



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

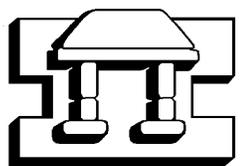
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**DETERMINACIÓN DE MICROCISTINAS DE *Microcystis*
spp. EN ALGUNOS HUMEDALES DEL MUNICIPIO DE
CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I Ó L O G O
P R E S E N T A

Francisco Alberto Seañez Basurto

DIRECTORA
M. en C. Gloria Garduño Solórzano



IZTACALA

Los Reyes Iztacala, Estado de México



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México

A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala

A mi Asesora de tesis

M. en C. Gloria Garduño Solórzano

A mis Sinodales

M. en C. María Guadalupe Oliva Martínez

Dr. Alfonso Lugo Vázquez

Biól. José del Carmen Benítez Flores

M. en C. María del Rosario González Valle

A los maestros

M. en C. Luis Barbo Portilla

Dr. Tirso Ríos

Dr. Ricardo Mejía

Y a todos los maestros que a lo largo de mi vida han ayudado a formar mi camino

Gracias

A mis Padres

Profra. Clara Basurto Cadena e Ing. Pedro Seañez Pérez por siempre ser el amor, el apoyo y estar cuando más los necesité, por la vida que me brindaron, por la formación y la inspiración que representan.

Mi hermano

ATC. Juan Manuel Seañez Basurto por ser una gran inspiración por acompañarme y compartir momentos inolvidables de la infancia.

A mis Abuelitos

Francisco Basurto y Ma. de la Luz Cadena Castilla, Juan Manuel Seañez y Sofía Pérez

A mis tíos

Margarita Tallarico Castilla

Dra. Guadalupe Basurto Cadena y Dr. Manuel Vázquez Arista

C.P. Rafael Basurto Cadena y Guadalupe Maya

Aloso D. Seañez Pérez y tía Gaby

A mis primos

Lagdi Vázquez Basurto, Paola Basurto Maya, Quiram Manuel Vázquez Basurto, Rafael Basurto Maya, Dacti Vázquez Basurto y Ana Belén Basurto Maya

A mi familia adoptiva

Sr. Mauro Díaz Piña, Sra. Aurelia Castro Gómez, Sr. Ricardo García Ramos, Sra. Ma del Rocío Díaz Castro, Yamili D. García Díaz y Yousi P. Díaz Castro, José y Angie

A mis sobrinos

Juan R. Seañez, Michelle Seañez y Sabdi R. Laguna.

A mi abue Tollita, tío Pino, tío Mingo, tío Arturin, siempre los llevo en mi corazón, gracias.

A mis amigos: Lalo, Abrahan, Abraham, Laurita, Erick, Alejandra, Mario, Kike, Penélope, Ely y Rosy. Gracias por hacer inolvidable esa etapa. Y los nuevos Jessy, Johan.

A mis jefes: Raúl Bañuelos, Javier Vega y Allison Andersen, gracias por confiar en mí.

Gracias a todas y cada una de las personas arriba mencionadas por permitirme ser parte de su vida, ya que yo soy el resultado de la interacción con ustedes, los quiero mucho.

A los dos amores de mi vida, Mi esposa Bióloga Yazid Y. García Díaz gracias por tu apoyo y confianza. A mi hijo Carlos E. Seañez García. Porque son el motor que mueve mi vida, la esperanza y la fe. Los amo con toda la fuerza de mí ser.

Y principalmente, Gracias a Dios por el permiso de vivir y estar en este camino.

