



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Unidad de Morfología y Función
Laboratorio de Zoología Acuática

Respuestas demográficas de *Moina macrocopa* (Straus, 1820) en presencia de cianotoxinas de la Pista de remo y canotaje “Virgilio Uribe”, Xochimilco.

TESIS

Para obtener el grado académico de

Biólogo

PRESENTA

David Alejandro Araiza Vázquez

Director de Tesis: Nandini Sarma
Los Reyes Iztacala, Edo. De México, 2017





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.

Agradecimientos

Primeramente, quiero agradecer y dedicar este trabajo a mis padres Donal y Rosa quienes fueron mi apoyo y sostén durante toda mi vida y mi vida académica sin ello nada de esto hubiera sido posible de lograr ya que con su amor y esfuerzo lograron que el día de hoy yo este redactando estas palabras. Les agradezco por ser el principal motor de mí vida y por hacer realidad este momento. Los amo.

También y para nada menos importante quiero agradecer a mi hermano Cristian por ser mi compañero de vida y estar en todos los momentos de felicidad y de tristeza a mi lado.

A mis abuelos Rosa y Keko que fueron mi apoyo durante mi carrera y que siempre estuvieron allí cuando los necesite. Gracias por estar al pendiente de mí y preocuparse por mi escuela y mi bienestar.

A la persona que se ha convertido en el amor de mi vida y que ha estado en todo momento junto a mi te agradezco por tanto Karina, eres el apoyo que complementa fuera de casa. Gracias por cada pequeño momento y cada detalle a tu lado. Te amo.

A mi asesora y a quien considero como un gran ejemplo académico y de vida, quiero agradecerle por el tiempo que invirtió en mí, al estar conmigo en cada momento de mi formación en esta rama, gracias por los regaños cuando fueron requeridos, por los reconocimientos en su momento, pero sobre todo por guiarme hasta este punto. Gracias Dra. Nandini Sarma.

A mis sinodales el Dr. S.S.S. Sarma, al Dr. Sergio Chazaro Olvera, al Dr. Hugo Virgilio Perales Vela, y al Dr. Pedro Ramirez Garcia por su tiempo y dedicación para poder pulir este trabajo.

Al M. en C. Cesar Alejandro Zamora Barrios, por su ayuda y asesoría a lo largo de la realización de esta tesis. De igual forma a cada uno de mis compañeros del laboratorio por la ayuda en diferentes ocasiones y por el apoyo que me brindaron.

Indice

1. Resumen.....	4
2. Introduccion.....	5
3. Antecedentes.....	11
4. Hipotesis.....	15
5. Justificacion.....	16
6. Objetivos.....	17
6.1 Objetivo General.....	17
6.2 Objetivos Particulares.....	17
7. Materiales y métodos.....	18
7.1 Identificación y cuantificación de las cianobacterias.....	18
7.2 Extracción de cianotoxinas.....	19
7.3 Determinación de la Concentración Letal Media (Prueba CL₅₀).....	20
7.4 Pruebas crónicas de Toxicidad (Tabla de vida).....	20
7.5 Concentración de Microcistinas.....	22
8. Resultados.....	23
8.1 Identificación y cuantificación de las cianobacterias.....	23
8.2 Concentración Letal Media (Prueba CL₅₀).....	24
8.3 Prueba crónica de toxicidad (Tabla de vida).....	25
8.4 Análisis Estadísticos (ANDEVA).....	32
8.5 Concentración de microcistinas.....	34
9. Discusión.....	34
10. Conclusiones.....	39
11. Referencias.....	41

1. Resumen

La eutrofización de los sistemas acuáticos da lugar a menudo a florecimientos algales dañinas tales como cianobacterias que tienen a menudo efectos tóxicos en diversos organismos. Esto se traduce en la alteración de los ecosistemas y la modificación de la composición y distribución de las comunidades biológicas. Tal es el caso de la Pista de Remo y Canotaje de Xochimilco que presenta florecimientos de cianobacterias durante todo el año que generalmente suelen ser del género *Microcystis*. El presente estudio tiene como objetivo evaluar las respuestas demográficas de *Moina macrocopa* en presencia de cianotoxinas originarias de cianobacterias, obtenidas mediante congelación y sonicación. Se realizaron ensayos de toxicidad aguda (CL₅₀). Los experimentos se realizaron en 20 mL de medio al cual se agregó una población mixta de 10 individuos de *M. macrocopa* a diferentes concentraciones, en tres diferentes periodos. Posteriormente se evaluó la mortalidad después de 24h. Las concentraciones medias letales fueron 1.56, 1.30 y 2.56 µg/L, respectivamente. Con respecto a la tabla de vida de *M. macrocopa*, ésta se realizó utilizando el 10% de las concentraciones del CL₅₀ y la mitad de este 10%, teniendo como dieta una concentración de 0.5×10^6 cel/mL *Scenedesmus acutus* con cuatro repeticiones por cada tratamiento. Se encontró que *Moina macrocopa* fue sensible a las cianotoxinas reduciendo su supervivencia desde las bajas concentraciones, así como la fecundidad y obteniendo tasas de crecimiento que van desde 0.49 y 0.27 ind/mL para el primer periodo, para el segundo periodo 0.38y 0.52 y para el último 0.42 y 0.52. Los datos indican que la mayoría de las cepas de cianobacterias de la Pista de remo y canotaje suelen ser tóxicas y pueden tener efectos adversos debido a la exposición a largo plazo.

2. Introducción

De acuerdo a su origen y dimensiones, los sistemas acuáticos se dividen en ambientes continentales tales como ríos, arroyos, lagunas y lagos, y marinos como océanos y mares. Los sistemas acuáticos continentales están formados en su mayoría por agua dulce proveniente del deshielo, de precipitaciones o del subsuelo. Por el movimiento que presentan estas masas de agua se clasifican en lénticos y lóticos. Los cuerpos de agua lénticos, se caracterizan por tener agua sin flujo determinado y se ejemplifica con humedales, lagos profundos y lagos someros (Fernández *et al.*, 2010). Estos ecosistemas actúan como el centro de interacción de gran número de factores bióticos y abióticos que pueden ser modificados por elementos xenobióticos. La presencia de contaminantes provoca la alteración de los ecosistemas modificando la composición y distribución de las comunidades biológicas, teniendo como consecuencia la alteración de la dinámica (Bozo *et al.*, 2007).

El deterioro de los ecosistemas debido a la contaminación es un problema crítico de nuestros tiempos. La creciente cantidad de contaminantes en este tipo de ecosistemas se produce como consecuencia del vertimiento de desechos industriales, urbanos, así como las actividades agrícola, minera y portuaria, representando un peligro inminente para el hombre y el medio ambiente (Gómez *et al.*, 2001). Este conflicto de contaminación es común en todas las latitudes terrestres y se ha observado un mayor avance en las últimas décadas debido al proceso de urbanización (Fortúbel, 2005; Arzate, 2008)

La actividad antropogénica es una constante amenaza para la estabilidad de los ecosistemas y en este sentido, los ecosistemas acuáticos son receptores de toda clase de desechos urbanos que, en su mayoría, son orgánicos; detectándose, además, la presencia de compuestos tóxicos (Fargašová, 1997), generalmente considerados dañinos por su persistencia en los sedimentos (Visviki y Rachlin, 1991).

La cuestión de los compuestos tóxicos se ve agravado aún más con el incremento población humana, que se traduce en un aumento desmedido de desechos, que de igual forma son vertidos en los sistemas lacustres. La problemática principal del aumento desmedido de desechos, se ve reflejada en el crecimiento desmedido de la concentración de nutrientes inorgánicos minerales, en especial fosfatos y nitratos (Oberholster, 2006) los cuales se presentan en forma de disuelta (Zheng, 2003).

El crecimiento en las concentraciones de los nutrientes inorgánicos en los cuerpos de agua, conduce al estado que es conocido como eutrofización y se resume como el proceso de origen antrópogenico que va deteriorando la calidad del agua, añadiendo mayores cantidades de nutrientes que son elementos esenciales para el crecimiento de organismos, principalmente nitrógeno (N), fósforo (P) y materia orgánica (MO); lo cual enriquece en nutrientes a los sistemas acuáticos. El proceso de eutrofización se produce en todo lago cuya afluencia de elementos nutritivos sea superior a la salida de los mismos (Moreno *et al.*, 2010). Produciendo efectos ecológicos y toxicológicos los cuales están directa o indirectamente relacionados con la proliferación de los productores primarios que se traduce en el incremento de la biomasa de algas tóxicas en ciertas situaciones, la reducción química de ciertos compuestos en las aguas del fondo y los sedimentos, los cambios en la biomasa de los productores secundarios y la disminución de la diversidad de especies en las comunidades de productores primarios y secundarios. Dicha proliferación, y su posterior muerte y descomposición, suelen conducir a una marcada disminución de la concentración de oxígeno disuelto en aquellos ecosistemas con una baja tasa de renovación de agua. (Camargo *et al.*, 2007).

En los ecosistemas acuáticos eutrofizados, en la mayoría de las ocasiones se puede observar una proliferación de algas, cianobacterias y micrófitos en demasía. Lo anterior puede presentar una alteración de la biota y de la diversidad biológica, El desarrollo de las cianobacterias provoca opacidad, que impide que la luz penetre hasta regiones profundas de la columna de agua. Las consecuencias directas son la imposibilidad de llevarse a cabo la fotosíntesis en lugares cada vez mas profundos de la columna de agua y por lo tanto, disminución en la producción de oxígeno libre; simultáneamente aumenta la actividad metabólica consumidora de oxígeno de los organismos descomponedores, que empiezan a recibir excedentes de materia orgánica generados en la superficie (Moreno *et al.*, 2010).

Las cianobacterias son uno de los grupos planctónicos que se ven favorecidos por las condiciones eutróficas de un sistema acuático (Zamora-Barrios *et al.*, 2015). Las cianobacterias o algas verde-azules llamadas así por la presencia de un pigmento fotosintético denominado ficocianina. Se reproducen de manera asexual mediante la formación de estructuras tales como esporas (endosporas y exosporas), o por fragmentación de las colonias o de los filamentos (Huisman *et al.*, 2005; Pineda, 2009; Zamora-Barrios *et al.*, 2015). Un porcentaje significativo de las especies de cianobacterias se encuentran en los sistemas de aguas continentales (límnicos), habitando en la columna de agua o el bentos de lagos, lagunas, ríos y arroyos de todo el mundo. Existen especies de cianobacterias en un amplio intervalo de tamaños, desde especies de 0.5 μm (ej.: *Prochlorococcus* sp.) hasta otras que

forman colonias macroscópicas de 450 µm hasta varios milímetros de diámetro (Whitton y Potts 2000).

Las cianobacterias pueden tomar ventaja de la gran cantidad de nutrientes de un cuerpo de agua aumentando significativamente el promedio de la biomasa de la población, ocasionando la formación de florecimientos (Codd, 2005). Los factores que desencadenan los florecimientos de las cianobacterias planctónicas son diversos y actúan en forma combinada. El crecimiento de las cianobacterias fitoplanctónicas en los ambientes naturales depende de su capacidad de optimizar la utilización de los recursos y minimizar las pérdidas de biomasa. Los recursos necesarios para el crecimiento son la luz y los nutrientes y aunado a esto el aumento en la temperatura estacional y en gran medida debido al calentamiento global, que al parecer es otro factor que favorece el crecimiento desmedido de estos microorganismos (Zamora-Barrios *et al.*, 2015). Las interacciones tróficas entre los organismos en los cuerpos de agua también juegan un papel importante para determinar la dominancia o no de las cianobacterias, además, las cianobacterias interactúan con otros productores primarios compartiendo los mismos recursos (UNESCO 2009).

Las cianobacterias producen una gran variedad de metabolitos secundarios, algunos de los cuales son tóxicos para animales y se conocen con el nombre genérico de cianotoxinas (Leflaive y Ten-Hage, 2007). Estos compuestos pueden afectar la biota acuática y terrestre incluyendo a los seres humanos (Sivonen y Jones, 1999). Se dispone de numerosos registros de toxicidad y mortandad de animales como consecuencia de estas toxinas, como por ejemplo aves acuáticas (Alonso-Andicoberry *et al.*, 2002) y ganado vacuno (Thomas *et al.*, 1998; Stewart *et al.*, 2008).

El efecto de las cianotoxinas presenta un riesgo significativo para la salud pública (Downing, 2014). La mayor parte de los eventos de intoxicación a causa de las cianotoxinas en el mundo han sido provocados por hepatotoxinas. La intoxicación aguda produce disgregación de los hepatocitos, necrosis de los capilares sanguíneos y la muerte por hemorragia intrahepática. Las microcistinas constituyen un conjunto de más de cien pentapéptidos o heptapéptidos producidos particularmente por cepas de *Microcystis*. Estas biotoxinas actúan inhibiendo las fosfatasa de proteínas y con ello el mecanismo de regulación de la arquitectura celular (NRA 1990; Repavich *et al.*, 1990; Nakano *et al.*, 1991; Carmichael y Falconer, 1993).

Inicialmente los síntomas de intoxicación se confundieron con los del cólera (Margalef, 1983). Las hepatotoxinas, en estado puro, tienen una toxicidad

intermedia entre la del veneno de la cobra. Es suficiente una dosis de 0.03-0.3 mg por kilogramo de peso corporal para matar en pocas horas un animal experimental (Metting y Pyne, 1986; Reynolds, 1991). Se encuentran por lo tanto entre los venenos más poderosos que se conocen. Para ingerir una dosis letal de *Microcystis*, deberían beberse cinco litros de agua con una población de unas 200,000 cél. ml⁻¹ (Reynolds, 1991).

Instintivamente el hombre evita dichas aguas, a pesar de esto existen casos documentados de muertes humanas. Siendo el ejemplo más conocido, el trágico caso de un centro de diálisis en Caruaru, Brasil, con más de setenta muertos (Azevedo, 2002). En el caso de las personas que utilizan día con día las instalaciones de la Pista de remo y canotaje de Xochimilco para su entrenamiento, resulta ser preocupante, ya que al estar expuestas directamente con el agua y al rocío de la pista y así mismo con los florecimientos de cianobacterias corren el riesgo de contraer los daños ya mencionados aun cuando se trate de concentraciones bajas, se observan síntomas clínicos subletales, caracterizados por desórdenes gastrointestinales, alergias, irritaciones en la piel y daños en los ojos de nadadores y bañistas (NRA, 1990).

