



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

**Efecto de la temperatura sobre la fisiología y la demografía de
Simocephalus vetulus en presencia de extractos crudos del
floreCIMIENTO de *Microcystis aeruginosa* de la Pista olímpica de remo
y canotaje “Virgilio Uribe”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

(LIMNOLOGÍA)

PRESENTA:

David Alejandro Araiza Vázquez

TUTORA PRINCIPAL:

Dra. Nandini Sarma
Facultad de Estudios Superiores Iztacala

COMITÉ TUTOR:

Dr. Hugo Virgilio Perales Vela
Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Dr. Roberto Rico Martínez
Universidad Autónoma de Aguascalientes

Dr. José Luis Gómez Márquez
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Dra. Patricia Bonilla Lemus
Facultad de Estudios Superiores Iztacala

CDMX, NOVIEMBRE, 2020



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.



**Efecto de la temperatura sobre la fisiología y la demografía de
Simocephalus vetulus en presencia de extractos crudos del
floreamiento de *Microcystis aeruginosa* de la Pista olímpica de remo
y canotaje “Virgilio Uribe”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

(LIMNOLOGÍA)

PRESENTA:

David Alejandro Araiza Vázquez

TUTORA PRINCIPAL:

Dra. Nandini Sarma
Facultad de Estudios Superiores Iztacala

COMITÉ TUTOR:

Dr. Hugo Virgilio Perales Vela
Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Dr. Roberto Rico Martínez
Universidad Autónoma de Aguascalientes

Dr. José Luis Gómez Márquez
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Dra. Patricia Bonilla Lemus
Facultad de Estudios Superiores Iztacala

MÉXICO, CDMX, NOVIEMBRE, 2020

A mi Madre

Por ser la mujer que simplemente me hace llenar de orgullo, te amo y no va a haber manera de devolvarte tanto que me has ofrecido desde que incluso no hubiera nacido. Esta tesis es un logro más que llevo a cabo, y sin lugar a duda ha sido en gran parte gracias a ti; no sé en dónde me encontraría de no ser por tu ayuda, tu compañía, y tu amor. Te doy mis sinceras gracias, amada madre.

A Kary

Por entenderme en todo, gracias a ti porque en todo momento fuiste un apoyo incondicional en mi vida, fuiste la felicidad encajada en una sola persona, mi todo reflejado en la persona a la cual yo amo demasiado, y por la cual estoy dispuesto a enfrentar todo y en todo momento. Este mismo furor y pasión con la que describo el perfecto e incondicional apoyo de mi pareja, fue el mismo con el que desarrollé cada parte y punto de esta tesis, y por esto mismo puedo afirmar y pronosticar su éxito y agrado para cada uno de sus lectores. Mis sinceras gracias, Kary, nunca podré terminar de agradecerte por tanta ayuda. TE AMO.

A mi Familia

Gracias por apoyarme en cada decisión y proyecto, gracias porque cada día me demuestran lo hermosa que es la vida y lo justa que puede llegar a ser; gracias a mi familia por permitirme cumplir con excelencia el desarrollo de esta tesis. Gracias por creer en mí y gracias a Dios por permitirme vivir y disfrutar de cada día. No ha sido sencillo el camino hasta ahora, pero gracias a sus aportes, a su amor, a su inmensa bondad y apoyo, lo complicado de lograr esta meta se ha notado menos. Les agradezco y hago presente mi gran afecto hacia ustedes, mi hermosa familia.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) Por otorgarme todo lo necesario y la oportunidad para mi formación como profesionista de este país.

Al Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, por la oportunidad de estudiar un posgrado (maestría) dentro de su jurisdicción y poder desarrollar un trabajo de investigación completo y de calidad. Agradezco a las coordinadoras encargadas del posgrado durante mi estancia en la maestría. Dra. Cecilia Vanegas Pérez y Dra. Claudia Ponce de León Hill. También agradezco al personal administrativo por el apoyo durante todo este tiempo (M. en C. Diana Juárez Bustos, Biol. Yazmín Valenzuela Velázquez, Guadalupe Godoy Medina y Gabriela Almaraz Mejía).

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

A mis asesores, la Dra. Paty Bonilla, el Dr. Hugo Virgilio Perales Vela, el Dr. Roberto Rico Martínez, Dr. José Luis Gómez Márquez, por su tiempo y dedicación para poder pulir este trabajo, con sus observaciones, comentarios y sugerencias. Por sus disponibilidad y esfuerzo para poder estar a tiempo en los procesos de evaluación, revisiones necesarias para cumplir todo lo requerido por parte del posgrado.

Al Dr. S.S.S. Sarma, por sus múltiples sugerencias con el fin de mejorar la calidad del trabajo en cada exposición que se llevaba a cabo en el laboratorio y por el apoyo por

parte de su laboratorio que brindo recursos necesarios a la hora de realizar algunas secciones de este trabajo.

Al Dr. Macelo Silva Briano, quien presto parte de su tiempo para ayudar a la identificación y confirmación de la especie de cladóceros utilizada en este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por proporcionar la beca escolar (724379), apoyo económico que fue fundamental para la realización de todo este trabajo y a los proyectos de PAPIIT (UNAM): IN219218 y IG200820

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

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

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

Al M. en C. Cesar Alejandro Zamora Barrios, por su ayuda y asesoría a lo largo de la realización del trabajo y mis estudios de maestría. De igual forma a cada uno de mis compañeros del laboratorio Zoología Acuática 1 y 2 por el apoyo que me brindaron.

Índice General

RESUMEN	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
ANTECEDENTES.....	14
JUSTIFICACIÓN.....	20
HIPÓTESIS.....	24
OBJETIVOS.....	25
V.I. OBJETIVO GENERAL	25
V.II. OBJETIVO PARTICULAR.....	25
ÁREA DE ESTUDIO.....	26
MATERIALES Y MÉTODOS	27
8.1. Preparación del material biológico.....	27
8.2. Identificación y preparación de extractos crudos de cianobacterias y células individuales	28
8.3. Cuantificación de equivalentes de microcistinas.....	29
8.4. Experimentos de toxicidad aguda	29
8.4.1. Concentración letal media (CL ₅₀)	29
8.4.2. Concentración efectiva media (CE ₅₀)	30
8.5. Experimentos de toxicidad crónica	32
8.5.1. Crecimiento poblacional	32
8.5.2. Tabla de vida.....	33
8.6. Medición de los organismos	37
8.7. Análisis estadísticos.....	38
RESULTADOS	39
9.1. Identificación y cuantificación de cianobacterias.....	39
9.2. Concentración de equivalentes de microcistinas	40

9.3. Experimentos de toxicidad aguda	41
9.3.1. Concentración letal media (CL50)	41
9.3.2. Palpitaciones del corazón	43
9.3.3. Concentración efectiva media (CE50)	
9.4. Experimentos de toxicidad crónica (Células de <i>M. aeruginosa</i>)	47
9.4.1. Supervivencia (lx), Fecundidad (mx) y Densidad poblacional	47
9.4.1. Parámetros demográficos (tabla de vida y crecimiento poblacional)	48
9.5. Experimentos de toxicidad crónica (Extracto crudo y temperatura)	52
9.5.1. Supervivencia (lx) y Fecundidad (mx)	52
9.5.2. Edad de la primera reproducción	57
9.5.3. Parámetros demográficos (tabla de vida)	58
9.5.4. Parámetros demográficos (crecimiento poblacional)	63
9.5.5. Inicio del crecimiento poblacional.....	66
9.6. Mediciones de los organismos	67
DISCUSIÓN	71
CONCLUSIONES	85
LITERATURA CITADA	86

Índice de Figuras

- Figura 1.** Porcentaje de trabajos relacionados con cianotoxinas, extractos crudos, microcistinas, temperatura y zooplancton temperatura. A nivel internacional y nacional **21**
- Figura 2.** Ubicación geográfica de la pista olímpica de remo y canotaje “Virgilio Uribe”**26**
- Figura 3.** Diseño de los ensayos para obtener la concentración letal media (CL₅₀) con diferentes porcentajes del extracto crudo de *M. aeruginosa*, evaluado a 18 y 25°C. Cuatro tratamientos + control. Cinco repeticiones x tratamiento.....**30**
- Figura 4.** Diseño del ensayo de concentración efectiva media (CE₅₀) con diferentes porcentajes del extracto crudo de *M. aeruginosa*, evaluado a 18 y 25°C. Cuatro tratamientos + control. Cinco repeticiones por tratamiento **31**
- Figura 5.** Diseño experimental de las pruebas de toxicidad crónica (tabla de vida y crecimiento poblacional) con extracto crudo de *M. aeruginosa*, evaluadas a 18°C. Dos tratamientos + control. Cinco repeticiones por tratamiento.**36**
- Figura 6.** Diseño experimental de las pruebas de toxicidad crónica (tabla de vida y crecimiento poblacional) con extracto crudo y células individuales de *M. aeruginosa*, evaluadas a 25°C. Dos tratamientos + control. Cinco repeticiones por tratamiento **36**
- Figura 7.** Puntos de medición de *S. vetulus*: ancho del cuerpo, largo del cuerpo, largo del intestino.....**37**
- Figura 8.** *Microcystis aeruginosa* Colonias (A), delimitación del mucilago (B) y células individuales (C)**39**
- Figura 9.** Representación gráfica de las unidades Probit, contra el logaritmo de la concentración de equivalentes de microcistinas contenidas en el extracto crudo, utilizados para obtener el valor de la concentración letal media (CL₅₀) en *S. vetulus*. 18°C y 25°C. Mediante una regresión lineal. C.V: Coeficiente de variación. Once tratamientos. Cinco repeticiones por tratamiento**42**
- Figura 10.** Representación gráfica a 18 y 25°C de las palpitations cardíacas de *S. vetulus* con relación al tiempo de exposición y a la concentración de

equivalentes de microcistinas. Media obtenida de diez repeticiones \pm error estándar. Letras representan diferencias significativas entre tratamientos (Tukey).44

Figura 11. Representación gráfica de la concentración efectiva media a diferentes tiempos con respecto a los porcentajes de extracto crudo y a la variación de las palpitations cardíacas en *S. vetulus* a una temperatura de 18° y 25°C. Obtenido de cuatro tratamientos. Cinco repeticiones por tratamiento. .. 46

Figura 12. Supervivencia (lx), Fecundidad (mx) y Densidad poblacional de *Simocephalus vetulus* con células individuales de *M. aeruginosa* como dieta. Media obtenida de cinco repeticiones \pm error estándar.48

Figura 13. Variables demográficas de *S. vetulus* con células individuales de *M. aeruginosa*. Media obtenida de cinco repeticiones \pm error estándar. Letras representan diferencias significativas entre tratamientos.....50

Figura 14. Supervivencia (lx) de *S. vetulus* en tratamientos de extracto crudo con diferentes concentraciones de equivalentes de microcistinas a 18 y 25°C. Media obtenida de cinco repeticiones \pm error estándar.54

Figura 15. Fecundidad (mx) de *S. vetulus* con diferentes concentraciones de equivalentes de microcistinas en el extracto crudo a 18 y 25°C. Media obtenida de cuatro repeticiones \pm error estándar.56

Figura 16. Días de la primera reproducción de *S. vetulus* en tratamientos con concentraciones de equivalentes de microcistinas ($\mu\text{g L}^{-1}$) a 18 y 25°C. Media obtenida de cinco repeticiones \pm error estándar. Letras representan diferencias significativas entre tratamientos (Tukey). 57

Figura 17. Variables demográficas de *S. vetulus* en tratamientos de extracto crudo a 18 y 25°C. Media obtenida de cinco repeticiones \pm error estándar. Letras representan diferencias significativas entre tratamientos..... 61

Figura 18. Crecimiento poblacional de *S. vetulus* en tratamientos de extracto crudo y células individuales de *M. aeruginosa*. Media obtenida de cinco repeticiones \pm error estándar..... 64

Figura 19. Tasa de crecimiento de *S. vetulus* en tratamientos de extracto crudo a 18 y 25°C. Media obtenida de cinco repeticiones \pm error estándar. Letras representan diferencias significativas entre tratamientos 65

Figura 20. Días del inicio del crecimiento exponencial de *S. vetulus* en tratamientos de extracto crudo a 18 y 25°C. Media obtenida de cinco

repeticiones \pm error estándar. Letras representan diferencias significativas
entre tratamientos. 66

Índice de Tablas

- Tabla 1.** Géneros de cianobacterias formadoras de florecimientos y potencialmente productoras de cianotoxinas en el mundo (Ortega, 1981) y México*(Buratti et al., 2017) **8**
- Tabla 2.** Número de los trabajos publicados en relación con cianotoxinas, extractos crudos, microcistinas, temperatura y zooplancton temperatura. A nivel internacional y nacional. (Obtenido de Web of Science, 1989-201. **21**
- Tabla 3.** Tamaño de células, de colonias y células por litro de *M. aeruginosa*.....**39**
- Tabla 4.** Concentración de los equivalentes de microcistinas en $\mu\text{g L}^{-1}$ obtenida mediante una prueba ELISA, calculada para cada tratamiento..... **40, 41**
- Tabla 5.** Análisis de varianza de tres vías (ANDEVA). Para determinar si existen diferencias significativas entre la concentración de extracto crudo y el tiempo de exposición, sobre las pulsaciones cardíacas de *S. vetulus*. Donde, DF: Grados de Libertad, SS: Suma de Cuadrados, MS: Media de cuadrados, F: Prueba de Fisher, P: Valor P.....**45**
- Tabla 6.** Análisis de varianza de una vía (ANDEVA). Para determinar si existen diferencias significativas entre el tratamiento con una dieta de *M. aeruginosa* a concentración de 0.5×10^6 cel mL^{-1} . Y el tratamiento testigo con una dieta de *Scenedesmus acutus* a concentración de 0.5×10^6 cel mL^{-1} , sobre las variables demográficas de *S. vetulus*. Donde, DF: Grados de Libertad, SS: Suma de Cuadrados, MS: Media de cuadrados, F: Prueba de Fisher, P: Valor P. **51**
- Tabla 7.** Análisis de varianza de dos vías (ANDEVA). Para determinar si existen diferencias significativas entre la concentración de equivalentes de microcistinas del extracto crudo y la temperatura de exposición, sobre la supervivencia de *S. vetulus*. Donde, DF: Grados de Libertad, SS: Suma de Cuadrados, MS: Media de cuadrados, F: Prueba de Fisher, P: Valor P. **53**
- Tabla 8.** Análisis de varianza de una vía (ANDEVA). Para determinar si existen diferencias significativas en la edad de la primera reproducción con la influencia de la temperatura (18 y 25°C) sobre el efecto del extracto crudo de *M. aeruginosa*, Donde, DF: Grados de Libertad, SS: Suma de Cuadrados, MS: Media de cuadrados, F: Prueba de Fisher, P: Valor P**58**

- Tabla 9.** Análisis de varianza de dos vías (ANDEVA). Para determinar si existen diferencias significativas de la influencia de la temperatura (18 y 25°C) sobre el efecto del extracto crudo de *M. aeruginosa*, en las variables demográficas de *S. vetulus*. Donde, DF: Grados de Libertad, SS: Suma de Cuadrados, MS: Media de cuadrados, F: Prueba de Fisher, P: Valor P..... **62, 63**
- Tabla 10.** Análisis de varianza de dos vías (ANDEVA). Para determinar si existen diferencias significativas de la influencia de la temperatura (18 y 25°C) sobre el efecto del extracto crudo de *M. aeruginosa*, en las variables demográficas de *S. vetulus*. Donde, DF: Grados de Libertad, SS: Suma de Cuadrados, MS: Media de cuadrados, F: Prueba de Fisher, P: Valor P.....**65**
- Tabla 11.** Supervivencia (lx), Fecundidad (mx) y Densidad poblacional de *S. vetulus* con células individuales de *M. aeruginosa* como dieta. Media obtenida de cinco repeticiones \pm error estándar.....**67**
- Tabla 12.** Tamaño (Largo, ancho e intestino) de adultos de *S. vetulus* antes y después de ser expuestos a diferentes concentraciones de equivalentes de microcistinas en el extracto crudo a 18 y 25°C y células individuales de *M. aeruginosa*. Media obtenida de cinco repeticiones \pm error estándar. **68**
- Tabla 13.** Tamaño (Largo, ancho e intestino) de neonatos de *S. vetulus* antes y después de ser expuestos a diferentes concentraciones de equivalentes de microcistinas en el extracto crudo a 18 t 25°C y células individuales de *M. aeruginosa*. Media obtenida de cinco repeticiones \pm error estándar. **68**
- Tabla 14.** Análisis de varianza de tres vías (ANDEVA). Para determinar si existen diferencias significativas, cuando se ofrece una dieta de *M. aeruginosa* y en influencia de la temperatura (18 y 25°C) sobre el efecto del extracto crudo de *M. aeruginosa*, en el tamaño de diferentes secciones de *S. vetulus*. Donde, DF: Grados de Libertad, SS: Suma de Cuadrados, MS: Media de cuadrados, F: Prueba de Fisher, P: Valor P.....**69, 70**

I. Resumen

El éxito de las cianobacterias depende de su capacidad de optimizar y utilizar recursos para su crecimiento. La presencia de estos organismos en el agua favorece la presencia de una gran variedad de metabolitos secundarios (cianotoxinas), los cuales pueden ser tóxicos para diferentes organismos. Por otro lado, el incremento de la temperatura en la actualidad, además de estimular crecimiento desmedido de las cianobacterias puede afectar la respuesta de organismos como los cladóceros, en la presencia de cianotoxinas, ya que la temperatura en organismos ectotérmicos tiende a modificar los procesos metabólicos y fisiológicos. El presente trabajo tiene como objetivo, evaluar el efecto de la temperatura y las microcistinas del florecimiento de *M. aeruginosa* de la pista olímpica de remo y canotaje "Virgilio Uribe", mediante extractos crudos y de células individuales sobre la fisiología y la demografía de *S. vetulus*. Para lograr esta premisa, se realizaron pruebas ecotoxicológicas a dos temperaturas diferentes (18 y 25°C). Por un lado, se realizaron pruebas agudas (CL₅₀ y CE₅₀) con el fin de conocer la respuesta de *S. vetulus* a las toxinas en cortos periodos de tiempo. Los valores de CL₅₀ fueron 2.05 µg L⁻¹ para 18°C y 1.69 µg L⁻¹ para 25°C. Para el caso de CE₅₀, se realizó en base a las mediciones de las palpaciones cardiacas del cladóceros, las cuales presentaron una disminución del 50% después de la exposición a las toxinas del extracto crudo posterior a 24 h a 25°C, y una disminución del 33% para 18°C. Con valores de CE₅₀ de 2.01 µg L⁻¹ para 18°C y 1.26 µg L⁻¹ para 25°C. Por otro lado, se llevaron a cabo pruebas de tipo crónicas a 18 y 25°C, que consistieron en tablas de vida y crecimientos poblacionales de *S. vetulus*, expuesto al extracto crudo y a una dieta de *S. acutus* y otro tratamiento sin extracto crudo, pero con una dieta de *M. aeruginosa*. Los resultados arrojaron disminuciones en ambas temperaturas

de la supervivencia para cada tratamiento, y aumento y disminuyó en la fecundidad, dependiendo de la temperatura. También se observó las alteraciones en la tasas de crecimiento poblacional con respecto a los controles a 18°C (0.08 ind d⁻¹) y a 25°C (0.12 ind d⁻¹), para las dos temperaturas en los tratamiento de baja concentración existieron aumentos en la tasas de crecimiento (0.11 ind d⁻¹ para 18°C y 0.13 ind d⁻¹ para 25°C), mientras que para la alta concentración se observaron disminuciones (0.04 ind d⁻¹ para 18°C y 0.11 ind d⁻¹ para 25°C). Todos los parámetros evaluados indican un efecto de la temperatura sobre la respuesta de *S. vetulus* a la cianotoxinas del extracto crudo.

Abstract

The presence of cyanobacteria in aquatic ecosystems leads to the presence of a many secondary metabolites (cyanotoxins), which can be toxic to different organisms. The current increase in temperatures, in addition to stimulating excessive growth of cyanobacteria, can also affect the response of organisms such as cladocerans, to cyanotoxins, since temperature in ectothermic organisms tends to modify their metabolism. The objective of this work was to evaluate the effect of temperature and microcystins from a bloom of *M. aeruginosa* in the rowing and canoeing canal "Virgilio Uribe". The effects of crude extracts and individual cells of *M. aeruginosa* on the physiology and demography of *S. vetulus* were tested. Ecotoxicological tests were carried out at 18 and 25°C; also, acute toxicity tests (LC₅₀ and EC₅₀) were carried out in order to assess the response of *S. vetulus* to toxins over 24h. The LC₅₀ values were 2.05 µg L⁻¹ for 18°C and 1.69 µg L⁻¹ for 25°C. The EC₅₀, performed on the basis of measurements of the cladoceran's heart palpitations, showed a 50% decrease after exposure to toxins from the crude extract after 24 h at 25°C and a 33% decrease at 18°C. The EC₅₀ values were 2.01 µg L⁻¹ at 18°C and 1.26 µg L⁻¹ at 25°C. Chronic tests, carried out at 18 and 25°C, consisted of life table and population growth of *S. vetulus*, exposed to the crude extract and a diet of *S. acutus* or treatments without crude extract, but with a diet of *M. aeruginosa*. The results showed decreases in both survival temperatures for each treatment, and increases and decreases in fecundity, depending on the temperature. Alterations were also observed in the rates of the population growth rate with respect to the controls at 18°C (0.08 ind d⁻¹) and at 25 °C (0.12 ind d⁻¹), for the two temperatures, in the low concentration treatments there were increases in growth rates (0.11 ind d⁻¹ for 18°C and 0.13 ind d⁻¹ for 25°C), while for high concentration decreases were observed (0.04 ind d⁻¹ for 18°C and 0.11 ind d⁻¹ for 25°C). All the parameters evaluated indicate an effect of temperature on the response of *S. vetulus* to cyanotoxins in the crude extract.

II. Introducción

Uno de los principales retos de la Limnología es combatir y controlar el problema de la eutrofización antropogénica (Downing, 2014), lo cual se ha traducido en un aumento de las floraciones de algas nocivas como las cianobacterias, debido a que pueden tomar ventaja de la gran cantidad de nutrientes existentes en un cuerpo de agua aumentando significativamente el promedio de su biomasa. Esto ocasiona la formación de floraciones alterando la biota y diversidad biológica (Codd *et al.*, 2005). Por otro lado, el desarrollo de estos organismos provoca turbidez, lo que impide que la luz penetre hasta regiones profundas de la columna de agua. Las consecuencias directas de este fenómeno, son la disminución de la capacidad de llevar a cabo la fotosíntesis en lugares cada vez menos profundos de la columna de agua y por lo tanto, disminución en la producción de oxígeno disuelto; simultáneamente aumenta la actividad metabólica consumidora de oxígeno de los organismos descomponedores, que empiezan a recibir excedentes de materia orgánica generados en la superficie (Moreno, 2010).

Junto con el aprovechamiento de nutrientes, las cianobacterias dependen de su capacidad de optimizar y utilizar otros recursos para minimizar las pérdidas de biomasa y así alcanzar desarrollo óptimo. Entre los diversos recursos destacan la intensidad lumínica, que tiene efecto directo sobre el metabolismo aumentando la actividad fotosintética (Paerl y Otten, 2013). Por otro lado, la temperatura es otro factor que en los últimos años ha favorecido el crecimiento desmedido de estos organismos (Huisman y Hulot, 2005). El incremento de temperatura ambiental global de la actualidad estimula la proliferación de cianobacterias. Muchos géneros de cianobacterias formadoras de florecimientos alcanzan sus máximas tasas de crecimiento a temperaturas relativamente altas, a menudo por encima de 25°C. El cambio climático es considerado un factor que permite la

expansión de las cianobacterias (Huisman *et. al.*, 2018), por lo que, las tasas de crecimiento de las cianobacterias parecen aumentar más rápido con la temperatura que con las del fitoplancton eucariota, de esta manera evitan la competencia con algas eucariontes.

Las cianobacterias o algas verde-azules, llamadas así por la presencia de un pigmento fotosintético denominado ficocianina, se reproducen de manera asexual mediante la formación de estructuras tales como esporas (endosporas y exosporas) o por fragmentación de las colonias o de los filamentos (Komárek, 1998; Whitton y Potts, 2000). Un porcentaje significativo de las especies de cianobacterias se encuentran en los sistemas de aguas continentales, habitando en la columna de agua o en el bentos de los lagos, lagunas, ríos y arroyos de todo el mundo (Whitton y Potts, 2000). Existen especies de cianobacterias en un amplio rango de tamaños, desde especies de 0,5 μm (ej.: *Prochlorococcus* sp.) hasta otras que forman colonias macroscópicas de 450 μm hasta varios milímetros de diámetro (ej. *Microcystis* sp) (Komárek, 1998).

La importancia ecológica y evolutiva de las cianobacterias radica en la capacidad de generar oxígeno formado mediante el proceso de fotosíntesis. A la vez, generan materia orgánica para otros organismos y son de utilidad económica en suelos, ya que incorporan el nitrógeno atmosférico mediante la fijación en compuestos utilizables por las plantas (Stanier y Cohen-Bazire, 1977) mejorando la calidad del suelo. Algunas cianobacterias establecen relaciones simbióticas con otros organismos tales como protozoarios, hongos líquenes y algunas plantas. Cabe resaltar un dato interesante, en los líquenes las cianobacterias carecen de pared celular y funcionan como cloroplastos que producen alimentos para el la especie simbiótica (Brodo *et al.*, 2001). Sin embargo, como se explica a continuación existen riesgos para los organismos acuáticos, cuando este grupo de organismos prolifera en exceso por lo cual son de los grupos más estudiados en los cuerpos de agua.

Los riesgos de las cianobacterias radican principalmente en la producción de una gran variedad de metabolitos secundarios de los cuales algunos son tóxicos para animales y plantas, dichos compuestos se conocen con el nombre genérico de cianotoxinas (Carmichael, 1992). Las cianotoxinas son compuestos que pueden afectar la biota acuática y terrestre incluyendo a los seres humanos (Sivonen y Jones, 1999), aunque instintivamente el hombre evita dichas aguas ya sea por su coloración u olor, existe un ejemplo documentado por intoxicación con microcistinas en un centro de diálisis en Caruaru, Brasil en el que reportan más de setenta muertos (Azevedo *et al.*, 2002). Además, se dispone de numerosos registros de toxicidad y mortandad de animales como consecuencia de estas toxinas, como por ejemplo aves acuáticas y ganado vacuno (Stewart *et al.*, 2008).

Las cianobacterias tienen la capacidad de regular la biosíntesis de cianotoxinas (metabolitos secundarios), con efectos toxicológicos sobre una gran variedad de organismos acuáticos, terrestres, silvestres y domésticos e incluso seres humanos (Van Apeldoorn *et al.*, 2007). Aunque el papel ecológico de las cianotoxinas aún se mantiene en debate (Holland y Kinnear, 2013) es evidente su efecto nocivo para muchos organismos acuáticos, en especial herbívoros filtradores (Ger *et al.*, 2014). Sin embargo, un alto grado de variación en la respuesta específica entre las especies del zooplancton ha sido reportado (Paes *et al.*, 2016). La intoxicación por cianotoxinas puede efectuarse por la ingesta directa de las células productoras o a través de la exposición a las cianotoxinas disueltas en el medio natural (Chorus y Bartram, 1999). El efecto tóxico de las cianobacterias altera la estructura de las comunidades acuáticas afectando la trasmisión energética entre los niveles basales de las cadenas alimentarias (Hansson *et al.*, 2007).



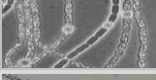









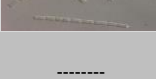

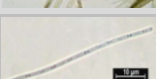





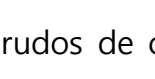
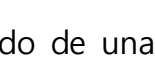
En general, la producción de cianotoxinas por parte de las cianobacterias, afecta severamente la estructura de la comunidad del zooplancton (Christoffersen, 1996) y la producción secundaria (Gulati, 1990; Christoffersen, 1996) ya que, estas son mal utilizadas como alimento por el zooplancton (De Bernardi y Giussani, 1990; Alva-Martínez *et al.*, 2007). En lagos de agua dulce los cladóceros son importantes

herbívoros de algas planctónicas. Durante las floraciones de cianobacterias, los cladóceros de talla pequeña (Allen, 1977; Hanazato, 1991; Sun *et al.*, 2012) y los rotíferos dominan la comunidad del zooplancton (Gilbert, 1990). Se cree comúnmente que las cianobacterias inhiben fuertemente a los cladóceros grandes y, por lo tanto, mejoran la capacidad competitiva de los cladóceros y copépodos de cuerpo pequeño (Lampert, 1987; Fulton y Paerl, 1988).

Existen un aproximado de 40 géneros de cianobacterias alrededor del mundo que son formadoras de florecimientos algales y potencialmente productoras de toxinas. De los cuales 11 géneros se han reportado en México (Buratti *et al.*, 2017). En la tabla 1, se observan algunos de los géneros más importantes para México y el mundo, dentro de los cuales destacan: *Microcystis*, *Anabaena*, *Cylindrospermopsis*, *Dolichospermum*, *Planktotrix* y *Oscillatoria* (Ortega, 1981; Buratti *et al.*, 2017).

