

**EVALUACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN ESPECIES DE *Aspergillus sp* COMO
CRITERIO TAXONÓMICO.**

Informe final

**Investigador principal: Rubén Darío Torrenegra G.
Otros Investigadores: Ludis Samira Rueda Blanco
Convenio N°: 082-2003**

**GIFUJ - GIBUJ
GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN FITOQUÍMICA Y BIOTRANSFORMACION
UNIVERSIDAD JAVERIANA**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
Abril 2005**

TABLA DE CONTENIDO

INFORME	Página
1. Objetivos y logros	3
1.1 Objetivos	3
1.2 Logros	3
2. Metodología	4
3. Resultados	5
4. Discusión de Resultados	7
5. Conclusiones	9
6. Aplicación de los Resultados	10
7. Impactos	11
8. Planes de Divulgación	11
9. Planes de Socialización	11

ANEXOS

Anexo 1	Descripción Macroscópica y Microscópica de las especies identificadas.
Anexo 2	Tabla 2. Descripción cultivos líquidos.
Anexo 3	Tabla 3. Promedio de lípidos totales.
	Tabla 4. Comparación de los métodos de extracción en peso seco y húmedo.
Anexo 4	Tabla 6. Cuadro comparativo de los perfiles de ácidos grasos de <i>Aspergillus</i> .

REFERENCIAS

EVALUACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN ESPECIES DE *Aspergillus sp* COMO CRITERIO TAXONÓMICO.

Título del Proyecto: Evaluación de ácidos grasos en especies de *Aspergillus sp* como marcador bioquímico y taxonómico.

Investigador principal: Rubén Darío Torrenegra G.

Otros Investigadores en el Proyecto: Ludis Samira Rueda Blanco.

Grupo de Investigación: Grupo de investigación en Fitoquímica y Biotransformación de la Pontificia Universidad Javeriana.

Facultad: Facultad de Ciencias.

Departamento: Departamento de Química.

1. OBJETIVOS Y LOGROS

Indique cuáles fueron los objetivos de la investigación y que tanto se lograron.

1.1 Objetivos

El objetivo principal de este proyecto consistió en obtener los perfiles de ácidos grasos de once cepas de *Aspergillus sp* aisladas de suelo del páramo de Guasca (Cundinamarca) y diferenciar sobre esta base bioquímica su taxonomía.

Los objetivos específicos que se desarrollaron fueron los siguientes:

Activación de once cepas nativas de *Aspergillus spp*, obtenidas de la colección de hongos del Páramo de Guasca, del Grupo de Investigación en Biotransformación de la Universidad Javeriana (GIBUJ).

Identificación y preservación de las especies de *Aspergillus spp* codificados así: SPG 5, SPG 7, SPG 17, SPG 62, SPG 13, SPG 26, SPG 40, SPG 19, SPG 32, EK 5 y EB 19.4.

Obtención bajo condiciones de cultivo estables, biomasa fúngica para la extracción y purificación de ésteres metílicos de ácidos grasos.

Análisis de los perfiles de ácidos grasos por Cromatografía de Gases y comparación cualitativa entre las especies identificadas, sobre esta base bioquímica.

1.2 Logros

Mediante el uso de claves taxonómicas y las observaciones realizadas, tanto macroscópicamente como microscópicamente de cada una de las cepas permitieron dar una aproximación a la identificación, sobre la base morfológica de las especies estudiadas.

Se aplicaron los métodos de conservación en suelo estéril, agua destilada y aceite mineral para cada una de las cepas, evaluando la viabilidad en cada uno de los métodos, asegurando

así, la colección de hongos aislados del páramo de Guasca del Grupo de investigación (GIBUJ).

Se realizaron los análisis cromatográficos de cada una de las cepas y se identificaron seis tipos de ácidos grasos, mediante el uso de patrones estándar y 16 por sus tiempos de retención.

En el análisis de los perfiles de ácidos grasos se obtuvieron diferencias y similitudes entre las especies analizadas corroborando la utilidad de los resultados

2. METODOLOGÍA

¿Qué metodología se empleó?, ¿Se ajusta a lo propuesto?

La metodología empleada en la identificación de las cepas analizadas, se basó en las técnicas de identificación morfológica tradicional, mediante el uso de diferentes claves taxonómicas para el género *Aspergillus* como Raper & Fennell (1965), Samson & Pitt (1990) y Samson & Hoekstra (2000) ayudado de técnicas micrométricas para la medición de estructuras típicas diferenciales en el género.