Las cianotoxinas son consideradas los compuestos más tóxicos y dañinos en las masas de agua, tanto por su elevada distribución como por su alta toxicidad. Son metabolitos secundarios que se generan y acumulan durante la producción de fotopigmentos, por estrés ambiental y antipredatorios (Ramírez *et al.*, 2004). Normalmente se clasifican por los efectos que producen como toxinas irritantes, citotoxinas, dermatotoxinas, neurotoxinas y hepatotoxinas (Jungblut *et al.*, 2006). Entre las toxinas producidas por las cianobacterias destacan las Microcistinas-LR, Saxitoxinas y la Anatoxina-a (Vasconcelos, 2001).

El efecto de las cianotoxinas se prueba a menudo mediante la extracción de los compuestos activos de cianobacterias cultivadas en condiciones de laboratorio. Durante la última década se han llevado a cabo varios estudios para probar la toxicidad de extractos de cianobacterias directamente de los florecimientos tomados en campo (Pietsch *et al.*, 2001; Okumura *et al.*, 2006). En algunos estudios se ha comprobado que organismos zooplanctónicos como *Ceriodaphnia cornuta* y *Plationus patulus* son extremadamente sensibles a la toxicidad de extractos crudos de *Dolichospermum planctonicum* (Zamora-Barrios *et al.*, 2015). La ventaja de estudiar estos extractos crudos es que los resultados abarcan efectos sinérgicos o antagónicos de la cianobacteria y sus toxinas y con base en esto extrapolar los resultados de laboratorio para obtener conclusiones sobre las condiciones naturales (Okumura *et al.*, 2006).

Se han identificado varios géneros de cianobacterias, formadoras de blooms y productores de cianotoxinas, entre los cuales están, *Microcystis*, *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Planktothrix*, *Aphanizomenon*, *Oscillatoria*, *Cylindrospermopsis*, *Raphidiopsis* y *Nodularia* (Codd, 2005). Principalmente estas cianobacterias producen dos tipos de toxinas, hepatotoxinas y neurotoxinas, pero son las hepatotoxinas las que se presentan con más frecuencia en comparación con las neurotoxinas; aproximadamente el 50% de los cuerpos de agua donde esta presente *Microcystis* muestran hepatotoxicidad a mamíferos y otros animales. Las toxinas responsables de la hepatotoxicidad son bien conocidas como microcistinas, las cuales se obtienen no sólo de *Microcystis*, sino también de *Anabaena*, *Nostoc* y *Oscillatoria* que también forman florecimientos de agua (Namikoshi *et al.*, 1996).

Además de los efectos agudos mencionados, la ingesta continuada de dosis subletales de hepatotoxinas tiene efectos crónicos graves bien comprobados, tales como la producción y estimulación de tumores hepáticos (Lawton *et al.*, 1990; Carmichael y Falconer, 1993). Algunos autores han aportado evidencias de que las cianotoxinas están relacionadas con la protección contra los depredadores para evitar la competencia de algas del fitoplancton o plantas (Jang *et al.*, 2007). Por otra parte, debe mencionarse que las cianobacterias también producen otras moléculas cuyo rol es inhibir alguna función de potenciales competidores (Briand *et al.*, 2004).

Las especies del género *Microcystis* son responsables de más del 60% de los casos de intoxicación en todo el mundo. La ecología de las especies tóxicas y no tóxicas no está clara por lo que es lícito hablar de toxicidad a nivel de género, es decir de *Microcystis* sp. (Ohtake *et al.*, 1989), independientemente de la especie presente. La toxicidad de una florecimiento presenta grandes variaciones aun de un día a otro, ya sea por factores ambientales, presencia de especies competidoras o por envejecimiento, siendo por lo tanto difícil de predecirla (NRA, 1990; Repavich *et al.*, 1990). Sin embargo, en México han sido poco estudiada la toxicidad de éstas otras cianotoxinas, por lo cual surge la necesidad de ampliar la información mediante bioensayos de toxicidad que demuestren cuales son las concentraciones que alteran de manera significativa a los organismos zooplanctónicos en nuestros cuerpos de agua (Zamora-Barrios *et al.*, 2015).

El zooplancton dulceacuícola en términos de biomasa se compone principalmente de protozoos, rotíferos, cladóceros, copépodos, siendo este último el grupo dominante (Downing y Rigler, 1984). Su papel en el control de la abundancia de fitoplancton, incluyendo algas tóxicas, tiene implicaciones en la biomaniplación de lagos (Alva-Martínez *et al.*, 2001). Además el zooplancton es uno de los grupos que se ve severamente alterado por la presencia de cianobacterias en el medio, ya que

para el consumo son difíciles de manejar y además provoca intoxicación y una baja nutrición para los organismos zooplanctónicos (Carmichael, 1986; Lampert, 1997).

Por lo anterior se presentan consecuencias adversas sobre el que es uno de los grupos más importantes, por tener las comunidades más amplias y variadas de los sistemas acuáticos (Ventura, 2008). Al observar que la abundancia de este grupo disminuía drásticamente en presencia de cianobacterias, se comenzaron a generar hipótesis de la existencia de cianotoxinas (Infante y Riehl, 1984).

Las cianobacterias han utilizado favorablemente la función de las cianotoxinas como medio de defensa contra la depredación por pastoreo del zooplancton, el cual está en contacto directo con las toxinas a través de la ingestión de las células como parte de su dieta, además dichas toxinas pueden bioacumularse en los tejidos generando que el zooplancton funcione como vector y esto provoca una fractura en las redes tróficas, ya que estos forman parte del eslabón que permite el intercambio energético a niveles tróficos superiores (Choueri *et al.*, 2009; Ferrao-Filho *et al.*, 2009).

Realizar ensayos toxicológicos con especies que tienen una gran relevancia ecológica dentro de estudios ecotoxicológicos ayuda a la obtención de resultados en los cuales, se puede realizar una extrapolación a toda la comunidad y de esta manera establecer estándares de calidad confiables en cuanto a la concentración máxima que puede tolerar el zooplancton. Bajo este contexto uno de los grupos más importantes son los organismos zooplanctónicos, que conforman una de las comunidades más amplias y variadas dentro de los sistemas acuáticos. Tal es el caso de los cladóceros y rotíferos en los cuales es conveniente realizar este tipo de ensayos, debido a que en la actualidad existe amplia información de ambos grupos, en diferentes aspectos tales como las características morfológicas externas e internas, la fisiología, la distribución en los sistemas epicontinentales, comportamiento ecológico e interacciones, así como un corto ciclo de vida (Ventura, 2008; Zamora-Barrios *et al.*, 2015). Además de los factores anteriores existen ventajas en la manipulación de estos organismos lo cual facilita y agiliza los ensayos gracias a características como su ciclo de vida relativamente corto, su baja variabilidad genética entre generaciones, su pequeña talla, sus requerimientos nutricionales que son bien conocidos, su reproducción en cortos períodos de tiempo y su sensibilidad a contaminantes tóxicos (Espinosa-Chávez y Martínez-Jerónimo, 2002).

El género *Moina* consta de especies conocidas comúnmente como pulgas de agua, que se distribuyen en cuerpos de agua permanentes o temporales, ligeramente salinos, localizados en regiones generalmente áridas con fenómenos

frecuentes de endorreísmo o arreísmo y pluviosidad variable (Ivleva, 1973; Margalef, 1983). En el Valle de México, *Moina macrocopa* distribuye ampliamente en condiciones de eutroficidad, en ambientes con valores de pH de 9.17 y salinidad de hasta 2 g L⁻¹ (Espinosa-Chávez y Martínez-Jerónimo, 1992); por lo que se prestan para generar información útil que permite la protección de los organismos de una o varias especies que integran la biota de un ecosistema, en este caso el zooplancton, y su respuesta ante los peligros de sustancias segregadas al ambiente (APHA, 1994).

Actualmente no se sabe si las diferentes especies de cladóceros responden de una manera similar cuando se exponen a cianotoxinas extraídas por medio de la congelación. Además, en comparación con muchos otros puntos ecológicos sensibles, tales como las tasas de alimentación y de filtración o la velocidad de natación, el enfoque demográfico de tabla de vida es muy sensible al estrés de las sustancias tóxicas (Ventura 2008; Zamora-Barrios *et al.*, 2015).

3. Antecedentes

Alva-Martinez *et al.* (2007) evaluaron el efecto de las dietas mixtas, que contenían 0, 25, 50, 75 y 100% en peso seco de *Microcystis aeruginosa* y el resto de una de las dos especies de algas verdes *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus*. El efecto de las dietas se midió sobre la población de cladóceros *Ceriodaphnia dubia* y *Moina macrocopa*. Independientemente de la proporción de *M. aeruginosa* en la dieta mixta, *C. dubia* cuando fue alimentada con *Chlorella* tuvo una fase de retraso inicial más larga; no fue el caso de la dieta mixta con *S. acutus*, donde la fase de latencia aumentó en proporción creciente. Cuando se aumentó al 100% *M. aeruginosa*, el crecimiento de la población de *C. dubia* se redujo en comparación con el 100% de *S. acutus* o el 100% de *C. vulgaris*, donde el crecimiento incremento. Además cuando había mayor proporción de *M. aeruginosa* en la dieta mixta resultaba en una disminución de la abundancia de *M. macrocopa*. Independientemente del tipo de dieta, *M. macrocopa* tuvo una fase de retraso menor que *C. dubia*. Para ambas especies de cladóceros, los valores más bajos de (r) se obtuvieron cuando se alimentaron con *Microcystis*.

Arzate (2008) realizó colectas de cianobacterias del género *Microcystis* en cuerpos de agua del Valle de México,. La finalidad fue identificar mediante marcajes moleculares a 12 cianobacterias toxigénicas presentes en estos cuerpos de agua. Ya con el material de colecta realizaron ensayos de toxicidad aguda con el agua (exudados) y extractos crudos de la biomasa constituida principalmente por *Microcystis*, con el cladóceros *Daphnia magna*. La prueba de toxicidad por medio

de exudados no generó la mortalidad de los organismos, sin embargo, en los extractos observó la mortalidad de los neonatos, con lo que calculó la concentración letal media (LC₅₀). Para analizar si la mortandad de estos cladóceros era generada por las microcistinas, realizó ensayos moleculares y amplificó regiones genéticas específicas, además mediante un kit inmunológico (prueba de ELISA) determinó la concentración de microcistinas presentes en los tratamientos donde se presentó mortandad, concluyendo que las microcistinas causaron intoxicación a los organismos expuestos.

Ferrao-Filho *et al.* (2009) evaluaron el potencial de los cladóceros para su uso en el biomonitoreo de las toxinas de cianobacterias. Cultivaron dos especies de zooplancton (*Daphnia gessneri* y *Moina micrura*) en el laboratorio para someterlos a bioensayos agudos de 48 h y crónicos de 10 días. Recolectaron muestras de agua de dos depósitos y se diluyeron en agua mineral a cuatro concentraciones. La supervivencia en los bioensayos agudos se utilizó para calcular la LC₅₀ y la supervivencia, y la fecundidad en bioensayos crónicos se utilizaron para calcular la tasa de crecimiento poblacional intrínseca (r) y la EC₅₀. El análisis del fitoplancton en las muestras de agua de un reservorio reveló que las cianobacterias eran el grupo dominante, representado por los géneros *Anabaena*, *Cylindrospermopsis* y *Microcystis*. Los resultados que obtuvieron de los bioensayos mostraron efectos adversos incluyendo muerte, parálisis y una tasa de crecimiento poblacional reducida, generalmente proporcional a la concentración de agua del reservorio. Estos efectos pueden estar relacionados con la presencia de toxinas de cianobacterias (microcistinas o saxitoxinas) en el agua.

Jang *et al.* (2007) investigaron la producción de microcistina (MC) en cuatro cepas de cianobacterias (tres *Microcystis aeruginosa* y una *Planktothrix agardhii*) en respuesta a diferentes densidades de zooplancton ramoneador (exposición directa: cero, dos, cuatro u ocho individuos por 300 mL) 0%, 10%, 25% y 50% de *Daphnia magna* y *Moina macrocopa*. La producción de MC aumentó después de la exposición directa a ambas especies de zooplancton y fue mayor con el aumento de la concentración de sustancias químicas. Esta producción de MC fue significativamente diferente entre el control y los tres niveles de tratamiento del zooplancton. Tras la exposición directa e indirecta de las cianobacterias al zooplancton, la MC intracelular alcanzó su máximo en los días 3 y 4. En la mayoría de las cepas de cianobacterias, el contenido máximo de MC fue significativamente mayor en el tratamiento directo con la densidad zooplanctónica más alta y en el tratamiento indirecto con la concentración más alta de zooplancton filtrado de medios que con tratamientos con la menor densidad y concentración, respectivamente. Encontraron que las concentraciones de MC extracelulares fueron

mucho más bajas que las intracelulares, pero ambas mostraron patrones temporales similares a lo largo del experimento.

Nandini (2000) evaluó la respuesta de los rotíferos y cladóceros en presencia de *Microcystis aeruginosa*, ofrecida como colonias y células individuales, comparando con una dieta de *Chlorella vulgaris* mediante el método demográfico de la tabla de vida. Las especies de zooplancton de prueba fueron *Simocephalus vetulus*, *Daphnia carinata*, *Moina macrocopa*, *Scapholeberis kingi*, *Ceriodaphnia cornuta*, *Brachionus calyciflorus* y *Hexarthra mira*. Para detectar el desarrollo de la resistencia a las toxinas de *Microcystis* en el zooplancton, además de la cepa cultivada en laboratorio de *Ceriodaphnia cornuta*, se utilizó otra cepa de la misma especie (denominada *C. cornuta 2*, que fue recogida de un estanque que contenía *Microcystis* las cuales fueron cultivadas en el laboratorio con *Chlorella* durante unas pocas semanas antes de la experimentación). Los experimentos se realizaron a 20° C y 30° C. La supervivencia fue más alta con *Chlorella* en la mayoría de las especies, pero baja en dietas con *Microcystis*. Excepto para *C. cornuta 2*, *S. kingi* y *S. vetulus*, todas las otras especies de ensayo fueron afectadas negativamente por *Microcystis*. La capacidad de consumir *Microcystis* mejoró a 30° C en *M. macrocopa*, *D. carinata* y *H. mira*. La mayor esperanza de vida media se registró para *C. cornuta 2* (25.3 ± 4.86 d) y la más baja para *B. calyciflorus* (0.58 ± 0.05 d). La mayor tasa reproductiva neta se observó para *C. cornuta 1* (44.9 ± 4.88) y el tiempo de generación más largo fue de 26.6 ± 2.13 d para *S. vetulus*. Entre los cladóceros que mostraron valores positivos de tasa de crecimiento poblacional (r), *M. macrocopa* tuvo los más altos con 0.96 ± 0.04 por día.