De todos los géneros mencionados, el género *Microcystis* spp, se encuentra frecuentemente en los cuerpos de agua (Komárek y Komárková-Legnerová, 2002; Pineda-Mendoza *et al.*, 2020). Además, es el mayor productor de cianotoxinas, de inhibidores enzimáticos, disruptores celulares y compuestos que pueden llegar a presentar otras actividades biológicas (Carmichael, 1992; Codd, 1995).

Por otro lado, algunos de los géneros de cianobacterias que a continuación se observan, presentan un 60 % de los casos de intoxicación en todo el mundo (Ohtake *et al.*, 1989) debido a sus cianotoxinas. Sin embargo, la toxicidad de una floración presenta grandes variaciones de un día a otro, ya sea por factores ambientales, presencia de especies competidoras o por envejecimiento, siendo por lo tanto difícil de predecirla (NRA, 1990; Repavich *et al.*, 1990).

Tabla 1. Géneros de cianobacterias formadoras de florecimientos y potencialmente productoras de cianotoxinas en el mundo (Ortega, 1981) y México*(Buratti et al., 2017)					
Cianobacteria	Imagen	Fuente de la Imagen	Cianobacteria	Imagen	Fuente de la Imagen
Anabaena*		Golden et al., 2003	Nostoc*		Potts, 2011
<i>Anabaenopsis</i>		Iteman et al., 2002	Oscillatoria*		Buratti et al., 2017
<i>Aphanizomenon</i>		Preußel et al., 2006	<i>Phormidium</i>		Buratti et al., 2017
<i>Aphanocapsa</i>		Whitton, 2011	Planktothrix*		Ernst., 2006
<i>Aphanothece</i>		Olenina et al., 2006	<i>Planktolyngbya</i>		Komárek, 2013
Arthrospira*		Buratti et al., 2017	<i>Plectonema</i>	-----	-----
Cylindrospermopsis*		Buratti et al., 2017	Pseudanabaena*		Buratti et al., 2017
Dolichospermum*		Buratti et al., 2017	<i>Raphidiopsis</i>	-----	-----
<i>Gloetrichia</i>		Carey et al., 2007	<i>Scytonema</i>		Büdel et al., 2002
<i>Limnothrix</i>		Gkelis et al., 2005	Synechococcus*		Prausová et al., 2017
<i>Lyngbya</i>		Onodera et al., 1998	<i>Trichodesmium</i>	-----	-----
Microcystis*		Presente trabajo	<i>Umezakia</i>	-----	-----
<i>Nodularia</i>		Runnegar et al., 1988	Woronichinia*		Nandini et al., 2019

Los extractos crudos de cianobacterias son el resultado de una lisis celular (B-Be'eres et al., 2012). Se han realizado algunas investigaciones sobre los efectos que tienen los extractos crudos en organismos zooplanctónicos, demostrando que causan estragos en su fecundidad y supervivencia.

A menudo en los trabajos demográficos realizados con organismos zooplanctónicos el término fecundidad suele confundirse con el término fertilidad. En demografía humana el término fertilidad describe la eficacia reproductiva real, mientras que fecundidad hace referencia a la capacidad fisiológica reproductiva máxima (Krebs, 1985; Begon, 1999). La fecundidad en organismos invertebrados es definida como el número de descendientes

producidos durante un cierto período de tiempo (Llodra, 2002). Por otro lado, para organismos partenogénéticos (organismos que su reproducción consiste en el desarrollo de una célula reproductora hasta llegar a formarse un nuevo individuo sin que se produzca fecundación; normalmente es el óvulo el que se desarrolla de este modo) como las especies del zooplancton dulceacuícolas (rotíferos y cladóceros), la fecundidad se define como el número total de descendientes producidos por una hembra (Zhang *et al.*, 2016; Comunicación con Nandini Sarma, S.S.S. Sarma y Luc De Meester;2020; Ferrão-Filho *et al.*, 2019). Sin embargo, dependiendo del autor y el organismo que se trabaje, el término fecundidad se puede definir de diferente manera de acuerdo con los objetivos de cada estudio.

Otra característica que se ve afectada a causa de la exposición a extractos crudos, es la supervivencia de los organismos (Pietsch *et al.*, 2001; Okumura *et al.*, 2006; Zamora-Barrios *et al.*, 2015; Nandini *et al.*, 2019). La cual se define como el número o la proporción de individuos que sobreviven a cada edad para una especie o grupo dado (por ejemplo, machos o hembras) (Krebs, 1985). Una característica a nivel mundial es la implementación de compuestos purificados de las cianobacterias, con el fin ser conocer sus efectos sobre plantas, vertebrados, algas y zooplancton. Sin embargo, esta situación dificulta las extrapolaciones que se puedan realizar al medio natural debido a que únicamente se está probando una sustancia única. El uso de extractos crudos de cianobacterias en ensayos experimentales permite tener predicciones con mayor acercamiento a la realidad en comparación con los compuestos purificados (Pietsch *et al.*, 2001; Zamora-Barrios *et al.*, 2015).

Existen registros de que los extractos crudos de especies del género *Microcystis* presentan en su mayoría altas concentraciones de equivalentes de microcistinas como MC-LR, MC-RR, MC-YR y MC-LA en comparación con otras cianotoxinas (Pietsch *et al.*, 2001; Okumura *et al.*, 2006). Estos equivalentes o tipos de microcistinas tiene reportes de alta y moderada toxicidad para los organismos

(Moreno *et al.*, 2003). Las variaciones en la molécula de microcistina, son ocasionadas por modificaciones estructurales como es la variación de los L-aminoácidos "X" y "Y", siendo la más común la microcistina-LR (MC-LR), con un residuo de leucina (L) en la posición 2 y una arginina (R) en la posición 4, reportándose un total de 246 variantes de microcistinas (Catherine *et al.*, 2017).

Las microcistinas dentro de las células tienen una fuerte relación con las proteínas fosfatasa tipo 1A y 2A, ya que, esta toxina puede actuar como un inhibidor competitivo frente al sustrato real de las proteínas fosfatasa, esto lo logra por el acoplamiento de la Metildeshidroalanina con los aminoácidos serina (S) o cisteína (C) de la parte catalítica del sitio activo, lo que altera el proceso de fosforilación/desfosforilación de las proteínas, provocando diversos procesos celulares (McKintosh *et al.*, 1990; Campos y Vasconcelos, 2010) lo que daña a los organismos que las ingieren, ya sea de manera directa (consumo de células) o indirecta (estar en contacto con el medio). Estudios realizados por (Reinikainen *et al.*, 1994) mencionan que dichas ingestiones han tenido efectos adversos *Daphnia* sp. al ser consumidores de poblaciones de *Microcystis* pueden ingerir cantidades considerables de microcistinas en la naturaleza, lo que resulta en efectos adversos para estos cladóceros. Por otro lado, Rohrlack y colaboradores (2001) mostraron que la correlación entre la tasa de ingestión de microcistina y el tiempo de supervivencia disminuía en varias especies de *Daphnia* originarias de diferentes cuerpos de agua.

Los cladóceros son microcrustáceos acuáticos que tienen un rol muy importante en los cuerpos de agua, ya que transfieren energía de los productores primarios a los consumidores de mayor nivel trófico, como los peces. Al mismo tiempo dentro de la ecotoxicología se utilizan en ensayos de toxicidad, ya que presentan muchas ventajas para medir el nivel de contaminación, la calidad del agua potable, debido a sus diversas características, como: su tamaño pequeño, sensibilidad a un gran número de sustancias tóxicas, amplia distribución en la naturaleza, reproducción predominantemente partenogenética, facilidad para

cultivarlos, alcanzan una gran biomasa y altas tasas de crecimiento poblacional (Sarma y Nandini, 2006; Smirnov, 2017).

La dinámica poblacional de los cladóceros depende en gran medida de factores ambientales que interactúan con el potencial fisiológico de especies particulares, a esto se le conoce como ecofisiología, e intenta explicar por qué ciertas especies soportan ciertos límites de factores ambientales, modificando su potencial morfológico y fisiológico lo que les permite vivir en una gran variedad de situaciones (Smirnov, 2017).

En el presente trabajo se enfatiza el factor de la temperatura, ya que controla la velocidad de procesos bioquímicos y tasas metabólicas (Lamkemeyer *et al.*, 2003). Los organismos poiquiloterms, como el zooplancton (cladóceros), dependen de la temperatura ambiental en la que se encuentran y se ha visto que esta tiene efectos en el promedio de vida y la reproducción en estos organismos (Enesco, 1993). La temperatura representa un importante factor de selección, ya que la distribución y las estrategias de historia de vida que presentan los organismos son altamente específicas dependiendo de la zona en que se encuentren (Sarma *et al.*, 2005).

Sarma y colaboradores (2005) mencionan que dependiendo de la zona en dónde habiten los cladóceros, estos serán diferentes en muchos aspectos de sus parámetros de historia de vida, incluido el tamaño de taxones iguales o similares de edades. Los rasgos principales de la historia de vida que distinguen a los cladóceros tropicales de sus contrapartes templadas son: tasas relativamente más altas de aumento de la población, niveles umbrales más altos de alimentos, tasas más altas de filtrado e ingestión y mayor tolerancia a niveles más altos de alimentos y temperaturas máximas.

Se ha demostrado que en diferentes especies de cladóceros de la familia Daphnidae, los efectos de *Microcystis* se mitigan con incrementos considerables

de temperatura (Walls *et al.*, 2018). Por otro lado, también se ha observado que los efectos de *Microcystis* podrían tener un efecto considerable sobre estos organismos (Nandini y Rao, 1998). Sin embargo, se ha estudiado poco acerca de cómo la temperatura se presenta como un factor ecológico que podría afectar la respuesta del zooplancton ante las cianobacterias y sus toxinas, ya que comúnmente los estudios acerca de esta respuesta son realizados a una temperatura (Ferrão-Filho y Azevedo, 2003; Okumura *et al.*, 2006; Zamora-Barrios *et al.*, 2015).

El género *Simocephalus* es un cladóceros que se encuentra en cuerpos de agua poco profundas en México (Fernández *et al.*, 2014), en un rango de temperatura de 12-27°C (Verbitsky *et al.*, 2014). Además, Nandini y Rao (1998) mencionan que el género *Simocephalus* es capaz de alimentarse de cianobacterias y crecer soportando temperaturas de hasta 30°C. La especie *Simocephalus vetulus* presenta una distribución natural en América incluyendo los cuerpos de agua en México (Elías Gutiérrez *et al.*, 2001). Sus características en conjunto lo postulan como un gran candidato para evaluaciones con bioensayos acuáticos en latitudes tropicales, logrando remplazar para este caso a especies del género *Daphnia* (Muñoz-Mejía, 1997).

Aunque la información referente a bioensayos acuáticos con extractos crudos de cianobacterias en *Simocephalus vetulus* es escasa existen trabajos con organismos del género *Ceriodaphnia*, el cual pertenece a la misma familia que el género *Simocephalus* en donde han evaluado el efecto de los extractos crudos sobre sus variables demográficas encontrando alteraciones en esta variable respecto a los tratamientos controles (Okumura *et al.*, 2006; Zamora-Barrios *et al.*, 2015). Por otro lado, con respecto a la temperatura, se han realizado estudios demográficos sobre los efectos de extractos crudos y de células de diferentes cianobacterias (*Anabaena affinis* y *Anabaena flos-aquae*) a diferentes temperaturas, encontrando que el aumento de la temperatura incrementa el efecto de los extractos crudos (Claska y Gilbert, 1998).

Por su parte, el género *Simocephalus* presenta una buena transparencia lo que permite observar fácilmente el corazón que late sin diseccionar y sacrificar a los animales (Mishra *et al.*, 2016). El corazón en cladóceros se reduce como una cámara bulbosa en el primer segmento verdadero (Smirnov, 2017). Los cladóceros poseen un sistema circulatorio abierto y un corazón miogénico (Maynard, 1960; Smirnov, 2017). Los latidos cardíacos y el flujo de hemolinfa se pueden observar fácilmente, ya que los cladóceros son translúcidos (Maynard, 1960; Smirnov, 2017).

Con referencia a este órgano existen trabajos donde se ha observado el efecto tóxico de las cianotoxinas sobre la cantidad de palpitations por minuto en *Daphnia*, así como en otros órganos de su cuerpo (Rohrlack *et al.*, 2005). En otro extremo se ha observado los efectos tóxicos de metales pesados sobre la fisiología cardíaca de *Simocephalus vetulus* (Mishra *et al.*, 2016). Al igual que en otros crustáceos (Rajaretnam y Stanley, 2015). Pero la fisiología de referencia del latido cardíaco a la toxicidad por otros compuestos como las cianotoxinas no se ha estudiado sobre todo en los cladóceros.

Para poder evaluar las respuestas de organismos a las cianotoxinas cuando existe una variación en la temperatura se utilizan pruebas ecotoxicológicas que se basan en el reconocimiento de la respuesta de los organismos ante la presencia de agentes tóxicos, las cuales, dependen del nivel de exposición para evaluar la respuesta al análisis. Para ello las pruebas de toxicidad utilizadas describen una relación de concentración-respuesta ya sea a corto o largo plazo (Hoffman *et al.*, 2002). Una prueba aguda es aquella en la que se puede percibir un efecto letal u otro producido por un agente tóxico en un tiempo relativamente corto, aproximadamente de 4 a 2 días, por el contrario, una prueba crónica es aquella en la que se pueden observar efectos a largo plazo y pueden estar relacionados con cambios en el crecimiento, metabolismo, reproducción, apetito, posibles mutaciones y hasta la muerte de los organismos (APHA, 1992).

III. Antecedentes

Claska y Gilbert en 1998, evaluaron los efectos de extracto crudo y de las células de *Anabaena affinis* y *Anabaena flos-aquae* sobre *Daphnia pulex* a diferentes temperaturas a través del crecimiento poblacional y tabla de vida. Reportan que *A. affinis* afectó de manera negativa la supervivencia y la fecundidad, mientras que *A. flos-aquae* afectó principalmente la fecundidad. Por otro lado, se observó un efecto adverso en el tamaño de los huevos. Concluyeron que el incremento en la temperatura aumenta los efectos inhibitorios de las cianobacterias tóxicas en el crecimiento poblacional de los daphnidos.

Nandini y Rao en 1998, evaluaron la capacidad de cladóceros y rotíferos para alimentarse de *Microcystis aeruginosa*, comparando el crecimiento somático y poblacional utilizando *Chlorella* y *Microcystis* (células individuales obtenidas mediante una técnica de sonicación) como tipos de alimentos. Se ocuparon cinco especies de cladóceros (*Ceriodaphnia cornuta*, *Scapholeberis kingi*, *Moina macrocopa*, *Daphnia carinata*, *Simocephalus vetulus*) y dos especies de rotíferos (*Brachionus calyciflorus*, *Hexarthra mira*). Los experimentos se realizaron a 20 y 30°C. En todos los tratamientos probados la tasa de crecimiento poblacional por día de los cladóceros varió de -0.715 a 0.612 y la de los rotíferos de -1.15 a 0.781. La capacidad de las poblaciones de cladóceros para crecer en células individuales de *Microcystis* no se relacionó con la longitud del cuerpo o la longitud del intestino, sino con su proporción. Los efectos tóxicos de *Microcystis* se mitigaron a la temperatura más alta. Una cepa de *C. cornuta* obtenida de un lago dominado por *Microcystis* tuvo una tasa de crecimiento más alta en las cianobacterias tóxicas, lo que sugiere que la tolerancia a *Microcystis* podría ser un rasgo hereditario.

Rohrlack y colaboradores en 2005, evaluaron la captación intestinal de *Daphnia galeata* y sus efectos adversos al alimentarse de *Microcystis*. Encontraron rupturas de la pared intestinal por la pérdida de contacto entre las células. Una vez que las microcistinas entraron en la sangre afectaron la comunicación neuromuscular y otras funciones que influyen en los sistemas musculares principales. En consecuencia, las tasas de latido de las antenas torácicas, mandíbulas y antenas secundarias, así como la actividad del intestino anterior disminuyeron, mientras que los músculos del intestino medio fueron estimulados. Los animales exhibieron síntomas de agotamiento y murieron. Sugieren que una ingestión de entre 10.2 ng y 18.3 ng de microcistina por 1 mg de peso fresco de *Daphnia* en el cuerpo es suficiente para matar a *D. galeata* dentro de 2 días.

Arzate-Cárdenas y colaboradores en 2010, estudiaron la presencia de *Microcystis* potencialmente productoras de cianotoxinas, en diferentes cuerpos de agua de la CDMX se aplicaron técnicas moleculares y se realizaron bioensayos de toxicidad aguda con neonatos de *Daphnia magna* expuestos a extractos crudos de cianobacterias. Las microcistinas sintetizadas en condiciones de cultivo se cuantificaron mediante ELISA, en la pista de remo y canotaje la concentración varía en un rango de 3.42 a 3.55 $\mu\text{g L}^{-1}$. Los bioensayos de toxicidad aguda revelaron que la mortalidad era independiente de la concentración de cianotoxinas en algunas cepas; esto sugiere la presencia de otros metabolitos (diferentes de las microcistinas) que también ejercen un importante efecto biológico. Las cepas aisladas tenían el gen *mcyA-Cd* y la mayoría de ellas producían cantidades variables de microcistinas en las condiciones de cultivo utilizadas, lo que confirmaba su potencial toxigénico. Los resultados advierten sobre los posibles riesgos de efectos tóxicos para la biota acuática, áreas vecinas, visitantes y usuarios de estos sitios, debido a la presencia constante de estas floraciones en los cuerpos de agua estudiados.

Fernández y colaboradores en 2014, compararon la capacidad de los microcrustáceos *Ceriodaphnia dubia*, *Moina macrocopa*, *Daphnia pulex*,

Simocephalus vetulus y *Heterocypris incongruas* para alimentarse y crecer con dietas de cianobacterias. Estudiaron las preferencias de alimentación de *Ceriodaphnia dubia*, *Moina macrocopa*, *Daphnia pulex*, *Simocephalus vetulus* y *Heterocypris incongruas* en el fitoplancton del agua natural del lago con un predominio de *Microcystis* sp *Fragilaria* sp. o *Planktothrix* sp lo que le añadieron *Scenedesmus acutus*. También se probó la capacidad de *D. pulex*, *S. vetulus* y *H. incongruas* para reducir las densidades de cianobacterias por pastoreo. Todas las especies se alimentaron de colonias pequeñas de *Microcystis* sp. pero no de *Planktothrix* sp o *Fragilaria* colonial sp *Simocephalus vetulus* y *H. incongruas* fueron generalistas en su alimentación y más capaces de reducir las densidades de cianobacterias. Las variables demográficas de *S. vetulus*, fueron significativamente más bajas en la dieta cianobacteriana en comparación con *H. incongruas* las tasas de crecimiento de la población fueron entre 0.07 y 0.2 d⁻¹.

Herrera y colaboradores en 2014, realizaron un estudio, donde utilizaron una muestra de floración natural obtenida de un reservorio en Colombia para evaluar sus efectos en cinco parámetros relacionados con el comportamiento alimentario de *Daphnia*, (movimiento de la segunda antena, movimiento de la mandíbula, apéndices torácicos, movimiento postabdomen y frecuencia cardíaca. Los resultados revelaron cambios significativos en todos los parámetros evaluados a dos concentraciones diferentes de extractos acuosos de la floración: los movimientos de las segundas antenas aumentaron significativamente y hubo reducciones significativas en los movimientos mandibulares, los movimientos torácicos y la frecuencia cardíaca. Aunque los movimientos postabdominales mostraron una gran variabilidad sin un patrón distintivo entre el control y los tratamientos, la reducción en los otros parámetros (como la frecuencia cardíaca con el tiempo) podría reflejar una intoxicación por microcistinas o una respuesta conductual (por ejemplo, inhibición de la alimentación).

Zamora-Barrios y colaboradores en 2015, evaluaron los efectos toxicológicos de extractos crudos de *Dolichospermum planctonicum* en *Plationus patulus*

(Rotifera) y *Ceriodaphnia cornuta* (Cladocera). El compuesto activo de las cianobacterias cultivadas en el laboratorio se extrajo liofilizándolo a -70°C durante 48 h, después de lo cual la muestra se descongeló. El ciclo se repitió cinco veces, y entre cada ciclo las células se sonicaron para lisarlas. Compararon los experimentos de crecimiento poblacional y demografía de la tabla de vida de las dos especies de zooplancton en medios con y sin (controles). Encontraron que los rotíferos eran más resistentes a los tóxicos que los cladóceros. Las tasas de crecimiento de la población oscilaron entre $0,11\text{ d}^{-1}$ en controles y $0,08\text{ d}^{-1}$ en presencia de extractos crudos para *P. patulus* y de $0,18$ en controles a $-0,27$ en presencia de extractos crudos para *C. cornuta*. El extracto crudo también tuvo un impacto negativo.

Araiza-Vázquez en 2017, evaluó las respuestas demográficas de *Moina macrocopa* en presencia de cianotoxinas originarias de cianobacterias, de la Pista de remo y canotaje "Virgilio Uribe" obtenidas mediante congelación y sonicación. Realizó ensayos de toxicidad aguda (CL_{50}) a diferentes concentraciones, en tres diferentes periodos. Evaluó la mortalidad después de 24h. Las concentraciones medias letales fueron 1.56, 1.30 y 2.56 $\mu\text{g/L}$, respectivamente. Con respecto a la tabla de vida de *M. macrocopa*, ésta se realizó utilizando el 10% de las concentraciones del CL_{50} y la mitad de este 10%, teniendo como dieta una concentración de $0.5 \times 10^6\text{ cel mL}^{-1}$ *Scenedesmus acutus*. *Moina macrocopa* fue sensible a las cianotoxinas reduciendo su supervivencia desde las bajas concentraciones, así como la fecundidad y obteniendo tasas de crecimiento que van desde 0.49 y 0.27 ind mL^{-1} para el primer periodo, para el segundo periodo 0.38y 0.52 y para el último 0.42 y 0.52. Concluyó que la mayoría de las especies de cianobacterias de la Pista de remo y canotaje Virgilio Uribe suelen ser tóxicas y pueden tener efectos adversos debido a la exposición a largo plazo.

Walls y colaboradores en 2018, evaluaron los patrones estacionales de la temperatura del agua, la biomasa de las cianobacterias y la concentración de microcistinas extracelulares en un lago eutrófico de agua dulce dominado por

Planktothrix agardhii. La temperatura del lago varió de 3 a 27°C y la biomasa de las cianobacterias aumentó con el calentamiento natural hasta los 18°C, pero luego disminuyó rápidamente con nuevos aumentos de temperatura. La concentración de microcistina extracelular se acopló estrechamente con la temperatura y fue más elevada entre 20 y 25°C, lo que coincidió con la disminución de la biomasa de las cianobacterias. Una tendencia similar se observó en las incubaciones de laboratorio donde la liberación de microcistina específica para la productividad fue más elevada entre 20 y 25°C y luego disminuyó bruscamente a 30°C. Estos resultados muestran un umbral de temperatura para la liberación de toxinas en *P. agardhii*, que demuestra un potencial para usar la temperatura del agua para pronosticar la severidad de la floración en lagos eutróficos donde las floraciones pueden persistir durante todo el año con diversos grados de toxicidad.

Gayosso-Morales y colaboradores en 2017, colectaron zooplancton, en los canales de Xochimilco, midieron temperatura, pH, conductividad, oxígeno disuelto, nitrato-N y fosfato-Ps, clorofila-a, y transparencia del disco Secchi en cada una de los sitios. El objetivo de este trabajo fue presentar datos sobre la dinámica del zooplancton en dos canales del lago durante un año. La comunidad de zooplancton estaba dominada por rotíferos; los cladóceros y los copépodos eran pocos. Los géneros comunes de rotíferos en el lago fueron *Keratella*, *Brachionus*, *Polyarthra*, *Trichocerca*, *Filinia*, *Asplanchna*. Los cladóceros fueron *Chydorus sphaericus*, *Pleuroxus varidentatus*, *Alona* sp *S. vetulus*. Y los copépodos *Acanthocyclops americanus* y *Microcyclops rubellus*. El análisis de correspondencia canónica (CCA) en la estación del canal de remo, mostró que los dos primeros ejes de ordenación explicaban el 46% de la varianza de los datos de especies en CCA. El primer y el segundo eje estaban bien correlacionados con los datos ambientales.

IV. Justificación

Actualmente en México existe una gran cantidad de reservorios acuáticos de gran importancia que presentan problemas de eutrofización, favoreciendo a organismos como las cianobacterias, aumentando significativamente la biomasa de su población y a su vez la formación de floraciones. Lo que provoca efectos como la reducción de la diversidad y abundancia de diferentes especies acuáticas, debido a la producción y liberación constantemente de toxinas al medio.

Se tiene registro de que la temperatura es un factor que determina la ecología y fisiología de los organismos en los cuerpos de agua tanto del zooplancton como de las cianobacterias (Moore *et al.*, 1996), siendo un factor que podría afectar las interacciones cianobacteria-zooplancton. Se ha registrado que el aumento actual de la temperatura en el 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 a las cianobacterias llegar a ser dominantes en los sistemas (Paerl y Huisman, 2009).

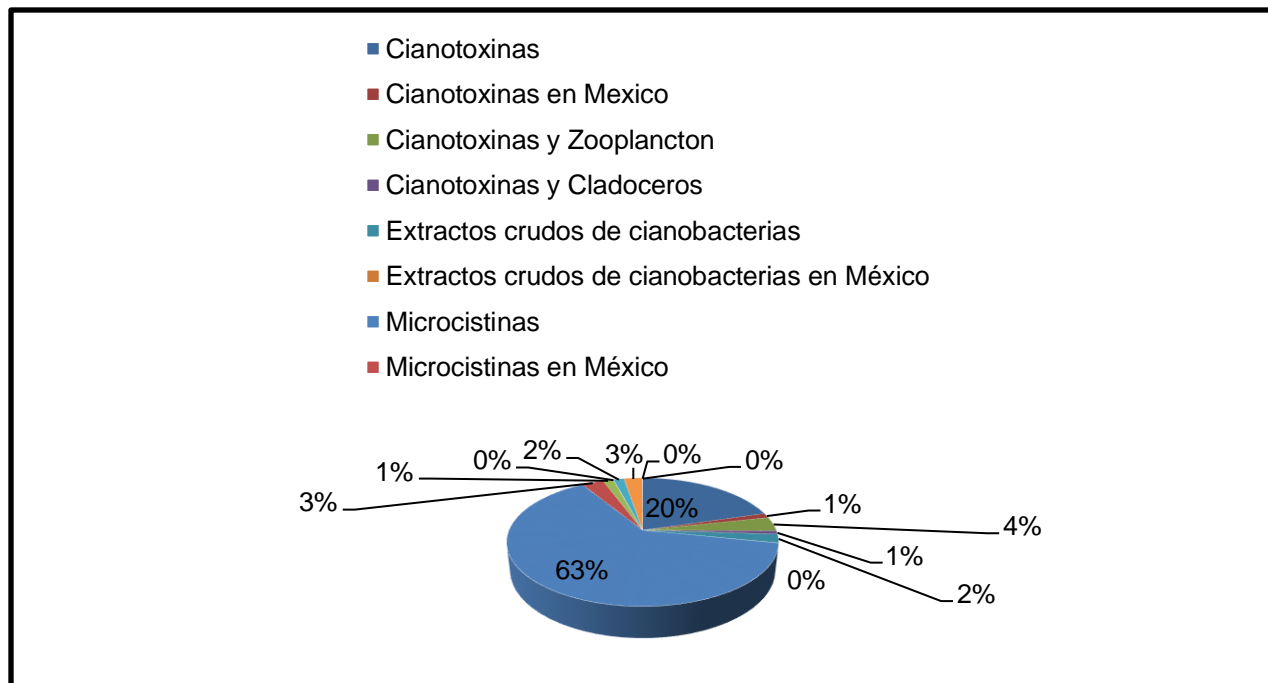
Aunque, a nivel mundial se tiene registro de los posibles efectos que pueden llegar a causar los cambios de temperatura en la interacción cianobacteria-zooplancton, llama la atención que en México la información acerca de cómo la temperatura se presenta como un factor ecológico que podría afectar la respuesta del zooplancton a las cianobacterias y sus toxinas (tabla 1) es escasa, ya que comúnmente los estudios acerca de esta respuesta son realizados a una temperatura dificultando la comparación de las características de la historia de vida de los cladóceros, especialmente las especies de la familia Daphnidae en

aguas tropicales y templadas, siendo la mayor parte de los trabajos en aguas templadas.

Tabla 2. Número de los trabajos publicados relacionados a cianotoxinas, extractos crudos, microcistinas, temperatura y zooplancton temperatura. A nivel internacional y nacional. (obtenido de Web of Science, 1989-2019)

Temas Seleccionados	Número de publicaciones
Cianotoxinas	2089
Cianotoxinas en México	121
Cianotoxinas y Zooplancton	361
Cianotoxinas y Cladóceros	88
Extractos crudos de cianobacterias	221
Extractos crudos de cianobacterias en México	4
Microcistinas	6447
Microcistinas en México	314
Microcistinas y Cladóceros	150
Microcistinas y <i>Simocephalus</i>	6
Cianotoxinas Temperatura	153
Microcistinas y Temperatura	266
Cianotoxinas y Temperatura en México	3
Microcistinas y Temperatura en México	4

Figura 1. Porcentaje de trabajos relacionados con cianotoxinas, extractos crudos, microcistinas, temperatura y zooplancton temperatura. A nivel internacional y nacional.



