



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Análisis estacional de la composición de cianoprocariontes en el lago de
Zumpango y su relación con la presencia de microcistina LR**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

RAQUEL ORTIZ FERNÁNDEZ



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. ROSALUZ TAVERA SIERRA
2013**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Hoja de datos de jurado

1. Datos del alumno

Ortiz
Fernández
Raquel
57 43 24 74
Universidad Nacional Autónoma de México
México
Facultad de Ciencias
Biología
303148560

2. Datos del tutor

Dra.
Rosaluz
Tavera
Sierra

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Claudia Alejandra
Ponce de León
Hill

4. Datos del sinodal 2

M. en C.
Lucía del Carmen
Márquez
Alonso

5. Datos del sinodal 3

Dr.
Jesús
Ramírez
Santos

6. Datos del sinodal 4

Dr.
Ricardo
Reyes
Chilpa

7. Datos del trabajo escrito

Análisis estacional de la composición de cianoprocariontes en el lago de Zumpango y su relación con la presencia de microcistina LR
84 p
2013

Agradecimientos

A mi mamá y papá porque me han dado todo, me han impulsado a seguir adelante, enseñado y aconsejado.

A Fer y Pao, gracias por ayudarme y animarme siempre que lo necesité, espero que sigamos juntas aprendiendo, disfrutando. A Leticia Fernández, por el apoyo tanto personal como académico.

A la Dra. Rosaluz Tavera Sierra gracias por la paciencia, disposición, múltiples pláticas, y el conocimiento transmitido para la realización de este trabajo, sin ella este trabajo no hubiera sido posible. Al Dr. Eberto Novelo Maldonado, M. en C. Guadalupe Vidal Gaona por las enseñanzas que me han dado desde mi inicio en el taller.

A Martha, por el apoyo en el trabajo, experiencias y conocimientos que compartimos para el desarrollo del método en el instituto de química. A los compañeros del laboratorio por compartir día a día los logros y experiencias en el desarrollo de nuestro trabajo.

A mi papá y Leonardo Zamora Cuéllar por la ayuda en las recolecciones.

En el Instituto de química, al Dr. Ricardo Reyes Chilpa por su apoyo para el inicio de la parte de química del trabajo; a la M. en C. Carmen Márquez Alonso por la enseñanza y paciencia que nos dio durante el desarrollo del método en el Laboratorio de cromatografía; M. en C. Jorge Cárdenas y a la Dra. Patricia Cano por el apoyo con el equipo que se utilizó durante el trabajo.

A la Dra. Claudia Ponce de León Hill, M. en C. Carmen Márquez Alonso, Dr. Jesús Ramírez Santos, Dr. Ricardo Reyes Chilpa por los comentarios que ayudaron a mejorar el trabajo.

Índice

Resumen	7
Introducción	8
1. Eutrofización y florecimientos algales nocivos.....	8
2. Importancia de estudio del florecimiento del lago de Zumpango y su producción de microcistina LR.....	10
Antecedentes	11
Objetivo general	13
Objetivos particulares	13
Área de estudio	14
1. Ubicación	14
2. Clima.....	14
3. Hidrología	14
4. Vegetación.....	14
5. Geología.....	15
6. “Proyecto ecoturístico del Lago de Zumpango”	15
Materiales y métodos	16
1. Recolecta en el lago de Zumpango, Estado de México.....	16
2. Identificación de especies y conteo celular	18
3. Conteo celular	19
4. Cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas por ionización por electrospray (CLAE/ESI-EM)	19
a. Cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE)	19
b. Espectrometría de masas (EM)	20
c. Curva de calibración.....	20
5. Extracción, detección y cuantificación de MC-LR del lago de Zumpango	20
a. Método e extracción de MC-LR.....	21
b. Detección y cuantificación de MC-LR intracelular	22
6. Análisis de regresión entre la cantidad de MC-LR cuantificada y la densidad celular del florecimiento	22
Resultados	23
1. Factores fisicoquímicos de las recolecciones en el lago de Zumpango	23
a. Factores fisicoquímicos de la recolección de octubre	23
b. Factores fisicoquímicos de la recolección de marzo.....	23
2. Descripción de especies del florecimiento de cianoprocariontes del lago de Zumpango	24

3. Densidad celular del florecimiento del lago de Zumpango	29
a. Densidad celular del muestreo de octubre de 2010	29
b. Densidad celular del muestreo de marzo de 2010	30
4. Curva de calibración de la MC-LR para cuantificar la toxina en las muestras del florecimiento del lago de Zumpango	33
5. Detección y cuantificación de MC-LR en el lago de Zumpango.....	36
a. Cuantificación de la MC-LR en octubre de 2010	36
6. Correlación entre MC-LR y densidad celular de cianoprocariontes del florecimiento del lago de Zumpango	41
a. Correlación entre la densidad celular de <i>Microcystis aeruginosa</i> y MC-LR.....	41
b. Correlación entre la densidad celular de <i>P. cf. isothrix</i> y MC-LR	43
Discusión	46
1. Resultados del análisis en función de la composición de cianoprocariontes del florecimiento del lago de Zumpango	46
2. Resultados del análisis en función de las densidades de especies de <i>Microcystis</i> en el lago de Zumpango.....	47
3. Análisis de regresión entre MC-LR con la densidad celular de <i>Microcystis aeruginosa</i> , <i>M. flos-aquae</i> y <i>P. cf. isothrix</i>	48
Conclusiones	50
Referencias.....	51
Apéndice 1.....	60
Apéndice 2.....	67
Apéndice 3.....	70
Apéndice 4.....	72
Apéndice 5.....	77
Apéndice 6.....	78
Apéndice 7.....	79
Apéndice 8.....	83

Resumen

En el presente estudio se determinó la concentración intracelular de MC-LR de *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis flos-aquae* y *Planktothrix* cf. *isothrix*, por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas por ionización con electrospray (CLAE- EM/ESI). Se hizo un análisis de correlación entre la densidad de las especies y la cantidad de microcistina LR cuantificada en cada punto de muestreo. Dada la naturaleza estadística de esta investigación y en tanto que el análisis se centró en el nivel de significación, la explicación biológica en el caso de aceptar la hipótesis nula se enfocó en que la producción de toxina puede ser variable en el tiempo o puede no ser producida por alguna de las especies que componen el florecimiento.

Una motivación central fue averiguar si existe una posible relación entre la concentración de la toxina y alguna de las especies y en qué medida esta relación puede ser confiable en términos predictivos. El objetivo fue proponer un método de aproximación (proxy) para detectar de forma rápida y confiable el estado de un florecimiento formado por cianoprocariontes, que sirva como base de medidas preventivas inmediatas.

El lago de Zumpango ubicado entre los municipios de Zumpango y Teoloyucan del Estado de México, es un cuerpo de agua que muestra deterioro ecológico debido a los episodios de desecación que ha tenido, su relleno con aguas residuales y al uso poco controlado que tiene actualmente como zona de recreación y de pesca. Esto ha derivado en la eutrofización del agua y como consecuencia el desarrollo de un florecimiento de cianoprocariontes que puede ser tóxico.

La distribución tan irregular de las especies y sus densidades poblacionales en los puntos de muestreo mostraron descripciones de orden polinomial y concluimos que la distribución irregular del florecimiento en el cuerpo de agua afectará la evaluación de la concentración de microcistina LR, sin embargo, se reforzó el planteamiento de la utilización de la densidad como un proxy, resaltando la necesidad de un número de muestreos elevado para obtener representatividad de resultados.

Introducción

1. Eutrofización y florecimientos

La eutrofización de los cuerpos de agua dulce es un proceso natural, pero se ha acelerado o aumentado por los nutrientes y desechos antropogénicos que causan un enriquecimiento artificial principalmente en compuestos nitrogenados y fosfatados (Dokulil & Teubner, 2000; Lucena, 2008). La eutrofización sucede frecuentemente en regiones donde hay urbanización descontrolada alrededor de los cuerpos de agua, descargas de agua tratada, fertilizantes y desechos de industrias como la agricultura o la acuicultura (Costa *et al.*, 2006).

Uno de los síntomas más prominentes que se genera debido a la eutrofización del agua, es el desarrollo de altas densidades de cianoprocariontes que pueden ser tóxicas, por lo que el florecimiento se denomina florecimiento algal nocivo (Harmful algal blooms, HABs, por sus siglas en inglés) (Azevedo *et al.*, 2002; Park, *et al.* 1998). La dominancia permanente de estas cianoprocariontes en los cuerpos de agua es un desenlace del proceso de eutrofización (Dokulil & Teubner, 2000). De acuerdo con Heisler *et al.* (2008) los florecimientos se definen como especies potencialmente tóxicas que producen gran cantidad de biomasa, causando hipoxia, anoxia y mortalidad de la vida en el agua después de alcanzar concentraciones muy altas. Las características de un florecimiento pueden ser olor y sabor desagradables, formación de espumas, pérdida de biodiversidad, reducción de la transparencia, producción primaria elevada y disminución de oxígeno que puede dar como resultado la muerte masiva de peces. Dichos organismos formadores de florecimientos se desarrollan generalmente a temperaturas de entre 22-25 °C, pH de valores neutros a alcalinos y altos niveles de nutrientes minerales (Dokulil & Teubner 2000; Rivasseau *et al.*, 1998). Debido a que los florecimientos se desarrollan en lagos eutróficos, se asumió que requerían altas concentraciones de nitrógeno y fósforo. La afinidad de muchas cianoprocariontes por el fósforo es más alta que para otros organismos y pueden consumirlo rápido y además tienen la capacidad de almacenarlo; este almacenamiento les permite realizar de dos a cuatro divisiones celulares, lo cual corresponde de 4-32 veces el incremento en la biomasa (Mur, *et al.*, 1999).

Los florecimientos, pueden estar formados por una o varias especies de cianoprocariontes cuyas poblaciones incluyen cepas que pueden o no producir toxinas, además algunas cepas

son más tóxicas que otras, por lo tanto si una cepa altamente tóxica está presente en el florecimiento, aunque no sea la especie dominante, el florecimiento es tóxico (Rinta-Kanto, *et al.*, 2009; Roset *et al.*, 2001; Sivonen & Jones 1999). Algunos de los géneros formadores de florecimientos y productores de toxinas son *Microcystis*, *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Nostoc*, *Planktothrix*, *Lynbya*, y *Cylindrospermopsis* (Dawson, 1998; Costa *et al.*, 2006; Lawton *et al.*, 1994).

En México existen cuerpos de agua naturales o artificiales, que además de ser utilizados por los habitantes del lugar (pesca, acuicultura, consumo), reciben gran afluencia turística (actividades recreativas y deportivas). En estos cuerpos de agua, los florecimientos permanentes de cianoprocariontes son comunes y representan un riesgo para la fauna acuática que los conforma, pero también para los visitantes y la población que desarrolla sus actividades cotidianas y que viven cerca de dichos cuerpos de agua. Se ha reportado la presencia de florecimientos de cianoprocariontes en lagos como: Alameda oriente, Chapultepec, Pátzcuaro, Pista de canotaje y Zumpango, en los cuales se han registrado especies de los géneros *Microcystis*, *Planktothrix*, *Anabaena*, y se han hecho estudios de cuantificación de cianotoxinas por cromatografía líquida, ELISA y bioensayos de toxicidad con *Daphnia magna* y ratones (Azrate *et al.*, 2010; Hitzfeld *et al.*, 2000; Vasconcelos *et al.*, 2010).

Se nombra cianotoxinas a las toxinas producidas por las cianoprocariontes formadoras de florecimientos y se dividen usualmente por su actividad biológica en hepatotoxinas y neurotoxinas (Carmichael, 1992) y por su estructura química en péptidos cíclicos y alcaloides. Las microcistinas son hepatotoxinas y tienen una distribución geográficamente amplia en cuerpos de agua dulce (Hitzfeld *et al.*, 2000). Estas toxinas, péptidos cíclicos no ribosomales, son metabolitos secundarios producto de la síntesis de pigmentos fotosintéticos y se liberan al agua hasta que hay muerte celular (Carmichael, 1992; Harada, 2004; Pearl & Millie, 1996).

Los florecimientos de cianoprocariontes son monitoreados usando medidas de biomasa. La identificación de las especies que los conforman, es requisito para determinar si se trata de especies productoras de toxinas, pero aún sin conocer a las especies, se pueden determinar

las toxinas presentes en el agua para saber si el florecimiento es capaz de producirlas. La concentración de clorofila *a* que se utiliza para determinar la biomasa algal, se ha utilizado también como una medida indirecta de la cantidad de microcistinas, debido a que éstas son metabolitos secundarios de la producción de fotopigmentos (ver Apéndice 1); en *Microcystis aeruginosa* Kützing (Figs. 4 y 5) pueden encontrarse en una proporción de 0.1 a 0.2 μg de microcistina por cada μg de clorofila *a* (Falconer *et al.*, 1999).

Dado que las microcistinas son producidas por cianoprocariontes que se encuentran en ambientes diversos, algunos autores sustentan que la producción de microcistinas y las cuotas celulares están influenciadas por factores abióticos como temperatura, irradianza, pH y nutrientes. Por lo tanto la producción de microcistinas es afectada indirectamente por estos factores ambientales, no solamente por la densidad celular (Halstvedt *et al.*, 2008; Long, *et al.* 2001; Millie *et al.*, 2009).

2. Importancia de estudio del florecimiento del lago de Zumpango y su producción de microcistina LR

De acuerdo con este marco teórico, en el lago de Zumpango se han observado las características que indican la presencia de un florecimiento de cianoprocariontes, como son: olor desagradable, coloración verde-azul del agua, muerte masiva de peces y formación de espuma. Durante este estudio se observó una notable acumulación de biomasa por acción del viento, en la costa. Los antecedentes de deterioro del lago de Zumpango (descarga de aguas residuales) han dado origen a la eutrofización y proliferación del florecimiento de cianoprocariontes mencionado y esto orientó nuestros objetivos para evaluar la peligrosidad potencial del florecimiento y cuantificar la microcistina LR (MC-LR), que es una de las cianotoxinas más comunes y tóxicas, así como caracterizar morfológicamente las especies y averiguar si todas ellas pueden ser productoras de MC-LR. Uno de los principales objetivos fue asociar la cantidad de toxina intracelular con la densidad poblacional de cada especie para establecer si se puede estimar la potencialidad del riesgo de intoxicación, a partir de las densidades de las poblaciones, lo que favorecería el desarrollo de monitoreos rápidos y económicos, comparados con la infraestructura y tiempo necesarios para las evaluaciones químicas.

Antecedentes

El Lago de Zumpango, es un cuerpo de agua continental que se ubica entre los municipios de Zumpango de Ocampo y Teoloyucan, Estado de México. Actualmente se considera un lago recreativo pero también es fuente de trabajo para algunos habitantes de la región, de manera que se desarrollan desde actividades como la pesca, hasta paseos en lancha y otras actividades recreativas. Es importante destacar que es uno de los lagos más estrechamente relacionados con actividades humanas pues el agua es utilizada para consumo del ganado y también sirve para el riego de las tierras de cultivo.

La profundidad promedio del lago es de tres metros, por lo que se considera un cuerpo de agua somero; es polimíctico porque la columna de agua tan somera favorece que se mezcle constantemente por acción del viento. La masa del agua es aportada por la lluvia que es llevada por el túnel emisor poniente y por aguas negras. Funciona como vaso regulador (Rivera *et al.*, 2005; Domínguez, 2006) y de almacenamiento con capacidad de $1 \times 10^8 \text{ m}^3$ de agua.

El mayor recurso natural del municipio es el agua que se deposita en el lago de Zumpango y es utilizada para el riego y la pesca por lo que los habitantes se dedican a la cría de peces introducidos, como la carpa plateada, carpa Israel y carpa espejo.

El lago de Zumpango ha tenido varios episodios de desecación. El primero ocurrió en 1982 con la finalidad de ampliar su capacidad de almacenamiento a 100 millones de m^3 , por acuerdo de un convenio firmado por la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH) y el gobierno del Estado de México. Para alcanzar el volumen de esta ampliación, se utilizó agua residual que provocó la proliferación de lirio acuático. Quince años más tarde, de 1997 a 1998 dio inicio un programa de saneamiento que desecó el lago por segunda ocasión para eliminar el lirio. El resultado a largo plazo ha sido el deterioro en la calidad del agua, incluyendo que al ser rellenado nuevamente, la maleza acuática volvió a proliferar (Domínguez, 2006).

En cuanto a los florecimientos de cianoprocariontes que acompañaron el deterioro de la calidad del agua, un antecedente reciente sobre la cuantificación de microcistinas en el lago

de Zumpango fue reportada por Vasconcelos *et al.* (2010). Estos autores utilizaron inmunoanálisis de adsorción enzimática (ELISA, por sus siglas en inglés) para cuantificar microcistinas en agua y para detectar algunas variantes intracelulares utilizaron ionización mediante desorción por láser asistida por matriz, con detector en tiempo de vuelo (MALDI-TOF, por sus siglas en inglés). En ese estudio se registró la presencia de especies tóxicas del género *Microcystis*; entre las variantes de microcistina que encontraron estuvieron la MC-LR, MC-RR y MC-WR. En la cuantificación que hicieron mediante la prueba ELISA, obtuvieron para el lago de Zumpango una concentración de $62.4 \mu\text{g MC-LR eq. L}^{-1}$, esta cantidad, comparada con los límites establecidos por OMS, está por arriba del límite propuesto para el consumo del agua, por lo tanto el florecimiento de cianoprocariontes del lago de Zumpango se debería considerar nocivo y como un riesgo para la fauna, flora, así como para la salud humana.

La importancia de este trabajo es la cuantificación intracelular de la microcistina LR, que es una de las microcistinas más comunes y tóxicas, estas cantidades intracelulares son las que potencialmente se pueden liberar al agua y son más importantes que las extracelulares. Las cantidades extracelulares que se pueden cuantificar, son las que se toman al momento del muestreo y ya que se degradan cuando son liberadas al agua, consideramos que es una cuantificación efímera (Falconer et al. 1999).

Objetivo general

Conocer la composición de especies y densidades poblacionales de cianoprocariontes del lago de Zumpango y medir la concentración intracelular de microcistina LR (MC-LR) por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas con ionización por electrospray (CLAE/ESI-EM), para asociar la cantidad de toxina intracelular con la densidad poblacional (organismos por litro) de cada especie y establecer si se puede estimar la potencialidad del riesgo de intoxicación, a partir de las densidades de las poblaciones.

Objetivos particulares

- Conocer la composición del florecimiento de cianoprocariontes del lago de Zumpango durante dos épocas e identificar a las especies dominantes.
- Cuantificar la concentración intracelular de microcistina LR extraída de algunas muestras del florecimiento.
- Relacionar los cambios en la cantidad de microcistina LR cuantificada, con los cambios en la composición del florecimiento que pudieran registrarse.
- Relacionar la concentración intracelular de toxina con el número de organismos por litro agua (densidad poblacional) de las especies de cianoprocariontes que componen el florecimiento.

Área de estudio

1. Ubicación

El lago de Zumpango se encuentra en el Estado de México entre los paralelos 19° 45' y 19° 50' de latitud norte y los meridianos 99° 45' y 19° 50' de longitud oeste, a una altitud de 2250 m.s.n.m. Mide 6.5 km de largo (norte a sur) y 4.5 km ancho (este a oeste), con una superficie de 1865 hectáreas. Ocupa el 1 % de la superficie del Estado de México (INEGI, 2005).

2. Clima

De acuerdo con los datos del INEGI, el clima del municipio de Zumpango de Ocampo es semiseco con lluvias en verano (59.41 %) y templado subhúmedo con lluvias en verano, de menos humedad (40.59 %). Porcentaje de lluvia invernal menor que el 5 % de la total anual. Tiene verano fresco largo, la temperatura media anual es de ente 12-18 °C, la temperatura media del mes más frío es de -3 a 18 °C y la temperatura media del mes más caliente es de 6.5 a 22 °C, con poca oscilación anual de las temperaturas medias mensuales (5 y 7 °C). Clima frío durante los meses de noviembre, diciembre, enero, febrero y marzo, la temperatura es cálida de abril a octubre (INEGI, 2005).

3. Hidrología

La precipitación pluvial anual es de 600 y 800 mm, registrándose la mayor precipitación pluvial en junio. De mayo a junio tienen lugar fuertes granizadas y ocasionalmente ocurren heladas en septiembre, diciembre, enero, febrero, marzo y excepcionalmente en abril (INEGI, 2005).

4. Vegetación

El 14.77 % de la vegetación es pastizal y el 1.91 % de matorral. La flora está conformada de *Opuntia vulgaris* (nopal), *Shinus molle* (pirul), *Cupressus* sp. (ciprés), *Fraxinus* sp. (fresno), *Quercus* sp. (encino), *Eucalyptus* sp. (eucaliptos), *Prunus virginiana* (capulín), *Crataegus pubescens* (tejocote), *Malus domestica* (manzano) y yerbas silvestres y de ornato (INEGI, 2005).

5. Geología

El 80 % del territorio del municipio de Zumpango es del periodo cuaternario, con sedimentos de aluvión y depósitos lacustres, por el norte del municipio hay dos tipos de rocas del periodo terciario y hacia la parte poniente se halla una zona de basaltos colorados, también del periodo terciario. El uso de suelo es en agricultura 60.23 % y zona urbana 17.42% (INEGI, 2005).