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
Importancia ecológica.....	4
Clasificación de Cianotoxinas	5
Estabilidad, degradación y remoción de microcistinas	7
Microcistinas en el género <i>Microcystis</i>	8
Antecedentes.....	8
Determinación de microcistinas por diferentes métodos.....	11
PROBLEMÁTICA	12
OBJETIVO	13
Objetivos Particulares.....	13
ÁREA DE ESTUDIO	14
Clima	15
MATERIAL Y MÉTODO	16
Obtención del material biológico	17
Determinación taxonómica.....	17
Obtención del extracto.....	17
Extracto de Agua residuo	18
Ensayos inmunológicos: Prueba de ELISA por competencia	18
Método analítico por HPLC	22
RESULTADOS	23
Determinación taxonómica.....	23
<i>Microcystis aeruginosa</i>	23
<i>Microcystis botrys</i>	23
<i>Microcystis flos-aquae</i>	24
<i>Microcystis panniformis</i>	24
Extracción y cuantificación	25
Técnica de HPLC para el registro de las microcistinas	26
DISCUSIÓN	29
Ficoflora	29
La prueba de ELISA por competencia	31
Método Analítico HPLC.....	33
CONCLUSIÓN	34
PERSPECTIVAS	35
BIBLIOGRAFÍA	36

RESUMEN

Las cianobacterias o algas verde-azules son organismos procariontes, cuando crecen en altas concentraciones de nutrientes principalmente nitrógeno y fósforo, pueden formar “*blooms*” o Florecimientos Algales Nocivos (FAN), en donde estos microorganismos producen toxinas llamadas cianotoxinas. Estas se clasifican según sus propiedades toxicológicas en: Neurotoxinas, Dermatotoxinas y Hepatotoxinas; considerando sus propiedades químicas se conocen tres grupos: péptidos cíclicos, alcaloides y lipopolisacáridos. Las microcistinas son heptapéptidos, potentes inhibidores de las fosfatasas tipo 1 y 2 (PP1 y PP2), causan toxicidad en hígado, riñones, tracto gastrointestinal, corazón, alteraciones hematológicas, bioquímicas, inmunológicas, desbalance iónico y reducción de crecimiento. Son consideradas como un problema ambiental, ecotoxicológico y principalmente sanitario, la Organización Mundial de la Salud estableció el nivel máximo permisible para el consumo oral diario de 1µg/l de microcistina LR (MC-LR). Debido a lo anterior, en este trabajo se reconocen los taxa específicos de las poblaciones del género *Microcystis* que se colectaron en los florecimientos observados en la presa de Guadalupe en el Estado de México durante los meses de junio-julio del 2006. El FAN estuvo conformado por cuatro especies: *Microcystis aeruginosa*, *M. botrys*, *M. panniformis* y *M. flos-aquae*. Para la cuantificación de la concentración de microcistinas se realizaron ensayos inmunológicos a través de la prueba de ELISA, calculando una concentración de 1.270 mg/l. No se conoció el tipo de microcistinas, ya que no se utilizaron cartuchos de inmunoafinidad en la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC, por sus siglas en inglés).

INTRODUCCIÓN

Las algas constituyen un grupo heterogéneo de fotosintetizadores productores de oxígeno con mecanismos propios de nutrición y reproducción (Bold y Wynne, 1985). Las últimas clasificaciones señalan 12 divisiones taxonómicas, de ellas sólo las cianobacterias son procariontes (Hoek *et al.*, 1995).

Generalmente, las cianobacterias, Cyanoprokaryota o algas verde-azules son aeróbicas y fotoautótrofas. Se encuentran entre los organismos más primitivos de la Tierra y tienen una larga historia evolutiva por lo que la mayoría de los geólogos están de acuerdo en que su origen data de 3,500 millones de años, lo que corresponde a la era Proterozoica conocida como “era de las Cianobacterias” (Roset *et al.*, 2001; Ramírez *et al.*, 2004). Komárek (2003) las considera como el ancestro más diverso y abundante de microorganismos, que se caracterizan por carecer de organelos con sistemas de membrana doble. Los pigmentos que contienen son clorofila *a*, β caroteno y ficobiliproteínas: *c*-ficocianina (azul), *c*-ficoeritrina (rojo) y aloficocianina organizadas en tilacoides simples localizados en formas particulares en cada *taxa*; dependen del CO₂ y producen oxígeno mediante la fotosíntesis. Las sustancias de reserva que producen son carbohidratos como el glucógeno, el alfa 1:4 glucano y polifosfatos (Trainor, 1978). La pared celular, es semejante a las bacterias Gram negativas; presentan una estructura multiestratificada constituida por 4 capas, denominadas L1, L2, L3 y L4; en observaciones en Microscopia Electrónica de Transmisión las capas L1 y L3, son transparentes; mientras las L2 y L4 son electrodensas. La L2, contiene mureina, peptidoglicanos, con cadenas laterales de péptidos, y alternando residuos de *N*-acetilglucosamina y ácido *N*-acetilmuranico. La L4, está organizada en una doble membrana constituida de lipopolisacáridos por lo que se ha llamado membrana externa.