Los aspectos que se tuvieron en cuenta para la identificación de las especies, a nivel macroscópico fueron: el color, aspecto, textura, producción de exudados, pigmentos y crecimiento radial de las colonias en diferentes medios de cultivo: agar papa dextrosa, Malta y Czapeck.

Para el análisis microscópico se tomaron fotografías en 10x, 40x y 100x de las estructuras típicas de *Aspergillus* con azul de lactofenol; para luego realizar las mediciones y descripciones de cada especie, teniendo en cuenta, la disposición y dimensión del conidioforo, color, forma y textura de las esporas, presencia o ausencia de células en forma de nuez.

La metodología empleada en la obtención de los perfiles de ácidos grasos se basó en la técnica de Sthall (1996); con algunas modificaciones debido a los recursos físicos disponibles:

Se realizaron cultivos líquidos de cada una de las once cepas, en caldo papa sacarosa por triplicado (200 ml - 400 ml), durante 6 días a 150 rpm con una temperatura promedio de 23 a 25°C, con el fin de recuperar por filtración al vacío, 2 gramos de biomasa fúngica.

La extracción lipídica se realizó por maceración del micelio obtenido, tanto para las muestras en peso húmedo como en peso seco, con cloroformo – hexano 3:1 y posteriormente sometidas a saponificación, en un sistema Quifick en calentamiento con NaOH al 15% en MeOH al 50%; seguido por la esterificación de los ácidos grasos liberados, con la adición de una solución al 54% de HCl 6N en MeOH.

Los ésteres metílicos de ácidos grasos se recuperaron en *éter-metil-terbutílico*; y se analizaron en un cromatógrafo de gases acoplado a un instrumento VARIANT®, en una columna de 30 m x 0.3 mm con un detector de ionización de llama (FID).

Los ácidos grasos fueron identificados con base a sus tiempos de retención relativos, comparados con los patrones estándar disponibles; aplicando un tiempo de corrida de 35 minutos por muestra, con una temperatura inicial de 40°C y una final de 220 °C, en el inyector 250°C y en el detector 280°C.

3. RESULTADOS

Discuta los resultados en términos de que aportes nuevos hacen al conocimiento, a la solución del problema planteado y a la pregunta de la investigación.

Los resultados obtenidos tanto de las identificaciones por claves taxonómicas como las obtenidas en los análisis de los perfiles de ácidos grasos, permitieron aclarar dudas acerca de si estos métodos empleados actualmente para la identificación y diferenciación de hongos eran útiles en los estudios taxonómicos y filogenéticos o si realmente contribuían de alguna forma en otras aplicaciones a nivel clínico, fitopatológico, biodeterioro, biotecnología y estudios ambientales.

Mediante en uso de las claves taxonómicas y teniendo en cuenta las características morfológicas observadas para el género *Aspergillus* se identificaron las especies descritas en la Tabla 1 y en el Anexo 1.

Cepas de *Aspergillus* Identificadas

Nº	Especie	Código
1	<i>A. fumigatus</i>	SPG 5
2	<i>A. tamaraii</i>	SPG 13
3	<i>A. versicolor</i>	EK 5
4	<i>A. fumigatus</i>	SPG 17
5	<i>A. ochraceus</i>	SPG 62
6	<i>A terreus</i>	SPG 26
7	<i>A. niger</i>	SPG 7
8	<i>A. flavus</i>	SPG 32
9	<i>A. nidulans</i>	SPG 19
10	<i>A. niger</i>	EB 19,4
11	<i>A. oryzae</i>	SPG 40

Tabla 1. Identificación por claves taxonómicas. SPG (Suelo Páramo de Guasca), EB (*Espeletia barclayana*), EK (*Espeletia killipi*).

Además, se realizaron observaciones de los cultivos líquidos, de cada una de las cepas con el fin de distinguir aspectos relevantes que ayudaran a la identificación de las especies. Se determinó que la formación de *pellets*, variaba entre 1 y 7 mm de diámetro con superficies lisas en general y algunas de aspecto filamento; presentando colores variables desde tonos negros, amarillos y verdes a medida que esporulaban. La mayor recuperación de biomasa se obtuvo de *A. niger* (SPG 7) y *A. versicolor* (EK 5) con un total de 38.7 g y 27.3g respectivamente en 400 ml de caldo papa sacarosa.