Otro punto importante dentro de este estudio es el efecto que se podría llegar a presentar sobre la salud de las personas que están en contacto con las aguas en las que existen floraciones de cianobacterias, apoyándonos con las pruebas aplicadas en este estudio. En el caso de las personas que utilizan día con día las instalaciones de la Pista de remo y canotaje de Xochimilco para su entrenamiento resulta ser preocupante, ya que al estar expuestas directamente con el agua, al roció de la pista y así mismo con los florecimientos de cianobacterias corren el riesgo de contraer los daños ya mencionados, aun cuando se trate de concentraciones bajas se observan síntomas clínicos subletales caracterizados por desórdenes gastrointestinales, alergias, irritaciones en la piel y daños en los ojos de nadadores y bañistas (NRA, 1990).

Por lo cual, generar información sobre los efectos de las cianotoxinas a nivel ecológico y fisiológico, y poder realizar inferencias en personas es de suma importancia, aunque la mayoría de la información en el mundo demuestre el efecto de los compuestos purificados de las cianobacterias sobre plantas, vertebrados, algas y zooplancton. Hasta la fecha, existe escasa información de los efectos a corto y largo plazo que tienen los extractos crudos sobre los organismos que podrían estar en contacto con estos, ya que muchas de las investigaciones centran su atención en la producción de extractos crudos con la finalidad de purificar otros compuestos como péptidos y pigmentos fotosintéticos de origen cianobacterial para su utilización en farmacología (Zamora-Barrios *et al.*, 2017).

Por ello, es de gran importancia desarrollar experimentos que nos permitan pronosticar y evaluar los riesgos de la exposición de algunos organismos a los extractos crudos, así como de las posibles alteraciones ecológicas que puedan causar dentro de un ecosistema acuático cuando existen variaciones en la temperatura apoyándonos en el zooplancton, con énfasis en el género *Simocephalus* el cual presenta la mayor abundancia de la familia Daphnidae a lo

largo del año en la Pista de remo y canotaje (Gayosso-Morales *et al.*, 2017), ya que el uso de estos organismos nos permiten comprender lo que puede estar ocurriendo en una situación real con la variación de temperatura y una sobrepoblación de cianobacterias tóxicas.

V. Hipótesis

Se sabe que el zooplancton (cladóceros) suele presentar efectos adversos a nivel fisiológico, somático y demográfico al estar expuesto a extractos crudos de *M. aeruginosa* y alimentarse de células de esta especie, lo que podría afectar diferentes tipos de tejidos en los organismos, provocando alteraciones en el funcionamiento del organismo. Entonces, se espera que *Simocephalus vetulus* presente una disminución en el crecimiento corporal y sus variables demográficas (supervivencia, fecundidad, tasas de reproducción, tasas de crecimiento, esperanza de vida, etc.), así como de la cantidad de palpitations cardíacas por minuto cuando se expone a extracto crudo o a células de *M. aeruginosa*.

Si el incremento de la temperatura es un factor que favorece el crecimiento de los organismos por el incremento de las tasas metabólicas, así como el crecimiento de las cianobacterias y la posible producción de cianotoxinas, entonces, se espera que a mayor temperatura en combinación con el extracto crudo tenga un efecto de disminución del crecimiento somático, la fisiología cardíaca y las variables demográficas de *Simocephalus vetulus* en comparación a cuando se expone únicamente ante el extracto crudo de *M. aeruginosa*.

VI. Objetivo

V.I. General

Evaluar el efecto de la temperatura sobre la fisiología y demografía de *Simocephalus vetulus* mediante extractos crudos y células individuales de un florecimiento de *Microcystis aeruginosa* originaria de la pista olímpica de remo y canotaje "Virgilio Uribe".

V.II. Particulares

Comparar el efecto de las cianotoxinas utilizando extractos crudos así como células individuales sobre el crecimiento somático y la demografía de *S. vetulus*.

Evaluar el efecto de la temperatura y el extracto crudo sobre los parámetros demográficos (tabla de vida y crecimiento poblacional) y el crecimiento somático de *S. vetulus*.

Determinar la concentración efectiva de los extractos crudos con diferentes temperaturas sobre *Simocephalus vetulus* aplicando una prueba de medición del pulso cardiaco.

VII. Área de Estudio

La pista de remo y canotaje "Virgilio Uribe" se encuentra ubicada en la zona lacustre de Xochimilco y paralela al canal de Cuemanco en la CDMX con un clima templado subhúmedo, mide 2200 m de longitud, tiene una profundidad máxima de 1.5 m. Este cuerpo de agua es eutrófico ya que recibe efluentes de desechos domésticos y hortícolas. La temperatura ambiental varía de 12 a 20°C, con lluvias de mayo a septiembre. Este es un cuerpo de agua creado para competencias de remo y canotaje, se abastece con agua que proviene de la planta de tratamiento de agua "Cerro de la Estrella" en la Alcaldía de Iztapalapa (Ciudad de México) (Gayosso-Morales *et al.*, 2017).

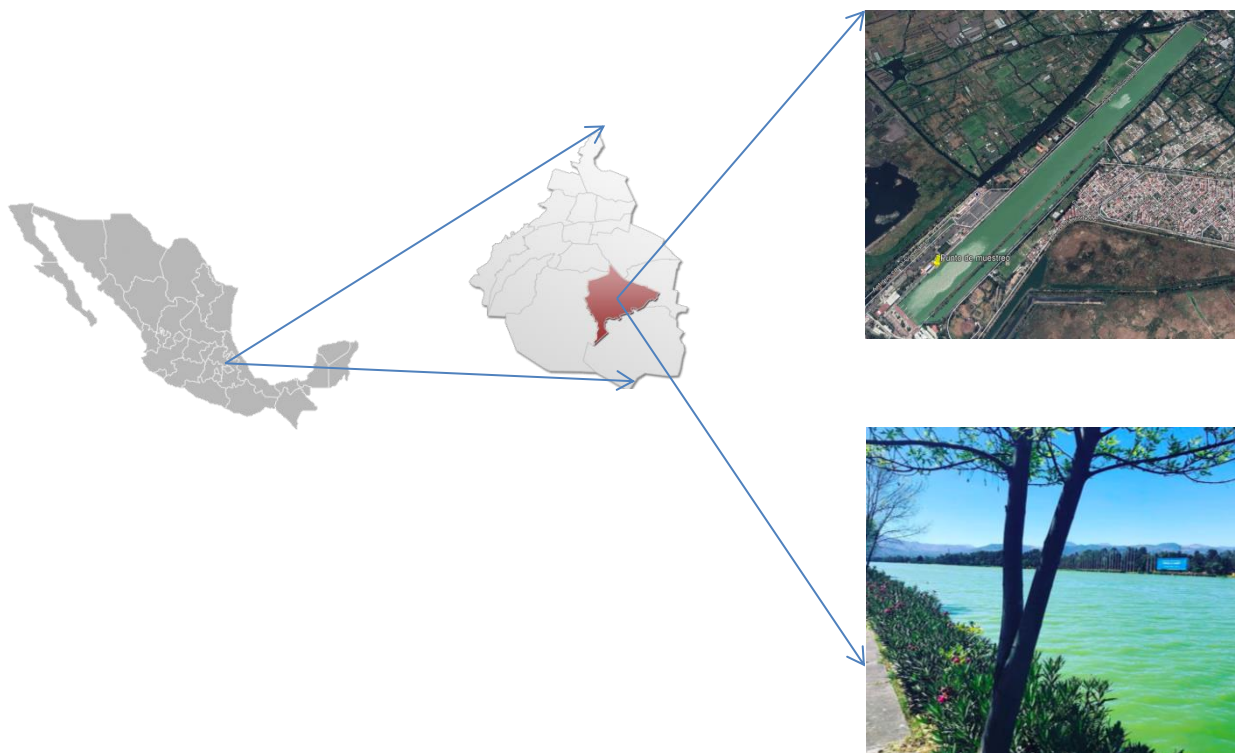


Figura 2. Ubicación geográfica de la pista olímpica de remo y canotaje "Virgilio Uribe"

VIII. Materiales y Métodos

8.1. Preparación del material biológico

El cladóceros *Simocephalus vetulus* se colectó y se aisló de las aguas de la pista de remo y canotaje de Xochimilco con el objetivo de establecer cultivos monoclonales a partir de una hembra partenogenética. Para la identificación y confirmación de este organismo se utilizó la clave del género *Simocephalus* (Dumont, 1983a) y la ayuda del Dr. Marcelo Silva Briano de manera presencial. Para el mantenimiento de los organismos, se utilizó agua moderadamente dura (medio EPA) que se preparó disolviendo 0.095 g de NaHCO_3 , 0.06 g de CaSO_4 , 0.06 g MgSO_4 y 0.02 g de KCl en 1 L de agua (Weber, 1993), el cual tuvo cambios del medio cada tercer día con la finalidad de evitar la acumulación de pellets de material orgánico y residuos alimenticios. Los cultivos se mantuvieron en el laboratorio de Zoología Acuática de la FES Iztacala durante la fase experimental a 18° y 25°C.

Para la alimentación de *S. vetulus*, se le ofreció como dieta exclusiva el alga verde *Scenedesmus acutus* a una concentración de 0.5×10^6 cel mL^{-1} . El alga fue cultivada en botellas transparentes de 2 L con medio estándar Bold, agregándose 0.5 g de NaHCO_3 cada 3 días (Borowitzka y Borowitzka, 1988); se mantuvo con constante aireación para evitar la sedimentación e iluminación fija (24 h) proporcionada por lámparas de luz blanca de 70 watts. El alga fue cosechada después de una semana, ya que en este tiempo alcanza su mayor densidad celular. Una vez que el alga fue cosechada, esta se decantó con el fin de eliminar la mayor cantidad de agua. Posteriormente para conocer la concentración celular de cada botella, se tomó una alícuota del alga ya decantada y fue cuantificada mediante una cámara de Neubauer.

8.2. Identificación y preparación de extractos crudos de cianobacterias y células individuales

La muestra de cianobacterias se obtuvo en el periodo de secas-cálidas correspondiente al mes de marzo del 2019. Se colectó directamente un total de 2 L de agua de la pista de remo y canotaje para poder obtener una muestra significativa de la floración. Esta muestra se fijó con formol al 4%, se almacenó y se transportó en un medio frío con hielo hacia el laboratorio en la FES Iztacala, con la finalidad de cuantificar el número de colonias y células que se encontraron en la muestra y poder realizar la identificación correspondiente con ayuda de las claves de Komárek-Anagnostidis (1998).

Una vez realizada la identificación y cuantificación, la muestra se sonicó en el ultrasonicador (Cole Palmer Instruments Co., USA) a 20 kHz y 0.4 Watts durante 5 min con el objetivo de separar las colonias de *M. aeruginosa*, enseguida se filtró con una malla de 20 μm obteniendo únicamente células separadas. Posteriormente se contaron las células de cianobacterias con una cámara Neubauer, para ajustar la concentración a 0.5×10^6 cel mL^{-1} adicionada con medio EPA para los tratamientos.

Para la elaboración del extracto crudo se tomó un total del 10 L (sin filtrar) de agua de la pista de remo y canotaje para poder obtener una muestra significativa de la floración. Para la extracción, se llevó a cabo según lo propuesto por Pietsch y colaboradores (2001) y modificado por Zamora-Barrios y colaboradores (2015). Se tomó la muestra de cianobacterias y se colocó en un recipiente cerrado para ser congelado a -20°C durante 72 h, posteriormente se dejó descongelar 24 h, posterior al tiempo la muestra se sonicó a 20 kHz y 50 Watts durante 10 min; por último, esta se volvió a congelar. Este ciclo de congelación/descongelación se repitió durante 5 veces, con la finalidad de provocar lisis celular, y asegurar la extracción de las microcistinas.

8.3. Cuantificación de equivalentes de microcistinas

Para la cuantificación de la concentración equivalentes de microcistinas LR en los extractos crudos, se usó el kit de ELISA "QuantiPlate for Microcytins de EnviroLogix™" (Portland, EUA) siguiendo las instrucciones de uso del fabricante. El kit es un ensayo competitivo entre la microcistina-LR en la muestra y la microcistina-LR marcada con una enzima (peroxidasa) por los sitios de reacción. Después de un simple paso de lavado, el resultado de la competencia se visualiza con un paso de desarrollo de color. La concentración en $\mu\text{g L}^{-1}$ es reportada como equivalentes de microcistinas LR (Zamora-Barrios *et al.*, 2015).

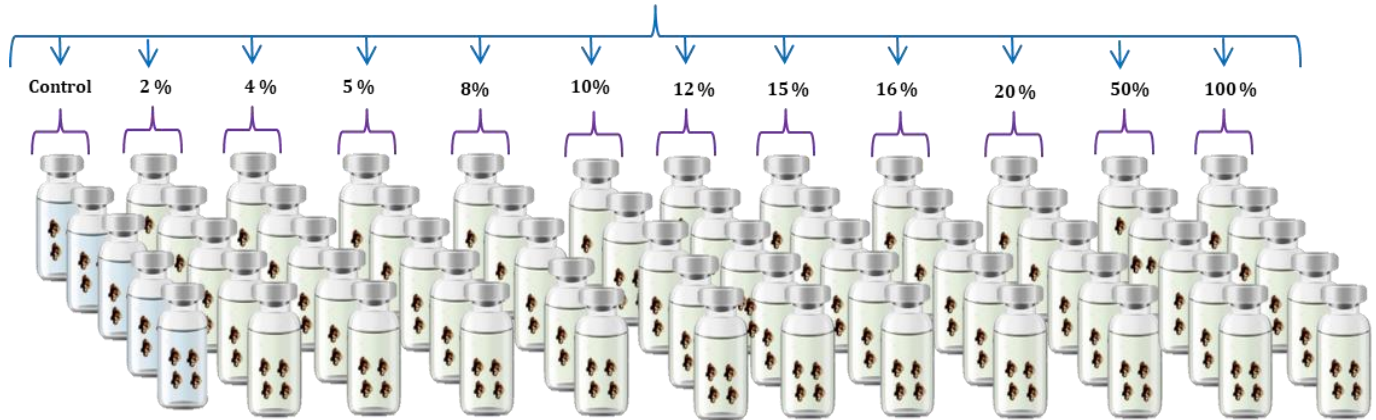
8.4. Experimentos de toxicidad aguda

8.4.1. Concentración letal media (CL₅₀)

La sensibilidad de *S. vetulus*, se evaluó mediante ensayos de concentración letal media en los que se buscó la concentración del extracto crudo de las cianobacterias, el cual reduce la población un 50% en un periodo de tiempo, dependiendo del organismo a utilizar. Para esto, se tomaron 10 organismos por separado, en etapa de neonatos de menos de 24 h y en estado óptimo, se colocaron dentro de recipientes de vidrio con volúmenes de 25 mL y 2 mL de medio. Se sometieron a disoluciones 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 16, 20, 50 y 100% del extracto crudo (el rango de concentración de equivalentes de microcistinas para estas disoluciones fue de 0 a $14.96 \mu\text{g L}^{-1}$) con cinco repeticiones para cada uno. Los tratamientos fueron colocados en la incubadora a 18 y 25°C con iluminación difusa. Después de 24 h se contaron los organismos de cada una de las disoluciones de extracto crudo y se determinaron los valores de CL₅₀ con ayuda del método de Probit (Finney, 1971). Finalmente, con los valores obtenidos del CL₅₀ para cada temperatura, se ajustaron las concentraciones subletales a cada uno de los tratamientos del trabajo con el fin de mantener a los organismos vivos durante todo el experimento.

Experimentos de toxicidad aguda 18°C

Concentración letal media (CL₅₀)



Experimentos de toxicidad aguda 25°C

Concentración letal media (CL₅₀)

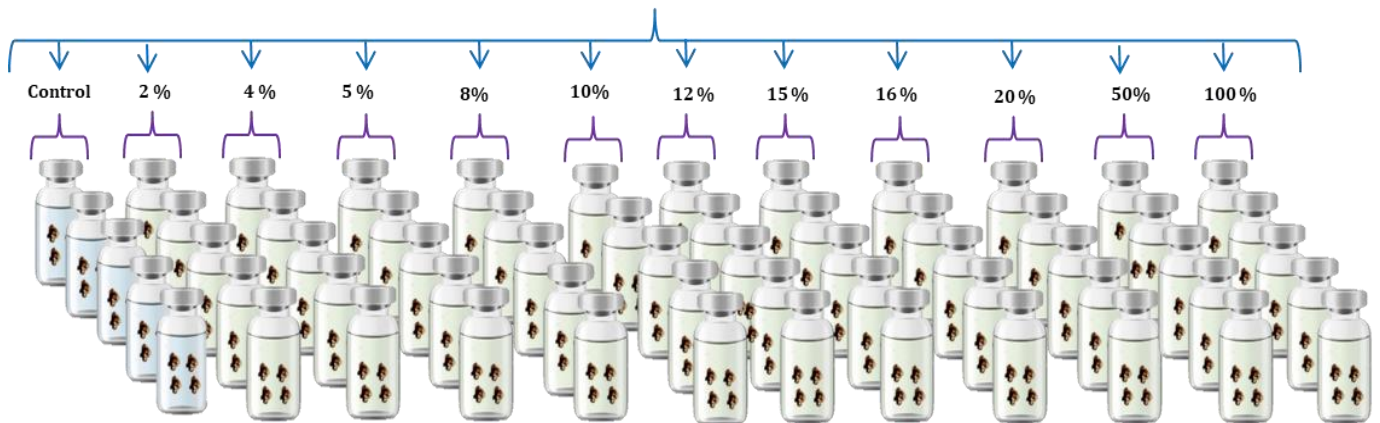


Figura 3. Diseño de los ensayos para obtener la concentración letal media (CL₅₀) con diferentes porcentajes del extracto crudo de *M. aeruginosa*, evaluado a 18 y 25°C. Cinco tratamientos + control. Cinco repeticiones por tratamiento

8.4.2. Concentración efectiva media (CE₅₀)

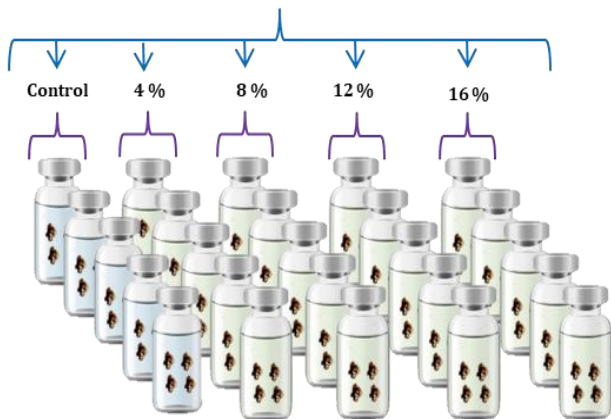
Otra prueba que se realizó para evaluar la sensibilidad fue un ensayo de concentración efectiva media, con esta prueba se buscó la concentración a la cual se produce un determinado efecto en el 50% de los organismos de este

experimento. Para esta prueba se evaluó el número de pulsaciones del corazón por minuto a 1, 2, 8 y 24 h de exposición, con ayuda de videograbaciones reproducidas a 120 cuadros/segundos. Para esto, se tomaron 10 organismos por separado, en etapa de neonatos de menos de 24 h en estado óptimo y se colocaron dentro de recipientes de vidrio con un volumen de 25 mL y 20 mL de medio. Se sometieron a disoluciones de 0, 4, 8, 12 y 16% del extracto crudo (el rango de concentración de equivalentes de microcistinas para estas disoluciones son de 0 a 2.4 $\mu\text{g L}^{-1}$) con cinco repeticiones para cada uno. Los tratamientos fueron colocados en la incubadora a 18 y 25°C con iluminación difusa.

Una vez obtenido el número de las palpitations cardiacas de *S. vetulus* los datos fueron sometidos a regresiones lineales, entre el número de palpitations y concentración de equivalentes de microcistinas del extracto crudo. Con ayuda de la regresión lineal se observó el valor de la concentración efectiva media para cada uno de los diferentes tiempos donde se midieron las palpitations cardiacas a diferentes temperaturas.

Experimentos de toxicidad aguda 18°C

Concentración efectiva media (CE₅₀)



Experimentos de toxicidad aguda 25°C

Concentración efectiva media (CE₅₀)

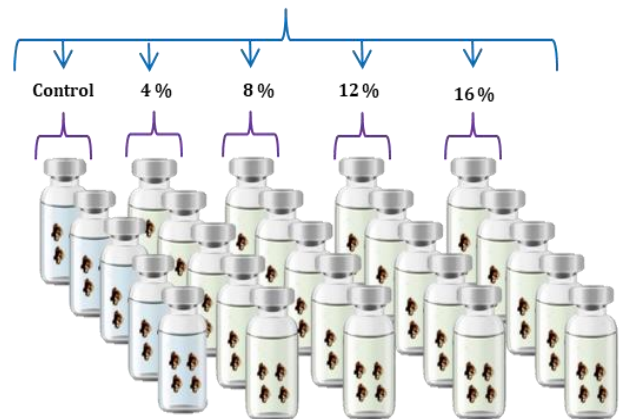


Figura 4. Diseño del ensayo de concentración efectiva media (CE₅₀) con diferentes porcentajes del extracto crudo de *M. aeruginosa*, evaluado a 18 y 25°C. Cuatro tratamientos + control. Cinco repeticiones por tratamiento

8.5. Experimentos de toxicidad crónica

Una vez obtenido el valor de CL_{50} de cada temperatura se determinaron las concentraciones subletales a partir de dichos valores, los cuales fueron 1.13% y 0.565% para 25°C (0.17 y 0.084 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente), mientras que para 18°C fueron 1.37% y 0.68% (0.21 y 0.1 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente). Para estas pruebas se escogieron experimentos de crecimiento poblacional y tabla de vida de *S. vetulus*.

8.5.1. Crecimiento poblacional

En el caso del crecimiento poblacional, se utilizaron las concentraciones subletales determinadas a partir del valor del CL_{50} . Se colocaron 10 individuos de *S. vetulus* por separado, de menos de 24 h y en estado óptimo, dentro de recipientes de vidrio con un volumen de 25 mL y 20 mL de medio, con cinco repeticiones para cada uno de los tratamientos. Los tratamientos utilizados fueron diluciones de 1.13% y 0.565% para 25°C (0.17 y 0.084 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente), mientras que para 18°C se usaron 1.37 % y 0.68% (0.21 y 0.1 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente) de extracto crudo en medio EPA con *S. acutus* como alimento a 0.5×10^6 cel mL^{-1}

Los tratamientos de ambas temperaturas se contabilizaron cada 24 h con el fin de tener un registro de los cambios en la densidad de individuos de la población con ayuda de un microscopio estereoscopio. Este procedimiento se realizó hasta que la población alcanzó un crecimiento exponencial máximo y posteriormente un decremento poblacional.

Además, de la misma manera se realizó otro experimento de crecimiento poblacional, pero sin la presencia de extractos crudos y presentando como alimento células de *M. aeruginosa* a una concentración de 0.5×10^6 cel mL^{-1} . El tratamiento junto con el grupo control, el cual contenía únicamente medio EPA con *S. acutus* como alimento a 0.5×10^6 cel mL^{-1} fueron colocados en una incubadora a 25°C, con iluminación difusa. De igual manera que los tratamientos con extracto crudo se contabilizaron cada 24 h con el fin de tener un registro de

los cambios en la densidad de individuos de la población con ayuda de un microscopio estereoscopio. Este procedimiento se realizó hasta que la población alcanzó un crecimiento exponencial máximo y posteriormente existió un decremento poblacional.

Con los datos obtenidos se realizó la gráfica de crecimiento poblacional y un gráfico exponencial de los datos, que posteriormente con ayuda de una regresión lineal se calculó de la tasa de crecimiento de la población:

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

Dónde:

N_0 : Densidad inicial de la población

N_t : Densidad de población después un tiempo

t: Tiempo en días

8.5.2. Tabla de vida

En el caso de la tabla de vida, se utilizaron las mismas concentraciones subletales del crecimiento poblacional, determinadas a partir del valor del CL_{50} . Se colocaron 10 individuos de menos de 24 h de nacidos por separado de *S. vetulus* en estado óptimo, dentro de recipientes de vidrio con volúmenes de 25 mL y 20 mL de medio, con cinco repeticiones para cada uno de los tratamientos. Los tratamientos utilizados fueron diluciones de 1.13% y 0.565% (0.17 y 0.084 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente) para 25°C, mientras que para 18°C se usaron 1.37 % y 0.68% (0.21 y 0.1 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente) de extracto crudo en medio EPA con *S. acutus* como alimento a 0.5×10^6 cel mL^{-1} .

Los tratamientos de ambas temperaturas se contabilizaron cada 24 h con el fin de tener un registro sobre el número de individuos que sobrevivía de la cohorte

original por cada día y el número de individuos que nacían por día, esto para calcular la fecundidad (estos últimos eran contabilizados y extraídos del experimento, únicamente para ver el comportamiento de la cohorte original). El experimento terminó cuando todos los individuos de la cohorte original morían, tanto en tratamientos experimentales como en el control. Estos conteos y observaciones se realizaron con ayuda de un microscopio estereoscopio.

Además, de la misma manera se realizó otro experimento de tabla de vida, pero sin la presencia de extractos crudos y presentando como alimento las células de *M. aeruginosa* a una concentración de 0.5×10^6 cel mL⁻¹. El tratamiento, junto con el grupo control el cual contenía únicamente medio EPA con *S. acutus* como alimento a 0.5×10^6 cel mL⁻¹ fueron colocados en una incubadora a una temperatura de 25°C, con iluminación difusa. De igual manera que los tratamientos con extracto crudo se contabilizaron cada 24 h con el fin de tener un registro de los cambios en la densidad de individuos de la población con ayuda de un microscopio estereoscopio. Este procedimiento se realizó hasta que la población alcanzó un crecimiento exponencial máximo y posteriormente existió un decremento poblacional. Con estas pruebas se midieron los parámetros de la tabla de vida, tales como supervivencia y los relacionados con la fecundidad, esperanza de vida, etc. Utilizando las siguientes fórmulas (Krebs,1985):

Supervivencia

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

Esperanza de vida

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

Fecundidad

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

Tasa intrínseca de crecimiento

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

Tasa bruta de reproducción

$$\sum_0^{\infty} mx$$

Tiempo Generacional

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

Tasa neta de reproducción

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

Dónde:

lx: Probabilidad de supervivencia.

nx: Número de individuos de la edad X.

mx: Fecundidad (Número de neonatos por hembra).

ex: Esperanza de vida

Tx: Tiempo que le queda de vida a la edad X

Experimentos de toxicidad crónica 18°C

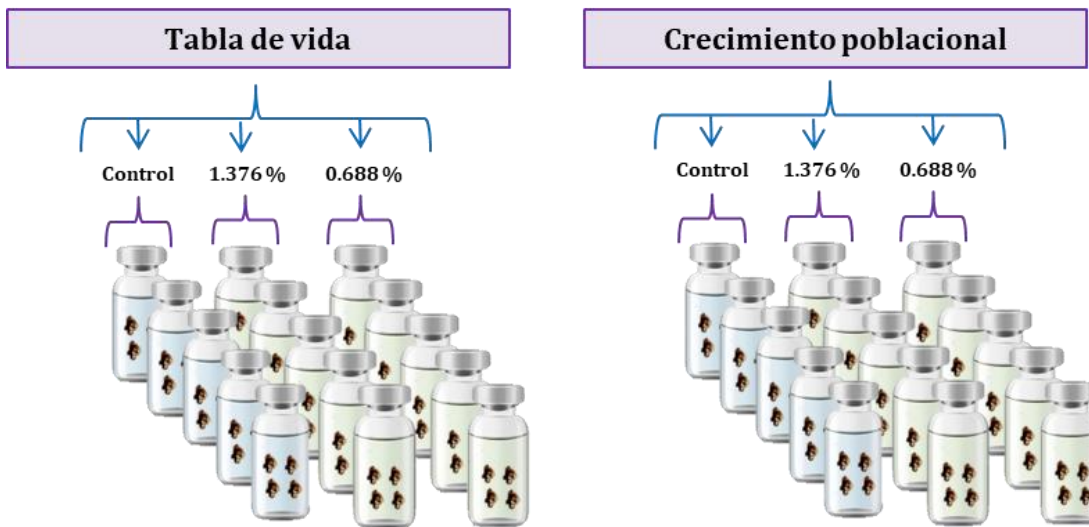


Figura 5. Diseño experimental de las pruebas de toxicidad crónica (tabla de vida y crecimiento poblacional) con extracto crudo de *M. aeruginosa*, evaluadas a 18°C. Dos tratamientos + control. Cinco repeticiones por tratamiento

Experimentos de toxicidad crónica 25°C

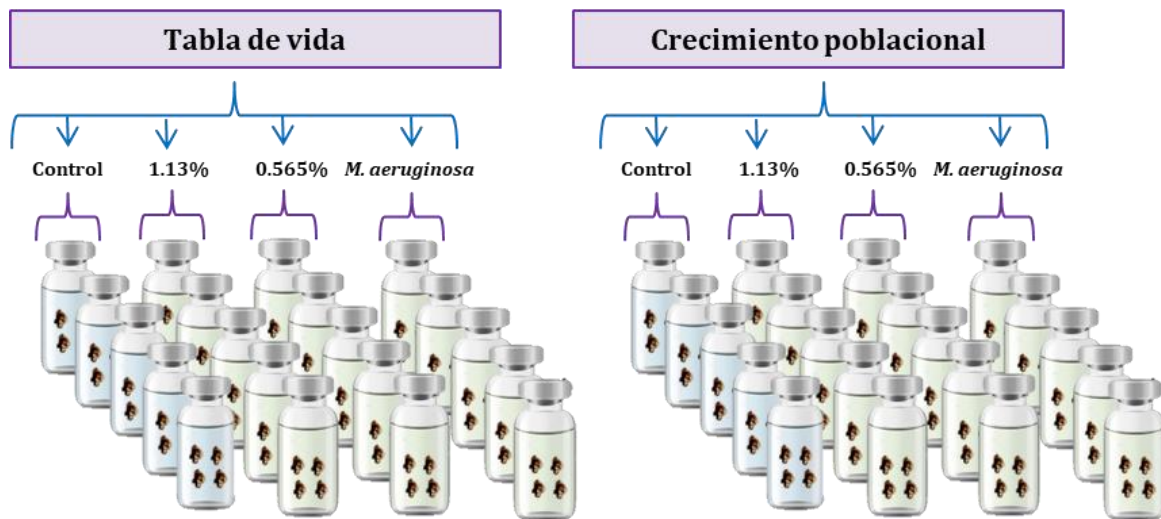


Figura 6. Diseño experimental de las pruebas de toxicidad crónica (tabla de vida y crecimiento poblacional) con extracto crudo y células individuales de *M. aeruginosa*, evaluadas a 25°C. Dos tratamientos + control. Cinco repeticiones por tratamiento

8.6. Medición de los organismos

Para la medición de los organismos se escogieron un total de cinco neonatos y adultos del experimento de crecimiento poblacional por cada repetición de los tratamientos teniendo en total 25 individuos por tratamiento a 18 y 25°C. Las mediciones se realizaron en organismos antes de iniciar el experimento y al concluir el experimento, una vez ya expuestos a los tratamientos y no expuestos (controles), se realizaron mediciones del largo y ancho del cuerpo, así como de intestino de los organismos con ayuda del programa Motic 2.0.

