



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

Toxicidad de extracto crudo de cianobacteria de la presa de Valle de Bravo en la población de *Brachionus calyciflorus* (Rotifera) y *Daphnia pulex* (Cladocera).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

CARLOS SÁNCHEZ ZAMORA



DIRECTOR DE TESIS:

NANDINI SARMA

**LOS REYES IZTACALA, ESTADO
DE MÉXICO (2018)**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria

A mi familia:

En especial a mis padres Rosalba Zamora González y Carlos Manuel Sánchez Yoal y a mi hermana Libertad Sánchez Zamora. Gracias por apoyarme durante todos estos años, en las buenas y en las malas, por siempre confiar en mí, por enseñarme a vivir la vida y hacer de mi lo que soy.

A una pequeña y pecosa persona:

A mi compañera, mi amiga y confidente, la persona que ha estado conmigo en todo momento. Te agradezco tanto, Lupe, eres la persona que me complementa. Gracias por cada momento, por pequeño que fuese y por cada sonrisa. Te amo.

“What is a scientist after all? It is a curious man looking through a keyhole, the keyhole of nature, trying to know what’s going on.”

-Jacques Yves Cousteau-

Agradecimientos

A la UNAM, principalmente a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala por la oportunidad que me fue otorgada para formarme dentro de esta institución con un profesional de la biología.

A la Dra. Nandini Sarma, que ha sido mi madre científica desde el momento en el que me abrió las puertas de su laboratorio de Zoología acuática para poderme desenvolver en esta rama. Por cada regaño, por cada reconocimiento, además por abrirme su corazón con el propósito de poderme superar, ser cada día mejor y poder llegar hasta este punto. Gracias.

A mis sinodales: Dr. S.S.S. Sarma, Dr. Hugo Virgilio Perales Vela, Dr. Pedro Ramírez García y M. en C. Teresa Ramírez Pérez por su tiempo y dedicación para poder pulir este trabajo.

A mis compañeros que están y estuvieron en el mismo laboratorio, por transmitirme su conocimiento, por los momentos divertidos y pláticas con cada uno de ustedes: César, Uriel, Cristian, Nayeli, Evelyn, Andrea, Karina, Alejandro, Tony, Toño nauplii, Toño, Michael, Rosa, Brenda, Mayra, Denise, Lety, Paulo, Selene, Christian, Alma, Gerardo, Ligia, Jair, Carlos profe y Beto.

A los compañeros de carrera que se convirtieron en otra familia para mí: Lupe, Rafa, Alfonso, Priscila, Sam, Adrian, Oscar, Bruno, Changungo, Sareni, David, Pato, Lala, Yunuen, Ileri y Xolotl.

A CONACyT por la beca de ayudante de investigador (SNI-20520) y a PAPIIT UNAM (IN219218).

Índice.

1. Resumen.	1
2. Introducción.	2
3. Antecedentes.	7
4. Justificación.	10
5. Objetivos.	12
6. Hipótesis.	12
7. Materiales y métodos.	13
7.1. Área de estudio:	13
7.2. Obtención de las muestras.	14
7.3. Identificación y cuantificación de las cianobacterias.	14
7.4. Preparación del extracto crudo de cianobacteria.	14
7.5. Determinación de la concentración de microcistinas.	15
7.6. Cultivo de organismos para las pruebas de toxicidad agudas y crónicas.	15
7.7. Prueba de toxicidad aguda.	15
7.8. Prueba de toxicidad crónica.	16
8. Resultados	19
8.1. Identificación y cuantificación de las cianobacterias.	19
8.2. Determinación de la concentración de microcistinas.	21
8.3. Prueba de toxicidad aguda (CL₅₀).	21
8.4. Pruebas de toxicidad crónica.	22
8.4.1. Crecimiento poblacional de <i>Brachionus calyciflorus</i>	22
8.4.2. Tabla de vida demográfica <i>Brachionus calyciflorus</i>	26
8.4.3. Crecimiento poblacional <i>Daphnia pulex</i>	33
8.4.4. Tabla de vida demográfica <i>Daphnia pulex</i>	37
9. Discusión.	44
10. Conclusiones.	52
11. Literatura citada.	53

1. Resumen.

La eutrofización de lagos y presas a lo largo del mundo es actualmente una gran problemática de salud ambiental y ligada a esto, el florecimiento recurrente de algas y en particular de cianobacterias, las cuales pueden ser nocivas, ya que, en muchos casos algunas pueden producir metabolitos tóxicos. La presencia de estas sustancias afecta las poblaciones de las especies que cohabitan estos sistemas y unas de ellas es el zooplancton el cual es dominado por rotíferos y cladóceros que son usados frecuentemente en ensayos de ecotoxicología, siendo el rotífero *Brachionus calyciflorus* y el cladóceros *Daphnia pulex* de las especies más utilizadas y tienen una amplia distribución en México. Valle de Bravo es una presa que abastece agua potable al área metropolitana de la ciudad de México, además de sufrir de un proceso de eutrofización. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de diferentes concentraciones del extracto crudo de cianobacterias de la presa Valle de Bravo en dos temporadas; secas (enero) y lluvias (septiembre) a 20 y 25°C sobre la demografía de las dos especies mencionadas anteriormente a través de pruebas toxicológicas usando dosis agudas y crónicas. El extracto crudo se preparó mediante 5 ciclos de congelación, descongelación y sonicado a 14MHz. Según las pruebas agudas con la muestra de enero *B. calyciflorus* obtuvo un LC₅₀ de 22.96 µg/L, mientras *D. pulex* de 133.96 µg/L. Mientras que para la muestra de septiembre *B. calyciflorus* obtuvo un valor de 14.39 µg/L, mientras que el valor de CL₅₀ de *D. pulex* fue de 236.56 µg/L. Las pruebas crónicas se realizaron a 20 y 25°C utilizando dos concentraciones subletales calculadas a partir del CL₅₀. Los resultados muestran una reducción en la supervivencia de ambas especies en presencia del extracto crudo de cianobacterias. La tasa de crecimiento se vio alterada en ambas especies, reduciéndose en *B. calyciflorus*, mientras que en *D. pulex* se vio aumentada. La temperatura al igual que la conformación taxonómica del florecimiento alteró la toxicidad de las cianotoxinas aumentando el efecto provocado por el extracto crudo. Se sugiere que estos estudios sean realizados de manera regular y sean incluidos en el monitoreo de la calidad de agua en cuerpos de agua continentales.

2. Introducción.

Mundialmente la eutrofización es un problema en los lagos y presas ocasionado por la contaminación de los cuerpos de agua debido a actividades antropogénicas que proveen de una gran cantidad de nutrientes, en especial fósforo y nitrógeno (Jeppesen *et al.*, 2011; Moss *et al.*, 2011). La introducción constante de nutrientes provoca una fuerte proliferación de organismos fitoplanctónicos, entre ellos, cianobacterias (Bartram *et al.*, 1999; Okumura *et al.*, 2007; Vela *et al.*, 2007). La proliferación de estos organismos (también conocida como florecimiento), muerte y posterior descomposición suelen conducir a una gran disminución de la concentración de oxígeno disuelto (Camargo *et al.*, 2007; Paerl y Huisman, 2008). De acuerdo a esto se pueden producir efectos ecológicos y toxicológicos directa o indirectamente relacionados con la proliferación de las cianobacterias (Briand *et al.*, 2003).

Las cianobacterias (cianoprocariontes, cianófitas o algas verdeazules) representan un antiguo, pero diverso y abundante grupo de microorganismos que poseen estructura celular procariota además de tener capacidad autotrófica. Su origen se estima en 3500 millones de años, su antigüedad ha propiciado que tengan una distribución cosmopolita, habitando ambientes terrestres y acuáticos, además de poder soportar condiciones adversas de alcalinidad y temperatura. Su intervalo ideal para el crecimiento es entre los 20 y 35°C, creciendo mejor a altas temperaturas comparado con otros organismos pertenecientes al fitoplancton (You *et al.*, 2017). Esta característica les da una ventaja sobre otros organismos como las diatomeas y las algas verdes, creciendo más en ambientes donde la temperatura es alta (Paerl y Huisman, 2009).

Estos organismos son comúnmente llamados algas verdeazules debido a que el pigmento fotosintetizador que utilizan es la ficocianina el cual les da esa coloración. El tamaño de sus células va desde menos de 1 µm de diámetro (picoplancton) hasta células de más de 20 µm de largo dependiendo de la especie, sin embargo, son capaces de formar colonias, las cuales pueden llegar a tener un tamaño mayor a

100 μm (Komárek, 2003). Una gran variedad de cianobacterias son capaces de formar florecimientos, además de poder producir metabolitos secundarios tóxicos con efectos directos o indirectos sobre una gran variedad de organismos (Dawson, 1998; Okumura *et al.*, 2007; Lopes *et al.*, 2010; Gélinas *et al.*, 2014; McGorum *et al.*, 2015). El ser humano también puede sufrir intoxicación por cianotoxinas (Svirčev *et al.*, 2017), debido a esto, la Organización Mundial de la Salud (OMS) indicó que la concentración permitida de MC-LR en sistemas utilizados para agua potable no deben exceder 1 $\mu\text{g/L}$ (WHO, 1998). Las cianobacterias son un gran problema debido a la producción de metabolitos secundarios llamados cianotoxinas, las cuales se clasifican de acuerdo: neurotoxinas, hepatotoxinas, citotoxinas y dermatotoxinas (Carmichael *et al.*, 1990).

En México, muchos de los cuerpos de agua sufren de eutrofización antropogénica (Olvera-Viascan *et al.*, 1998) provocando que, sumado a la presencia de cianotoxinas, la calidad del agua se vea afectada por medio de alteraciones en las propiedades organolépticas, reducción del oxígeno disuelto, etc. (Carmichael, 2001; Codd, 2005; Harke *et al.*, 2016). De estos cuerpos de agua, muchos son usados para agricultura, recreación y, algunos, como fuente de agua potable, por esto es necesario el estudio del potencial efecto tóxico de las cianobacterias (Vasconcelos, 2010).

Valle de Bravo es una presa que es parte del sistema Cutzamala el cual abastece de agua potable a la zona metropolitana de la ciudad de México con 14,700 L/s de este volumen, la presa de Valle de Bravo aporta 6000 L/s (40%), haciéndolo uno de los cuerpos de agua más importantes del estado de México (CONAGUA., 2005). Sin embargo, como en otras partes del mundo (Jeppesen *et al.*, 2007), este cuerpo de agua sufre de un proceso de eutrofización debido al constante flujo de nutrientes como lo son el nitrógeno y el fósforo los cuales provienen de fuentes antropogénicas (Olvera, 1990; Olvera-Viascán *et al.*, 2008; Ramírez-Zierold *et al.*, 2010). Se han reportado géneros de cianobacteria como son: *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Lyngbya*, *Microcystis* y *Woronichinia* los cuales dominan en el sistema en diferentes épocas del año dependiendo de las condiciones ambientales (Ramírez-García *et*

al., 2002; Gaytan-Herrera *et al.*, 2011). De los géneros reportados se han encontrado especies potencialmente tóxicas (Olvera-Ramírez *et al.*, 2010) haciendo que sea necesario conocer la toxicidad de las cianobacterias presentes (Vasconcelos *et al.*, 2010).

Estos organismos son muy conocidos por el daño que provocan en la biota acuática, en particular, sobre la comunidad de zooplancton, aunque sus daños son variables dependiendo de la especie de la que se trate (Agrawal *et al.*, 2001). La comunidad del zooplancton está principalmente representada por dos grupos; rotíferos y cladóceros (Thorp y Covich, 2001). En rotíferos y cladóceros se ha comprobado que la exposición a las cianotoxinas provoca una disminución en la supervivencia y fecundidad de manera considerable (Pires *et al.*, 2011; Soares *et al.*, 2010) y se debe a la presencia de estas toxinas el que se modifique la estructura y dinámica de la comunidad de estos organismos (Ger *et al.*, 2014).

El efecto tóxico de cianotoxinas purificadas ha sido muy estudiado, probando sus efectos sobre diversos organismos incluyendo plantas y bacterias, entre otros organismos terrestres o bien en células humanas (Mankiewicz-Boczek *et al.*, 2011; El Khalloufi *et al.*, 2012; Vishwakarma, 2013; Gelinis *et al.*, 2014). Sin embargo, las cianobacterias no forman un solo tipo de cianotoxina (Carmichael, 1992), por lo que el uso de metodologías como el extracto crudo puede dar datos más cercanos a lo ocurrido en la naturaleza. Esta metodología está pensada para representar los eventos que ocurren de manera natural al romper las células y liberar la toxina al medio. Se debe tener en cuenta que no hay certeza en que el efecto observado sea por una sola sustancia, sino por la interacción con otros metabolitos (Palíková *et al.*, 2007; Arzate-Cárdenas *et al.*, 2010). La mayoría de los trabajos realizados se han enfocado en el efecto de cepas de cianobacterias cultivadas bajo condiciones de laboratorio (DeMott *et al.*, 1991; Olvera-Ramírez *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2014). Debido a la creciente preocupación, se han realizado trabajos donde se prueba la toxicidad de florecimientos naturales sobre organismos de la biota acuática (Pietsch *et al.*, 2001; Sotero-Santos *et al.*, 2006; Okumura *et al.*, 2007; Sotero-Santos *et al.*, 2008; Barrios *et al.*, 2015).

Por otro lado, la temperatura juega un factor importante sobre el zooplancton y las cianobacterias ya que modifica su estructura, controlando aspectos importantes como la ecología y fisiología (Moore *et al.*, 1996; Jeppesen *et al.*, 2010). Las cianobacterias, además del incremento poblacional por la eutrofización, el cambio climático, y en específico el calentamiento global, favorece el crecimiento además de propiciar la aparición de florecimientos de cianobacterias (Jiang *et al.*, 2008; Paerl y Huisman, 2009). Se ha encontrado evidencia en la cual, basados en datos de laboratorio y campo, hay una relación positiva entre el aumento de la temperatura y la dominancia de las cianobacterias (Kosten *et al.*, 2012). En lugares de climas templados las cianobacterias sólo dominan la comunidad fitoplanctónica durante los periodos cálidos del año cuando los recursos suficientes para su desarrollo están disponibles (Watson *et al.*, 1997). Por esto, los lugares con climas tropicales son los más aptos para la proliferación de cianobacterias (Okumura *et al.*, 2007).

En el zooplancton existen cambios en su tasa metabólica y nivel de actividad debido al cambio de temperatura, esto viéndose reflejado en su supervivencia y fecundidad (Heinle, 1969; Goss y Bunting, 1980, 1983; Moore *et al.*, 1996; Kauler y Enesco, 2011). Incluso se ha encontrado que el cambio en la temperatura altera el efecto que tienen las cianotoxinas sobre el zooplancton (Gilbert, 1996; Zhang *et al.*, 2012; Xiang *et al.*, 2017). Sin embargo muy poco se ha sido estudiado acerca de cómo este importante factor ecológico puede afectar la respuesta del zooplancton a las cianobacterias ya que comúnmente los estudios acerca de esta respuesta son realizados a una temperatura (Gilbert y Durand, 1990; Ferrão-Filho y Azevedo, 2003; Sotero-Santos *et al.*, 2006; Okumura *et al.*, 2007; Sotero-Santos *et al.*, 2008; Barrios *et al.*, 2015).

En ecotoxicología, el uso de rotíferos y cladóceros es muy común debido a su importancia ecológica, rápido crecimiento y reproducción, además de alta sensibilidad a sustancias tóxicas incorporadas al ambiente por otros organismos o sustancias xenobióticas (Snell y Janssen, 1995). Los estudios en esta área incluyen evaluaciones de campo y experimentación en laboratorio, estos últimos divididos en pruebas agudas y crónicas (Sarma y Nandini, 2006). Los ensayos crónicos son

basados en respuestas demográficas basadas en la supervivencia y fecundidad de los organismos que se puede apreciar en experimentos de crecimiento poblacional y experimentos de tabla de vida del zooplancton con los tóxicos (García-García *et al.*, 2007). En cuanto a los bioensayos agudos, se mide la supervivencia en un determinado tiempo dependiendo de la especie a utilizar (Sarma y Nandini, 2006).

En el pasado los estudios toxicológicos se basaban en bioensayos con ratas (Heinze, 1996), ahora se utiliza zooplancton debido a su gran importancia en la ecología acuática, su rápido crecimiento y reproducción, además de la alta sensibilidad que tienen a los cambios en la calidad del agua ocasionada por sustancias tóxicas (Sarma y Nandini, 2006). El zooplancton, particularmente rotíferos y cladóceros son comúnmente un componente dominante de los consumidores primarios de los ecosistemas acuáticos de agua dulce (Thorp y Covich, 2001). Para pruebas ecotoxicológicas *Daphnia magna* es usada en todas partes del mundo (APHA, 1994; Koivistio, 1995), pero debido a la restricción que tiene su distribución (Norte América y Europa) (Thorp y Covich, 2001) es prudente utilizar cladóceros locales, como es el caso de *Daphnia pulex* o algún miembro de los géneros *Moina* y *Ceriodaphnia* para el caso de países tropicales como México. En cuanto al caso de los rotíferos, los del género *Brachionus* son ampliamente utilizados para evaluaciones de contaminación del agua (Rao y Sarma, 1986), en particular en pruebas ecotoxicológicas se utiliza a *Brachionus calyciflorus* (APHA, 1994; Snell y Janssen, 1995).

3. Antecedentes.

En Valle de Bravo se tienen reportes de la presencia constante de cianobacterias y es mencionado el riesgo que estas representan. Ramírez-García *et al.* (2002) registraron la variación de zooplancton en la presa Valle de Bravo, de algunas variables fisicoquímicas y de la conformación de la comunidad de fitoplancton. Encontrando 4 géneros muy abundantes de cianobacterias (*Anabaena*, *Microcystis*, *Nostoc* y *Oscillatoria*) entre los cuales hay especies potencialmente tóxicas, siendo la presencia de estas uno de los factores que regula la comunidad de zooplancton. Gaytan-Herrera *et al.* (2011) registraron variación en la comunidad de fitoplancton en la presa de Valle de Bravo durante un año. Los organismos que alcanzaron las más altas densidades fueron: *Microcystis spp.*, *Snowella septentrionalis*, *Anabaena spp.*, *Aphanizomenon yezonense* y *Fragilaria crotonensis*. La dominancia de cianobacterias y otros miembros de chlorococcales, además de los altos y fluctuantes valores del índice de diversidad de Shanon-Wiener refieren a un cambio en las condiciones naturales provocadas por la eutrofización.

Alillo-Sánchez *et al.* (2014) determinaron la presencia de microcistinas y su relación con especies tóxicas de cianobacterias reportadas en la presa de Valle de Bravo usando la prueba de ELISA para la medición de microcistinas, además de abundancia y biovolumen de las cianobacterias. Se encontraron concentraciones altas de microcistinas las cuales sobrepasan el valor guía establecido por la OMS para agua potable, esto viéndose en un intervalo de febrero a junio, particularmente en abril (5.56 µg/L). Figueroa-Sánchez *et al.* (2014) registraron la conformación de la comunidad de zooplancton con relación a la presencia de cianobacterias en Valle de Bravo. Midieron la concentración de microcistinas basados en la prueba de ELISA donde encontraron concentraciones de microcistinas en un rango de 0.03-0.77 µg/L.

Los trabajos donde se utilizaron organismos del género *Brachionus* o algún otro miembro de la clase Rotifera para observar el efecto que tienen las cianobacterias no son muy abundantes. Gilbert (1996) donde evaluó el efecto de *Anabaena flos-*

aquae y de la anatoxina de esta misma cepa sobre el crecimiento poblacional de *Brachionus calyciflorus* y *Asplanchna girodi* a tres temperaturas; 12 o 14°C, 19°C y 25 o 26°C. Encontrando que el efecto de la cianobacteria sobre el crecimiento poblacional de ambas especies aumentaba conforme a la temperatura, con efectos de hasta el doble temperaturas altas. Lin *et al.* (2014) determinaron el efecto de *Anabaena planctonica* en el crecimiento poblacional de *Plationus patulus* y *Brachionus havanaensis*, bajo diferentes dietas y estando ambas especies juntas y separadas. Encontraron que *Pseudanabaena tenuis* produjo extinción de ambas especies de rotíferos tanto cuando se vieron expuestas únicamente a la cianobacteria como cuando fue combinada con *Chlorella vulgaris* además de encontrar que el crecimiento poblacional en ambas especies fue menor cuando la cianobacteria fue incluida en la dieta.