Los datos se relacionan en la Tabla 2 (Anexo 2).

Se analizaron y se compararon los lípidos totales de 5 especies. Como resultado se obtuvo que el promedio extraíble era de 0.02 g para las cepas analizadas.

Los valores se describen en la Tabla 3 (Anexo 3).

La extracción de ácidos grasos se realizó con la biomasa fúngica en peso húmedo para el total de las especies, sin embargo se hicieron extracciones de 4 cepas en peso seco, con el fin de observar las diferencias. El análisis demostró que el porcentaje de recuperación de ácidos grasos en peso húmedo era del 44% y en peso seco del 56%.

Los datos se describen en la Tabla 4 (Anexo 3).

ANALISIS		METODO		
Total de ácidos grasos separados*		Ps	Ph	Total
SPG 32	<i>A. flavus</i>	8	5	
SPG 19	<i>A. nidulans</i>	8	9	
EB 19,4	<i>A. niger</i>	4	3	
SPG 40	<i>A. oryzae</i>	8	5	
Total de a.g x método		28	22	50
% de á.g recuperado x método		56%	44%	100%

Tabla 5. Porcentaje de ácidos grasos recuperados por método Ps (peso seco) Ph (Peso húmedo).

Con base en los datos obtenidos en la Tabla 6 (Anexo 4) donde se describen los ácidos grasos identificados, tiempos de retención y porcentajes relativos de cada una de las especies; se determinaron los porcentajes de incidencia tanto de los ácidos grasos en el total de las cepas, como la incidencia de los ácidos grasos por especie; a fin de establecer tanto el tipo de ácido graso más frecuente en el total de las cepas, como la especie con el mayor número de ácidos grasos identificados y el % relativo de ácidos grasos predominante en el total de las cepas.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Análisis de ácidos grasos por especie				
N°	Especie	Código	N° Age	%Iage
1	<i>A. tamarii</i>	SPG 13	11	14,8
2	<i>A. fumigatus</i>	SPG 5	10	13,5
3	<i>A. nidulans</i>	SPG 19	9	12,1
4	<i>A. terreus</i>	SPG 26	9	12,1
5	<i>A. ochraceus</i>	SPG 62	8	10,8
6	<i>A. versicolor</i>	EK 5	5	6,7
7	<i>A. fumigatus</i>	SPG 17	5	6,7
8	<i>A. flavus</i>	SPG 32	5	6,7
9	<i>A. oryzae</i>	SPG 40	5	6,7
10	<i>A. niger</i>	SPG 7	4	5,4
11	<i>A. niger</i>	EB 19,4	3	4
Total			74	99,5

Tabla 7. N° Age: Total de ácidos grasos en cada especie.

%Iage: Porcentaje de incidencia con respecto al número de ácidos grasos por especie, en relación con el número total de ácidos grasos obtenidos.

En la tabla Tabla 7 se observa que *A. tamarii* (SPG 13) es la cepa con mayor número de ácidos grasos identificados, representando el 14.8%, seguido de *A. fumigatus* (SPG 5) con el 13.5 %, *A. nidulans* (SPG 19) y *A. terreus* (SPG 26) con el 12.1%.

En la Tabla 8 y 9 (Anexo 5) se calcularon los porcentajes de incidencia tanto de los ácidos grasos identificados como de los porcentajes relativos obtenidos bajo las condiciones y parámetros establecidos en las cepas analizadas.

El ácido graso con mayor incidencia fue el Oléico con un porcentaje del 13.5%, seguido de Palmítico con un 9.4%, Behénico, 20.56, 27.89, 28.85 y Araquídico con un 6.7% y Esteárico y Linoléico con un 5.4 %; el resto representan valores < 4%.

El ácido graso con el mayor porcentaje relativo presente en las once cepas analizadas fue el ácido Oléico con un 29.4%, seguido del 20.56 con un 12.9%, luego el Linoléico con 10.9%, Palmítico con 7.7% y 28.85 con el 7.5%, el resto representan valores < 7%.

4. DISCUSION DE RESULTADOS

Discuta los resultados a la luz de los siguientes aspectos: Concordancia de los resultados con lo esperado y con los hallazgos previos a la literatura. Si hay divergencia con los hallazgos previos en la literatura, discuta y explique.

