel de género como de especie o variedad, tal es el caso de la ausencia del ácido **Linolénico** en *Anabaena variabilis* (Murata, 1992), aunque se reporta para el género incluso como elemento predominante, puede estar ausente y observándose a su vez un aumento en el ácido **Palmítico**, remplazando completamente a los PUFAs de las series C18:0 (Stanier, 1977). En las muestras analizadas del cultivo unialgal de *Anabaena* se presenta dicho ácido en cantidades de 119 ng/mg. La presencia del ácido **Linolénico** está ligada con la iluminación ya que puede estar ausente cuando los organismos crecen en completa oscuridad lo que sugiere una relación directa entre éste y la actividad

fotosintética (González, 1976). El cultivo se mantuvo en condiciones de luz continua y la cantidad del **Linolénico** presente refleja que en el laboratorio las condiciones de iluminación se mantuvieron sin mucha variación. Este ácido es un importante componente de la dieta en el hombre así como complemento alimenticio en acuicultura (Singh *et al*, 2002).

VIII. CONCLUSIONES

La cromatografía de gases, es una técnica muy sensible que puede conjugarse con otros elementos como los fisiológicos y genéticos para obtener una importante herramienta analítica en la identificación de microorganismos incluso a nivel de especie.

En México el grupo de las cianobacterias ha sido estudiado con fines ambientales, ya que se considera como el principal indicador de condiciones eutróficas en lagos y embalses, sin embargo, estos organismos juegan un papel muy importante no sólo en este caso sino también para el aislamiento de los metabolitos secundarios que además de su probada toxicidad estos productos pueden llegar a ser de importancia farmacéutica e industrial.

Con base en los resultados obtenidos por el análisis cromatográfico se concluye que el perfil de ácidos grasos (Figura 6) de *Anabaena spp.*, en nuestro cultivo unialgal es el siguiente: Mirístico (14:0), 3-hidroxitetradecanoato (14:0 3-OH), Palmitoléico (16:1⁹), Palmítico (16:0), 15-metilhexadecanoato (17:0-i), 2-hidroxihexadecanoato (16:0 2-OH), • -Linolénico (18:3^{6,9,12}), Linoléico (18:2^{9,12}), Oleico (18:1⁹ _{cis}), Elaídico (18:1⁹ _{trans}), Esteárico (18:0) y cis-9,10 metileneoctadecanoato (19:0^Δ).

Con relación a la presencia de los ácidos Mirístico (14:0) y Esteárico (18:0), los cuales se presentaron en cantidades relativamente altas, y de acuerdo a bibliografía estos ácidos están presentes en cepas hepatotóxicas, por lo cual, por el momento este cultivo puede ser considerado como hepatotóxico.

El género *Anabaena* presente el lago de Zumpango y aislado en el laboratorio presenta características que lo consideran hepatotóxico, sin embargo no se han reportado problemas en la población relacionada con este cuerpo de agua, no así, se han presentado problemas de eutrofización.

IX. RECOMENDACIONES

Es importante determinar con mayor exactitud la edad del cultivo, así como tener un mayor control en las condiciones experimentales para el desarrollo del mismo como son la temperatura, luz y periodos de iluminación.

Para realizar de forma más integra la identificación de cianobacterias en cultivos unialgales, se deben corroborar con cultivos axénicos y tipificados para la identificación de la especie así como un estándar de ácidos grasos más amplio, ya que esta técnica, por el mismo hecho de ser tan sensible detectara todos los ácidos grasos presentes en la muestra, aún en niveles traza, recordamos que aún en cantidades mínimas son de gran importancia para la determinación taxonómica.

Este tipo de estudios abren paso para nuevas investigaciones tanto en el plano de identificación taxonómica para la realización de una base de datos, como para la obtención de información relacionada con salud pública.