Algunas especies contienen nitrogenasa, en el heterocito, por lo cual son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico y otras pueden precipitar CaCO₃ formando

estromatolitos (formaciones rocosas de cianobacterias en capas superpuestas silíceas o calcáreas) (Hoek *et al.*, 1995).

Casi todas las cianobacterias producen compuestos mucilaginosos que forman una vaina, que varía de consistencia y amplitud alrededor de las células. Esta puede formar masas hialinas, amorfas, difusas o capas difusas y estructuradas, cuya función es proteger de la radiación solar intensa, por lo que también contienen pigmentos carotenoides (Komárek, 2003). La estructura del mucílago es una característica importante para la diagnosis de los géneros. La lamelación o estratificación se origina por la producción periódica de mucílago. La estructura, consistencia y delimitación del margen de las envolturas gelatinosas es utilizada como un carácter intergenérico. Se reproducen asexualmente por la formación de hormogonios, exosporas, acinetos, fragmentación y baeocistos anteriormente llamados endosporas (Fogg *et al.*, 1973, Sant' Anna *et al.*, 2006).

Las cianobacterias han colonizado casi todos los ambientes dulceacuícolas, marinos y terrestres. En cuerpos de agua dulceacuícolas de aguas alcalinas o neutras con pH entre 6 - 9, y temperaturas entre 15° y 30°C (Roset *et al.*, 2001). En México en aguas termales de los Azufres, Michoacán se desarrollan tapetes de *Phormidium boryanum* a 85 °C (López Sandoval *et al.*, 2007). Cuando crecen en altas concentraciones de nutrientes, principalmente nitrógeno y fósforo, pueden formar un florecimiento algal conocido con el nombre de “*bloom*”, algunos de estos pueden llegar a ser tóxicos (Ortega *et al.*, 1994). Otros hábitats donde se desarrollan son: manantiales termales, desiertos, endolíticos; simbioses con algunos hongos (formando líquenes) y con plantas, forman manchas incrustadas sobre la superficie húmeda de las rocas, en el suelo o en la corteza de los árboles y sobre la nieve (Komárek, 2003).

Históricamente las primeras clasificaciones fueron propuestas por criterios morfológicos (Geitler, 1932; Desikachary, 1959). Más tarde, los bacteriólogos utilizaron características fisiológicas y bioquímicas usando cultivos. En las últimas cuatro décadas, las clasificaciones consideran las características ecológicas,

ultraestructurales y evidencias moleculares de los taxa, lo que ha permitido ampliar el conocimiento del grupo (Komárek, 2003). Asimismo los resultados de los estudios moleculares y ultraestructurales han generado cambios continuos en los esquemas de clasificación (Anagnostidis y Komárek, 1985).

Las cianobacterias presentan una amplia variedad morfológica. El tamaño de las células puede variar entre 1µm de diámetro hasta 20µm de largo, y la forma celular varía entre esféricas, ovaladas, fusiformes, cilíndricas e irregulares. En algunos géneros coloniales sus células pueden ser poligonales ó elongadas, y en otros grupos las colonias pueden ser amorfas y polarizadas (Hoek *et al.*, 1995).