6. “Proyecto ecoturístico del Lago de Zumpango”

Este proyecto lo diseñaron el gobierno del Estado de México y el Ayuntamiento del municipio de Zumpango, con la finalidad de que el lago se considere de tipo ecoturístico, ya que se considera el más importante de la región y fue declarado como “Primer santuario del agua” en 2003. Algunos objetivos de este proyecto para la protección y aprovechamiento del área natural protegida son: mantener la capacidad de infiltración y retención de agua para las necesidades locales y regionales y disminuir la condición de contaminación del cuerpo de agua y escurrimientos, provenientes de aguas residuales domésticas y municipales no tratadas (H. Ayuntamiento de Zumpango, 2003).

Materiales y métodos

1. Recoleta en el lago de Zumpango, Estado de México

Las recolecciones de muestras del lago de Zumpango se hicieron en el mes de marzo y octubre (época de secas) de 2010 (Fig. 1), tomando diez sitios de muestreo (Fig.2). La distancia entre cada sitio de muestreo fue de 2-6 m. Los sitios de muestreo se distribuyeron de esta manera, porque fueron los lugares donde fue posible tener acceso a la orilla. Se contó con una muestra del lago, recolectada en septiembre de 2009, proporcionada por el Dr. R. Reyes Chilpa (Inst. de Química, UNAM), que fue utilizada como información adicional para determinar las especies de cianoprocariontes. No se incluyó en los análisis por discrepancia del método de recolección.

En cada sitio de muestreo se midieron factores fisicoquímicos de oxígeno disuelto, pH, conductividad y temperatura de campo, con equipo portátil (Conductronic-18), y la irradianza *in situ* con un sensor de irradianza HOBO. Se tomaron las siguientes muestras por cada sitio:

- Toma directa de un litro de agua para conteo celular. Parte de esta muestra (20 ml) se preservó con formalina al 3% para material de herbario y se montaron preparaciones semipermanentes.
- En cada uno de los diez sitios de recolección se filtraron 18 litros agua con redes de fitoplancton de 50 μm de poro para obtener un concentrado del florecimiento del lago, eliminando el zooplancton; estos concentrados se utilizaron para la cuantificación intracelular y detección de la microcistina LR (Vasconcelos et al., 1996).

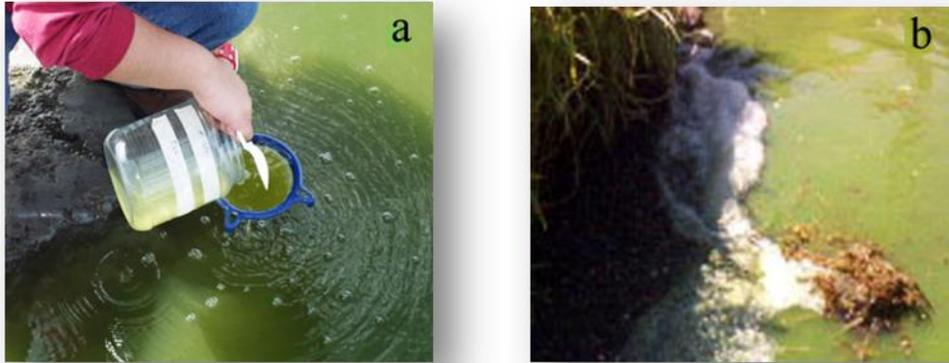


Figura 1. Florecimiento de cianoprocariontes del lago de Zumpango en 2010. **(a)** Florecimiento de marzo y **(b)** florecimiento de octubre. En ambas fechas de recolección se observó coloración verde del agua. En octubre la acumulación de la biomasa fue más densa y hubo formación de espuma.

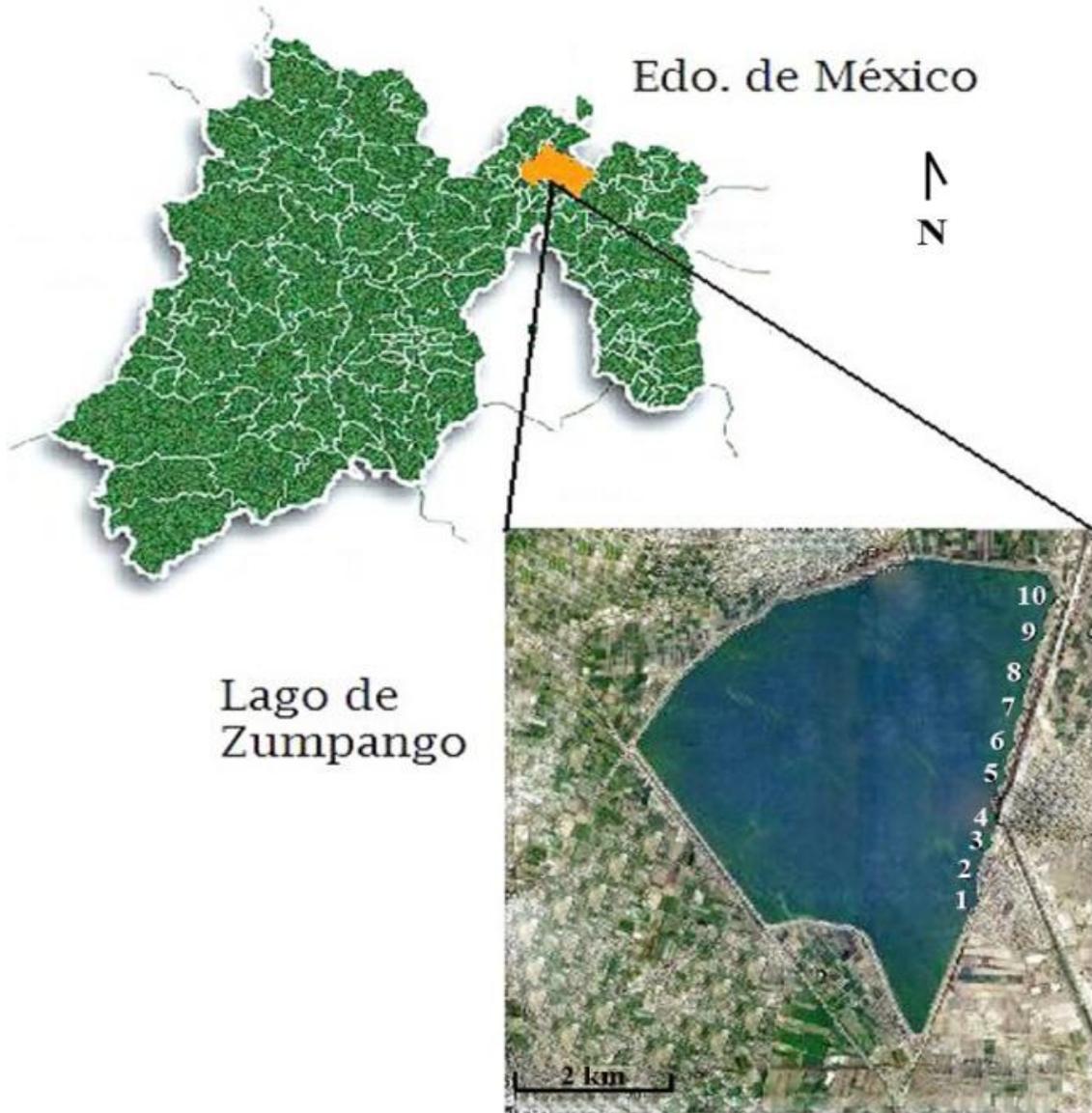


Figura 2. Ubicación del lago de Zumpango en el municipio de Zumpango de Ocampo en el Estado de México, los sitios de muestreo que se tomaron para las recolecciones de marzo y octubre de 2010 están marcados con números.

2. Identificación de especies

La identificación de las especies, se hizo en preparaciones montadas en gelatina glicerizada (González y Novelo, 1986) con el material preservado. Se utilizaron los trabajos de Komárek & Komárková- Legnerová (2002), Komárek (2005), Komarek & Anagnostidis (2005), Sant'Anna *et al.* (2004). Las observaciones se hicieron en un microscopio Nikon

Optiphot-2 y se hizo un registro fotográfico con una cámara Nikon coolpix S10 acoplada al microscopio antes mencionado.

3. Conteo celular

El conteo celular se hizo por duplicado y se promedió (en dos preparaciones por cada sitio de recolecta), se contó el número de células por especie, y este valor se llevó a número de células por volumen (células ml^{-1}) para las muestras de marzo y octubre de 2010. El conteo en ambas recolecciones se hizo para comparar de densidad celular de las especies que se identificaron.

4. Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas por ionización con electrospray (CLAE/ESI-EM)

Para la detección y cuantificación de la MC-LR en los extractos del Lago de Zumpango se empleó un método de cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas con ionización por electrospray (CLAE/ESI-EM). El equipo que se utilizó fue un cromatógrafo de líquidos marca Agilent modelo 1200 con automuestreador (el cual inyecta de manera automática las cantidades del analito que se le indica a través del programa de adquisición de datos) acoplado a un espectrofotómetro de masas modelo Bruker Esquire 6000 equipado con electrospray como fuente ionización y trampa de iones como analizador.

a. Cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE)

La separación de la microcistina LR se llevó a cabo en una columna C18 Synergi de 150 x 2 mm y 4 μm de tamaño de partícula y un gradiente de metanol/ácido fórmico al 0.1% (v/v) en agua, que se muestra en la Tabla 1 (Purdie *et al*, 2009). El metanol fue grado HPLC y el agua grado Milli Q, el ácido fórmico para análisis.

Previamente a su inyección en el cromatógrafo, todas las muestras fueron filtradas por membrana de 0.45 μm .

Tabla 1. Condiciones para la separación de la MC-LR por CL/ESI-EM

Fase móvil	A= Metanol B= 0.1% ácido fórmico en agua
Gradiente	0-30 min A: 70 % B: 30 % 30-45 min A: 100 %
Fase estacionaria	Synergi polar 150 x 2 mm 4 μm
Flujo de fase móvil	0.2 ml min ⁻¹
Temperatura de la columna	40 °C
Tiempo de corrida	35 minutos

b. Espectrometría de masas (EM)

La detección de la microcistina tuvo lugar en el espectrómetro de masas, que se operó en modo positivo, se escaneó el intervalo entre 100 y 1100 Da de m/z. Debido a la baja concentración del analito en las muestras se empleó el método de extracción de iones (modo positivo), que consiste en aislar el ion, en este caso, el de masa 995.6 Da que corresponde a la microcistina LR protonada cuya masa molecular monoisotópica es de 994.5487 (Ver Apéndice 2 para el diagrama y explicación del funcionamiento de la CLAE/ESI-EM).

c. Curva de calibración

Para cuantificar la MC-LR intracelular del florecimiento del Lago de Zumpango, se construyó una curva de calibración, para esto se utilizó un estándar comercial (Agilent®) de MC-LR disuelto en metanol, con concentración de 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Se obtuvieron ionogramas y espectros de masa a partir de la inyección de cuatro volúmenes distintos del estándar que se inyectaron por duplicado. Una vez obtenidas las áreas de la señal de la MC-LR se graficaron y se calculó la curva por el método de mínimos cuadrados.

5. Extracción, detección y cuantificación de MC-LR del lago de Zumpango

La extracción y cuantificación de MC-LR de los diez sitios de muestreo se hizo únicamente para las muestras de octubre de 2010. Se utilizó una muestra del mes de marzo del primer sitio para las pruebas de montaje del método. En la recolección de marzo se

observó, además de varias especies de *Microcystis*, la presencia de *M. protocystis* Crow, una especie que no es productora de toxinas (Sivonen & Jones, 1999).

a. Método de extracción de MC-LR

La extracción de microcistina LR se hizo con los concentrados algales de cada uno de los diez sitios de muestreo del mes de octubre de 2010 (Fig. 3). Todos los concentrados se liofilizaron y almacenaron a -20°C hasta su análisis (Lawton *et al.*, 1994; Prakash *et al.*, 2009; Sangolkar *et al.*, 2006; Vasconcelos *et al.*, 1996).



Figura 3. Toma de muestras concentradas del florecimiento de cianoprocariontes en el lago de Zumpango en octubre del 2010. (a) Se muestra la toma de agua en las redes de fitoplancton, las cuales se dejaban en reposo para obtener la mayor cantidad de biomasa algal y (b) retirar la mayor cantidad de agua. El material obtenido se guardó en frascos de vidrio y su traslado se hizo en frío.

Para el análisis se elaboró un extracto por cada liofilizado obtenido de 100 mg de biomasa. Cada extracto se preparó en 5 ml de metanol/ agua al 75 %, se sonicó durante diez minutos con una potencia de 36 W (Sonicator 3000 Misonix), se agitó durante 30 minutos y se centrifugó a 1100 r.p.m. durante 5 minutos (centrífuga Eppendorf 5414 R). El sobrenadante se recuperó y se mantuvo en frío (4°C). El botón se resuspendió en 5 ml de metanol/ agua al 75% y se repitieron los pasos de extracción dos veces más. En cada paso de extracción se obtuvieron 5 ml de extracto, por lo que el volumen final de extracto fue de 15

ml. Este extracto se concentró por evaporación (rotavapor Büchi 461 Water bath 011) a 35 °C para obtener el volumen de un mililitro, finalmente se centrifugó durante 30 minutos a 10000 r.p.m. y el sobrenadante se inyectó en la CL/ESI-EM (Fastner *et al.*, 1998; Lawton *et al.*, 1994; Lawton & Edwards, 2001; Prakash *et al.*, 2009; Sangolkar *et al.*, 2006).

b. Detección y cuantificación de MC-LR intracelular

Para la cuantificación de MC-LR en los extractos, se inyectaron diferentes volúmenes de extracto, procurando que las áreas de la señal correspondiente estuvieran dentro de los límites de la curva de calibración.

La MC-LR intracelular de los extractos se identificó comparando el espectro de la señal, y su tiempo de retención con los del estándar. La cuantificación se hizo con los valores de las áreas de pico y a partir de la ecuación de curva de calibración construida se calculó la concentración de MC-LR para cada inyección de extracto de cada sitio de recolección (Lawton *et al.*, 1994).

6. Análisis de regresión entre la cantidad de MC-LR cuantificada y la densidad celular del florecimiento

Se hizo una regresión lineal simple entre las variables cantidad de MC-LR ($\mu\text{g g}^{-1}$) y densidad celular (células ml^{-1}) de las especies de cada sitio de muestreo en el lago de Zumpango, utilizando el programa SPSS 17.0 para determinar una posible correlación entre las variables, bajo la hipótesis de que si existe una relación robusta se podría estimar la cantidad de MC-LR intracelular del lago de Zumpango, con base en los conteos celulares de las especies de cianoprocariontes que conforman el florecimiento.

En el caso de las muestras de octubre, la densidad celular de las especies de *Microcystis aeruginosa*, *M. flos-aquae* Wittrock y *Planktothrix cf. isothrix*, se tomaron por separado los datos para la regresión lineal porque una especie puede producir mayor cantidad de MC-LR que otra (Kotak *et al.*, 1995).

Los datos obtenidos en el mes de marzo del 2010 no se incluyeron en el análisis de regresión debido a la limitación de infraestructura para analizar un número mayor de muestras.

Resultados

1. Factores fisicoquímicos de las recolecciones en el lago de Zumpango

a. Factores fisicoquímicos de la recolección de octubre

En octubre hubo un aumento en el nivel del agua en el lago, se formaron espumas más densas en la costa este, mayor acumulación de natas del florecimiento e intensificación del olor desagradable del agua en comparación con la recolecta de marzo. El valor promedio de temperatura fue de 20.7 °C y el de pH fue de 9.8 (Tabla 2).

Tabla 2. Factores fisicoquímicos de la recolecta del 12 de octubre del 2010 en el lago de Zumpango.

Sitio	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Temperatura (°C)	18.6	19.6	17.8	18.8	19.7	10.9	23.9	23.9	22.2	22.5
pH	9	8.78	9.6	9.9	9.9	9.9	9.9	9.9	10.4	10.3
Irradianza superficial ($\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-2}$)	10.549	10.549	3.122	15.5	62	248.002	21.53	43.056	75.778	19.806

b. Factores fisicoquímicos de la recolección de marzo

En ambas fechas de recolección los florecimientos se presentaron de color verde característico del agua que contiene cianoprocariontes. El olor desagradable fue constante pero la formación de espumas sólo se observó en octubre.

En el mes de marzo se midieron algunos factores fisicoquímicos por sitio de muestreo (Tabla 3). Con promedios de temperatura de 23.46 °C y pH de 8.1. En la recolecta de marzo se observó gran cantidad de peces muertos, que fue reportada en junio de 2010 por autoridades del municipio como un caso de anoxia del lago (Barrera, 2010).

Tabla 3. Factores fisicoquímicos de temperatura y pH de la recoleta del 15 de marzo del 2010 en el lago de Zumpango.

Sitio	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Temperatura (°C)	16.7	18	20.5	23.5	24.3	25.9	27.5	26.9	26.9	24.4
pH	7.85	8.08	8.18	8.22	8.15	8.27	8.26	8.25	8.2	8.27

2. Descripción de especies del florecimiento de cianoprocariontes del lago de Zumpango

Microcystis flos-aquae (Wittrock) Kirchner, 1898 (Fig. 4)

Colonias microscópicas, pulverulentas, compactas, más o menos esféricas o irregulares en el contorno, no lobuladas, con agregados celulares muy densos, sin perforaciones en las colonias; las envolturas mucilaginosas no exceden el margen de los agregados celulares, son finas, hialinas, sin color, difluentes. Células esféricas, con aerotopos en la periferia de las células que les dan un color pardo, de 2.5-3.0 μm de diámetro.

- Ecología

Se encuentran en agua dulce, planctónicas, usualmente junto con otras algas planctónicas y cianoprocariontes, son parte de florecimientos, y de cuerpos de agua eutróficos (de consumo y/o de recreación), en toda la zona templada. Produce algunas variantes de microcistinas y sus formas desmetiladas, por ejemplo: MC-LR, MC-RR.

Referencias de herbario, MexZu 21 a 60, de la recolecta del florecimiento en los meses de marzo y octubre del 2010.

Microcystis protocystis Crow, 1923. (Fig. 4)

Colonias microscópicas, sin perforaciones, de forma irregular, con células bien distribuidas en la superficie del mucílago, que es hialino y difluente; las células son esféricas, 3.0-4.8 μm de diámetro, contenido celular de verde a pardo, con numerosos aerotopos.

La envoltura mucilaginosa alrededor de cada célula, distingue a esta especie de otras y es fácil de observar. Sin embargo, las células se distribuyen muy dispersamente en el mucílago, lo que contrasta con otras especies y esta disposición celular da un aspecto de colonias senescente que en ocasiones dificulta la separación de especies del género.

- Ecología

Esta especie forma florecimientos en cuerpos de agua eutróficos (recreativos y/o de consumo) y no se ha registrado su producción de microcistinas. De acuerdo con Komárek & Komárková- Legnerová (2002) se ha reportado en distintos cuerpos eutróficos en México, D.F., Veracruz, Puebla, Hidalgo y Michoacán. Es de ocurrencia común en la parte central de México que corresponde a una distribución pantropical (Komárek, 2002). Referencias de herbario, MexZu 21 a 40, de la recolecta del marzo del 2010.

Microcystis aeruginosa Kützing, 1846. (Fig. 5).

Colonias mucilaginosas, microscópicas, más o menos esféricas, lenticulares o poco elongadas, irregulares, lobuladas, a veces distintivamente elongadas; usualmente de (40) 600-90 (1000) μm de diámetro, con perforaciones pequeñas en las colonias; células distribuidas irregularmente, pero algunas veces con células empaquetadas densamente en varias regiones de la colonia. Mucílago sin color, sin estructura, difluente. Células esféricas, verde-azules, de color verde a pardo, con numerosos aerotopos en todas las células de la colonia; las células miden de 5.0-4.8 μm de diámetro.

- Ecología

Se encuentran en agua dulce y salada, planctónicas en cuerpos de agua eutróficos (lagos de consumo y/o de recreación), comúnmente formando florecimientos; presentan distribución cosmopolita con excepción de regiones polares y subpolares. Poblaciones y cepas tóxicas. Esta especie es productora de microcistinas y sus variantes desmetiladas, por ejemplo: MC-LR, MC-RR, MC-YR, MC-LW, MC-LY, MC-LF, MC-VF, MC-YA, MC-LL.

Referencias de herbario MexZu 1 a 20 y 41 a 60, de las recolecciones de septiembre de 2009 y de octubre de 2010.

Planktothrix cf. isothrix (Skuja) Komarek et Komárková 2004. (Fig. 5).

Los tricomas son de color verde a pardo y se encuentran formando masas sin arreglo definido, solitarios y formando florecimientos, tricomas usualmente rectos, raramente pequeños; en el lago de Zumpango se encontraron organismos con una longitud máxima de 0.5 mm, de color verde a pardo, tricomas cilíndricos de 5.0 μm de ancho y no atenuados. No presentan oscilación, ni rotación, son rectos, sin constricciones en las células, algunas con pequeños gránulos. Células pequeñas, más cortas que anchas de 2.5-5.0 μm , casi siempre con aerotopos abundantes dando un color de pardo oscuro a los tricomas. Células apicales cilíndricas y ampliamente redondeadas, no capitadas, sin caliptra ni pared celular externa amplia.