Mientras que, los trabajos donde se utilizaron organismos pertenecientes al género *Daphnia* o algún otro miembro de la clase Cladocera para poder observar el efecto de las cianobacterias o en su caso las cianotoxinas han sido diversos. DeMott *et al.* (1991) determinaron el efecto de toxinas purificada de *Microcystis aeruginosa* y *Nodularia spumigena* en la supervivencia y alimentación de *Diaptomus birgei*, *Daphnia pulicaria*, *D. hyalina* y *D. pulex*. Encontrando que *D. birgei* fue la especie más sensible, *D. pulicaria* fue la menos sensible, en tanto *D. pulex* junto con *D. hyalina* intermedias. Claska y Gilbert (1998) evaluaron los efectos de extracto crudo y de las células de *Anabaena affinis* y *Anabaena flos-aquae* sobre *Daphnia pulex* a diferentes temperaturas; realizaron una tabla de vida. Encontrando que *A. affinis* afectó tanto la supervivencia y la fecundidad, mientras que *A. flos-aquae* afecto principalmente la fecundidad. Además de un efecto en el tamaño de los huevos. El incremento en la temperatura enaltece los efectos inhibitorios de las cianobacterias tóxicas en el crecimiento poblacional de los daphnidos.

Ferrão-Filho *et al.* (2003) evaluaron los efectos de la cianobacteria *Microcystis aeruginosa* sobre los cladóceros *Moina micrura* y *Ceriodaphnia cornuta* realizando tabla de vida y crecimiento poblacional. Encontrando que al dar de comer colonias y células de *M. aeruginosa* se inhibe el crecimiento poblacional. Sotero-Santos *et*

al. (2006) determinaron la toxicidad del extracto crudo de un florecimiento de cianobacterias en *Daphnia similis* y *Ceriodaphnia silvestrii* utilizando pruebas agudas donde midieron su supervivencia a 24 y 48 horas. Obteniendo que *D. similis* tuvo una mayor resistencia que *C. silvestrii* (186.61 y 155.11 mg/L respectivamente). A partir de los resultados obtuvieron concentraciones para bioensayos realizados en ratones. Okumura *et al.* (2007) evaluaron la toxicidad de extractos crudos de dos florecimientos naturales y de una cepa cultivada en laboratorio sobre *Daphnia similis*, *Ceriodaphnia dubia* y *C. silvestrii* realizando pruebas agudas y crónicas. Sus resultados muestran que las dos especies de *Ceriodaphnia* fueron menos sensibles que *Daphnia similis*. También encontraron una disminución en la fecundidad y supervivencia de los organismos conforme se aumenta la concentración de la toxina.

Sotero-Santos *et al.* (2008) evaluaron la toxicidad del extracto crudo de un florecimiento del cual se tomaron muestras en 3 diferentes días, este florecimiento era dominado por *Anabaena circinalis* y *A. spiroides* el cual fue administrado a *Ceriodaphnia dubia* y *C. silvestrii*. Realizando pruebas agudas en estos cladóceros, posteriormente, con base en las pruebas en cladóceros hicieron pruebas en ratones. Encontraron que en las tres muestras que tomaron tenían una concentración de microcistinas diferente y un efecto diferente sobre la supervivencia de los organismos de prueba. Olivera-Ramírez *et al.* (2010) determinaron los efectos de extractos crudos, extractos acuosos y de las células de la cianobacteria *Pseudanabaena tenuis* aislada de la presa de Valle de Bravo sobre *Daphnia magna* y *Ceriodaphnia dubia*, utilizando pruebas agudas. Encontrando que la exposición directa a las células no tuvo un efecto significativo sobre la supervivencia de los cladóceros, mientras que cuando se utilizó el extracto acuoso y crudo se obtuvo un efecto negativo tanto en la supervivencia como en la reproducción. Por otro lado, algunos trabajos incluso utilizan organismos de ambas clases (Rotifera y Cladocera) para observar el efecto que tienen las cianobacterias. Barrios *et al.* (2015) evaluaron los efectos toxicológicos de extractos crudos de *Dolichospermum planctonicum* en *Plationus patulus* y *Ceriodaphnia cornuta* utilizando experimentos de crecimiento poblacional y tabla de vida, donde midieron la supervivencia y fecundidad.

Encontrando que la fecundidad y supervivencia fue afectada negativamente, además que la fecundidad se vio más afectada que la supervivencia.

4. Justificación.

En México hay muchos lagos y presas, una de las cuales es Valle de Bravo en el Estado de México, la cual juega un papel importante como parte del sistema hidráulico Cutzamala, el cual provee el 40% de agua al área metropolitana de la Ciudad de México (CONAGUA, 2005). Esta presa, al igual que otras alrededor del mundo, se ve implicada en un proceso de eutrofización por la gran introducción de nutrientes (N y P) al sistema debido a actividades antropogénicas (Ramírez-Zierold *et al.*, 2010). Como resultado de este proceso, se ha observado la proliferación y formación de florecimientos potencialmente tóxicos de cianobacterias de los géneros: *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Anabaena*, entre otras (Gaytan-Herrera *et al.*, 2011).

Las toxinas producidas por las cianobacterias son ampliamente conocidas por sus efectos adversos en organismos de la biota acuática y animales terrestres, tanto de manera directa como indirecta (Lopes *et al.*, 2010; Gélinas *et al.*, 2014; McGorum *et al.*, 2015). La presencia de las cianotoxinas reduce significativamente la potabilidad del agua cuando rebasa los niveles permisibles de cianotoxinas (Carmichael, 2001; Codd *et al.*, 2005; Alillo-Sánchez *et al.*, 2014) ya que el ser humano también puede ser propenso a sufrir intoxicación por cianotoxinas, debido a esto, se estableció un valor guía de cianotoxinas en sistemas utilizados para agua potable (WHO, 1998).

Para ver el efecto que tienen distintas sustancias (entre ellas las cianotoxinas) la Asociación Americana de Salud Pública (“APHA” por sus siglas en inglés) tiene estipulado el uso de especies específicas de zooplancton entre las cuales están *B. calyciflorus* y *D. pulex* (APHA, 1994). Valle de Bravo es un sistema donde la temperatura durante el año va desde los 16°C hasta los 25°C (Figuroa-Sánchez *et al.*, 2014). *B. calyciflorus* es un organismo que es abundante en sistemas en los cuales la temperatura es cálida (Enríquez-García *et al.*, 2009), por otro lado *D. pulex*

es mayormente distribuido en sistemas con una temperatura templada (Sarma *et al.*, 2005). Siendo un motivo para la utilización de esos organismos, ya que Valle de Bravo presenta temperaturas en las cuales estos organismos habitan.

La temperatura es un factor determinante de la ecología y fisiología de los organismos en los cuerpos de agua, tanto del zooplancton como de las cianobacterias (Moore *et al.*, 1996; Paerl y Huisman, 2008), siendo un factor que afecta la interacción cianobacteria-zooplancton. El aumento en la temperatura del agua ya sea estacional o por el cambio climático puede incrementar los efectos de las cianobacterias tóxicas en el zooplancton, además de promover su capacidad competitiva con otros miembros del fitoplancton, lo que le permite que lleguen a ser dominantes en los sistemas (Paerl y Huisman, 2009).

5. Objetivos.

General:

- Evaluar la toxicidad de cianobacterias en diferentes épocas del año en la presa Valle de Bravo mediante pruebas demográficas.

Particulares:

1. Cuantificar la concentración de microcistinas presentes en los extractos crudos de cianobacterias utilizados.
2. Realizar pruebas agudas y crónicas del extracto crudo de cianobacterias sobre la población de zooplancton (*Brachionus calyciflorus* y *Daphnia pulex*).
3. Comparar la toxicidad del extracto crudo de cianobacterias en dos especies del zooplancton (*Brachionus calyciflorus* y *Daphnia pulex*) a dos temperaturas.
4. Comparar el efecto tóxico del extracto crudo de cianobacterias en diferentes épocas del año, mediante la respuesta de pruebas demográficas.

6. Hipótesis.

Si el extracto crudo de cianobacterias de la presa Valle de Bravo es tóxico, entonces al exponer poblaciones de *Daphnia pulex* y *Brachionus calyciflorus* a extracto crudo tendrá un efecto negativo en las variables demográficas de ambas especies.

7. Materiales y métodos.

7.1. Área de estudio:

La presa de Valle de Bravo es una presa tropical de gran altitud que se localiza al oeste de la ciudad de Toluca en el Estado de México. Se encuentra a una altitud de 1780 metros sobre el nivel del mar en las coordenadas: 19°11'38.71" N y 100°09'02.59" O; tienen una capacidad de almacenamiento de 418.25×10^6 m³, abarcando una superficie de 18.55 km² y una profundidad promedio de 21.1 m (Olvera, 1990) (Fig. 1).



Figura 1 Sitio de muestreo en el embalse de Valle de Bravo, Estado de México.

La presa de Valle de Bravo fue construida en 1947 formando parte del sistema hidroeléctrico "Miguel Alemán". En la actualidad, la presa forma parte del sistema hidráulico "Cutzamala" perteneciente a la región hidrológica 18 teniendo como

finalidad abastecer de agua potable a la zona metropolitana del Valle de México, aportando 331.5 hm³/año (CONAGUA, 2005).

7.2. Obtención de las muestras.

Las muestras se tomaron en dos fechas diferentes siendo el 10 de enero del 2017 y el 19 de septiembre del 2017, donde, de acuerdo con Gaytan-Herrera *et al.* (2011), forman parte de dos temporadas distintas (secas y lluvias respectivamente). Para la muestra de enero se tomaron 20 L directamente del florecimiento de cianobacterias, mientras que, para la muestra de septiembre, debido a que la densidad del florecimiento de cianobacterias era menor se tomaron 150 L. Posteriormente, en el laboratorio se concentró la biomasa para la preparación del extracto crudo.

7.3. Identificación y cuantificación de las cianobacterias.

De la muestra tomada, previo a la concentración de esta, 100 mL por muestra fueron fijados con formol al 3% para hacer la identificación taxonómica. Siguiendo las claves de Wehr y Sheath (2003). Para la cuantificación de las cianobacterias se utilizó una cámara de Sedgwick-Rafter.

7.4. Preparación del extracto crudo de cianobacteria.

Para obtener el extracto crudo del florecimiento la biomasa de cianobacteria fue congelada a -20°C y almacenado por dos días, después de eso fue descongelado a temperatura ambiente. Una vez descongelado el material fue sonificado por 10 min a 14 MHz y congelado de nuevo siguiendo el método descrito por Pietsch *et al.* (2001). El ciclo de congelación, descongelación y sonificado fue repetido 5 veces, posteriormente el extracto crudo fue centrifugado a 4000 rpm por 30 min para remover todos los restos celulares. Finalmente, el extracto crudo fue almacenado a -20°C hasta el día en que se usó.

7.5. Determinación de la concentración de microcistinas.

Para determinar la concentración de microcistinas en el extracto crudo se utilizó el “QuantiPlate for Microcystins” de EnviroLogix™ de acuerdo con las especificaciones de uso dadas por el fabricante. Esta prueba está basada en la prueba de ELISA (*Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay*).

7.6. Cultivo de organismos para las pruebas de toxicidad agudas y crónicas.

Para el mantenimiento de los cultivos de zooplancton utilizados se cultivaron dos algas verdes (*Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus*) en botellas de 2 L, usando medio basal Bold (Borowitzka y Borowitzka, 1988), agregando 0.5 g de NaHCO₃ cada tres días como fuente adicional de carbono, además de aireación y luz constante. El alga fue cosechada durante la fase exponencial, sedimentada, decantada y resuspendida en agua destilada.

El rotífero *Brachionus calyciflorus* fue aislado del lago de Xochimilco, Ciudad de México, mientras que el cladócero *Daphnia pulex* fue aislado del humedal Chimaliapan, Estado de México. Ambas especies se cultivaron de manera independiente e iniciando a partir de un solo individuo. Los cultivos fueron mantenidos usando agua moderadamente dura (medio EPA), el cual fue preparado disolviendo 1.9 g de NaHCO₃, 1.2 g de CaSO₄, 1.2 g de MgSO₄ y 0.04 g de KCL en 20 L de agua destilada (Weber, 1993). Los cultivos de zooplancton fueron mantenidos a una densidad algal de 0.5x10⁶ cel/mL, la densidad fue establecida usando un hematocímetro. Los rotíferos fueron alimentados con *Chlorella vulgaris*, mientras que los cladóceros con *Scenedesmus acutus*.

7.7. Prueba de toxicidad aguda.

Para las pruebas agudas se realizó CL₅₀, el cual es un bioensayo donde se busca la concentración de una sustancia dada, la cual reduzca la población en estudio un 50% en un periodo de tiempo variable dependiendo del organismo a utilizar. En este estudio se expuso 20 neonatos de *B. calyciflorus* y 5 neonatos de *D. pulex* a diferentes concentraciones del extracto crudo en medio de cultivo EPA. Se hicieron

soluciones con diferentes porcentajes del extracto curdo empezando desde 0.5% hasta 32%. Se usó una densidad de 0.25×10^6 cel/mL de *Chlorella vulgaris* para *B. calyciflorus* y 0.5×10^6 cel/mL de *Scenedesmus acutus* para *D. pulex* como alimento. Todos los tratamientos tuvieron cuatro repeticiones, además de un grupo control. Todo lo anterior se colocó en una incubadora a 20°C. Pasado el periodo de 24 horas se cuantificó la sobrevivencia de los individuos.

7.8. Prueba de toxicidad crónica.

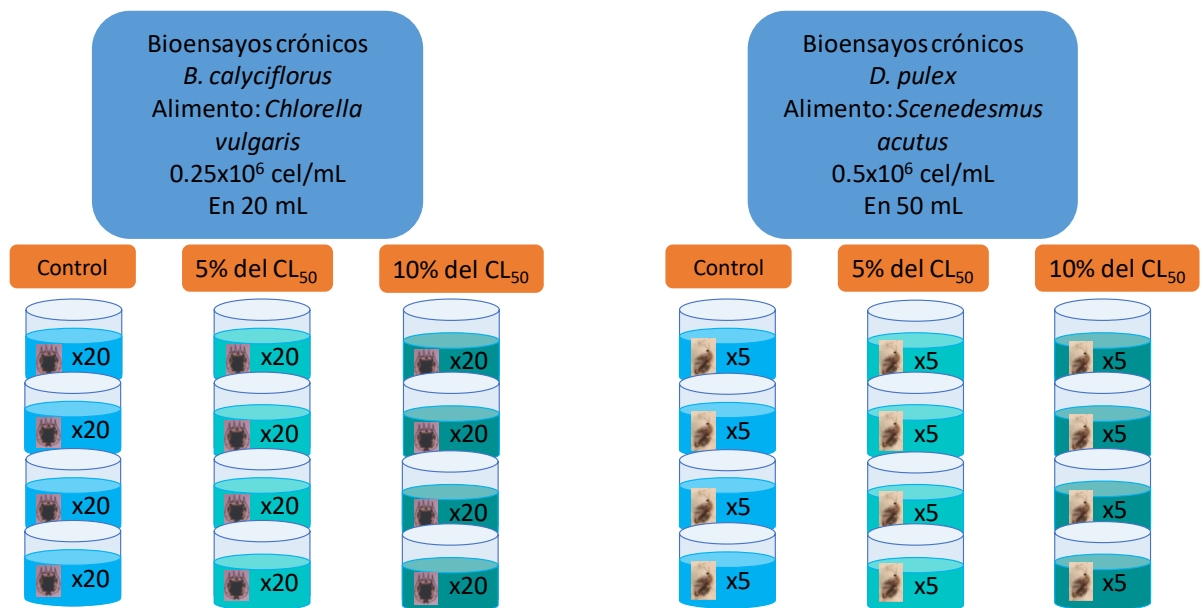
Para las pruebas crónicas, se realizó tabla de vida y crecimiento poblacional. Para el crecimiento poblacional se utilizaron concentraciones subletales obtenidas a partir del CL_{50} . Se utilizaron dos concentraciones subletales del 5 y 10% de la CL_{50} con el fin de poder apreciar el efecto a largo plazo. Las dos concentraciones subletales fueron por muestra y por organismo utilizado. Las concentraciones utilizadas fueron diluidas en medio de cultivo EPA con *C. vulgaris* a una concentración de 0.25×10^6 cel/mL para *B. calyciflorus* y de 0.5×10^6 cel/mL para *D. pulex* a dos temperaturas, a 20 y 25°C, con 4 repeticiones cada una, además de un grupo control. Se colocaron 20 neonatos de *B. calyciflorus* en 20 mL de medio de cultivo EPA y 5 neonatos de *D. pulex* en 50 mL. La cuantificación de los individuos fue realizada cada día hasta el momento en que el tamaño de la población empezó a declinar. Basado en los datos colectados, se calculó la tasa de crecimiento (r) usando la siguiente ecuación según Krebs (1985):

$$r = \frac{(\ln N_t - \ln N_0)}{t}$$

Donde: r es la tasa de crecimiento poblacional por día, N_t el número de individuos en la población después del tiempo t , N_0 densidad poblacional inicial y t el tiempo en días.

Para la tabla de vida se colocaron 20 neonatos de *B. calyciflorus* en 20 mL y 5 neonatos de *D. pulex* en 50 mL. Para los bioensayos se utilizaron dos concentraciones subletales del 5 y del 10% del CL_{50} . Las concentraciones utilizadas fueron diluidas en medio de cultivo EPA con *C. vulgaris* a una concentración de

0.25x10⁶ cel/mL para *B. calyciflorus* y de 0.5x10⁶ cel/mL para *D. pulex*, además de contar con control, cada tratamiento con cuatro réplicas. Se utilizaron dos temperaturas (20 y 25°C). Todos los días se cuantificaron los individuos sobrevivientes y los neonatos que nacieron, posteriormente, se retiraron a los neonatos del experimento. Los experimentos realizados con *B. calyciflorus* se cuantificaron cada 12 horas (2 veces al día) debido a su ciclo reproductivo más rápido y *D. pulex* se cuantificaron cada 24 horas. Siguiéndose el experimento hasta que todos los organismos murieron. A partir de los datos obtenidos se calculó la supervivencia y fecundidad y parámetros relacionados usando las siguientes fórmulas propuestas por Krebs (1985):



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 producción

$$R_0 = \sum_0^{\infty} lx \cdot mx$$

Esperanza de vida

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

Tasa intrínseca de crecimiento

$$\sum_{x=w}^n e^{-rx} \cdot lx \cdot mx = 1$$

Tiempo generacional

$$T = \frac{\sum x \cdot lx \cdot mx}{R_0}$$

Donde, lx es la probabilidad de que un individuo sobreviva a una clase de edad, mx es la fecundidad específica de edad, R_0 es el número promedio de descendencia por hembra.

Los datos fueron graficados y analizados utilizando el programa Sigma Plot 11, además mediante ANDEVA se buscaron efectos estadísticamente significativos entre tratamientos y entre temperaturas, seguido de una prueba post hoc de Tukey.

8. Resultados

8.1. Identificación y cuantificación de las cianobacterias.

Los florecimientos que se utilizaron para este trabajo estuvieron representados por 4 especies de cianobacterias, siendo *Microcystis wesenbergii* la que tuvo una mayor densidad en enero seguida de *Microcystis aeruginosa*, mientras que *Woronichinia naegeliana* fue la que mostró una mayor densidad en septiembre seguida de la especie *Lyngbya birgei* (Tabla 1).

Tabla 1. Conteo de cianobacterias por mililitro en las dos muestras tomadas en Valle de Bravo, Estado de México.

ESPECIE	ÉPOCA	
	Enero	Septiembre
<i>Lyngbya birgei</i>	140	770
<i>Microcystis aeruginosa</i>	2250	350
<i>Microcystis wesenbergii</i>	11970	250
<i>Woronichinia naegeliana</i>	470	12900

A

B

C

D

Figura 2 Especies de cianobacterias encontradas en los florecimientos de cianobacterias de Valle de Bravo, Estado de México en enero y septiembre;
A. *Lyngbya birgei* **B.** *Microcystis aeruginosa* **C.** *Microcystis wesenbergii* **D.** *Woronichinia naegeliana*

8.2. Determinación de la concentración de microcistinas.

En la muestra de enero, una concentración del 1% del extracto total (500 mL) obtuvo una concentración de 3.83 µg/L, lo cual extrapolándolo a los 20 L que se tomaron del florecimiento se obtuvo un valor de 47.83 µg/L. Mientras que en la muestra de septiembre una concentración del 1% del extracto total (500 mL) obtuvo una concentración de 0.29 µg/L., que extrapolándolo a los 150 litros tomados del florecimiento obtuvo un valor de 3.42 µg/L, lo cual es menor a lo encontrado en enero.

8.3. Prueba de toxicidad aguda (CL₅₀).

En la muestra de enero el valor de CL₅₀ para *B. calyciflorus* fue de 22.96 µg/L, mientras que el valor para *D. pulex* 133.94 µg/L. A partir de estas concentraciones de CL₅₀ se utilizaron dos concentraciones subletales; 1.15 y 2.3 µg/L para *B. calyciflorus*. En el caso de *D. pulex*, las concentraciones subletales utilizadas para las pruebas de toxicidad crónica fueron: 6.7 y 13.4 µg/L.