Oberholste *et al.* (2006) investigaron la composición taxonómica de las asociaciones de fitoplancton en el lago Sheldon durante el verano de 2004, un año después de la finalización de un proyecto de restauración en el lago. Su estudio analizó los cambios físicos y químicos causados por la escorrentía urbana y la mezcla artificial, así como la utilidad de los marcadores moleculares de microcistina derivados del grupo de genes *mcy* para la detección de cepas tóxicas de cianobacterias en muestras ambientales del lago Sheldon. Este estudio demuestra claramente que la tasa de mezcla artificial por sí sola era insuficiente para causar una transición a un sistema acuático bien mezclado y que las cianobacterias permanecieron dominantes durante los meses de verano. La presencia de cepas tóxicas de cianobacterias se confirmó con el uso de marcadores moleculares que detectaron la presencia del grupo de genes *mcy* responsable de la producción de toxina por *Microcystis* spp.

Pietsch *et al.* (2001) investigaron la situación de "vida real" de un evento de lisis de cianobacterias. Para este propósito, se tomaron células intactas de un florecimiento

natural de cianobacterias del lago Müggelsee, Berlín, y se rompieron las células mediante ciclos repetidos de congelación / descongelación. Este extracto crudo se utilizó para exponer varios organismos acuáticos que van desde microalgas (*Scenedesmus armatus*), macrofitos (*Ceratophyllum demersum*), invertebrados (*Chaoborus crystallinus*) hasta huevos de peces (*Danio rerio*) para observar varios parámetros fisiológicos como la actividad enzimática de desintoxicación y, en el caso de las microalgas y las macrófitas, también el efecto sobre la actividad de la fotosíntesis. En todas las pruebas, el extracto en bruto de cianobacterias causó efectos más fuertes que las toxinas de cianobacterias puras usadas en concentraciones equivalentes.

Okumura *et al.* (2006) evaluaron los efectos generados por los compuestos tóxicos de cianobacterias liberados por los florecimientos cianobacteriales, colectaron material con una red para fitoplancton con una abertura de malla 25 μm , de dos florecimientos naturales, el primero en el embalse de Barra bonita y el segundo en el embalse de Ibitinga, ambos situados en San Paulo, Brasil. Identificaron que el fitoplancton de ambos embalses estaba constituido principalmente por cuatro *Microcystis* spp. Evaluaron la toxicidad aguda mediante bioensayos con cladóceros (*Daphnia similis*, *Ceriodaphnia silvestrii* y *Ceriodaphnia dubia*) expuestos a extractos crudos cianobacteriales obtenidos de las muestras de los embalses y de una cepa de *Microcystis aeruginosa* cultivada en laboratorio. Analizaron la sensibilidad y la sobrevivencia de los organismos obteniendo como resultados una mayor toxicidad por parte del cultivo del embalse de Ibitinga, esto lo cuantificaron con un kit que mediante un ensayo inmunológico detecta las microcistinas-LR. Concluyeron que *Daphnia similis* tiene una mayor sensibilidad a la toxicidad en comparación de los otros organismos zooplanctónicos evaluados.

Zamora-Barrios *et al.* (2015) Evaluaron los efectos toxicológicos de extractos crudos de *Dolichospermum planctonicum* en *Plationus patulus* (rotífero) y *Ceriodaphnia cornuta* (Cladóceras). Utilizando un compuesto activo de *Anabaena* cultivada en el laboratorio, que obtuvo por congelación a -70°C durante 48 h, después de lo cual la muestra se descongeló. El ciclo se repitió cinco veces, y entre cada ciclo se sonicaron las células para lisarlas. Posteriormente se probó en experimentos de crecimiento demográfico y de la tabla de vida de las dos especies de zooplancton se compararon en medios con y sin (control) las cianotoxinas. Obteniendo como resultado una alteración en las variables demográficas de ambos organismos, encontrando que los rotíferos eran más resistentes a los tóxicos que los cladóceros. Sus tasas de crecimiento poblacional oscilaron entre 0.11 d^{-1} en controles a 0.08 d^{-1} en presencia de los extractos crudos de *P. patulus* y de 0.18 en controles a -0.27 en presencia de los extractos brutos de *C. cornuta* y afectando negativamente a la reproducción más que a la supervivencia.

4. Hipótesis

- Si las cianotoxinas son factores bióticos que influyen en la distribución y composición de las comunidades biológicas que provocan la alteración de la dinámica, entonces, bajo estas afirmaciones se espera una disminución en las variables demográficas de *Moina macrocopa*.
- Si la supervivencia y la fecundidad, son indicadores sensibles de estrés ambiental y son dos unidades básicas para explicar muchas variables de la historia de vida, por lo tanto la exposición de los organismos a las cianotoxinas provocará la alteración de estas unidades y como consecuencia las variables dependientes a éstas.
- Si los factores que desencadenan los florecimientos de las cianobacterias son diversos y actúan en forma combinada y si los florecimientos de cianobacterias permanecen por períodos más largos se espera que en el periodo de Junio-Julio exista un mayor florecimiento en la Pista de remo y canotaje.

5. Justificación

Actualmente la actividad antropogénica es una constante amenaza para la estabilidad de los sistemas acuáticos ya que son receptores de toda clase de desechos urbanos, lo que aumenta desmedidamente la concentración de nutrientes inorgánicos minerales, tales como los fosfatos y nitratos, condiciones que favorecen a organismos como las cianobacterias, las cuales toman ventaja de la gran cantidad de nutrientes de un cuerpo de agua. Además, el centro de México es un lugar que cuenta todo el año con temperaturas favorables para los florecimientos de cianobacterias, además de contar con una gran cantidad de lagos y lagunas de gran importancia que presentan problemas de eutrofización antropogénica (UNESCO 2009)

Estos factores, en conjunto permiten la formación de florecimientos de cianobacterias y favorecen su permanencia la mayor parte del año. La presencia de estos organismos pueden causar efectos como la reducción drástica de la diversidad y abundancia de diferentes especies acuáticas, debido a la producción y liberación constante de cianotoxinas al medio, así como la intoxicación y el ocasionar diferentes efectos crónicos graves bien comprobados, tales como la producción y estimulación de tumores hepáticos en diferentes animales y en humanos (Carmichael, 1986; Lampert, 1997; Lawton *et al.*, 1990).

Este podría ser el caso de todas las personas que a diario se encuentran en contacto con el agua de la pista de remo y canotaje de Xochimilco que al entrar en contacto con estos organismos durante periodos largos de tiempo los llevaría a sufrir consecuencias que van desde intoxicaciones hasta la muerte.

Por esta razón es de gran importancia desarrollar experimentos que nos permitan pronosticar y evaluar los riesgos de la exposición de algunos organismos y de personas a las cianotoxinas, así como de las alteraciones ecológicas que puedan causar dentro de un ecosistema acuático apoyándonos en el zooplancton, ya que estos nos permiten comprender lo que puede estar ocurriendo en una situación real, con una sobrepoblación de cianobacterias tóxicas. Estos puntos dieron pie a estudiar el efecto de las cianotoxinas evaluando las respuestas de *Moina macrocopa* a una prueba de toxicidad aguda para poder observar el efecto en grandes concentraciones y posteriormente evaluar el efecto en las variables demográficas mediante una prueba crónica en presencia de cianotoxinas para que en un futuro se puedan tomar medidas respecto al tema de la gestión de los cuerpos de aguas con este problema y las consecuencias adversas que ocasionan a la salud pública y protección de los organismos de varias especies que integran la biota de

un ecosistema, ante los peligros de sustancias liberadas al ambiente por las cianobacterias tóxicas.

6. Objetivos

6.1 General

Evaluar las respuestas demográficas de *Moina macrocopa* en presencia de cianotoxinas de la pista de remo y canotaje Virgilio Uribe, Xochimilco.

6.2 Particulares

- Cuantificar las concentraciones de las cianotoxinas de los extractos crudos utilizando el Kit inmunológico con base en la prueba de ELISA.
- Evaluar el efecto del extracto sobre la supervivencia de *Moina macrocopa* mediante pruebas de toxicidad aguda.
- Cuantificar el efecto de las cianotoxinas sobre las variables reproductivas de *Moina macrocopa* mediante pruebas crónicas de toxicidad.

7. Materiales y métodos

Los cultivos iniciales de *Moina macrocopa* se colectaron de una fuente de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Los cultivos de *M. macrocopa* fueron mantenidos en el laboratorio de Zoología Acuática de la FES Iztacala durante una temporada. Para el cultivo en el laboratorio se utilizó agua moderadamente dura (medio EPA) que se preparó: disolviendo 0.9 g de NaHCO₃, 0.6 g de CaSO₄, 0.6 g de MgSO₄ y 0.04 g de KCl en 1L de agua destilada (Weber, 1993), el cultivo se mantuvo a 20° C y fueron alimentados exclusivamente con el alga *Scenedesmus acutus* a una concentración de 0.5x10⁶ células mL⁻¹. El medio de cultivo se cambió cada tercer día con la finalidad de evitar la acumulación de pellets, material orgánico y residuos alimenticios. *M. macrocopa* es un organismo que tiene ciclos de vida cortos, se reproduce asexualmente por partenogénesis lo cual da como resultado un gran número de neonatos en un corto periodo de tiempo, esta razón lo convierte en un organismo ideal para los bioensayos ecotoxicológicos.

El alga *Scenedesmus acutus*, fue cultivada en botellas transparentes de 2 litros con medio estándar Bold, agregándose 0.5g de NaHCO₃ cada 3 días (Zamora-Barrios *et al.*, 2015), se mantuvo con constante aireación e iluminación fija (24 horas) proporcionada por lámparas de luz blanca de 70 watts. El alga fue cosechada después de una semana ya que en este tiempo alcanza su mayor densidad de células por ml. Posteriormente para conocer la concentración celular de cada botella, se tomó una alicuota que fue cuantificada mediante un cámara de Neubauer.

La muestra de cianobacterias se recolectó en los periodos de junio-julio, septiembre-octubre y marzo-abril en la Pista de Canotaje ubicada en la zona lacustre de Xochimilco y paralela al canal de Cuemanco, siendo sus medidas de 2200 m. de longitud con una superficie de 600,000 m². Se colecto directamente un total de 10 L de agua que contenía a las cianobacterias de la Pista de Remo y Canotaje, y posteriormente se almacenaron y se mantuvieron en hielo y se transportaron al laboratorio de la FES Iztacala.

7.1. Identificación y cuantificación de las cianobacterias

Las cianobacterias se identificaron siguiendo las claves de Komárek-Anagnostidis de 1998. Posteriormente se midió el tamaño de célula y de la colonia de cada periodo de muestreo, estos parámetros también fueron utilizados para la identificación de los organismos.

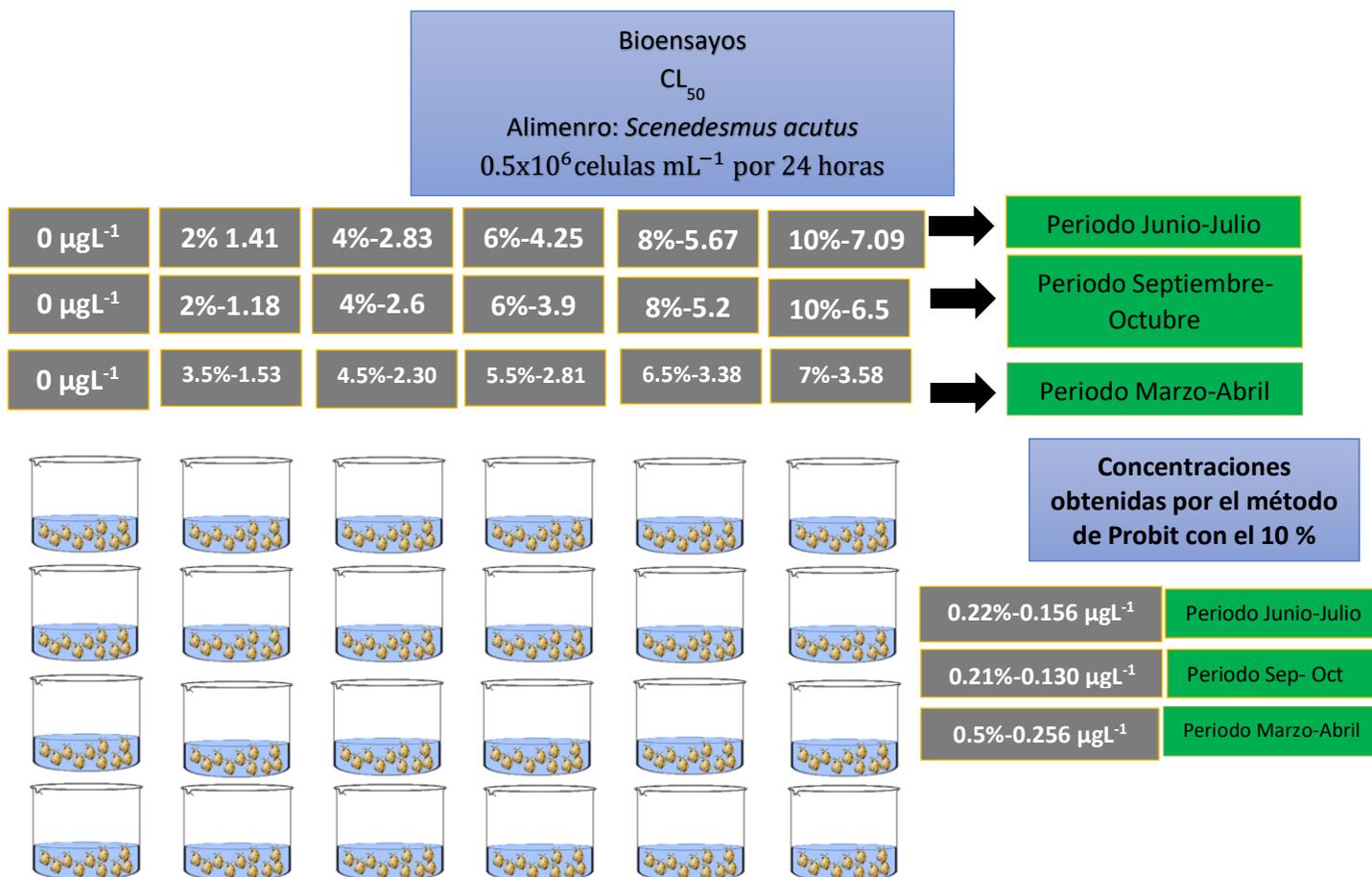
Mediante la cámara de Neubauer se cuantificó el número de células por mililitro y posteriormente se calculó el número de células en un litro, este procedimiento se llevó a cabo para los diferentes periodos. La cuantificación de las colonias se realizó utilizando la celda de Sedgwick-Rafter.