Con base en la morfología vegetativa se presentan organismos unicelulares, coloniales, filamentos uni o multiseriados con ramificaciones verdaderas o falsas y pseudoparenquimatosas o agregados de filamentos o células densamente entrelazadas (*Hydrococcus*) en las que se observa cierto grado de diferenciación celular y en algunos casos comunicación celular (Nostocales y Stigonematales). El tipo de organización y la polaridad son considerados aspectos de importancia taxonómica a nivel de familia y orden (Sant' Anna *et al.*, 2006).

Importancia ecológica

Tienen una gran importancia ecológica como indicadores de contaminación y como fijadoras de nitrógeno (Marshall, 1987). Las Cyanobacterias son productoras de metabolitos secundarios bioactivos, bajo ciertas condiciones producen Florecimientos Algales Nocivos (FAN) también llamados *blooms*. Este fenómeno es causado por el incremento de la concentración de células, por lo general son perceptibles a simple vista debido a los colores, dependen de la talla, forma y concentración de los organismos causantes de concentraciones del orden de 10⁶ cels/l (Reguera., 2002).

La producción de florecimientos causa varios problemas ecológicos; entre ellos generar un exceso de materia orgánica, disminuir la concentración de oxígeno disuelto, muerte de componentes del zooplancton, peces y aves, y alteraciones de

las condiciones organolépticas debido a la producción de geosmina o 2 metilisoberneol y formación de espuma (Oberholster *et al.*, 2006). Pero también hay la producción de toxinas llamadas cianotoxinas; estas se presentan cuando hay un alto incremento de fósforo y nitrógeno de temperatura y una variación abrupta del pH (Briand *et al.*, 2008; Sant' Anna *et al.*, 2006).

La temperatura óptima para el crecimiento de las cianobacterias oscila entre los 20 y 25°C, éste intervalo es alto para el crecimiento de diatomeas y clorofíceas (Kardinaal y Visser, 2005); por lo tanto, las cianobacterias no se ven afectadas cuando las condiciones de temperatura son extremas, sino por el contrario son favorecidas para su crecimiento; lo anterior explica la formación de *blooms* durante el verano en los ambientes de zonas templadas y boreales. Así mismo, las variaciones de temperatura están relacionadas con cambios en la concentración y composición de las cianotoxinas, por ejemplo a temperaturas inferiores a 25°C *Anabaena* sp. produce microcistina LR (MC-LR), mientras que en temperaturas altas produce microcistina RR (MC-RR) (Msagati *et al.*, 2006).

Clasificación de Cianotoxinas

Los principales *taxa* productores de cianotoxinas son: *Aphanizomenon*, *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Cylindrospermum*, *Cylindrospermopsis*, *Gloetrichia*, *Gomphosphaeria*, *Lyngbya*, *Microcystis*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Phormidium*, *Oscillatoria*, *Pseudanabaena*, *Planktothrix*, *Synechococcus*, *Synechocystis* y *Trichodesmium* (Cronberg, 2005).

Las toxinas biosintetizadas por las cianobacterias constituyen tres grupos químicamente heterogéneos: péptidos cíclicos (microcistina y nodularina), alcaloides (neurotoxina y cilindrospermopsina) y lipopolisacáridos (Kaebernick y Neilan, 2001; Roset *et al.*, 2001; Ouellette *et al.*, 2003; Falconer, 2005a y b; Wiegand y Pflugmachaer, 2005; Sant' Anna *et al.*, 2006).

Por otra parte, las cianotoxinas se clasifican según las propiedades toxicológicas en: **Neurotoxinas, Dermatotoxinas y Hepatotoxinas.**

Las **Neurotoxinas** son alcaloides de tipo carbamato (saxitoxinas, anatoxinas y homoanatoxina) que ocasionan parálisis progresiva de los músculos. Estas son producidas por cepas de los géneros: *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Lyngbya*, *Cylindrospermopsis*, *Oscillatoria* y *Trichodesmium* (Sant' Anna et al., 2006).

Las **Dermatotoxinas** corresponden a lipopolisacáridos formados por carbohidratos (hexosas) y ácidos grasos de cadena C₁₄ a C₁₈. Estas causan irritaciones en los ojos, piel, fiebre y en ocasiones alteraciones gastrointestinales. Los primeros estudios sobre estas cianotoxinas han sido realizados en algunas especies de *Microcystis*, *Anabaena* y *Anacystis* (Moreno et al., 2002).