En la muestra de septiembre el valor de CL₅₀ para *B. calyciflorus* fue de 14.39 µg/L. Mientras que el valor de CL₅₀ de *D. pulex* fue de 236.56 µg/L. A partir de estas concentraciones fueron utilizadas las concentraciones subletales: 0.72 y 1.44 µg/L para *B. calyciflorus*. Mientras que para *D. pulex* se utilizaron las concentraciones subletales: 11.83 y 23.66 µg/L (Tabla 2).

Tabla 2 Valores obtenidos a partir de la prueba de toxicidad aguda en *B. calyciflorus* y *D. pulex* en presencia del extracto crudo de cianobacterias de Valle de Bravo, Estado de México en enero y septiembre.

	ENERO			SEPTIEMBRE		
	CL ₅₀ (µg/L)	Concentración subletal (µg/L)		CL ₅₀ (µg/L)	Concentración subletal (µg/L)	
<i>B. calyciflorus</i>	22.96	1.15	2.3	14.39	0.72	1.44
<i>D. pulex</i>	133.94	6.7	13.4	236.56	11.83	23.66

8.4. Pruebas de toxicidad crónica.

8.4.1. Crecimiento poblacional de *Brachionus calyciflorus*.

En las curvas de crecimiento de *B. calyciflorus* con el extracto crudo de la muestra de enero se observa un inicio prematuro del crecimiento poblacional a 25°C, a comparación de lo que sucedió a 20°C tanto en los tratamientos con el extracto crudo de cianobacterias como en los controles. La densidad poblacional máxima fue mayor en los controles a comparación de los tratamientos. A 20°C el testigo alcanzó una densidad máxima de 146 ind/20 mL y los tratamientos con extracto crudo de cianobacterias alrededor de 90 ind/20 mL. Por otro lado, a 25°C la densidad mayor fue de 254 ind/20 mL, mientras que en los tratamientos fue entre 120 y 140 ind/20 mL. La densidad poblacional máxima a 20°C en los tratamientos se obtuvo alrededor del día 8, mientras que en el control hasta el día 11. A 25°C la densidad máxima siguió la misma tendencia mencionada anteriormente, obteniéndola primero en los tratamientos entre el día 4 y 6, mientras que en el control hasta el día 8. La densidad poblacional máxima se alcanzó primero a 25°C, tanto en los tratamientos como en el control (Figura 2).

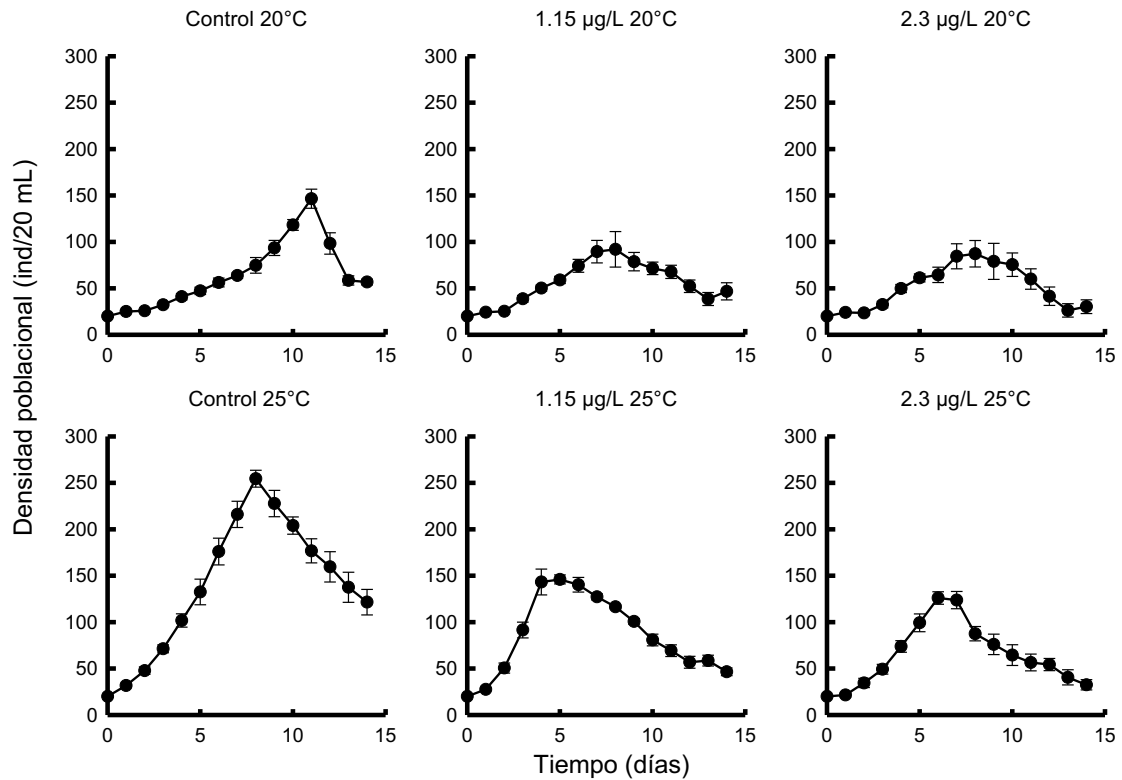


Figura 2 Crecimiento poblacional de *B. calyciflorus* en presencia de extracto crudo de cianobacterias del mes de enero a dos concentraciones (1.15 y 2.3 µg/L) y a dos temperaturas (20 y 25°C).

A 20°C la tasa de crecimiento no fue significativamente diferente entre los tratamientos y el control. Por otro lado, la tasa de crecimiento a 25°C del control no fue significativamente diferente a la concentración de 2.3 µg/L, aunque sí fue significativamente diferente ($P < 0.05$) a la concentración de 1.15 µg/L, esta misma también sinodo diferente significativamente ($P < 0.005$) con la concentración de 2.3 µg/L. Con respecto al aumento de temperatura, se obtuvieron valores más altos en la tasa de crecimiento a 25°C a comparación de lo que se presentó a 20°C, tanto en los tratamientos como en el control (Figura 3).

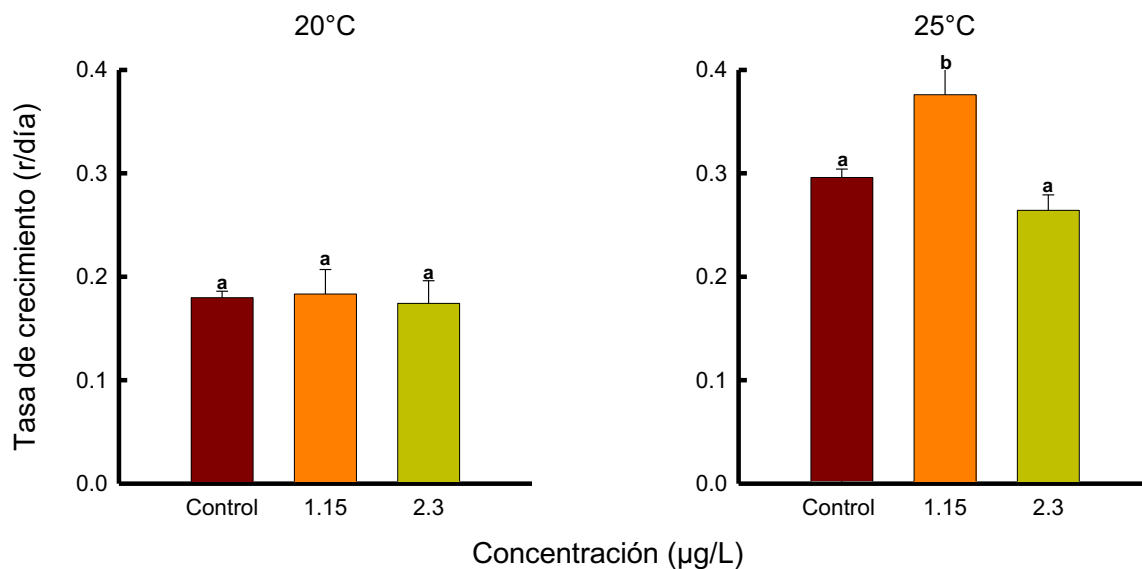


Figura 3 Tasa de crecimiento poblacional ($r/\text{día}$) de *B. calyciflorus* en presencia de extracto crudo de cianobacterias del mes de enero a dos concentraciones (1.15 y 2.3 $\mu\text{g/L}$) y a dos temperaturas (20 y 25°C). Barras con diferentes letras son estadísticamente diferentes.

Con la muestra de septiembre las curvas de crecimiento muestran un inicio del crecimiento poblacional primero en los controles (siendo desde el día 1), mientras que en los tratamientos se retrasa entre el día 2 y 5 en ambas temperaturas. La densidad poblacional máxima fue menor en los tratamientos a comparación con los testigos. A 20°C la densidad máxima en el testigo fue de 200 ind/20 mL, mientras que en los tratamientos fue de alrededor de 115 ind/20 mL. A 25°C en el testigo la densidad máxima fue de 212 ind/20 mL, mientras que en los tratamientos fue de alrededor de 110 ind/20 mL. La densidad máxima se tardó más en alcanzarse en los tratamientos a comparación con los controles de ambas temperaturas. A 20°C, la densidad máxima del control se obtuvo primero que en los tratamientos, siendo en el día 10 y en los tratamientos alrededor del día 13. Por otro lado, a 25°C, en el control, se obtuvo primero la densidad máxima, siendo en el día 7, mientras que en los tratamientos fue entre el día 10 y 12 (Figura 4).

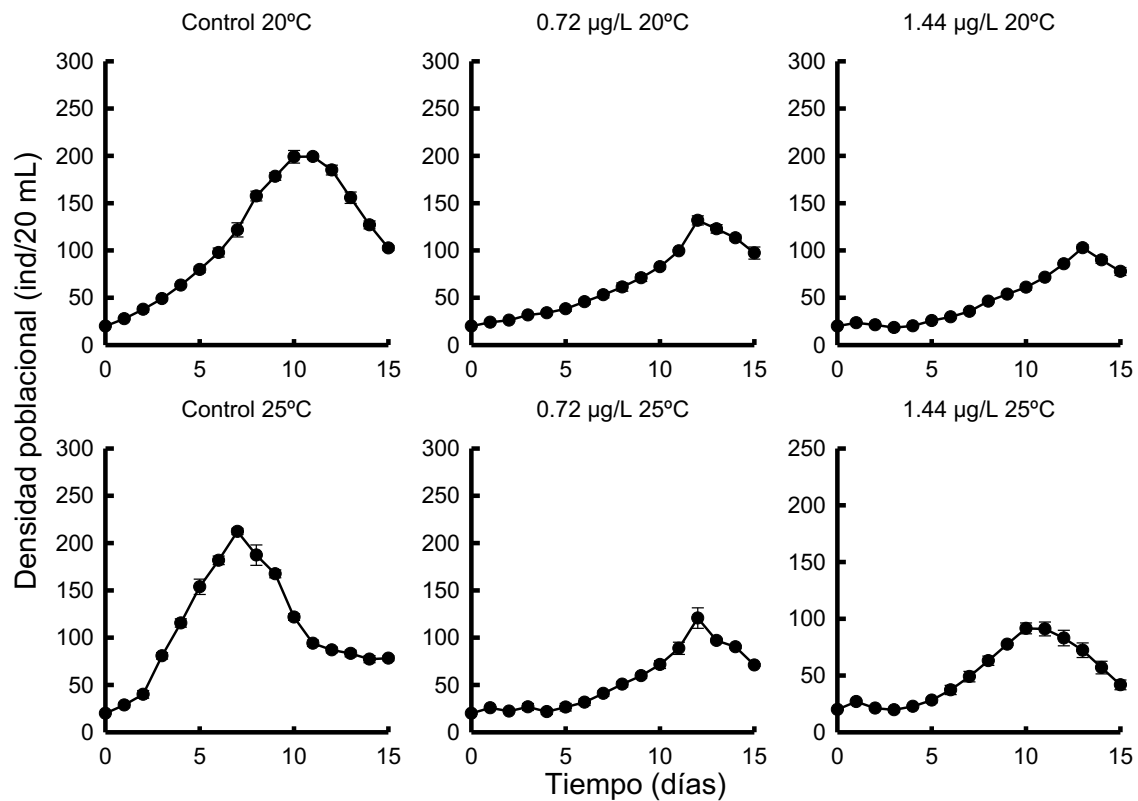


Figura 4 Crecimiento poblacional de *B. calyciflorus* en presencia de extracto crudo de cianobacterias del mes de septiembre a dos concentraciones (0.72 y 1.44 µg/L) y a dos temperaturas (20 y 25°C).

La tasa de crecimiento para la muestra de septiembre fue menor en los tratamientos a comparación de los controles. A 20°C la diferencia entre el control y los tratamientos fue significativamente diferente ($P < 0.001$), además hubo diferencia significativa entre tratamientos ($P < 0.001$). A 25°C la diferencia se aprecia más marcada entre el control y los tratamientos, con una diferencia significativa de $P < 0.001$, además, no hubo diferencia significativa entre tratamientos. Al comparar las tasas de crecimiento obtenidas entre las dos temperaturas se puede notar un aumento en la tasa de crecimiento a 25°C en el control (Figura 5).

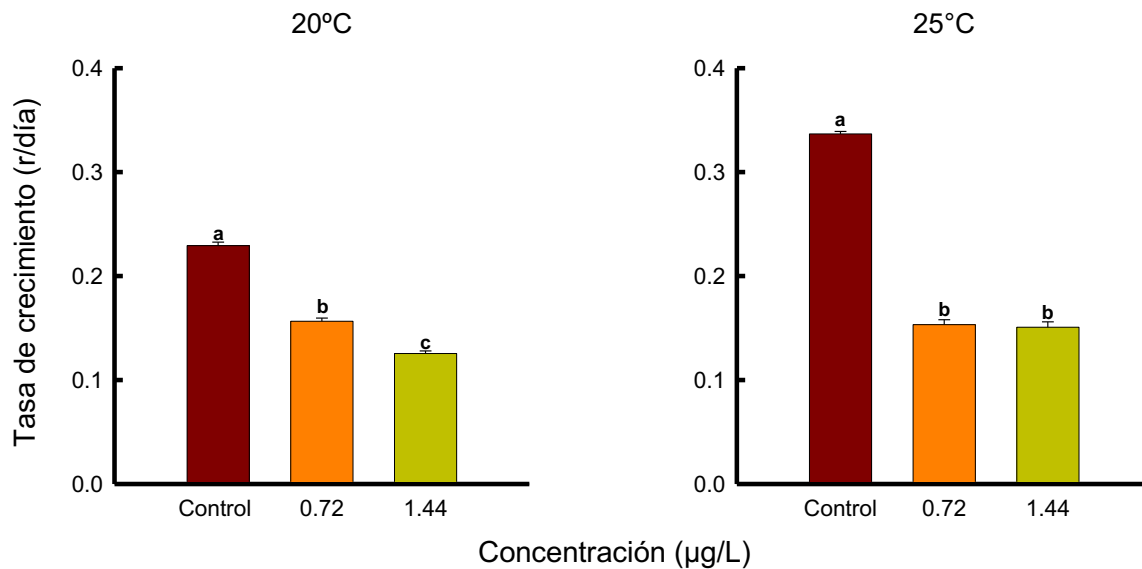


Figura 5 Tasa de crecimiento poblacional ($r/día$) de *B. calyciflorus* en presencia de extracto crudo de cianobacterias del mes de septiembre a dos concentraciones (0.72 y 1.44 $\mu g/L$) y a dos temperaturas (20 y 25°C). Barras con diferentes letras son estadísticamente diferentes.

8.4.2. Tabla de vida demográfica *Brachionus calyciflorus*.

Las curvas de supervivencia de *B. calyciflorus* con la muestra de enero fueron diferentes acorde a la temperatura, aunque apreciándose más en la temperatura alta. A 20°C la disminución de la supervivencia fue más pronunciada en presencia del tratamiento a comparación del control, además, la supervivencia alcanzada fue menor en los tratamientos (alrededor de 15 días), mientras que en el control se alcanzó el día 20. En cuanto a la fecundidad, en el control se aprecia una mayor reproducción, donde 5 veces la fecundidad fue alta durante su tiempo de vida, mientras que conforme la concentración aumentó, la cantidad de veces donde la fecundidad fue alta disminuyó. Refiriéndose a que un organismo durante su vida, es capaz de tener una alta fecundidad en varias ocasiones cuando está en condiciones óptimas, mientras que en presencia de extracto crudo de cianobacterias, esta capacidad se ve reducida, llegando a tener sólo una vez en su vida una reproducción alta.

A 25°C las curvas de supervivencia, al igual que en la otra temperatura, el control tuvo una supervivencia mayor alcanzando los 18 días, mientras que los tratamientos

la supervivencia estuvo entre 11 y 12 días. En cuanto a la fecundidad, el control muestra 2 picos muy grandes de reproducción, mientras que, en presencia del tratamiento, esto se redujo a uno (Figura 6).

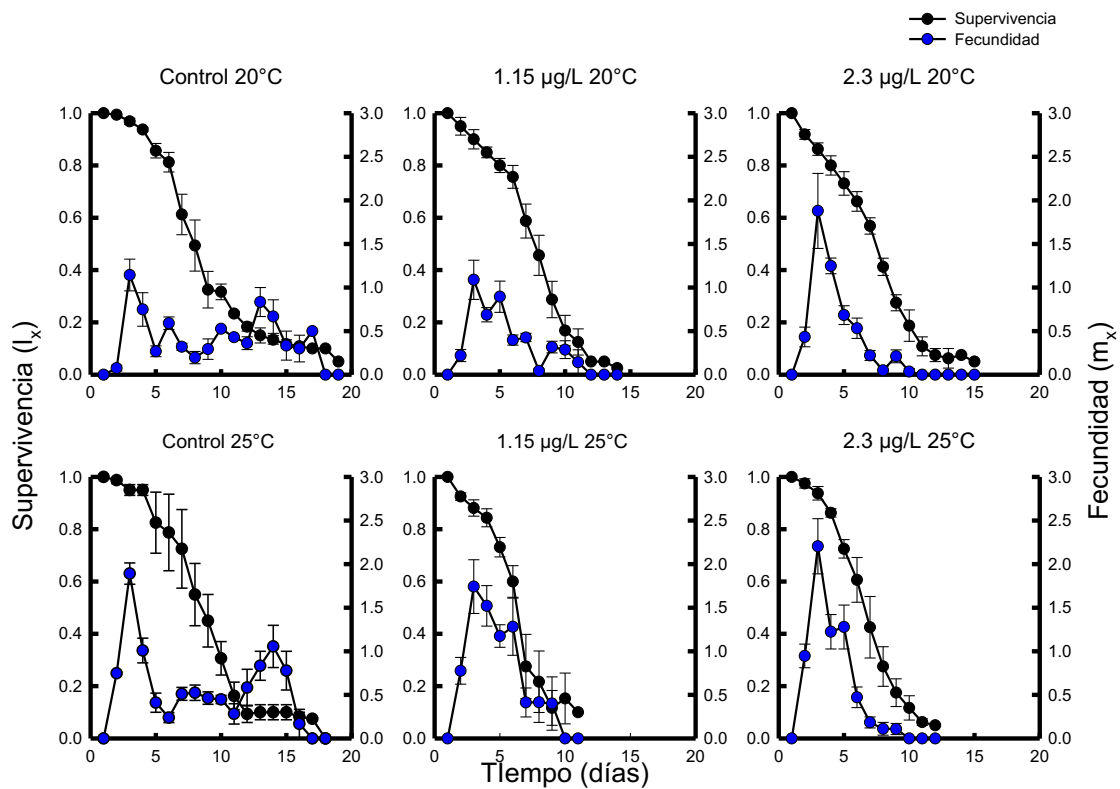


Figura 6 Supervivencia (puntos negros) y fecundidad (puntos azules) de *B. calyciflorus* expuesto a dos concentraciones de extracto crudo de cianobacterias (1.15 y 2.3 µg/L) del mes de enero a dos temperaturas (20 y 25°C). Nótese que los ejes tienen diferentes escalas.

Los parámetros demográficos derivados de la supervivencia y fecundidad tuvieron un efecto conforme a la presencia del extracto crudo. A 20°C, el promedio de vida y la esperanza de vida se vieron disminuidas de manera significativa, siendo mayor la diferencia en el tratamiento de 2.3 µg/L ($P < 0.005$) que lo mostrado en la concentración baja ($P < 0.01$). La tasa bruta de reproducción fue significativamente mayor en el control a comparación de lo observado en los controles, siendo mayor la diferencia entre la concentración baja ($P < 0.01$) que la diferencia con 2.3 µg/L ($P < 0.05$). Por otro lado, la tasa neta de reproducción no tuvo diferencias significativas en ninguna de las combinaciones. El tiempo generacional fue afectado en la presencia del tratamiento, reduciéndose de manera significativa con respecto

al control, siendo mayor la reducción en la concentración alta ($P < 0.005$) que la que se sufrió $1.15 \mu\text{g/L}$ ($P < 0.05$). Por último, la tasa intrínseca de reproducción aumentó mientras la concentración fue aumentando, pero sólo fue significativa esta diferencia en la concentración alta del tratamiento ($P < 0.05$) (Figura 7).