7.2. Extracción de cianotoxinas

La extracción de las cianotoxinas se llevó a cabo siguiendo lo propuesto por (Zamora-Barrios *et al.*, 2015) donde mencionan que se tomó la muestra de cianobacterias, y se colocó en un recipiente cerrado, para ser congelado a -70°C durante 72 horas, posteriormente se dejó descongelando 24 horas, una vez terminada la descongelación, la muestra se sonicó a 20 kHz durante 10 minutos, por último la muestra se volvió a congelar. Este ciclo de congelado/ descongelado se repitió por cinco veces, con la finalidad de provocar lisis celular y asegurar la extracción de las cianotoxinas (Pietsch *et al.*, 2001).

7.3. Determinación de la Concentración Letal Media (Prueba CL_{50})

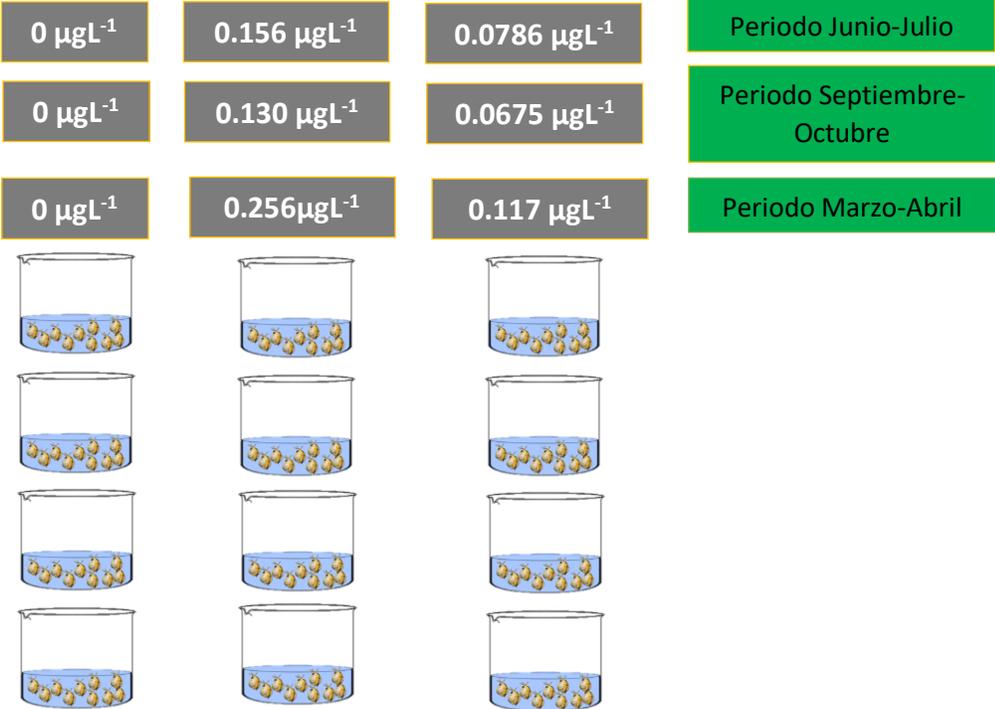
La sensibilidad de *Moina macrocopa* se evaluó mediante un bioensayo de 24 horas con cuatro repeticiones, usando las siguientes concentraciones de cianotoxinas. Para el caso de los periodos junio-julio y septiembre-octubre se utilizó, 0.4 mL del extracto de cianotoxinas por 19.6 mL de EPA, 0.8 mL del extracto de cianotoxinas por 19.2 mL de EPA, 1.2 mL del extracto de cianotoxinas por 18.8 mL de EPA, 1.6 mL de extracto por 18.4 mL de EPA, 2 mL del extracto por 18 mL de EPA. Para el periodo de marzo-abril las concentraciones que se utilizaron fueron 0.6 mL del extracto por 19.4 mL de EPA, 0.9 mL del extracto por 19.1 mL de EPA, 1.1 mL del extracto por 18.9 mL de EPA, 1.3 mL del extracto por 18.7 mL de EPA, 1.4 de extracto por 18.6 mL de EPA, 1.8 mL de extracto por 18.2 mL de EPA. Para todos los casos se utilizó un testigo control con medio EPA y *Scenedesmus acutus* a una concentración de 0.5×10^6 cels mL^{-1} . Para iniciar el experimento se contaron 5 individuos en cada recipiente de plástico transparente con un volumen de 20 mL. El experimento se colocó en una incubadora a una temperatura de $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Después de un día se cuantificó la sobrevivencia de los organismos mediante un microscopio estereoscópico y se obtuvo el cálculo de la prueba de CL_{50} con el programa "probit Individuals, end points" con un intervalo de confianza del 95% (Finney, 1971).



7.4. Pruebas crónicas de Toxicidad (Tabla de vida)

Para realizar los experimentos demográficos se colocaron 10 neonatos de *Moina macrocopa* previamente en estado óptimo; en recipientes de plástico de 20 mL de volumen con cuatro repeticiones para cada uno de los tratamientos. Para los tratamientos se realizaron bioensayos con dos concentraciones del extracto diluido en medio EPA con *S. acutus* a 0.5 X 10⁶ cels. mL⁻¹. Las concentraciones se obtuvieron tomando el 10% del CL₅₀ y la mitad de éste 10%. Los testigos control cada uno con cuatro réplicas fueron con medio EPA y *S. acutus* a una concentración de 0.5 X 10⁶ cels. mL⁻¹. Para establecer condiciones controladas los bioensayos se mantuvieron en la incubadora a 20 ± 1°C con iluminación difusa durante los 15 días de experimentación. Para cada día se cuantificaron los organismos sobrevivientes y los neonatos que nacían cada día se contabilizaron y posteriormente se retiraban del experimento. De los datos de fecundidad y supervivencia se calcularon las variables demográficas con las ecuaciones (Krebs, 1985):

Bioensayos
 Tabla de vida
 Alimento : *Scenedesmus acutus*
 $0.5 \times 10^6 \text{ células mL}^{-1}$



Supervivencia

$$lx = \frac{nx}{N^\circ \text{ inicial de individuos}}$$

Fecundidad

$$mx = \frac{N^\circ \text{ de neonatos producidos}}{nx}$$

Tasa bruta de reproducción

$$\sum_0^\infty mx$$

Tasa neta de reproducción

$$R_0 = \sum_0^{\infty} l_x \cdot m_x$$

Esperanza de vida

$$e_x = \frac{T_x}{n_x}$$

Tasa intrínseca de crecimiento

$$\sum_{x=w}^n e^{-rx} \cdot l_x \cdot m_x = 1$$

Tiempo Generacional

$$T = \frac{\sum x \cdot l_x \cdot m_x}{\sum l_x \cdot m_x}$$

Con la ayuda del programa SigmaPlot versión 11.0 se graficaron las variables demográficas y mediante una ANDEVA de dos vías, se determinaron las diferencias de los tratamientos en cada variable. Y se realizaron comparaciones múltiples entre las medias, mediante la prueba de Tukey.

7.5. Concentración de Microcistinas

Para la medición de microcistinas se usó el “QuantiPlate for Microcystins de EnviroLogixTM”(Portland, EUA), siguiendo las instrucciones de uso del fabricante. Los anticuerpos utilizados en el método de ELISA son de origen policlonal y se suministran como antisuero de inmunoglobulina purificada, son empleados como conjugados no marcados o enzimáticos y reaccionan con un antígeno determinado, en este caso las microcistinas (Zamora-Barrios *et al.*, 2015). Se obtuvieron las concentraciones de toxicidad del extracto diluido en medio EPA para cada concentración de los experimentos de cada periodo.

8. Resultados

8.1. Identificación y cuantificación de las cianobacterias

La identificación de las de las muestra de la Pista de remo y canotaje arrojó que en dicha muestra el género de cianobacterias dominante fue *Microcystis*. Para el caso del periodo de junio-julio se encontró que la especie dominante fue *Microcystis aeruginosa*. Como se puede observar en la Figura 1, en el periodo septiembre-octubre se observó la presencia de más de una especie de *Microcystis* siendo estas *M. flos aquae* y *M. wesenbergii*. Y para el caso del ultimo periodo se registró la presencia de *M. flos-aquae*. Por lo que se corrobora que este género es el principal productor de microcistinas, las cuales como se ha reportado, son hepatotóxicas

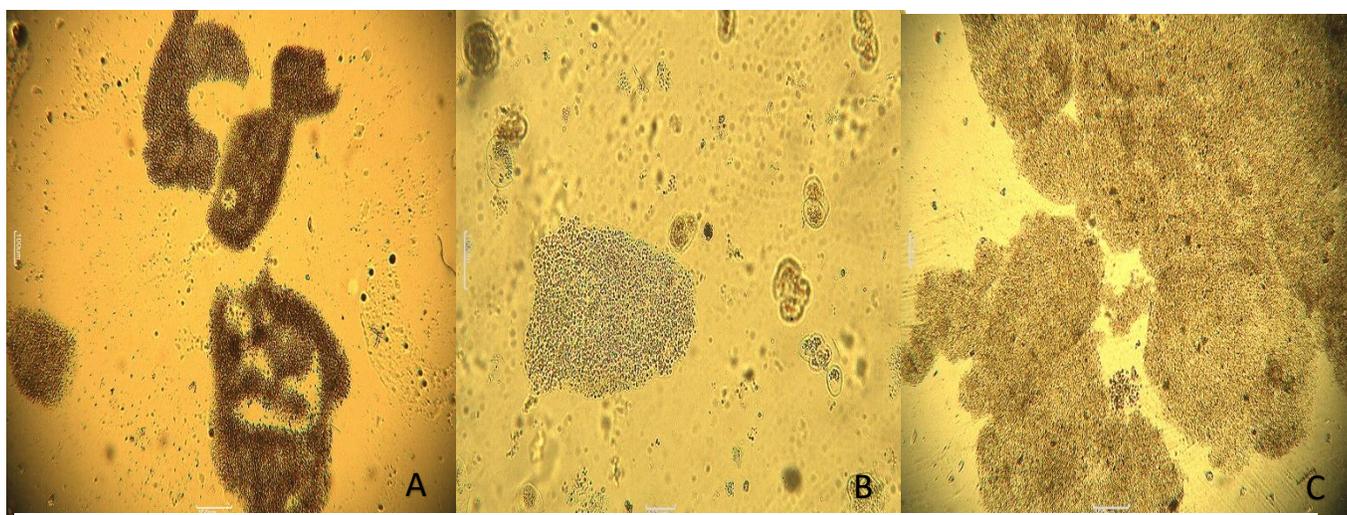


Figura 1. Imágenes del género *Microcystis* provenientes de la Pista de remo y canotaje de Xochimilco; A. En el periodo junio-julio del 2016, *Microcystis aeruginosa* B. Periodo septiembre-octubre del 2016, *M. wesenbergii* y *M. flos-aquae* C. Periodo marzo-abril del 2017, *M. flos-aquae*.

Periodo	Especies	Tamaño de células	Tamaño de colonias	N° de células/L	N° de colonias/L
Junio-Julio	<i>M. aeruginosa</i>	2.97 μm	722 $\mu\text{m/L}$ y 487.6 $\mu\text{m/A}$	$2.07 \times 10^7 \text{ cel/L}$	823 cel/mL
Sep- Octubre	<i>M. flos-aquae</i>	3.34 μm	521.3 $\mu\text{m/L}$ y 371 $\mu\text{m/A}$	-----	486 cel/mL
	<i>M. wesenbergii</i>	4.16 μm	312 $\mu\text{m/L}$ y 76 $\mu\text{m/A}$	-----	678 cel/mL
Marzo Abril	<i>M. flos-aquae</i>	3.17 μm	861.4 $\mu\text{m/L}$ y 771.8 $\mu\text{m/A}$	$2.58 \times 10^7 \text{ cel/L}$	917 cel/mL

Tabla 1. Tamaño y número de colonias y células por litro segun el periodo y la especie que se encontró en la Pista de remo y canotaje.

El la Tabla 1 se pueden observar, las características morfológicas de cada especie de *Microcystis* encontradas en los tres diferentes periodos. Se observa el tamaño de células y es posible apreciar que dependiendo de la especie el tamaño puede cambiar. A su vez se obtuvo el número de células, el número de las colonias. Cabe resaltar que para el periodo de septiembre-octubre el número de células no se obtuvo debido a que existía mas de una especie de *Microcystis*.