Las **Hepatotoxinas** (microcistinas y nodularinas), productoras de tumores son generadas por varias especies del género *Microcystis*, algunas especies de *Anabaena*, *Planktothrix*, *Nostoc*, *Hapalosiphon*, *Synechocystis*, *Aphanocapsa* y *Oscillatoria* (Roset et al., 2001; Sant' Anna et al., 2006),

Las microcistinas (MC) son heptapeptidos cíclicos cuya fórmula generalizada es: ciclo (d-Ala¹-X²-d-MeAsp³-Y⁴-Adda-Arg⁵-d-Glu⁶-Mdha⁷-) (Figura 1). Están formadas por cinco aminoácidos invariables: d-alanina, ácido d-metilaspártico, Adda (ácido 3-Amino-9-Metoxi-2,6,8-Trimetil-10-fenil-4,6-dienoico), ácido d-glutámico y N-metildihidroalanina; en posiciones 1, 3, 5, 6 y 7; y dos L-aminoácidos en las posiciones 2 y 4 (Falconer, 2005 a y b). El aminoácido, Adda es esencial para la expresión de la actividad biológica.

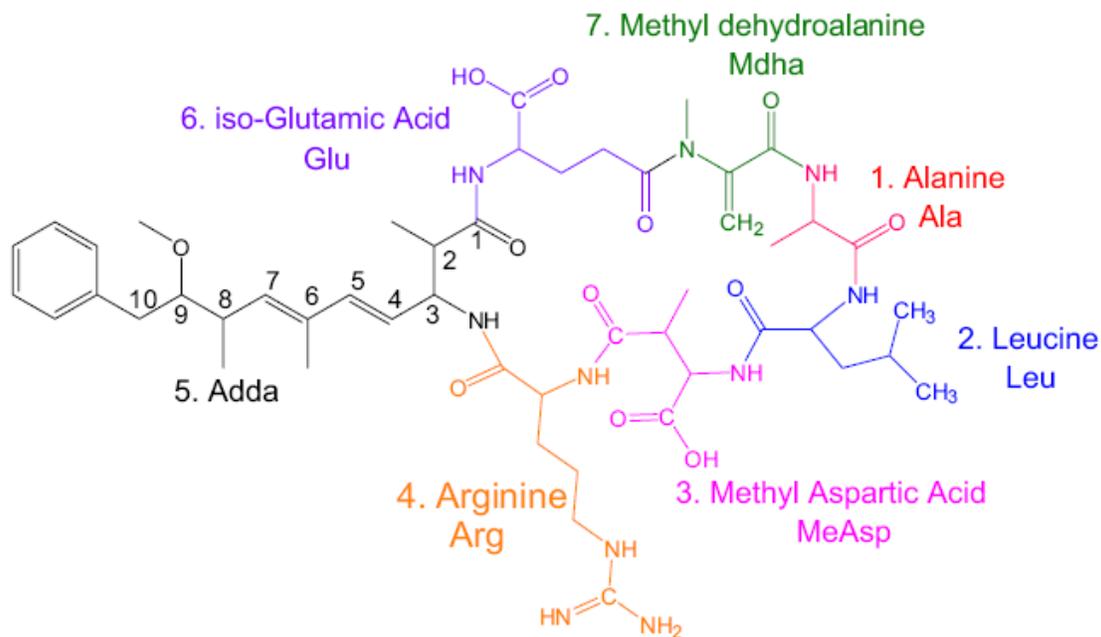


Figura 1. Estructura química de la microcistina LR, según Antoniou *et al.*, (2008).