La taxonomía fúngica es dinámica y progresiva, variando de un autor a otro; de allí que la clave de una buena identificación morfológica radica principalmente en el material bibliográfico empleado para dicha identificación.

Las características de las especies coincidieron con lo descrito por Samson & Hoekstra (2000), para las secciones *Circumdanti* (*A. flavus*, *A. niger*, *A. tamarii*, *A. ochraceus* y *A. oryzae*), *Fumigati* (*A. fumigatus*) y *Nidulantes* (*A. nidulans*, *A. versicolor*, *A. terreus*).

La estabilidad de las cepas permitió que la identificación fuera más confiable ya que algunos géneros y especies son más sensibles a variaciones por factores medioambientales; característica que coincide con lo expuesto por Smith (1963) al considerar dentro del género especies verdaderas con morfologías definidas y poco variables. En contraste, se determinó que la cepa SPG 19 - *A. nidulans* es susceptible a cambios pleomórficos ya que se evidenció en la formación de estructuras atípicas de las especie y variación en el aspecto macroscópico, a pesar de trabajar con cepas obtenidas de cultivos madres y axénicos. Las cepas de *Aspergillus* analizadas fueron obtenidas de Páramo por Chitiva & Cabrera (2001) demostrando una vez más, la ubicuidad de este género y su capacidad de crecer a diferentes temperaturas sobre sustratos con diverso contenido de humedad.

La cantidad de lípidos totales obtenidos en las muestras analizadas no presentaron variaciones significativas, lo que demuestra que el método de extracción es reproducible bajo las condiciones utilizadas.

Los ácidos grasos que se obtienen a partir de una muestra en peso seco y peso húmedo son considerables, ya que se pueden extraer diferentes ácidos grasos y en diferente porcentaje, aunque las condiciones de cultivo sean las mismas para ambas muestras.

Por esta razón los resultados de los análisis de ácidos grasos tienden a ser específicos en relación a las condiciones establecidas, tanto del cultivo, como del método de extracción y de la cromatografía. Valcárcel (1988).

Con base en los resultados obtenidos en el análisis estadístico de los ácidos grasos identificados, se observó que el ácido Oléico es representativo en todas las cepas, siendo su porcentaje relativo es el mas alto, a excepción la especie *terreus* que no presentó este ácido graso. Característica que la diferencia de las demás especies analizadas.

El ácido graso con tr: 20.56, presentó un porcentaje relativo alto, y una incidencia media que sugiere su importancia dentro de este género, en especial en las especies de *A. fumigatus* (SPG 5), *A. versicolor* (EK5), *A. flavus* (SPG 32), *A. nidulans* (SPG 19) y *A. oryzae* (SPG 40).

El ácido Palmítico incidió en la mayoría de las especies menos en las cepas de *A. tamaritii* (SPG 13), *A. ochraceus* (SPG 62), *A. flavus* (SPG 32), *A. oryzae* (SPG 40) pertenecientes a la sección *Circumdati* y *A. terreus* (SPG 26) de la sección *Nidulantes*. Samson & H. (2000).

El ácido Behénico aunque presentó una incidencia del 8.1 % reportó un bajo porcentaje relativo en las especies que lo presentaron: *A. tamaritii* (SPG 13), *A. versicolor* (EK 5), *A. ochraceus* (SPG 62), *A. terreus* (SPG 26), *A. flavus* (SPG 32) y *A. oryzae* (SPG 40).

El ácido Linoleico se halló con un porcentaje relativo alto (10.9%), pero una incidencia baja para el total de especies. Solo lo presentan en mayor proporción *A. fumigatus* (SPG 17), *A. ochraceus* (SPG 62), *A. niger* (SPG 7) y *A. niger* (EB 19.4).

Las cepas SPG 5 y SPG 17 se identificaron como pertenecientes a la especie *fumigatus* con algunas diferencias, tanto en el contenido de ácidos grasos, como en las características microscópicas. En cuanto al contenido de ácidos grasos, las cepas coincidieron en tipo y % relativo aproximado en los ácidos Palmítico, Esteárico, Oleico, Linoléico y Araquídico y se diferenciaron, debido a que la cepa SPG 5 presentó un ácido con tr: 18.1 / 2.35% y 4 ácidos más con tiempos de retención de 25 a 28; con porcentajes del 3 al 7%.