8.2. Concentración Letal Media (Prueba CL₅₀)

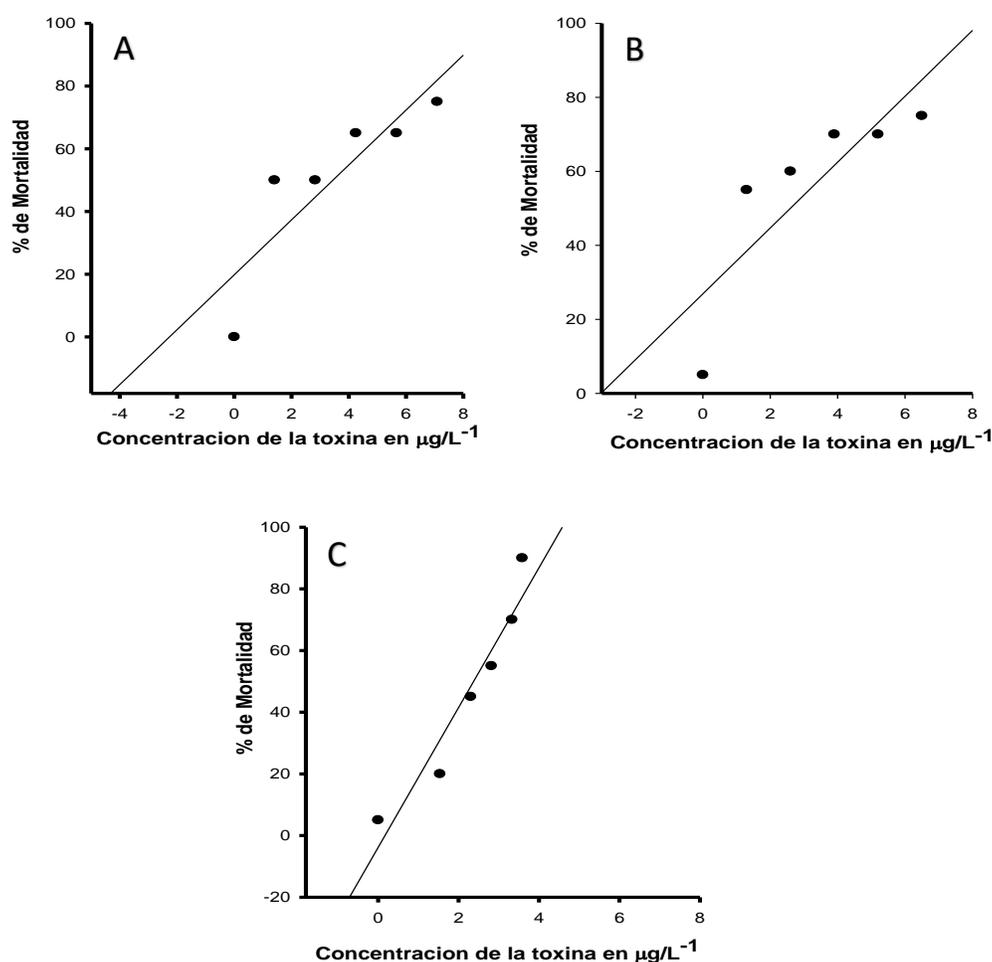


Figura 2. Representación gráfica de los valores de mortalidad con respecto a la concentración de toxina, obtenidos de la prueba de concentración letal media (CL₅₀) en *Moina macrocopa* para los periodos: a. Junio-Julio. b. Septiembre-Octubre. c. Marzo-Abril

Los resultados obtenidos en esta prueba para cada periodo de estudio se presentan en las Figura 2. Estos datos fueron procesados para poder obtener el CL_{50} mediante el programa probit Individuals, end points. Para el caso del CL_{50} del periodo marzo-abril las concentraciones se modificaron, debido a que en las concentraciones que se habían utilizado en los periodos anteriores, no se presentó mortalidad. Por tal motivo se amplió el rango de la prueba para este periodo. Los valores obtenidos del CL_{50} para cada periodo fueron 1.6, 1.3, 2.6 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente y a partir de estos se tomó un 10% de cada uno para obtener una concentración subletal y de igual forma de este 10% se tomó la mitad de cada valor para tener un punto de comparación en los valores de la tabla de vida.

8.3. Pruebas de Toxicidad crónica (Tabla de vida)

Las curvas de supervivencia de *Moina macrocopa* en dos diferentes concentraciones de extracto de cianobacterias indican que entre mayor es la concentración, menor es la capacidad de la población de sobrevivir. Para el caso del periodo junio-julio se observó que en ausencia de la toxina (Control) la supervivencia fue de 14 días en comparación con la concentración baja (0.079 $\mu\text{g L}^{-1}$) y la concentración alta (0.16 $\mu\text{g L}^{-1}$) donde la toxina tuvo un efecto adverso reduciendo la supervivencia a 12 y 9 días respectivamente (Fig 3).

En el periodo correspondiente a septiembre-octubre, la supervivencia en el control tuvo una duración de 12 días, mientras que en los tratamientos de baja y de alta concentración de la toxina de este mismo periodo, la supervivencia cayó hasta los 10 días en ambos casos, mostrando que el aumento de concentración no tuvo efecto sobre la supervivencia (Fig 3).

Para el último periodo, correspondiente a los meses marzo-abril, la supervivencia en el control fue de 15 días, esta fue con respecto al tiempo la más grande de los tres periodos. Por otro lado los tratamientos de baja, 0.12 $\mu\text{g L}^{-1}$ y de alta, 0.26 $\mu\text{g L}^{-1}$ concentración, afectaron la supervivencia, reduciendo hasta 12 y 9 días respectivamente (Fig 3).

Por otro lado, para el caso de la fecundidad se pueden observar patrones diferentes en cada periodo. En el primer periodo, la reproducción sin la presencia de toxinas comenzó a partir del día 3 obteniendo un primer pico de reproducción en el día 7 y un segundo pico en el día 11, concluyendo su ciclo de reproducción en el día 13. En el tratamiento que contenía 0.079 $\mu\text{g L}^{-1}$ de la toxina. la reproducción comenzó en el día 4 obteniendo su primer pico de igual forma en el día 7 y un segundo pico en el día 9 con la diferencia de que a comparación del control la reproducción fue mayor. Para el tratamiento de 0.16 $\mu\text{g L}^{-1}$ la reproducción comenzó en el día 3 y solamente obtuvo un pico en el día 7 (Fig 4).

En el segundo periodo la reproducción para el control comenzó a partir del día 5 obtenido un pico máximo de reproducción en el día 9. Para los tratamientos de este periodo ambos tuvieron su pico máximo de reproducción los días 7 y 8, respectivamente, como particularidad de este periodo, en todos los tratamientos solo se presentó un pico de reproducción (Fig 4).

Por último, la reproducción para el periodo de marzo comenzó a partir del día 4 obteniendo dos picos máximos de reproducción los días 8 y 13. En el tratamiento de 0.25% la reproducción tuvo un total de 4 picos de reproducción los días 6, 8, 10 y 12. Teniendo la mayor reproducción el día 8. El último tratamiento obtuvo un total de tres picos de reproducción, teniendo la mayor cifra reproductiva el día 7. Cabe mencionar que esta cifra fue el doble que los picos del control (Fig 4).

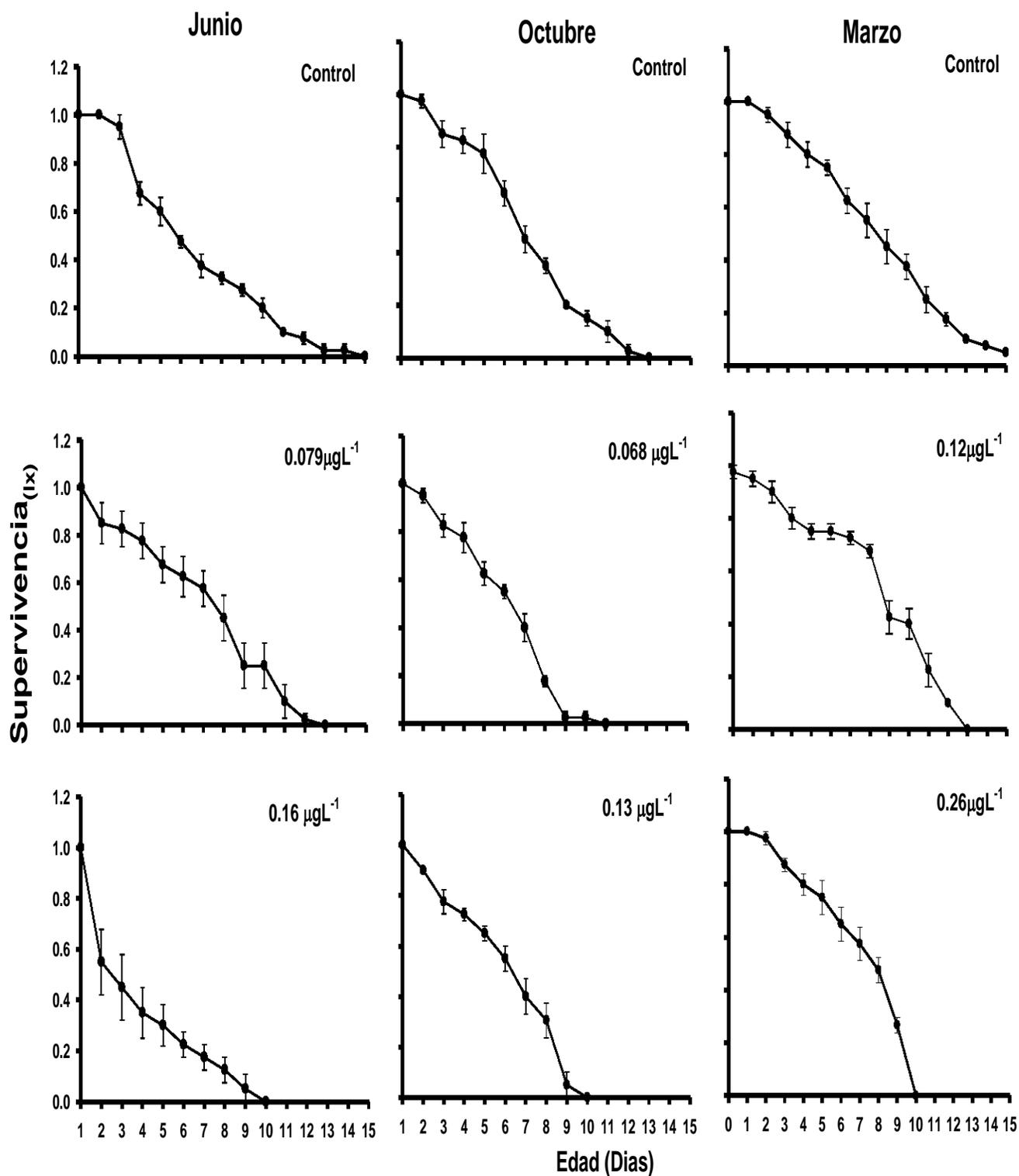


Figura 3. Supervivencia edad-específica de *Moina macrocopa* en presencia del extracto diluido de cianobacterias con diferentes concentraciones, en tres periodos diferentes y *Scenedesmus acutus* a 0.5×10^6 cels mL^{-1} como alimento. Media obtenida de cuatro repeticiones (cohortes) \pm error estándar.

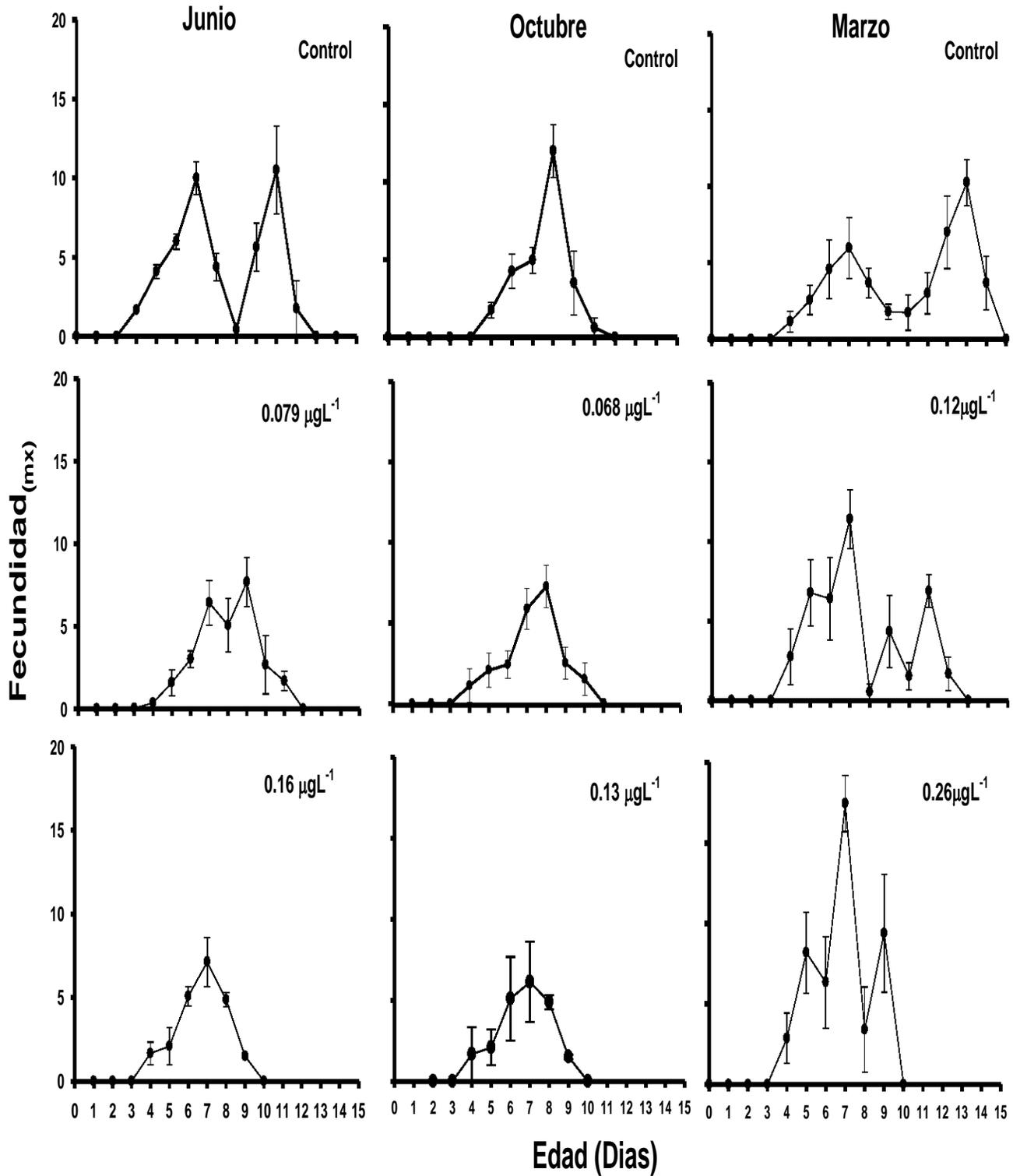


Figura 4. Índice de Fecundidad (mx) de *Moina macrocopa* en tratamientos con extracto diluido de cianobacterias en tres periodos diferentes y *Scenedesmus acutus* a 0.5×10^6 cels mL⁻¹ como alimento. Media obtenida de cuatro repeticiones \pm error estándar.