- Ecología

Se encuentran en agua dulce, primero béntónicos, después planctónicos, formando florecimientos; la especie se distribuye alrededor del mundo en aguas estancadas y lagos eutróficos a hipertróficos. Las especies del género *Planktothrix* producen principalmente microcistina RR y sus variantes desmetiladas, sin embargo se ha reportado producción de MC-LR (Barco *et al.*, 2004; Briand, *et al.* 2008; Ernst *et al.*, 2005; Messineo *et al.*, 2006). Se distribuye en Europa, República Checa, Grecia, Noruega, Japón, Marruecos, USA, Mozambique, Zaire. De acuerdo con Komarek & Anagnostidis (2005), los datos de manantiales termales, son considerados debatibles y la similitud morfológica entre poblaciones templadas y tropicales debería ser confirmada. Por esta razón decidimos describirla como especie a confrontar.

Referencias de herbario MexZu 41 a 60 de las recolectas del florecimiento de los meses de marzo y octubre del 2010. Según nuestras observaciones, no se detectó con certeza que esta especie sea bentónica en el lago de Zumpango.

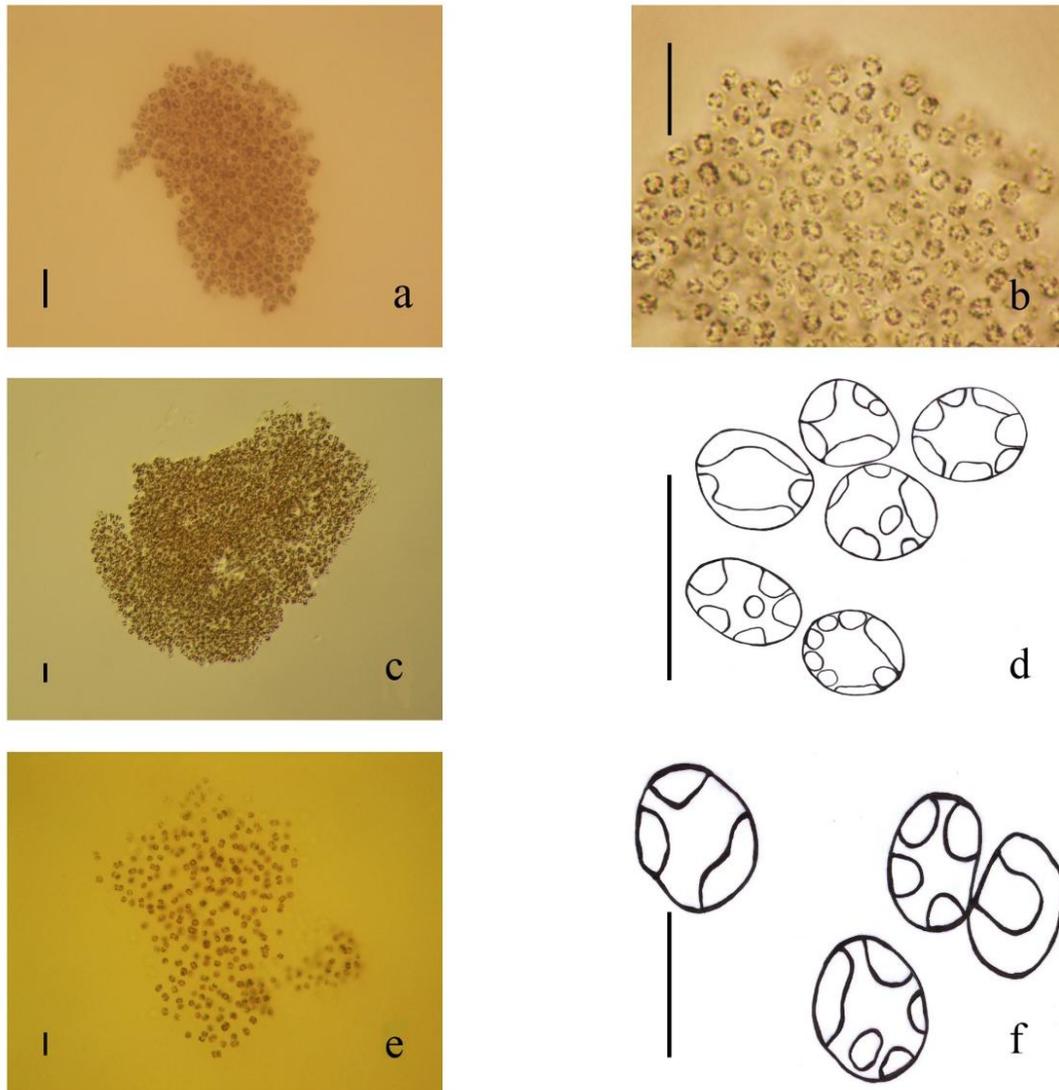


Figura 4. Variación de las colonias de *Microcystis* en el lago de Zumpango. *M. flos-aquae*: (a y c) colonias en 40 X donde se observa el acomodo muy compacto de las células en el mucílago; (b) aumento a 100 X de la periferia de la colonia, se observa el color pardo característico que le dan los aerotopos a las células; (d) dibujo del detalle de las células, donde se muestra la distribución y abundancia de los aerotopos en la periferia de las células. *M. protocystis*: (e) colonia en aumento de 40 X, colonia de forma irregular y donde se observa que las células están acomodadas de manera dispersa en el mucílago; (f) dibujo del detalle de las células en la periferia. Barras de a-c y e: 10 μ m; d y f: 5 μ m.

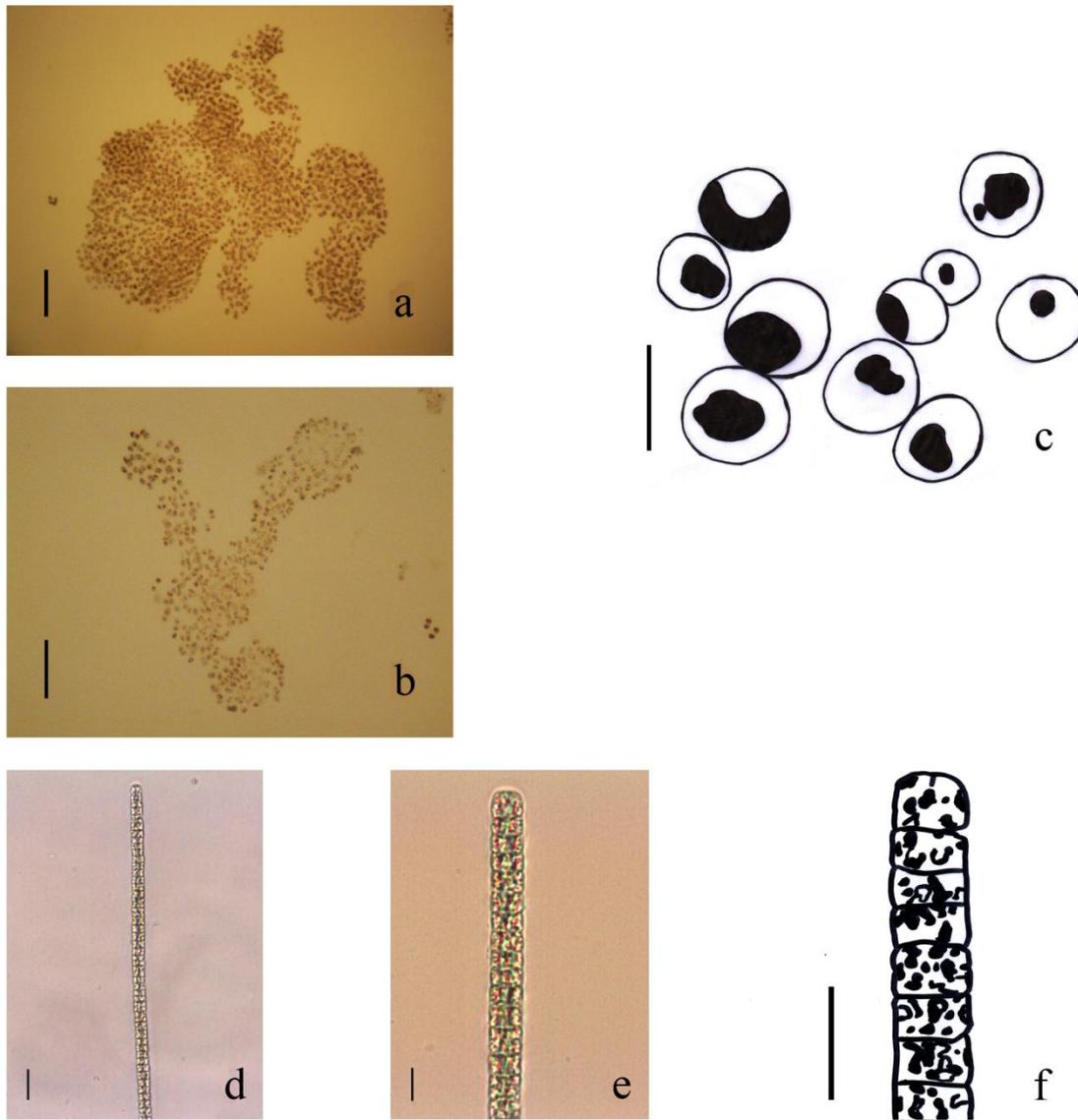


Figura 5. Colonias de *Microcystis aeruginosa* y tricomas de *Planktothrix cf. isothrix*. *M. aeruginosa*: (a y b) colonias irregulares, donde se pueden observar pequeñas perforaciones en las colonias que son una característica de la especie, 20 X; (c) dibujo con el detalle de la distribución de los aerotopos, regularmente en el centro de las células. *P. cf. isothrix*: (d) tricoma, donde se observa que es recto, 20 X; (e) acercamiento al tricoma a 100 X; (f) dibujo con el detalle de la abundancia y distribución de los aerotopos a lo largo del tricoma y en cada célula, los aerotopos le dan un color de verde a pardo a los tricomas. Barras de a y b: 50 μm ; d: 10 μm ; e: 10 μm ; c y f: 5 μm .

En los muestreos de Zumpango en marzo y octubre del 2010 se identificaron las especies *Microcystis flos-aquae*, *Microcystis aeruginosa* (Figs. 4 y 5) y *Planktothrix cf. isothrix* (Fig. 5). En la muestra adicional de septiembre de 2009 se observaron solamente *Microcystis flos-aquae* y *Microcystis protocystis* (Fig. 4). Los resultados mostraron que el florecimiento de cianoprocariontes en el lago ha estado compuesto por varias especies principalmente del género *Microcystis*. Además se presentaron *P. cf. isothrix* y *Pseudanabaena mucicola*, registrada por Vasconcelos *et al.* (2010), pero esta última no ha sido recurrente. Los cambios en la composición sugirieron que la toxicidad potencial producida por MC-LR puede variar en tanto que esta composición varía (Tabla 4).

Tabla 4. Comparación de la composición del florecimiento del lago de Zumpango, observaciones de recolectas hechas en los meses de septiembre de 2009, marzo y octubre de 2010 y por último lo reportado por Vasconcelos *et al.* (2010) hecho en noviembre del 2009.

Fecha de observación	Composición del florecimiento
Septiembre del 2009	<i>Microcystis aeruginosa</i> y <i>Microcystis flos-aquae</i>
15 de marzo del 2010	<i>M. protocystis</i> , <i>M. flos-aquae</i> y <i>Planktothrix</i> sp.
12 de octubre del 2010	<i>M. aeruginosa</i> , <i>M. flos-aquae</i> y <i>Planktothrix cf. isothrix</i> .
Noviembre del 2009 (Vasconcelos <i>et al.</i> 2010)	<i>M. aeruginosa</i> , <i>M. panniformis</i> , <i>M. protocystis</i> , <i>Pseudanabaena mucicola</i>

3. Densidad celular del florecimiento del lago de Zumpango

a. Densidad celular del muestreo de octubre de 2010

En octubre se estimó la densidad de las especies y la concentración intracelular de microcistina LR. La densidad celular en octubre fue mayor para *P. cf. isothrix*, que para *Microcystis* spp. y para las especies de *Microcystis*, *M. aeruginosa* tuvo mayor densidad celular que *M. flos-aquae*, la cual estuvo ausente en los sitios 1, 3 y 4 (Tabla 5).

Tabla 5. Densidad celular (células ml⁻¹) de *Microcystis aeruginosa*, *M. flos-aquae* y *Planktothrix cf. isothrix* en cada sitio de recolección de octubre de 2010.

Sitio	<i>M. aeruginosa</i> (cél. ml ⁻¹)	<i>M. flos-aquae</i> (cél. ml ⁻¹)	<i>Planktothrix</i> (cél. ml ⁻¹)	Cianoprocariontes (cél. ml ⁻¹)
1	1.12 x 10 ⁴ ±	0	2.2336 x 10 ⁶ ±	
2	9.76 x 10 ⁴ ±	1.42 x 10 ⁴ ±	7.9552 x 10 ⁶ ±	
3	5.8 x 10 ⁴ ±	0	4.4672 x 10 ⁶ ±	
4	4.24 x 10 ⁴ ±	0	2.4832 x 10 ⁶ ±	
5	4.079 x 10 ⁵ ±	1.5 x 10 ³ ±	1.55136 x 10 ⁷ ±	
6	8.066 x 10 ⁵ ±	1.795 x 10 ⁵ ±	1.49376 x 10 ⁷ ±	
7	2.536 x 10 ⁵ ±	1.176 x 10 ⁵ ±	2.66432 x 10 ⁷ ±	
8	1.1 x 10 ⁵ ±	4.91 x 10 ⁴ ±	1.17312 x 10 ⁶ ±	
9	2.971 x 10 ⁵ ±	5.63 x 10 ⁴ ±	2.03328 x 10 ⁷ ±	
10	4.8 x 10 ⁵ ±	1.49 x 10 ⁴ ±	2.03328 x 10 ⁷ ±	
Totales	2.5644 x 10⁶ ±	4.331 x 10⁵ ±	1.266304 x 10⁸ ±	1.296279 x 10⁸ ±
Total Especies por género		2.9975x10⁶ ±	1.266304 x 10⁸ ±	

b. Densidad celular del muestreo de marzo de 2010

En marzo se estimó la densidad de las especies. La densidad celular en marzo fue mayor para *P. cf. istoryrix*, que para *Microcystis* spp. y para las especies de *Microcystis*, *M. flos-aquae* tuvo mayor densidad celular que *M. protocystis*. Hubo ausencia de *M. flos-aquae* en el sitio 4 y de *M. protocystis* en el sitio 5 (Tabla 6 y Fig. 6).

Tabla 6. Densidad celular (células ml⁻¹) de *Microcystis flos-aquae*, *M. protocystis* y *Planktothrix* cf. *isothrix* en cada sito de recolección de marzo de 2010.

Sitio	<i>M. flos-aquae</i> (cél. ml ⁻¹)	<i>M. protocystis</i> (cél. ml ⁻¹)	<i>P. cf. isothrix</i> (cél. ml ⁻¹)	Cianoprocariontes (cél. ml ⁻¹)
1	1.6425 x 10 ⁵ ±	1.006 x 10 ⁵ ±	8.05475 x 10 ⁶ ±	
2	2.0415 x 10 ⁵ ±	8.125 x 10 ⁴ ±	9.05525 x 10 ⁶ ±	
3	7.825 x 10 ⁴ ±	1.05 x 10 ³ ±	5.77825 x 10 ⁶ ±	
4	0	1.5 x 10 ³ ±	5.25625 x 10 ⁶ ±	
5	5.8 x 10 ³ ±	0	8.91025 x 10 ⁶ ±	
6	6.418 x 10 ⁵ ±	5.49 x 10 ⁴ ±	1.340525 x 10 ⁷ ±	
7	5.4565 x 10 ⁵ ±	1.6345 x 10 ⁵ ±	1.61675 x 10 ⁷ ±	
8	1.218 x 10 ⁵ ±	4.46 x 10 ⁴ ±	1.1832 x 10 ⁷ ±	
9	1.73 x 10 ⁵ ±	8.025 x 10 ⁴ ±	9.802 x 10 ⁶ ±	
10	2.057 x 10 ⁵ ±	7.705 x 10 ⁴ ±	1.356475 x 10 ⁷ ±	
Totales	2.1404 x 10⁶ ±	6.0465 x 10⁵ ±	1.0182625 x 10⁸ ±	1.045713 x 10⁸ ±
Total		2.74505 x 10⁶ ±	1.0182625 x 10⁸ ±	
Especies por género				

Comparando la densidad celular de especies cianoprocariontes en las dos recolecciones, los valores fueron mayores en octubre (Tablas 5 y 6 y Fig. 6).

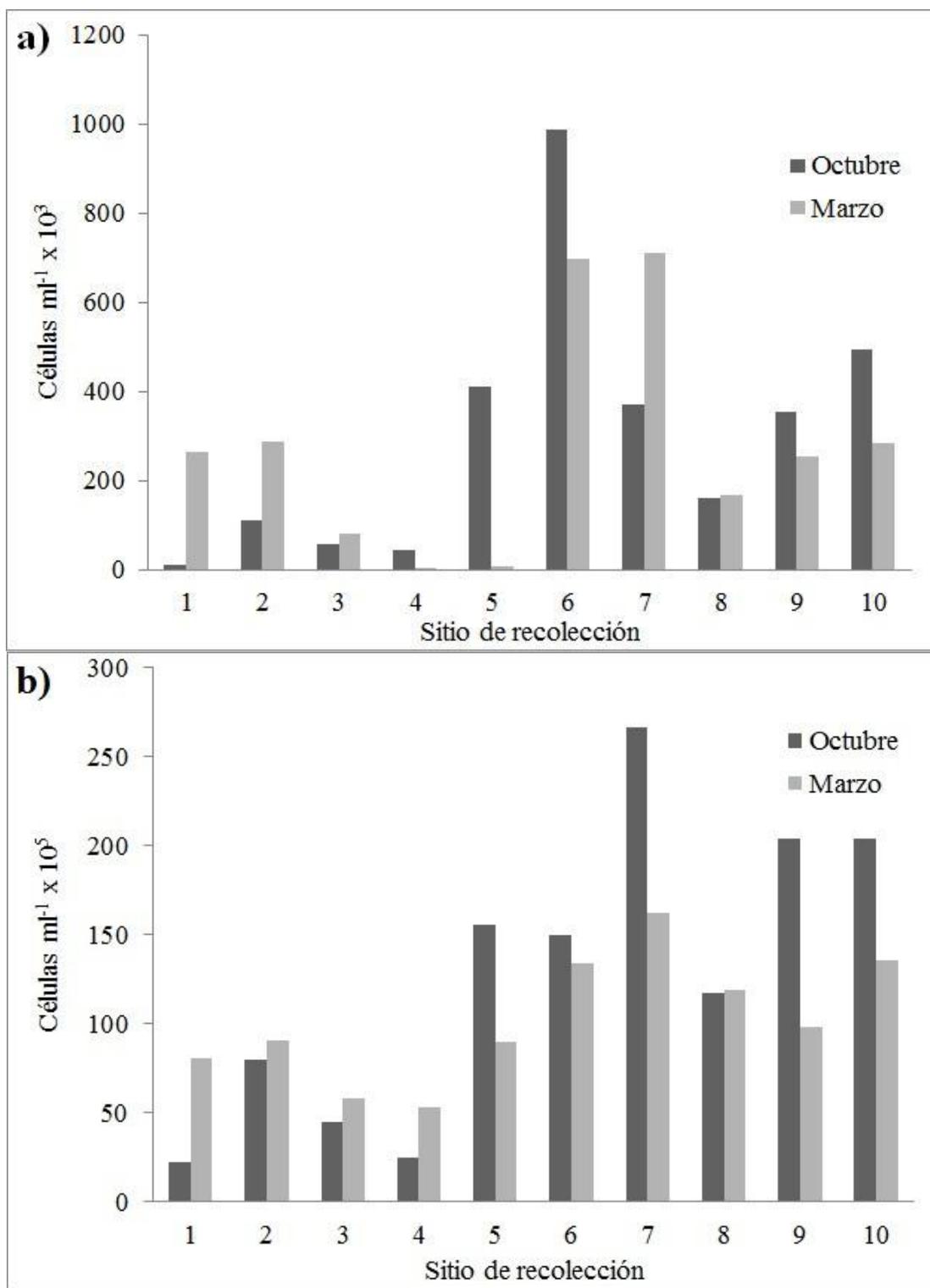


Figura 6. Gráficas de comparación entre la densidad celular de *Microcystis* spp. (a) y *Planktothrix* cf. *isotrix* (b) de marzo y octubre de 2010 en el lago de Zumpango.

4. Curva de calibración de la MC-LR para cuantificar la toxina en las muestras del florecimiento del lago de Zumpango

Los ionogramas obtenidos para cada uno de los puntos de la curva de calibración en el CLAE/ESI-EM se muestran en la Figura 7 a, c, e, g. El área bajo la señal o pico de cada gráfica es proporcional a la concentración del estándar de MC-LR. Las gráficas de la derecha (Fig. 7 b, d, f, h) son los espectros obtenidos de dicha señal, en ella se aprecia la del ion de masa 995.6 Da que corresponde a la masa molecular de la $[(MC-LR) + H]^+$ a partir de los espectros de masa, cuya lectura estuvo acoplada al cromatógrafo (Apéndice 2). Todas las lecturas se realizaron con una réplica (Tabla 7).