X. ANEXO

PREPARACIÓN DE MEDIO BG11

Colocar en un matraz Erlenmeyer 300 ml de agua destilada y estéril, adicionar 2 ml. de Medio BG-11 (solución 50X para cianobacterias SIGMA) por cada 100 ml. de agua.

Para el cultivo se requiere un pH de 7-10 neutral o alcalino y luz menor 500 lx. Puede adicionarse vitamina B12, requerida para algunas especies (Rippka *et al*, 1979).

	Solución Stock	ml / l	*Microelementos	g / l
NaNO ₃	150 g/l	10 ml	H ₃ BO ₃	2.86 g
K ₂ HPO ₄	30 g/l	1 ml	MnCl ₂ .4H ₂ O	1.81 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	75 g/l	1 ml	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.222 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	36 g/l	1 ml	NaMoO ₄ .5H ₂ O	0.390 g
Na ₂ CO ₃	20 g/l	1 ml	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.079 g
Citrato Férrico	6 g/l	1 ml	Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0.0494 g
Ácido Cítrico	6 g/l	1 ml		
EDTA	1 g/l	1 ml		
* Microelementos		1 ml		

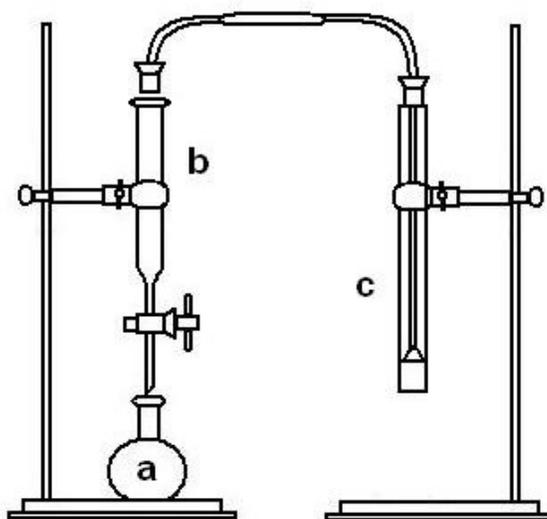
SOLUCIONES PARA ESTERIFICACIÓN

a). Solución "A" (Metóxido de Sodio).

Tomar 37 ml. de metanol y 25 ml. de metóxido de sodio, mezclar y aforar a 100 ml. con benceno. Almacenar en refrigeración de 2 a 8 °C en envases color ámbar.

b). Solución "B" (Metanol saturado con cloro gas).

Preparar un sistema de flujo como se muestra en el siguiente esquema:



1. El sistema debe montarse en una campana de extracción ya que la reacción química es de alto riesgo.
2. Colocar en el matraz de bola (a) 30 ml. de ácido clorhídrico concentrado (HCl)
3. En el embudo (b) colocar 30 ml. de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4)
4. Colocar en el tubo colector (c) 20-25 ml. de metanol

5. Una vez colocados los reactivos, unir el sistema y abrir lo más lento posible la llave del embudo donde está el ácido sulfúrico concentrado, dejar que el flujo continúe. El pH debe ser ácido.
6. Una vez terminado el flujo, colocar el metanol saturado con cloro del tubo colector (c) en un frasco ámbar y refrigerar de 2 a 8 °C.
7. El contenido del matraz de bola debe desecharse en un recipiente especial.

c). Solución “C” (Fisiológica 0.85%).

Disolver 8.5 grs. de cristales de Cloruro de Sodio (NaCl) en 1000 ml de agua destilada, esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 min. enfriar y almacenar en refrigeración.