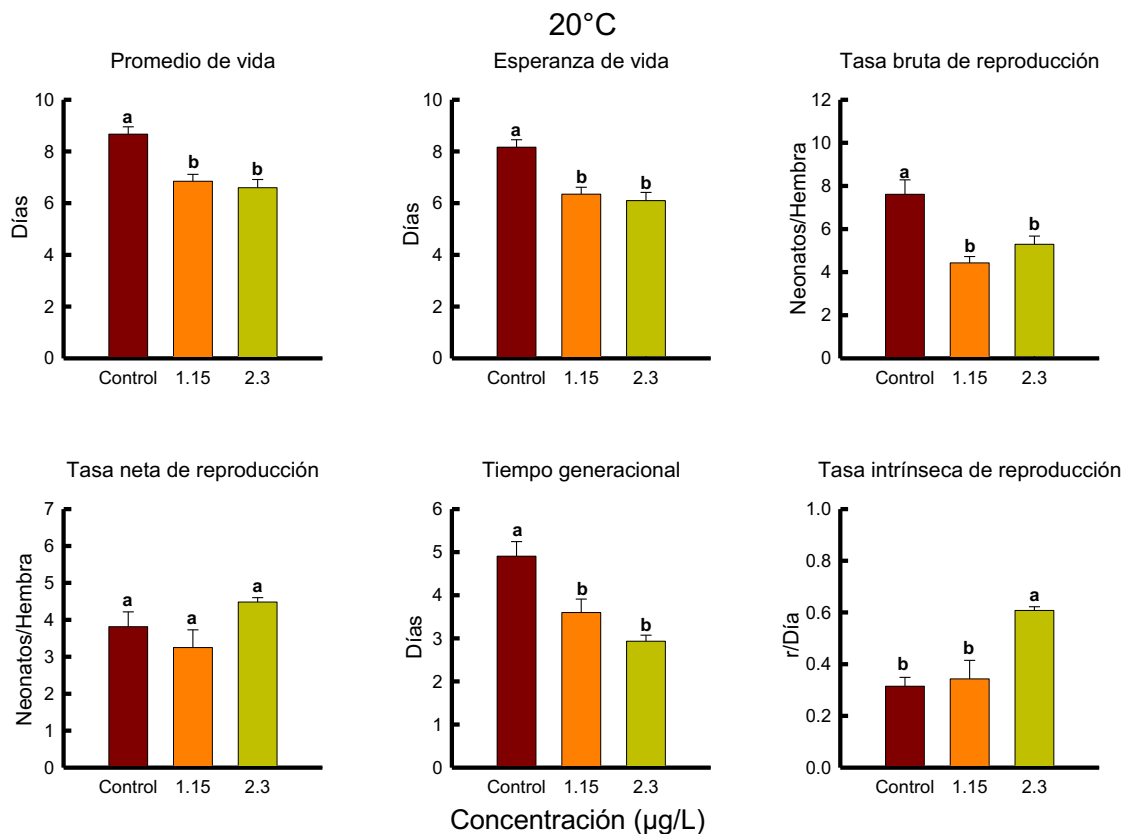


Figura 7 Variables demográficas derivadas de la supervivencia y fecundidad de *B. calyciflorus* expuesto a dos concentraciones de extracto crudo de cianobacterias (1.15 y $2.3 \mu\text{g/L}$) del mes de enero a 20°C . Barras con diferentes letras son estadísticamente diferentes.

A 25°C el promedio de vida y la esperanza de vida fueron mayores en el control a comparación de lo que se mostró en ambos tratamientos. Las diferencias entre el control y los tratamientos fueron significativas, siendo mayor la diferencia en la concentración baja del tratamiento ($P < 0.005$), a comparación de la diferencia que hubo con $2.3 \mu\text{g/L}$ de la toxina ($P < 0.005$), aunque entre los tratamientos no hubo diferencia significativa. La tasa bruta de reproducción sufrió una reducción en presencia del tratamiento, viéndose una reducción gradual, aunque sólo en la concentración alta fue cuando la diferencia fue significativa ($P < 0.03$). Por el otro lado, la tasa neta de reproducción no tuvo diferencias significativas en ninguna de

las combinaciones. En cuanto al tiempo generacional, se vio reducido conforme la concentración del extracto crudo de cianobacteria aumentó, pero en 2.3 $\mu\text{g/L}$ fue donde hubo diferencia significativa ($P < 0.03$). En cuanto a la tasa intrínseca de reproducción, aumentó con respecto al control, aunque fue poco y apenas apreciable a 1.15 $\mu\text{g/L}$, pero en el otro tratamiento la diferencia es significativa con respecto al control y al otro tratamiento ($P < 0.003$ y 0.002 respectivamente) (Figura 8).

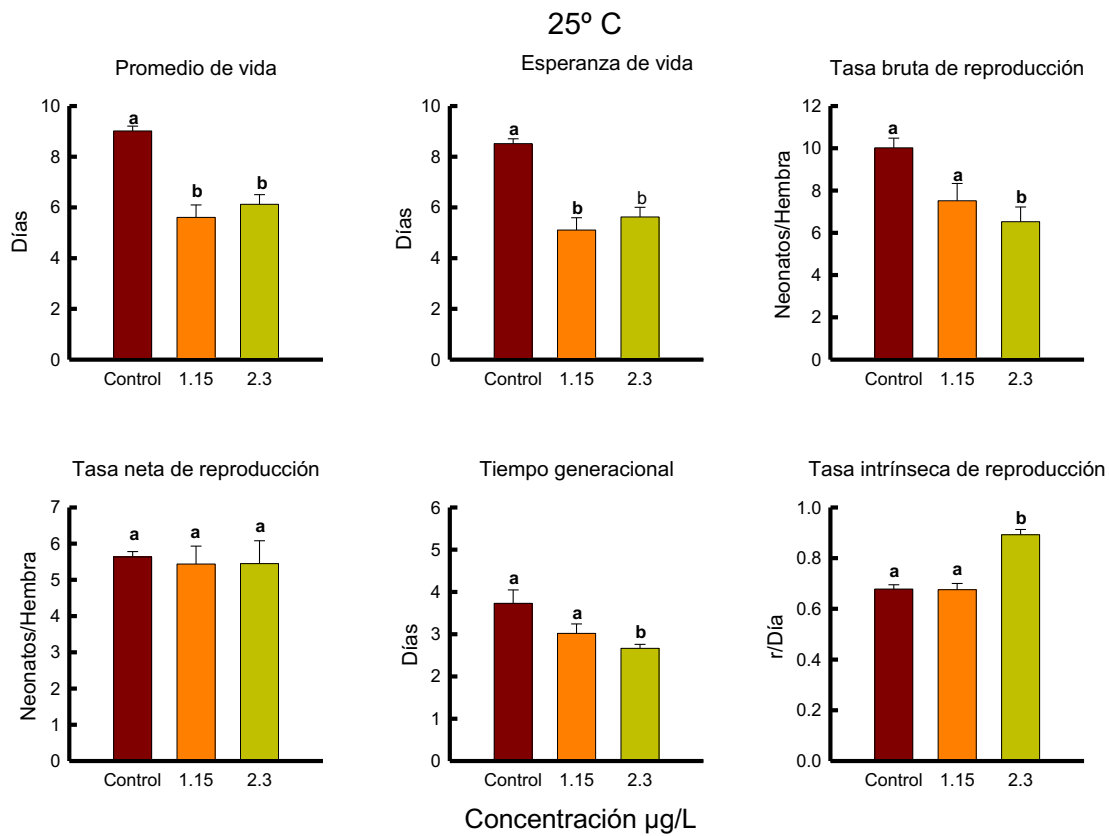


Figura 8 Variables demográficas derivadas de la supervivencia y fecundidad de *B. calyciflorus* expuesto a dos concentraciones de extracto crudo de cianobacterias (0.229 y 0.459 $\mu\text{g/L}$) del mes de enero a 25°C. Barras con diferentes letras son estadísticamente diferentes.

Por otro lado, las curvas de supervivencia de *B. calyciflorus* para la muestra de septiembre también fueron diferentes acorde a la temperatura. A 20°C la caída de la población fue un poco más notable en presencia del tratamiento a comparación del control, apreciándose mejor en la concentración alta. La supervivencia fue menor en los tratamientos (alrededor de 14 días), mientras que en el control se alcanzó el día el día 18. En cuanto a la fecundidad, tanto en los tratamientos como

en el control se ve una constante en la producción, pero se ve una diferencia en el auge reproductivo mostrado casi al final, siendo más largo en el control que en los tratamientos.

A 25°C las curvas de supervivencia muestran una diferencia más marcada entre los tratamientos y el control. El control tuvo una supervivencia mayor llegando a los 16 días, mientras que en los tratamientos entre 10 y 12 días. En cuanto a la fecundidad, el control muestra una reproducción constante con muchos picos, que además duró durante todos los experimentos. En contraste, los tratamientos tuvieron una reproducción más baja con menos picos y de menor duración (Figura 9).

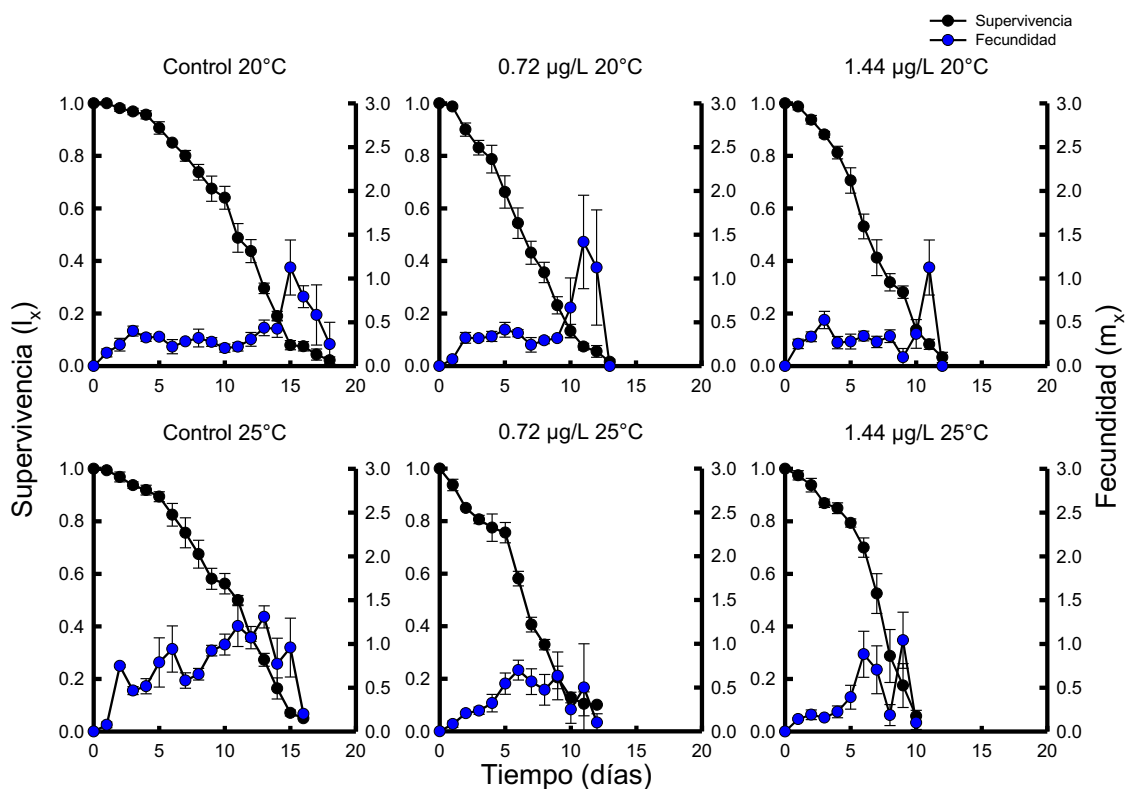


Figura 9 Supervivencia (puntos negros) y fecundidad (puntos azules) de *B. calyciflorus* expuesto a dos concentraciones de extracto crudo de cianobacterias (0.72 y 1.44 µg/L) del mes de septiembre a dos temperaturas (20 y 25°C). Nótese que los ejes tienen diferentes escalas.

Los parámetros demográficos derivados de la tabla de vida con la muestra de septiembre también se vieron afectados en presencia de las concentraciones utilizadas de extracto crudo de cianobacterias. A 20°C, el promedio de vida y la esperanza de vida se vieron disminuidas de manera significativa, aunque fue mayor

en la concentración baja ($P < 0.009$), que a $1.44 \mu\text{g/L}$ ($P < 0.02$), esto, sin diferencias significativas entre tratamientos. La tasa bruta de reproducción fue mayor en el control a comparación de los tratamientos, sin embargo la diferencia no fue significativa para decir que fueron diferentes. Mientras que la tasa neta de reproducción tuvo valores significativamente más altos ($P < 0.002$) en el control, a comparación de lo que se mostró en los tratamientos.

El tiempo generacional fue afectado en la presencia del tratamiento, de concentración alta reduciéndose de manera significativa con respecto al control ($P < 0.03$), además no se muestra una diferencia significativa entre los tratamientos. Por último, la tasa intrínseca de reproducción no tuvo diferencias significativas entre los tratamientos y el control (Figura 10).

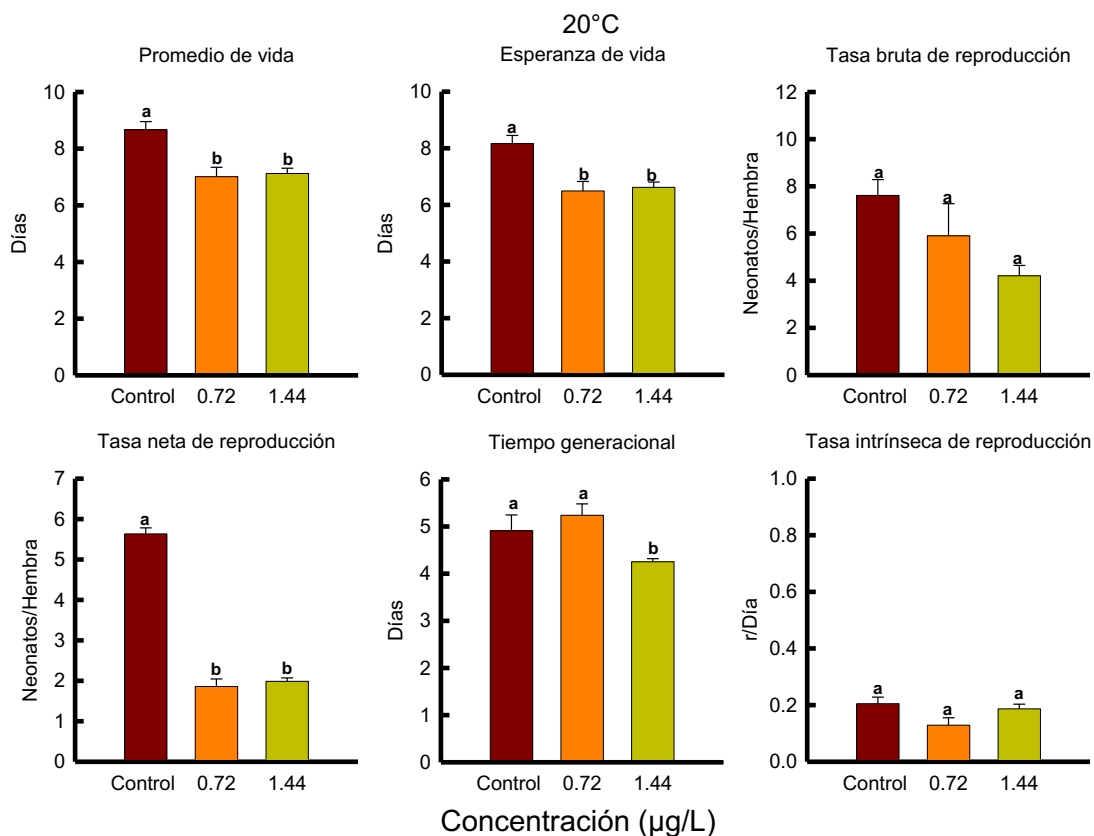


Figura 10 Variables demográficas derivadas de la supervivencia y fecundidad de *B. calyciflorus* expuesto a dos concentraciones de extracto crudo de cianobacterias (0.72 y $1.44 \mu\text{g/L}$) del mes de septiembre a 20°C . Barras con diferentes letras son estadísticamente diferentes.

A 25°C, el promedio de vida y la esperanza de vida se vieron disminuidas de manera significativa, siendo mayor el efecto en la concentración baja ($P < 0.001$) que a 1.44 $\mu\text{g/L}$ ($P < 0.003$), además de no haber diferencia significativa entre los tratamientos utilizados. La tasa bruta de reproducción fue mayor en el control a comparación de los tratamientos esto mostrándose para los dos tratamientos ($P < 0.001$). Mientras que la tasa neta de reproducción tuvo valores significativamente más altos en el control ($P < 0.001$), a comparación de lo que se mostro en los tratamientos, los cuales no tuvieron una diferencia significativa entre ellos.

El tiempo generacional fue afectado en la presencia del tratamiento, esta vez aumentando en presencia del tratamiento de manera significativa, pero a 0.72 $\mu\text{g/L}$ fue mayor la diferencia ($P < 0.005$) que a 1.44 $\mu\text{g/L}$ ($P < 0.008$), aunque sin observarse una diferencia significativa entre los tratamientos. Por último, la tasa intrínseca de reproducción fue significativamente mayor en el control ($P < 0.001$) a comparación de lo que hubo en los tratamientos (Figura 11).

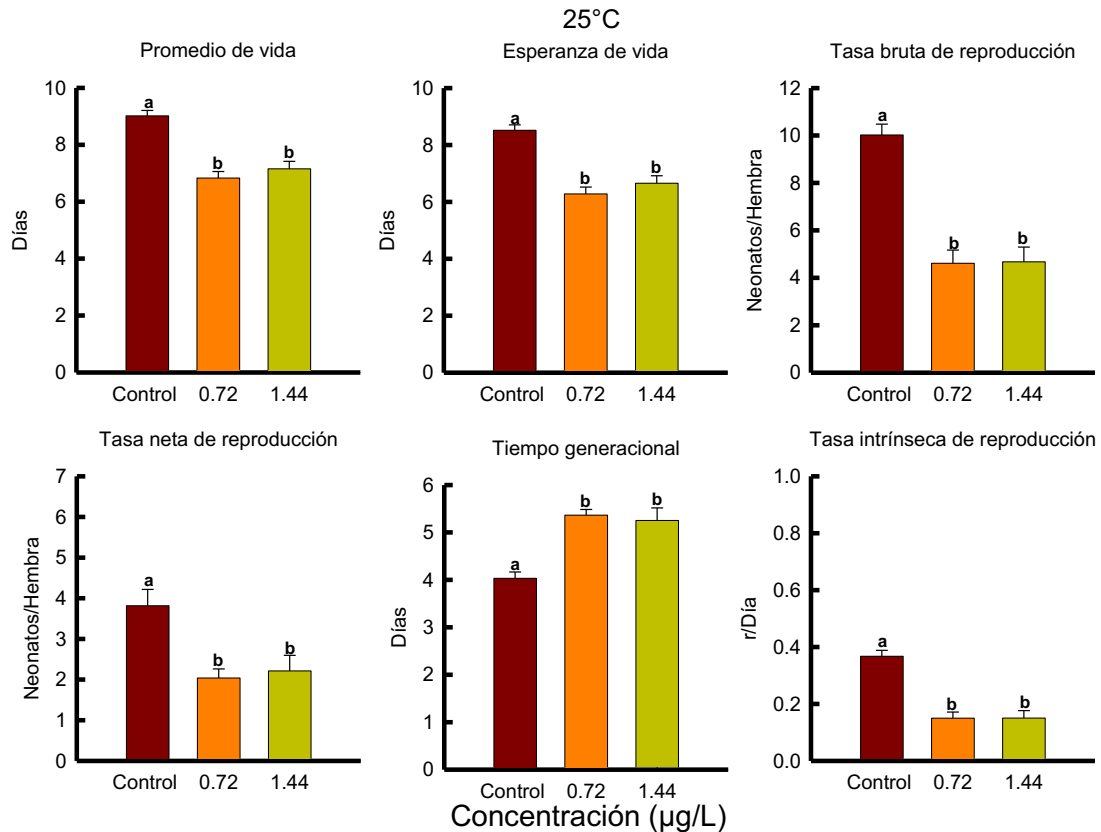


Figura 11 Variables demográficas derivadas de la supervivencia y fecundidad de *B. calyciflorus* expuesto a dos concentraciones de extracto crudo de cianobacterias (0.72 y 1.44 µg/L) del mes de septiembre a 25°C. Barras con diferentes letras son estadísticamente diferentes.