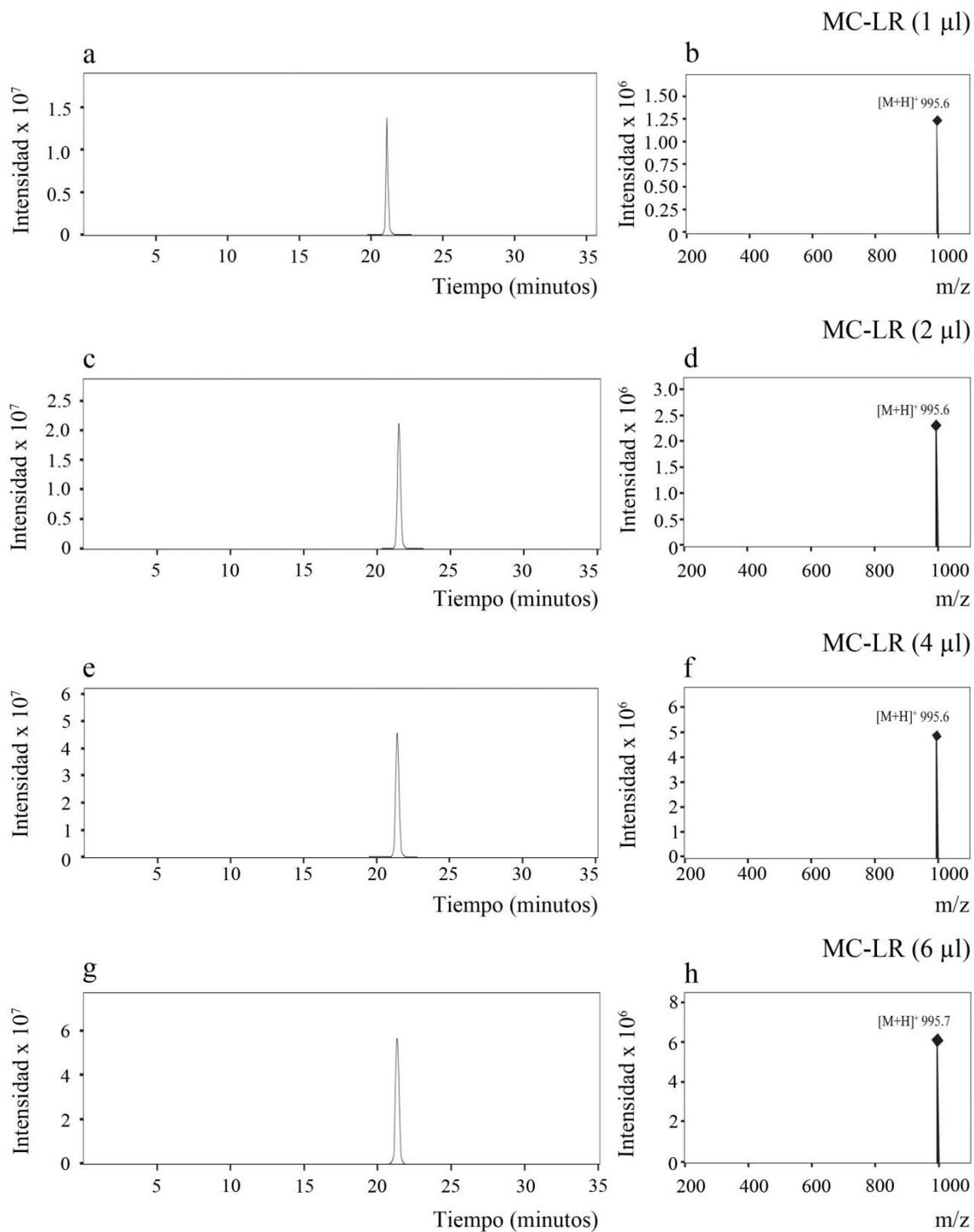


Figura 7. Columna de la izquierda, ionogramas de las cuatro concentraciones de estándar de MC-LR que se inyectaron para construir la curva de calibración (cromatógrafo de líquidos); columna de la derecha, espectros de masa de la $[(\text{MC-LR}) + \text{H}]^+$, donde se muestra la intensidad de la señal en función de la cantidad de iones de acuerdo con el peso molecular (espectrómetro de masas) (no se muestran las réplicas, Tabla 7).

Tabla 7. Volúmenes de inyección del estándar con concentración de $0.01 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$, con la cantidad de MC-LR que contiene cada inyección, el área de pico por inyección y los promedios de las dos réplicas que se hicieron para obtener las mediciones de concentración de la cantidad de estándar inyectado. t_r : tiempo de retención en minutos.

Vol. Inyección (μl)	Cantidad de MC-LR (μg)	t_r (minutos)	Área bajo la curva	Promedios del área
6	0.06	21.4	1062622321	
6	0.06	21.3	1011209964	1036916143
4	0.04	21.5	662826144	
4	0.04	21.4	759979790	711402967
2	0.02	21.5	315025976	
2	0.02	21.4	315651125	315338550.5
1	0.01	21.1	158610150	
1	0.01	21.1	140894945	149752547.5

La curva de calibración de MC-LR ($\mu\text{g } \text{g}^{-1}$) se construyó a partir de los valores promedio indicados por el área bajo la curva del pico de cada volumen inyectado (réplicas, Tabla 7), versus la cantidad en microgramos del estándar (MC-LR) inyectado (Fig. 8). La correlación entre las cantidades de estándar utilizadas (cantidades inyectadas para cada lectura) y los valores de concentración obtenidos, mostró un coeficiente $R^2 = 0.9983$, que permite concluir que la relación entre los datos de la curva es lineal.

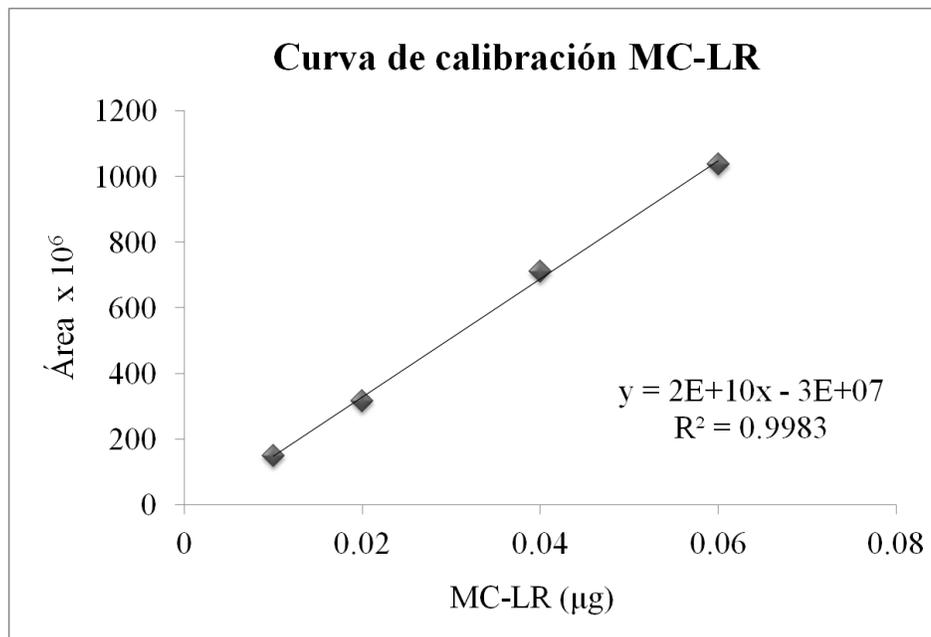


Figura 8. Curva de calibración de MC-LR obtenida a partir de inyecciones de cuatro cantidades del estándar comercial (Agilent®) de microcistina LR en el CL/ESI-EM. Se indica la ecuación de la recta y el valor de R^2 .

5. Detección y cuantificación de MC-LR en el lago de Zumpango

a. Cuantificación de la MC-LR en octubre de 2010

La MC-LR en los extractos se identificó por el tiempo de retención (t_r) de 21.1 minutos y por su masa molecular. En la Figura 9 se muestran los ionogramas de cada extracto de los diez sitios de recolección y sus espectros de masas (no se muestra la réplica).

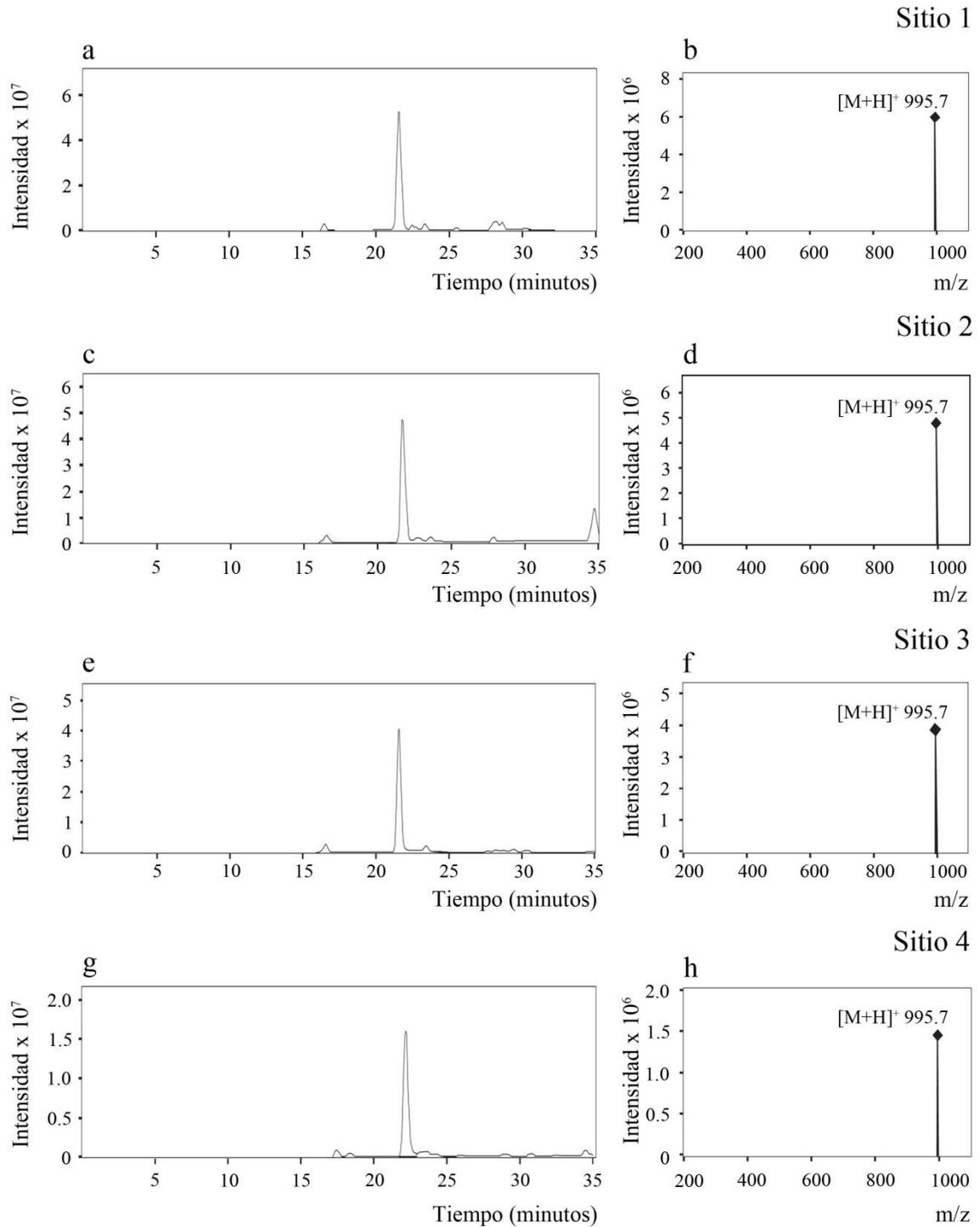


Figura 9. Ionogramas (columna de la izquierda) y espectros de masas (columna de la derecha), de la cantidad de MC-LR detectada en los extractos de los sitios de muestreo 1 a 4. En los Ionogramas se muestra el pico de la $[(MC-LR)+H]^+$ y el tiempo de retención que tuvo, así como la intensidad de la señal. Los espectros de masa indican el P.M. de la toxina y la intensidad de la señal que corresponde al número de iones que detectó el espectrofotómetro.

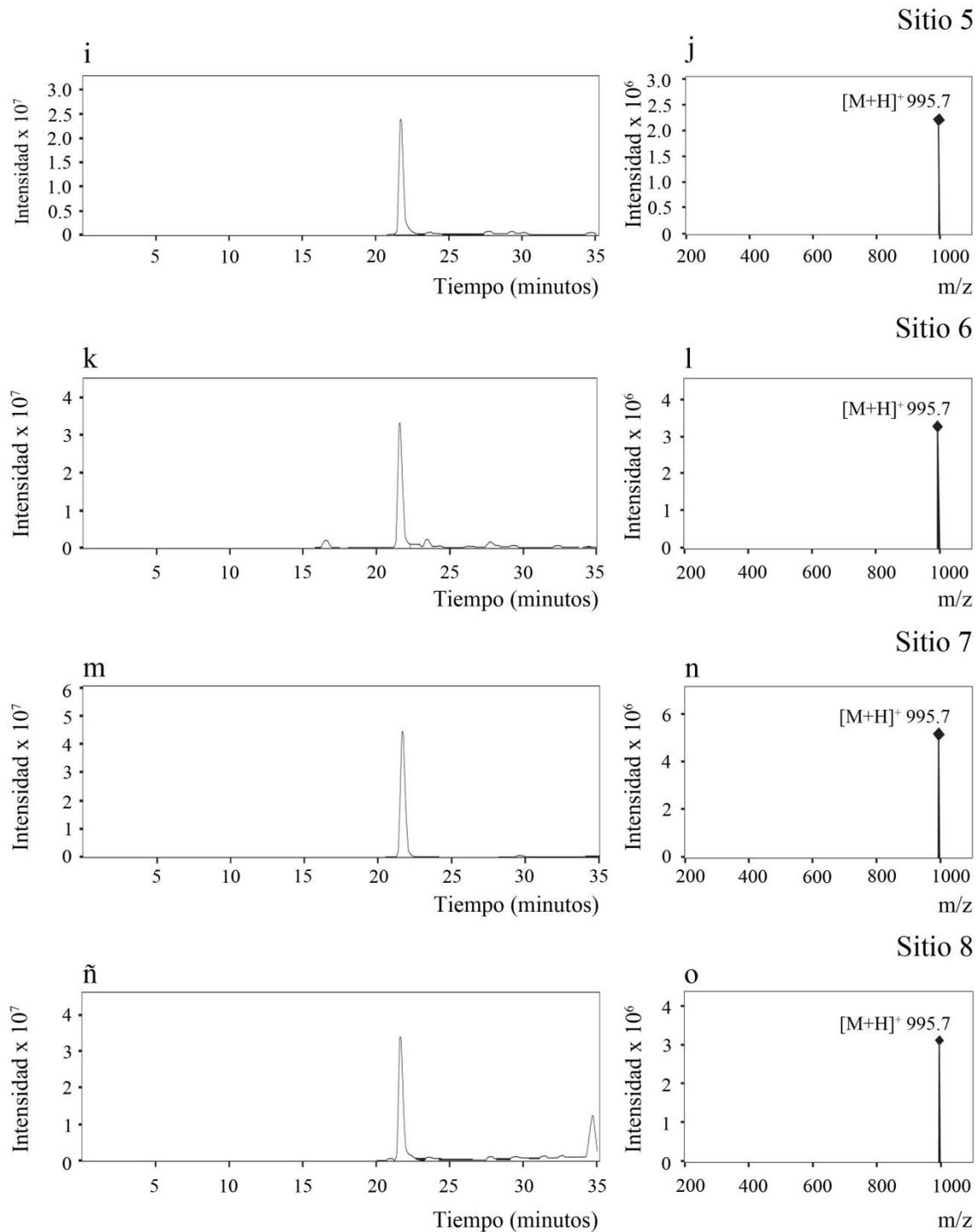


Figura 9 (continuación). Ionogramas (columna izquierda) y espectros de masas (columna derecha), de la cantidad de MC-LR detectada en los extractos de los sitios de muestreo 5 a 8.

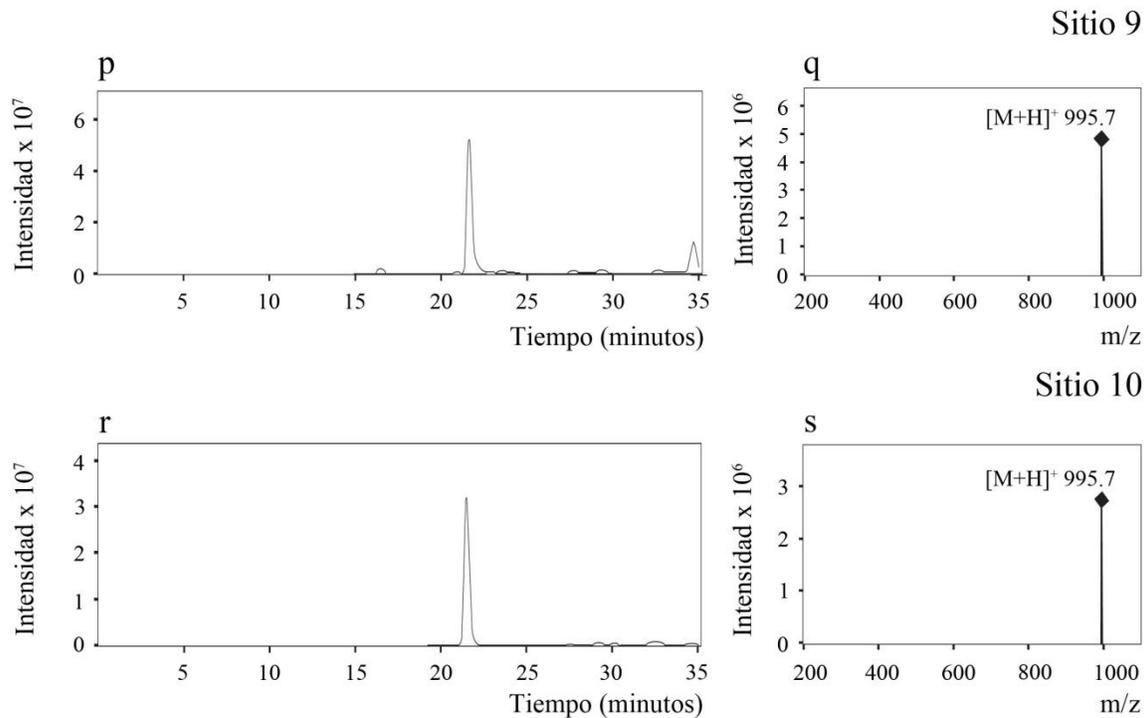


Figura 9 (continuación). Ionogramas (columna izquierda) y espectros de masas (columna derecha), de la cantidad de MC-LR detectada en los extractos de los sitios de muestreo 9 y 10.

Se utilizaron dos mediciones de MC-LR para cada sitio. A partir de cantidades de microcistina extraída variables, se ajustaron los volúmenes de inyección de cada muestra de cada sitio. En el sitio 7 fue necesario además hacer diluciones para interpolar el dato en la curva de calibración (Tabla 8).

Los valores de áreas obtenidos, al igual que en las lecturas del estándar (Tabla 7), fueron un promedio de dos lecturas de cada sitio. Estos valores promedio representaron la concentración de MC-LR dependiendo del volumen de muestra utilizado (volumen de inyección) y el cálculo final se obtuvo a partir de la ecuación de la curva de calibración de la MC-LR ($y = 2 \times 10^{10}x - 3 \times 10^7$) y se ajustó a 100 mg de biomasa liofilizada de cianoprocariontes, en un mililitro de metanol (Tabla 9).

Sitio	Vol. de inyección (μl)	t_r (minutos)	Área bajo la curva
1	10	21.5	559882135
1	10	21.5	572926331
2	10	21.7	990622397
2	10	21.7	1050107504
3	5	21.6	797426067
3	5	21.5	814252211
4	1	22.2	362396664
4	1	22.2	333653272
5	2	21.7	527102424
5	2	21.7	555016482
6	10	21.6	755168085
6	10	21.5	738212960
7	10 (dilución 1:15)	21.7	1020311725
7	10 (dilución 1:15)	21.3	1076210461
8	5	21.7	758405838
8	5	21.6	741874668
9	3	21.6	442682634
9	3	21.6	451566957
10	1	21.5	785339360
10	1	21.5	719265845

Tabla 8. Volumen de inyección de los extractos (100 mg de biomasa liofilizada) de los diez sitios muestreados en el lago de Zumpango, tiempos de retención en minutos (t_r) y áreas de la señal de la MC-LR, que se obtuvieron de los picos de la señal en los ionogramas. Las inyecciones de las muestras de cada sitio de recolección se hicieron por duplicado (filas sin color).

Muestra	A	B	C	D	E
	Área (promedio)	MC-LR (μg)	MC-LR ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	MC-LR ($\mu\text{g } 100 \text{ mg}^{-1}$)	MC-LR ($\mu\text{g g}^{-1}$)
1	566404233	0.0298	2.982021165	2.982021165	29.82
2	1020364951	0.0525	5.251824753	5.251824753	52.51
3	805839139	0.0417	8.35839139	8.35839139	83.58
4	348024968	0.0189	18.9012484	18.9012484	189.0
5	541059453	0.0285	14.27648633	14.27648633	142.7
6	746690522.5	0.0388	3.883452613	3.883452613	38.83
7	1048261093	0.0539	81.68644644	81.68644644	816.8
8	750140253	0.0390	13.00233755	13.00233755	130.0
9	447124796	0.0238	7.952079925	7.952079925	79.52
10	752302603	0.0391	39.11513013	39.11513013	391.1

Tabla 9. Proceso de cálculo de MC-LR en cada sitio de muestreo (valores promedio de muestras analizadas). **A**, promedio del área de pico de señal de MC-LR obtenida de cada ionograma; **B**, cantidad de toxina (μg) calculada para el volumen inyectado; **C**, cantidad de microcistina por mililitro de extracto, equivalente a la cantidad total de microcistina extraída, **D**, **E**, cálculo de la concentración de microcistina por gramo de células en el fitoplancton de cada sitio, como masa de material liofilizado.