Aunque las cepas SPG 7 y EB 19.4 se identificaron como pertenecientes a la especie *niger* presentaron diferencias a nivel microscópico; sobre todo la cepa SPG 7 que es muy similar a la especie *tamarii*, sin embargo el análisis de ácidos grasos corroboró que pertenece a la especie *niger*, ya que se identificó la presencia de los mismos ácidos grasos y sus porcentajes relativos fueron similares; excepto por la presencia de ácido Esteárico en la cepa SPG 7 con un 9.8%.

Sobre esta base bioquímica se pueden establecer diferencias específicas y generales entre las especies analizadas, esto conlleva a buscar las posibles relaciones filogenéticas y taxonómicas con ayuda de las claves morfológicas convencionales complementado con estudios de metabolitos secundarios y técnicas moleculares entre otros.

Sin duda alguna los esfuerzos por identificar especies fúngicas son valiosos pero a la vez dispendiosos; ya que requieren de la implementación de bases de datos que disminuyan el margen de error en las identificaciones realizadas. Guarro (1999).

5. CONCLUSIONES

Resuma las conclusiones derivadas de los hallazgos de esta investigación

Las cepas SPG 5 y SPG 17 coinciden con las claves taxonómicas con *A. fumigatus*, SPG 13 con *A. tamarii*, EK 5 con *A. versicolor*, SPG 62 con *A. ochraceus*, SPG 26 con *A. terreus*, SPG 32 con *A. flavus*, SPG 19 con *A. nidulans*, SPG 7 y EB 19.4 con *A. niger* y SPG 40 con *A. oryzae*.

El promedio de lípidos totales extraíbles con cloroformo – hexano 3: 1, de 2 g de biomasa fúngica de *Aspergillus spp* es de 0.02 g.

La recuperación en el número de ácidos grasos mediante la extracción por peso seco es mayor que en peso húmedo, aunque los porcentajes relativos pueden variar.

El ácido graso con mayor porcentaje de incidencia y porcentaje relativo fue el Oléico con un 13.5% y un 29.4% respectivamente en las once cepas analizadas.

El ácido Palmítico no está presente en *A. tamarii* (SPG 13), *A. ochraceus* (SPG 62), *A. flavus* (SPG 32), *A. oryzae* (SPG 40) y *A. terreus* (SPG 26).

La cepa SPG 26 identificada como *A. terreus* no presentó ácido Oléico, predominante en el género, tampoco presentó ácido Palmítico pero sí Behénico y 7 ácidos grasos más presentes en el resto de las cepas; como ácidos específicos presentó tr: 20.86 con un 1.87 % relativo y tr: 28.04 con un 14.1 % relativo.

Las cepas que presentaron ácidos grasos específicos además de *A. terreus* fueron *A. fumigatus* SPG 5 (tr: 27.5 / 6.56%) y *A. tamarii* SPG 13 (tr: 25.95 / 0.59 % y tr: 27.68 / 11.35%).

Se corroboró mediante el análisis de ácidos grasos que las cepas SPG 5 y SPG 17 pertenecen a la especie *fumigatus* por sus similitudes, pero también se obtuvieron diferencias que hacen específicas las características entre una cepa y otra.

Se corroboró que la cepa SPG 7 y EB 19.4 pertenecen a la especie *niger*, al comparar la presencia de los mismos ácidos grasos y porcentajes relativos similares; excepto por el ácido Esteárico específico en la cepa SPG 7 con un 9.8%.

Los resultados de los análisis de ácidos grasos son específicos, en relación a las condiciones establecidas en el cultivo, método de extracción y cromatografía.

La identificación de hongos por análisis de ácidos grasos es una herramienta que permite diferenciarlos sobre esta base y establecer relaciones taxonómicas.

6. APLICACIÓN DE RESULTADOS

Indique si los resultados tendrían alguna posible aplicación.

Aunque existe un especial interés por el estudio de la micro- biodiversidad, en diferentes ambientes; a veces se agotan esfuerzos en los aislamientos de dichos microorganismos y algunos, lastimosamente, se quedan en la mitad del camino debido a la falta de conocimiento taxonómico, al manejo y a la conservación de las especies aisladas.