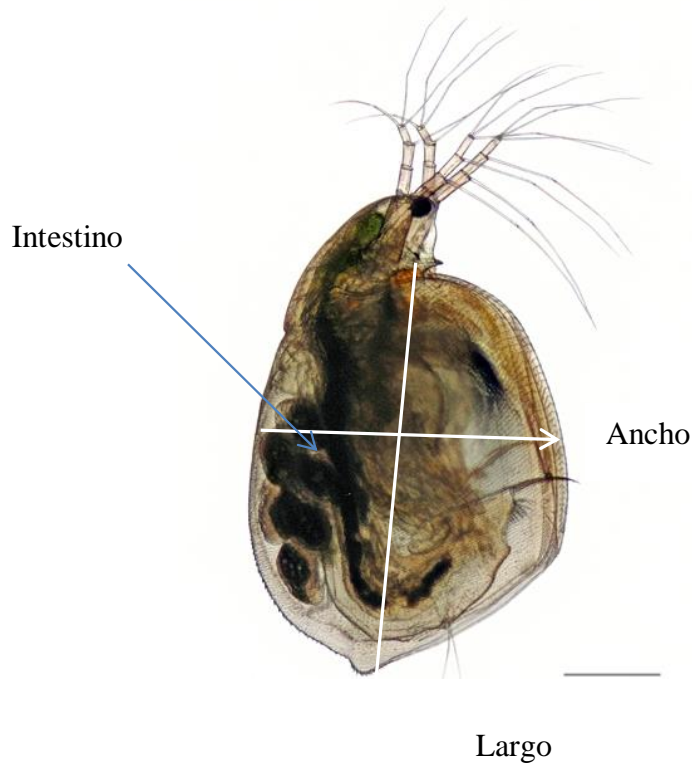


Figura 7. Puntos de medición de *S. vetulus*: ancho del cuerpo, largo del cuerpo, largo del intestino.

8.7. Análisis estadísticos

Posteriormente de realizados los experimentos y obtenidos los datos, mediante el programa SigmaPlot versión 11.0 se evaluó cada grupo de datos para obtener un análisis de las varianzas (ANDEVA) de una vía y de dos vías dependiendo de las variables a analizar en cada experimento, esto con el fin de encontrar diferencias significativas en las variables de tabla de vida para 18 y 25°C, para las densidades poblacionales y las tasas de crecimiento, como también para encontrar diferencias en el tamaño de los organismos y las pulsaciones por minuto del corazón. Obteniendo también los resultados estadísticos que permitieran realizar comparaciones múltiples entre las medias, aplicando las pruebas de rango post hoc (Tukey). Además, para cada análisis de varianza, con apoyo del mismo programa se calcularon los supuestos (normalidad, semejanza de varianza) de este análisis con el fin de tener resultados confiables.

IX. RESULTADOS

9.1. Identificación y cuantificación de cianobacterias

Segun la revisión de las muestras de la pista olimpica de remo y canotaje "Virgilio Uribe", la especie dominante de cianobacterias fue *M. aeruginosa*, como se puede observar en la figura 8.

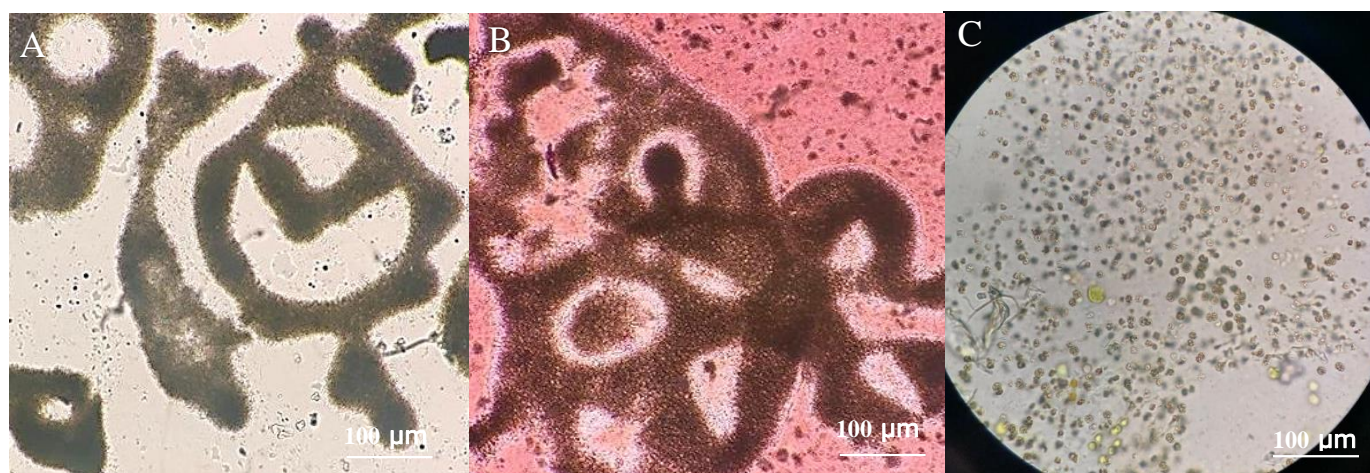


Figura 8. *M. aeruginosa* Colonias (A), delimitación del mucilago con tinta china (B) y células individuales (C)

En la tabla 3, se puede observar el tamaño de las células y las colonias de la especie *M. aeruginosa* proveniente de la pista olímpica de remo y canotaje. El diámetro promedio fue de 4.78 µm, mientras que, para las colonias al tener una forma irregular se obtuvieron promedios de 397.8 µm de largo y 476.4 µm de ancho. De igual manera se obtuvo el número aproximado de células y de las colonias por litro.

Tabla 3. Tamaño y número de colonias y células por litro de *M. aeruginosa*

Especie	Tamaño de célula (µm)	Tamaño de colonia(µm)	N. de cel/L	N. de col/L
<i>Microcystis aeruginosa</i>	4.78	397.8 de largo y 476.4 de ancho	19,664x10 ⁶	1113

9.2. Concentración de equivalentes microcistinas

La tabla 4, muestra las concentraciones de equivalentes de microcistinas de cada porcentaje de extracto crudo que fue utilizado en este trabajo. La concentración de equivalentes de microcistinas total del extracto crudo tuvo un total de 14.96 $\mu\text{g L}^{-1}$. Por otro lado, la concentración para el agua de la pista de remo y canotaje fue de 3.78 $\mu\text{g L}^{-1}$ de equivalentes de microcistinas. Para el caso de los porcentajes utilizados en las pruebas agudas la concentración osciló en un rango de 0.60 a 2.40 $\mu\text{g L}^{-1}$, y para los porcentajes de las pruebas crónicas las concentraciones estuvieron en un rango de 0.084 a 0.21 $\mu\text{g L}^{-1}$ de equivalentes de microcistinas.

Tabla 4. Concentración de los equivalentes de microcistinas LR en $\mu\text{g L}^{-1}$ calculada para cada tratamiento de todo el experimento.

Tratamientos	Concentración de equivalentes de microcistinas $\mu\text{g L}^{-1}$
Extracto 100%	14.96
• Extracto (Pruebas agudas) 50%	7.1
• Extracto (Pruebas agudas) 20%	1.80
• Extracto (Pruebas agudas) 16%	2.85
• Extracto (Pruebas agudas) 15%	2.24
• Extracto (Pruebas agudas) 12%	1.79
• Extracto (Pruebas agudas) 10%	1.47
• Extracto (Pruebas agudas) 8%	1.19
• Extracto (Pruebas agudas) 6%	0.74
• Extracto (Pruebas agudas) 4%	0.59
• Extracto (Pruebas agudas) 2%	0.24
Extracto (Valor de CL_{50} 25°C) 11.32%	1.69
Extracto (Valor de CL_{50} 18°C) 13.76%	2.05

• Extracto (Pruebas crónicas 25°C) 1.13%	0.17
• Extracto (Pruebas crónicas 25°C) 0.56%	0.084
• Extracto (Pruebas crónicas 18°C) 1.37%	0.21
• Extracto (Pruebas crónicas 18°C) 0.68%	0.10
• Valor del CE ₅₀ 25°C con 1h (2.46%)	0.36
• Valor del CE ₅₀ 25°C con 2 h (3.09%)	0.456
• Valor del CE ₅₀ 25°C con 8 h (3.75%)	0.56
• Valor del CE ₅₀ 25°C con 24 h (3.57%)	0.53
• Valor del CE ₅₀ 18°C con 1h (3.11%)	0.46
• Valor del CE ₅₀ 18°C con 2 h (3.17%)	0.47
• Valor del CE ₅₀ 18°C con 8 h (3.96%)	0.59
• Valor del CE ₅₀ 18°C con 24 h (3.95%)	0.589
Agua de la Pista olímpica de remo y canotaje	3.78

9.3. Experimentos de toxicidad aguda

9.3.1. Concentración letal media (CL₅₀)

En la figura 9, se muestra la representación gráfica los puntos de los valores de la prueba probit contra el logaritmo de la concentración de equivalentes de microcistinas contenidas en el extracto crudo, para 18 y 25°C. Desde una perspectiva general, se observa una tendencia que indica que a menor temperatura en comparación con una temperatura más alta se necesita mayor cantidad de extracto crudo para poder apreciar un efecto.

Para este caso el cálculo de la concentración se realizó con el método de probit, para cada temperatura, los valores de CL₅₀, fueron a 25°C, 11.32%, lo que corresponde a 1.69 µg L⁻¹ de equivalente de microcistinas, y a 18°C el valor de fue de 13.76% lo que corresponde por su parte a 2.05 µg L⁻¹ de equivalente de

microcistinas. Sin embargo con ayuda de la figura 9, se podría calcular con el despeje de la variable "x" y la sustitución de "y" con valores probit, de la ecuación de la recta, la cual se obtiene de la regresión lineal aplicada a los valores de probit y el logaritmo de la concentración.

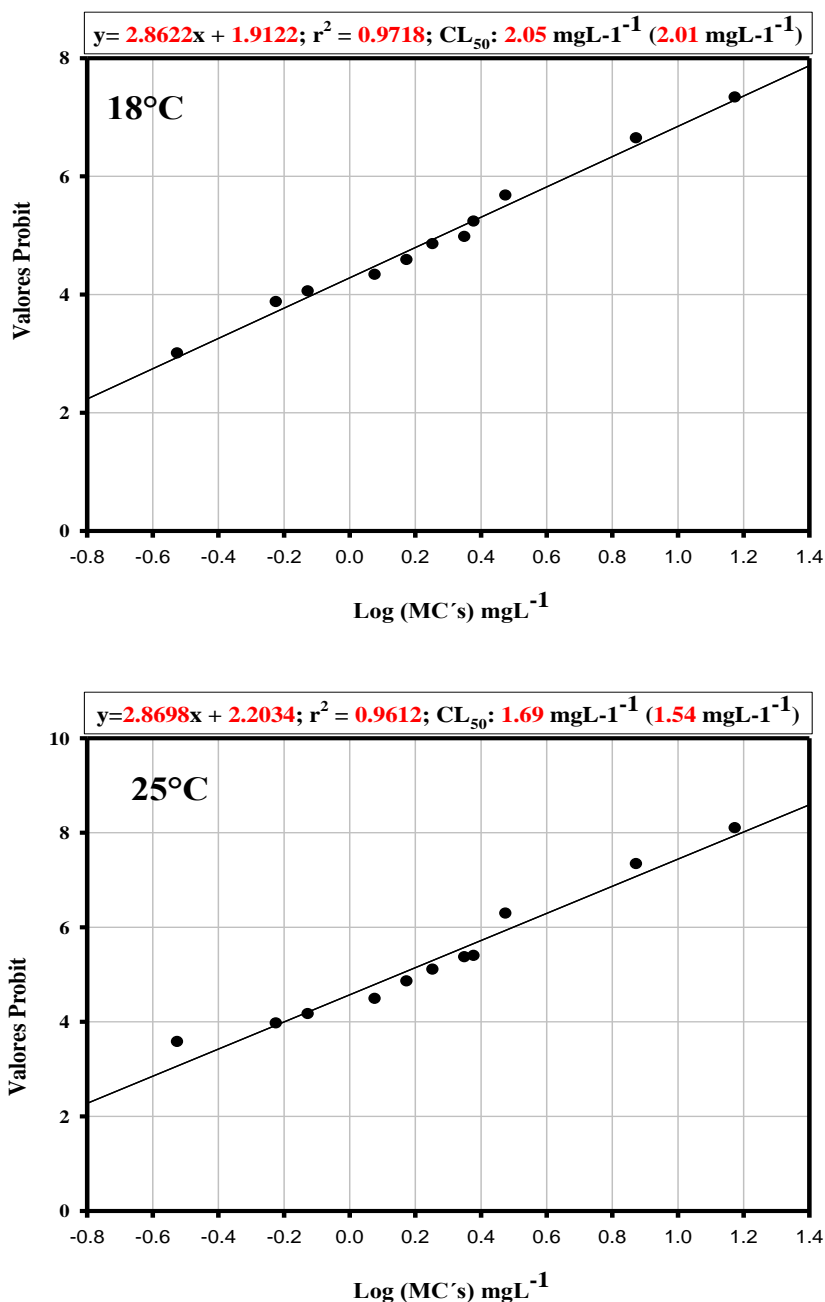


Figura 9. Representación gráfica de las unidades Probit, contra el logaritmo de la concentración de equivalentes de microcistinas contenidas en el extracto crudo, utilizados para obtener el valor de la concentración letal media (CL₅₀) en *S. vetulus*. 18°C y 25°C. Mediante una regresión lineal. R²: Coeficiente de determinación. C.V: Coeficiente de variación. Once tratamientos. Cinco repeticiones por tratamiento

9.3.2. Palpitaciones del corazón

En la figura 10 se puede observar el efecto que tiene la temperatura sobre la respuesta fisiológica cardíaca (palpitaciones por minuto) de *S. vetulus*, cuando se expone a diferentes porcentajes de extracto crudo. Se puede observar en ambas temperaturas que conforme aumenta el porcentaje de extracto crudo, existe una reducción significativa de las palpitaciones cardíacas (ANDEVA: $F= 1,271.667^*$; $p<0.001$; tabla 5). De igual forma se observa una disminución significativa de las palpitaciones con el aumento del tiempo de exposición al extracto (ANDEVA: $F= 5,062.216^*$; $p<0.001$; tabla 5).

Referente al tiempo de exposición, se observa que a menor tiempo (1 y 2 h) de exposición los tratamientos con las mayores concentraciones de equivalentes de microcistinas, reducen las palpitaciones en un 11% para 18°C y un 21% para 25°C. Mientras que después de 24 h de exposición la reducción de las palpitaciones es de 34% para 18°C y 54% para 25°C mostrando una mayor diferencia significativa (ANDEVA: $F= 1,162.354^*$; $p<0.001$; tabla 5) con respecto a 1 y 2 h, lo que indica un mayor efecto con mayor tiempo de exposición.

Por otro lado, haciendo una comparación en las palpitaciones (Fig. 10) con respecto a las temperaturas, se puede observar una diferencia significativa en el número de palpitaciones por minuto, obteniendo promedios de 454 palpitaciones/min para los tratamientos controles de 25°C y 314 palpitaciones/min para los controles de 18°C, disminuyendo significativamente este promedio para cada temperatura (ANDEVA: $F= 10,4056.06$; $P<0.001^*$, tabla 5), conforme aumenta el porcentaje de extracto crudo y el tiempo de exposición. Se enfatiza que la temperatura tiene el mayor efecto sobre el número de palpitaciones/min.

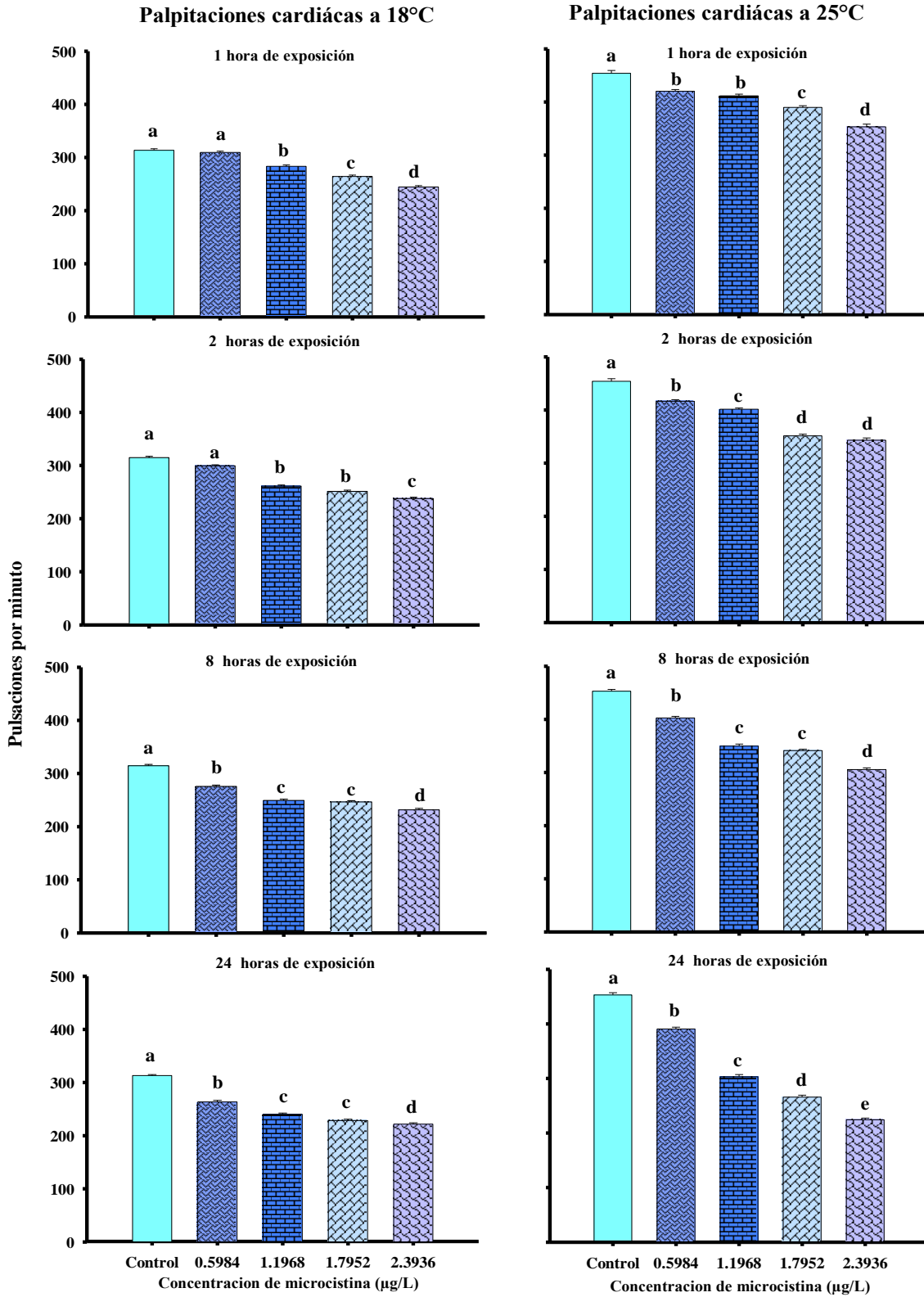


Figura 10. Representación gráfica a 18 y 25°C de las palpitations cardiacas de *S. vetulus* con relación al tiempo de exposición y a la concentración de equivalentes de microcistinas. Medía obtenida de cinco repeticiones \pm error estándar. Letras representan diferencias significativas entre tratamientos (Tukey $p < 0.05$).

Tabla 5. Análisis de varianza de tres vías (ANDEVA). Para determinar si existen diferencias significativas entre la concentración de extracto crudo y el tiempo de exposición, sobre las pulsaciones cardíacas de *S. vetulus*. Donde, DF: Grados de Libertad, SS: Suma de Cuadrados, MS: Media de cuadrados, *F*: Prueba de Fisher, *p*: Valor P. * indica que el valor es significativo con 0.001, ns = no significativo

Pulsaciones del corazón a 18° y 25 ° C					
Fuente de variación	DF	SS	MS	<i>F</i>	<i>p</i>
Concentración	4	585813.072	146453.27	15033.697	<0.001*
Hora de Exposición	3	147943.275	49314.425	5062.216	<0.001*
Temperatura	1	1013679.469	1013679.5	104056.06	<0.001*
Concentración x Temperatura	4	49552.628	12388.157	1271.667	<0.001*
Hora de Exposición x Temperatura	3	33969.808	11323.269	1162.354	<0.001*
Concentración x Hora de Exposición	12	34354.706	2862.892	293.881	<0.001*
Residual	320	3117.333	9.742		
Total	359	1920863.531	5350.595		

9.3.3. Concentración efectiva media (CE₅₀)

En la figura 11 se muestran las regresiones lineales con la cuales se obtuvo el valor de la concentración efectiva media para cada hora de exposición y temperatura. Los CE₅₀ para 18°C, estuvieron en un rango de 1.71 a 2.01 µg L⁻¹ y a 25°C de 0.40 a 1.56 µg L⁻¹. Con estos rangos, se observa una tendencia que indica que, a menor temperatura en comparación con una temperatura más alta, se necesita mayor cantidad de extracto crudo para poder observar un efecto.

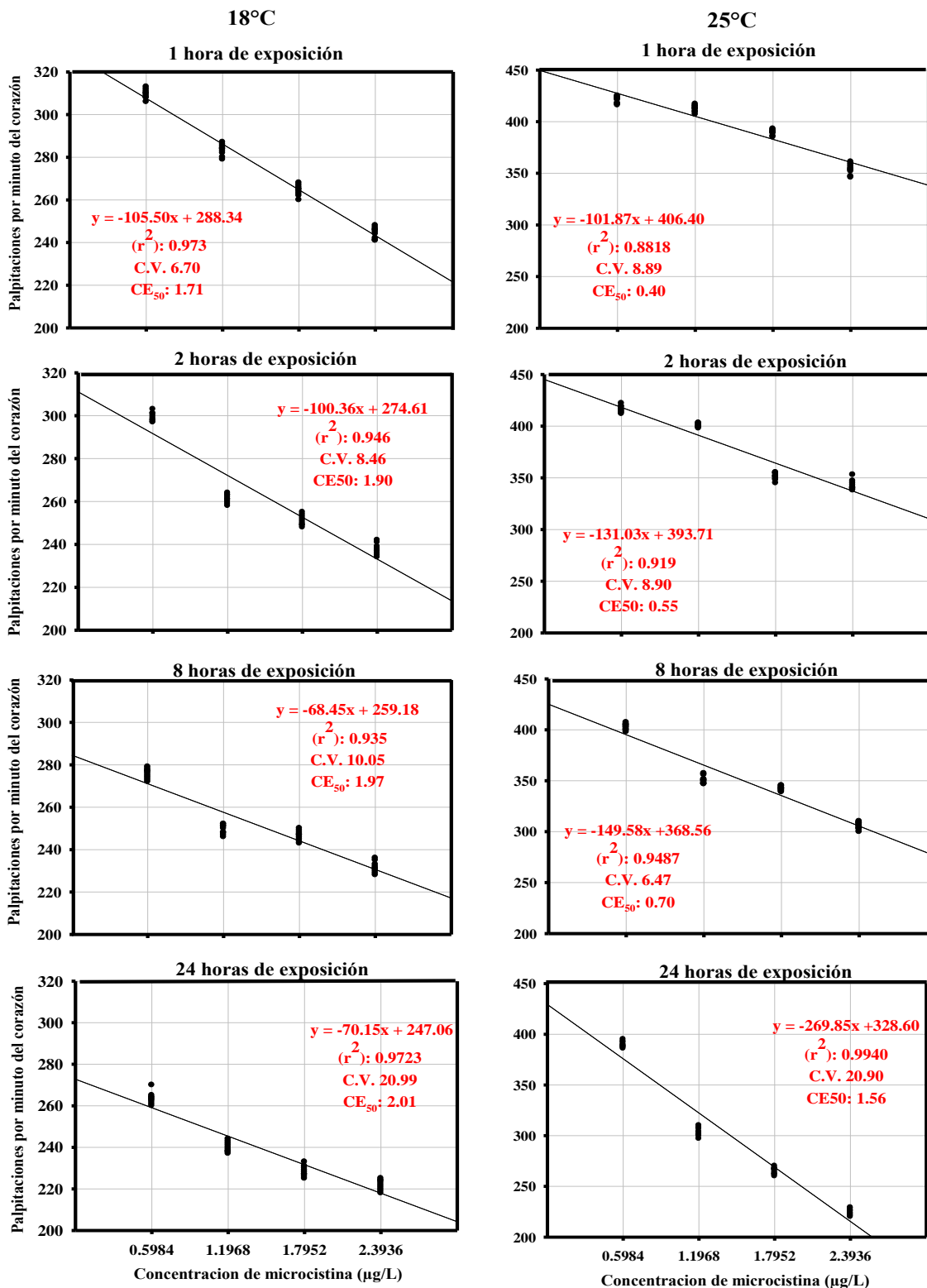


Figura 11. Representación gráfica de la concentración efectiva media (CE₅₀) a diferentes tiempos con respecto a los porcentajes de extracto crudo y a la variación de las palpitations cardíacas en *S. vetulus* a una temperatura de 18° y 25°C. Mediante una regresión lineal. R²: Coeficiente de determinación. C.V: Coeficiente de variación. Obtenido de cuatro tratamientos. Cinco repeticiones por tratamiento.

9.4. Experimentos de toxicidad crónica (Células de *M. aeruginosa*)

9.4.1. Supervivencia (I_x), Fecundidad (m_x) y Densidad poblacional.

Las curvas de supervivencia de *S. vetulus* en el tratamiento con células de *M. aeruginosa*, muestra que la capacidad de la población de sobrevivir es inferior con un total de 25 días de supervivencia en comparación con el grupo control que obtuvo un total de 31 días (Fig. 12).

En el caso de la fecundidad se puede observar una tendencia dónde la reproducción en el tratamiento control, comenzó a partir del día 8 obteniendo un primer pico máximo de reproducción en el día 24 y un segundo pico en el día 30, concluyendo su ciclo de reproducción en el día 38. Realizando la comparativa correspondiente con el tratamiento donde *M. aeruginosa* fue proporcionada como único alimento, la reproducción comenzó a partir del día 4, presentando dos picos máximos de reproducción en los días 12 y 16 respectivamente y finalizando su ciclo reproductivo el día 22 (Fig. 12).

Por último, para la curva de crecimiento poblacional de *S. vetulus* en ausencia de células de *M. aeruginosa* se obtuvo un promedio de 108 ind mL⁻¹ (Fig. 12). Es notable apreciar una diferencia significativa en la densidad de individuos con el tratamiento con *M. aeruginosa* como alimento. Siendo la densidad del tratamiento de 29 ind mL⁻¹.