Las cantidades de MC-LR fueron variables entre los diez sitios analizados y los sitios siete (816.86 $\mu\text{g g}^{-1}$) y diez (391.15 $\mu\text{g g}^{-1}$) tuvieron los valores más altos (Fig. 9). El promedio de MC-LR intracelular cuantificada para el lago de Zumpango fue de 195 $\mu\text{g g}^{-1}$.

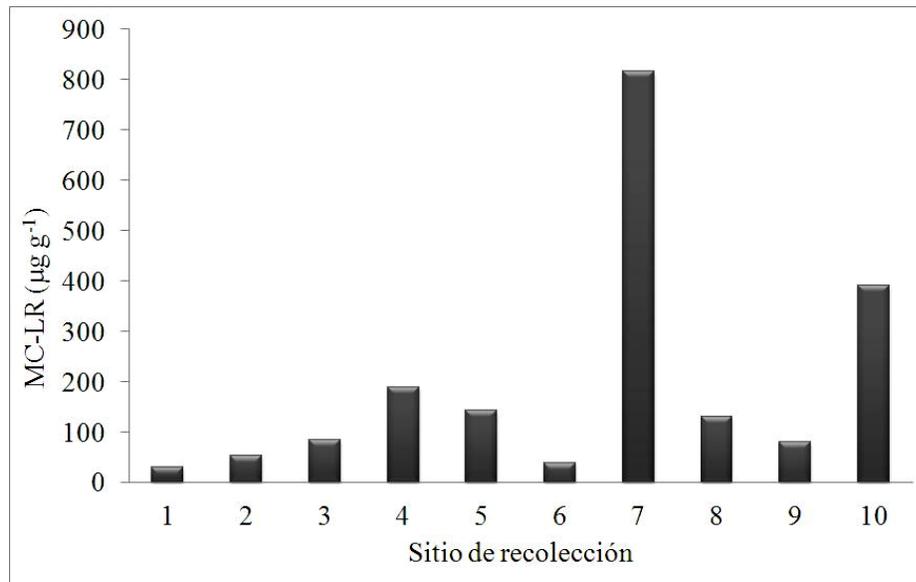


Figura 9. Cantidades de microcistina LR ($\mu\text{g g}^{-1}$) en cada sitio de recolección en el lago de Zumpango.

6. Correlación entre MC-LR y densidad celular de cianoprocariontes del florecimiento del lago de Zumpango

a. Correlación entre densidad la celular de *Microcystis aeruginosa* y MC-LR

Se hizo un análisis de regresión polinomial entre la densidad celular de *Microcystis aeruginosa* y la concentración de MC-LR de cada sitio, en el mes de octubre (Apéndice 7). Los resultados mostrados en la Tabla 10 indicaron que la ecuación lineal no es significativa, mientras que las ecuaciones cuadrática y cúbica fueron altamente significativas ($p \leq 0.05$). En el caso de *M. aeruginosa*, la ecuación que explica mejor la correlación entre las variables es la cúbica ($p = 0.009$), con valores altos de F y de R^2 (la cantidad de variabilidad de la toxina que puede explicarse en función de la densidad celular). Aunque el valor de la constante de la ecuación cuadrática se acerca más a los valores de densidades que se

obtuvieron, la expresión gráfica de los modelos mostró el modelo cúbico con un grado menor dentro de los posibles, con un mejor ajuste entre las variables. En ninguna de las ecuaciones hubo discrepancia entre las relaciones que guardaron los sitios (Fig. 10). La ecuación de tercer orden y los parámetros estimados indican los cambios medios que corresponden a la variable dependiente por cada unidad de cambio de la variable independiente. Esta modelación polinomial de tercer orden explica el 80% de la variación y tuvo mayor significancia en comparación de la ecuación lineal y de segundo orden, es por eso que esta es la ecuación seleccionada para expresar el modelo.

La expresión matemática del modelo cúbico para *M. aeruginosa* fue:

$$Y = 43.159 + 0.002(x) - 1.135 (x^2) + 1.931 (x^3) \quad (1)$$

Tabla 10. Resumen del modelo y parámetros estimados. En la Tabla obtenida en SPSS, se muestran los valores de R^2 para los modelos lineal, cuadrático y cúbico, donde el más significativo y con mayor valor de R^2 es el cúbico, que además tiene el valor de F más alto.

Variable dependiente: MC-LR

Ecuación	Resumen del modelo					Parámetros estimados			
	R cuadrada	F	gl 1	gl 2	Sig.	Constante	b1	b2	b 3
Lineal	0.259	2.798	1	8	0.133	54.282	0.000		
Cuadrática	0.631	5.984	2	7	0.031	149.828	-0.001	3.298E-9	
Cúbica	0.835	10.136	3	6	0.009	43.159	0.002	-1.135E-8	1.931E-14

La variable independiente es *Microcystis aeruginosa*.

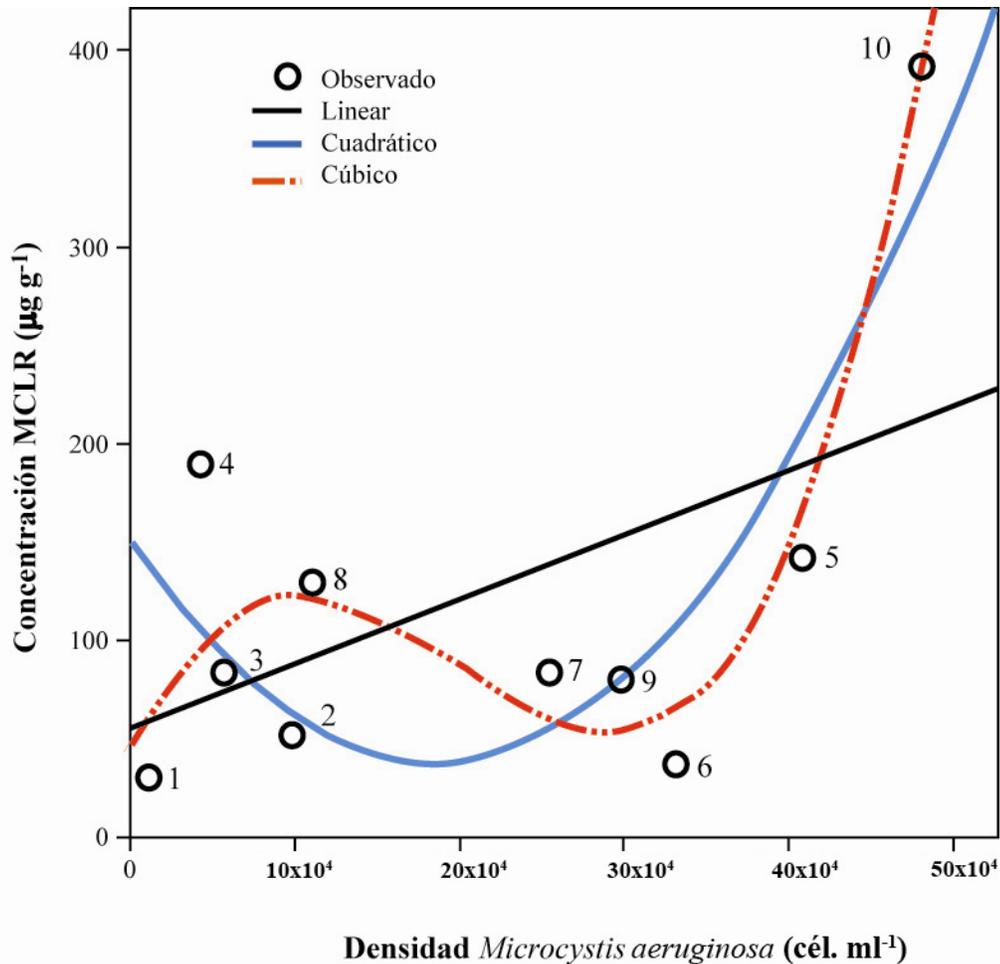


Figura 10. Gráfica de los modelos cuadráticos, cúbico y lineal de la correlación entre la cantidad de MC-LR y la densidad celular de *Microcystis aeruginosa*.

b. Correlación entre la densidad celular de *P. cf. istorhix* y cantidad de MC-LR

Se hizo un análisis de regresión polinomial entre la densidad celular de *Planktothrix. cf. istorhix* y la concentración de MC-LR de cada sitio, en el mes de octubre (Apéndice 7). Los resultados mostrados en la Tabla 10 indicaron que la ecuación lineal no es significativa, mientras que las ecuaciones cuadrática y cúbica fueron altamente significativas ($p \leq 0.05$). En el caso de *P. cf. istorhix*, la ecuación que explica mejor la correlación entre las variables es la cuadrática ($p = 0.002$), con valores altos de F y de R^2 (la cantidad de variabilidad de la toxina que puede explicarse en función de la densidad celular). La expresión gráfica de los modelos mostró el modelo cuadrático con un grado menor dentro de los posibles, con un

mejor ajuste entre las variables. En ninguna de las ecuaciones hubo discrepancia entre las relaciones que guardaron los sitios (Fig. 11). La ecuación de segundo orden y los parámetros estimados indican los cambios medios que corresponden a la variable dependiente por cada unidad de cambio de la variable independiente. Esta modelación polinomial de segundo orden explica el 80% de la variación y tuvo mayor significancia en comparación de la ecuación lineal y de tercer orden, es por eso que esta es la ecuación seleccionada para expresar el modelo.

La expresión matemática del modelo cuadrático para *P. cf. isothrix* fue:

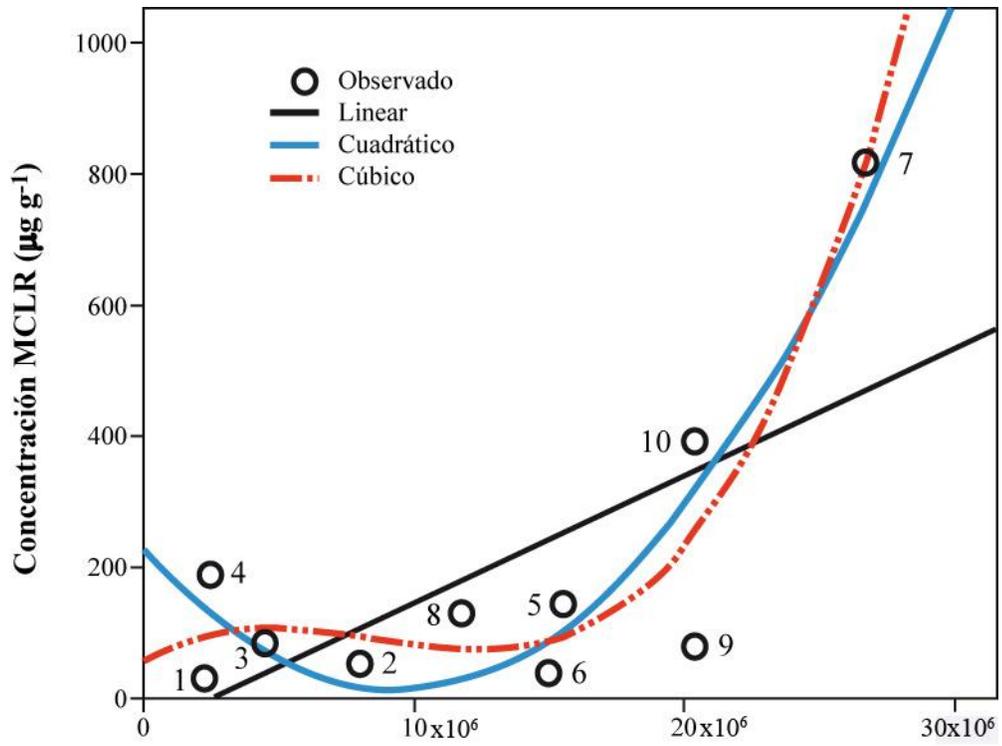
$$Y = 231.052 - 4.640(x) + 2.472 (x^2) \quad (2)$$

Tabla 11. Resumen del modelo y parámetros estimados. Se muestra el análisis de correlación lineal, cuadrático y cúbico entre la cantidad de MC-LR y la densidad celular de *Planktothrix cf. isothrix*.

Variable dependiente: MC-LR

Ecuación	Resumen del modelo					Parámetros estimados			
	R cuadrada	F	df 1	df 2	Sig.	Constante	b1	b2	b 3
Lineal	0.449	6.525	1	8	0.034	-50.937	1.945E-5		
Cuadrática	0.820	15.947	2	7	0.002	231.052	-4.604E-5	2.472E-12	
Cúbica	0.865	12.830	3	6	0.005	56.769	2.429E-5	-3.582E-12	1.401E-19

La variable independiente es *Planktothrix*



Densidad *Planktothrix cf. isothrix* (cél ml⁻¹)

Figura 11. Gráfica de los modelos cuadráticos, cúbico y lineal de la correlación entre la cantidad de MC-LR y la densidad celular de *Planktothrix cf. isothrix*.

Discusión

Los resultados del trabajo mostraron una variación esperada entre las densidades poblacionales de las especies y la microcistina LR y para comprobar si puede ser confiable utilizar el proxy de densidad buscado, como se explicó en los objetivos, la estrategia fue realizar un análisis de regresión para nuestros datos porque nos informa si hay una correlación estadísticamente significativa entre la variable dependiente (en nuestro caso la MC-LR intracelular que cuantificamos) y la densidad celular de las especies que conforman el florecimiento de cianoprocariontes, como variable independiente. El análisis se estructuró a partir de un método de prueba de hipótesis, en el cual rechazamos o aceptamos la H_0 la cual, basada en que las medias de los datos serían iguales plantea que si la cantidad de toxina cambia, no habrá diferencia entre las densidades de las especies estudiadas. El enfoque estadístico de nuestra investigación fue crítico porque la producción de toxina puede ser variable en el tiempo o puede no ser producida por alguna de las especies que componen el florecimiento.

De acuerdo con nuestros resultados, la significancia estadística basada en el 95 % de confianza, permitió aceptar la hipótesis alternativa (H_1) y se pudo establecer una correlación entre la variación de la concentración de microcistina LR intracelular extraída de todos los cianoprocariontes del florecimiento y la variación de la densidad celular de algunas de las especies que componen el florecimiento de Zumpango, como *M. aeruginosa* y *P. cf. isothrix*, a través de modelos de orden polinomial.

1. Resultado del análisis en función de la composición de cianoprocariontes del florecimiento del lago de Zumpango

El florecimiento del lago de Zumpango ha tenido cambios en la composición de especies de cianoprocariontes. Esto lo observamos en septiembre de 2009 y en las recolecciones de marzo y octubre de 2010. En marzo y octubre identificamos que la composición de especies de *Microcystis* varió. Los cambios en composición afectan los resultados de concentración de toxinas porque pueden estar involucradas especies que producen o no microcistinas. *M. protocystis*, un miembro común en los florecimientos de cianoprocariontes en cuerpos de agua eutróficos (Komáček & Komárková, 2002; Sivonen & Jones, 1999) no se ha reportado como productora de toxinas y estuvo presente en el florecimiento durante marzo de 2010.

Esta composición de especies productoras y no productoras de toxinas es una característica que se ha presentado en diversos cuerpos de agua (Christiansen *et al.*, 2003; Janse *et al.*, 2004; Kotak *et al.*, 1995) y enfatiza la importancia de hacer una identificación previa de las especies de cianoprocariontes que están conformando el florecimiento en la época en que se quiere hacer el estudio, antes de realizar un método de cuantificación de toxinas (Arzate *et al.*, 2010).

En Zumpango fue importante reconocer desde el punto de vista taxonómico cuáles especies producen o no toxina y cómo modifican su presencia entre los muestreos, pues la variabilidad de los datos puede estar asociada con la presencia de especies que contribuyen a la densidad pero no a la concentración de la toxina. Znachor *et al.* (2006) y Rolland *et al.*, (2005) sugieren que pueden coexistir especies que contienen algunos de los genes que codifican para la toxina con aquellas que tienen la dotación completa, por lo que son otro indicador importante para sustentar la potencialidad tóxica de un cuerpo de agua. Nos parece que este postulado es aceptable mientras no haya suficientes estudios que prueben que es la dotación genómica completa y no la variabilidad en la expresión, la que está relacionada con la síntesis de toxinas.

2. Resultado del análisis de MC-LR en función de las densidades de especies de *Microcystis* en el lago Zumpango

Kotak *et al.* (1995) encontró variación de concentraciones de MC-LR y densidad celular en *M. aeruginosa* de distintos sitios de los lagos Coal y Little Beaver (Canadá). La variación en parte fue producida por una mezcla de cepas tóxicas y no tóxicas dentro de la misma población de *M. aeruginosa*, pero lo importante con respecto a nuestros resultados en Zumpango es que en esos lagos canadienses, *M. aeruginosa* mostró una distribución espacial irregular de poblaciones con distintas densidades y Kotak (1995, op. cit.) relaciona también la variabilidad de sus datos con la distribución espacial de las colonias.

En Zumpango, la variabilidad de la densidad celular de una especie en cada sitio de muestreo, se relacionaría con una distribución irregular de poblaciones. Por ejemplo, *M. flos-aquae* estuvo presente en sólo siete sitios de recolección (Tabla 5), por lo que no se consideró pertinente incluir esta especie en el análisis de regresión de la concentración de toxina y la

densidad celular. Esta observación sin embargo, refuerza el planteamiento de hacer muestreos amplios y además medir las variables ambientales que pueden influir en la distribución de la nata en diferentes zonas del lago, por ejemplo el viento.

Otro factor importante a considerar es con respecto a la flotabilidad de los cianoprocariontes que presentan aerotopos, como los de Zumpango, cuya presencia también afecta la variación en la distribución espacial de las poblaciones y como resultado, afecta a las densidades celulares y evidentemente, a las concentraciones de MC-LR. La presencia de aerotopos es importante pues debido a la flotabilidad de las células, el viento favorece la acumulación irregular de la biomasa y la formación de espumas superficiales en el cuerpo de agua. Por ejemplo en los sitios 7 y 10 en los que se observó más concentrada la nata de cianoprocariontes. Esto ya ha sido observado en otros estudios de cianoprocariontes tóxicas (Welker, *et al.*, 1999; Znachor *et al.*, 2006), lo que sugiere que es una situación frecuente.

Los cambios en la composición de especies de Zumpango indicaron que cuando un florecimiento está compuesto de especies productoras y no productoras de toxinas, se necesita un conjunto de datos más amplio para poder establecer un patrón en la sucesión de especies, lo que se relaciona con un indicador de la época en que el florecimiento aunque sea tóxico, puede ser aceptable y en qué época podría ser peligroso, tomando como base los límites de toxicidad de MC-LR establecidos por la Organización Mundial de la salud (WHO, por sus siglas en inglés) (2003) (ver apéndice 3). Esta fue la explicación para entender que aunque la cantidad de toxina se correlacionó linealmente con las densidades poblacionales de algunas especies, no hay un reflejo estricto de esta correlación y la manera como se distribuyen en el espacio físico que ofrece el medio, especialmente las cianoprocariontes con aerotopos. Así, en tanto que los sitios de muestreo se comportan de un modo bastante independiente, es importante analizar la mayor cantidad posible de sitios.

3. Análisis de regresión entre MC-LR con la densidad celular de *Microcystis aeruginosa*, *M. flos-aquae* y *Planktothrix cf. isothrix*

Aunque Fastner *et al.* (2001) señalaron que sólo existe correlación lineal positiva entre microcistina y densidad celular o biomasa en los casos en que el florecimiento sea monoespecífico o con dominancia de sólo un taxón, pensamos que cuando se encuentran

florecimientos multiespecíficos como el de Zumpango es necesario buscar modelos que permitan predecir situaciones de riesgo, justamente para estos casos frecuentes en cuerpos de agua de abastecimiento para la población. Por otra parte, no podemos cifrar este tipo de estudios en límites tan estrechos como el que propone Fastner *et al.* (2001 op. cit.) porque también se han encontrado resultados promisorios en lagos con varias cianoprocariontes tóxicas. Rolland *et al.* (2005) encontraron en los lagos que pertenecen a la Cuenca Yamaska en Canadá, una correlación significativa entre la concentración de microcistinas y la biomasa de *Microcystis* spp. y *Anabaena* spp. de modo que el resultado puede ser característico de cada cuerpo de agua.

Los valores de R^2 para las correlaciones de los dos análisis aplicados en este estudio (*P. cf. isothrix* y *M. aeruginosa*) fueron altamente satisfactorios pues ambos resultados explican más del 80% de la variabilidad del parámetro Microcistina. Si consideramos las diferencias entre las densidades de ambas especies, esto significa que a pesar de que las distribuciones de la biomasa en el cuerpo de agua sean heterogéneas, el principio que queremos mostrar se cumple. Es decir, que la concentración de toxina sí sigue las densidades celulares de las especies que la producen y por tanto, las densidades celulares pueden indicarnos la amenaza potencial de toxina que podría haber en un cuerpo de agua. Al usarlo como parámetro en nuestros análisis, hemos convertido a la densidad celular en un proxy. Esto ha sido importante pues si como proponemos en este trabajo, se requiere el análisis de un número elevado de muestreos, utilizando nuestros mismos métodos químicos y una infraestructura altamente especializada, se eleva tanto el costo de la evaluación que vuelve prohibitivo un monitoreo sistemático de los cuerpos de agua.