Las microcistinas son moléculas relativamente polares debido a la presencia de ácidos carboxílicos libres en su estructura y a la arginina con una cadena lateral en las posiciones 2 y 4. Las toxinas se denominan de acuerdo a los dos L-aminoácidos variables en las posiciones X y Y, por ejemplo, la MC-LR contiene los aminoácidos leucina (L) y arginina (R) en estas posiciones. Actualmente se conoce que una cepa de cianobacteria puede sintetizar más de una variable de microcistina (Sivonen y Jones, 1999; Kaebernick y Neilan, 2001; Vasconcelos, 2001; Falconer, 2005a y b; Wiegand y Pflugmachaer, 2005; Jayaraj *et al.*, 2006).

Según los aminoácidos existentes en las posiciones X y Y se pueden clasificar en tres grupos de toxicidad: elevada (MC-LR > MC-LA > MC-YR); moderada (MC-WR, MC desmetiladas en Mdha y -Me-Asp), y baja (MC-LY < MC-RR) (Pérez y Gutierrez, 2008).

Estabilidad, degradación y remoción de microcistinas

Las microcistinas son extremadamente resistentes a la hidrólisis enzimática, pH extremos, a temperaturas hasta los 300°C y no son destruidas por oxidantes comunes. Su vida media es aproximadamente 3 semanas a 40°C y pH 1 (Cousins

et al., 1996). Para su remoción se debe eliminar la estratificación, minimizar la incorporación de nutrientes, reducir los tiempos de residencia y no usar alguicidas como el sulfato de cobre ya que al provocar la lisis de las cianobacterias, se liberan las toxinas. La degradación completa de las microcistinas requiere de un tratamiento a reflujos con ácido hidroxilórico 6 N y ácido trifluoroacético (Ramírez *et al.*, 2004).

Microcistinas (MC) en el género *Microcystis*

El género *Microcystis* se compone de colonias planctónicas mucilaginosas multicelulares, es productor de aproximadamente 80 tipos de microcistinas (Prieto *et al.*, 2005) conformadas por péptidos cíclicos hepatotóxicos. Estas se caracterizan por ser de bajo peso molecular y su estructura está formada por siete aminoácidos, fueron descubiertas en las décadas de los sesentas. Debido a los efectos que causan estas toxinas son consideradas como un problema ambiental, ecotoxicológico y principalmente sanitario por esta razón la Organización Mundial de la Salud estableció el nivel máximo permisible para el consumo humano diario de 1ug/l de MC-LR (Moreno *et al.*, 2002).

Antecedentes

Las hepatotoxinas, han sido citadas como causantes de toxicidad en animales e incluso en humanos (Vieira *et al.*, 2005) en la región del Amazonas, Brasil, relacionadas con la contaminación del agua potable que afecta a la población por medio de la ingesta. El primer informe de un *blooms* de cianobacterias toxigénicas asociados con intoxicaciones humanas se dio a principios de 1930. Se ha documentado que las rutas principales de exposición son por ingestión de agua o comida contaminada con cianotoxinas, por inhalación durante el desarrollo de actividades acuáticas, por contacto con la piel y de forma intravenosa por diálisis. El único informe que existe sobre intoxicaciones letales fue en una clínica de Caruaru, Brasil en 1996, por el uso de agua contaminada con cianotoxinas durante el proceso de diálisis (Vasconcelos, 2001).

La inhalación puede producir síntomas alérgicos, tales como rinitis, conjuntivitis, disnea o bronquitis aguda. El contacto puede desencadenar irritación ocular, conjuntivitis, dermatitis aguda, obstrucción nasal, fiebre, náuseas, mialgia, vómito y asma (Hunter, 1998; Lucena, 2008).

Wiegand y Pflugmacher (2005) señalan que las cianobacterias pueden producir diferentes grupos de toxinas, y que pueden ser clasificadas según su actividad ya sea en: hepatotóxica, neurotóxica, citotóxica, dermatotóxica e irritante, además de la producción de endotoxinas (lipolisacáridos, conocidos por su actividad en *Escherichia coli* y *Salmonella sp*), y debido a la producción de estas sustancias indican el peligro que representa la formación de los *blooms* (FAN) en la naturaleza.