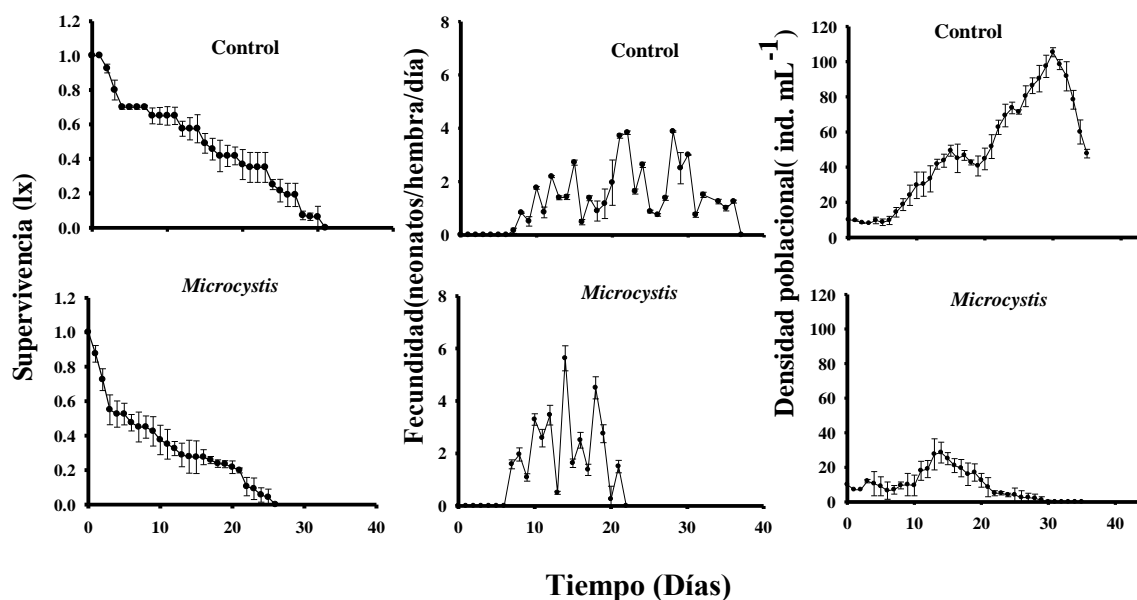


Figura 12. Supervivencia (I_x), Fecundidad (m_x) y Densidad poblacional de *S. vetulus* con células individuales de *M. aeruginosa* como dieta. Medía obtenida de cinco repeticiones \pm error estándar.

9.4.2. Parámetros demográficos (tabla de vida y crecimiento poblacional)

El tratamiento control de *S. vetulus* mostró los valores de mayor tamaño en la variable promedio de vida, alcanzando un total de 16 días (Fig. 13). Los resultados obtenidos demuestran que estos organismos al estar en contacto y consumir *M. aeruginosa* en comparación con el control reducen su promedio de vida con diferencias significativa entre ellos, alcanzado 6 días respectivamente (ANDEVA: $F= 21.227$; $P<0.001^*$, tabla 6).

Los datos obtenidos para la esperanza de vida, resultaron seguir la misma tendencia de los datos del promedio de vida, el valor más alto obtenido (12 días) fue para el control, que contenía medio EPA y *S. acutus* a 0.5×10^6 cel mL^{-1} como alimento, decreciendo para el caso del tratamiento de *M. aeruginosa* como alimento, la esperanza de vida fue de 5 días (Fig.13), con diferencia significativas (ANDEVA: $F= 20.703$; $P<0.001^*$, tabla 6) con respecto al control.

El tiempo generacional para el control, se encontró alrededor de los 20 días, siendo significativamente mayor en comparación con el tratamiento de *M.*

aeruginosa, el cual disminuyó hasta los 15 días (ANDEVA: $F= 29.1$; $P<0.001^*$, tabla 6),

En cuanto a la evaluación de las variables reproductivas, la tasa de reproducción bruta demostró tener una mayor reproducción en el grupo control alcanzado valores en promedio de más de 48 neonatos por día (Fig. 13) en comparación con el tratamiento de *M. aeruginosa* como alimento, que fue significativamente menor, observando una reducción en su reproducción, con menos de 40 neonatos por día aunque no existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos (ANDEVA: $F= 1.686$; $P 0.242$, tabla 6).

Por otro lado, la tasa reproductiva neta mostró una tendencia similar existiendo un mayor número de neonatos sobrevivientes en el tratamiento control con un promedio de 18 neonatos por día. Se obtuvo una diferencia significativa en comparación con el tratamiento de *M. aeruginosa* (ANDEVA: $F= 27.721$; $P<0.001^*$, tabla 6) el cual obtuvo en promedio un total de 10 neonatos por día (Fig. 13).

Por último, la tasa de crecimiento poblacional (r) de *S. vetulus* para el caso de la tabla de vida, muestra la misma tendencia observada con anterioridad, siendo el grupo control el que tuvo una mayor tasa de crecimiento de la población con 0.12 ind d^{-1} (Fig. 13), presentando diferencia significativa (ANDEVA: $F= 9.29$; $P 0.023$, tabla 6) con el tratamiento de *M. aeruginosa* que obtuvo un promedio de 0.10 ind d^{-1} (Fig. 13).

Finalmente, es posible observar que la tasa de crecimiento en el crecimiento poblacional presentó la misma tendencia que su contraparte de la tabla de vida con un total de 0.09 d^{-1} para el grupo control (Fig. 13). Por otro lado, se aprecia que el tratamiento de *M. aeruginosa* como alimento tuvo un mayor impacto sobre el crecimiento alcanzando una tasa de crecimiento promedio de 0.04 d^{-1} presentando diferencias significativas (ANDEVA: $F= 124.442$; $P<0.001^*$, tabla 6) respecto al tratamiento control.

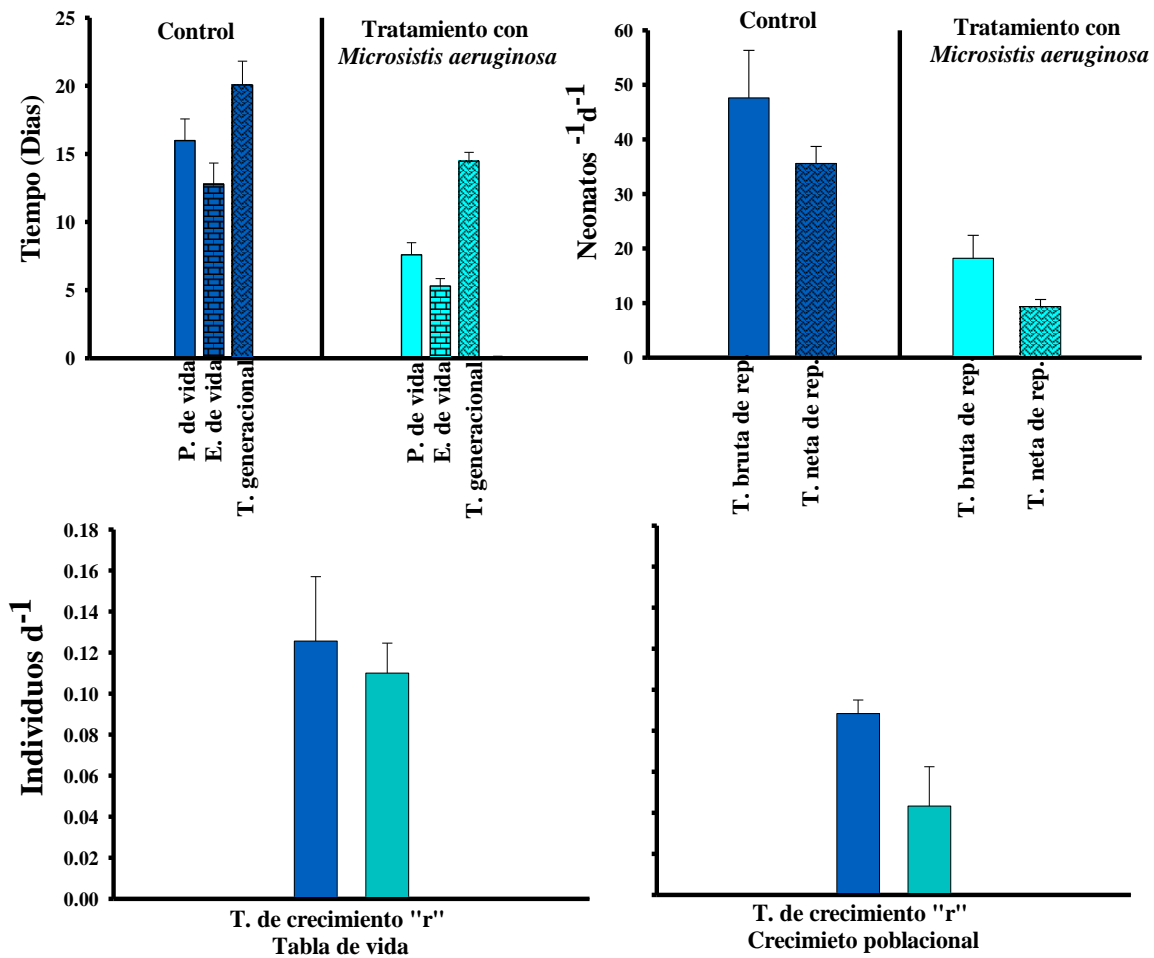


Figura 13. Variables demográficas de *S. vetulus*, con células individuales de *M. aeruginosa*. Medía obtenida de cinco repeticiones \pm error estándar. Letras representan diferencias significativas entre tratamientos.

Además, cabe resaltar que las tasas de crecimiento de la tabla de vida y del crecimiento poblacional resultaron ser diferentes entre sí, con respecto a los individuos por día, lo que podría indicar por la naturaleza de cada prueba que se están presentado interacciones entre las especies, como la competencia intraespecífica.

Tabla 6. Análisis de varianza una vía (ANDEVA). Para determinar si existen diferencias significativas entre el tratamiento con una dieta de *M. aeruginosa* a concentración de 0.5×10^6 cel mL⁻¹. Y el tratamiento testigo con una dieta de *S. acutus* a concentración de 0.5×10^6 cel mL⁻¹, sobre las variables demográficas de *S. vetulus*. Donde, DF: Grados de Libertad, SS: Suma de Cuadrados, MS: Media de cuadrados, *F*: Prueba de Fisher, P: Valor P. * indica que el valor es significativo con 0.001, ns = no significativo.

Promedio de vida					
Fuente de variación	DF	SS	MS	F	P
Entre grupos	1	140.74	140.74	21.227	<0.001*
Residual	6	39.781	6.63		
Total	7	180.521			
Esperanza de vida					
Entre grupos	1	111.751	111.751	20.703	<0.001*
Residual	6	32.388	5.398		
Total	7	144.139			
Tasa bruta de reproducción					
Entre grupos	1	288.5	288.5	1.686	0.242 ns
Residual	6	1026.798	171.133		
Total	7	1315.298			
Tasa neta de reproducción					
Entre grupos	1	147.981	147.981	27.721	<0.001*
Residual	6	32.029	5.338		
Total	7	180.011			
Tiempo generacional					
Entre grupos	1	62.824	62.824	29.1	<0.001*
Residual	6	41.42	6.903		
Total	7	104.244			
Tasa de crecimiento (Tabla de vida)					
Entre grupos	1	0.00859	0.00859	9.29	0.023 ns
Residual	6	0.00555	0.000925		
Total	7	0.0141			
Tasa de crecimiento (Crecimiento poblacional)					
Entre grupos	1	0.00289	0.00145	124.442	<0.001*
Residual	9	0.000105	0.0000116		
Total	11	0.003			

9.5. Experimentos de toxicidad crónica (Extracto crudo y temperatura)

9.5.1. Supervivencia (I_x) y Fecundidad (m_x)

Las curvas de supervivencia de *S. vetulus* obtenidas a temperaturas diferentes muestran situaciones en común, como el hecho de que a mayor porcentaje del extracto crudo, es mayor la concentración de equivalentes de microcistinas y a su vez será menor la capacidad de la población para sobrevivir. Por otro lado, se observa que a 25°C en el caso del tratamiento control la supervivencia alcanzó un máximo de 32 días a comparación con los 41 días de supervivencia a 18 °C, lo que nos indica que a menor temperatura la supervivencia es mayor (Fig. 14).

Además, en presencia del extracto crudo existe una tendencia hacia la reducción de la supervivencia, la cual es mayor cuando la temperatura es alta (25°C), lo que indicaría una sinergia entre la concentración de equivalentes de microcistinas del extracto crudo y la temperatura.

Por otro lado, de manera más detallada, la supervivencia de *S. vetulus* en los tratamientos controles a 18°C fue de 41 días, presentando diferencias significativas con su contraparte de 25°C (ANDEVA: $F= 147$; $P<0.001^*$, tabla 7), el cual tuvo una supervivencia de 31 días. En presencia del extracto crudo los tratamientos que tenían una concentración de equivalentes de microcistinas de 0.10 $\mu\text{g L}^{-1}$ para 18°C y 0.084 $\mu\text{g L}^{-1}$ para 25°C (concentraciones bajas), la supervivencia fue de 39 y 26 días respectivamente presentando diferencias significativas entre sí (ANDEVA: $F= 49.148$; $P<0.001^*$, tabla 7) pero no con sus respectivos tratamientos controles. Por último, en presencia del extracto crudo con concentraciones de 0.21 $\mu\text{g L}^{-1}$ para 18°C y 0.17 $\mu\text{g L}^{-1}$ para 25°C (concentraciones altas), la supervivencia disminuyó a 33 y 18 días respectivamente, con diferencias significativas entre sí y con los tratamientos controles ($P<0.001$ ANDEVA: $F= 49.148$; $P<0.001^*$, tabla 7).

Tabla 7. Análisis de varianza de dos vías (ANDEVA). Para determinar si existen diferencias significativas entre la concentración de equivalentes de microcistinas del extracto crudo y la temperatura de exposición, sobre la supervivencia de *S. vetulus*. Donde, DF: Grados de Libertad, SS: Suma de Cuadrados, MS: Media de cuadrados, *F*: Prueba de Fisher, P: Valor P. * indica que el valor es significativo con 0.001, ns = no significativo

Fuente de variación	DF	SS	MS	<i>F</i>	P
Temperatura	1	661.5	661.5	147	<0.001*
Concentración	2	442.333	221.167	49.148	<0.001*
Temperatura x Concentración	2	7	3.5	0.778	0.474 ns
Residual	18	81	4.5		
Total	23	1191.833	51.819		

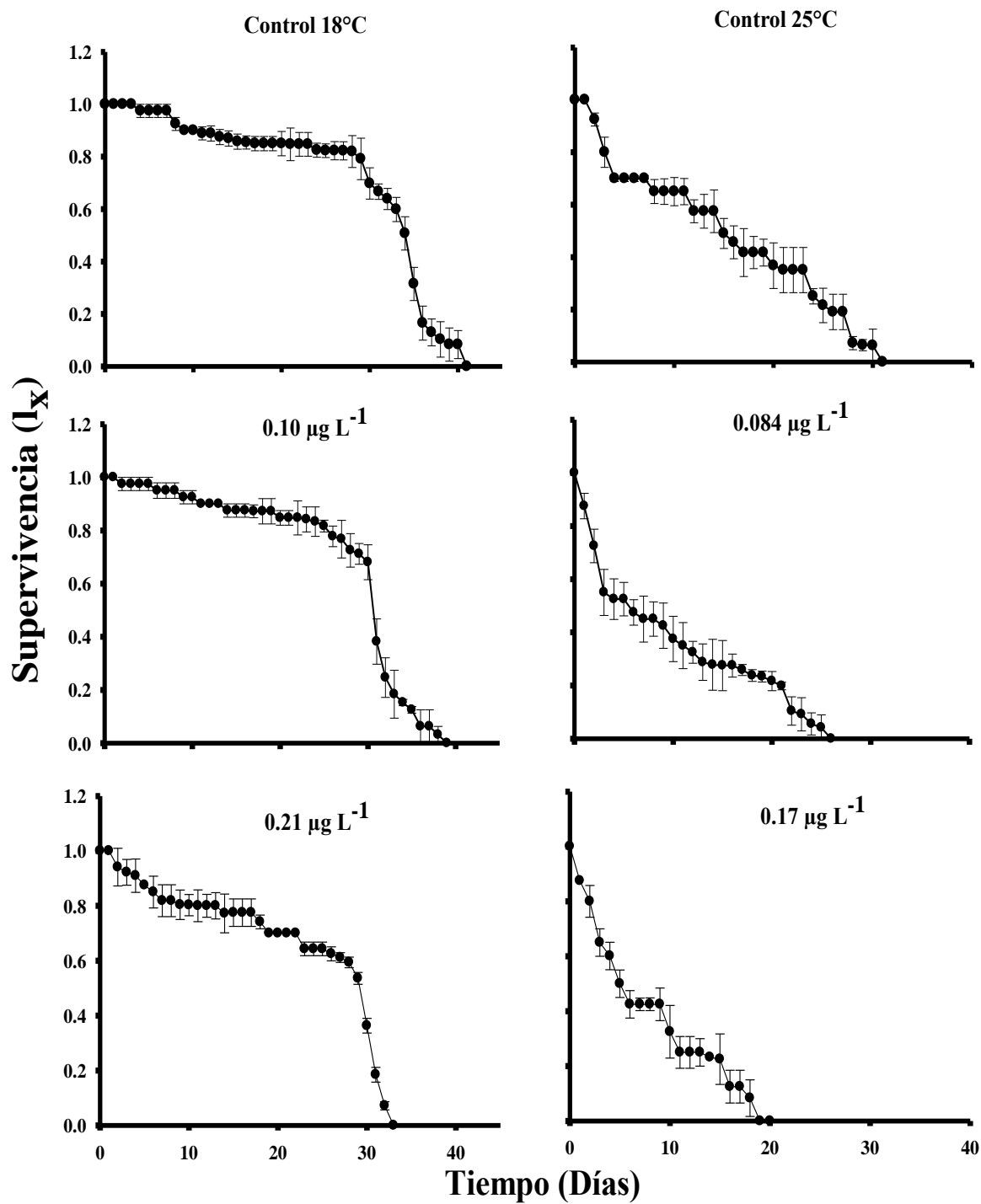


Figura 14. Supervivencia (I_x) de *S. vetulus* en tratamientos de extracto crudo con diferentes concentraciones de equivalentes de microcistinas a 18 y 25°C. Media obtenida de cinco repeticiones ± error estándar.

Por otro lado, para el caso de la fecundidad se pueden observar patrones diferentes con respecto a la temperatura. En todos los tratamientos, se observa en primera instancia que los picos de reproducción son mayores a 25°C en comparación con 18°C y el tiempo de reproducción fue menor a 25°C en presencia del extracto crudo en comparación a los 18°C (Fig. 15).

Por otra parte, con respecto al inicio y término de la reproducción para el caso de los tratamientos controles (25°C y 18°C), la reproducción comenzó a partir del día 8 y día 9 respectivamente. Se obtuvieron picos máximos de reproducción en el día 24 y un segundo pico en el día 30 en 25°C. Para el caso de 18°C los picos de máxima reproducción los tuvo los días 22 y 26. Los ciclos de reproducción concluyeron los días 29 y 38 respectivamente. De igual manera se observa que a 18°C la reproducción con respecto al número de crías por día es menor que a 25°C.

Para los tratamientos con concentraciones bajas de equivalentes de microcistinas (0.10 $\mu\text{g L}^{-1}$ para 18°C y 0.084 $\mu\text{g L}^{-1}$ para 25°C), la reproducción comenzó los días 10 y 6 respectivamente (Fig. 15), obteniendo el primer pico de reproducción los días 11 y 7 respectivamente. Posteriormente, se registró para ambos casos un segundo pico de reproducción que resultaban ser mayores al primero los días 28 y 17. Cabe resaltar que, respecto al tratamiento de concentración baja a 18°C el tiempo de reproducción fue mayor en comparación con su grupo control, lo que indicaría un efecto de hormesis (respuesta bifásica a un agente ambiental caracterizada por una estimulación de dosis baja o efecto beneficioso y un efecto inhibitor o tóxico de dosis alta (Calabrese y Brain, 2005). Sin embargo, este efecto únicamente se observa a bajas temperaturas. Por otro lado, en comparación con los controles y las concentraciones altas (0.21 $\mu\text{g L}^{-1}$ para 18°C y 0.17 $\mu\text{g L}^{-1}$ para 25°C), los tratamientos con concentraciones bajas de equivalentes de microcistinas, fueron los que mostraron los picos con mayor reproducción para 25 y 18°C.

Por último, para los tratamientos con concentraciones altas ($0.21 \mu\text{g L}^{-1}$ para 18°C y $0.17 \mu\text{g L}^{-1}$ para 25°C) la reproducción comenzó los días 11 y 7, obteniendo para el caso de 25°C solamente un pico de reproducción en el día 12, concluyendo el ciclo reproductivo el día 20 (Fig. 15). Para el tratamiento a 18°C los picos máximos de reproducción se registraron los días 22 y 27, concluyendo el ciclo reproductivo a los 29 días del comienzo.

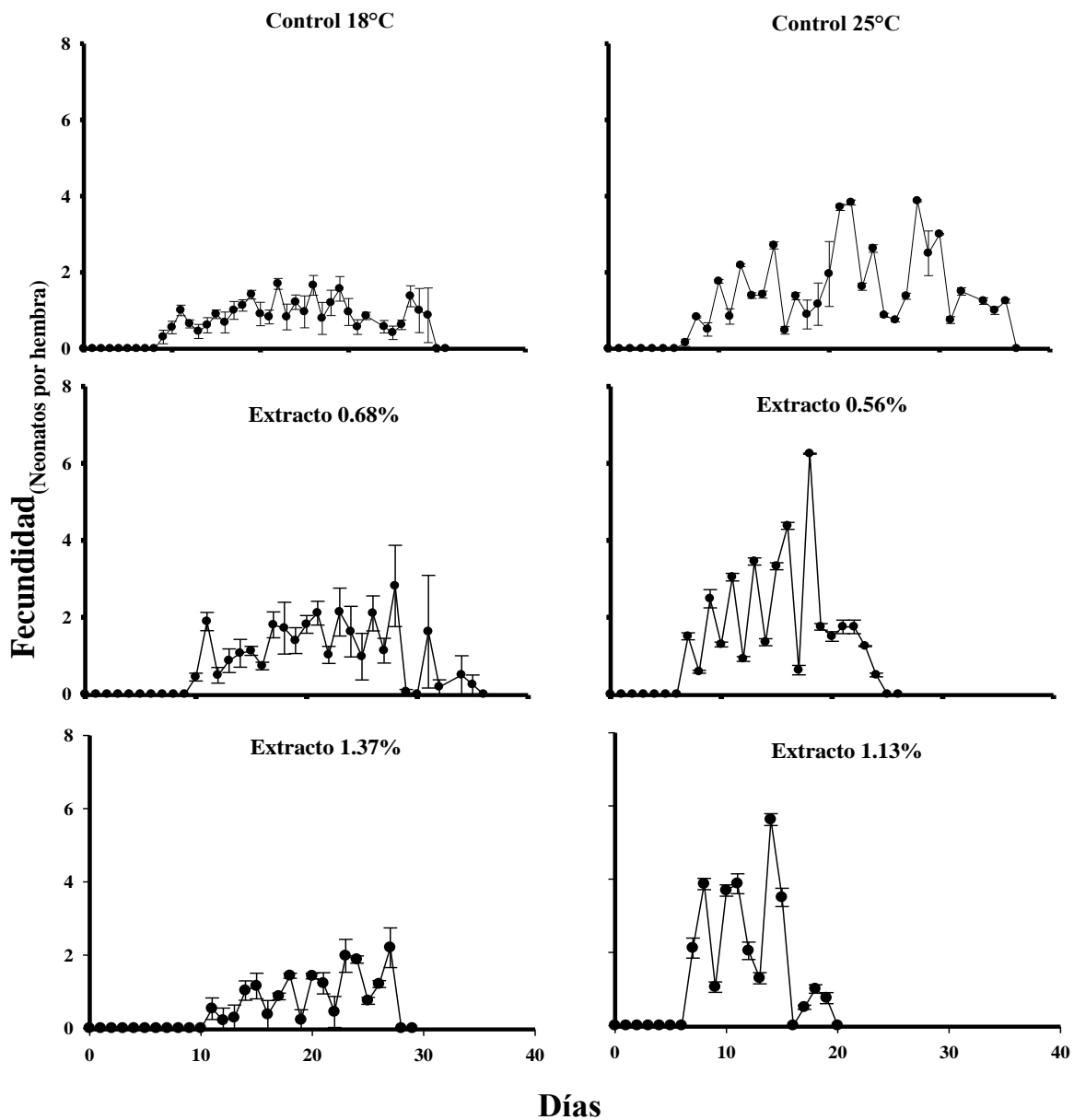


Figura 15. Fecundidad (m_x) de *S. vetulus* con diferentes concentraciones de equivalentes de microcistinas en el extracto crudo a 18 y 25°C . Media obtenida de cuatro repeticiones \pm error estándar.

9.5.2. Edad de la primera reproducción

En la figura 16, se muestran los días de las primeras reproducciones basadas en la prueba de fecundidad para los tratamientos controles concentraciones bajas y altas de 18 y 25°C. Se puede observar que a alta temperatura (25°C), el día de la primera reproducción fue el mismo para el tratamiento control y los tratamientos experimentales (día 7), mientras que, para 18°C los días de la primera reproducción fueron para el tratamiento control el día 9, para el tratamiento de concentración baja el día 10 y para el tratamiento de concentración alta fue el día 11. Estas tendencias en ambas temperaturas nos podría indicar un estrés que está dado por las altas temperaturas, independientemente de la concentración de equivalentes de microcistinas del extracto crudo. Además, se observa que existen diferencias significativas entre las dos temperaturas con respecto a los días de la primera reproducción (ANDEVA: $F= 121$; $P<0.001^*$, tabla 8).

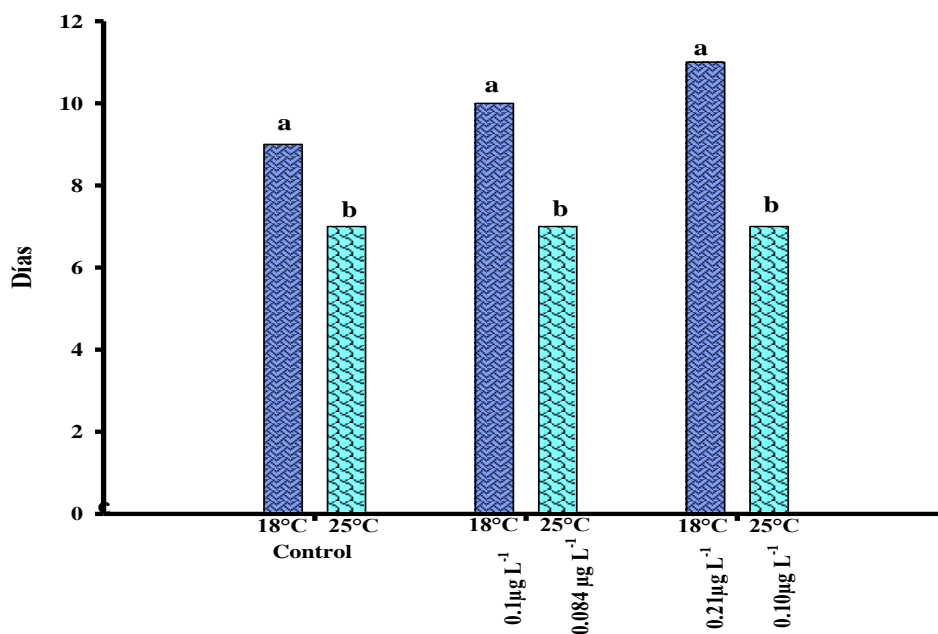


Figura 16. Días de la primera reproducción de *S. vetulus* en tratamientos con concentraciones de equivalentes de microcistinas ($\mu\text{g L}^{-1}$) a 18 y 25°C. Media obtenida de cinco repeticiones \pm error estándar. Letras representan diferencias significativas entre tratamientos (Tukey $p<0.05$).

Tabla 8. Análisis de varianza de dos vías (ANDEVA). Para determinar si existen diferencias significativas en la edad de la primera reproducción con la influencia de la temperatura (18 y 25°C) sobre el efecto del extracto crudo de *M. aeruginosa*. Donde, DF: Grados de Libertad, SS: Suma de Cuadrados, MS: Media de cuadrados, *F*: Prueba de Fisher, P: Valor P. * indica que el valor es significativo con 0.001, ns = no significativo.

Edad de la primera reproducción					
Fuente de variación	DF	SS	MS	F	P
Temperatura	1	45.375	45.375	121	<0.001*
Concentración	2	0.583	0.292	0.778	0.474 ns
Temperatura x Concentración	2	5.25	2.625	7	0.006 *
Residual	18	6.75	0.375		
Total	23	57.958	2.52		

9.5.3. Parámetros demográficos (tabla de vida)

En la figura 17, se observan las diferentes variables demográficas medidas para este experimento. En el caso del promedio de vida se observa la tendencia, donde a mayor temperatura menor es el promedio de vida, presentando diferencias significativas (ANDEVA: $F= 143.831$; $P<0.001^*$, tabla 9) en comparación con la baja temperatura, sin importar las concentraciones de equivalentes de microcistinas. Por otro lado, con respecto a la concentración de equivalentes de microcistinas en el extracto crudo, se observa una tendencia hacia la disminución del promedio de vida conforme aumenta la concentración de estas sin importar la temperatura a la que se encuentre, pero remarcando que un efecto combinado de temperatura-toxina; el tratamiento de concentración alta a 25°C fue el tratamiento más afectado por estas variables presentando diferencias significativas con el resto de los tratamientos (ANDEVA: $F= 34.572$; $P<0.001^*$, tabla 9).