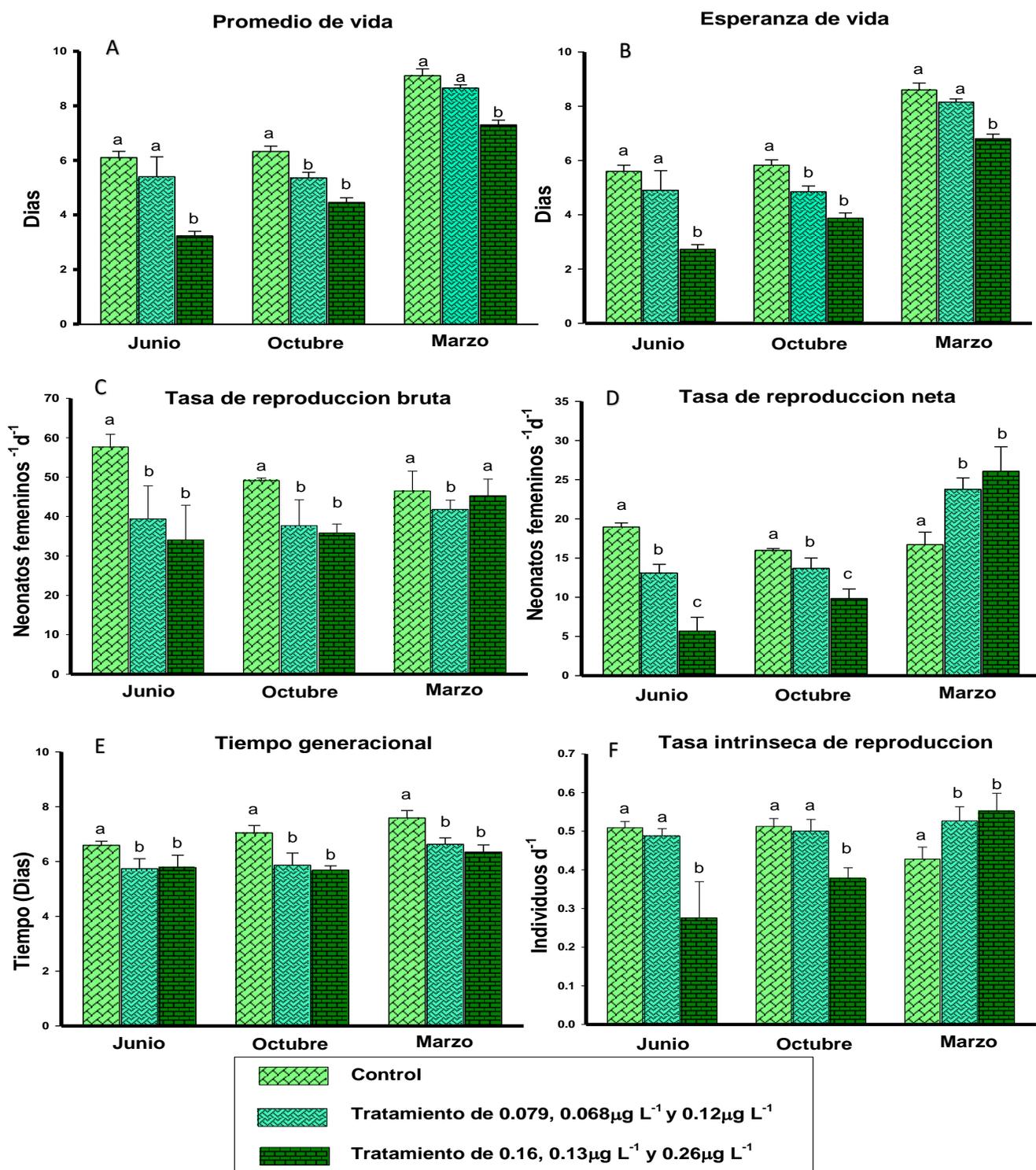


Figura 5. Variables demográficas de *Moina macrocopa* en presencia del extracto diluido de cianobacterias con diferentes concentraciones, en tres periodos diferentes y *Scenedesmus acutus* a 0.5×10^6 cels mL⁻¹ como alimento. Media obtenida de cuatro repeticiones \pm error estándar. Para cada variable las barras de datos con la misma letra alfabética no son significantes $p > 0.05$, prueba de Tukey).

El tratamiento control de *Moina macrocopa*, mostró los valores mayores en la variable promedio de vida, alcanzando un total de 6 días para el primer y segundo periodo y 9 días para el tercer periodo. Los resultados obtenidos demuestran que estos organismos al estar en contacto con la toxina en comparación con el control reducen su promedio de vida, alcanzado 5.4 y 5.3 días para los dos primeros periodos respectivamente y 8.6 para el tercer periodo con la baja concentración del extracto, significativamente diferente que los controles ($P > 0.05$, ANDEVA). Para el caso de las concentraciones altas, el promedio de vida varió entre 3.2 a 7.3 días, significativamente más baja que los controles ($P < 0.05$, ANDEVA) (Tabla 3).

Los datos obtenidos de la esperanza de vida resultaron ser muy semejantes a los datos del promedio vida, del valor más alto obtenido por control, que contenía medio EPA y *S. acutus* a 0.5×10^6 cels mL^{-1} como alimento, decreciendo consecuentemente conforme se aumentaba la concentración de las toxinas, obteniendo diferencias significativas ($P < 0.05$) con respecto al control. A diferencia del periodo junio-julio donde no hubo diferencia significativa entre el control y el tratamiento de baja concentración (Tabla 4).

En cuanto a la evaluación de las variables reproductivas, la tasa de reproducción bruta demostró tener una mayor reproducción en los controles de los tres periodos, alcanzado valores en promedio de más de 50 neonatos por día, en comparación a los tratamientos de baja concentración de los dos primeros periodos donde mostraron valores de reproducción significativamente bajos, con menos de 40 individuos por día ($P < 0.05$ ANDEVA). De igual forma el tratamiento de alta concentración mostró una disminución significativa de la reproducción obteniendo un promedio de 35 neonatos por día en comparación con los controles $P < 0.05$ (Tabla 5). Cabe resaltar que en el último periodo el tratamiento de alta concentración no mostró diferencia significativa con respecto al control, pero con el tratamiento de baja concentración se mostró diferencia significativa ($P < 0.05$ ANDEVA).

La tasa reproductiva neta, mostró la misma tendencia, existiendo una mayor reproducción en los tratamientos control para el caso de los dos primeros periodos con un promedio de 18 neonatos por día. Obteniendo diferencias significativas en comparación con el tratamiento de baja concentración para ambos periodos ($P < 0.05$) con un promedio de 15 neonatos por día. En el caso del tratamiento de alta concentración se obtuvo un total de 8 neonatos por día, mostrando una diferencia significativa tanto para el control, como para el tratamiento de baja concentración ($p < 0.05$) (Tabla 6). De igual forma se resalta que para el tercer periodo esta situación se vió modificada por completo al tener significativamente

una mayor reproducción en los tratamientos con extracto, que el mismo control sólo con *S. acutus* ($P < 0.05$). Esto para ambos tratamientos con respecto al control.

Los valores obtenidos del tiempo generación, mostraron que los organismos en los controles de cada periodo tardan en promedio 7 días hasta alcanzar su primer pico máximo de reproducción, a diferencia de los tratamientos con baja concentración del extracto que tardan en promedio hasta 5.3 días, mostrando diferencias significativas respecto al control ($P < 0.05$). En el tratamiento de alta concentración se observa que los organismos tardan en promedio desde su nacimiento hasta su primer pico de reproducción alrededor de 6 días, significativamente menor que el control pero no con el tratamiento de baja concentración donde no se presenta una diferencia ($P < 0.05$ ANDEVA) (Tabla 7).

La tasa de incremento poblacional (r) de *Moina macrocopa* muestra la misma tendencia que se puede observar en la tasa de reproducción neta, donde se puede observar que en el último periodo ambos tratamientos con extracto, resultan tener significativamente una mayor tasa de crecimiento con respecto al control ($P < 0.05$). En cuanto al primer y segundo periodo el tratamiento de baja concentración muestra un crecimiento similar al control, por lo que no existen diferencias significativas con respecto al control. Para el tratamiento de alta concentración la tasa de crecimiento disminuyó significativamente en ambos periodos, no sólo en el control sino de igual forma en el tratamiento de baja concentración con una $p < 0.05$ (ANDEVA) (Tabla 8).

8.4. Analisis Estadístico (ANDEVA)

PROMEDIO DE VIDA					
Fuente de variación	DF	SS	MS	F	P
Epoca del año	2	72.919	36.459	165.852	<0.001
Concentración	2	22.52	11.26	51.221	<0.001
Epoca del año X Concentración	4	7.629	1.907	8.675	<0.001
Residual	27	5.935	0.22		
Total	35	109.003	3.114		

Tabla 3. Analisis estadístico (ANDEVA) de dos factores para el promedio de vida.

ESPERANZA DE VIDA					
Fuente de variación	DF	SS	MS	F	P
Epoca del año	2	72.827	36.414	162.709	<0.001
Concentración	2	22.347	11.174	49.928	<0.001
Epoca del año X Concentración	4	7.759	1.94	8.668	<0.001
Residual	27	6.042	0.224		
Total	35	108.976	3.114		

Tabla 4. Analisis estadístico (ANDEVA) de dos factores para la esperanza de vida

TASA DE REPRODUCCION BRUTA					
Fuente de variación	DF	SS	MS	F	P
Epoca del año	2	1079.993	539.997	3.671	0.039
Concentración	2	450.991	225.496	1.533	0.234
Epoca del año X Concentración	4	1253.393	313.348	2.13	0.104
Residual	27	3971.588	147.096		
Total	35	6755.966	193.028		

Tabla 5. Analisis estadístico (ANDEVA) de dos factores para la tasa de reproducción bruta.

TASA DE REPRODUCCION NETA					
Fuente de variación	DF	SS	MS	F	P
Epoca del año	2	957.594	478.797	47.921	<0.001
Concentración	2	156.123	78.061	7.813	0.002
Epoca del año X Concentración	4	474.077	118.519	11.862	<0.001
Residual	27	269.768	9.991		
Total	35	1857.562	53.073		

Tabla 6. Analisis estadístico (ANDEVA) de dos factores para la tasa de reproducción neta.

TIEMPO GENERACIONAL					
Fuente de variación	DF	SS	MS	F	P
Epoca del año	2	4.525	2.262	6.042	0.007
Concentración	2	4.35	2.175	5.808	0.008
Epoca del año X Concentración	4	5.21	1.303	3.478	0.02
Residual	27	10.11	0.374		
Total	35	24.195	0.691		

Tabla 7. Analisis estadístico (ANDEVA) de dos factores para el tiempo generacional.

TASA INTRINSECA DE CRECIMIENTO					
Fuente de variación	DF	SS	MS	F	P
Epoca del año	2	0.0792	0.0396	5.558	0.01
Concentración	2	0.0184	0.00921	1.292	0.291
Epoca del año X Concentración	4	0.235	0.0587	8.236	<0.001
Residual	27	0.192	0.00713		
Total	35	0.525	0.015		

Tabla 8. Analisis estadístico (ANDEVA) de dos factores para la tasa intrínseca de crecimiento.

8.5. Concentraciones de microcistinas

A los extractos crudos de cianobacterias se les detectó la presencia de alguna de las microcistinas que detecta la técnica de ELISA (Microcistina-LR), en un intervalo de detección de 0.16 a 2.6 $\mu\text{g L}^{-1}$. En todos los tratamientos analizados se determinaron concentraciones no mayores a 0.3 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Tabla 2).

Tratamientos	Concentración de microcistinas crudas $\mu\text{g L}^{-1}$
Tratamiento Diluido Junio (0.22%)	0.16
Tratamiento Diluido Junio (0.11%)	0.079
Tratamiento Diluido Octubre (0.2%)	0.13
Tratamiento Diluido Octubre (0.1%)	0.068
Tratamiento Diluido Marzo (0.5%)	0.26
Tratamiento Diluido Marzo (0.25%)	0.12

Tabla 2. Concentración de cianotoxinas en $\mu\text{g L}^{-1}$ obtenida mediante una prueba ELISA, calculada para cada tratamiento de los tres diferentes periodos.

9. Discusión

Los diferentes factores bióticos y abióticos a menudo causan estrés sobre los cladóceros, estos pueden ser evaluados mediante estudios de crecimiento de la población u observaciones en una tabla de vida. Si bien los estudios del crecimiento de la población nos arrojan datos sobre las abundancias pico y el tiempo necesario para alcanzar estas densidades, estos por si solos no pueden mostrar los efectos adversos del estrés sobre los parámetros relacionados con la supervivencia, o con la reproducción (Nandini *et al.*, 2004). Para esto se utilizan estudios demográficos

de tabla de vida que nos proporcionan datos sobre la edad específica, la mortalidad y la fecundidad (Krebs, 1985).

Las variables de la tabla de vida, son indicadores sensibles del estrés ambiental. La supervivencia específica de la edad y la mortalidad son dos unidades básicas para explicar muchas variables de la historia de vida, tales como la tasa bruta y neta de reproducción, tiempo de generación y la tasa de incremento de la población. Aunque no todas estas variables son igualmente sensibles a una presión dada, y debido al hecho de que algunos de ellos no muestran desviaciones significativas de los controles bajo condiciones de estrés es importante evaluar las estrategias de historia de vida de zooplancton (Roex *et al.*, 2000). Sin embargo, cuando la presión es demasiado alta la reproducción se inhibe, por lo que la únicas variables que podrían medirse son aquellas relacionadas con la supervivencia, tales como el promedio de vida, que bajo estas condiciones es de hecho sensible (Nandini *et al.*, 2004). En el presente estudio se observó que la presión generada por la presencia de cianotoxinas afectó de forma considerable la mayoría de las variables de la historia de vida de *Moina macrocopa* pudiéndose notar desde el tratamiento de baja concentración donde, para cada periodo, hubo una alteración en ésta variable demográfica.

Actualmente no se sabe si las diferentes especies de cladóceros responden de una manera similar cuando se exponen a extractos crudos de cianotoxinas extraídas por medio de la congelación, debido a que dicho método ayuda a extraer la mayoría de las toxinas. Además, en comparación con otros puntos ecológicos sensibles, tales como las tasas de alimentación y de filtración o la velocidad de natación, el enfoque demográfico de tabla de vida es muy sensible al estrés de las sustancias tóxicas (Espinosa-Chávez y Martínez-Jerónimo, 2002; Zamora-Barrios *et al.*, 2015). Por otro lado en los estudios ecotoxicológicos se emplean especies que tienen una gran relevancia ecológica, para que, a partir de los resultados obtenidos, se pueda realizar una extrapolación a toda la comunidad y de esta manera establecer estándares de calidad confiables. Bajo este contexto uno de los grupos más importantes son los organismos zooplanctónicos como son los géneros *Daphnia*, *Ceriodaphnia*, *Moina* y *Diaphanosoma*, ya que conforman una de las comunidades más amplias y variadas dentro de los sistemas acuáticos (Ventura, 2008).

Los extractos de cianobacterias se han probado en varios organismos, pero con respecto a la pertinencia, en ensayos ecotoxicológicos, el zooplancton es el grupo con mayor importancia. Se han realizado pocos estudios utilizando extractos crudos de cianobacterias sobre cladóceros a pesar del hecho de que este grupo de zooplancton se utiliza comúnmente en bioensayos ecotoxicológicos (Zamora-Barrios *et al.*, 2015). *Moina macrocopa* es un cladóceros que podría utilizarse como

organismo estándar para bioensayos toxicológicos, tanto agudos como crónicos, ya que esta especie se distribuye en zonas tropicales; cuenta con varias propiedades como: tener un ciclo de vida corto, alta fecundidad, breves tiempos generacionales, es fácil de mantener y cultivar, y presenta reproducción partenogenética (Maier, 1993). Además, tiene un amplio rango de distribución por lo que podría cultivarse bajo condiciones templadas, subtropicales y tropicales.