La identificación de hongos y bacterias por análisis de ácidos grasos se ha utilizado como una herramienta bioquímica (marcador) que permite diferenciarlos sobre esta base, y permite además, establecer relaciones taxonómicas y metabólicas; dadas por sus interacciones medioambientales. También se han utilizado como indicadores, de la presencia o abundancia relativa de comunidades microbianas; como las que intervienen en la mineralización de suelos, ambientes marinos, compostaje, entre otros. Shiosaki (2001), Romano (2000), Rajendran (1994), Frostegard (1993).

Los resultados obtenidos se aplican no solo al estudio taxonómico del género *Aspergillus* sino que permiten ser implementados en todo tipo de hongos.

Además, el análisis de ácidos grasos tiene la ventaja de ser un proceso de bajo costo y la identificación requiere de un menor tiempo; si se compara con técnicas de DNA, esto abre la posibilidad que sobre esta técnica se amplíen las bases de datos de hongos identificados en diferentes ambientes en un menor tiempo posible.

7. IMPACTOS

Indique si considera que los resultados podrían tener algún impacto sobre políticas.

El impacto de este trabajo se refleja en el interés que hay sobre el conocimiento, conservación y uso de la biodiversidad. Enmarcado en los compromisos adquiridos por

Colombia en el marco del Convenio sobre Diversidad Biológica de las Naciones Unidas (Ley 165 de 1994), al igual que dentro del desarrollo de la Política Nacional de Biodiversidad abanderado por el Instituto Alexander von Humbolt.

8. PLANES DE DIVULGACIÓN Y SOCIALIZACIÓN

Teniendo en cuenta lo comprometido en la propuesta, cuáles son sus planes de divulgación.

Con base en los resultados obtenidos se elaborarán dos artículos, uno donde se describan las cepas identificadas morfológicamente; como una contribución en la identificación de especies nativas de Páramo Colombiano y otro donde se describa el resultado de la identificación de ácidos grasos y su utilidad como marcador bioquímico en la taxonomía de hongos. Estos escritos serán publicados en revistas indexadas y expuestos en Congresos de Microbiología y Química con el apoyo del Grupo de Investigación.

REFERENCIAS

- SAMSOM; H. Introduction to Food – and Airborne. Fungi. Sixt. Edition, Ponsen & Looyen, Netherlands. 2000.
- SMITH G. Introducción a la Micología Industrial. Ed. Acribia, Zaragoza. España.1963.
- SAMSON, PITT. Modern Concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* Classification. Vol. 185. Plenum Press. New York and London.1990.
- KENNETH B. RAPER. The genus *Aspergillus*. Ed. The William & Wiking. Baltimore.1965.
- CHITIVA, C. Aislamiento e Identificación de Hongos Filamentosos del Suelo del Páramo de Guasca (Colombia) en zona de vegetación de Frailejones. Tesis Departamento de Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana. 2001.
- GUARRO, J. Developments in Fungal Taxonomy. Clinical Microbiology. American Society for Microbiology. Jul 1999, p. 454 -500.
- CARRILLO L. Los hongos de los Alimentos y Forrajes.Revisión en Internet: www.unsa.edu.ar/matbit/hongos/04htextoaspergillus.pdf.
- STAHL, P. D. & K. Characterization and Differentiation of Filamentous Fungi based on fatty acid composition. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 62, no 11 Nov.1996; p. 4136-4146.
- SHIOSAKI, K. R. Biochemical Markers in Taxonomy of the genus *Cunninghamella*. Revista Iberoamericana de Micología, Vol. 18, 2001; p. 123-127.
- FROSTEGARD, A. Phospholipid Fatty Acid Composition, Biomass, and Activity of Microbial Communities from Two Soil Types Experimentally Exposed to Different Heavy Metals. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 59, no 11 Nov.1993; p. 3605-3617.

- RAJENDRAN, N. Characterization of Microbial Community Structure in the Surface Sediment of Osaka Bay, Japan, by Phospholipids Fatty Acid Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 60, no 1 Jan.1994; p. 248-257.
- ROMANO, I. Lipid profile: a useful chemotaxonomy marker for classification of a new cyanobacterium in *Spirulina* genus. *Phytochemistry*, Vol 54, 2000; p. 289-294.
- BIOSINTESIS. Instituto de Investigación de recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Boletín N° 28, Marzo 2001, ISSN-0123-7896.