Los datos obtenidos en la esperanza de vida resultaron seguir la misma tendencia que los datos del promedio vida, los valores más altos obtenidos fueron en los controles (27 días para 18°C y 12 días para 25°C), que contenían medio EPA y *S. acutus* a 0.5×10^6 cel mL⁻¹ como alimento, disminuyó consecuentemente conforme aumentó la concentración de equivalentes de microcistinas y remarcando una mayor supervivencia a temperaturas bajas. Nuevamente, es claro

observar que existe un efecto combinado de temperatura-toxina con un mayor impacto en los tratamientos a 25°C, presentando diferencias significativas con el resto de los tratamientos a 18°C (ANDEVA: $F= 33.375$; $P<0.001^*$, tabla 9).

En cuanto a la evaluación de las variables reproductivas, la tasa de reproducción bruta demostró tener una mayor reproducción en el control, alcanzado valores en promedio de más de 48 neonatos por día a 25°C (Fig. 17). Mientras que, a 18°C el tratamiento control con 25 neonatos por día fue significativamente menor (ANDEVA: $F= 13.292$; $P<0.001^*$, tabla 9) con su contraparte. Cabe resaltar que en las variables reproductivas a una baja temperatura (18°C) y a una baja concentración de equivalentes de microcistinas ($0.10 \mu\text{g L}^{-1}$) el número de neonatos por día es significativamente mayor (Tukey $p<0.05$) en comparación con el tratamiento control, lo que indicaría que existe un estímulo por las bajas concentraciones de las toxinas (hormesis). Sin embargo, este efecto de estímulo no se observa a 25°C, por lo que en este caso el número de neonatos por día disminuye de manera significativa (ANDEVA: $F= 5.061$; $P 0.018$ tabla 9) con el aumento de la concentración.

La tasa reproductiva neta mostró una tendencia similar a la tasa de reproducción bruta, existiendo una mayor reproducción en el tratamiento control a 25°C en comparación con los neonatos por día del grupo control a 18°C. Por otro lado, a baja temperatura (18°C) se observa que en los tratamientos de baja concentración de equivalentes de microcistinas ($0.10 \mu\text{g L}^{-1}$) al igual que en la tasa de reproducción bruta, el número de neonatos por día es significativamente mayor (ANDEVA: $F= 57.278$; $P<0.001^*$, tabla 9) en comparación con el tratamiento control, lo que indicaría que existe un estímulo por parte de las bajas concentraciones de las toxinas (hormesis) (Fig. 17).

El tiempo generacional para los tratamientos controles (18 y 25°C) fueron de alrededor de 22 y 20 días respectivamente, mostrando diferencias significativas con respecto a sus respectivos tratamientos experimentales (ANDEVA: $F= 27.722$;

P<0.001*, tabla 8). Cada uno de los tratamientos disminuyó significativamente (ANDEVA: $F= 27.722$; P<0.001*, tabla 8) su tiempo de generación con el aumento de la concentración de equivalentes de microcistinas, esto sin tener un efecto claro de la temperatura (Fig. 17).

La tasa de crecimiento poblacional (r) de *S. vetulus* muestra una tendencia en la cual existe mayor crecimiento en el experimento de 25°C en comparación con 18°C, presentando en esta ocasión un efecto de estímulo por parte del tratamiento de concentración baja. Para el caso de los controles, se obtuvieron tasas de crecimiento de 0.08 d⁻¹ para 18°C y 0.12 d⁻¹ para 25°C con diferencias significativas entre ellos (ANDEVA: $F= 122.075$; P<0.001*, tabla 9). Cabe resaltar que en ambas temperaturas las tasas de crecimiento en los tratamientos con concentraciones bajas de equivalentes de microcistinas fueron significativamente mayores (ANDEVA: $F= 19.147$; P<0.001*, tabla 9) en comparación con el control, lo que indicaría el efecto antes mencionado (hormesis). Por último, en los tratamientos con concentraciones de 0.21 µg L⁻¹ para 18°C y 0.17 µg L⁻¹ para 25°C (concentraciones altas), es notable observar los valores de la tasa de reproducción para cada uno de sus respectivos casos, ya que fueron los que tuvieron menor tasa de crecimiento con 0.04 d⁻¹ y 0.1 d⁻¹ respectivamente sin presentar diferencia significativa para cada tratamiento (ANDEVA: $F= 0.767$; P 0.469, tabla 9). (Fig. 17). Además, entre estos dos tratamientos es notorio observar que existe una diferencia significativa con respecto a la temperatura (ANDEVA: $F= 122.075$; P<0.001*, tabla 9).

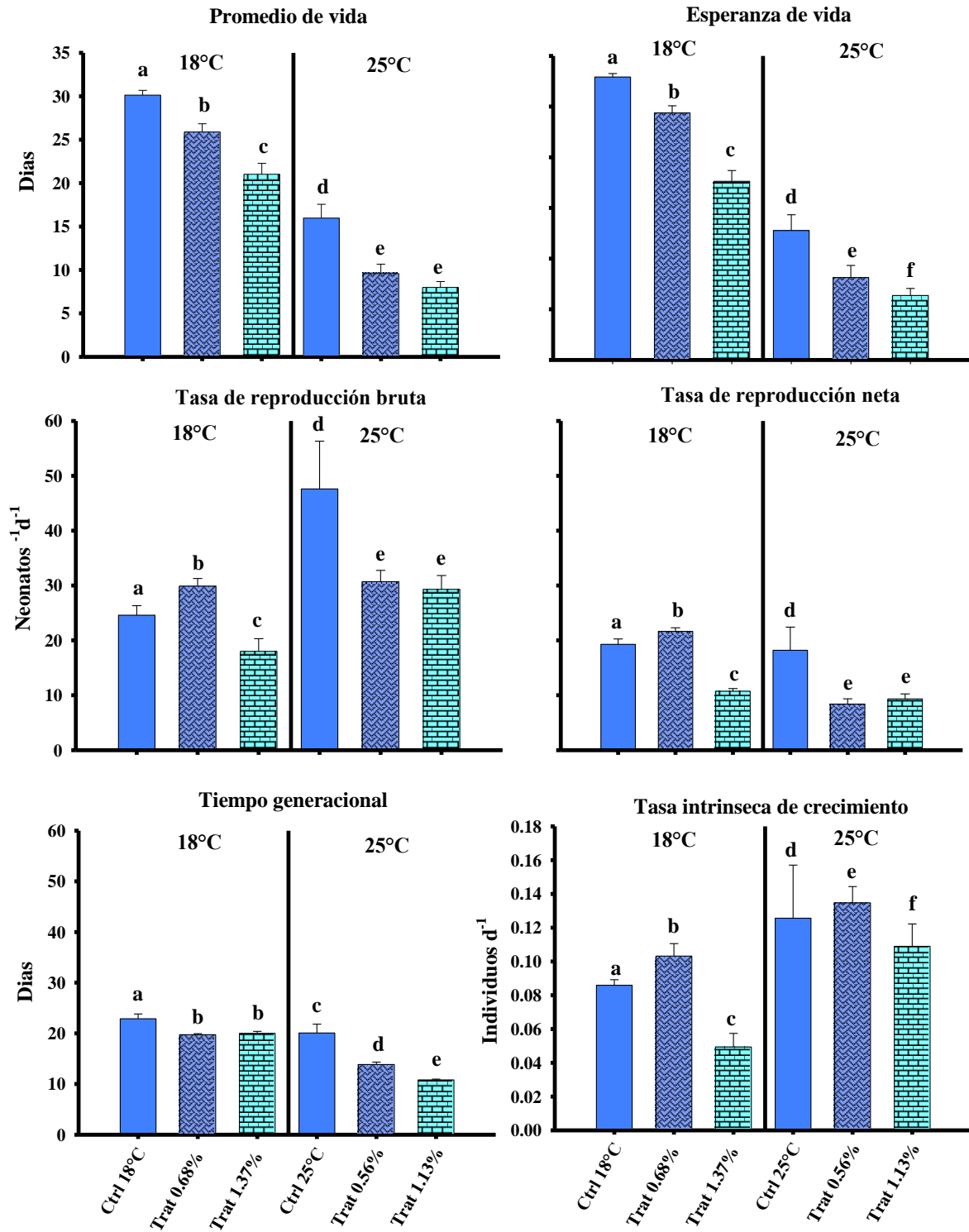


Figura 17. Variables demográficas de *S. vetulus* en tratamientos de extracto crudo a 18 y 25°C. Medía obtenida de cinco repeticiones ± error estándar. Letras representan diferencias significativas entre tratamientos (Tukey $p < 0.05$).

Tabla 9. Análisis de varianza de dos vías (ANDEVA). Para determinar si existen diferencias significativas de la influencia de la temperatura (18 y 25°C) sobre el efecto del extracto crudo de *M. aeruginosa*, en las variables demográficas de *S. vetulus*. Donde, DF: Grados de Libertad, SS: Suma de Cuadrados, MS: Media de cuadrados, *F*: Prueba de Fisher, P: Valor P. * indica que el valor es significativo con 0.001, ns = no significativo.

Promedio de vida					
Fuente de variación	DF	SS	MS	F	P
Temperatura	1	618.119	618.119	143.831	<0.001*
Concentración	2	987.952	493.976	114.944	<0.001*
Temperatura x Concentración	2	313.639	156.819	36.49	<0.001*
Residual	18	77.356	4.298		
Total	23	1997.065	86.829		
Esperanza de vida					
Temperatura	1	1213.393	1213.393	300.337	<0.001*
Concentración	2	279.346	139.673	34.572	<0.001*
Temperatura x Concentración	2	27.271	13.636	33.375	<0.001*
Residual	18	72.722	4.04		
Total	23	1592.732	69.249		
Tasa bruta de reproducción					
Temperatura	1	845.778	845.778	13.292	<0.001*
Concentración	2	644.026	322.013	5.061	0.018*
Temperatura x Concentración	2	515.277	257.638	4.049	0.035*
Residual	18	1145.38	63.632		
Total	23	3150.462	136.977		
Tasa neta de reproducción					
Temperatura	1	170.268	170.268	57.278	<0.001*
Concentración	2	296.693	148.346	49.903	<0.001*
Temperatura x Concentración	2	188.308	94.154	31.673	<0.001*
Residual	18	53.508	2.973		
Total	23	708.777	30.816		
Tiempo generacional					
Temperatura	1	212.703	212.703	73.054	<0.001*
Concentración	2	161.433	80.717	27.722	<0.001*
Temperatura x Concentración	2	40.58	20.29	6.969	0.006*
Residual	18	52.409	2.912		
Total	23	467.125	20.31		
Tasa de crecimiento					
Temperatura	1	0.0525	0.0525	122.075	<0.001*
Concentración	2	0.000661	0.00033	0.767	0.479 ns

Temperatura x Concentración	2	0.0165	0.00824	19.147	<0.001*
Residual	18	0.00775	0.00043		
Total	23	0.0774	0.00337		

9.5.4. Parámetros demográficos (crecimiento poblacional)

Las curvas de crecimiento poblacional de *S. vetulus* a diferentes temperaturas para los tratamientos control muestran en promedio 105 ind mL⁻¹ para 25°C y 65 ind mL⁻¹ para 18°C. Cabe señalar que, para ambas temperaturas en todos los tratamientos incluyendo el tratamiento control se tiene la presencia de dos picos de crecimiento, situación que a 18°C se presentan con menor intensidad. Comparando los promedios de los tratamientos controles con sus respectivos tratamientos a concentraciones bajas de equivalentes de microcistinas (0.10 µg L⁻¹ para 18°C y 0.084 µg L⁻¹ para 25°C) se observa que existe un mayor promedio de crecimiento (97 ind mL⁻¹) para 18°C que para 25°C (91 ind mL⁻¹). Remarcando un mayor crecimiento para el tratamiento de concentración baja a 18°C, como ya se ha venido observado en este trabajo. Para el caso de los tratamientos con concentraciones de 0.21 µg L⁻¹ para 18°C y 0.17 µg L⁻¹ para 25°C (concentraciones altas), se puede observar que al aumentar la cantidad de extracto crudo disminuye la densidad poblacional alcanzando valores de 86 y 60 ind mL⁻¹ para 25 y 18°C respectivamente (Fig. 18).

Por su lado, las tasas de crecimiento poblacional de *S. vetulus* a diferentes temperaturas (Fig. 19) no presentan diferencias significativas los controles en comparación con los tratamientos con concentraciones bajas de equivalentes de microcistinas (0.10 µg L⁻¹ para 18°C y 0.084 µg L⁻¹ para 25°C), obteniendo 0.08 individuos d⁻¹ para 25°C y 0.04 individuos d⁻¹ para 18°C, en el caso de los controles, mientras que, para los tratamientos se obtuvieron 0.11 individuos d⁻¹ para 25°C y 0.05 ind d⁻¹ para 18°C. Por último, es notable observar que los tratamientos con concentraciones de 0.21 µg L⁻¹ para 18°C y 0.17 µg L⁻¹ para 25°C (concentraciones altas) muestran tasas de crecimiento más bajas con 0.07

individuos d^{-1} para $25^{\circ}C$ y 0.03 individuos d^{-1} para $18^{\circ}C$, mostrando diferencias significativas con el resto de los tratamientos (ANDEVA: $F= 9.971$; $P<0.001^*$, tabla 11).

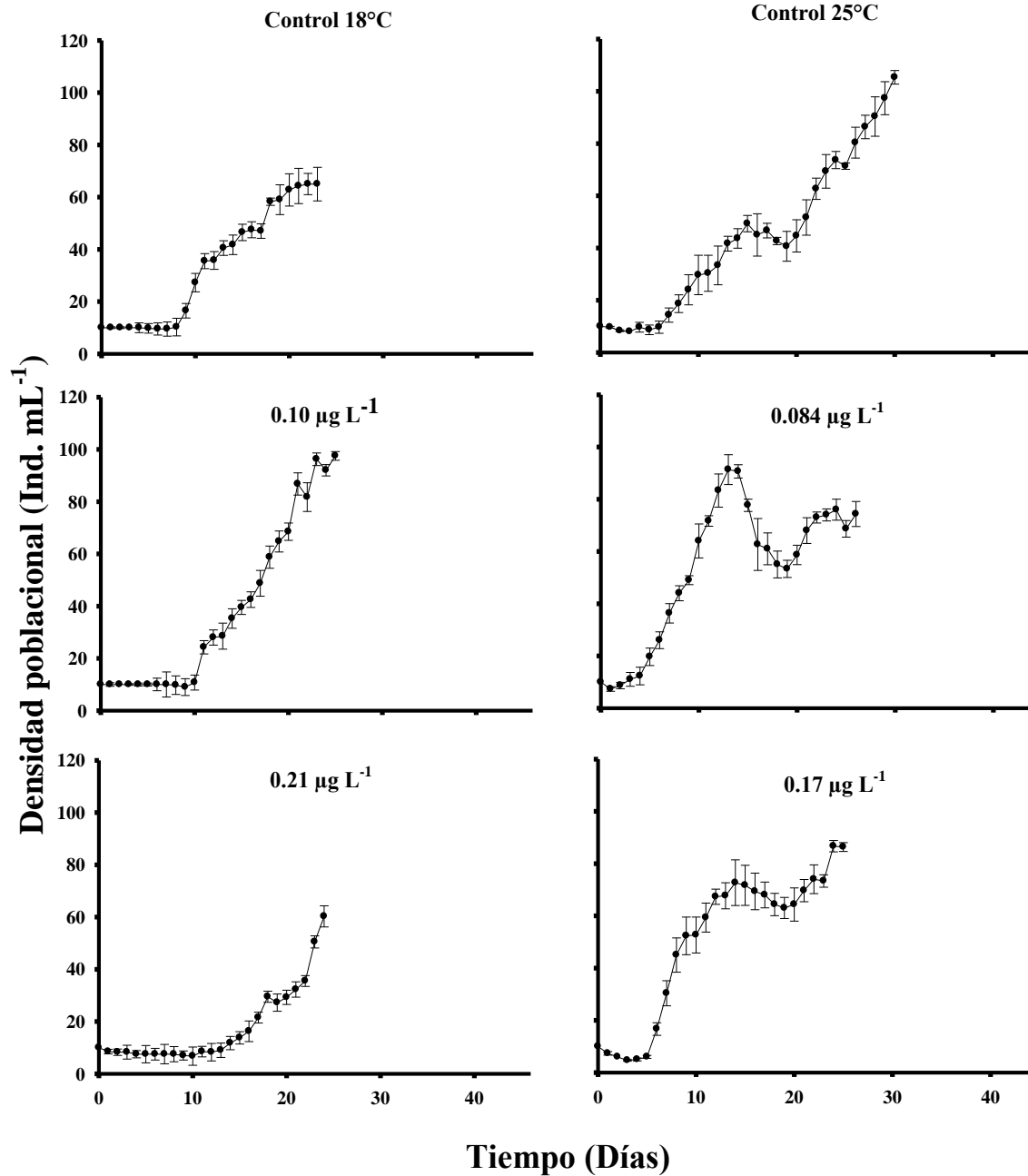
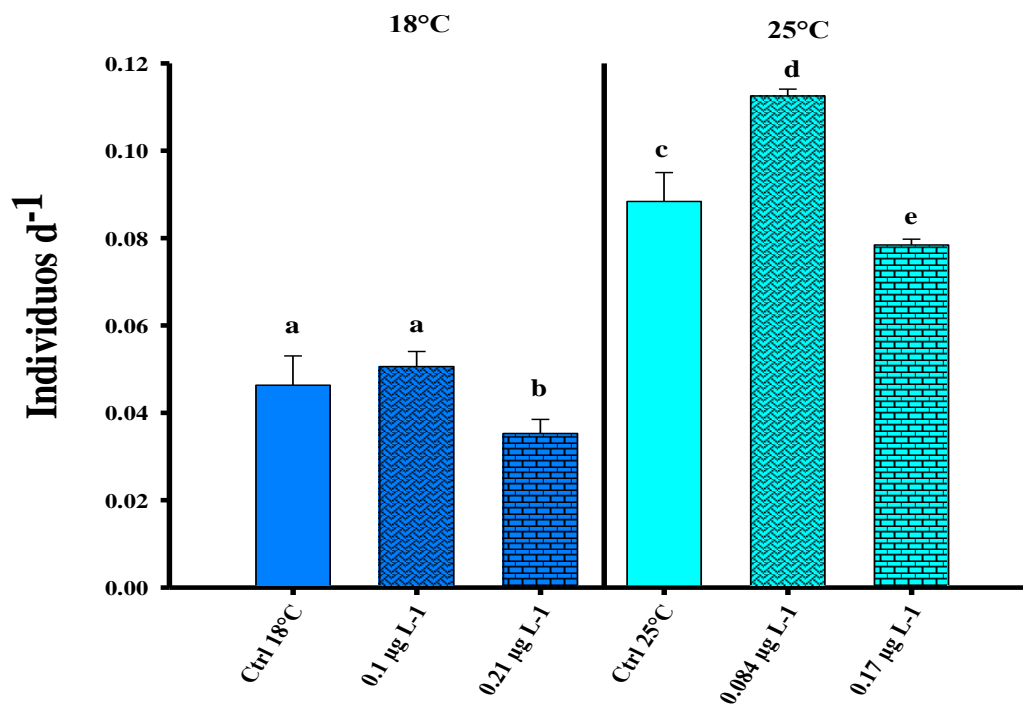


Figura 18. Crecimiento poblacional de *S. vetulus* en tratamientos de extracto crudo y células individuales de *M. aeruginosa*. Media obtenida de cinco repeticiones \pm error estándar



8

Figura 19. Tasa de crecimiento de *S. vetulus* en tratamientos de extracto crudo a 18 y 25°C. Media obtenida de cinco repeticiones \pm error estándar. Las letras representan diferencias significativas entre tratamientos (Tukey $p < 0.05$).

Tabla 10. Análisis de varianza de dos vías (ANDEVA). Para determinar si existen diferencias significativas de la influencia de la temperatura (18 y 25°C) sobre el efecto del extracto crudo de *M. aeruginosa*, en las variables demográficas de *S. vetulus*. Donde, DF: Grados de Libertad, SS: Suma de Cuadrados, MS: Media de cuadrados, F: Prueba de Fisher, P: Valor P. * indica que el valor es significativo con 0.001, ns = no significativo

Fuente de variación	Promedio de vida				
	DF	SS	MS	F	P
Temperatura	1	0.127	0.127	8.213	<0.001*
Concentración	2	0.0116	0.00579	0.376	0.692 ns
Temperatura x Concentración	2	0.0299	0.015	9.971	<0.001*
Residual	18	0.277	0.0154		
Total	23	0.446	0.0194		

9.5.5. Inicio del crecimiento poblacional

En la figura 20, se muestran los días donde inicio el crecimiento exponencial de *S. vetulus*. Se puede observar que a mayor temperatura, los días del inicio del crecimiento disminuyen en comparación con 18°C y en este caso el extracto crudo provoca efecto significativo en conjunto con la temperatura sobre los días iniciales del crecimiento (ANDEVA: $F= 32.78$; $P<0.001^*$, tabla 9). Por otro lado, existe una relación entre los días en que inició el crecimiento y las tasas de crecimiento de la población, observado en general que a 25°C los días de crecimiento disminuyen y las tasas de crecimiento incrementan, lo mismo ocurre con 18°C pero de forma inversa.

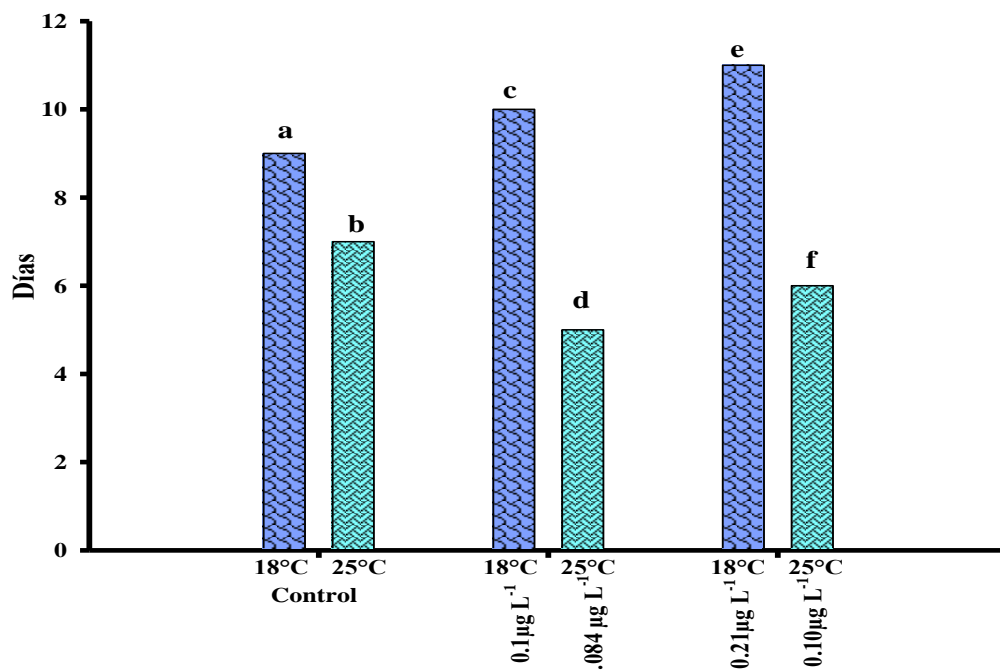


Figura 20. Días del inicio del crecimiento exponencial de *S. vetulus* en tratamientos de extracto crudo a 18 y 25°C. Media obtenida de cinco repeticiones \pm error estándar. Letras representan diferencias significativas entre tratamientos (Tukey $p<0.05$).

Tabla 11. Análisis de varianza de dos vías (ANDEVA). Para determinar si existen diferencias significativas en la edad del crecimiento exponencial con la influencia de la temperatura (18 y 25°C) sobre el efecto del extracto crudo de *M. aeruginosa*, Donde, DF: Grados de Libertad, SS: Suma de Cuadrados, MS: Media de cuadrados, *F*: Prueba de Fisher, P: Valor P. * indica que el valor es significativo con 0.001, ns = no significativo.

Edad del inicio del crecimiento					
Fuente de variación	DF	SS	MS	<i>F</i>	P
Temperatura	1	155.042	155.042	272.268	<0.001*
Concentración	2	31	15.5	27.22	<0.001*
Temperatura x Concentración	2	37.333	18.667	32.78	<0.001*
Residual	18	10.25	0.569		
Total	23	233.625	10.158		

9.6. Mediciones de los organismos

En la tabla 12 se puede observar el promedio de las mediciones en adultos del largo y ancho del cuerpo de *S. vetulus* así como de su intestino. Las mediciones de los individuos al final del experimento de crecimiento poblacional muestran una disminución significativa en cada parte medida (ANDEVA: $F= 32.72$; $P<0.001^*$, tabla 14), sobre todo justo al final del experimento y cuando la concentración de equivalentes de microcistinas aumenta. Para el caso de la temperatura, se observó que esta presenta diferencias significativas (tabla 13) en las respuestas del tamaño. Sin embargo, cabe señalar que a menor temperatura los organismos tanto adultos como neonatos fueron ligeramente más grandes.

Por otro lado, en el tratamiento de *M. aeruginosa* como alimento, se observa que los tamaños fueron los más afectados al finalizar el experimento siendo significativamente diferentes (ANDEVA: $F= 32.72$; $P<0.001^*$, tabla 14) tanto para adultos como neonatos.

En la tabla 13, se puede observar el promedio de las mediciones en neonatos del largo y ancho del cuerpo de *S. vetulus* así como de su intestino. Siguiendo la

misma tendencia que los adultos, las medidas de los individuos al final del experimento de crecimiento poblacional muestran una disminución significativa en cada parte medida (ANDEVA: $F= 32.72$; $P<0.001^*$, tabla 14), sobre todo justo al final del experimento y cuando la concentración de equivalentes de microcistinas aumenta. Para el caso de la temperatura, se observó que esta, no presenta un efecto que provoque diferencias significativas (tabla 14) en las respuestas del tamaño. Sin embargo, cabe señalar que a menor temperatura los organismos tanto adultos como neonatos fueron ligeramente más grandes.

Tabla 12. Tamaño (Largo, ancho e intestino) de adultos de *S. vetulus* antes y después de ser expuestos a diferentes concentraciones de equivalentes de microcistinas en el extracto crudo a 18 y 25°C y células individuales de *Microcystis aeruginosa*. Media obtenida de cinco repeticiones \pm error estándar.

Temporada	Medida	Adultos						
		Control		0.1 $\mu\text{g L}^{-1}$	0.084 $\mu\text{g L}^{-1}$	0.21 $\mu\text{g L}^{-1}$	0.17 $\mu\text{g L}^{-1}$	<i>M. aeruginosa</i>
		18°C	25°C	18°C	25°C	18°C	25°C	25°C
Inicio	Largo	1363.18	1361.42	1362.88	1360.48	1364.86	1361.42	1358.9
	Ancho	852.12	860.68	864.66	873.24	864.96	869.52	857.3
	Intestino	1285.04	1286.04	1275.64	1268.7	1272.75	1274.14	1284.08
Final	Largo	1362.26	1359.42	1344.1	1338.54	1331.52	1327.52	1325.69
	Ancho	848.8	858.36	837.78	820.92	817.86	812.46	810.25
	Intestino	1280.78	1281.14	1253.16	1230.16	1225.32	1222.32	1219.78

Tabla 13. Tamaño (Largo, ancho e intestino) de neonatos de *S. vetulus* antes y después de ser expuestos a diferentes concentraciones de equivalentes de microcistinas en el extracto crudo a 18 t 25°C y células individuales de *Microcystis aeruginosa*. Media obtenida de cinco repeticiones \pm error estándar.

Temporada	Medida	Neonatos						
		Control		0.1 $\mu\text{g L}^{-1}$	0.084 $\mu\text{g L}^{-1}$	0.21 $\mu\text{g L}^{-1}$	0.17 $\mu\text{g L}^{-1}$	<i>M. aeruginosa</i>
		18°C	25°C	18°C	25°C	18°C	25°C	25°C
Inicio	Largo	610.4	609.56	612.68	611.66	611.92	610.32	610.34
	Ancho	350.02	350.36	359.1	361.4	361.18	360.18	350.36
	Intestino	462.84	461.66	468.66	465.06	469.3	467.5	461.66
Final	Largo	612.36	611.986	605.86	603.54	602.12	600.58	492.78
	Ancho	353.84	346.88	351.22	352.98	341.175	339.24	339.24
	Intestino	463.5	463.88	441.8	438.34	429.98	427.62	427.62

Tabla 14. Análisis de varianza de tres vías (ANDEVA). Para determinar si existen diferencias significativas, cuando se ofrece una dieta de *M. aeruginosa* y en influencia de la temperatura (18 y 25°C) sobre el efecto del extracto crudo de *M. aeruginosa*, en el tamaño de diferentes secciones de *S. vetulus*. Donde, DF: Grados de Libertad, SS: Suma de Cuadrados, MS: Media de cuadrados, F: Prueba de Fisher, P: Valor P. * indica que el valor es significativo con 0.001, ns = no significativo.