Conclusiones

- La cuantificación de toxinas intracelulares como la MC-LR en florecimientos de cianoprocariontes nos indica la cantidad potencial que se puede liberar al agua. Esta cuantificación es trascendente en cuerpos de agua como el lago de Zumpango, por la estrecha relación que tiene el agua para los habitantes de la región, que implica además de aspectos de salud, una importancia económica debido a la pesca y al uso que se le da como centro de recreación y de abastecimiento para el riego de cultivos y para consumo por el ganado.
- Las observaciones de la diversidad de cianoprocariontes que componen el florecimiento del lago de Zumpango mostraron presencia de especies no tóxicas tan abundantes como las tóxicas (Tabla 4). Concluimos que si un florecimiento de cianoprocariontes muestra esta combinación de cianoprocariontes, se requiere estudiar de manera independiente la relación que existe entre la densidad celular de cada especie y la cantidad de MC-LR que produce, porque los cambios en la densidad celular planctónica total, no corresponderán con los cambios en la cantidad de toxina intracelular total, que es lo que se obtiene del análisis químico.
- A partir de ecuaciones polinomiales pudimos ver que hay una variación de la cantidad de toxina y densidad celular dentro del lago de Zumpango. En tanto que en la localidad hay una acumulación diferente de la nata de cianoprocariontes entre los sitios, concluimos que se necesita ampliar el muestreo en todo el lago y realizar monitoreos constantes para poder determinar tanto los cambios en la composición de especies de cianoprocariontes como las variaciones espaciales en las densidades poblacionales. En el caso del lago de Zumpango, lo conducente será establecer modelos para la predicción de cantidad de toxina en cada época del año y composición de especies, para plantear algunas medidas de prevención para evitar daños a la salud.
- La concentración de toxina intracelular determinada en este estudio siguió las densidades celulares de las especies que la producen y por tanto, la cuantificación de las densidades celulares de las cianoprocariontes sí puede indicarnos la amenaza potencial de toxina que podría haber en un cuerpo de agua.

Referencias

Arzate, M.A., Olvera, R. & Martínez, F. 2010. Microcystin toxigenic strains in urban lakes: a case of study in Mexico city. *Ecotoxicology* 19 (6): 1157-1165.

Azevedo, S.M.F.O., Carmichael, W.W., Jochimsen, E.M., Rinehart, K.L., Lau, S., Shaw, G.R., Eaglesham, G.K. 2002. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Carcaru- Brazil. *Toxicology* 181-182: 441-446.

Barco, M., Flores, C., Rivera, J. & Caixach, J. 2004. Determination of microcystin variants and related peptides present in a water bloom of *Planktothrix (Oscillatoria) rubescens* in a Spanish drinking water reservoir by LC/ESI-MS. *Toxicon* 44 (8): 881-886.

Barrera, J.M. Aguas negras matan a peces en la laguna de Zumpango. Periódico El Universal, sección "Estado de México" México, Martes 8 de junio de 2010. Fecha de consulta: enero, 2013. Disponible en:

<http://www.eluniversal.com.mx/notas/686306.html>

Burch, M. 2008. Effective doses, guidelines and regulations. En: Hudnell, H. Editor. Cyanobacterial harmful algal blooms: State of the science and research need. Springer, New York. 913 pp.

Briand, E., Gugger, M., François, J., Bernard, C., Humbert, J-F. & Quiblier, C. 2008. Temporal variations in the dynamics of potentially microcystin-producing strains in a bloom-forming *Planktithrix agardhii* (cyanobacterium) population. *Applied and environmental microbiology* 74 (12): 3839-3848.

Carmichael, W.W. 1992. Cyanobacteria secondary metabolites- the cyanotoxins. *Journal of applied microbiology* 72 (6): 445-459.

Carrasco, D., Moreno, E., Sanchis, D., Wörmer, L., Paniagua, T., Del Cueto, A. & Quesada, A. 2006. Cyanobacterial abundance and microcystin occurrence in Mediterranean water

reservoirs in Central Spain: microcystins in the Madrid area. *European Journal of Phycology* 41 (3): 281-291.

Christiansen, G., Fastner, J., Erhard, M., Börner, T. & Dittmann, E. 20003. Microcystin biosynthesis in *Planktothrix*: genes, evolution and manipulation. *Journal of bacteriology* 158 (2): 564-572.

Costa, I.A.S., Azevedo, S.M.F.O., Senna, P.A.C., Bernardo, R.R., Costa, S.M. & Chellappa, N.T. 2006. Occurrence of toxin-producing cyanobacteria blooms in a Brazilian semiarid reservoir. *Brazilian Journal of Biology* 66 (1b): 211-219.

Dawson, R.M. 1998. The toxicology of microcystin. *Toxicon* 36 (7): 953-962.

Dokulil, M. & Teubner, K. 2000. Cyanobacterial dominance in lakes. *Hydrobiologia* 438: 1-12.

Domínguez, I.E. 2006. Estudio de la diversidad de zooplancton y fitoplancton de la laguna de Zumpango (Estado de México) para su uso en la biomanipulación. Tesis de Maestría en ciencias biológicas UNAM. 69 pp.

Engelhardt, H. & Aitzetmüller, K. 1986. Practice of high performance liquid chromatography: applications, equipment and quantitative analysis. Quantitative analysis in HPLC. Springer. Germany. 461 pp.

Ernst, B., Hitzfeld, B. & Dietrich, D. 2001. Presence of *Planktothrix* sp. and cyanobacterial toxins in lake Ammersee, Germany and their impact on whitefish (*Coregonus lavaretus* L.). *Environmental toxicology* 16 (6): 483-488.

Falconer, I., Bartram, J., Chorus, I., Kuiper- Goodman, T., Utkilen, H., Burch, M. & Codd, G. 1999. Safe levels and safe practices. En: Chorus, I. & Bartram, J. Editores. Toxic

cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. WHO. 400 pp.

Fastner, J., Erhard, M. & Neumann, U. 2001. Microcystin variants in *Microcystis* and *Planktothrix* dominated field samples.. En: Chorus, I. Editor. Cyanotoxins. Occurrence, causes, consequences. Springer. 357 pp.

Fastner, J., Flieger, I. & Neuman, U. 1998. Optimised extraction of microcystin from field samples- a comparison of different solvent and procedures. *Water Research*. 32 (10): 3177-3181.

Fitzgerald, D.J., Cunliffe, D.A. & Burch, M.D. 1999. Development of health alerts for cyanobacteria and related toxins in drinking water in South Australia. *Environmental Toxicology* 14(1): 203-207.

Freund, R.J., Wilson, W.J. & Ping Sa. 2006. Regression analysis. Statical modeling of a response variable. Elsevier. U.S.A. 459 pp.

González, G. y Novelo, E. 1986. Manual de herbario administración y manejo de colecciones técnicas de recolección y preparación de ejemplares botánicos. Consejo nacional de la Flora de México. En Lot. A. y F.

H. Ayuntamiento del Estado de México. 2003. Manifestación de impacto ambiental modalidad particular del sector hidráulico. Proyecto ecoturístico Laguna de Zumpango.

Halstvedt, C., Rohrlack, T., Ptacnik, R. & Edvardsen, B. 2008. On the effect of abiotic environmental factors on the production of bioactive oligopeptides in field populations of *Planktothrix* spp. (Cyanobacteria). *Journal of plankton research* 50 (5): 607-617.

Harada, K-I. 2004. Production of secondary metabolites by freshwater cyanobacteria. *Chemical and pharmaceutical bulletin* 52 (8): 889-899.

Harada, K., Murata, H., Qiang, Z., Suzuki, M. & Kondo, F. 1996. Mass spectrometric screening method for microcystins in cyanobacteria. *Toxicon*. 34 (6): 701-710.

Heisler, J. Glibert, P. M., Burkholder, J.M., Anderson, D.M., Cochlan, W., Dennison, W.C., Dortch, Q., Gobler, C.J., Heil, C.A., Lewitus, A., Magnien, R., Marchall, H.G., Sellner, K., Stockwell, D.A., Stoecher, D.K. & Suddleson, M. 2008. Eutrophication and harmful algal blooms: a scientific consensus. *Harmful algae* 8 (1): 3-13.

Hitzfeld, B., Höger, S. J. & Dietrich, D.R.. 2000. Cyanobacterial toxins: removal during drinking water treatment, and human risk assessment. *Environmental health perspectives* 108 (1): 113-122.

INEGI. 2005. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Zumpango, México.

Janse, I., Kadinaal, W.E., Meima, M., Fastner, J., Visser, P. M. & Zwart, G. 2004. Toxic and nontoxic *Microcystis* colonies in natural populations can be differentiated on the basis of rRNA gene internal transcribed spacer diversity. *Applied and environmental microbiology*. 70 (7): 3979-3987.

Kim, B-H., Hwang, S-J., Park, M-H. & Kim, Y-J. 2010. Relationship between cyanobacterial biomass and total microcystin LR levels in drinking and recreational water. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 85 (5): 457-462.

Komarek, J. & Anagnostidis, K. 2005. Cyanoprokaryota, 2. Teil/second part. Subwasserflora von mitteleuropa. Elsevier. Volume 19/2.

Komárek, J. & Komárková, J. 2004. Taxonomic review of the cyanoprokaryotic genera *Planktothrix* and *Planktothricoides*. *Czech Phycology, Olomouc* 4: 1.18.

Komárek, J. & Komárková-Legnerová, J. 2002. Contribution to the knowledge of planktic cyanoprokaryotes from central Mexico. *Preslia, Praha* 74:207-233.

Kotak, B., Angeline, K-Y., Prepas, E.E., Kenefick, S.L. & Hrudey, S.E. 1995. Variability of the hepatotoxin microcystin LR in hypereutrophic drinking water lakes. *Journal of Phycology* 31: 248-263.

Lawton, L. & Edwards, C. 2001. Purification of microcystis. *Journal of chromatography A* 912: 191-209.

Lawton, L.A., Edwards, C. & Codd, G.A. 1994. Extraction and high- performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters. *Analyst* 119: 1525-1530.

Lawton, L., Marsalek, B., Padisák, J. & Chorus, I. 1999. Determination of cyanobacteria in the laboratory. En: Chorus, I. & Bartram, J. Editores. Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. WHO. 400 pp.

Long, B.M., Jones, G.J. & Orr, P.T. 2001. Cellular microcystin content in N-limited *Microcystis aeruginosa* can be predicted from growth rate. *Applied and environmental microbiology* 67 (1): 278-283.

Lucena E. 2008. Aspectos sanitarios de las cianotoxinas. *Higiene y sanidad ambiental* 8: 291-302.

Messineo, V., Matteri, D., Melchiorre, S., Bogialli, S., Salzano, R., Mazza, R., Capelli, G. & Bruno, M. 2006. *Microcystis* diversity in a *Planktothrix rubescens* population from lake Albano. *Toxicon* 48 (2): 160-174.

Millie, D.F., Fahnenstiel, G.L., Bressie, J.D., Pigg, R.J., Rediske, R.R., Klarer, D.M., Tester, P.A. & Litaker R.W. 2009. Late-summer phytoplankton in western Lake Erie (Laurentian

Grat Lakes): bloom distributions, toxicity, and environmental influences. *Aquatic Ecology* 43 (4): 915-934.

Moreno, I., Repetto G. y Cameán, A. 2003. Interés toxicológico de las microcistinas. *Revista de toxicología* 20: 159-165.

Mur, L., Skulberg, O. & Utkilen, H. 1999. Cyanobacteria in the environment. En: Chorus, I. & Bartram, J. Editores. Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. WHO. 400 pp.

McElhiney, J. & Lawton, L.A. 2005. Detection of the cyanobacterial hepatotoxins microcystins. *Toxicology and applied pharmacology* 203 (3): 219-230.

McClave, J.T., Sincich, T. & Mendenhall, W. 2006. Statistics. Prentice Hall. Decimal edition. USA. 835 pp.

Paerl, H.W. & Millie, D.F. 1996. Physiological ecology of toxic aquatic cyanobacteria. *Phycologia* 35 (6S): 160-167.

Park, H-D., Iwami, C., Watanabe, M.F., Harada, K., Okino, T., Hayashi, H. 1998. Temporal variabilities of the concentrations of intra and extracellular microcystin and toxic *Microcystis* species in a hypertrophic lake, Lake Suwa, Japan (1991-1994). *Environmental toxicology and water quality* 13(1): 61-72.

Pérez, D.S., Soraci, A.L. y Tapia, M.O. 2008. Cianobacterias y cianotoxinas: rol de las microcistinas en la salud humana y animal y su detección en muestras de agua. *Analecta veterinaria* 28 (1): 48:56.

Purdie, E., Young, F. M., Menzel, D. & Codd, G.A. 2009. A method for acetonitrile-free microcystin analysis and purification by high-performance liquid chromatography, using methanol as mobile phase. *Toxicon* 54: 887-890.

Prakash, S., Lawton, L. & Edwards, C. 2009. Stability of toxigenic *Microcystis* blooms. *Harmful algae* 8 (3): 377-384.

Rinta-Kanto, J.M., Konopko, E.A., DeBruyn, J.M., Bourbonniere, R.A., Boyer, G.L. & Wilhelm, S.W. 2009. Lake Erie *Microcystis*: relationship between microcystin production, dynamics of genotypes and environmental parameters in a large lake. *Harmful algae*. 8 (5): 665-673.

Rivasseau, C., Martins, S. & Hennion, M-C. 1998. Determination of some physicochemical parameters of microcystins (cyanobacterial toxins) and trace level analysis in environmental samples using liquid chromatography. *Journal of chromatography A* 799 (1-2): 155-169.

Rivera, P., Medina, R. y Rosas, N. 2005. Conservación de agua y suelo en Zumpango, Estado de México. Anuario IMTA. 134-140.

Rolland, A., Bird, D. & Giani, A. 2005. Seasonal changes in composition of the cyanobacterial community and the occurrence of hepatotoxic blooms in the Eastern townships, Québec, Canada. *Journal of plankton research* 27 (7): 683-694.

Roset, J. Aguayo, S. y Muñoz, M. J. 2001. Detección de cianoprocariontes y sus toxinas. Una revisión. *Revista de toxicología*. 18: 65-71.

Sangolkar, L.N., Maske, S. & Chakrabarti, T. 2006. Methods for determining microcystins (peptide hepatotoxins) and microcystin-producing cyanobacteria. A review. *Water research*. 40 (19): 3485-3496.

Sant'Anna, C., Azevedo, M.T., Senna, P.A., Komàrek, J. & Komàrková, J. 2004. Planktic cyanobacteria from Sao Paulo state, Brazil: Chroococcales. *Revista Brasileira de Botanica* 27 (2): 213-277.

Sivonen, K. & Jones, G. 1999. Cyanobacterial toxins. En: Chorus, I. & Bartram, J. Editores. Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. WHO. 400 pp.

Thermo scientific. Proteomics: Sample identification. [en línea][fecha de revisión: enero 2012] Disponible en:

<http://www.dionex.com/en-us/markets/life-science/protein-sciences/proteomics/lp-80196.html>

Vasconcelos, V., Martins, A., Vale, M., Antunes, A., Azevedo, J., Welker, M., Lopez, O. & Montejano, G. 2010. First report on the occurrence of microcystins in planktonic cyanobacteria from Central Mexico. *Toxicon* 56 (3): 425-431.

Vasconcelos, V., Sivonen, K., Carmichael, W.W. & Namikoshi, M. 1996. Hepatotoxic microcystin diversity in cyanobacterial blooms collected in Portuguese freshwaters. *Water Research* 30 (10): 2377-2384.

Waters. Identifying and quantitating compounds [en línea] [fecha de consulta: enero, 2013]. Disponible en:

http://www.waters.com/waters/nav.htm?locale=es_ES&cid=10049064

Welker, M., Hoeg, S. & Steinberg, C. 1999. Hepatotoxic cyanobacteria in the shallow lake Müggelsee. *Hydrobiologia* 408-409 (0): 263-268.

Wiedner, C., Visser, P.M., Fastner, J., Metcalf, J.S., Codd, G.A. & Mur, L.R. 2003. Effect of light on the microcystins content of *Microcystis* strain PCC 7806. *App. and Environ. Microbiology* 69 (3): 1481-1481.

WHO. 2003. Algae and cyanobacteria in fresh water. En: Guidelines for safe recreational water environments. Vol. 1: Coastal and freshwater. World Health Organization, Geneva. 253 pp.

Xie, L. & Park, H-D. 2007. Determination of microcystins in fish tissues using HPLC with a rapid and efficient solid phase extraction. *Aquaculture* 271 (1-4): 530-536.

Znachor, P., Jurczak, T., Komárková, J., Jezberová, J., Mankiewicz, J., Kastovská, K. & Zapomelová, E. 2006. Summer changes in cyanobacterial bloom composition and microcystin concentration in eutrophic Czech reservoirs. *Environmental Toxicology* 21 (3): 236-243.

Apéndice 1

Características generales de las cianotoxinas

Se nombra cianotoxinas a las toxinas producidas por las cianoprocariontes formadoras de florecimientos y se dividen usualmente por su actividad biológica en hepatotoxinas y neurotoxinas (Carmichael, 1992) y por su estructura química en péptidos cíclicos y alcaloides (Tabla 12).

Tabla 12. Tomada de Sivonen & Jones (1999). Clasificación de cianotoxinas por su composición química en péptidos cíclicos y alcaloides, órgano que afectan en mamíferos y género de cianoprocariontes de donde fueron aisladas e identificadas por primera vez.

Grupo de toxinas	Órgano blanco en mamíferos	Géneros de cianoprocariontes que las producen
Péptidos cíclicos		
Microcistinas	Hígado	<i>Microcystis, Anabaena, Planktothrix, Nostoc, Hapalosiphon, Anabaenopsis.</i>
Nodularinas	Hígado	<i>Nodularia.</i>
Alcaloides		
Anatoxina-a	Sinapsis nerviosa	<i>Anabaena, Planktothrix, Aphanizomenon.</i>
Anatoxina-a (S)	Sinapsis nerviosa	<i>Anabaena.</i>
Cilindrospermopsina	Hígado	<i>Cylindrospermopsis, Aphanizomenon, Umezakia.</i>
Saxitoxinas	Axones nerviosos	<i>Anabaena, Aphanizomenon, Lynbya, Cylindrospermopsis.</i>

1. Características de las neurotoxinas y hepatotoxinas

Neurotoxinas. Son toxinas producidas por algunas especies de los géneros

Anabaena, Aphanizomenon, Oscillatoria y *Trichodesmium*. Actúan en la transmisión del impulso nervioso y pueden provocar la muerte por hipoxia. Y son las siguientes (Hitzfeld *et al.*, 2000):

a. Anatoxina-a

Esta neurotoxina es un alcaloide, potente agonista pos sináptico colinérgico nicotínico, que causa una despolarización neuromuscular. La LD₅₀ intraperitoneal en ratón para esta

toxina purificada es de $200 \mu\text{g kg}^{-1}$, con un tiempo de sobrevivencia de unos cuantos minutos. Tienen un peso molecular de 165 Da.

b. Anatoxina- a (s)

La toxicosis asociada con la inhibición de la actividad de la acetil colinesterasa ha sido reportada en perros, cerdos y patos en algunas regiones de E.U.A. Los síntomas en cerdos incluyen hiperventilación, ataxia, diarrea, cianosis, entre otros. La LD_{50} intraperitoneal en ratón es de $40 \mu\text{g kg}^{-1}$ o cerca de diez veces más letal que la anatoxina-a. Tienen un peso molecular de 252 Da.

c. Saxitoxina (STX)

Son un grupo de neurotoxinas alcaloides que pueden ser sulfatadas (saxitoxinas- STX), individualmente sulfatadas (gonyautoxinas- GTX) o doblemente sulfatadas (C-toxinas).

También conocida como veneno paralítico de crustáceos (paralytic shellfish poisons PSPs, por sus siglas en inglés). Cuya LD_{50} intraperitoneal equivale a cerca de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$. Esta toxina actúa bloqueando de los canales de sodio en los nervios sin afectar la permeabilidad del potasio o la resistencia de la membrana.

Hepatotoxinas. Estas toxinas incluyen las cilindrospermopsinas, nodularinas y microcistinas. Son toxinas producidas especies de los géneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Oscillatoria* y *Nostoc*, producen lesiones hepáticas y pueden conducir a la muerte por hemorragia intrahepática y choque hipovolémico (baja en la presión sanguínea). En dosis letales, se han atribuido efectos carcinogénicos. Son solubles en agua, excepto por algunas microcistinas más hidrofóbicas, son capaces de penetrar directamente la membrana lipídica de los animales, plantas y bacterias.

a. Cilindrospermopsinas

Es un alcaloide guanidino cíclico con peso molecular de 415 Da. Es producido por *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Umezakia natans* y *Aphanizomenon ovalisporum*. Afecta el hígado, aunque en un extracto crudo de *C. raciborskii* inyectado o administrado oralmente a ratones induce síntomas patológicos en los riñones, timo, bazo y corazón. Tiene una LD_{50} intraperitoneal en ratón de $2100 \mu\text{g Kg L}^{-1}$ en 24 horas y $200 \mu\text{g kg L}^{-1}$ en 5-6 días.

b. Nodularinas

Son pentapéptidos con peso molecular de 824 Da., fueron identificadas por primera vez en organismos de la especie *Nodularia spumigena*. Hasta hoy se han identificado ocho nodularinas, clasificadas por la variación en su composición e isomerización de aminoácidos (Lucena, 2008). Han sido reportadas por tener efectos perjudiciales en organismos del cuerpo de agua donde se esté desarrollando el florecimiento de esta cianoprocariontes, incluyendo invertebrados y peces. El consumo de agua que contiene *N. spumigena* ha llevado a la muerte de animales domésticos y nativos por hemorragias masivas del riñón. En dosis agudas, se ha reportado que la nodularina, actúa como promotor de tumores en el hígado. Se ha encontrado acumulación de nodularinas en crustáceos y otros alimentos marinos.