XI. REFERENCIAS

- Alcántara, B. M. C. 1979. **Química inorgánica moderna.** Primera edición. CECSA, México. 636 pp.
- Allen, M. N., Stainer, R. Y. 1968. **Selective Isolation of Blue-Green algae from water and soil.** *J. Gen. Microbiol.* 51: 203-209.
- Anagnostidis, K., Komárek, J. 1985. **Modern approach to the classification system of cyanophytes.** *Arch. Hydrobiol.* Suppl. 71, 1/2 (Algological studies 38/39) 291-302.
- Beasley, V. R., Dahlem A. M., Cook W. O., Valentine W. M., Lovell R. A., Hooser S. B., Harada K., Suzuki M. Y Carmichael W. W. 1989. **Diagnostic and clinically important aspects of cyanobacterial (blue-green algae) toxicoses.** *J. Vet. Diag. Inv.* 1:359-365.
- Beyer, H., Walte, W. 1987. **Manual de Química orgánica.** Primera edición. Reverté. Barcelona, España. 1084 pp.
- Blanco, A. 1996. **Química Biológica.** Sexta edición. El Ateneo. Buenos Aires. 688 pp.
- Brondz, I. 2002. **Development of fatty acid analysis by high-performance liquid chromatography, gas chromatography, and related techniques (Review).** *Ana. Chim. Acta.* 465:1–37.
- Carmichael, W. W. 1986. **Isolation, culture and toxicity testing of toxic freshwater cyanobacteria (blue–green algae).** *Fund. Res. Homog. Catal.* 3:1249–1262.

- Carmichael, W. W. 1994. **The toxins of Cyanobacteria.** *Scientific American* 270:78–86.
- Caudales, R., Wells, J. M. 1992. **Differentiation of the free-living *Anabaena* and *Nostoc* cyanobacteria on the basis of fatty acid composition.** *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42:246-25.
- Cohen, Z., Margheri, M. C., Tomaselli, L. 1995. **Chemotaxonomy of cyanobacteria.** *Phytochem.* 4(4):1155-1158.
- Cohen, Z., Vonshak, A. 1991. **Fatty acid composition of *spirulina* and *spirulina*-like cyanobacteria in relation to their chemotaxonomy.** *Phytochem.* 30:205-206.
- Cohen, Z., Vonshak, A., Richmond, A. 1987. **Fatty acid composition of *spirulina* strains grown under various environmental conditions.** *Phytochem.* 26:2255-2258.
- De Gracia, J. M. S. 1975. **Fundamentos de la Cromatografía de Gases.** Segunda edición. Alhambra. España. 205 pp.
- Edward, L. R. 1989. **Phycology.** Segunda edición. Cambridge University Press. USA. 53-101.
- Fogg, G. E., Stewart, W. D., Fay, P., Walsby, A. E. 1978. **The blue-green algae.** Tercera edición. Academic Press. Gran Bretaña. 431 pp.
- Garduño, S. G., Oliva, M. M. G., Ortega, M., Valdés, G. R., Ramírez, M. G. 2005. **Algas Epicontinentales del Estado de México.** En prensa.

- Garrity, M. G., Winters, M., Searles, B. D. 2001. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Segunda edición. E. U. A. 41 pp.
- Glass, R. L. 1971. **Saponification and the preparation of fatty acid methylesteres**. *Lipids*. 6:919-925.
- González, A. M. E. 1987. **Fundamentos teóricos y principios de la Cromatografía en fase de vapor**. ENEP Iztacala, Proyecto de Conservación Y Mejoramiento del Ambiente. UNAM. 67 pp.
- González, V. L. I. 1976. **Determinación de ácidos grasos en una nueva especie de alga del género *Nostoc***. *Anal. Cent. Cien. Mar y Limnol.* 1-8.
- Gugger, M., Lyra, C., Suominen, I., Tsitko, I., Humbert, J. F., Salkinoja-Salonen, M. S., Sivonen, K. 2002. **Cellular fatty acids as chemotaxonomic markers of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis*, *Nostoc* and *Planktothrix* (cyanobacteria)**. *Int J Syst Evol Microbiol.* 52:1007-1015.
- Haüsler, J. 1987. **Determinatin of organic acid content by gas-chromatography as a rapid and accurated identification method of bacteria**. V curso simposio internacional sobre biología de la contaminación, UNAM-SEDUE-UPN, México.
- Hoiczuk, E., Hansel, A. 2000. **Cyanobacterial Cell Walls: News from an Unusual Prokaryotic Envelope**. *J. Bacteriol.* 182:1191-1199.
- Holt, G. J., Krieg, R. R. 1984. **Bergey's Manual of sistematic Bacteriology**. Vol. 1 Williams & Wilkins. Baltimore London. 15 p.