Hoy en día, se han desarrollado trabajos de bioensayos para evaluar la toxicidad de las cianobacterias, generalmente en ellos se utilizan organismos modelo, como es el caso de *Daphnia*, que es un género representativo de los cladóceros, ya que es utilizado frecuentemente en diversas investigaciones biológicas (Zamora-Barrios *et al.*, 2015). Sin embargo este organismo forma parte del plancton de la zona limnética de regiones templadas, siendo rara su presencia en los cuerpos de agua tropicales, lo que reduce la posibilidad de extrapolar los resultados que se obtienen con este organismo a cuerpos de agua dulce tropicales, sin embargo, es sustituida por moinidos y bosminidos (Dumont, 1994). *M. macrocopa* es un cladóceros que se distribuye ampliamente en regiones tropicales con temperaturas de 5° a 30°C, por lo que es un gran candidato para sustituir a los daphnidos que son menos comunes en cuerpos de agua tropicales (Maier, 1993).

Uno de los parámetros en la presencia de cianotoxinas que se vieron afectados, fue el caso de la disminución de la supervivencia en las concentraciones más altas de las cianotoxinas, disminuyendo 38% para los tres periodos. Zamora-Barrios *et al.* (2015) demostraron que *Ceriodaphnia cornuta* a bajas concentraciones de cianotoxinas presenta tasas de reproducción y supervivencias a niveles bajos. En contraste *M. macrocopa* en concentraciones bajas de extractos de cianobacterias, presenta un comportamiento intermedio entre la ausencia de toxina y la alta concentración, teniendo en promedio un 25% de la disminución de la supervivencia. De la misma forma, Okumura *et al.* (2006) encontraron que las microcistinas pueden causar efectos negativos sobre la supervivencia de diferentes especies cladóceros, incluyendo a *Ceriodaphnia dubia* y *Ceriodaphnia silvestrii* con concentraciones bajas de esta cianotoxina.

Por otro lado en el caso de las variables relacionadas con la fecundidad y reproducción, se mostraron diferentes comportamientos como sucedió en el periodo de junio-julio donde las variables demográficas se vieron afectadas negativamente disminuyendo conforme se aumentaba la concentración. Esta situación al igual que las bajas supervivencias del cladóceros se pueden explicar, primeramente por la temporada del año a la que pertenecen estos meses la cual corresponde a la época de lluvias. En esta época la temperatura y la irradiación de luz es mayor, lo que favorecerá la proliferación de cianobacterias, gracias a su capacidad para explotar intensidades de luz muy bajas o altas, optimizar la

fotosíntesis mediante la flotación en la columna de agua, soportar amplios rangos de temperatura, crecer en ambientes crónicamente deficientes en nutrientes y resistir la depredación debido a su capacidad de sintetizar toxinas (Aubriot *et al.*, 2009). Además en este periodo la cianobacteria que dominaba era *Microcystis aeruginosa*. Retomando esto último, Jang *et al.* (2007) concluyeron por primera vez que el género *Microcystis* se asocia con la presencia de consumidores. Y los estudios han demostrado que el aumento de la producción de microcistinas potencialmente tóxicas en varias cepas de *M. aeruginosa* es una defensa inducida mediada por contacto físico asociado con la alimentación o por señales químicas de zooplankton herbívoro o peces fitoplanctónicos. Provocando así no solo la alteración de las diferentes variables demográficas sino que también otros factores como la alteración en su alimentación o la inhibición de enzimas digestivas (Agrawal *et al.*, 2005).

Durante el periodo de septiembre-octubre, los resultados obtenidos fueron semejantes a los del primer periodo. Este periodo presentó una particularidad, la cual era que existía más de una especie de *Microcystis*. Por un lado se tenía a *Microcystis wesenbergii* la cual demostró tener efecto sobre la supervivencia de *Moina macrocopa* acortándola a siete días en las concentraciones más altas, mientras que en las concentraciones bajas de la cianobacteria aplazaba unos días más su supervivencia (Yasuno *et al.*, 1998). Y como es de observarse tanto la supervivencia como la fecundidad y las variables relacionadas a esta fueron afectadas en este segundo periodo, cabe resaltar que no fue la única especie de *Microcystis*. Por otro lado Watanabe (1996) indicó que *M. wesenbergii* ha sido considerada generalmente como una cianobacteria no tóxica, pero (Otsuka *et al.*, 1999) concluyeron que la mayoría de los morfotipos de *Microcystis* incluyen tanto cepas tóxicas como no tóxicas. En República Checa se demostró que *M. wesenbergii* contenía muy poca o nada de microcistinas (Marsalek *et al.*, 2001). Por otro lado, los florecimientos hepatotóxicos de *Microcystis* en los lagos daneses fueron dominados por *M. wesenbergii* (Henriksen, 1996).

Como ya se mencionó en este segundo periodo se tuvo la presencia de una segunda especie la cual es *Microcystis flos-aquae*. Jungmann (1994) demostró que *M. flos-aquae* presenta un compuesto que altera la supervivencia de *Daphnia pulex* y de igual forma en el segundo periodo todas las variables demográficas se vieron afectadas. Por otro lado para el tercer y último periodo la especie de *Microcystis* que se encontraba dominante en la pista era *Microcystis flos-aquae* pero a diferencia del segundo periodo, en éste las variables demográficas como la supervivencia disminuyeron, en contraste con las variables de reproducción las cuales aumentaron, además cabe resaltar que para poder alcanzar o igualar los parámetros de los dos periodos anteriores se aumentó el rango de concentración

debido a la falta de toxicidad. Con referente a esto Padilla *et al.* (2006) menciona que la toxicidad dependerá de la cepa, mas que de la especie misma, que se encuentre en un preciso momento en un cuerpo de agua.

La toxicidad depende de las cepas y no de las especies, pudiendo coexistir en un mismo sitio cepas de la misma especie, tóxicas y no tóxicas (Sirenko 1980; Margalef 1983; Ohtake *et al.*, 1989; Skulberg *et al.*, 1993). Solamente para *Microcystis* sp. se han identificado no menos de 68 cepas diferentes, entre las cuales la proporción entre tóxicos y no tóxicos varía entre 6 y 86 % (Shirai *et al.*, 1991). Además en un estudio anterior, se encontró que las cianobacterias aumentan su producción de toxinas en respuesta a la presencia de zooplancton, como una defensa inducida mediada por la liberación de sustancias químicas del zooplancton (Jang *et al.*, 2003). Esta situación ha sido considerada como una respuesta evolutiva para proporcionar protección a las cianobacterias contra el zooplancton (DeMott y Moxter, 1991). Actualmente se sabe que el aumento de la producción de toxinas por las cianobacterias es respuesta al aumento de las densidades de zooplancton y las concentraciones infoquímicos liberados por el zooplancton.

En este trabajo, en contraste con lo obtenido por Zamora-Barrios *et al.* 2015, *Moina macrocopa* a diferencia de *Ceriodaphnia cornuta* presentó mayor resistencia a la exposición de los extractos de cianobacterias. Este comportamiento de resistencia de *M. macrocopa* podría explicarse, ya que se distribuye ampliamente en condiciones de eutroficidad si ningún problema, en ambientes con valores de pH de 9.17, y salinidad de hasta 2 g L⁻¹ (Espinosa-Chávez y Martínez-Jerónimo, 1992), y a la situación mencionada en el 2000 por Ferrao-Filho y colaboradores en donde los cladóceros tropicales mostraron una amplia resistencia a las cepas tóxicas de *Microcystis*. Aunque por otro lado varios cuerpos de agua con altas densidades de cianobacterias tienen densidades bajas de cladóceros (Smith y Lester, 2007). Algunos estudios han descrito la coexistencia entre los cladóceros y las cianobacterias, cuando estos las utilizan como alimento (Ferrao-Filho y William 2000; Nandini 2000). Esto puede llevar a la generación de una resistencia por parte de los cladóceros..

La toxicidad de estas sustancias depende de los organismos en los que se prueban; son a menudo más tóxicos para los animales (Agrawal *et al.*, 2005) que a las algas o plantas. Mientras que los estudios indican que la toxicidad es mayor en extractos de cianobacterias de los florecimientos recién recogidos (Okumura *et al.*, 2006; Vasconcelos *et al.*, 2010), también hay algunos que sugieren que los florecimientos no siempre son tóxicos (Feizhou *et al.*, 2013). De estas observaciones surge la importancia de que estos estudios se realicen con mayor frecuencia, y en particular por la rapidez y relativa facilidad para la obtención de resultados.

La prueba ELISA para la detección de microcistinas mostró que aunque los extractos contenían concentraciones bajas de toxinas en comparación con las permisibles por la WHO de $1\mu\text{L}^{-1}$ para “agua potable”. Se observó una reducción considerablemente a la demografía de los organismos. Sin embargo, quedó documentado que las cianobacterias pueden producir más de una cianotoxina al mismo tiempo así como metabolitos secundarios que pueden también ser tóxicos (Jungmann 1992). Tal como lo mostró Claska en 1998 donde menciona que la anatoxina-a afecta la fertilidad de los cladóceros, reduciendo el número de crías por la madurez del embrague y el retraso. En relación a niveles permisibles de microcistinas para lagos de recreación Chorus y Bartram (1999) mencionan que estos deben tener cuando *Microcystis* es dominante de $20\mu\text{g L}^{-1}$

La literatura actual hace referencia a los efectos dañinos de muchas cepas de cianobacterias productoras de toxinas, sin embargo, la mayoría de estos trabajos fueron realizados en países de climas templados (Canter *et al.*, 1990), lo cual genera una necesidad de investigación para los países con climas tropicales, México incluido, donde se han realizado ya algunos trabajos que hacen referencia a la toxicidad de las cianobacterias en lugares con problemáticas de eutrofización de sus cuerpos de agua y con énfasis a sitios que son fuente de abastecimiento de agua para consumo humano o lugares de esparcimiento recreacional como es el caso del Lago de Chapala en el estado de Jalisco, Valle de Bravo en el Estado de México y Lagos urbanos como Tezozómoc y Chapultepec en la Ciudad de México.

10. Conclusiones

- La extracción de cianotoxinas de las diferentes especies de *Microcystis* en los diferentes periodos producen efectos adversos sobre las variables de supervivencia y reproducción de *Moina macrocopa*.
- La presencia de cianotoxinas como las microcistinas en los los cuerpo de agua, puede alterar la reproducción y sobrevivencia de los organismos que están en contacto directo con éstas, por dicha situación es de gran importancia realizar con mayor frecuencia experimentos que nos permitan comprender respuestas ecológicas de los organismos en presencia de cianotoxinas.

- Las variables reproductivas de *M. macrocopa* para los periodos de junio-julio y septiembre-octubre se vieron afectadas en presencia de las cianotoxinas, de tal modo, que conforme aumentaba la concentración esas variables disminuían.
- Para el periodo de marzo-abril las variables reproductivas resultaron ser diferentes en comparación con los periodos pasados, en este caso la reproducción conforme aumentaba la concentración del extracto aumentaban de igual forma.
- En el caso de los tres periodos la supervivencia de *Moina macrocopa* se vió afectada desde las concentraciones mas bajas de cianotoxinas, reduciéndola en un 38% con respecto a los controles que no tenían cianotoxinas.
- El efecto adverso sobre las variables demográficas de *Moina macrocopa* se le atribuye a la presencia de microcistinas generadas por parte de las cianobacteria. Sin embargo se sabe y se puede atribuir también a la presencia y capacidad de producción de otras toxinas como podrían ser las neurotoxinas.

Referencias

- Agrawal M.K., D. Bagchi., S. N. Bagchi. 2005. Cysteine and serine protease mediated proteolysis in body homogenate of a zooplankter, *Moina macrocopa*, is inhibited by the toxic cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 141:33-41.
- Alonso-Andicoberry, C., García-Villada, L., López-Rodas V. & E. Costas. 2002. Catastrophic mortality of flamingos in a Spanish national park caused by cyanobacteria. *The veterinary Record* 151: 706-707.
- Alva-Martínez, A., S. S. S. Sarma and S. Nandini. 2001. Comparative Population Dynamics of Three Species of Cladocera in Relation to Different Levels of *Chlorella vulgaris* and *Microcystis aeruginosa*. *Crustaceana* 74: 749-764.
- Alva-Martínez, A., S.S.S. Sarma and S. Nanidini. 2007. Effect of mixed diets (cyanobacteria and green algae) on the populations growth of the cladocerans *Ceriodaphnia dubia* and *Moina macrocopa*. *Aquat Ecol.* 41: 579-585.
- APHA (American Public Health Association). American Water Works Association & Water Pollution control Federation. 1994. Standard methods for the examination of water and wastewater . 17 Ed. APHA Washington D.C. 1197pp.
- Arzate, C. M. 2008. Detección de Cianobacterias toxigénicas pertenecientes al género *Microcystis* mediante marcadores y ensayos biológicos (Tesis de maestría, Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas).
- Aubriot, L. 2009. Cianobacterias planctónicas: factores que regulan su crecimiento. En: BONILLA, S.(ed.), Cianobacterias Planctónicas del Uruguay Manual para la identificación y medidas de gestión.
- Azevedo, S. M. F. O., W. W. Carmichael., E. M. Jochimsen., K. L. Rinehart., S Lau., G. K. Eaglesham. 2002. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru/Brazil. *Toxicology* 182: 441-446.
- Azis K. M. S. 1974. Diarrhea toxin obtained from a water bloom producing species of *Microcystis aeruginosa* Kutz. *Science* 193: 1206-1207

Beyruth, Z., C.L. Santanna., M.T. de P. Azevedo., M. do Carmo Cavalho y H.A.S.L. Pereira. 1992: Toxic algae in freshwaters of Sao Paulo State. En: Cordeiro-Marino, M. *et al.* 1992. *Algae and Environment: a general approach.* 131 pp. SBFic./CETESB. Sao Paulo. p 52-64.

Bozo, L., M, Fernández., M, López. 2007. Biomarcadores de contaminación química en comunidades microbianas. *Interciencia* 32: 8-13

Briand, J. F., C. Lebouranger., J. F. Humbert., C. Bernard & P. Dufour. 2004. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) invasión at mid-latitudes: selection, wide physiological tolerance, or global warming? *Journal of Phycology* 40: 231-238.