Moreno *et al.*, (2002) establecen que se han producido intoxicaciones graves incluso fatales, debido a las floraciones de Cianobacterias, tras la ingesta de aguas contaminadas, afectando en mayor parte al hígado. Las MC producen una necrosis hepática aguda masiva, un cuadro hemorrágico y un choque hipovolémico dando lugar a la muerte de animales y humanos en pocas horas (4-24 h).

La hepatotoxicidad de las microcistinas ha sido extensivamente estudiada en condiciones de laboratorio; en peces se ha reportado, no solo la toxicidad en hígado sino también en riñones, tracto gastrointestinal, cardíaco, alteraciones hematológicas, bioquímicas, inmunológicas, desbalance iónico, reducción de crecimiento, incluso se está considerando la posible neurotoxicidad.

Roset *et al.*, (2001) indican que las microcistinas y nodularinas son potentes inhibidores de las fosfatasa tipo 1 y 2 (PP1 y PP2) de las células eucariontes.

Las hepatotoxinas llegan a los hepatocitos y provocan la pérdida de la arquitectura y desarrolla graves lesiones internas en el hígado; la ausencia de contacto entre las células origina espacios internos con afluencia de sangre capilar, ocasionando por tanto un edema hepático.

La intoxicación aguda en mamíferos se caracteriza por la ruptura de la arquitectura hepática, debido a la fosforilación de las proteínas del citoesqueleto, ocasionando hemorragia intrahepática masiva, necrosis y la muerte en pocas horas (Vasconcelos, 2001).

Las PP1 y PP2 están implicadas en procesos celulares importantes como la división celular, la síntesis de proteínas, la contracción muscular, el transporte de calcio, entre otros (Ito *et al.*, 1997), de ahí la importancia de que estos procesos se vean alterados cuando hay una ingesta de agua contaminada con cianobacterias tóxicas.

En junio del 2006, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC por sus siglas en inglés) clasificó a la MC-LR como carcinogénico potente del Grupo 2B (Edwards y Lawton, 2009).

Ramírez *et al.*, (2006) indican que existe una relación entre estructura y toxicidad (por medio de una variación en dos L-aminoácidos, grupos metil en Mdha y/o -Me-Asp; Adda; Glu y Mdha) dentro de las diferentes estructuras de las microcistinas que son producidas por las especies del género *Microcystis*.

Rositano *et al.*, (2001) señalan que las microcistinas son responsables de la formación de tumores provocando daños severos en humanos y animales.

En la naturaleza se pueden reconocer *blooms* con cianobacterias toxigénicas y no toxigénicas. La afirmación de la toxicidad de dichos microorganismos no es posible mediante observaciones microscópicas, ya que no presentan diferencias morfológicas aparentes (Kaebernick y Neilan, 2001). Ante esta situación se han desarrollado métodos inmunológicos y fisicoquímicos para determinar las cepas toxigénicas productoras de microcistinas e identificar la estructura química de dicho compuesto (Sant' Anna *et al.*, 2006).

Determinación de microcistinas por diferentes métodos

Existen diversos métodos usados para detectar e identificar microcistinas en el agua y en el contenido intracelular; varían en el costo, tiempo de preparación de la muestra, complejidad del equipo y de la técnica, grado de detección y precisión (Chorus y Bartram, 1999). Actualmente para determinar la toxicidad de microcistinas se usan los siguientes métodos analíticos que representan gran precisión: cromatografía líquida (LC), espectrofotometría de masas (MS) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

También se han desarrollado ensayos inmunológicos que emplean anticuerpos mono ó policlonales, el más conocido es la prueba de ELISA. Este último permite detectar hepatotoxinas a partir de $0.2\mu\text{g l}^{-1}$ y tiene una alta sensibilidad (Sangolkar *et al.*, 2006; Sant' Anna *et al.*, 2006).

Para el monitoreo de *blooms* de cianobacterias, se han utilizado métodos moleculares como son la detección y caracterización de algunos de los genes *mcy* por PCR, la amplificación polimórfica al azar de DNA (RAPD) y el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)-PCR, para discriminar entre cepas toxigénicas y no toxigénicas (Sangolkar *et al.*, 2006).