Según los aminoácidos existentes en las posiciones X e Y, las microcistinas se pueden clasificar en tres grupos de toxicidad: toxicidad moderada (MC-WR), toxicidad baja (MC-LY<MC-RR<MC-M (O) (R)), toxicidad elevada (MC-LR>MC-LA>MC-YR) (Moreno *et al.*, 2003; Pérez *et al.*, 2008).

c. Microcistinas

Las microcistinas son hepatotoxinas y tienen una distribución geográficamente amplia en cuerpos de agua dulce (Hitzfeld *et al.*, 2000). Se detectaron por primera vez en *Microcystis aeruginosa*, pero son producidas por especies de cianoprocariontes de agua dulce de los géneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix*, *Oscillatoria* y *Nostoc*. Estas toxinas, péptidos cíclicos no ribosomales, son metabolitos secundarios producto de la síntesis de pigmentos fotosintéticos y se liberan al agua hasta que hay muerte celular (Carmichael, 1992; Harada, 2004; Pearl & Millie, 1996). Son sintetizados por la actividad de diez diferentes enzimas, codificadas por un grupo de genes *mcy*; tienen bajo peso molecular (900-1100 Da); una LD₅₀ de 50 µg Kg⁻¹ en ratón y su espectro de absorción UV tiene un máximo a 238 nm. Están compuestas de D-alanina en la posición 1, dos variables de L-aminoácidos en las posiciones 2 (X) y 4 (Y), gamma-unido D-ácido glutámico en la posición 6 y 3, aminoácidos inusuales: b-unido D-eitro-B-metilaspártico (MeAsp) en la posición 3; ácido (2s,3s,8s,9s)-3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4, 6-dienoico (Adda) en la posición 5; y N-metil dehidroalanina (MDha) en la posición 7 (Arzate *et al.*, 2010; Carmichael, 1992; Dawson,

1998). Actualmente se han identificado alrededor de 80 variantes, siendo más frecuentes las que se producen por sustituciones de L-aminoácidos en las posiciones 2 (X) y 4 (Y) y por desmetilaciones de los aminoácidos en la posición 3 y/o 7 (Fig. 12 y Tabla 13), aunque se han observado variaciones en cada aminoácido. La nomenclatura de las variantes de microcistinas es de acuerdo con los aminoácidos variables de las posiciones X e Y, se indican con un sufijo de dos letras, por ejemplo MC-LR (leucina en la posición 2 y arginina en la 4), MC-RR (arginina en ambas posiciones) o MC-YR (tirosina y arginina).

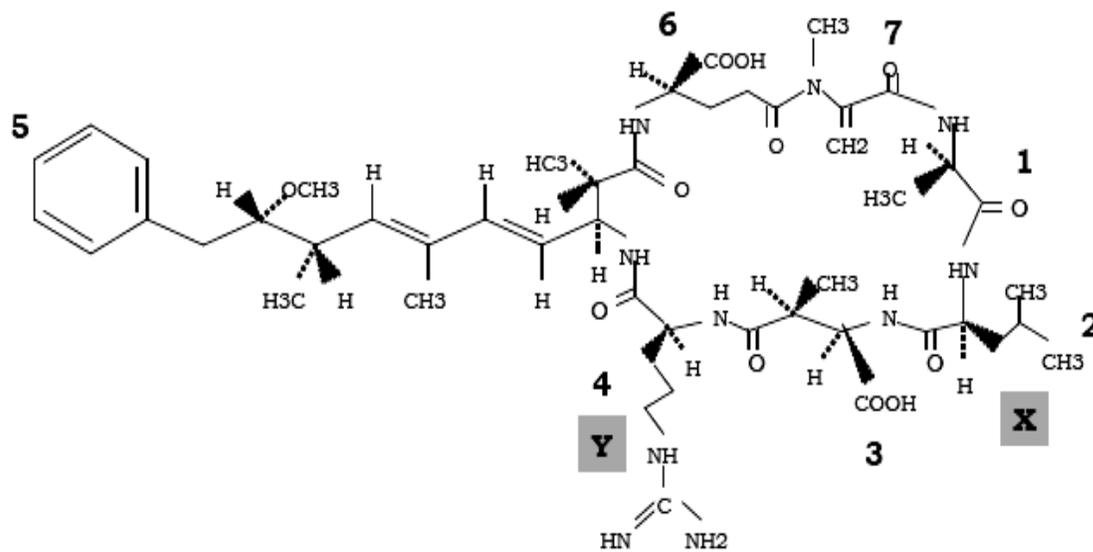


Figura 12. Tomada de Pérez *et al.*, 2008. Estructura general de la molécula de microcistina, mostrando las posiciones X e Y, donde se sustituyen los aminoácidos que son las variedades de microcistina.

Nombre	R2 (X)	R3	R4 (Y)	R7	P.M. (Da.)
MC-LA	Leucina	-	Alanina	-	909
MC-M(O)R	Metionina (O)	-	Arginina	-	1028
MC-YA	Tirosina	-	Alanina	-	959
MC-LR	Leucina	D- MEAsp/	Arginina	Mdha	995
MC-LR[D-Asp ³]	Leucina	D-Asp ²	Arginina	-	980
MC-LR[Dha ⁷]	Leucina	-	Arginina	[Dha ⁷]	980
MC-FR	Fenilalanina	-	Arginina	-	1028
MC-RR	Arginina	D-Me Asp/	Arginina	Mdha	1038
MC-RR[D-Asp ²]	Arginina	D-Asp ²	Arginina	-	1023
MC-RR[D-Asp ² ,Dha ⁴]	Arginina	D-Asp ²	Arginina	Dha ⁴	1009
MC-YR	Tirosina	D-MeAsp	Arginina	Mdha	1044
MC-WR	Triptofano	-	Arginina	-	1067

Tabla 13. Modificado de McElhiney & Lawton (2005) y Sivonen & Jones (1999). Se muestran algunas variantes de microcistina, con los aminoácidos de los radicales 2, 3, 4 y 7, estos radicales son los que varían y dan la diversidad de moléculas de microcistina. DHA= dehidroalanina, D-asp= Ácido D-aspártico.

Las microcistinas son moléculas relativamente polares, debido al contenido de grupos polares como los ácidos carboxílicos en las posiciones 3 y 6 (los cuales tienen carga negativa a un pH 7) y la presencia de arginina en posiciones 2 y/o 4, contienen partes más hidrofóbicas como el residuo Adda (ácido 3-amino-9-metoxi-2, 6, 8-trimetil-10-fenildeca-4, 6-dienoico) o los sustituyentes hidrofóbicos de los aminoácidos. Las microcistinas son hidrofóbicas, a pesar de su carácter neutral o aniónico (Rivasseau, *et al.*, 1998).

La hidrofobicidad es la tendencia de los compuestos para acumularse en las membranas y organismos vivos. Muchas variantes son hidrofóbicas por lo que no pueden pasar la membrana celular y requieren de un transportador dependiente de ATP.

Aún no se ha encontrado una causa de la síntesis de las microcistinas, o un factor por el cual se produzcan y se desconoce si la producción tiene una función en algún proceso fisiológico en las células que las producen (Wiedner *et al.*, 2003).

Las células que dañan las microcistinas son los hepatocitos y macrófagos, entran al cuerpo por el intestino, vía ácidos biliares que están en las células hepáticas y epitelio intestinal. Son hepatotóxicas en mamíferos y peces, alterando los microfilamentos de actina y provocando pérdida del soporte celular, como consecuencia, los hepatocitos se redondean,

causando la destrucción de las sinusoides hepáticas, generando hemorragia intrahepática letal, una vez en la sangre, se unen específicamente al tejido del hígado donde forman uniones con las proteínas fosfatasa 1 (PP1) y 2A (PP2), resultando en la inhibición de éstas. Esta inhibición altera el equilibrio enzimático, aumentando las fosfoproteínas que activan la cascada de las caspasas que son enzimas que activan y desencadenan el proceso de apoptosis que consiste en la muerte celular programada. También hay una reorganización del citoesqueleto porque afecta la organización de los microtúbulos y microfilamentos (Pérez *et al.*, 2008). La toxicidad crónica, se ha probado en bioensayos con ratones y ratas, y han observado daño hepático crónico por administración continua de microcistinas. En peces, la exposición crónica a florecimientos algales tóxicos, los lleva a reducción de la talla en las poblaciones.

La toxicidad aguda en humanos, se ha observado por presentar necrosis hepática aguda masiva que produce hemorragias. Los síntomas que presentan las personas que han estado en contacto con las toxinas son: irritación en la piel y ojos, alergias, náuseas, mareos y gastroenteritis aguda. Uno de los efectos al inicio de la intoxicación por microcistinas es la elevación en los niveles séricos de bilirrubina, fosfatasa alcalina, aspartato aminotransferasa (GOT) y alanina aminotransferasa (GTP) (Moreno *et al.*, 2003; Pérez *et al.*, 2008). Las vías de exposición son el contacto directo con partes expuestas del cuerpo (oídos, ojos, boca, garganta) o áreas cubiertas por alguna prenda porque las células de las cianoprocariontes se acumulan, se favorece el rompimiento celular y liberación de su contenido y la ingestión accidental: al tragar o inhalar agua (por aerosoles) o consumir alimentos en los que se hubieran acumulado (vegetales y animales), o que estén preparados con agua de un sitio contaminado, pues la ebullición no las destruye (Falconer *et al.*, 1999; Pérez *et al.*, 2008).

Algunos países han establecido sus propios valores para el consumo de agua que contiene MC-LR: España estableció $1 \mu\text{g L}^{-1}$ como el máximo nivel de microcistinas (totales) en aguas para consumo (Barco *et al.*, 2004); Canadá propuso el valor de $1.5 \mu\text{g de MC-LR L}^{-1}$ (Fitzgerald *et al.*, 1999) y Australia determinó un valor de $1.3 \mu\text{g L}^{-1}$ (Kim *et al.*, 2010).

En experimentos de laboratorio, usando bajos niveles de MC-LR ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) en aguas de reserva, encontraron que la degradación primaria de la toxina ocurrió en menos de una

semana. Fue estable durante 27 días en agua desionizada y 12 días en agua de reservorio esterilizada, indicando que la inestabilidad en agua de reservorio es debido a la biodegradación. El mecanismo de inactivación es probablemente por modificación de la cadena ADDA. Las microcistinas son estables bajo irradiación de la luz solar, aunque la radiación de la luz del sol con pigmentos contenidos en las cianoprocariontes descompone la toxina por isomerización de la doble ligadura del lado de la cadena ADDA, la vida media para este proceso fue de 10 días. Una degradación más rápida de las variedades LR y RR (en el orden de minutos), por mecanismo adicional de isomerización, se observó cuando están expuestas a la luz UV a longitudes de onda cerca de su absorción máxima de 238-254 nm (Dawson, 1998).

Apéndice 2

Descripción del método de cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas por ionización con electrospray (CLAE/ESI-EM)

La cromatografía líquida de alta eficiencia es un método de separación de componentes distribuidos en dos fases, la fase móvil son solventes bombeados a presión a través de una fase estacionaria que es una columna de materiales específicos para el componente a analizar (Fig. 16). La cromatografía en fase reversa, utiliza fases estacionarias no polares, columnas de sílica C₈, C₁₈, cianopropil, para interactuar con los grupos no polares en las moléculas que se están separando, con fases móviles compuestas por disolventes como metanol, agua, tetrahidrofurano y ácidos como el ácido trifluoroacético, fórmico, acético o bases como la tietilamina y butilamina, el gradiente tiene que cubrir un intervalo suficiente de polaridad para permitir el análisis de todas las microcistinas que varían considerablemente en sus polaridades (Harada *et al.*, 1996).

La unión de la cromatografía líquida y la espectrometría de masas combinan las ventajas de estas dos técnicas de separación y detección.

El fundamento de la CLAE/EM-ESI es que el flujo de la muestra separada en la columna de la cromatografía líquida, entra al detector de masas sin solvente (y antes de que se determine su espectro de masas, el solvente debe ser removido sin perder la muestra) y la muestra pase a través de la ionización por electrospray. Experimentalmente, el electrospray es producido aplicando un potencial eléctrico a la muestra líquida que está fluyendo hacia el capilar metálico. En cuanto el flujo pasa a través del capilar, la carga eléctrica se deposita en la superficie del líquido emergido del capilar, y las fuerzas de repulsión se producen, lo que rompe el líquido en pequeñas gotas.

Cuando las fuerzas de repulsión exceden la tensión superficial, las gotas se desintegran, produciendo iones del analito.

La muestra con el solvente, pasa a través de un capilar y al final de ese tubo se aplica un alto voltaje (3-6 kV). El líquido se evapora con temperatura y nitrógeno gaseoso en un “spray” a la salida del capilar. El alto voltaje de la punta de este capilar, atrae a los iones

carga positiva, por lo tanto, las gotas que salen del capilar están cargados con la misma polaridad que la punta. El gas nebulizante alrededor de la parte externa del capilar ayuda a evaporar las moléculas neutras del solvente de las gotas, trayendo a los iones cargados juntos hasta que la repulsión desestabiliza y rompe las gotas. Las partículas cargadas positivamente si se trabajó en modo positivo o negativo si se trabajó en modo negativo, se transportan al analizador de masa, donde son medidas las razones masa carga m/z de cada una de las moléculas. En el caso de la microcistina LR, al ionizarse en modo positivo se forma el aducto $[(MC-LR)+H]^+$ que tiene una unidad de masa más que la molécula de microcistina LR. Los estudios con EM/ESI de biopolímeros grandes como proteínas, polipéptidos y oligonucleótidos, se muestra un diagrama en la Figura 14 (Engelhardt & Aitzermüller, 1968).

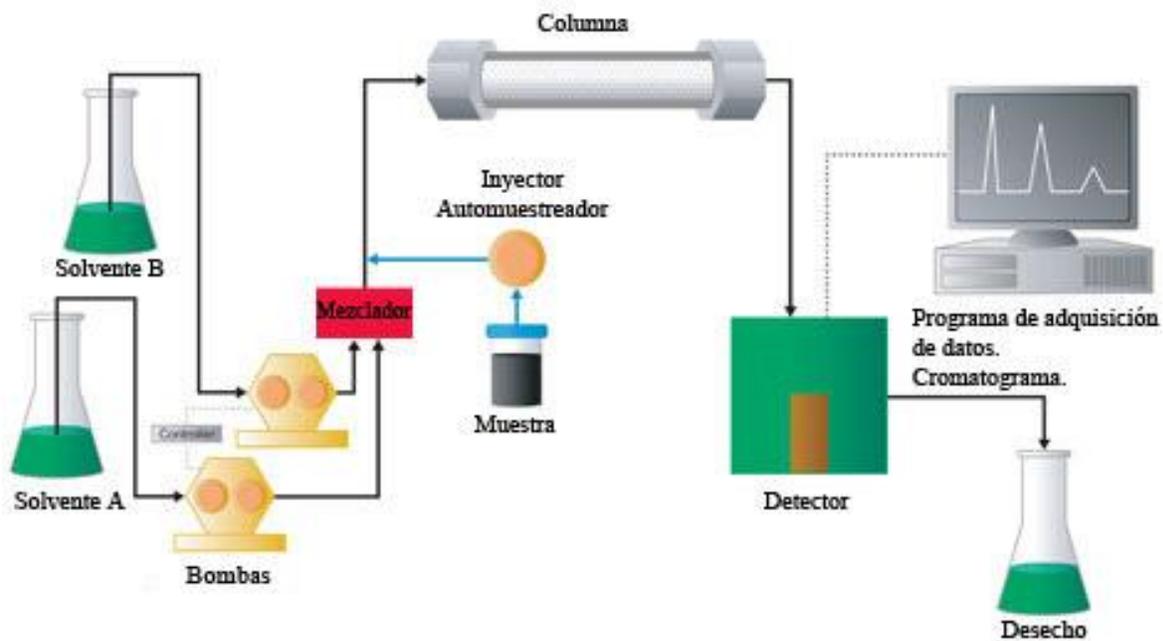


Figura 13. Tomado del apunte Identifying and quantitating compounds en: waters.com de los componentes de un equipo HPLC.

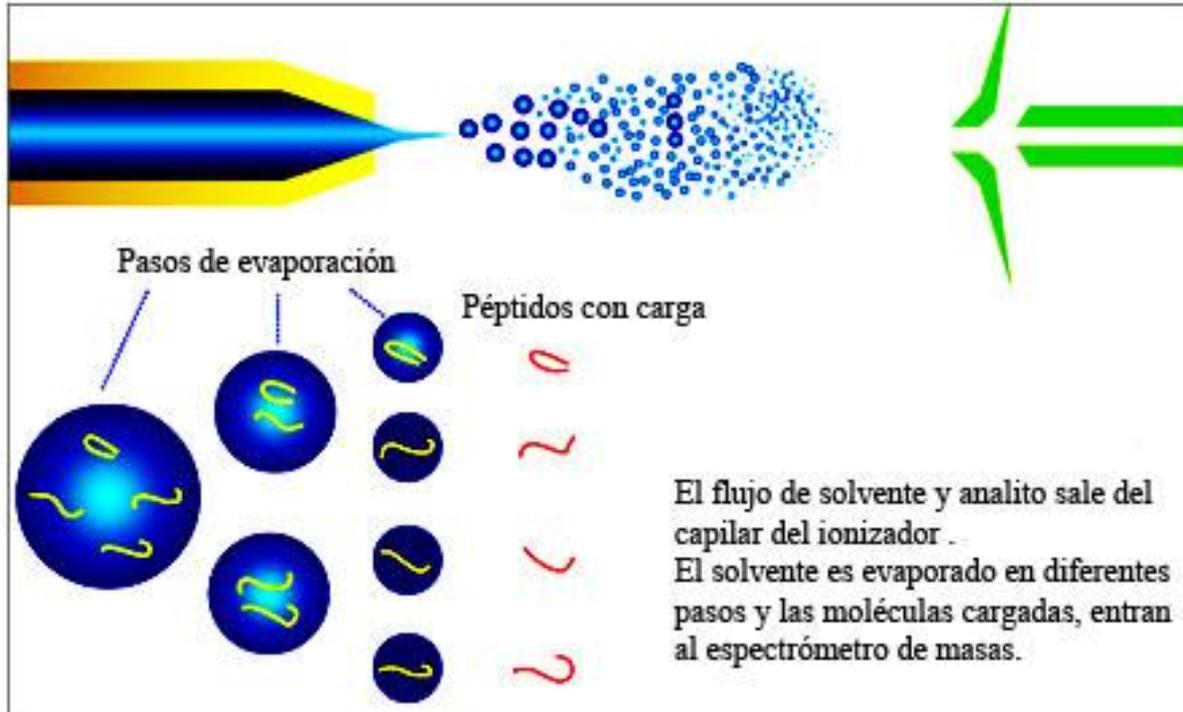


Figura 14. Diagrama de la ionización por electrospray. Tomado del apunte Proteomics, detection en dionex.com

Apéndice 3

Reportes de cuantificación de microcistinas de otros países y valores guía para el consumo del agua que las contiene

Recopilación de las cantidades de microcistina totales y algunas variantes en lagos de distintas ciudades, donde se da el número de muestras y el porcentaje tóxico de ellas, además de la concentración en peso seco y la concentración en volumen.

Tabla 14. Concentraciones de microcistinas ($\mu\text{g L}^{-1}$ o $\mu\text{g g}^{-1}$) en distintas ciudades alrededor del mundo. Tomado y modificada de Fastner *et al.*, 2001.

Ciudad	Número de muestras (% tóxico)	Concentración ($\mu\text{g g}^{-1}$ (peso seco) o $\mu\text{g L}^{-1}$)	Microcistina
Argentina	35 (97)	5.8 -2400	Totales
Brasil	7	0.08-3.70	Totales
Alemania	11 (100)	500- 6500	Totales
Alemania	129 (100)	0.14-119 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Totales
Alemania	1 (100)	14700	Totales
Brasil	50 (18)	0.003 -10.00 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Totales
Brasil	8 (6)	270-1121	Totales
Canadá	50 (37)	4-610	LR
Chile	2 (100)	8-130	Totales
Chile	1 (100)	20	Totales
China	6 (100)	24.5 -97.3	Totales
Dinamarca	296 (198)	10-1695	Totales
Japón	17 (11)	2.5- 2120	RR, YR, LR
Hungría	2 (100)	1710 -6600	Totales
Francia	25 (72)	0-5.2 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Totales
Kenya	4 (100)	310-19822	Totales
Korea	25 (100)	0-0.2 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Totales
Marruecos	9 (89)	700-8800	Totales
Marruecos	8 (100)	0-8800	Totales
Ohio	5	1200	Totales
Filipinas	3 (100)	694-4019	Totales
Filipinas	11 (55)	0- 1344	Totales
Uruguay	9 (100)	101-1074	Totales

La OMS estableció un valor guía para el consumo diario de MC-LR de $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$. En México no se ha establecido un valor para el consumo de agua que contiene MC-LR.