8.4.3. Crecimiento poblacional *Daphnia pulex*.

Las curvas de crecimiento poblacional de *D. pulex* con la muestra de enero muestran que el crecimiento empezó primero en los tratamientos. El crecimiento empezó primero a 20°C, siendo en los tratamientos más rápido, empezando alrededor del día 5, mientras que en el control alrededor del día 7. Además, los tratamientos obtuvieron una mayor densidad poblacional que los controles, viéndose una densidad poblacional de entre 120 y 160 ind/50 mL en los tratamientos, mientras que en el control fue de alrededor de 80 ind/50 mL. Al igual que a 20, a 25°C el crecimiento empezó primero en los tratamientos donde empezó en el día 4, a comparación del control donde empezó en el día 10. La densidad máxima que se alcanzó en el control fue menor que la obtenida en los tratamientos,

que fue alrededor de 130 y 160 ind/50 mL, mientras que en el control fue alrededor de 75 ind/50 mL (Figura 12).

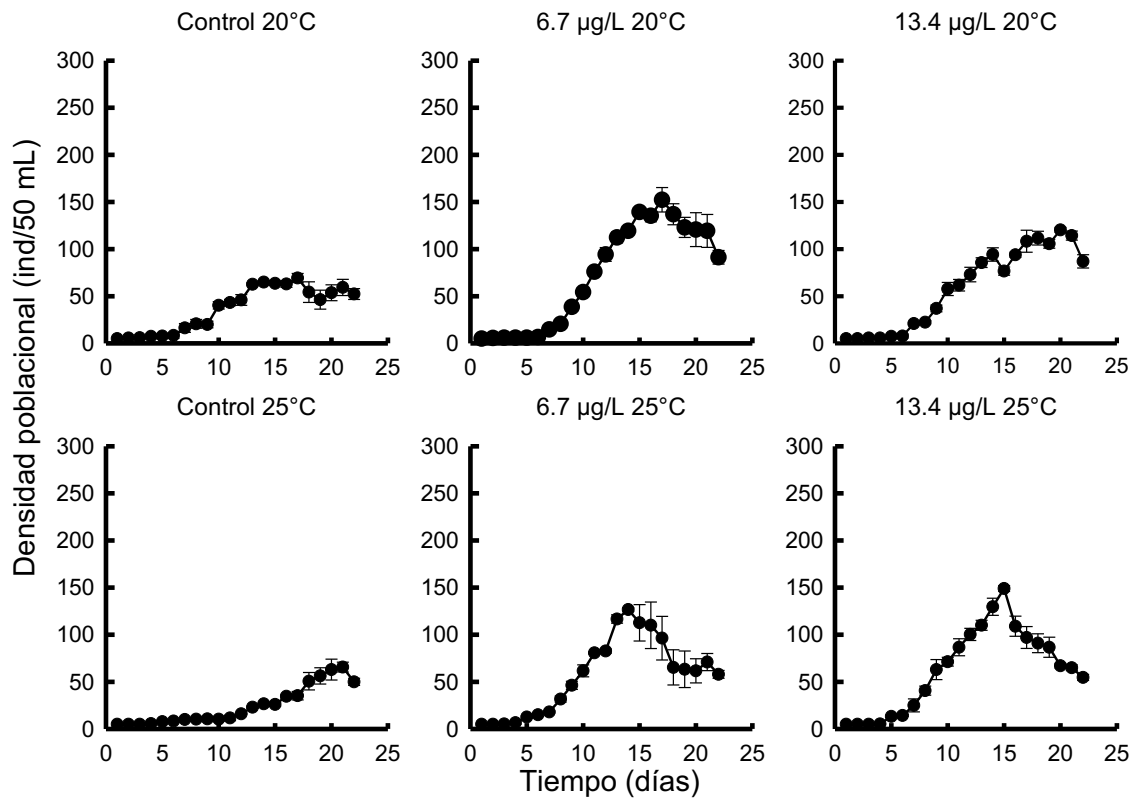


Figura 12 Crecimiento poblacional de *D. pulex* en presencia de extracto crudo de cianobacterias del mes de enero a dos concentraciones (6.7 y 13.4 µg/L) y a dos temperaturas (20 y 25°C)

La tasa de crecimiento con el extracto de enero fue mayor en los tratamientos a comparación de los controles. A 20°C la diferencia entre el control y los tratamientos fue significativamente diferente siendo mayor la diferencia con la concentración baja ($P < 0.01$), que lo mostrado en el otro tratamiento ($P < 0.03$), sin ser significativamente diferentes entre tratamientos. A 25°C el control fue significativamente menor a comparación de lo obtenido en los tratamientos, esta vez siendo significativamente diferente a 13.4 µg/L ($P < 0.02$) aunque sin diferencias significativas con 6.7 µg/L, además, sin diferencias significativas entre tratamientos. Al comparar entre las tasas de crecimiento obtenidas en las dos temperaturas no se ve una diferencia marcada (Figura 13).

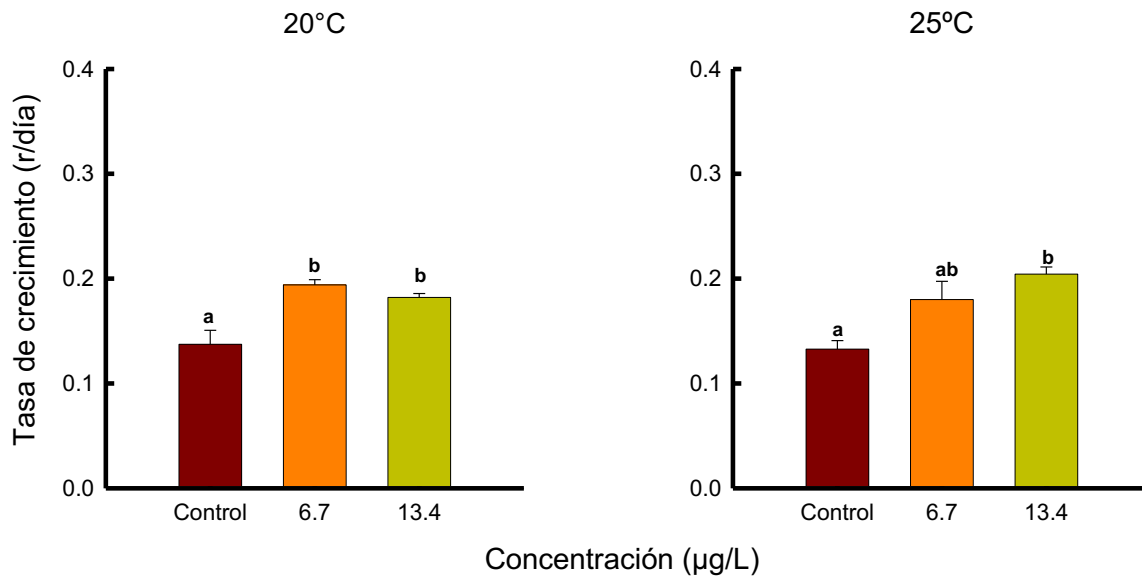


Figura 13 Tasa de crecimiento poblacional ($r/\text{día}$) de *D. pulex* en presencia de extracto crudo de cianobacterias del mes de enero a dos concentraciones (6.7 y 13.4 $\mu\text{g/L}$) y a dos temperaturas (20 y 25°C). Barras con diferentes letras son estadísticamente diferentes.

Con el extracto de septiembre las curvas de crecimiento de *D. pulex* muestran que el crecimiento se retrasó a 20°C tanto en el control como en los tratamientos. En el control empezó en el día 6 al igual que a 23.66 $\mu\text{g/L}$, y a 11.83 $\mu\text{g/L}$ empezando desde el día 5. La densidad máxima obtenida fue mayor en los tratamientos siendo entre 150 y 170 ind/50 mL, mientras que en el control no alcanzó más de 70 ind/50 mL. A 25°C el crecimiento poblacional es mayor que lo observado en la temperatura baja, además de empezar antes el crecimiento poblacional. En el control inició en el día 3, mientras que en los tratamientos empezó al día 5. La densidad máxima obtenida en el control fue menor a comparación de lo encontrado a 11.83 $\mu\text{g/L}$ que fue de alrededor de 220 ind/50 mL, mientras que en el control 170 ind/50 mL. Sin embargo, en la concentración alta la densidad máxima obtenida fue de 130 ind/50 mL (Figura 14).

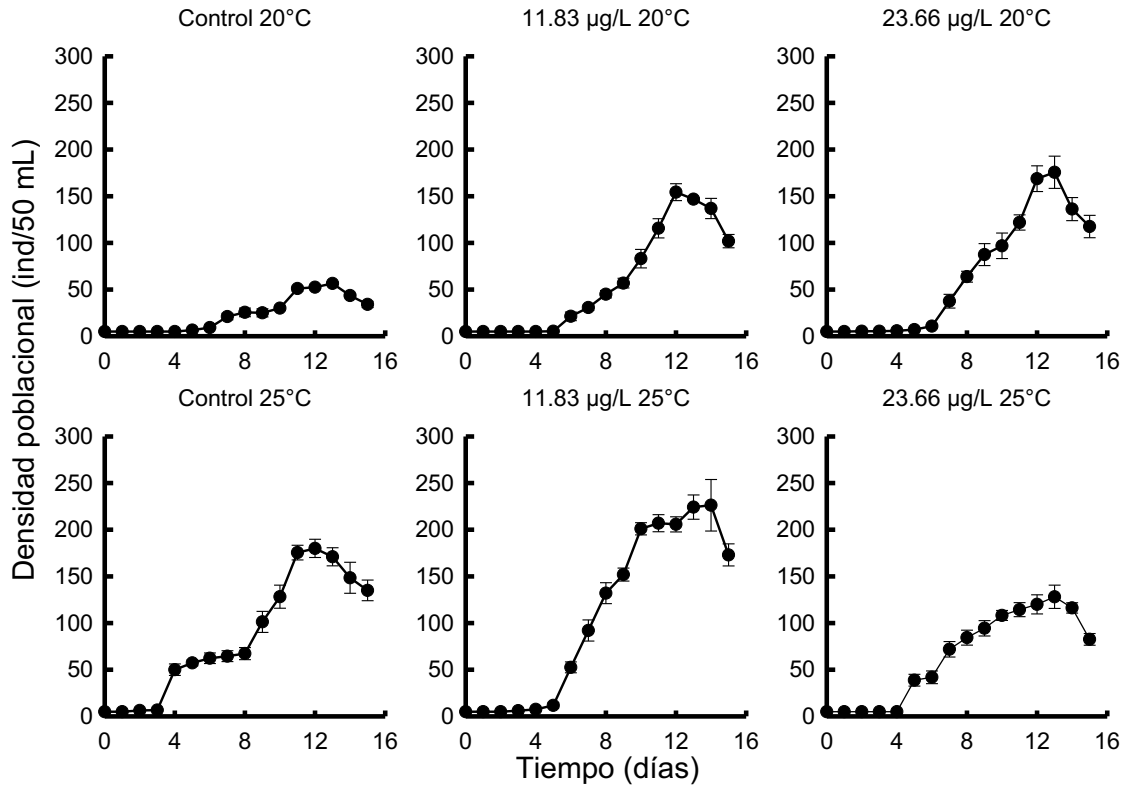


Figura 14 Crecimiento poblacional de *D. pulex* en presencia de extracto crudo de cianobacterias del mes de septiembre a dos concentraciones (11.83 y 23.66 µg/L) y a dos temperaturas (20 y 25°C)

La tasa de crecimiento con la muestra de septiembre fue mayor en la mayoría de los tratamientos a comparación de los controles. A 20°C las diferencias entre el control y los tratamientos fueron significativas ($P < 0.001$), sin ser diferentes entre los tratamientos. A 25°C el control no tuvo diferencias significativas con la concentración baja, pero en comparación de la tasa de crecimiento de 23.66 µg/L, el control fue significativamente mayor ($P < 0.001$). Además, los tratamientos fueron significativamente diferentes entre sí ($P < 0.002$). Comparando las tasas de crecimiento obtenidas entre las dos temperaturas se puede apreciar una mayor tasa de crecimiento a 25°C, que lo mostrado a 20°C, tanto en los controles como en los tratamientos (Figura 15).

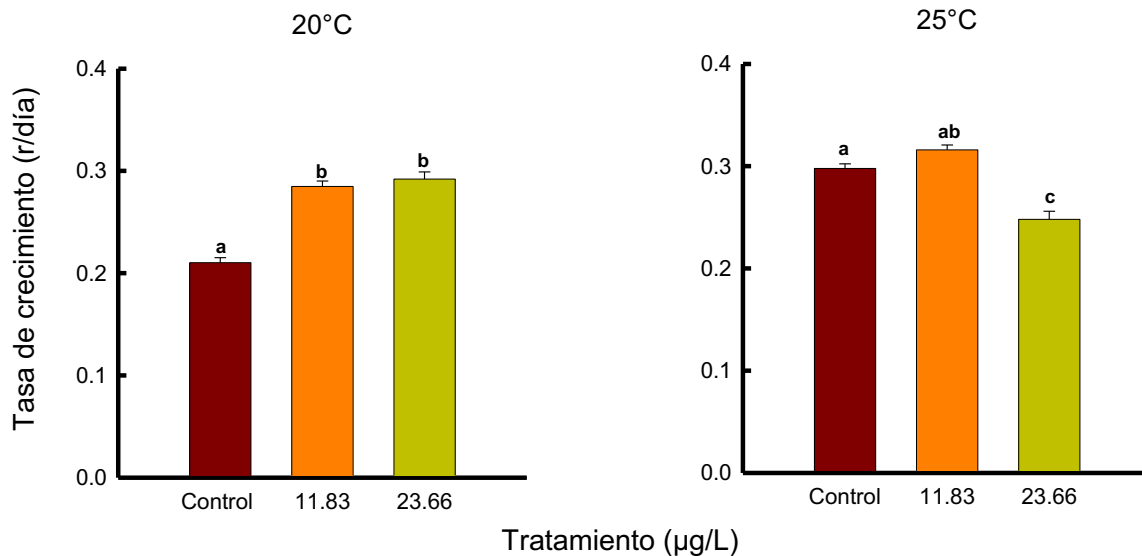


Figura 15 Tasa de crecimiento poblacional (r/día) de *D. pulex* en presencia de extracto crudo de cianobacterias del mes de septiembre a dos concentraciones (11.83 y 23.66 µg/L) y a dos temperaturas (20 y 25°C). Barras con diferentes letras son estadísticamente diferentes.

8.4.4. Tabla de vida *Daphnia pulex*.

Las curvas de supervivencia de *D. pulex* con la muestra de enero tuvieron diferencias dependiendo de la temperatura a la que fueron sometidas. A 20°C el control y la concentración baja del extracto crudo de cianobacterias se comportaron de manera similar, mientras que a 13.4 µg/L al día 20 ya había 50% de mortalidad de la población. La mayor supervivencia fue en el día 40 al igual que a 6.7 µg/L, mientras que para la concentración alta fue de alrededor de 28 días. Por otro lado, a 25°C se nota una disminución en la supervivencia en los tratamientos comparados con el testigo, aunque con un efecto más notable a 13.4 µg/L. Siendo la mayor supervivencia al día 35 en el testigo mientras que en los tratamientos fue entre 15 y 20. Las curvas de fecundidad muestran los efectos del extracto crudo de cianobacterias al empezar primero la reproducción en los tratamientos a comparación de los controles, esto viéndose en ambas de las temperaturas utilizadas. Los valores de fecundidad fueron más altos a 20°C donde los valores máximos oscilaron entre 6 y 4, mientras que cuando fueron puestos en 25°C los valores máximos fueron menores alcanzando valores entre 2 y 3 (Figura 16).

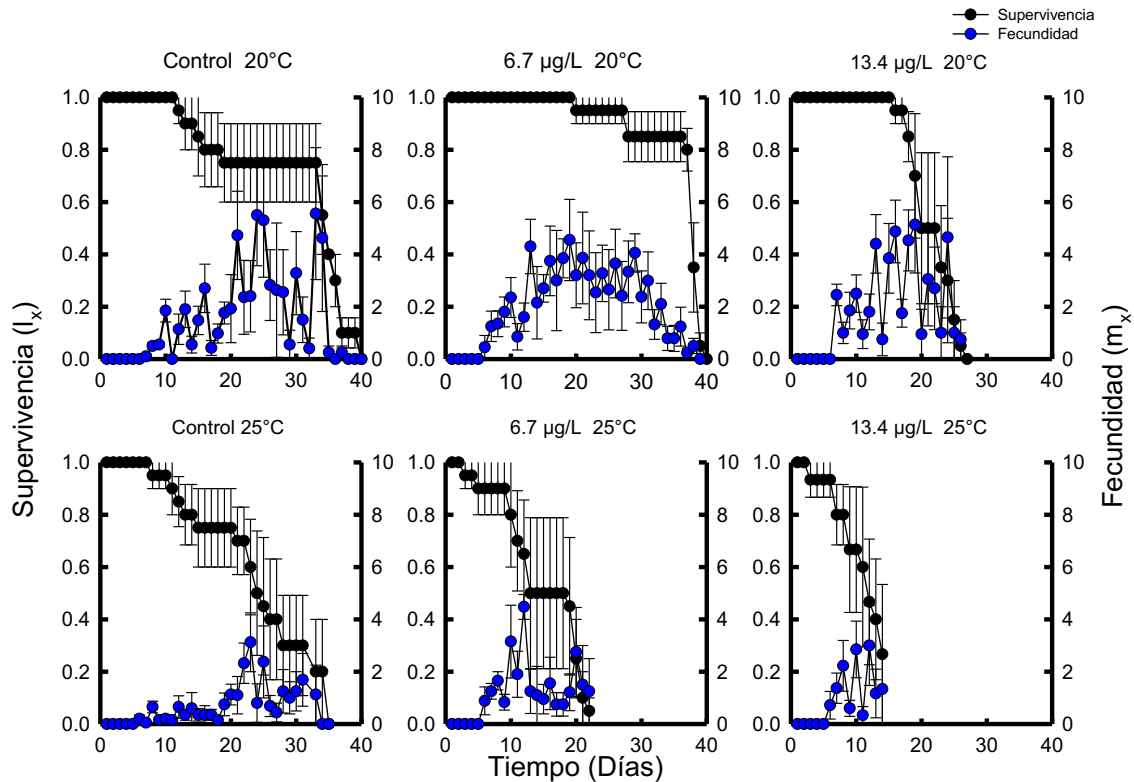


Figura 16 Supervivencia (puntos negros) y fecundidad (puntos azules) de *D. pulex* expuesto a dos concentraciones de extracto crudo de cianobacterias (1.34 y 2.68 $\mu\text{g/L}$) del mes de enero a dos temperaturas (20 y 25°C). Nótese que los ejes tienen diferentes escalas.

A 20°C, el promedio de vida y la esperanza de vida de la concentración baja se vio aumentada con respecto al control, pero sin ser esta diferencia significativa, mientras que en la concentración alta se vio disminuida de manera significativa ($P < 0.04$) con respecto al control. Además, entre tratamientos la diferencia que hubo fue significativa ($P < 0.004$). La tasa bruta de reproducción fue mayor a 6.7 $\mu\text{g/L}$ en comparación con el control, sin embargo, no hubo una diferencia significativa. En la concentración alta disminuyó de manera significativa ($P < 0.02$) con respecto al control, esto dando una diferencia significativa entre los tratamientos ($P < 0.001$). Por otro lado, la tasa neta de reproducción tuvo valores más altos en los tratamientos a comparación del control, pero sólo a 6.7 tuvo diferencias significativas ($P < 0.05$).

El tiempo generacional fue afectado en la presencia del tratamiento reduciéndose conforme la concentración del tratamiento, pero no fue hasta la concentración alta donde hubo una diferencia significativa con respecto al control ($P < 0.001$), donde

incluso tuvo diferencias significativas con respecto a la concentración baja ($P < 0.006$). En cuanto a la tasa intrínseca de crecimiento, en el control fue significativamente más baja con respecto a los tratamientos ($P < 0.001$), aunque no hubo una diferencia significativa entre el valor obtenido entre tratamientos (Figura 17).