Largo de neonatos					
Fuente de variación	DF	SS	MS	F	P
Temperatura	1	1.482	1.482	0.158	0.693 ns
Tiempo	1	259.459	259.459	27.694	<0.001*
Concentración	2	181.678	90.839	9.696	<0.001*
Temperatura x Tiempo	1	19.074	19.074	2.036	0.16 ns
Temperatura x Concentración	2	13.507	6.753	0.721	0.492 ns
Tiempo x Concentración	2	318.612	159.306	17.004	<0.001*
Temperatura x Tiempo x Concent.	2	32.409	16.205	1.73	0.188 ns
Residual	48	449.696	9.369		
Total	59	1275.917	21.626		
Ancho de neonatos					
Temperatura	1	3.553	3.553	0.0563	0.813 ns
Tiempo	1	1438.641	1438.641	22.812	<0.001*
Concentración	2	525.624	262.812	24.167	<0.001*
Temperatura x Tiempo	1	24.067	24.067	0.382	0.54 ns
Temperatura x Concentración	2	3.772	1.886	0.029	0.971 ns
Tiempo x Concentración	2	760.972	380.486	26.033	<0.001*
Temperatura x Tiempo x Concent.	2	318.832	159.416	2.528	0.09 ns
Residual	48	3027.108	63.065		
Total	59	6102.569	103.433		
Intestino de neonatos					
Temperatura	1	52.641	52.641	0.667	0.418 ns
Tiempo	1	6767.064	6767.064	85.705	<0.001*
Concentración	2	2126.905	1063.453	13.469	<0.001*
Temperatura x Tiempo	1	8.817	8.817	0.112	0.74 ns
Temperatura x Concentración	2	20.769	10.385	0.132	0.877 ns
Tiempo x Concentración	2	4164.784	2082.392	26.373	<0.001*
Temperatura x Tiempo x Concent	2	1.937	0.969	0.0123	0.988 ns
Residual	48	3789.98	78.958		
Total	59	16932.897	286.998		
Largo de adultos					
Temperatura	1	98.817	98.817	1.7	0.198 ns
Tiempo	1	4671.073	4671.073	80.378	<0.001*

Concentración	2	2107.289	1053.645	18.131	<0.001*
Temperatura x Tiempo	1	0.0167	0.0167	0.00287	0.987 ns
Temperatura x Concentración	2	16.917	8.459	0.146	0.865 ns
Tiempo x Concentración	2	2254.505	1127.253	19.397	<0.001*
Temperatura x Tiempo x Concent.	2	38.565	19.283	0.332	0.719 ns
Residual	48	2789.46	58.114		
Total	59	11976.643	202.994		
Ancho de adultos					
Temperatura	1	397.838	397.838	3.261	0.077 ns
Tiempo	1	10770.92	10770.92	88.285	<0.001*
Concentración	2	3539.56	1769.78	14.506	<0.001*
Temperatura x Tiempo	1	15.913	15.913	0.13	0.72 ns
Temperatura x Concentración	2	861.043	430.521	3.529	0.037
Tiempo x Concentración	2	3594.894	1797.447	14.733	<0.001*
Temperatura x Tiempo x Concent	2	1382.977	691.489	5.668	0.006 *
Residual	48	5856.076	122.002		
Total	59	26419.222	447.783		
Intestino de adultos					
Temperatura	1	32.708	32.708	0.0462	0.831 ns
Tiempo	1	15827.504	15827.504	22.333	<0.001*
Concentración	2	9548.953	4774.477	16.737	<0.001*
Temperatura x Tiempo	1	927.48	927.48	1.309	0.258 ns
Temperatura x Concentración	2	466.48	233.24	0.329	0.721 ns
Tiempo x Concentración	2	6184.626	3092.313	14.363	<0.001*
Temperatura x Tiempo x Concent	2	842.144	421.072	0.594	0.556 ns
Residual	48	34017.92	708.707		
Total	59	67847.817	1149.963		

X. Discusión

El género de cianobacterias *Microcystis* es el más frecuente formador de floraciones en los cuerpos de agua continentales (Komárek y Komárková-Legnerová, 2002), especialmente la especie como *M. aeruginosa* la cual es capaz de producir hepatotoxinas. En este trabajo se encontró que la especie dominante del florecimiento cianobacterial en la Pista olímpica de remo y canotaje "Virgilio Uribe" fue *M. aeruginosa*, con tallas promedio de las colonias de 397 μm de largo y 476 μm de ancho. El tamaño promedio de las células fue de 4.78 μm . Estas medidas concuerdan con las reportadas por Vidal y Pérez en 2009, los cuales encontraron que las formas de las colonias son irregulares y que pueden medir 352 μm en promedio de largo (min: 55,0; máx: 650) y 402 μm de ancho (min: 55,0; máx: 725) y las células presentan tamaños promedio de 4,9 μm (min: 3,0; máx: 7,0), luego de la división celular. Debido a este gran tamaño de las colonias, los organismos como los cladóceros que se alimentan de manera generalista no pueden consumirlas (De Bernardi y Giussani, 1990).

La especie *M. aeruginosa* es capaz de producir una serie de metabolitos secundarios, denominados como cianotoxinas, dentro de las cuales se encuentran las microcistinas. Estas últimas son responsables de más del 60 % de los casos de intoxicación en todo el mundo (Ohtake *et al.*, 1989), provocan efectos agudos y crónicos que pueden causar la inhibición de la proteína fosfatasa (PP1 y PPA2) y promover la hiperfosforilación de la proteína intracelular resultante, también conducen a la alteración de los filamentos intermedios que forman el citoesqueleto (Carmichael, 1992). Se han establecido límites permisibles de esta sustancia que permiten tener un marco de control alrededor del mundo. La World Health Organization (WHO) en 1998 estableció la concentración permisible para agua potable de 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ de microcistinas disueltas. Mientras que en relación con los niveles permisibles de microcistinas para lagos de recreación, Chorus y

Bartram (1999) mencionan que estos deben tener un máximo de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ cuando *Microcystis* es dominante. La concentración de esta toxina de la pista de remo y canotaje de Xochimilco fue de $3.78 \mu\text{g L}^{-1}$, lo que nos indica que estamos dentro del límite permisible. La pista de remo y canotaje anteriormente ha presentado concentraciones de microcistinas de 3.42 y $3.55 \mu\text{g L}^{-1}$ (Arzarte-Cárdenas *et al.*, 2010) y $2.77 \mu\text{g L}^{-1}$ (Pineda-Mendoza *et al.*, 2012). Esto indica, que las concentraciones de microcistinas en los últimos 10 años se han mantenido estables en un rango acorde al tipo uso que se le da a la pista de remo y canotaje.

Sin embargo, para las personas que utilizan día con día las instalaciones de la Pista de remo y canotaje de Xochimilco para su entrenamiento, resulta ser preocupante, ya que al estar expuestas directamente con el agua y al rocío de la pista y así mismo con los florecimientos de cianobacterias, corren el riesgo de presentar cuadros clínicos con síntomas subletales, caracterizados por desórdenes gastrointestinales, alergias, irritaciones en la piel y daños en los ojos de nadadores y bañistas (NRA, 1990).

Por otro lado, para el caso de las células de *Microcystis*, en este trabajo se logró cuantificar un total de $196,600 \text{ cel mL}^{-1}$ lo que indica que es un florecimiento catalogado como alto, esto de acuerdo a los niveles de referencia manejado por la WHO (2003) y modificados por Churro y colaboradores (2012) donde este último hace mención de la presencia de espuma sobre el florecimiento cuando hay concentraciones de células superiores a $100,000 \text{ cel mL}^{-1}$. Como la pista de remo y canotaje sobrepasa las $100,000 \text{ cel mL}^{-1}$, se recomienda que se implementen acciones que nos permitan prevenir el contacto con el florecimiento y la espuma, ya que, para presentar una intoxicación aguda con *Microcystis* en promedio se tendrían que consumir 3 litros de agua con una población de unas $200,000 \text{ cel mL}^{-1}$ (Reynolds, 1991). Y aunque no esté comprobado el consumo de agua de manera directa o accidental en la pista de remo y canotaje, el número de células por mililitro que se registraron fue similar a las reportadas para adquirir una intoxicación aguda.

En diferentes investigaciones, se menciona que las mediciones de alteraciones fisiológicas o conductuales pueden dar una señal de advertencia antes de que el daño sea irreversible. Varios estudios indicaron que el comportamiento de natación y los parámetros fisiológicos de individuos de la familia Daphnidae, pueden verse alterados por una serie de xenobióticos y toxinas tales como toxinas bacterianas (Herrera *et al.*, 2014; Bownik y Pawlik-Skowrońska, 2019) y medicamentos (Campbell *et al.*, 2004). En el presente trabajo los parámetros evaluados por el efecto de extractos crudos fueron, la fisiología cardíaca con el número de palpitations por minuto y el crecimiento somático de *Simocephalus*, aportando datos para las próximas evaluaciones con referente al efecto de cianobacterias.

Para poder evaluar las respuestas de organismos a las cianobacterias y cianotoxinas se utilizaron pruebas ecotoxicológicas que se basan en el reconocimiento de la respuesta de los organismos ante la presencia de agentes tóxicos, y dependen del nivel de exposición para evaluar la respuesta al agente. Para ello, las pruebas de toxicidad que se utilizaron en este trabajo describen una relación de concentración-respuesta a corto (CE_{50} y CL_{50}) o largo plazo (tabla de vida y crecimiento poblacional) (Hoffman *et al.*, 2002). En el presente trabajo para poder evaluar la relación de concentración-respuesta a corto plazo y el efecto de la temperatura sobre esta relación, se utilizaron pruebas de CL_{50} (concentración letal media) y CE_{50} (concentración efectiva media). Estas pruebas resultan ser de tipo agudas, ya que se puede percibir un efecto letal u otro producido por un agente tóxico (cianotoxinas) en un tiempo relativamente corto, aproximadamente de 1 a 2 días (APHA, 1992). Los valores de CL_{50} que se presentaron en este trabajo fueron $1.69 \mu\text{g L}^{-1}$ para 25°C y $2.05 \mu\text{g L}^{-1}$ para 18°C , estos valores son comparables con lo reportado por Sierosławska y Rymuszka (2013), quienes reportan $2.78 \mu\text{g L}^{-1}$ como valor de CL_{50} para la microcistina-LR a 20°C . La disminución de la concentración cuando aumenta la temperatura, indica que el incremento en la temperatura enaltece los efectos inhibitorios de las

cianobacterias tóxicas sobre los daphnidos (Claska y Gilbert, 1998). Por otro lado, el aumento de la temperatura provoca un incremento en la actividad metabólica (Lamkemeyer *et al.*, 2003), por lo que, al tener incrementos de la temperatura los cladóceros incrementan su actividad, lo que ocasiona que se ingirieran y asimilen más rápido las diferentes sustancias (Skadovskiy, 1955; Smirnov, 2017). En este trabajo se observó que, al aumentar la temperatura a 25°C el efecto del extracto crudo sobre la mitad de la población es evidente con menor concentración y viceversa, esto en un periodo de tiempo definido (24h).

Por otro lado, los valores de CE_{50} después de 24 h de exposición a extractos crudos con equivalentes de microcistinas fueron de 0.589 $\mu\text{g L}^{-1}$ para 18°C y 0.53 $\mu\text{g L}^{-1}$ para 25°C. Se han reportado que el CE_{50} después de 24 h en presencia de microcistina-LR purificada fue de 0.97 $\mu\text{g L}^{-1}$ para *Daphnia magna* (Sierosławska, 2013) Además, se ha demostrado que un aumento en la temperatura provoca una disminución en la CE_{50} , en presencia de extractos de cianobacterias (Hietala *et al.*, 1997), lo que indica que la temperatura regula la respuesta fisiológica de este organismo ante extractos de cianobacterias (Lamkemeyer *et al.*, 2003). Cabe señalar que el CE_{50} es la concentración calculada estadísticamente de una sustancia en el medio, que se espera que produzca un determinado efecto en el 50% de los organismos de experimentación de una población dada (Duffus, 1993). En este caso el efecto evaluado fue la respuesta de la fisiología cardíaca (palpitaciones cardíacas), las cuales se redujeron con el aumento de la concentración de equivalentes de microcistinas. Se ha demostrado que existe la reducción en la frecuencia cardíaca de *Daphnia* cuando se exponen a extractos crudos de cianobacterias, lo que podría reflejar una intoxicación por microcistinas, aumentando con el paso del tiempo (Herrera *et al.*, 2014). Tomando en cuenta este último punto, los latidos disminuyeron con el aumento en el tiempo de exposición a la toxina, esto es comparable con la disminución de los latidos cardiacos cuando existe el aumento del tiempo de exposición y la ingestión de células de *Microcystis* observada en *Daphnia galeata* (Rohrlack *et al.*, 2005). Por otro lado, Mishra y colaboradores (2016) reportaron para *S. vetulus* que los latidos

cardiacos disminuyen cuando incrementa el tiempo de exposición a metales pesados.

La temperatura en este caso juega un papel crucial, ya que la frecuencia cardíaca aumenta con el incremento de la temperatura (Smirnov, 2017, y según los resultados en esta investigación las palpitations cardíacas aumentan con las altas temperaturas, obteniendo 454 palpitations/minuto para 25°C y 314 palpitations/minuto para 18°C. Esta misma característica se ha reportado en otros individuos de la familia Daphnidae, en los cuales existe un promedio de 300 palpitations/minuto a 20°C y estas disminuyen a 195 palpitations/minuto con 10°C (Campbell *et al.*, 2004).

En el otro extremo tenemos las pruebas crónicas en la que se pueden observar efectos a largo plazo y pueden estar relacionados con cambios en el crecimiento, metabolismo, reproducción, posibles mutaciones y hasta la muerte de los organismos (APHA, 1992). El zooplancton frecuentemente suele ser sujeto de diferentes niveles de estrés durante todo su ciclo de vida; entre los factores responsables del estrés está la presencia de cianobacterias. Los estudios ecotoxicológicos a largo plazo sobre zooplancton comenzaron entre 1960-1970 (Cairns Jr. y Dickson 1971; Halbach, 1974). El estudio sobre el efecto de los extractos crudos de cianobacterias sobre el zooplancton comenzó tiempo después (Okumura *et al.*, 2006; Zamora-Barrios *et al.*, 2015). En el presente trabajo, el estrés en organismos zooplactónicos (*S. vetulus*), fue evaluado mediante estudios de crecimiento poblacional y observaciones en tablas de vida.

Si bien, los estudios del crecimiento de la población nos arrojan datos sobre las abundancias pico y el tiempo necesario para alcanzar estas densidades, estos por sí solos no pueden mostrar los efectos adversos del estrés sobre los parámetros relacionados con la supervivencia, o con la reproducción (Nandini *et al.*, 2004). Para esto, se utilizan estudios demográficos de tabla de vida que nos proporcionan datos sobre la edad específica, la mortalidad y la fecundidad (Krebs,

1985). En este estudio fue posible observar la presión que ejerce la presencia de las equivalentes de microcistinas ya sea en forma de extracto crudo o células individuales sobre las variables demográficas de *S. vetulus*, donde se vieron alteraciones en la demografía y su crecimiento poblacional (Fig. 12, 13, 14, 15, 17).

La supervivencia de *S. vetulus* con una dieta exclusiva de células de *M. aeruginosa* se redujo un 20%, mientras que la fecundidad en términos de tiempo se redujo un 42% comparado con el control. Estudios anteriores han reportado la reducción del 50% de la supervivencia y la fecundidad de *S. vetulus*, teniendo como dieta a *M. aeruginosa* (Fernández *et al.*, 2012), lo cual nos sirve como referencia al momento de establecer comparaciones dentro del mismo género.

Por otro lado, las variables demográficas (promedio de vida, esperanza de vida, tiempo generacional, tasa de reproducción bruta y neta y tasa de crecimiento) mostraron una disminución promedio del 40% en comparación con el control que contenía *S. acutus* como dieta exclusiva. Anteriormente, para cladóceros como *Daphnia laevis* se habían reportado la disminución de estas variables en un 30% cuando *D. laevis* fue alimentada con *M. aeruginosa* (Nandini *et al.*, 2000). Mientras que para *Moina micrura*, se ha observado la disminución del 50% de estas variables cuando crece utilizando como alimento *M. aeruginosa* (Nandini *et al.*, 2017). Estos porcentajes de disminución son comparables con los del presente estudio y la disminución de estas variables es significativa con respecto a los tratamientos testigos, aun tratándose de diferentes cladóceros.

Para el caso del crecimiento poblacional, la densidad poblacional que fue alimentada con *M. aeruginosa* disminuyó en promedio un 80% comparada con el control. Se han reportado disminuciones de las densidades poblacionales de *S. vetulus* (Nandini y Rao, 1998), *Daphnia pulex* (Alva-Martínez *et al.*, 2007), *Ceriodaphnia dubia* y *Moina macrocopa* (Alva-Martínez *et al.*, 2007) cuando son alimentados con *M. aeruginosa*.

Finalmente, en relación al uso de células de *M. aeruginosa* se logra observar que las tasas de crecimiento de la tabla de vida (0.10 ind d^{-1}) y el crecimiento poblacional (0.04 ind d^{-1}) son diferentes en sus respectivos valores, esto es debido a que en el caso de la tabla de vida se contabilizan los neonatos que nacen de la cohorte original y posteriormente son retirados. Sin embargo, en el crecimiento poblacional, los neonatos únicamente son contados y permanecen dentro el experimento, lo que conlleva, a que exista una interacción como la competencia intraespecífica por espacio y el alimento proporcionado (Knillmann *et al.*, 2012) a diferencia de la tabla de vida. Se sabe que la disponibilidad limitada de alimentos (Chandini, 1988; Antunes *et al.*, 2004) y en combinación con la falta de espacio (Beklioglu *et al.*, 2010) tienen una influencia negativa en la respuesta de los organismos acuáticos a los tóxicos, tal y como lo reportó (Knillmann *et al.*, 2012), donde la competencia intraespecífica aumentó 11 días después de la contaminación con esfenvalerato. Este conocimiento sobre la interacción entre la competencia y la respuesta a los tóxicos es importante para evaluar los efectos de estos factores en condiciones de campo.

Por otra parte, usar extractos crudos de cianobacterias en la actualidad sirve para representar los eventos que podrían ocurrir de manera natural cuando se rompen las células y se liberan toxinas al medio. Sin embargo, debe tomarse en cuenta que no hay certeza de que el efecto sólo sea por microcistinas, sino que también puede ser por la interacción de otros metabolitos con características tóxicas (Nandini *et al.*, 2019; Arzate-Cárdenas *et al.*, 2010).

Los resultados del presente trabajo demuestran que la temperatura juega un papel importante sobre el zooplancton y las cianobacterias. De manera general en este estudio, se observó la disminución significativa del crecimiento somático y el número de latidos cardiacos, que representan la fisiología cardíaca. En diversos estudios se ha demostrado que la mancuerna temperatura-cianobacteria, modifica la estructura somática, controlando aspectos importantes como la

ecología y fisiología (Moore *et al.*, 1996; Jeppesen *et al.*, 2010). Existen registros previos sobre los cambios en la actividad metabólica de estos organismos debido al cambio de temperatura, lo cual se ve reflejado en la supervivencia y fecundidad (Goss y Bunting, 1983; Moore *et al.*, 1996). Esta última aseveración, se logró ver reflejada en este estudio, ya que se encontró que a mayor temperatura los efectos adversos sobre las variables demográficas (supervivencia y fecundidad) de los extractos crudos son más agudos. Por último, se ha reportado que el cambio en la temperatura altera el efecto que tienen las cianotoxinas sobre el zooplancton (Gilbert, 1996; Xiang *et al.*, 2017), este cambio se puede observar en la pruebas agudas y crónicas de este trabajo, en donde se presenta una disminución de las variables cuando la temperatura fue de 25°C en comparación con la de 18°C.

La supervivencia de *S. vetulus* en presencia de extractos crudos en este estudio se realizaron bajo dos temperaturas (18 y 25°C). Los resultados arrojaron que a 25°C la supervivencia fue en promedio 25% menor que con 18°C de temperatura, esto en ausencia del extracto crudo. Lo que indica que el aumento de la temperatura por si sola modifica el parámetro de supervivencia de forma considerable (Moore *et al.*, 1996) confirmando dicha disminución con parámetros como el promedio de vida y esperanza de vida (Fig. 14). Esto se puede explicar, asumiendo el hecho del incremento en la actividad metabólica con el aumento de la temperatura (Skadovskiy, 1955; Lamkemeyer *et al.*, 2003), lo que provoca que el ciclo de vida de los organismos se lleve a cabo en un corto periodo de tiempo a mayor temperatura.

En los tratamientos con extracto crudo, el mayor efecto se registró cuando la temperatura fue mayor, lo que indica un efecto combinado de la temperatura y el extracto crudo, que provoca un estrés en el organismo disminuyendo su supervivencia aproximadamente en un 45% en las concentraciones más altas, mientras que a 18°C se puede observar que el efecto del extracto crudo provocó la disminución de la supervivencia un 24%, y en ausencia de este la supervivencia fue mayor comparado con su contraparte de 25°C. Zamora-Barrios y

colaboradores (2015) demostraron que la supervivencia de *Ceriodaphnia cornuta* en ausencia de extractos crudos fue mayor en comparación a cualquier concentración a la que fue expuesto este organismo. De la misma forma Okumura y colaboradores (2006) observaron que las microcistinas pueden causar efectos negativos sobre la supervivencia de diferentes especies cladóceros incluyendo a *Ceriodaphnia dubia* y *Ceriodaphnia silvestrii* ante concentraciones bajas de cianotoxinas.

Para el caso de la fecundidad y las variables relacionadas con este parámetro, se logró observar un comportamiento en el cual existe una disminución en el tiempo de reproducción cuando la proporción de extracto crudo aumenta y, por lo tanto, la concentración de equivalentes de microcistinas. Sin embargo, haciendo énfasis en cada una de las temperaturas, iniciando por 25°C la disminución del tiempo de reproducción y la supervivencia a causa de la relación de la temperatura y extracto crudo, se ve reflejada en el aumento del número de neonatos por hembra que tenemos cada día, que es posible observar para cada tratamiento a 25°C. Esta situación descrita podría ser un cambio en la estrategia reproductiva generada por la presencia de los extractos crudos, conocido comúnmente como compromiso "Trade-off", donde existe un incremento en algún rasgo como consecuencia de las situaciones ecológicas o ambientales (Stearns, 1989). Cuando las condiciones son adversas, la respuesta más común es el aumento de la fecundidad, lo que provoca un acortamiento en la natalidad de los progenitores, de tal forma que la esperanza de vida se ve reducida (McArthur, 1972).

La anterior situación, podría indicar que *S. vetulus* tiene la capacidad de reproducirse constantemente al estar en contacto con *M. aeruginosa* y microcistinas a costa de reducir su tiempo de vida con temperaturas por encima de 20°C. Nandini y Rao en 1998 reportaron para *S. vetulus* un incremento en su crecimiento poblacional cuando era alimentado con *M. aeruginosa* a una temperatura de 30°C, lo que podría indicar una adaptación para el género *Simocephalus*. Sin embargo, se ha reportado una situación contraria al tener

disminución del tiempo y la fecundidad de manera significativa en otros géneros como *Ceriodaphnia* y *Moina* (Zamora-Barrios *et al.*, 2015; Nandini *et al.*, 2017).

En temperaturas de 18°C, el efecto que observamos es completamente distinto que a 25°C, ya que el tiempo de reproducción únicamente disminuyó en el tratamiento con alta concentración, así como el número de neonatos por día. Claska y Gilbert (1998) reportaron que el cladóceros *Daphnia pulex* disminuyó su fecundidad cuando fue expuesto a extractos crudos de *Anabaena flos-aquae*. Sin embargo, el tratamiento de baja concentración no causó disminución considerable en el tiempo de reproducción y el número de neonatos por día, si no que estos incrementaron en vez de disminuir. Esta situación no podría indicar un efecto de "hormesis", que está definido por ser una respuesta dependiente de la dosis de manera bifásica, en donde un agente ambiental es caracterizado por generar una estimulación de dosis baja o efecto beneficioso y un efecto inhibitorio o tóxico de dosis alta (Mattson, 2007). Existen diferentes trabajos con cladóceros donde se ha logrado observar dicho efecto haciendo pruebas con diferentes sustancias como el ácido cafeico de polifenol, probado en *M. macrocopa* (Pietsch *et al.*, 2010), o el efecto del carbofurano sobre *Ceriodaphnia silvestrii* (Mansano *et al.*, 2016), así como de metales pesados en *M. macrocopa*, *C. dubia* y *D. pulex* (Nandini *et al.*, 2007; Sánchez-Ortiz *et al.*, 2010).

Por último, con referente a la tabla de vida, la disminución en el tiempo generacional en ambas temperaturas se puede explicar desde el punto de vista del estrés. Al aumentar el estrés, la energía necesaria para mantenerse en el sistema aumenta forzando a las poblaciones a hacer compromisos para que el cambio no afecte tanto, uno de los compromisos es la disminución en el tamaño de madurez disminuyendo a su vez el tiempo que tardan en madurar los organismos, lo que provoca una disminución en el tiempo generacional (Nandini *et al.*, 2019).

El crecimiento de la población permite la cuantificación no solo de las tasas de crecimiento sino también de los niveles de abundancia (Alva-Martínez *et al.*, 2007). En este trabajo se logró observar que el crecimiento de *S. vetulus* en presencia de *M. aeruginosa* se obtuvieron densidades promedio de 22 ind mL⁻¹, este valor se puede comparar con las densidades reportadas para *S. vetulus* por Nandini y Rao (1998), con un promedio de 20 ind ml⁻¹ para 20°C y un promedio de 110 ind ml⁻¹ para 30°C. Por otro lado, en los tratamientos con extracto crudo tanto, las tasas de crecimiento poblacional como el crecimiento de la población fueron significativamente mayores respecto al tratamiento con *M. aeruginosa*, estas densidades en comparación con las reportadas por Zamora-Barrios y colaboradores (2015) para *C. cornuta* son significativamente mayores en número de individuos. Sólo unos pocos estudios han analizado el papel de la temperatura en la utilización de cianobacterias por zooplancton.

Referente a las medidas del cuerpo de *S. vetulus*, la disminución de largo y ancho, así como del intestino después de ser expuestos al extracto crudo y células de *M. aeruginosa*, concuerdan con las medidas de *S. vetulus* después de ser expuesto a células de *M. aeruginosa* a 20°C (Nandini y Rao, 1998). En este trabajo se observó que en todos los tratamientos con extracto crudo y con células *M. aeruginosa* el tamaño de cada sección medida disminuyó en promedio 5%.

Desde una perspectiva más amplia, a baja temperatura (18°C) tanto los adultos como los neonatos son más grandes en comparación con los mismos individuos a 25°C. Esto es debido a que los individuos en ambientes más fríos crecen más lentamente, pero son más grandes como adultos. Este patrón generalizado se materializa en dos reglas bien establecidas: la regla de Bergmann, que describe la asociación entre la temperatura y el tamaño corporal en entornos naturales. En el caso de los organismos ectotermos, ya sean invertebrados o vertebrados, se han propuesto varias hipótesis sobre la variación del tamaño corporal que reflejan la evidencia de los invertebrados siguen reglas como la de Bergmann, donde algunos muestran patrones recíprocos o compuestos y otros no muestran

ningún patrón en absoluto en la modificación de su tamaño (los cambios bergmannianos son mucho más frecuentes en ectotermos que en endotermos) (Blanckenhorn y Demont 2004), por otro lado, la regla del tamaño corporal que describe las normas de reacción que relacionan a la temperatura con el tamaño corporal en experimentos de laboratorio (McNab, 1971; Meiri y Dayan, 2003). La teoría predice que los organismos deberían crecer hasta ser más grandes en ambientes más fríos cuando la eficiencia del crecimiento disminuye con el aumento de la temperatura ambiental (Angilletta y Dunham, 2003).

La disminución del tamaño del intestino podría deberse a la mancuerna de temperatura-cianotoxinas ya que, después de la digestión en general y por consecuente la digestión de las células cianobacterianas existe un alto grado de exposición a toxinas al igual que cuando se utilizan extractos crudos, las toxinas se acumulan en el intestino medio y luego se transportan directamente al torrente sanguíneo a través de la absorción por el epitelio intestinal, siendo este órgano la principal fuente de absorción de nutriente para el cuerpo (Nogueira *et al.*, 2006; Herrera *et al.*, 2015). Por lo tanto, el intestino al tener la función de almacenamiento y absorción, es muy probable que su tamaño se vea alterado al estar en constante contacto con las toxinas del extracto crudo y las células de cianobacterias, siendo más notorio este efecto a 25°C por el hecho de que la temperatura elevada tiene a acelerar los procesos en organismos ectotérmicos (Lamkemeyer *et al.*, 2003). Por otro lado, la regla del tamaño corporal, al establecer que a menor temperatura los organismos crecen con mayor tamaño y viceversa (Angilletta y Dunham, 2003) podría ser otra posible explicación del porque el intestino resultó ser de mayor tamaño a menor temperatura, además de una posible disminución en la actividad metabólica lo que implicaría un efecto menor o retardado por parte de las toxinas.