Camargo J.A., A. Alonso. 2007. Contaminación por nitrógeno inorgánico en los ecosistemas acuáticos: problemas medioambientales, criterios de calidad del agua, e implicaciones del cambio climático. *Ecosistemas*, 16: 98-110.

Canter, M. H., I. S. Heaney., G. Lund. 1990. The ecological significance of grazing planktonic populations of cyanobacteria by the ciliate *Nassula*. *New Phytol.* 114: 247-263.

Carmichael, W.W. and I.R. Falconer. 1993. Diseases related to freshwater blue-green algal toxins, and control measures. En: I.R. Falconer: *Algal toxins in seafood and drinking water.* Academic Press, Cap. 12. p. 187009.

Carmichael, W.W., N. A. Mahmood., E. G. Hyde. 1990. Natural toxins from cyanobacteria (blue-green algae). In: Hall S, Strichartz G (eds) *Marine toxins, origin, structure and Molecular pharmacology.* American Chemical Society, Washington DC, 418: 87-106.

Chorus, I and J. Bartram. 1999. *Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management.* E y FN Spon, London, 416 pp.

Choueri, B. R., K. P. Gusso., G. G. Melao., Lombardi, T.A. 2009. The influence of cyanobacterium exudates on copper uptake and toxicity to a tropical freshwater cladoceran. *Journal of plankton research* 31: 1225-1233.

Claska, E.M, and J.J. Gilbert. 1998. The effect of temperature on the response of *Daphnia* to toxic cyanobacteria. *Freshwater Biology* 39: 221-232.

Codd, G., L. Morrison., J. Metcalf. 2005. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection, *Toxicology and Applied Pharmacology* 203: 264-272.

demott, W. R and F. Moxter. 1991. Foraging on cyanobacteria by copepods: Responses to chemical defenses and resource abundance. *Ecology* 72: 1820- 1834.

Downing, J. A. 2014. Productivity of Freshwater Ecosystems and Climate Change. *Global Environmental Change* 221-229.

Downing, J. A. and F. H. Rigler. 1984. *A manual for the methods of assessment of secondary productivity in fresh waters*, 2nd ed., IBP Handbook 17. Blackwell Scientific, London.

Dumont, J.H.1994.Factors determining biogeography and distribution on the Cladocera in the tropics. *Hydrobiologia* 272: 27-38.

Espinosa-Chávez F, Martínez-Jerónimo F, Ramírez-Granado R (1992) Tasa de filtración y cultivo de *Moina macrocopa* Straus 1820 (Crustacea: Cladocera) alimentada con *Scenedesmus incrassatulus* (Chlorophyceae) y estiércol vacuno digerido. *Anales Inst. Ciencia del Mar y Limnol.* 19: 54-59.

Fargašová, A. 1997. Comparative study of ecotoxicological effect of triorgatonin compounds on various biological subjects, *Ecotoxicol & Environm. Saft.* 36: 38-42.

Feizhou, C., D. Xi., S. Tingting., R. D. Gulati., L. Zhengwen. 2013. Microcystins derived from lysing *Microcystis* cells do not cause negative effects on crustacean zooplankton in Lake Taihu China. *Aquat Ecol.* 47: 379-387.

Fernandez, M. A., J. L. Gama., E. Pavon., T. Ramirez., O. Angeles. 2010. Analisis de calidad del agua. UNAM. 10-14.

Ferrao-Filho, A and R. D. William. 2000. Effects of toxic and non-toxic cyanobacteria on the life history of tropical and temperate cladocerans. *Freshw Biol.* 45:1-19.

Ferrao-Filho, A., M. C. S. Soaresb., V. Magalhaesc., S. M.F.O. Azevedo. 2009. Biomonitoring of cyanotoxins in two tropical reservoirs by cladoceran toxicity bioassays. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 72 :479-489.

Fortúbel, R. F. 2005. Indicadores fisicoquímicos y biológicos del proceso de eutrofización del lago Titikaka (Bolivia), *Ecología Aplicada* 4: 135-141.

Gómez, L., Y. Larduet., N. Abrahantes. 2001. Contaminación y biodiversidad en ecosistemas acuáticos. el fitoplancton de la bahía de Santiago de Cuba. *Rev. Invest. Mar* 22: 191-197.

Henriksen, P. 1996. Microcystin profiles and contents in Danish populations of cyanobacteria/blue-green algae as determined by HPLC. *Phycologia* 35: 102-110.

Huisman, J and F. D. Hulot. 2005. Population dynamics of harmful cyanobacteria. *In Harmful Cyanobacteria*, Aquatic Ecology Series. eds. Huisman, J, Matthijs, HCP, and Visser, PM, Dordrecht, The Netherlands: Springer. 76-143.

Ikawa, M. and J.J. Sasner. 1990. The chemistry and physiology of algal toxins. *In: Introduction to applied physiology*. (Akatsuka, I. ed.). The Hague, SPB Academic Publ. p. 27-65.

Infante, A., Riehl, W. 1984. The effects of cyanophyta upon zooplankton in a eutrophic tropical lake (lake Valencia, Venezuela). *Hydrobiologia* 1: 293-298.

Ivleva, I. V. 1973. Biology and methods. Mass cultivation of invertebrates. Israel Program for Scientific Translations, Jerusalem. 148.

Jang, M. H., J. M. Jung and N. Takamura. 2007. Changes in microcystin production in cyanobacteria exposed to zooplankton at different population densities and microchemical concentrations. *Limnology and Oceanography* 52: 1454-1466.

Jang, M. H., K. Ha, G. J. Joo and N. Takamura. 2003. Toxin production of cyanobacteria is increased by exposure to zooplankton. *Freshw. Biol.* 48: 1540-1550.

Jungblut, A.D., S.J. Hoeger., D. Mountfort., B.C. Hitzfeld., D.R. Dietrich., B.A. Neilan. 2006. Characterization of microcystin production in an Antarctic cyanobacterial mat community. *Toxicon* 47: 271-278

Jungmann, D. 1992. Toxic compounds isolated from *Microcystis* PCC7806 that are more active against *Daphnia* than two microcystins. *Limnol. Oceanogr.* 37: 1777-1783.

Jungmann, D. and J. Benndorf. 1994. Toxicity to *Daphnia* of a compound extracted from laboratory and natural *Microcystis* spp., and the role of microcystins. *Freshwat. Biol.* 32: 13-20.

Krebs, C. J. (1985). *Ecology*. The experimental analysis of distribution and abundance. 3rd ed. Harper & Row, New York.

Lampert, W and U. Sommer. 1997. *Limnology: The ecology of lakes and streams*. Oxford Univ. Press, New York.

Lawton, L.A., D.L. Campbell., K.A. Beattie and G.A. Codd. 1990: Use of a rapid bioluminescence assay for detecting cyanobacterial microcystin toxicity. *Lett. Applied Microbiology* 11: 205-207.

Leflaive, J. and L. Ten-Hage. 2007. Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: a comparison of allelopathic compounds and toxins. *Freshwater Biology* 52: 199-214.

Maier, G. 1993. The life histories of two temporarily co-existing, pond dwelling cladocerans. *Internationale Revue dergesamten. Hydrobiology* 78: 83-93.

Mangas-Ramirez, E., S. S. S. Sarma & S. Nandini, 2002. Combined effects of algal (*Chlorella vulgaris*) density and ammonia concentration on the population dynamics of *Ceriodaphnia dubia* and *Moina macrocopa* (Cladocera). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 51: 216–222.

Margalef, R. 1983. *Limnología*. Omega. Barcelona. 1010 pp.

Marsalek, B., L. Blaha., J. Turanek., J. Neea. 2001. Microcystin-LR and total microcystins in cyanobacterial blooms in the Czech Republic 1993-1998.

Metting, B. and JW. Pyne 1986: Biologically active compounds from microalgae. *Enzyme and Microbiology Technology*, 8: 386-394.

Moreno, F. D. P., Q. J. Manzano., L. A. Cuevas., 2010. Métodos para idénticar, diagnosticar y evaluar el grado de eutrofia. *ContactoS* 78: 25-33.

Nakano, Y., M. Shirai, N. Mori y M. Nakano 1991. Neutralization of microcystin shock in mice by tumor necrosis factor alpha antiserum. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 327-330.

Namikoshi, M and K. L. Rinehart. 1996. Bioactive compounds produced by cyanobacteria. *J. Industrial Microbiol.* 17: 373-384.

Nandini, S. 2000. Responses of rotifers and cladocerans to *Microcystis aeruginosa* (Cyanophyceae): A demographic study, *Aquatic Ecology* 34 :227-242.

Nandini, S., S. M. Mayely., S. S. S. Sarma. 2004. Effect of stress on the life-table demography of *Moina macrocopa*. *Hydrobiology*, 526: 245-254.

NRA (National River Authority). 1990. Toxic blue-green algae. Water Quality Series Nº 2. Pearson, M.J. (Comp.). *Informe del grupo de trabajo sobre Algas Tóxicas*. National River Authority, U.K.

Oberholster, P. J. A. M. Botha, T. R. Cloete. 2006. Toxic cyanobacterial blooms in a shallow, artificially mixed urban lake in Colorado, USA, *Lakes & Reservoirs: Research and Management* 11: 111-123.

Ohtake, A., M. Shirai, T. Aida, N. Mori, K. Harada, K. Matsumura, M. Suzuki y M. Nakano. 1989. Toxicity of *Microcystis* species isolates from natural blooms and purification of the toxin. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 3202-3207.

Okumura, D., R. Sotero-Santos., R. Takenaka-Akemi., O Rocha. 2006. Evaluation of cyanobacteria toxicity in tropical reservoirs using crude extracts bioassay with cladocerans. *Ecotoxicology* 16: 263-270.

Otsuka, S., S. Suda, S., Li, R., Watanabe, M., Oyaizu, H., Matsumoto, S., Watanabe, M.M. 1999. Phylogenetic relationships between toxic and non-toxic strains of the genus *Microcystis* based on 16S to 23S internal transcribed spacer sequence. *FEMS Microbiol. Lett.* 172: 15-21.

Pietsch, C., C. Wiegand., M.V. Ame., A. Nicklisch., D. Wunderlin., S. Pflugmacher. 2001. The effects of a cyanobacterial crude extract on different aquatic organisms: Evidence for cyanobacterial toxins modulating factors. *Environ. Toxicol.* 16: 535-542.

Pineda, M. R. 2009. Determinación de cianobacterias toxigénicas productoras de microcistinas por métodos moleculares y bioensayos. Tesis de maestría, Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, México DF.

Ramírez, García P., E. Martínez, Romero., M. D. Martínez, Salgado., C. A. Eslava. 2004. Cianobacterias, microorganismos del fitoplancton y su relación con la salud humana. Instituto Nacional de Ecología, p. 1-18.

Repavich, W.M., W.C. Sonzogni., J.H. Standridge., R.E. Wedepohl y L.F. Meisner. 1990. Cyanobacteria (Blue-green algae) in Wisconsin waters: acute and chronic toxicity. *Water Research*, 24: 225-231.

Reynolds, C. S. 1991. Toxic blue-green algae: the "problem" in perspective. *Freshwater Forum* 1 :29-38.

Roex, E. W. M., C. A. M. van Gestel., A. P. van Wezel and N. M. van Straalen. 2000. Ratios between acute aquatic toxicity and effects on population growth rates in relation to toxicant mode of action. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19: 685-693.

Shirai, K.M., A. Ohtake., T. Sano., S. Matsumoto., T. Sakamoto., A. Sato., K. I. Harada., T. Shimada. 1991. Toxicity and toxins of natural blooms and isolate strains of *Microcystis spp.* (cyanobacteria) and improved procedure for purification of cultures. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 1241-1245.

Sirenko, L.A. 1980. Toxicity fluctuations and factors determining them. En Barica, J. y L.R. Mur (eds.): *Hypertrophic ecosystems*. Junk BV Publishers, La Haya. p. 231-234.

Sivonen, K. and G. Jones. 1999. Cyanobacterial toxins. En: Toxic cyanobacteria in water; Aguide to ther public health consequences, monitotoring and mangement. I. Chorus and J . Bartram (Eds.) London, Chapman and Hall: 41-111.

Skulberg, O.M., W.W. Carmichael., G.A. Codd and R. Skulberg. 1993. Taxonomy of toxic Cyanophyceae (Cyanobacteria). En: Algal toxins in seafood and drinking water. *Academic Press*, p.145-164.

Stewart, I., A. A. Seawright and G. R. Shaw. 2008. Cyanobacterial poisoning in livestock, wild mammals and birds- an overview. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 619: 613-637.

Thomas, A. D., M, L. Saker., J. H Norton and R. D. Olsen. 1998. Cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* as a probable cause of death in cattle in northerm Queensland. *Australian Vetenary Journal*, 76: 592-594.

UNESCO. 2009. Cianobacterias Planctónicas del Uruguay. Manual para la identificación y medidas de gestión. Sylvia Bonilla (editora). Documento Técnico PHI-LAC, N° 16.

Vasconcelos, V. 2001. Cyanobacteria toxins: diversity and ecological effects, *Limnetica*, 20: 45- 58.

Ventura, L. C. 2008. Biología reproductiva de *Ceriodaphnia rigaudi* Richard 1894 (Crustacea: Anomopoda) y efectos de su exposición a petróleo crudo. Tesis de Maestría. Escuela Nacional de Ciencias Biologicas. IPN. Mexico.

Visviki, I. and J.W. Rachlin. 1991. The toxic action and interactions of copper and cadmium to the marine alga *Dunaliella minuta*, in both acute and chronic exposure. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20: 271.

Watanabe, M. 1996. Isolation, cultivation and classification of bloom-forming *Microcystis* in Japan. In: Watanabe, M.F., Harada, K., Carmichael, W.W., Fujiki, H.P. (Eds.), Toxic Microcystis. CRC Press, Boca Raton, pp. 13e34.

Weber, C.I. 1993. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. 4th edn. United States, Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio, EPA/600/4-90/027.

Whitton, B and M. Potts. 2000. The ecology of Cyanobacteria. Kluwer Academic Publishers. USA, 671 pp.

Yasuno M., Y. Sugaya., K. Kaya and K. M. M. Watanabe. 1998. Variations in the toxicity of *Microcystis* species to *Moina macrocopa*. *Phycological Research* 46, 31-36.

Zamora-Barrios, C. A., S. Nandini and S. S. S. Sarma. 2015. Effect of crude extracts of *Dolichospermum planctonicum* on the demography of *Platyonus patulus* (Rotifera) and *Ceriodaphnia cornuta* (Cladocera). *Ecotoxicology* 24: 85-93.

Zheng, L and M. J. Paul. 2003. Effects Of Eutrophication On Stream Ecosystems.