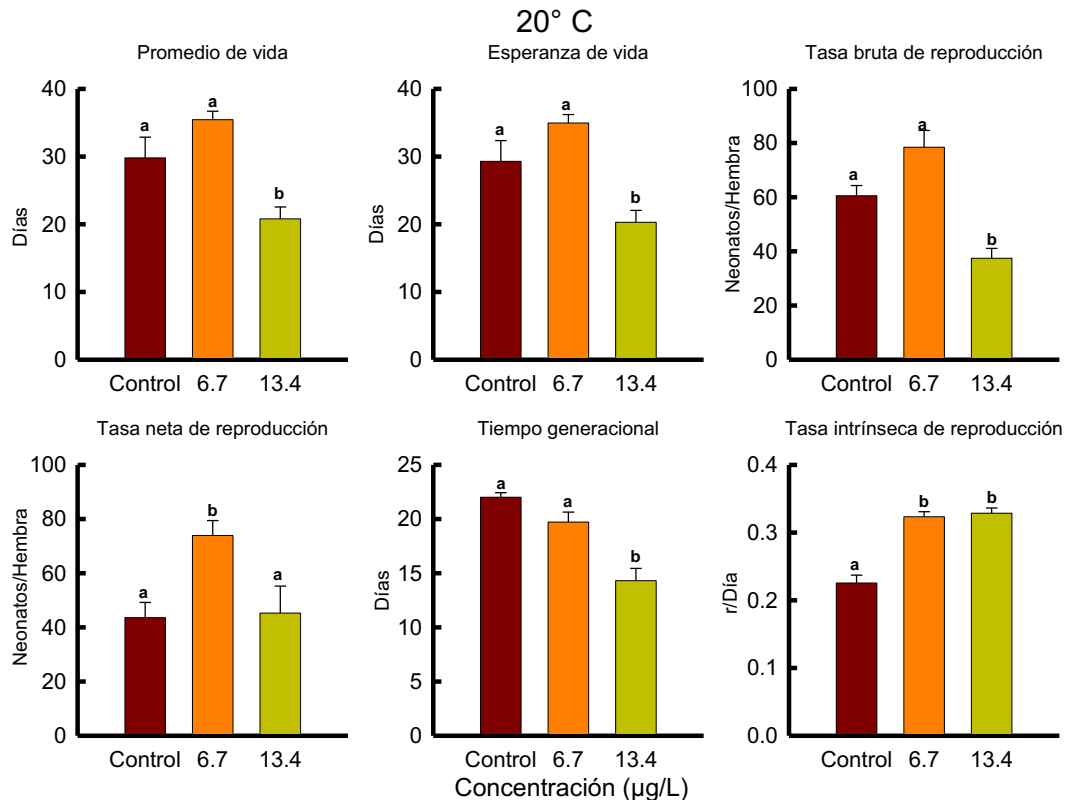


Figura 17 Variables demográficas derivadas de la supervivencia y fecundidad de *D. pulex* expuesto a dos concentraciones de extracto crudo de cianobacterias (6.7 y 13.4 $\mu\text{g/L}$) del mes de enero a 20°C. Barras con diferentes letras son estadísticamente diferentes.

A 25°C, el promedio de vida se vio reducido en presencia de los tratamientos de manera significativa, siendo mayor el efecto en la concentración alta ($P < 0.004$) que lo mostrado en la concentración baja ($P < 0.007$). La esperanza de vida se vio afectada de una manera similar, al afectarse significativamente más a 13.4 $\mu\text{g/L}$ ($P < 0.003$) que lo que se muestra a 6.7 $\mu\text{g/L}$ ($P < 0.02$). La tasa bruta de reproducción se vio aumentada a 6.7 $\mu\text{g/L}$ esto teniendo diferencias significativas con el control ($P < 0.02$), mientras que en la concentración alta se vio disminuida, pero sin

diferencias significativas con el control. Entre tratamientos sí hubo una diferencia significativa ($P < 0.005$). La tasa neta de reproducción se comportó de la misma forma, siendo más alta a $6.7 \mu\text{g/L}$ ($P < 0.04$) con respecto al control, mientras que a $13.4 \mu\text{g/L}$ no hubo diferencias significativas con respecto al control. Hubo diferencias significativas entre los tratamientos utilizados ($P < 0.007$).

El tiempo generacional fue afectado en la presencia del tratamiento, disminuyendo de manera significativa con respecto al control ($P < 0.001$), aunque sin mostrar una diferencia significativa entre los tratamientos. Por último, la tasa intrínseca de reproducción fue significativamente menor en el control con respecto a los tratamientos, siendo mayor el efecto en la concentración baja ($P < 0.007$) que en la concentración alta ($P < 0.04$) (Figura 18).

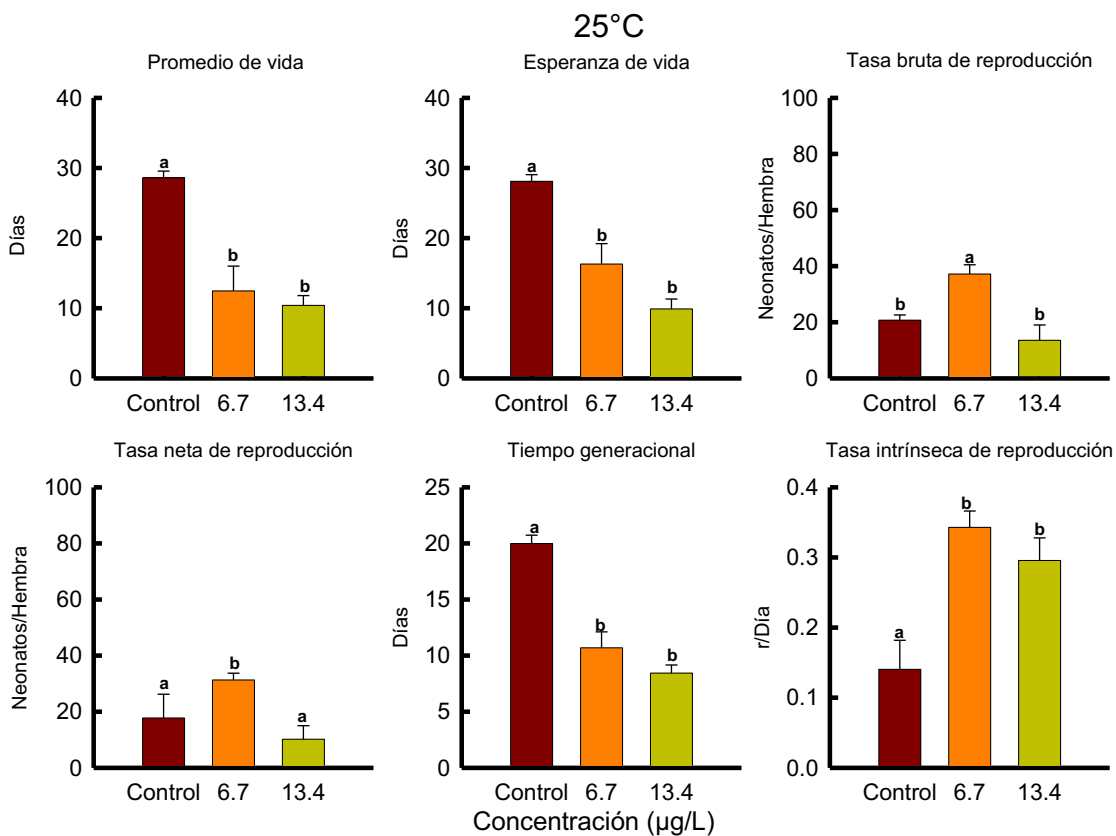


Figura 18 Variables demográficas derivadas de la supervivencia y fecundidad de *D. pulex* expuesto a dos concentraciones de extracto crudo de cianobacterias (6.7 y $13.4 \mu\text{g/L}$) del mes de enero a 25°C . Barras con diferentes letras son estadísticamente diferentes.

Para la muestra de septiembre las curvas de supervivencia de *D. pulex* mostraron un efecto contundente en los tratamientos ya que en ambas temperaturas en presencia del extracto crudo la supervivencia decayó de manera abrupta, alrededor del día 20. El día de mayor supervivencia a 20°C fue en el testigo a 41 días, mientras que en los tratamientos fue entre 31 y 34 días. El efecto negativo es mejor apreciado a 25°C donde decayó primero la supervivencia y más rápido. El día de mayor supervivencia en los tratamientos fue entre 25 y 29 días, lo cual fue menor que el testigo (35 días). Las curvas de fecundidad de edad específica empezaron primero a 25°C (6 días) a comparación de lo que se vio a 20°C (8 días). Se obtuvieron valores máximos entre 3 y 5 en los tratamientos, mientras que en el testigo los valores máximos llegaron a 1 (Fig. 8). A 20°C la fecundidad tuvo valores más altos en conforme aumentó la concentración del tratamiento teniendo valores máximos entre 4 y 9 mientras que en el testigo de 2 (Figura 19).

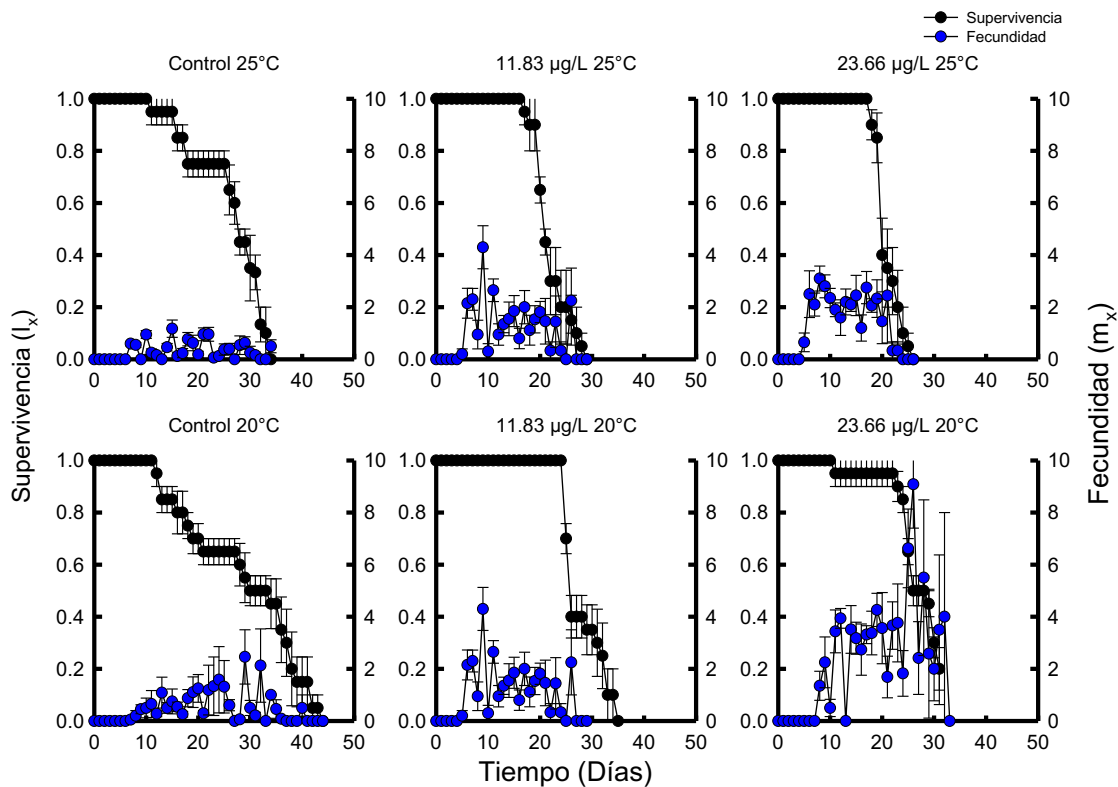


Figura 19 Supervivencia (puntos negros) y fecundidad (puntos azules) de *D. pulex* expuesto a dos concentraciones de extracto crudo de cianobacterias (11.83 y 23.66 µg/L) del mes de septiembre a dos temperaturas (20 y 25°C). Nótese que los ejes tienen diferentes escalas.

A 20°C, tanto el promedio de vida, como la esperanza de vida y el tiempo generacional no tuvieron diferencias significativas entre los tratamientos y el control. La tasa bruta de reproducción se vio aumentada en presencia del tratamiento ($P < 0.001$) sin tener diferencias significativas entre los tratamientos. La tasa neta de reproducción se comportó de una manera similar, al aumentar en presencia del tóxico de manera significativa ($P < 0.001$) con respecto al control. De igual forma, no hubo diferencias entre los tratamientos. Por último, la tasa intrínseca de reproducción fue significativamente menor en el control con respecto a los tratamientos ($P < 0.001$), sin tener diferencias entre los tratamientos (Figura 20).

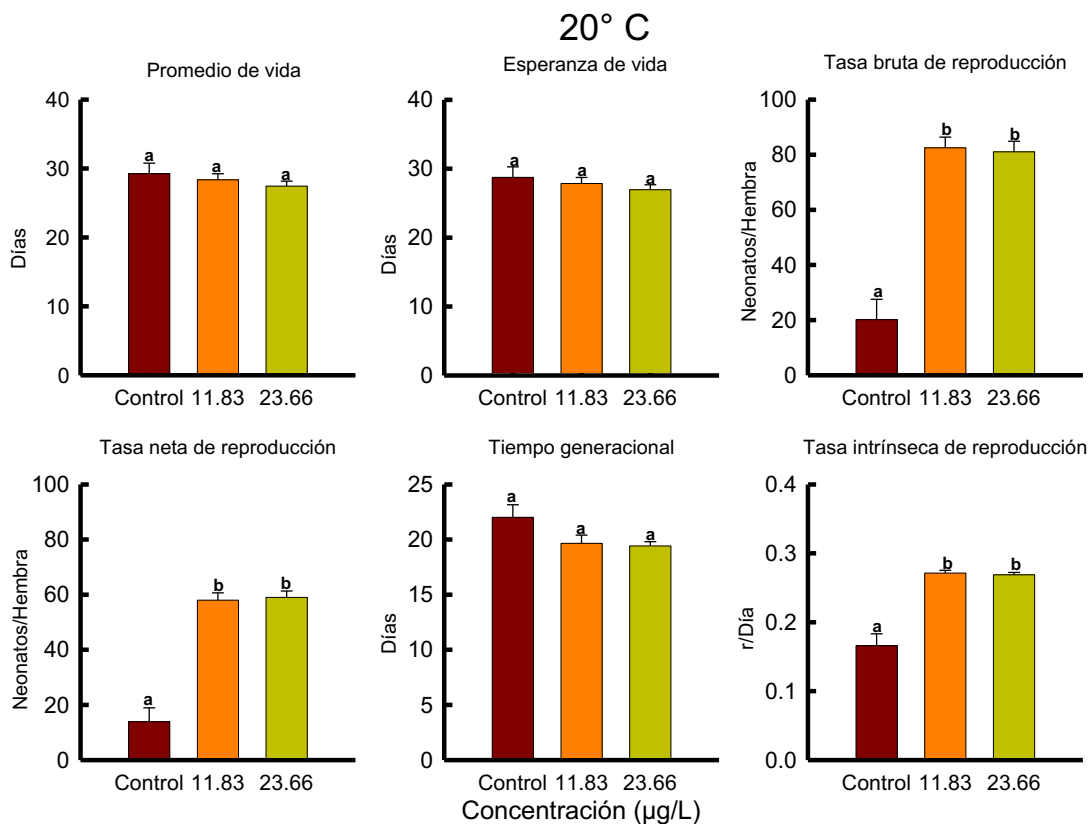


Figura 20 Variables demográficas derivadas de la supervivencia y fecundidad de *D. pulex* expuesto a dos concentraciones de extracto crudo de cianobacterias (11.83 y 23.66 µg/L) del mes de septiembre a 20°C. Barras con diferentes letras son estadísticamente diferentes.

A 25°C, el promedio de vida y la esperanza de vida se vieron reducidos en presencia de los tratamientos de manera significativa teniendo mayor efecto en la concentración alta ($P < 0.004$) a comparación de lo mostrado en la concentración baja ($P < 0.02$), sin mostrar diferencias significativas entre los tratamientos. La tasa

bruta de reproducción se vio aumentada significativamente en ambas concentraciones con respecto al control ($P < 0.001$), pero sin diferencias significativas entre ambos tratamientos. La tasa neta de reproducción significativamente más alta en las concentraciones usadas ($P < 0.001$) con respecto al control. Además de haber diferencias significativas entre los tratamientos utilizados ($P < 0.03$).

El tiempo generacional fue disminuido en presencia del tratamiento, disminuyendo de manera significativa con respecto al control, notándose mas a 23.66 $\mu\text{g/L}$ ($P < 0.004$) a comparación de lo mostrado 11.83 $\mu\text{g/L}$ ($P < 0.008$), aunque sin mostrar una diferencia significativa entre los tratamientos. Por último, la tasa intrínseca de reproducción fue significativamente menor en el control con respecto a los tratamientos ($P < 0.001$). (Figura 21).

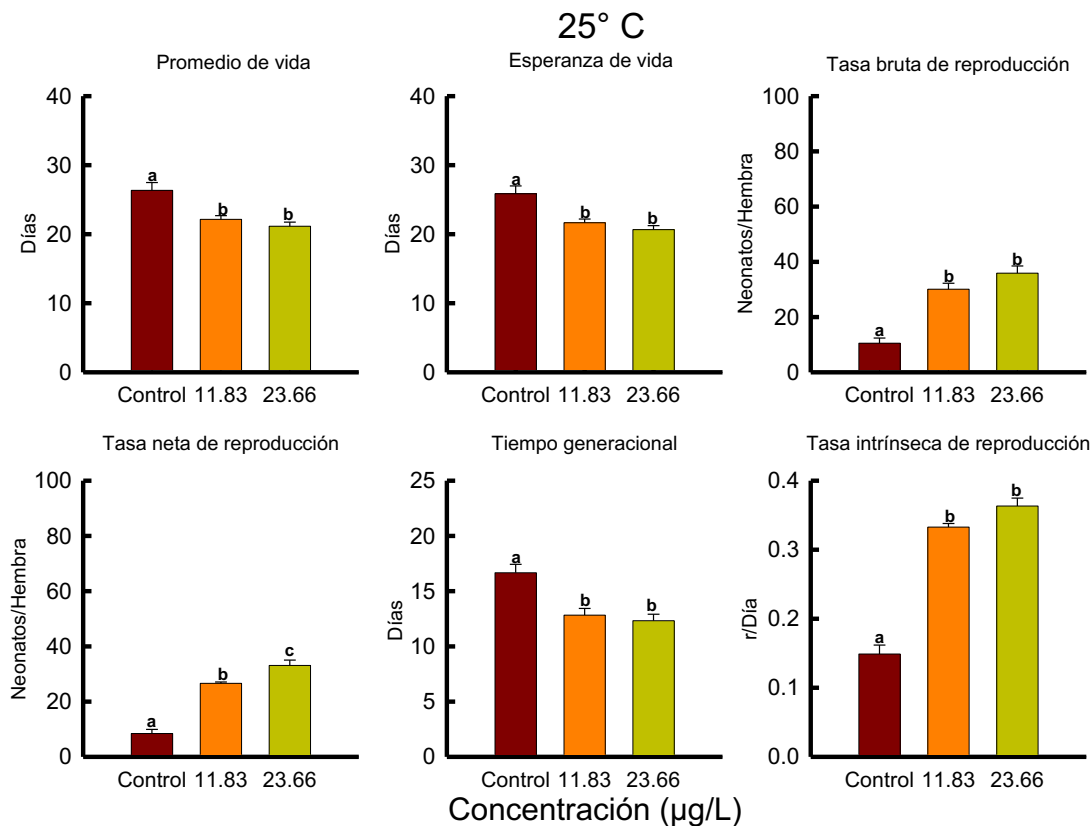


Figura 21 Variables demográficas derivadas de la supervivencia y fecundidad de *D. pulex* expuesto a dos concentraciones de extracto crudo de cianobacterias (11.83 y 23.66 $\mu\text{g/L}$) del mes de septiembre a 25°C. Barras con diferentes letras son estadísticamente diferentes.

9. Discusión.

En México, se han reportado gran variedad de cuerpos de agua que tienen presencia de cianobacterias durante periodos del año, los cuales causan distintos efectos adversos a las comunidades que habitan dichos lugares (Berry y Lind, 2010). Valle de Bravo es uno de los cuerpos de agua del centro de México que tiene presencia constante de cianobacterias, además estas son potencialmente tóxicas (Vasconcelos *et al.*, 2010). En las muestras tomadas del florecimiento se determinó la presencia de tres géneros: *Microcystis*, *Woronichinia* y *Lyngbya*, los cuales también son reportados por Gaytan-Herrera *et al.* (2011), además es mencionado que son potencialmente tóxicas (Ramírez-García *et al.*, 2002).

Los niveles obtenidos de cianotoxinas en este estudio muestran dos valores distintos en la concentración de microcistinas, siendo mayor en enero (47.83 µg/L) que lo visto en septiembre (3.42 µg/L). Estos valores son más altos que los mencionados por Figueroa-Sánchez *et al.* (2014) donde menciona valores que van de 0.33 a 0.77 µg/L, mientras que lo mencionado por Alillo-Sánchez *et al.* (2014) indica valores que van de 0.25 a 5.56 µg/L entrando en el rango lo encontrado en este trabajo en el mes de septiembre. Cabe recalcar que los datos mencionados en la literatura fueron realizados sólo con el agua, quitando todo el fitoplancton que hubiera, por lo que la medición es sólo de las microcistinas existentes en el agua, mientras que lo reportado en este trabajo es de las microcistinas dentro de las células de cianobacterias. Esto siendo parte de la importancia de utilizar extractos de cianobacterias para la realización de bioensayos.

El uso de extractos crudos está pensado para representar los eventos que ocurren de manera natural al romper las células y liberar la toxina al medio. Teniendo en cuenta que no hay certeza de que el efecto sólo sea por microcistinas, si no que también puede ser por la interacción de otros metabolitos con características tóxicas (Palíkova *et al.*, 2007; Arzate-Cárdenas *et al.*, 2010).