El presente estudio, apoya la noción de que los animales criados a temperaturas más bajas crecen a un tamaño corporal más grande. Además, en el presente caso, la mancuerna de cianobacteria-temperatura, provocó que los organismos expuestos al extracto crudo con alta temperatura, tienden a iniciar su crecimiento

con mayor rapidez, lo que nos indica una situación de estrés en comparación con la baja temperatura, en la cual se muestra que *S. vetulus* crece con lentitud. De hecho, las revisiones recientes indican que este patrón se observa en un grupo diverso de organismos incluidos animales, plantas, protozoos y bacterias. Atkinson en 1994 y 1995, estimó que el 180% de las especies ectotérmicas (como los cladóceros) estudiadas en laboratorios exhibieron un crecimiento más rápido pero un tamaño más pequeño del cuerpo adulto a temperaturas de crianza altas. Esta tendencia denominada la regla del tamaño es un caso especial de la regla de Bergmann en la que la relación entre la temperatura ambiental y el tamaño corporal es producto de la plasticidad fenotípica (Atkinson, 1996).

El hecho de que el efecto del extracto crudo tenga un efecto menor sobre *S. vetulus* a menor temperatura, podría relacionarse con cambios en la estrategia generada por la presencia de los extractos crudos y cambios de temperatura ("trade-off"), donde sacrifican el número de individuos que puedan generar dentro de una población por un crecimiento somático e individual más grande y fuerte (Stearns, 1989).

En general, el extracto crudo y *M. aeruginosa* tuvieron un efecto negativo sobre *S. vetulus*. Se ha demostrado que diferentes especies de cianobacterias tienen un efecto y toxicidad diferente sobre la respuesta demográfica del zooplancton (Claska y Gilbert, 1998; Okumura *et al.*, 2006). Esta respuesta se debe principalmente a que cada género puede producir metabolitos secundarios (Carmichael *et al.*, 1990). Aunque, gran parte del zooplancton se alimenta de algas verdes, existe evidencia de que al haber baja densidad de este tipo de alimento consumen cianobacterias. Por lo que es importante conocer el efecto que tienen las cianobacterias sobre el zooplancton, ya que aparte de la producción de metabolitos secundarios tóxicos tienen otras características que afectan a esta comunidad (Ger *et al.*, 2014) como bajo valor nutricional, realizan formación de mucilago y de grandes colonias o filamentos (Ferrão-Filho y Azevedo, 2003; Liang *et al.*, 2017).

Aunque, los extractos crudos sean unos de los factores que afectan las variables de este experimento; se ha reportado que la temperatura es un factor que afecta diferentes procesos como la muda en cladóceros (Hessen *et al.*, 2000), lo que provoca una mayor demanda de nutrientes y energía. El cambio térmico se ha visto que altera el efecto tóxico de distintas sustancias (Ashforth y Yan, 2008). A pesar de eso, se ha estudiado muy poco sobre el papel que juega la temperatura en la interacción zooplancton-cianobacterias, ya que, comúnmente los estudios realizados son a una temperatura (Ferrão-Filho y Azevedo, 2003; Okumura *et al.*, 2006), además de otras características que ayudan a la dominancia de las cianobacterias, es importante el estudio de la temperatura porque el aumento de esta variable ya sea por la temporalidad o el cambio climático, promueve la dominancia de cianobacterias y una mayor interacción entre este grupo y el zooplancton.

XI. Conclusión

La temperatura es un factor determinante sobre la fisiología y las respuestas de organismos ectotérmicos como el zooplancton a diversos compuestos que se encuentran en el ambiente. Tiene gran influencia en el crecimiento de organismos como las cianobacterias. Y en este trabajo se logró evaluar el efecto de la temperatura en la respuesta de *S. vetulus* ante cianotoxinas provenientes de un florecimiento cianobacterial. Se encontró que las toxinas por sí solas a temperatura ambiente tienen un efecto negativo sobre la demografía de *S. vetulus*, ya sea en su forma de célula o extracto crudo. Sin embargo, se encontró que con el extracto crudo los efectos negativos fueron mayores sobre *S. vetulus*. Dicha situación es de suma importancia, ya que es lo que se esperaría cuando existe la senescencia de las floraciones y sus compuestos queda libres en medio y los organismos entran en contacto con ellos. Con respecto a la influencia de la temperatura en el trabajo, se encontró que el incremento de este factor, logró agudizar la respuesta de *S. vetulus* a el extracto crudo, tanto para su demografía, crecimiento y fisiología cardíaca, debido a que el aumento de la temperatura en organismos ectotérmicos provoca el aumento del metabolismo, lo que da como resultado que se asimilen en menor periodo de tiempo las sustancias, y por lo tanto, los efectos se presentaron de manera más rápida y las concentraciones efectivas disminuyeron con el aumento de la temperatura, ya que se necesita menor cantidad de extracto para provocar un efecto.

XII. Literatura Citada

- Allen JD (1977) An analysis of seasonal dynamics of a mixed population of *Daphnia*, and the associated cladoceran community. *Freshwater Biology* 7(6), 505-512.
- Alva-Martínez AF, Sarma SSS, Nandini S (2007) Effect of mixed diets (cyanobacteria and green algae) on the population growth of the cladocerans *Ceriodaphnia dubia* and *Moina macrocopa*. *Aquatic Ecology* 41(4), 579-585.
- Alva-Martínez AF, Sarma SSS, Nandini S (2007) Population dynamics of *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus havanaensis* (Rotifera) on mixed diets with *Microcystis aeruginosa* and green algae. *Hidrobiológica* 17(8), 59-67.
- Angilletta MJ, Dunham AE (2003) The temperature-size rule in ectotherms: simple evolutionary explanations may not be general. *The American Naturalist* 162(3), 332-342.
- Antunes SC, Castro BB, Goncalves F (2004) Effect of food level on the acute and chronic responses of daphnids to lindane. *Environ Pollut* 127,367-375.
- American Public Health Association (APHA) (1992) Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. *Díaz de Santos* 17,800-899.
- Araiza-Vázquez DA (2017) Respuestas demográficas de *Moina macrocopa* (Straus, 1820) en presencia de cianotoxinas de la pista de remo y canotaje "Virgilio Uribe" (Tesis de licenciatura). *Universidad Nacional Autónoma de México*. Tlalneptla. México.
- Arzate-Cárdenas MA, Olvera-Ramirez R, Martinez-Jeronimo F (2010) *Microcystis* toxigenic strains in urban lakes: a case of study in Mexico City. *Ecotoxicology* 19(6), 1157-1165.

- Ashforth D, Yan ND (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.
- Atkinson D (1994) Temperature and organism size: a biological law for ectotherms? *Advances in Ecological Research* 25, 1–58.
- Atkinson D (1995) Effects of temperature on the size of aquatic ectotherms: exceptions to the general rule. *Journal of Thermal Biology* 20, 61–74.
- Atkinson D (1996) Ectotherm life history responses to developmental temperature. In Johnston IA, Bennett AF. *Animals and temperature: phenotypic and evolutionary adaptation* 183–204.
- Azevedo SM, Carmichael WW, Jochimsen EM, Rinehart KL, Lau S, Shaw GR, Eaglesham, GK (2002) Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. *Toxicology* 181, 441-446.
- B-Be'res V, Grigorszky I, Vasas G, Borics G, Varbír G, Nagy SA, Bacsi I (2012) The effects of *Microcystis aeruginosa* (cyanobacterium) on *Cryptomonas ovata* (Cryptophyta) in laboratory cultures: why these organisms do not coexist in steady-state assemblages? *Hydrobiologia* 691(1), 97:107.
- Begon M, Harper JL, Townsend CR (1999) *Ecología*. Omega, Barcelona.
- Beklioglu M, Akkas SB, Ozcan HE, Bezirci G, Togan I (2010) Effects of 4-nonylphenol, fish predation and food availability on survival and life history traits of *Daphnia magna* straus. *Ecotoxicology* 19(5), 901–910.
- Borowitzka MA, Borowitzka LJ (1988) Microalgal biotechnology. *Cambridge University Press*.

- Bownik A, Pawlik-Skowrońska B (2019) Early indicators of behavioral and physiological disturbances in *Daphnia magna* (Cladocera) induced by cyanobacterial neurotoxin anatoxin-a. *Science of The Total Environment* 695, 133913.
- Blanckenhorn WU, Demont M (2004) Bergmann and converse Bergmann latitudinal clines in arthropods: Two ends of a continuum? *Integr. Comp. Biol.* 44, 413-424.
- Brodo IM, Sharnoff, SD, Sharnoff S (2001) Lichens of north America. *Yale University Press*.
- Buratti FM, Manganelli M, Vichi S, Stefanelli M, Scardala S, Testai E, Funari E (2017) Cyanotoxins: producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation. *Archives of Toxicology* 91(3), 1049-1130.
- Cairns Jr J, Dickson KL (1971) A simple method for the biological assessment of the effects of waste discharges on aquatic bottom-dwelling organisms. *Journal (Water Pollution Control Federation)* 755-772.
- Calabrese EJ, Blain R (2005) The occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature, the hormesis database: an overview. *Toxicol Appl Pharmacol* 202-289.
- Campbell AK, Wann KT, Matthews SB (2004) Lactose causes heart arrhythmia in the water flea *Daphnia pulex*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 139(2), 225-234.
- Campos A, Vasconcelos V (2010) Molecular mechanisms of microcystin toxicity in animal cells. *Int. J. Mol. Sci* 11, 268–287.

Carmichael WW, Mahmood NA, Hyde EG (1990) Natural toxins from cyanobacteria (bluegreen algae). In: Hall S, Strichartz G (Eds) Marine toxins, origin, structure and Molecular pharmacology. *American Chemical Society* 418, 87-106.

Carmichael WW (1992) Cyanobacteria secondary metabolites: The cyanotoxins. *J. Appl. Bacteriol* 72, 445-459.

Catherine A, Bernard C, Spoof L, Bruno M (2017) Microcystins and nodularins. In: Meriluoto J, Spoof L, Codd GA (Eds.), Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis. *John Wiley & Sons, Ltd., Hoboken* 107-126.

Chandini T (1988) Effects of different food (*Chlorella*) concentrations on the chronic toxicity of cadmium to survivorship, growth and reproduction of *Echinisca triserialis* (Crustacea: Cladocera). *Environ Pollut* 54, 139–154.

Chorus I, Bartram J (1999) Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. Edited by Ingrid Chorus and Jamie Bertram. World Health Organization (WHO). *Spon FN* 416.

Christoffersen K (1996) Ecological implications of cyanobacterial toxins in aquatic food webs. *Phycologia* 35, 42–50.

Churro C, Dias, Valério E (2012) Risk assessment of cyanobacteria and cyanotoxins, the particularities and challenges of *Planktothrix* spp. monitoring. In *Novel approaches and their applications in risk assessment* IntechOpen.

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

Codd GA (1995) Cyanobacterial toxins: Occurrence, properties and biological significance. *Water Sci. Technol* 32, 149-156.

- Codd, GA, Morrison L, Metcalf J (2005) Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicology and Applied Pharmacology* 203, 264–272.
- De Bernardi RD, Giussani G (1990) Are blue-green algae a suitable food for zooplankton? An overview. *Hydrobiologia* 200(1), 29-41.
- Downing JA (2014) Productivity of Freshwater Ecosystems and Climate Change. *Global Environmental Change* 221-229.
- Duffus J (1993) Glossary for chemists of terms used in toxicology (IUPAC Recommendations 1993). *Pure and applied chemistry* 65(9), 2003-2122.
- Elías-Gutiérrez M, Smirnov NN, Suárez-Morales E, Dimas-Flores N (2001) New and little known cladocerans (Crustacea: Anomopoda) from southeastern Mexico. *Hydrobiologia* 442(1-3), 41-54.
- Enesco EH (1993) Rotifers in aging research: use of rotifers to test various theories of aging. *Hydrobiologia* 255:256, 59-70.
- Ferrão-Filho DA, Azevedo SM (2003) Effects of unicellular and colonial forms of toxic *Microcystis aeruginosa* from laboratory cultures and natural populations on tropical cladocerans. *Aquatic ecology* 37(1), 23-35.
- Ferrão-Filho DA, Dias TM, Pereira UJ, dos Santos JAA, Kozłowsky-Suzuki B (2019). Nutritional and toxicity constraints of phytoplankton from a Brazilian reservoir to the fitness of cladoceran species. *Environmental Science and Pollution* 36(10), 2689–2697.
- Fernández R, Nandini S, Sarma SSS, Castellanos-Paez ME (2014) Effects of cyanobacteria, fish kairomones, and the presence of ostracods on the demography of *Simocephalus vetulus* (Cladocera). *Invertebrate Biology* 133(4), 371–380.

- Finey DJ (1971) Probit analysis. 3rd ed. *Cambridge University Press* 333.
- Fulton RS, Paerl HW (1988) Effects of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* on zooplankton competitive relations. *Oecologia* 76(3), 383-389.
- Gayosso-Morales MA, Nandini S, Martínez-Jeronimo FF, Sarma SSS (2017) Effect of organic and inorganic turbidity on the zooplankton community structure of a shallow water body in Central Mexico (Lake Xochimilco, Mexico). *Journal of Environmental Biology* 38(6), 1183-1196.
- Ger KA, Hansson LA, Lüring M (2014) Understanding cyanobacteria-zooplankton interactions in a more eutrophic world. *Freshwater Biology* 59(9), 1783–1798.
- Gilbert JJ (1990) Differential effects of *Anabaena affinis* on cladocerans and rotifers: mechanisms and implications. *Ecology*. 71, 1727–1740.
- Gilbert J (1996) Effect of the temperature on the response of planktonic rotifers to a toxic cyanobacterium. *Ecology* 77, 1174-1180.
- Goss LB, Bunting DL (1983) *Daphnia* development and reproduction: responses to temperature. *Journal of Thermal Biology* 8, 375-380.
- Gulati RD (1990) Structural and grazing responses of zooplankton community to biomanipulation of some dutch water bodies. *Hydrobiologia* 200:201, 99–118.
- Halbach U, Halbach-Keup G (1974) Quantitative beziehungen zwischen phytoplankton und der populations dynamik des rotators *Brachionus calyciflorus* Pallas. Befunde aus laboratoriumsexperimenten und freilanduntersuchungen. *Archiv für Hydrobiologie* 273-309.

- Hanazato T (1991) Effects of long-and short-term exposure to carbaryl on survival, growth and reproduction of *Daphnia ambigua*. *Environmental Pollution* 74(2), 139-148.
- Hanazato T (2000) Toxic cyanobacteria and the zooplankton community: Watanabe MF, Harada K, Carmichael WW, Fujiki H (Eds.) *Toxic Microcystis*. CRC Press, Boca Raton 79–98.
- Hansson LA, Gustafsson S, Rengefors K, Bomark L (2007) Cyanobacterial chemical warfare affects zooplankton community composition. *Freshwater Biology* 52(7), 1290-1301.
- Hessen DO, Alstad NE, Skardal L (2000) Calcium limitation in *Daphnia magna*. *Journal of Plankton Research* 22(3), 553-568.
- Herrera NA, Palacio J, Echeverri F, Ferrão-Filho AS (2014) Effects of a cyanobacterial bloom sample containing microcystin-LR on the ecophysiology of *Daphnia similis*. *Toxicology reports* 1, 909-914.
- Herrera NA, Echeverri LF, Ferrão-Filho AS (2015) Effects of phytoplankton extracts containing the toxin microcystin-LR on the survival and reproduction of cladocerans. *Toxicon* 95, 38–45.
- Hietala J, Laurén-Määttä CA, Milla, Walls M (1997) Sensitivity of *Daphnia* to toxic cyanobacteria: effects of genotype and temperature. *Freshwater Biology* 37(2), 299-306.
- Hoffman DJ, Rattner BA, Burton Jr. GA, Cairns Jr. J (2002) Handbook of ecotoxicology. Lewis Publishers, A CRC Press Company 1253.
- Holland A, Kinnear S (2013) Interpreting the possible ecological role (s) of cyanotoxins: compounds for competitive advantage and/or physiological aide? *Marine drugs* 11(7), 2239-2258.

- Huisman J, Hulot FD (2005) Population dynamics of harmful cyanobacteria. *In Harmful Cyanobacteria*, Aquatic Ecology Series. Eds. Huisman J, Matthijs HCP, Visser, PM, Dordrecht. *The Netherlands: Springer* 76-143.
- Huisman J, Codd GA, Paerl HW, Ibelings BW, Verspagen JMH, Visser PM (2018) Cyanobacterial blooms. *Nature Reviews Microbiology* 16(8), 471–483.
- Jeppesen E, Moss B, Bennion H, Carvalho L, De Meester L, Feuchtmayr H, Friberg N, Gessner MO, Hefting M, Lauridsen TL (2010) Interaction of climate change and eutrophication. En: Kernan M, Battarbee RW, Moss B, editors. *Climate change impacts on freshwater ecosystems*, 119-151.
- Komárek J, Anagnostidis K (1998) Cyanoprokaryota Teil: Chroococcales. Süßwasserflora von Mitteleuropa. Band 19/1. Berlin, *Spektrum Akademischer Verlag*.
- Komárek J, Komárková-Legnerová J (2002) Contribution to the knowledge of planktic cyanoprokaryotes from central Mexico. *Preslia, Praha* 74, 207–233.
- Komárek J (2013) Süßwasserflora von Mitteleuropa. Cyanoprokaryota: 3rd part: heterocystous genera. *Heidelberg: Springer Spektrum* 19, [I]-XVIII, [1]-1130.
- Krebs CJ (1985) Ecology. The experimental analysis of distribution and abundance. 3rd ed. *Harper & Row, New York*.
- Knillmann S, Stampfl NC, Beketov MA, Liess M (2012) Intraspecific competition increases toxicant effects in outdoor pond microcosms. *Ecotoxicology* 21(7), 1857–1866.
- Lamkemeyer T, Zeis B, Rudiger JP (2003) Temperature acclimation influences temperature-related behavior as well as oxygen-transport physiology and biochemistry in the water flea *Daphnia magna*. *Canadian Journal of Zoology* 81(2), 237-249.

- Lampert W (1987) Laboratory studies on zooplankton-cyanobacteria interactions. New Zealand. *Journal of marine and freshwater research* 21(3), 483-490.
- 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.
- McArthur RH (1972) Geographical ecology: Patterns in the distribution of species. *New York: Harper & Row*.
- McKintosh C, Beattie KA, Klumpp S, Cohen P, Codd GA (1990) Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatase-1 and phosphatase-2A from both mammals and higher-plants. *FEBS Lett* 264, 187-192.
- Mansano AS, Moreira RA, Dornfeld HC, Diniz LR, Vieira EM, Daam MA, Seleglim MHR (2016) Acute and chronic toxicity of diuron and carbofuran to the neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. *Environmental Science and Pollution Research* 25(14), 13335-13346.
- Mattson MP (2008) Hormesis defined. *Ageing research reviews* 7(1), 1-7.
- Maynard DM (1960) Circulation and heart function. *The Physiology of Crustaceans* 1, 161-226.
- Meiri S, Dayan T (2003) On the validity of Bergmann's rule. *Journal of Biogeography* 30(3), 331-351.
- McNab BK (1971) On the ecological significance of Bergmann's rule. *Ecology* 52(5), 845-854.

- Mishra A, Chopra AK, Shukla S (2016) Physiological responses of heart of tailless fresh water flea *Simocephalus vetulus* (Crustacea-Cladocera) under copper sulphate stress). *CIB Tech J. Zoo* 5(3), 52-59.
- Moore M, Folt CL, Stemberger R (1996) Consequences of elevated temperatures for zooplankton assemblages in temperature lakes. *Archiv fur hydrobiologia* 135, 289-319.
- Moreno I, Repetto G, Cameán A (2003) Interés toxicológico de las microcistinas. *Revista de Toxicología* 20(3), 159-165.
- Moreno MJ (2010) Analysis of the Relationship Between Submerged Aquatic Vegetation (SAV) and Water Trophic Status of Lakes Clustered in Northwestern Hillsborough County, Florida. *Water, Air, & Soil Pollution* 214(1-4), 539-546.
- Muñoz-Mejía G (1997) Cultivo Experimental de tres especies de Cladóceros de la familia Daphnidae y evaluación de su utilidad como organismos de prueba en estudios toxicológicos (*Doctoral dissertation, MS Dissertation. Esc. Nal. Cienc. Biol. IPN, México DF 1997*).
- Nandini S, Rao TR (1998) Somatic and population growth in selected cladocerans and rotifer species offered the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* as food, *Aquatic Ecology* 31, 283-298.
- Nandini S, Ramírez-García P (2000) Life table demography and population growth of *Daphnia laevis* (Cladocera, Anomopoda) under different densities of *Chlorella vulgaris* and *Microcystis aeruginosa*. *Crustaceana* 73(10), 1273–1286.
- Nandini S, Mayely SM, Sarma SSS (2004) Effect of stress on the life-table demography of *Moina macrocopa*. *Hydrobiology* 526, 245–254.

- Nandini S, Picazo-Paez EA, Sarma SSS (2007). The combined effects of heavy metals (copper and zinc), temperature and food (*Chlorella vulgaris*) level on the demographic characters of *Moina macrocopa* (Crustacea: Cladocera). *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 42(10), 1433–1442.
- Nandini S, Miracle MR, Vicente E, Sarma SSS, Gulati RD (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, Sánchez-Zamora C, Sarma SSS (2019). Toxicity of cyanobacterial blooms from the reservoir Valle de Bravo (Mexico): A case study on the rotifer *Brachionus calyciflorus*. *Science of the Total Environment* 688, 1348-1358.
- National River Authority (NRA) (1990) Toxic blue-green algae. Water Quality Series N° 2. Pearson, M.J. (Comp.). *Informe del grupo de trabajo sobre Algas Tóxicas*. National River Authority, U.K.
- Nogueira ICG, Lobo-da-Cunha A, Vasconcelos VM (2006). Effects of *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Aphanizomenon ovalisporum* (cyanobacteria) ingestion on *Daphnia magna* midgut and associated diverticula epithelium. *Aquatic Toxicology*, 80(2), 194–203.
- Ohtake AM, Shirai T, Aida N, Mori K, Harada K, Matsumura M, Suzuki M, Nakano (1989) Toxicity of *Microcystis* species isolates from natural blooms and purification of the toxin. *Applied and Environmental Microbiology* 55(12), 3202-3207.
- Okumura D, Sotero-Santos R, Takenaka-Akemi R, Rocha O (2006) Evaluation of cyanobacteria toxicity in tropical reservoirs using crude extracts bioassay with cladocerans. *Ecotoxicology* 16, 263–270.
- Ortega MM (1981) Catálogo de algas continentales recientes de México. *Primera edición, Universidad Nacional Autónoma de México* 565.

- Paes TASV, Costal ASD, Silva APC, Eskinazi-Sant'Anna EM (2016) Canmicrocystins affect zooplankton structure community in tropicaleutrophic reservoirs? *Brazilian Journal of Biology* 76(2), 450-460.
- Paerl HW, Huisman J (2009) Climate change: a catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. *Environmental microbiology reports* 1(1), 27-37.
- Paerl HW, Otten TG (2013) Harmful cyanobacterial blooms: causes, consequences, and controls. *Microbial ecology* 65(4), 995-1010.
- Pietsch K, Wiegand C, Amé MV, Nicklisch A, Wunderlin D, Pflungmacher S (2001) The effects of a cyanobacterial crude extract on different aquatic organisms: evidence for cyanobacterial toxin modulating factors. *Environ. Toxicol* 16(6), 535-542.
- Pietsch K, Hofmann S, Henkel R, Saul N, Menzel R, Steinberg CEW (2010) The plant polyphenol caffeic acid affects life traits differently in the nematode *Caenorhabditis elegans* and the cladoceran *Moina macrocopa*. *Fresenius Env. Bull* 19, 1238–1244.
- Pineda MR, Olvera-Ramirez R, Martínez-Jerónimo F (2012) *Microcystins* produced by filamentous cyanobacteria in urban lakes. A case study in Mexico City. *Hidrobiológica* 22(3), 290-298.
- Pineda MR, Briones-Roblero M, Gonzalez-Escobedo CI, Rivera-Orduña R, Martínez-Jerónimo F, Zúñiga G (2020) Seasonal changes in the bacterial community structure of three eutrophicated urban lakes in Mexico City, with emphasis on *Microcystis* spp. *Toxicon* 178, 8-20.
- Rajaretnam AS, Stanley SA (2015). Studies on the toxicological effects of bimetals on the cladoceran, *Daphnia magna* and examination of histopathological effects through Transmission Electron Microscopy (TEM). *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 7(4), 506-511.

- Llodra RE (2002) Fecundity and life-history strategies in marine invertebrates. *Advances in Marine Biology* 87–170.
- Reinikainen M, Ketola M, Walls M (1994) Effects of the concentrations of toxic *Microcystis aeruginosa* and an alternative food on the survival of *Daphnia pulex*. *Limnology and Oceanography* 39(2), 424-432.
- Repavich WM, Sonzogni WC, Standridge JH, Wedepohl RE, Meisner LF (1990) Cyanobacteria (Blue-green algae) in Wisconsin waters: acute and chronic toxicity. *Water Research* 24, 225-231.
- Reynolds CS (1991) Toxic blue-green algae: the problem in perspective. *Freshwat. For* 1, 29–38.
- Rohrlack T, Dittmann E, Börner T, Christoffersen K (2001) Effects of Cell-Bound microcystins on Survival and Feeding of *Daphnia* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 67(8), 3523–3529.
- Rohrlack T, Christoffersen K, Dittmann E, Nogueira I, Vasconcelos V, Börner T (2005) Ingestion of microcystins by *Daphnia*: Intestinal uptake and toxic effects. *Limnol. Oceanographic* 50, 440–448.
- Sarma SSS, Nandini S, Gulati RD (2005) Life history strategies of cladocerans: comparisons of tropical and temperate taxa. *Hydrobiologia* 542, 315–333.
- Sarma SSS, Nandini S (2006) Review of recent ecotoxicological studies on cladocerans. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 41(8), 1417-1430.
- Skadovski S (1955) Ecological physiology of aquatic organisms. Moskva, p. 34 (in Russian).

- Sieroslawska A, Rymuszka A (2013) Assessment of the potential genotoxic and proapoptotic impact of selected cyanotoxins on fish leukocytes. *Cent. Eur. J. Immunology* 38, 190-195.
- Sivonen K, Jones G (1999) Cyanobacterial toxins. In: Toxic cyanobacteria in water; A guide to their public health consequences, monitoring and management. I. Chorus and J. Bartram (Eds.) London, *Chapman and Hall* 41-111.
- Smirnov NN (2017) Physiology of the Cladocera. *Academic Press, Elsevier* 196.
- Stanier RY, Cohen-Bazire G (1977) Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Annu Rev Microbiol* 31, 225-274
- Stearns SC (1989) Trade-Offs in Life-History Evolution. *Functional Ecology* 3(3), 259.
- Stewart IA, Seawright A, Shaw GF (2008) Cyanobacterial poisoning in livestock, wild mammals and birds an overview. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 619, 613-637.
- Sun X, Tao M, Qin B, Qi M, Niu Y, Zhang J, Xie P (2012) Large-scale field evidence on the enhancement of small-sized cladocerans by *Microcystis* blooms in Lake Taihu, China. *Journal of plankton research* 34(10), 853-863.
- Van Apeldoorn ME, Van Egmond HP, Speijers GJ, Bakker GJ (2007) Toxins of cyanobacteria. *Molecular nutrition & food research* 51(1), 7-60.
- Verbitsky VB, Verbitskaya TI, Malysheva OA (2014) Temperature behavior of the cladoceran *Simocephalus vetulus* O.F. Müller, 1776 (Crustacea, Cladocera) from the Rybinsk water reservoir. *Doklady Biological Sciences* 455(1), 91-93.
- Vidal L, Pérez M. del C (2009) Capítulo 9, Parte III-Identificación. Claves taxonómicas. En Bonilla (2009). *Cianobacterias Planctónicas de Uruguay*, UNESCO 41-44.

- Walls JT, Wyatt KH, Doll JC, Rubenstein EM, Rober AR (2018) Hot and toxic: Temperature regulates microcystin release from cyanobacteria. *Science of The Total Environment* 610-611, 786–795.
- Weber, CI (1993) Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. 4th edn. United States, Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio, EPA/600/4-90/027.
- Whitton BA, Potts M (2000) The ecology of Cyanobacteria. *Kluwer Academic Publishers. USA* 671.
- Whitton BA (2011) Cianobacterias (Cyanophyta). En: La flora de algas de agua dulce de las Islas británicas. Una guía de identificación de algas de agua dulce y terrestres. Segunda edición. (John, DM, Whitton, BA y Brook, AJ Eds). *Cambridge University Press* 3-158.
- World Health Organization (WHO) (1998). Guidelines for Drinking e Water Quality. *Second ed. Addendum* (2).
- World Health Organization (WHO) (2003) Guidelines for Safe Recreational Water Environments. *Coastal and Freshwaters* (1), 136-158.
- Xiang XL, Chen YY, Xu QL, Zhu LY, Wen XL, Xi YL (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.
- 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.
- Zamora-Barrios CA, Nandini S, Sarma SSS (2015) Effect of crude extracts of *Dolichospermum planctonicum* on the demography of *Plationus patulus* (Rotifera) and *Ceriodaphnia cornuta* (Cladocera). *Ecotoxicology* 24, 85-93.

Zamora-Barrios CA, Nandini S, Sarma SSS (2017) Effect of crude extracts from cyanobacterial blooms in Lake Texcoco (Mexico) on the population growth of *Brachionus calyciflorus* (Rotifera). *Toxicon* 139, 45–53.

Zhang C, Jansen M, De Meester L, Stoks R (2016) Energy storage and fecundity explain deviations from ecological stoichiometry predictions under global warming and size-selective predation. *Journal of Animal Ecology* 85(6), 1431–1441.