- Hori, K., Ishii, S., Ikeda, G., Okamoto, J., Tanji, Y., Weeraphasphong, C., Unno, H. 2002. **Behavior of filamentous cyanobacterium *Anabaena spp.* in water column and its cellular characteristics.** *Biochem. Engin. J.* 10:217–225.
- Kantz, T., Bold, H. 1985. **Phycological studies. IX Morphological and taxonomic Investigations of *Nostoc* and *Anabaena* in culture.** The Univ. Texas. 7-67 pp.
- Kenyon, C. N. 1972. **Fatty acid composition of unicellular strains of blue-green algae.** *J. Bacteriol.* 109:827-834.
- Kenyon, C. N., Rippka, R., Stanier, R. Y. 1972. **Fatty acid composition and physiological properties of some filamentous blue-green algae.** *Arch. Microbiol.* 83:216-236.
- Komárek, J., Anagnostidis, K. 1989. **Modern approach to the classification system of Cyanophytes 4-Nostocales.** *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 82.3 (Algological studies 56) 247-345.
- Krishnamurthy, T., Carmichael, W. W., Sarver, E. W. 1986. **Toxic peptides from fresh water cyanobacteria (blue-green algae). I. Isolation, purification and characterization of peptides from *Microcystis aeruginosa* and *Anabaena flos-aquae*.** *Toxicon.* 24(9):865-873.
- Lehninger, A. L. 1991. **Bioquímica.** Segunda edición. Omega. Barcelona, España. 1117pp.

- Li, R., Watanabe M. 2001. **Fatty acid profiles and their chemotaxonomy in planktonic species of *Anabaena* (Cyanobacteria) with straight trichomes.** *Phytochem.* 57:727-731.
- Martin, T. 2000. **Cyanobacterial dominance in lakes.** *Hydrobiol.* 438:1–12.
- Martínez, R. E., Martínez S. M. D, Ma., Ramírez, G. P. 2002. **“Determinación de toxinas biológicas en una fuente de abastecimiento de agua dulce”** XXVIII Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Cancún. México.
- May, V. 2000. **The occurrence of toxic cyanophyte blooms in Australia.** National Herbarium of New South Wales. Royal Botanic Gardens. Sydney, New South Wales, Australia. 127-142.
- Millán, C. M., Martínez, S. M. D., Martínez R. E., Ramírez G. P. 2002. **“Aislamiento y cultivo de *Anabaena* spp, en dos fuentes de abastecimiento de agua para uso y consumo humano”.** XVII Congreso Nacional de Hidráulica, Monterrey, N. L. México.
- Mundt, S., Kreitlow, S., Jansen, R. 2003. **Fatty acids with antibacterial activity from the cyanobacterium *Oscillatoria redekei* HUB 051.** *J. Applied Phycol.* 15: 263–267.
- Murata, N., Wada, H., Gombos, Z. 1992. **Modes of fatty-acid desaturation in cyanobacteria.** *Plant Cell. Physiol.* 33:933-941.
- Nhoato, A. 2001. **Toxicidad de las cianobacterias en algas de represa.** *Invest. Vet. en línea.* 5(1):1-8.