El zooplancton es sujeto de diferentes niveles de estrés durante todo su ciclo de vida, entre los provocantes del estrés está la presencia de cianobacterias y por tanto

de los metabolitos secundarios que estas producen. Al estar bajo constantes cambios ambientales, es de vital importancia la adecuación a las circunstancias presentes, y así, poder preservar la especie (Hutchinson, 1967). Dependiendo la especie de la que se esté hablando los diversos cambios que hay en el sistema pueden ser favorables u hostiles. Este tipo de respuestas ante factores estresantes se ven reflejados en pruebas crónicas y agudas. Estas últimas nos dan un panorama amplio de la resistencia que los organismos tienen a distintas sustancias, aunque en organismos como los invertebrados, la resistencia que tienen puede ser muy diferente, incluso entre especies cercanas (Roex *et al.*, 2000). Como lo observado en este trabajo, donde, a partir de la prueba aguda las dos especies utilizadas tienen una resistencia diferente, siendo más resistente *D. pulex* a comparación de lo observado en *B. calyciflorus*, esto viéndose con las dos muestras.

Si bien, los ensayos agudos nos dan datos muy útiles, estos sólo se basan en la supervivencia del organismo, sin tomar en cuenta la reproducción, por lo cual son usados estudios demográficos donde la fecundidad toma parte, como es el caso del crecimiento poblacional donde se pueden obtener datos sobre la abundancia máxima y el tiempo que le toma a dicha población alcanzar esa densidad, aunque, estos por si solos no muestran los efectos negativos sobre parámetros relacionados con la supervivencia y fecundidad en conjunto, como es el caso de la tabla de vida, donde se obtienen datos como el promedio de vida y el tiempo generacional (Krebs, 1985). En este estudio se vio la presión que ejerce la presencia de cianotoxinas sobre las variables demográficas de *B. calyciflorus* y *D. pulex*, donde se vieron alteraciones en la demografía de ambas especies en las concentraciones utilizadas.

En este trabajo se observó una reducción en el crecimiento poblacional de *B. calyciflorus*, donde las densidades alcanzadas fueron menores en los tratamientos a comparación de los controles, además de un periodo menor de crecimiento antes del decaimiento de la población, esto concuerda con lo encontrado por Barrios *et al.* (2017), donde en presencia alta de cianotoxinas el crecimiento poblacional fue menor, además de encontrar una tasa de crecimiento menor en la presencia del tratamiento de igual forma que en el presente trabajo. Alva-Martínez *et al.* (2009)

también vieron este efecto cuando se incluye cianobacterias en la dieta de *B. calyciflorus* y *B. havanensis*. De igual forma Barrios *et al.* (2015) vio el mismo efecto en otro género de rotíferos al exponer a extractos crudos de cianobacterias a *Plationus patulus*.

En cuestión a las variables demográficas involucradas en el ciclo de vida de *B. calyciflorus*, como es la esperanza de vida y el tiempo generacional fueron reducidas en presencia del tratamiento. Esto sucediendo de la misma forma que lo reportado en Gilbert (1996) con esta misma especie alimentada con cianobacteria. En cuanto a trabajos donde se utilicen extractos crudos sobre rotíferos, se ha visto en la especie *Plationus patulus* donde Barrios *et al.* (2015) encontraron una disminución de las variables demográficas, en especial en la tasa de crecimiento bruta y neta. Ese mismo efecto fue visto en los tratamientos de las dos temporadas que se utilizaron. Se ha estudiado poco el efecto de las cianotoxinas sobre organismos pertenecientes a la clase Rotifera.

El efecto de las cianotoxinas no sólo se puede observar cuando se utilizan extractos de cianobacterias. En *B. calyciflorus* se ha visto el efecto que tienen las cianobacterias en diferentes aspectos de su demografía, además de otras respuestas como la movilidad y el comportamiento alimenticio. Aunque no sólo se han visto estos efectos en organismos de este género, sino que también se han visto efectos negativos por las cianobacterias en otros géneros de rotíferos como: *Asplanchna* y *Keratella* (Gilbert y Durand, 1990; Gilbert, 1996).

Por otro lado, la interacción cladócero-cianobacteria ha sido estudiada desde varios puntos de vista, por lo que a comparación de la información que hay con respecto al efecto en rotíferos, en este grupo de crustáceos es más abundante. En este trabajo se vio un efecto contrario en varios sentidos con respecto a la respuesta que tuvo *B. calyciflorus* y lo mostrado por *D. pulex* ya que, en su caso, el crecimiento poblacional observado no se vio disminuido en presencia del tratamiento, sino que fue aumentado, incluso, con una tasa de crecimiento mayor. Esta respuesta ha sido mostrada alimentando *D. pulex* con *M. aeruginosa* donde su crecimiento era mayor alimentándose de cianobacteria que alimentada con *C. vulgaris*. Sin embargo, es

mencionado que el efecto que muestran los organismos es variado dependiendo de la historia de vida que tengan, por lo que no para todos los organismos va a ser la misma respuesta la presencia de cianobacterias. Ya que otras especies como *Moina macrocopa* y *M. micrura* no pudieron crecer al ser alimentadas de cianobacteria (Alva-Martínez *et al.*, 2001; Nandini *et al.*, 2017). En distintos trabajos se ha visto esta capacidad del género *Daphnia* de poder crecer en un medio con presencia de cianobacterias (Rohrlack *et al.*, 1999; Nandini *et al.*, 2000).

A pesar de la aparente resistencia que presenta el género *Daphnia* para poder crecer en contacto con cianobacterias y microcistinas, no es hasta el momento de ver otros factores de la demografía, como la supervivencia, se ve que la supervivencia es reducida en presencia de cianotoxinas. En este trabajo se vio una reducción de la supervivencia conforme aumentó la concentración a la que fueron expuestas, encontrando hasta 50% de reducción de la supervivencia. Ferrão-Filho *et al.* (2000) al evaluar el efecto de cianobacteria sobre diferentes especies de cladóceros incluyendo *D. pulex* también encontraron una disminución en la supervivencia. Por el otro lado, en este trabajo, la fecundidad fue aumentada en los tratamientos. Este mismo patrón fue observado por Dao *et al.* (2010) donde al exponer a *D. magna* a cianotoxinas encontraron una reducción de su supervivencia, además encontraron un aumento en la fecundidad. Ante cambios desfavorables, la respuesta más común es la alta fecundidad, lo cual trae como consecuencia un acortamiento en la natalidad de los progenitores, de tal forma que la esperanza de vida se ve reducida (MacArthur, 1972). Esto nos indica que *Daphnia* tiene la capacidad reproducirse constantemente al estar en contacto con cianobacterias y cianotoxinas a costa de reducir su tiempo de vida. Barrios *et al.* (2015) y Nandini *et al.* (2017) encontraron lo contrario en otros géneros como *Ceriodaphnia* y *Moina*, donde la fecundidad es reducida de manera significativa.

En este trabajo también se evaluó el efecto que tienen las cianotoxinas a dos temperaturas (20 y 25°C) ya que la temperatura determina distintos aspectos de las poblaciones de zooplancton como la reproducción y el tiempo de desarrollo (Yilong y Xiangfei, 2004). Aunque son diferentes los factores que afectan dichas variables,

la temperatura es de los principales. Se ha visto que afecta procedimientos como la muda en cladóceros (Hessen *et al.*, 2000) lo que provoca una mayor demanda de nutrientes y energía, aunque también ha sido estudiado el efecto en la historia de vida de rotíferos (Yi-Long *et al.*, 2004). El cambio térmico se ha visto que altera el efecto tóxico de distintas sustancias (Ashforth y Yan, 2008). A pesar de eso, muy poco se ha estudiado del papel que juega la temperatura en la interacción zooplancton-cianobacterias, ya que, comúnmente, los estudios realizados son a una temperatura (Gilbert y Durand, 1990; Ferrão-Filho y Azevedo, 2003; Okumura *et al.*, 2007; Sotero-Santos *et al.*, 2008; Barrios *et al.*, 2017). Siendo importante el estudio de este factor porque el aumento de la temperatura ya sea por la temporalidad o el cambio climático, promueve la dominancia de cianobacterias y una mayor interacción entre este grupo y el zooplancton.

El crecimiento poblacional de *B. calyciflorus* se vio acelerado cuando la temperatura fue de 25°C, iniciando la fase exponencial por lo menos un día antes a comparación de lo visto a 20°C, aunque de la misma forma, en presencia del tratamiento la densidad poblacional que alcanzó era menor que en el control. Con ese mismo patrón la tasa de crecimiento en general fue mayor en la temperatura alta. De manera similar Nandini y Rao (1998) mostraron un aumento en la tasa de crecimiento de *B. calyciflorus* cuando aumentó la temperatura en ausencia de la cianobacteria, también encontraron un aumento de la tasa de crecimiento de los tratamientos con el aumento de temperatura, mientras que en este trabajo se vieron más reducidas con respecto al control. Mismo efecto a lo encontrado por Gilbert (1996), donde vio una disminución de la tasa de crecimiento conforme la temperatura aumentó, esto viéndolo en *B. calyciflorus* y en *Asplanchna girodi*. Esta diferencia se puede deber a que utilizaron una sola cianobacteria y en las muestras de florecimiento usadas había varias especies.

El efecto de la temperatura no sólo se vio en este aspecto, sino también sobre las variables demográficas, donde el tiempo generacional, supervivencia y fecundidad fueron afectados. Estas variables fueron disminuidas con el aumento en la temperatura, e incluso más en presencia del tratamiento esto coincidiendo con otros

trabajos. Es mencionado en la literatura que el constante enfrentamiento a condiciones adversas como lo son la temperatura o las toxinas promueven la producción más constante de “proteínas de estrés” (por ejemplo: proteínas de choque térmico) esto con el fin de proteger otras proteínas como las que conforman la pared celular (Feder y Hofman, 1999). La producción de moléculas para prevenir el mal funcionamiento de los sistemas provoca un gasto mayor de energía, este gasto mayor de energía se ha visto que altera la producción de neonatos (Tessier *et al.*, 1983) afectando de manera fuerte la fecundidad.

Por otro lado, en *D. pulex* el cambio en la temperatura aumentó su tasa de crecimiento, de igual forma que lo visto por Hietala *et al.* (1997), donde se ve una tasa de crecimiento mayor en presencia de cianobacterias y una temperatura alta. Aunque es contrario a lo encontrado por Claska y Gilbert (1998) donde con una sepa de la misma especie vieron una disminución en la tasa de crecimiento conforme la temperatura y la concentración de cianotoxina aumentaba. En el caso de los demás factores presentes en la demografía de este organismo, variables como la supervivencia y fecundidad fueron afectadas. Esta última variable no sólo fue afectada reduciendo la cantidad de nacimientos, también fue acortado el tiempo generacional, lo que concuerda con el trabajo de Hietala *et al.* (1997).

La disminución en el tiempo generacional es debido a que, al aumentar el estrés, la energía necesaria para mantenerse en el sistema aumenta, forzando a las poblaciones a hacer compromisos para que cambio no afecte tanto, uno de los compromisos es la disminución en el tamaño de la madurez, disminuyendo a su vez el tiempo que tardan en madurar los organismos. La disminución en estos factores provoca una disminución en el tiempo generacional, esto se ha visto que pasa cuando aumenta la temperatura disminuyendo de la misma forma el tiempo necesario para madurar (McKee y Ebert, 1996), por lo que no es necesariamente que el cambio de temperatura aumente la sensibilidad, sino que provoque distinto tipo de respuestas (Claska y Gilbert, 1998). Otro efecto que referente a la fecundidad que se ha visto en cladóceros es el aborto provocado por las cianobacterias el cual

también aumenta conforme la temperatura lo hace (Bednarska *et al.*, 2011), aunque no fue evaluado en este trabajo.

Los resultados tanto de *B. calyciflorus*, como de *D. pulex* muestran un efecto negativo en su demografía debido a la presencia de las cianotoxinas extraídas, esto al igual que en otros trabajos en la misma área. Siendo organismos del género *Daphnia* más utilizado para la realización de ensayos de este tipo (DeMott *et al.*, 1991; Arzate-Cárdenas *et al.*, 2010; Yang *et al.* 2012). Por otro lado, una especie fue más sensible a la presencia del extracto crudo de cianobacterias, tomando en cuenta las dos tasas de crecimiento obtenidas (del crecimiento poblacional y de la tabla de vida demográfica) se pudo observar que *D. pulex* fue la que tuvo la tasa de crecimiento más sensible, encontrando valores de hasta en los tratamientos que lo visto en el control.

En cuanto al porque las cianotoxinas afectan al zooplancton es en cladóceros donde se ha visto el mecanismo de acción, observándose que afectan directamente el canal alimenticio, además, es mencionado que concentraciones altas no podrían manejarlas, ya que estas afectan la unión intercelular del conducto alimenticio (Chen *et al.*, 2005; Rohrlack, 2005). Los daños en el canal alimenticio provocan una entrada directamente al torrente, afectando a todo el cuerpo rápidamente. Otro de los efectos es el daño que tiene las cianotoxinas es en las proteínas fosfatasa 1 y 2A (MacKintosh *et al.*, 1990), aunque también se ha encontrado que afecta la unidad beta de la ATP sintetasa afectando el suministro de energía a las células (Mikhailov *et al.*, 2003). Aunque uno de los efectos más generales que tienen estos metabolitos secundarios es a través de la provocación de estrés oxidativo (Wiegand y Pflugmacher, 2005). También se menciona que el daño podría ser menor en organismos que naturalmente cohabitan con cianobacterias (Gustafsson y Hansson, 2004).

En general, el extracto crudo tuvo un efecto en ambas especies y en las dos temporadas utilizadas, sin embargo, hay un cambio en el efecto del extracto crudo del mes de enero y el de septiembre debido a las cianobacterias que conforman el florecimiento, siendo esto mencionado por varios autores (Carmichael, 1990;

Okumura *et al.*, 2007; Barrios *et al.*, 2017). Se ha demostrado que diferentes especies de cianobacterias tienen un efecto y toxicidad diferente sobre la respuesta demográfica del zooplancton (DeMott *et al.*, 1991; Claska y Gilbert, 1998; Okumura *et al.*, 2007). Esta respuesta diferente se debe principalmente a que cada género puede producir metabolitos secundarios (Carmichael, 1990). Como es el caso de *W. naegeliana* que tuvo dominancia en la muestra de septiembre, esta cianobacteria ha sido reportada como productora de una microcistina con una composición diferente que es incluso más tóxica que la producida por *M. aeruginosa* (Bober y Bialczyk, 2017). Esto da explicación a por qué la toxicidad fue tan diferente, por la presencia de esta cianobacteria. Además, no todas las cianobacterias son capaces de producir microcistinas, ya que es necesario un determinado gen para generarlas (Rouhiainen *et al.*, 2004). Como *M. wesenbergii* la cual fue dominante en enero y que ha sido reportada como no productora de cianotoxina (Ramírez-García *et al.*, 2002). Diferentes cianobacterias se han reportado como dominantes en diferentes épocas del año en Valle de Bravo, debido a las diferencias en las condiciones ambientales presentes a lo largo del año por lo que es importante el monitoreo constante de la toxicidad.

Aunque, gran parte del zooplancton son organismos con preferencia por la alimentación con algas verdes (como lo son *B. calyciflorus* y *D. pulex*), hay reportes donde al haber baja densidad de este tipo de alimento consumen cianobacterias. Por lo que saber el efecto que tienen las cianobacterias sobre el zooplancton es importante, ya que aparte de la producción de metabolitos secundarios tóxicos tienen otras características que afectan a esta comunidad (Ger *et al.*, 2014): bajo valor nutricional (Sperfeld y Wacker, 2009; Wacker y Martin-Creuzburg, 2012), formación de mucílago y de grandes colonias o filamentos (Ferrão-Filho *et al.*, 2003; Pires *et al.*, 2011; Bednarska y Slusarczyk, 2013; Liang *et al.*, 2017).

10. Conclusiones.

- El florecimiento de cianobacterias de la presa Valle de Bravo es tóxico para las especies de zooplancton utilizadas en este estudio, cambiando su toxicidad dependiendo de la época del año.
- La concentración de microcistinas presentes en el extracto crudo de cianobacterias cambió con relación a cuál cianobacteria era dominante en esa época del año.
- El extracto crudo de cianobacterias tuvo un efecto negativo en la supervivencia y reproducción de *B. calyciflorus* y *D. pulex*.
- La tasa de crecimiento de *D. pulex* fue la que fue más sensible a la presencia del extracto crudo de cianobacterias, esto viéndose en las dos pruebas de toxicidad crónica que se utilizaron.
- La temperatura modificó el efecto que tuvo el extracto crudo, el incremento en la temperatura intensificó el efecto del extracto crudo sobre las especies de zooplancton utilizadas.
- El efecto provocado fue diferente dependiendo de la época en la cual fue recolectada la muestra, debido al cambio en la conformación del florecimiento de cianobacterias ya que diferentes géneros pueden producir distintos tipos de cianotoxinas u otros metabolitos secundarios.

11. Literatura citada.

- Agrawal M., Bagchi D. & Bagchi S. (2001). Acute inhibition of protease and suppression of growth in zooplankter, *Moina macrocopa*, by *Microcystis* blooms collected in Central India. *Hydrobiologia*, 464: 37-44.
- Alillo-Sánchez J.L., Gaytán-Herrera M.L., Martínez-Almeida V.M. & Ramírez-García P., (2014). Microcystin-LR equivalents and their correlation with *Anabaena spp.* (*Dolichospermum spp.*) in the main reservoir of a hydraulic system of Central Mexico. *Inland Waters*, 4: 327-336.
- Alva-Martínez, A. F., Fernández, R., Sarma, S. S. S., & Nandini, S. (2009). Effect of mixed toxic diets (*Microcystis* and *Chlorella*) on the rotifers *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus havanaensis* cultured alone and together. *Limnologica-Ecology and Management of Inland Waters*, 39(4): 302-305.
- Alva-Martínez, A. F., Sarma, S. S. S., & Nandini, S. (2001). Comparative population dynamics of three species of cladocera in relation to different levels of *Chlorella vulgaris* and *Microcystis aeruginosa*. *Crustaceana*, 74(8), 749-764.
- 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, 1197.
- Arzate-Cárdenas, M. A., Olvera-Ramírez, R., & Martínez-Jerónimo, F. (2010). Microcystis toxigenic strains in urban lakes: a case of study in Mexico City. *Ecotoxicology*, 19(6): 1157-1165.
- Ashforth, D., & Yan, N. D. (2008). The interactive effects of calcium concentration and temperature on the survival and reproduction of *Daphnia pulex* at high and low food concentrations. *Limnology and Oceanography*, 53(2): 420-432.
- Barrios C., S. Nandini & S. S. S. Sarma. (2015). Effect of crude extracts of *Dolichospermum planctonicum* on the demography of *Platonus patulus* (Rotifera) and *Ceriodaphnia cornuta* (Cladocera). *Ecotoxicology*, 24:85-93.

- Barrios, C. A. Z., Nandini, S., & Sarma, S. S. S. (2017). Effect of crude extracts from cyanobacterial blooms in Lake Texcoco (Mexico) on the population growth of *Brachionus calyciflorus* (Rotifera). *Toxicon*, 139: 45-53.
- Bartram J., Carmichael W.W., Chorus I., Jones G. & Skulberg O.M. (1999). Introduction. In: Chorus I, Bartram J (eds) Toxic cyanobacteria in water— A guide to their public health consequences, monitoring and management. E & FN Spon, London, 1-13.
- Bednarska, A., & Slusarczyk, M. (2013). Effect of non-toxic, filamentous cyanobacteria on egg abortion in *Daphnia* under various thermal conditions. *Hydrobiologia*, 715 (1): 151-157.
- Bednarska, A., Joanna, Ł. O. Ś., & Dawidowicz, P. (2011). Temperature-dependent effect of filamentous cyanobacteria on *Daphnia magna* life history traits. *Journal of Limnology*, 70(2): 353-358.
- Berry P. & Lind O. (2010). First evidence of “paralytic shellfish toxins” and cylindrospermopsin in Mexican freshwater system, Lago Cuemanco, and bioaccumulation of toxins in “tegololo” snails (*Pomacea patula caremacensis*). *Toxicon*, 55: 930-938.
- Berry, J. P., & Lind, O. (2010). First evidence of “paralytic shellfish toxins” and cylindrospermopsin in a Mexican freshwater system, Lago Catemaco, and apparent bioaccumulation of the toxins in “teogolo” snails (*Pomacea patula catemacensis*). *Toxicon*, 55(5), 930-938.
- Bober, B., & Bialczyk, J. (2017). Determination of the toxicity of the freshwater cyanobacterium *Woronichinia naegeliana* (Unger) Elenkin. *Journal of applied phycology*, 29(3), 1355-1362.
- Borowitzka, M. A. & L. J. Borowitzka. (1988). *Micro-algal Biotechnology*. Cambridge University Press, London.
- Briand J., Jacquet, S. & Humbert, J. (2003) Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. *Vertebrate Research*, 34: 361-377.