Algunos países han establecido sus propios valores para el consumo de agua que contiene MC-LR u otras cianotoxinas:

- España: $1 \mu\text{g L}^{-1}$ como el máximo nivel de microcistinas totales en agua para consumo (Barco *et al.*, 2004).
- Canadá propuso valor de $1.5 \mu\text{g L}^{-1}$ de MC-LR L^{-1} (Fitzgerald *et al.*, 1999).
- Australia determinó un valor de $1.3 \mu\text{g L}^{-1}$ de microcistinas totales, expresadas como equivalentes de toxicidad de MC-LR (Kim *et al.*, 2010).
- Brasil, determinó $1.0 \mu\text{g L}^{-1}$ para microcistinas, $3.0 \mu\text{g L}^{-1}$ para equivalentes de saxitoxina y $15 \mu\text{g L}^{-1}$ de cilindrospermopsina, además prohíben el uso de alguicidas y requieren de un análisis de toxinas cuando las densidades celulares exceden $10\,000 \text{ células ml}^{-1}$.
- Italia estableció $0.84 \mu\text{g L}^{-1}$ de microcistinas totales.
- Holanda $20 \mu\text{g}$ de microcistina LR L^{-1} .

Apéndice 4

Pruebas de los métodos que se utilizaron para la realización del método de extracción y cuantificación de MC-LR

1. Para la detección y cuantificación de MC-LR

- a. Se utilizó el equipo Waters 1525 Binary HPLC pump y un detector de arreglo de diodos Waters 2996 PDA UV, en el cual se inyectaron de 10 μ l de estándar de MC-LR (Fastner, *et al.* 1994) y se utilizaron las condiciones de la tabla 15.

Fase móvil	A= Acetonitrilo B= 0.1% ácido fórmico en agua
Gradiente	0-30 min A: 40 % B: 60 % 30-45 min A: 100 %
Fase estacionaria	C ₁₈ 2.1 x 100 mm
Flujo de fase móvil	0.2 ml min ⁻¹
Temperatura de la columna	
Tiempo de corrida	45 minutos

Tabla 15. Condiciones utilizadas en el equipo Waters 1525 Binary HPLC pump.

No pudimos observar el estándar con el detector UV porque las cantidades eran muy bajas para el límite de detección del aparato. Por lo que se decidió analizar tanto los extractos como el estándar de MC-LR en un cromatógrafo líquido de alta eficiencia acoplado a un detector de masas por ionización con electrospray (CLAE/EM-ESI).

b. Cambiamos algunas condiciones del CLAE-UV (Tabla 16)

Fase móvil	A= 0.1% ácido fórmico en metanol/agua (4:6) B= 0.1% ácido fórmico en metanol
Gradiente	0-30min A= 100% 30-50min B= 100%
Fase estacionaria	Columna C ₁₈ (polar) 150 x2 mm 4 μ,
Flujo de solventes	0.2 ml min ⁻¹
Volumen de la inyección	20 μl
Tiempo de corrida	50 minutos
Detector	PDA

Tabla 16. Condiciones utilizadas en Waters 1525 Binary HPLC pump.

- c. Utilizamos cromatógrafo de líquidos marca Agilent modelo 1200 con acoplado a un espectrofotómetro de masas modelo Bruker Esquire 6000 equipado con electrospray como fuente ionización y trampa de iones como analizador, con las condiciones de la tabla 17.

Fase móvil	A= 0.1% ácido fórmico en metanol/ agua B= 0.1% ácido fórmico en metanol
Gradiente	0-30 min A: 40 % B: 60 % 30-60 min A: 100 %
Fase estacionaria	C ₁₈ 2.1 x 100 mm
Flujo de fase móvil	0.2 ml min ⁻¹
Temperatura de la columna	40°C
Tiempo de corrida	45 minutos

Tabla 17. Condiciones utilizadas en el cromatógrafo Agilent modelo 1200 con acoplado a un espectrofotómetro de masas modelo Bruker Esquire 6000 equipado con electrospray

Utilizando el método de extracción de iones para poder observar el espectro del estándar de MC-LR y comparando su tiempo de retención y masa molecular con el de los extractos de las localidades. El tiempo de retención (t_r) fue de 21 minutos.

2. Métodos de extracción de MC-LR

a. Siguiendo a Prakash *et al.* (2009):

1. Utilizar 100 mg de material liofilizado para la extracción en 50 ml de metanol/agua al 70%.
2. Sonicar durante 15 minutos.
3. Agitación durante una hora.
4. Centrifugar 5 minutos a 8830 g o 5 min a 10119 r.p.m.
5. El sobrenadante se recupera. Y se re-extrae dos veces más
6. Se evapora y se resuspende en 1 ml de metanol/ agua al 80%:

b. Se hicieron cambios en el método de extracción de Prakash, *et al.* (2009):

1. Se utilizaron 50 mg de material liofilizado y se extrajeron en 5 ml de metanol /agua al 75%. Se disminuyó la cantidad de material liofilizado y solvente para extraer y concentrar el extracto desde el inicio del proceso.
2. Agitación durante 30 minutos
3. El extracto se inyectó sin evaporar, filtrando previamente con filtros de 0.45 μm . Se inyectaron directamente en al cromatógrafo de líquidos sin evaporar para evitar la pérdida de la microcistina en este proceso.

c. Se hizo un procedimiento de limpieza del extracto con cartuchos NH_2 :

1. Acondicionar el cartucho dos veces con metanol y dos veces con acetato de amonio*.
2. Se mezclan 0.5 ml de extracto con acetato de amonio y se recuperó esta fracción.
3. Se lavó con metanol/ acetato de amonio (50:50) y se recuperó la fracción.
4. Se lavó con metanol/ acetato de amonio (80:20) y se recuperó la fracción.
5. Se eluye con metanol 100%.

*Los lavados para el acondicionamiento del cartucho son con 2 ml de solvente (aproximadamente el doble del volumen del cartucho).

En las fracciones que inyectamos, no salieron picos de nuestro interés.

Excepto en la fracción 50:50 (acetato de amonio/ metanol), donde salió un pico con tiempo de retención a los 20.660 minutos.

d. A partir del extracto hecho con el método modificado de Prakash, *et al.* (2009), se limpió el extracto con cartuchos C₁₈:

1. Se lavó el cartucho con metanol y después agua*
2. Se mezcló 1 ml de extracto con metanol 100%
3. Se lavó con metanol/agua 80%
4. Se lavó con metanol/agua 50%
5. Se lavó con metanol/agua 20%

*El cartucho se lava con 2 ml de solvente, que es aproximadamente el doble de volumen del cartucho.

La limpieza de extracto se hizo con dos cartuchos, uno donde las fracciones de metanol tenían 0.1% de ácido fórmico y en otro sin ácido fórmico.

Se inyectaron las ocho fracciones y no se observó un pico al tiempo de retención esperado.

e. A partir del extracto hecho con el método modificado de Prakash, *et al.* (2009), se limpió el extracto con cartuchos C₁₈ y se aumentó el número de fracciones con metanol/agua y se comenzó la limpieza con la fracción de menor proporción de metanol:

1. 20%
2. 30%
3. 50%
4. 80%
5. 100%

No se observó el pico de la MC-LR en las fracciones.

Se hizo una dilución de 160 µl de estándar de MC-LR + 600 µl de agua, el cual se analizó con el CLAE-EM/ESI, su t_r 20.744 minutos, en la réplica de esta inyección se obtuvo un t_r de 20.748 minutos.

Se inyectó una dilución de 1µl de estándar de MC-LR + 19 µl metanol. El cromatograma mostró un pico a los 20.721 minutos.

f. Método de extracción por dispersión de matriz fase sólida (DMFS) (Xie & Park, 2007):

1. Se maceraron 65 mg de liofilizado 130 mg de sílica gel.
2. Este macerado se puso en un cartucho hecho con una pipeta reteniendo el contenido con algodón.
3. Se lavó con 2 ml de hexano.
4. Se lavó con cloroformo hasta que el residuo ya no tuvo color verde.
5. Para la elución se utilizaron 3 ml de metanol 70%.

Se cambió el gradiente porque al tener un gradiente con agua, la columna se puede dañar.

g. Limpieza de extracto de acuerdo con Xie & Park (2007):

1. Los cartuchos C₁₈ se acondicionaron con metanol y después agua.
2. Se tomaron 2 ml del extracto y se agregaron 2-4 ml de agua al cartucho.
3. Se lavó con 10 ml de metanol/agua 5%.
4. Después se lavó con 12 ml de metanol 100%. Esta fracción se evaporó a sequedad y se resuspendió en 0.5 ml de metanol.
5. Se hizo una columna con una pipeta con sílica gel acondicionada con 4 ml de metanol.
6. 0.5 ml de extracto se completaron con los 4 ml de metanol 100%.
7. Los El extracto eluyó con metanol al 70%.
8. Esta fracción se evaporó a sequedad y se resuspendió en 200 µl de metanol al 70% para inyectar al cromatógrafo de líquidos.

Apéndice 5

Prueba de hipótesis para demostrar que la ordenada al origen es significativamente igual a cero ($b=0$) en la curva de calibración de la MC-LR.

$H_0 b \neq 0$

$H_1 b = 0$

Para esto se hizo una prueba t, donde se obtuvo el valor de t calculado para la ordenada al origen que dio un valor de -1.56586527 como se muestra en la tabla 18. También se muestra la curva de regresión ajustada con los valores calculados y observados de y (Fig. 14).

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>
Intercepción	-31417238.14	20063819.5	-1.56586527	0.257869925
Variable X 1	17992916612	531503562.6	33.85286173	0.000871448

Tabla18. Estadística de regresión de la curva de calibración de la MC-LR.

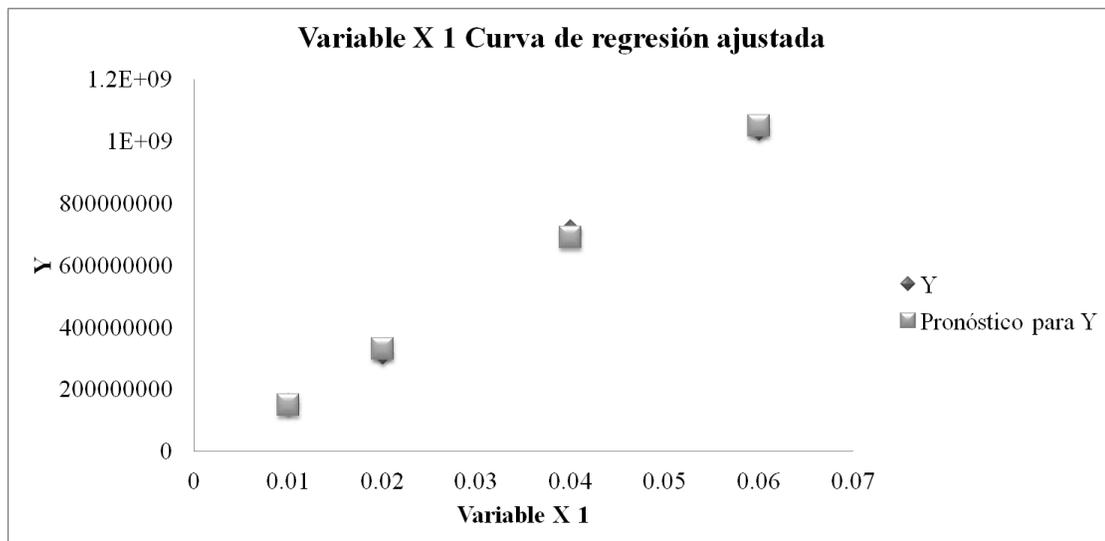


Figura 14. Gráfica con los valores observados y calculados de los valores de y (área) de la curva de calibración de la MC-LR.

Para la prueba de hipótesis se calculó el valor de t y se comparó con el valor de t de tablas:

t calculado= -1.56586527

t de tablas = 4.3 con dos grados de libertad

Si el valor de t de tablas es mayor que el valor de t calculado, entonces se rechaza la H_0 , en nuestro caso se rechazaría que $b \neq 0$ y se acepta que $b = 0$.

Apéndice 6

Recomendaciones del procedimiento de extracción de la microcistina LR

1. Una vez que se tienen las muestras liofilizadas, se recomienda mantenerlas en un frasco de vidrio con tapa de rosca, limpio y seco, y selladas con parafilm. Esto para mantenerlas libre de humedad, en caso de que no se procesen inmediatamente después del proceso de liofilización.

Así mismo, es necesario guardarlas cubiertas (puede ser con aluminio), para evitar que tengan contacto con la luz, porque esto degrada las toxinas. Y mantenerlas en refrigeración, lo común es a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Lawton *et al.*, 1999).

2. Durante el proceso de extracción, los sobrenadantes que se obtienen entre cada proceso de sonicación, agitación y centrifugación deben mantenerse en oscuridad y refrigeración. Cuando se tengan los extractos con el volumen final de 15 ml, es mejor, hacer el proceso de centrifugación antes de que la muestra se analice, debido a que puede haber partículas que se resuspendan y provocar un tapón en la columna.
3. Se recomienda que el estándar este almacenado a una temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y tapado para que no tenga contacto con la luz. Se debe utilizar inmediatamente, por ejemplo, para la construcción de curvas de calibración o como estándar interno, porque hay evaporación del solvente en el que está disuelto, provocando la concentración del compuesto.

O bien, se pueden hacer alícuotas, para evitar el continuo congelamiento y descongelamiento del estándar original.

Apéndice 7

Apunte sobre el ajuste de curvas (Freund *et al.*, 2006; McClave *et al.*, 2006)

- **Regresión lineal simple**

Un modelo de regresión es una aplicación de un modelo lineal donde la variable respuesta (dependiente) es identificada con valores numéricos de una o más variables cuantitativas llamadas factor o variables independientes.

La porción estocástica o estadística del modelo especifica que las observaciones individuales de las poblaciones se distribuyen normalmente con respecto a las medias.

El propósito de un análisis estadístico de modelo de regresión no es principalmente hacer inferencias sobre las diferencias de las medias de estas poblaciones, pero sí hacer inferencias acerca de la relación de la media de la variable respuesta con las variables independientes. Estas inferencias son hechas a través de los parámetros del modelo. El resultado de esta relación puede ser utilizada como predicción o explicación del comportamiento de la variable respuesta.

El modelo de regresión más simple es el modelo de regresión lineal simple, que se escribe de la siguiente manera:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x + \epsilon$$

Donde

Y es la variable dependiente o variable respuesta (variable que será modelada).

X es la variable independiente o variable predictiva (variable usada como predictor de y).

β_0 (beta cero) es la intersección con y , esto quiere decir el punto al cual la línea intersecciona o corta al eje de las y .

β_1 (beta uno) es la pendiente, es decir, la cantidad a la que incrementa o decrementa en el componente determinístico de y por cada unidad.

Este modelo tiene una parte determinística y una parte aleatoria, la parte determinística del modelo es:

$$\beta_0 + \beta_1 x$$

Y la parte aleatoria es:

$$\epsilon$$

Lo que satisface las propuestas generales de la estadística.

- Regresión polinomial. Es una forma de regresión lineal en el cual la relación entre la variable independiente x y la variable dependiente y es modelada en el orden polinomial n -ésima. La regresión polinomial ajusta a una relación no lineal entre el valor de x y el valor correspondiente de y , denotado por $E(y/x)$, y ha sido usado para describir fenómenos no lineales como el crecimiento de tejidos, la distribución de isótopos en sedimentos o la progresión de epidemias.

Aunque la regresión polinomial ajusta a modelos no lineales en los datos, como problema de estimación estadística es lineal, en el sentido de que la función de regresión $E(y/x)$ es lineal en los parámetros desconocidos que son estimados a partir de los datos. Por esta razón la regresión polinomial es considerada como un caso especial de la regresión lineal.

Un modelo polinomial con una variable independiente x se escribe de la siguiente manera:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x + \beta_2 x^2 + \beta_3 x^3 + \beta_m x^m + \dots + \epsilon$$

Donde

Y = es la variable respuesta

x^m = es la variable independiente; m son los coeficientes para la i -ésima potencia de x

β_i $i=0, 1, 2, 3, \dots$,

ϵ = es el error aleatorio, definido como usual

Como se escribe el modelo, es llamado de orden polinomial a la m -ava potencia y m puede tomar como cualquier valor, aunque los valores menores que 3 y 4 son más utilizados en la práctica.

Razones para la utilización de un modelo polinomial:

- Es fácil de utilizar porque puede ser utilizado como una regresión lineal
- De acuerdo con varias series de expansión, cualquier función continua puede ser aproximada sobre un rango limitado por una función polinomial, por ejemplo la correlación que hicimos para explicar la microcistina LR en función de la densidad celular de las especies que conforman el florecimiento.
- Permite un ajuste secuencial de incremento en la complejidad de las curvas. Las figuras básicas de la curva polinomial son lineales, cuadráticas, cúbicas y de cuarto orden (llamado cuartica).

Una característica importante del ajuste polinomial es que la especificación de m es el grado de polinomialidad. De hecho, si $m = n - 1$, la regresión tendrá un ajuste perfecto.

- Los valores de las potencias de una variable tienden a estar altamente correlacionados. Estas correlaciones tienden a llegar a ser más altas (1) cuanto más pequeño es el rango de la variable comparado con la media y (2) se utilizan potencias más altas. En otras palabras, hay multicolinealidad extrema entre las variables en una regresión polinomial. Porque en una regresión polinomial estamos interesados en la estimación de respuestas más que en la interpretación de coeficientes, esta multicolinealidad no representa problemas.

• **La ecuación para un modelo cuadrático es:**

$$y = \beta_0 + \beta_1 x + \beta_2 x^2 + \epsilon$$

β_0 es la intersección de la curva con y

β_1 es el parámetro de cambio

β_2 es la tasa de curvatura

El término x^2 , llamado término cuadrático (o término de segundo orden), permite hipotetizar una curva en la gráfica de respuesta al modelo relacionando y con x .

Cuando la curva se abre hacia arriba, el signo de β_2 es positivo; cuando la curva se abre hacia abajo, el signo de β_2 es negativo.

- **La ecuación para un modelo cúbico es:**

$$y = \beta_0 + \beta_1 x + \beta_2 x^2 + \beta_3 x^3 + \epsilon$$

Y se le llama ajuste de tercer orden.

Apéndice 8

Manejo de pruebas de hipótesis. (McClave *et al.*, 2006)

Para decidir entre dos hipótesis que afectan a un cierto parámetro de la población, se usa el contraste de hipótesis a partir de la información de la muestra. Para elegir una de estas dos hipótesis es necesario conocer una medida del error cometido, es decir, cuantas veces de cada cien nos equivocamos.

- **Hipótesis nula (H0):** una teoría acerca de los valores de una o más poblaciones de parámetros. Es lo contrario de lo que se sospecha que va a ocurrir y será aceptada a menos que los datos prueben que es falsa.

- **Hipótesis alternativa (H1):** una teoría que contradice la hipótesis nula. Es lo que se sospecha que va a ser cierto y será aceptada solo si los datos dan evidencia suficiente de que es verdadera.

Podemos aceptar una hipótesis cuando en realidad no es cierta, entonces cometeremos errores, que podrán ser de dos tipos:

Conclusión	Estado verdadero de la naturaleza	
	H0 verdadera	H1 verdadera
Aceptar H0 (Asumir H0 como verdadera)	Decisión correcta	Error Tipo II (probabilidad β)
Rechazar H0 (asumir H1 como verdadera)	Error Tipo I (probabilidad α)	Decisión correcta

Tabla 19.Tipos de errores en un análisis de correlación.

De los dos, el más importante es α , llamado nivel de significación y que informa de la probabilidad de estar equivocado si se acepta la hipótesis alternativa, pero permite que en caso de aceptar la H1 sin que sea cierta, el margen de error sea muy pequeño. El valor del nivel de significación suele ser un 5%, lo que significa que sólo 5 de cada 100 veces se aceptará la hipótesis alternativa cuando la cierta es la nula.

Para rechazar la H_0 tenemos una región de rechazo, que son los valores numéricos de la prueba estadística para la cual esta hipótesis será rechazada. La región de rechazo es escogida a partir de que la probabilidad es α que contendrá la prueba estadística cuando la hipótesis nula sea verdadera, por lo tanto se tratará de un error de Tipo I. El error de α usualmente es pequeño (0.01, 0.05 o 0.10) y es referido como el nivel de significancia de la prueba.

Por lo tanto:

- Si el valor numérico de la prueba estadística cae en la región de rechazo, la H_0 será rechazada y se concluirá que la H_1 es verdadera. Se sabe que el proceso de la prueba de hipótesis llevará a una conclusión incorrecta (error Tipo I) solo cuando el 100% de α en el momento en que H_0 es verdadera.
- Si la prueba estadística no cae en la región de rechazo, no se rechaza H_0 . Por lo tanto, se reservará el juicio acerca de cuál hipótesis es verdadera. No se concluye que la hipótesis nula es verdadera porque no se sabe (generalmente) la probabilidad β de que el procedimiento de la prueba llevará a una aceptación incorrecta de la H_0 .