- Østensvik, Ø., Skulberg, O.M., Underdal, B., Hormazabal, V. 1998. **Antibacterial properties of extracts from selected planktonic freshwater cyanobacteria – a comparative study of bacterial bioassays.** *J. Applied Microbiol.* 84:1117-1124.
- Paredes, S. F., Mira, G. J., Sassián, M. P., García-Martos, P. 2001. **La cromatografía Gas-Líquido con espectrometría de masas en la identificación de levaduras.** *Rev. Iberoam. Micol.* 18:33-37.
- Piorreck, M., Baasch, K.H., Pohl, P. 1984. **Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes.** *Phytochem.* 23:207-216.
- Piorreck, M., Pohl, P. 1984. **Formation of biomass, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acid in green and blue-green algae during one growth phase.** *Phytochem.* 23:217-223.
- Pizzolon, L. 1996. **Importancia de las cianobacterias como factor de toxicidad en las aguas continentales.** *Interc.* 21(6):239-245.
- Ramírez, G. P., Martínez, R. E. 2001. **“Identification and Quantification of Cyanotoxins by HPLC in a Watersupply reservoir.”** Congress BIOMARKERS’. Biomarkers of Environmental Contamination. Póvoa de Varzim, Portugal.
- Ramírez, G. P., Martínez, R. E., Martínez, M. D., Eslava, C. C. 2004. **“Cianobacterias, Microorganismos del Fitoplancton y su relación con la salud humana”.** Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, Programa Universitario del Medio Ambiente-UNAM. México, D.F. 83-105 p.

Ramírez, G. P., Sarma S. S. S. N., Robles, V. E., Cuesta, I. Hurtado, M. D. 2002. **Seasonal Variations of zooplankton abundance in the freshwater reservoir Valle de Bravo (México).** *Hidrobiol.* 467:99-108.

Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J., Herdman, M., Stanier, R. 1979. **Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria.** *J. Gen. Microbiol.* 111:1-61.

Robin, S. G., Whittick, A. 1987. **Introduction to phycology.** Blackwell Scientific publications. Great Britain. 174-182 p.

Robinson, W. J. 1974. **Principios de análisis instrumental.** Acribia. Zaragoza, España. 357 pp.

Roset, J., Aguayo S. Muñoz M. J. 2001. **Detección de cianobacterias y sus toxinas. Una revisión.** *Rev. Toxicol.* 18: 65-71.

Sato, N., Murata, N. 1988. **Membrane lipids.** *Methods Enzymol.* 167:251-259.

Scagel, R. F., Rouse G. E., Stein J. R., Bandoni R. J., Shofield W. B., Taylor T. M. C. 1980. **El Reino Vegetal. Los grupos de las plantas y sus relaciones evolutivas.** Tercera edición. Omega, S.A. Barcelona. 659 pp.

Scout, P. W. R. 1995. **Techniques and Practice of Chromatography.** Ed. Marcel Dekker. E.U.A. 387pp.

Singh S., Sinha R., Hädert D. 2002. **Role of Lipids and Fatty Acids in Stress Tolerance in Cyanobacteria.** *Acta Protozool.* 41: 297 – 308

- Stanier, R. Y., Cohen-Bazire, G. 1977. **Phototrophic prokaryotes: The Cyanobacteria.** *Ann. Rev. Microbiol.* 31:225-274.
- Streble, H. K. 1987. **Atlas de los Microorganismos de Agua Dulce.** Omega. 330 pp.
- Vargas, M. A., Rodríguez, H., Moreno, J., Olivares, H., Del Campo, J. A., Rivas, J., Guerrero, M. G. 1998. **Biochemical composition and fatty acid content of filamentous nitrogen-fixing cyanobacteria.** *J. Phycol.* 34:812-817.
- Voet, D., Voet, J. 1995. **Biochemistry.** Segunda edición. Jhon Wiley & Sons, Inc. Canada. 277-329.
- Welch, D. F. 1991. **Applications of Cellular Fatty Acid Analysis.** *Clin. Microbiol. Rev.* 4(4):422-438.
- Willard, H. H., Merrit, L. L., Dean, J. A. 1991. **Métodos instrumentales de análisis.** Primera edición. Iberoamericana. México. 879 pp.
- Zajic, J. E. 1970. **Properties and Products of Algae.** Plenum Press. New York. Library of congress catalog. 115-127.