- Camargo J.A & A. Alonso. (2007). Contaminación por nitrógeno inorgánico en los ecosistemas acuáticos: problemas medioambientales, criterios de calidad de agua e implicaciones del cambio climático. *Ecosistemas*, 16: 98-110.
- Carmichael WW, Mahmood NA & Hyde EG (1990) Natural toxins from cyanobacteria (blue-green algae). In: Hall S, Strichartz G (eds) *Marine toxins, origin, structure and Molecular pharmacology*, vol 418. American Chemical Society, Washington DC, pp 87-106.
- Carmichael, W. W. (1992). Cyanobacteria secondary metabolites—the cyanotoxins. *Journal of Applied Microbiology*, 72(6): 445-459.
- Carmichel WW. (2001) Health effects of toxin-producing cyanobacteria: “The CyanoHABS”. *Hum. Ecol. Risk Assess*, 7:1393-1407.
- Chen, W., Song, L., Ou, D., & Gan, N. (2005). Chronic toxicity and responses of several important enzymes in *Daphnia magna* on exposure to sublethal microcystin-LR. *Environmental toxicology*, 20(3): 323-330.
- Claska M. & Gilbert J. (1998). The effect of temperature on the response of *Daphnia* to toxic cyanobacteria. *Freshwater Biology*, 39: 221-232.
- Codd GA., Morrison LF. & Metcalf JS. (2005) Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicol. Appl. Pharm*, 203: 264-272.
- CONAGUA (Comisión Nacional del Agua). (2005). *Sistema Cutzamala: Agua para millones de mexicanos*.
- Dao, T. S., Do-Hong, L. C., & Wiegand, C. (2010). Chronic effects of cyanobacterial toxins on *Daphnia magna* and their offspring. *Toxicon*, 55(7): 1244-1254.
- Dawson, R. M. (1998). The toxicology of microcystins. *Toxicon*, 36(7): 953-962.
- DeMott W., Qing-Xue Z. & Carmichael W. (1991). Effects of toxic cyanobacteria and purified toxins on the survival and feeding of a copepod and three species of *Daphnia*. *Limnol. Oceanogr*, 36 (7): 1346-1357.

- El Khalloufi F., El Ghazali I., Sqrane S., Oufdou K., Vasconcelos V. & Oudra B. (2012). Phytotoxic effects of a natural bloom extract containing microcystins on *Lycopersicon esculentum*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 79: 199-205.
- Enríquez-García C., Nandini S. & Sarma S.S.S. (2009). Seasonal dynamics of zooplankton in Lake Huetzalin, Xochimilco (Mexico City, Mexico). *Limnologica*. 39(4): 283-291.
- Feder, M. E., & G. E. Hofmann. (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol*, 61: 243-282.
- Ferrão -Filho, A. S., Azevedo, S. M., & DeMott, W. R. (2000). Effects of toxic and non-toxic cyanobacteria on the life history of tropical and temperate cladocerans. *Freshwater Biology*, 45(1): 1-19.
- Ferrão-Filho A. & Azevedo S. (2003). Effects of unicellular and colonial forms of toxic *Microcystis aeruginosa* from laboratory cultures and natural populations on tropical cladocerans. *Aquatic Ecology*. 37: 23-25.
- Figueroa-Sánchez M., S. Nandini & S.S.S. Sarma. (2014). Zooplankton community structure in the presence of low levels of cyanotoxins: a case study in a high altitude tropical reservoir (Valle de Bravo, Mexico). *J. Limnol.*, 73(1): 157-166
- García-García G., Picazo-Paez E. A., Nandini S. & Sarma S.S.S. (2007). Combined effects of sediment and lead (PbCl₂) on the demography of *Brachionus patulus* (Rotifera: Brachionidae). *Hydrobiologia*, 539: 209-218.
- Gaytan-Herrera M. L., Martinez-Almeida V., Oliva-Martinez M. G., Duran-Díaz A. & Ramírez-García P., (2011) Temporal variation of phytoplankton from the tropical reservoir Valle de Bravo, Mexico. *J. Environ. Biol*, 32: 117-116.
- Gélinas, M., Fortier, M., Lajeunesse, A., Fournier, M., Gagnon, C., Barnabé, S., & Gagné, F. (2014). Responses of freshwater mussel (*Elliptio complanata*) hemocytes exposed in vitro to crude extracts of *Microcystis aeruginosa* and *Lyngbya wollei*. *Ecotoxicology*, 23(2): 260-266.

- Ger, K. A., Hansson, L. A., & Lüring, M. (2014). Understanding cyanobacteria-zooplankton interactions in a more eutrophic world. *Freshwater Biology*, 59(9): 1783-1798.
- Gilbert J. & Durand M. (1990) Effect of *Anabaena flos-aquae* on the abilities of *Daphnia* and *Keratella* to feed and reproduce on unicellular algae. *Freshwater Biology*, 24: 577-596.
- Gilbert J. (1996). Effect of the temperature on the response of planktonic rotifers to a toxic cyanobacterium. *Ecology*, 77: 1174-1180.
- Goss L.B. & Bunting D.L. (1980) Temperature effects on zooplankton respiration. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 66A: 651-658.
- Goss L.B. & Bunting D.L. (1983) *Daphnia* development and reproduction: responses to temperature. *Journal of Thermal Biology*, 8: 375-380.
- Gustafsson, S., & Hansson, L. A. (2004). Development of tolerance against toxic cyanobacteria in *Daphnia*. *Aquatic ecology*, 38(1): 37-44.
- Harke, M. J., Steffen, M. M., Gobler, C. J., Otten, T. G., Wilhelm, S. W., Wood, S. A., & Paerl, H. W. (2016). A review of the global ecology, genomics, and biogeography of the toxic cyanobacterium, *Microcystis* spp. *Harmful Algae*, 54: 4-20.
- Heinle D. (1969). Temperature and Zooplankton. *Chesapeake Science*, 10: 186-209.
- Heinze R. (1996). A biotest for hepatotoxins using primary rat hepatocytes. *Phycologia*, 35: 89-93
- Hessen, D. O., Alstad, N. E., & Skardal, L. (2000). Calcium limitation in *Daphnia magna*. *Journal of Plankton Research*, 22(3), 553-568.
- Hietala, J., Laurén-Määttä, C., & Walls, M. (1997). Sensitivity of *Daphnia* to toxic cyanobacteria: effects of genotype and temperature. *Freshwater Biology*, 37(2): 299-306.
- Hutchinson, G. E. (1967). *A Treatise on Limnology: Introduction to Lake Biology and the Limnoplakton*. John Wiley.
- Jeppesen E., Sondergaard M., Kauridsen T.L., Kronvang B., Beklioglu M., Lammens E.,

Jensen H.S., Kohler J., Ventala A.M., Tarvainen M. & Tátrai I. (2007). Danish and other European experiences in managing shallow lakes. *Lake Reserv. Manage*, 236: 439-451.

Jeppesen, E, Moss B, Bennion H, Carvalho L, De Meester L, Feuchtmayr H, Friberg N, Gessner MO, Heffting M & Lauridsen TL. (2010). Interaction of climate change and eutrophication. En: Kernan M, Battarbee RW, Moss B, editors. *Climate change impacts on freshwater ecosystems*. Chichester (UK): Wiley-Blackwell. 119-151.

Jeppesen, E., Kronvang, B., Olesen, J. E., Audet, J., Søndergaard, M., Hoffmann, Carl C., Andersen H., Lauridsen T., Liboriussen L., Larsen S., Beklioglu, M., Meerhoff M. & Özen A., Özkan K. (2011). Climate change effects on nitrogen loading from cultivated catchments in Europe: implications for nitrogen retention, ecological state of lakes and adaptation. *Hydrobiologia*, 663(1): 1-21.

Jiang, Y., Ji, B., Wong, R. N. S., & Wong, M. H. (2008). Statistical study on the effects of environmental factors on the growth and microcystins production of bloom-forming cyanobacterium—*Microcystis aeruginosa*. *Harmful algae*, 7(2): 127-136.

Kauler, P., & Enesco, H. E. (2011). The effect of temperature on life history parameters and cost of reproduction in the rotifer *Brachionus calyciflorus*. *Journal of Freshwater Ecology*, 26(3): 399-408.

Koivistio S. (1995). Is *Daphnia magna* an ecological representative zooplankton species in toxicity tests? *Environ Pollut*, 90: 263-267.

Komárek J. (2003). Capítulo 3: Coccoid and colonial cyanobacteria. En Wehr, J. D., Sheath, R. G. (Eds.) *Freshwater Algae of North America: ecology and classification*. Academic Press. San Diego, California.

Kosten S., Huszar V., Bécares E., Costa L., Donk E., Hansson L., Jeppesen E., Kruk C., Lacerot G., Mazzeo N., Meester L., Moss B., Lürling M., Nöges T., Romo S. & Scheffer M. (2012) Warmer climates boost cyanobacterial dominance in shallow lakes. *Global Change Biology*, 18: 118-126.

- Krebs C. J. (1985). Ecology: The Experimental Analysis of Distribution and Abundance. 3rd edition. Harper and Row, New York.
- Liang, Y., Ouyang, K., Chen, X., Su, Y., & Yang, J. (2017). Life strategy and grazing intensity responses of *Brachionus calyciflorus* fed on different concentrations of microcystin-producing and microcystin-free *Microcystis aeruginosa*. Scientific Reports, 7: 43127.
- Lin, Q., Sarma, S. S. S., & Han, B. P. (2014). Effect of cyanobacterium on competition between rotifers: a population growth study. Inland Waters, 4(3): 319-326.
- Lopes, V. R., Fernández, N., Martins, R. F., & Vasconcelos, V. (2010). Primary screening of the bioactivity of brackishwater cyanobacteria: Toxicity of crude extracts to *Artemia salina* larvae and *Paracentrotus lividus* embryos. Marine drugs, 8(3): 471-482.
- MacArthur R.H. (1972). Geographical ecology: Patterns in the distribution of species. New York: Harper & Row.
- Mackintosh, C., Beatie, K.A., Klumpp, S., Cohen, P. & Codd, G.A., (1990). Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. FEBS Letters, 264: 187-192.
- Mankiewicz-Boczek J., Jadwiga P., Gagała I., Izydorczyk K., Jurczak T., Dziubałtowska E., Stepnik M., Arkusz J., Komorowska M., Skowron A. & Zalewski M. (2011). Effects of microcystins-containing cyanobacteria from a temperate ecosystem on human lymphocytes culture and their potential for adverse human health effects. Harmful Algae, 11: 356-365.
- McGorum, B. C., Pirie, R. S., Glendinning, L., McLachlan, G., Metcalf, J. S., Banack, S. A., Cox P. A & Codd, G. A. (2015). Grazing livestock are exposed to terrestrial cyanobacteria. Veterinary research, 46(1): 16.
- Mckee, D., & D. Ebert. (1996). The effect of temperature on maturation threshold body-length in *Daphnia magna*. Oecologia, 108: 627-630.

- Mikhailov, A., Harmala-Brasken, A.S., Hellman, J., Merilouto, J.A.O. & Eriksson, J.E. (2003). Identification of ATP-synthetase as a novel intracellular target for microcystin-LR. *Chemico-Biological Interactions*, 142: 223-237.
- Moore M., Folt, C.L. & Stemberger R. (1996). Consequences of elevated temperatures for zooplankton assemblages in temperature lakes. *Archiv fur hydrobiologia*, 135: 289-319.
- Moss, B., Kosten, S., Meerhoff, M., Battarbee, R. W., Jeppesen, E., Mazzeo, N., Havens K., Lacerot G., Liu Z., De Mester L., Paerl, H. & Scheffer M. (2011). Allied attack: climate change and eutrophication. *Inland waters*, 1(2): 101-105.
- Nandini, S. & Rao TR. (1998). Somatic and population growth in selected cladoceran and rotifer species offered the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* as food, *Aquatic Ecology* 31: 283-298.
- Nandini, S., Miracle, M. R., Vicente, E., Sarma, S. S. S., & Gulati, R. D. (2017). *Microcystis* extracts and single cells have differential impacts on the demography of cladocerans: a case study on *Moina* cf. *micrura* isolated from the Mediterranean coastal shallow lake (L'Albufera, Spain). *Hydrobiologia*, 798(1), 127-139.
- Nandini, S., S. S. S. Sarma & P. Ramírez-García, (2000). Life table demography and population growth of *Daphnia laevis* (Cladocera) under different densities of *Chlorella vulgaris* and *Microcystis aeruginosa*. *Crustaceana*, 73: 1273-1286.
- Okumura D., Sotero-Santos R., Takenaka R. & Rocha O. (2007). Evaluation of cyanobacteria toxicity in tropical reservoirs using crude extracts bioassay with cladocerans. *Ecotoxicology*, 16: 263-270.
- Olvera V. V. (1990). Estudio de la eutroficación del embalse de Valle de Brazo, México. M. Sc. Dissertation. Faculty of Science, UNAM, México city. 87pp.
- Olvera-Ramírez R., Centeno-Ramos C. & Martínez-Jerónimo F. (2010). Toxic effects of *Pseudanabaena tenuis* (Cyanobacteria) on the cladocerans *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia*. *Hidrobiológica*, 20 (3): 203-210.

- Olvera-Viascán V., Bravo-Inclán L. & Sánchez-Chávez J. (1998). Aquatic ecology and management assessment in Valle de Bravo reservoir and its watershed. *Aquatic Ecosystem Health & Management*, 1(3-4): 277-290.
- Paerl H. & Huisman J. (2008). Blooms like it hot. *Science*, 320: 57-58.
- Paerl H. & Huisman J. (2009). Climate change: a catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. *Environmental Microbiology Reports*, 1 (1): 27-37.
- Palíková, M., Krejčí, R., Hilscherová, K., Babica, P., Navrátil, S., Kopp, R., & Bláha, L. (2007). Effect of different cyanobacterial biomasses and their fractions with variable microcystin content on embryonal development of carp (*Cyprinus carpio L.*). *Aquatic Toxicology*, 81(3): 312-318.
- Pietsch C., Wiegand C., Áme V., Nicklish A., Wunderlin D. & Pflugmacher S. (2001). The effects of cyanobacterial crude extract on different aquatic organisms: evidence for cyanobacterial toxin modulating factors. *Environ Toxicol*, 16: 535-542.
- Pires, L. M. D., Sarpe, D., Brehm, M., & Ibelings, B. W. (2011). Potential synergistic effects of microcystins and bacterial lipopolysaccharides on life history traits of *Daphnia galeata* raised on low and high food levels. *Aquatic toxicology*, 104(3-4): 230-242.
- Ramírez-García, P., Nandini, S., Sarma, S.S.S., Robles-Valderrama, E., Cuesta, I. & Hurtado, M.D., (2002). Seasonal variation of zooplankton abundance in the freshwater reservoir Valle de Bravo (Mexico). *Hydrobiologia*, 467: 99-108.
- Ramírez-Zierold, J. A., Merino-Ibarra, M., Monroy-Ríos, E., Olson, M., Castillo, F. S., Gallegos, M. E., & Vilaclara, G. (2010). Changing water, phosphorus and nitrogen budgets for Valle de Bravo reservoir, water supply for Mexico City Metropolitan Area. *Lake and Reservoir Management*, 26(1): 23-34.
- Rao TR, Sarma SSS. (1986). Demographic parameters of *Brachionus patulus* Muller (Rotifera) exposed to sublethal DDT concentrations at low and high food levels. *Hydrobiologia*, 139: 193-200.

- Rohrlack, T., Christoffersen, K., Dittmann, E., Nogueira, I., Vasconcelos, V., & Börner, T. (2005). Ingestion of microcystins by *Daphnia*: intestinal uptake and toxic effects. *Limnology and oceanography*, 50(2): 440-448.
- Rohrlack, T., M. Henning & J. G. Kohl. (1999). Mechanisms of the inhibitory effect of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on *Daphnia galeata*'s ingestion rate. *Journ. Plankton Res.*, 21: 1489-1500.
- Rouhiainen, L., Vakkilainen, T., Siemer, B. L., Buikema, W., Haselkorn, R., & Sivonen, K. (2004). Genes coding for hepatotoxic heptapeptides (microcystins) in the cyanobacterium *Anabaena* strain 90. *Applied and environmental microbiology*, 70(2): 686-692.
- Sarma S.S.S. & Nandini S. (2006). Review of recent ecotoxicological studies on cladocerans. *J Environ Sci Health B*, 41: 1417-1430.
- Sarma S.S.S., Nandini S. & Gulati R.D. (2005). Life history strategies of cladocerans: comparisons of tropical and temperate taxa. *Hydrobiologia*. 542: 315-333.
- Snell TW & Janssen CR. (1995). Rotifers in ecotoxicology. *Hydrobiologia*, 313/314: 231-247
- Soares, M. C. S., Lüring, M., & Huszar, V. L. (2010). Responses of the rotifer *Brachionus calyciflorus* to two tropical toxic cyanobacteria (*Cylindrospermopsis raciborskii* and *Microcystis aeruginosa*) in pure and mixed diets with green algae. *Journal of Plankton Research*, 32(7): 999-1008.
- Sotero-Santos R., Carvalho E., Dellamano-Oliveira M. & Rocha O. (2008). Occurrence and toxicity of an *Anabaena* bloom in a tropical reservoir (Southeast Brazil). *Harmful Algae*, 7: 590-598.
- Sotero-Santos R., Silva C., Verani N., Nonaka K. & Rocha O. (2006). Toxicity of a cyanobacteria bloom in Barra Bonita Reservoir (Middle Tiete River, São Paulo, Brazil). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64: 163-170.

- Sperfeld, E., & Wacker, A. (2009). Effects of temperature and dietary sterol availability on growth and cholesterol allocation of the aquatic keystone species *Daphnia*. *Journal of Experimental Biology*, 212(19): 3051-3059.
- Svirčev, Z., Drobac, D., Tokodi, N., Mijović, B., Codd, G. A., & Meriluoto, J. (2017). Toxicology of microcystins with reference to cases of human intoxications and epidemiological investigations of exposures to cyanobacteria and cyanotoxins. *Archives of toxicology*, 91(2): 621-650.
- Tessier, A. J., L. L. Henry, & C. E. Goulden. (1983). Starvation in *Daphnia*: Energy reserves and reproductive allocation. *Limnol. Oceanogr*, 28: 667-676.
- Thorp J.H. & Covich A.P. (2001). Ecology and classification of North American freshwater invertebrates, 2nd edn. Academic Press. San Diego, California.
- Vasconcelos V., Martins A., Vale M., Antunes A., Azevedo J., Welker M., Lopez O. & Montejano G. (2010). First report on the occurrence of microcystins in planktonic cyanobacteria from Central Mexico. *Toxicon*, 56: 425-431.
- Vela L., Sevilla E., Matín B., Pellicer S., Bes T., Fillat M. & Peleato L. (2007). Las Microcistinas. *Rec. Real Academia de Ciencias. Zaragoza. Facultad de ciencias, Universidad de Zaragoza*, 62: 135-146.
- Vishwakarma R. (2013). Inhibitory microbial activity and GC-MS based metabolite profile of the halophilic cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. *Algological Studies*, 141: 73-91
- Wacker, A., & Martin-Creuzburg, D. (2012). Biochemical nutrient requirements of the rotifer *Brachionus calyciflorus*: co-limitation by sterols and amino acids. *Functional Ecology*, 26(5): 1135-1143.
- Watson S.B., McCauley E. & Downing J.A. (1997). Patterns in phytoplankton taxonomic composition across temperate lakes of differing nutrients status. *Limnology and Oceanography*, 42: 487-495.

- 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.
- Wiegand, C. & Pflugmacher, S., (2005). Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 203: 201-218.
- World Health Organization (WHO). (1998). Guidelines for drinking-water quality, 2nd ed. Addendum to Vol. 2. Health criteria and other supporting information. World Health Organization, Geneva.
- Xiang, X. L., Chen, Y. Y., Xu, Q. L., Zhu, L. Y., Wen, X. L., & Xi, Y. L. (2017). Combined Effects of Temperature and the Microcystin MC-LR on the Feeding Behavior of the Rotifer *Brachionus calyciflorus*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 99(4): 493-499.
- Yang, Z., Lü, K., Chen, Y., & Montagnes, D. J. (2012). The interactive effects of ammonia and microcystin on life-history traits of the cladoceran *Daphnia magna*: synergistic or antagonistic? *PLoS One*, 7(3): e32285.
- Yi-Long, X., & Xiangfei, H. (2004). Temperature effect on the life history of three types of *Brachionus calyciflorus* females. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 22(2): 192-197.
- You, J., Mallery, K., Hong, J., & Hondzo, M. (2017). Temperature effects on growth and buoyancy of *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Plankton Research*, 40(1): 16-28.
- Zhang, X., & Geng, H. (2012). Effect of *Microcystis aeruginosa* on the rotifer *Brachionus calyciflorus* at different temperatures. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 88(1): 20-24.