En la actualidad existe una gran cantidad de información sobre los daños ocasionados por cianobacterias toxigénicas presentes tanto en cuerpos de agua con fines recreativos como en aquellos que sirven de suministro para consumo humano en países como Australia, China, Inglaterra, España, Alemania, Hungría, Dinamarca, Portugal, Finlandia, Canadá, Estados Unidos, Uruguay y Brasil (Sivonen y Jones, 1999).

En México, Ramírez *et al.*, (2004) indican que en Valle de Bravo, Estado de México se han realizado estudios de monitoreo debido a que durante casi seis meses al año se registró durante el verano la presencia de cianobacterias con *blooms*, detectándose MC-LR en los meses de junio, septiembre y noviembre de 1999. Las concentraciones más altas de microcistinas se observaron en el mes de

junio con valores de 2,551 mg Kg⁻¹, peso en base seca. El valor más bajo se determinó en noviembre, cuando aparentemente el FAN había desaparecido; en este mes el valor máximo fue de 109 mg Kg⁻¹, peso en base seca. También, Pineda Mendoza (2009) estudio cianobacterias filamentosas toxigénicas productoras de microcistinas mediante bioensayos, métodos moleculares y analíticos de tres lagos urbanos de la Ciudad de México; por la técnica de ELISA donde encontró concentraciones de 0.14 a 2.78 µg l⁻¹.

PROBLEMÁTICA

Hasta finales de la década de 1970, el agua de la presa de Guadalupe era transparente y frecuentemente se organizaban competencias de motonáutica y otras actividades acuáticas. Sin embargo, el incremento de la contaminación de las aguas provocó que a inicios de la década de 1980 el cuerpo de agua fuera invadido por el lirio acuático (*Eichhornia crassipes*). La cubierta de lirio provocó la desaparición de muchos organismos, incluidos los peces y favoreció el crecimiento desmedido de organismos nocivos como mosquitos, además de la pérdida por evapotranspiración de grandes cantidades de agua y la generación de malos olores. Esta situación continuó hasta que en 1993, la SARH en conjunto con el Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA) implementaron un primer programa de control químico del lirio mediante la aplicación de herbicidas como el 2,4 D y el diquat. A finales de ese año la cobertura de lirio en la presa había disminuido de forma significativa. Sin embargo, la falta de un mantenimiento adecuado ocasionó que en 1995, la presa se encontrara nuevamente cubierta de lirio. Entre 1996 y 1997 se implementó un nuevo programa de control, esta vez utilizando la extracción mecánica de lirio. Esta actividad tuvo éxito y nuevamente el espejo de agua estuvo sin lirio. A partir de entonces el lirio no ha vuelto a cubrir la superficie del cuerpo acuático, pero otros problemas han surgido en los últimos tiempos relacionados con el volumen de agua residual que recibe, provocando mortandades masiva de peces, así como florecimientos de cianobacterias (Lugo *et al.*, 2007).

En el municipio de Cuautitlán Izcalli, Estado de México se registró la muerte de 40 toneladas de peces en la presa de Guadalupe, durante mayo 2004 a febrero 2005. Un primer estudio en agosto del 2004, señaló como posible causa de la muerte de los peces, la toxicidad provocada por Cianobacterias del género *Microcystis*. Por tanto, investigadores de la FES Iztacala, UNAM propusieron el monitoreo anual de algunos humedales del municipio de Cuautitlán Izcalli para señalar las posibles causas de muerte de dichos organismos (convenio 18330-615-11-V-06).

Apoyados por el convenio de colaboración con el municipio de Cuautitlán Izcalli, se realizó el “Estudio limnológico de la subcuenca tributaria afluentes de la presa de Guadalupe” en septiembre 2004-2005. De mayo a agosto del 2005 se presentó un *bloom* de varias especies de *Microcystis*; cuantificándose a través de la técnica de Utermöhl 532 000 cel/ml (Garduño Solórzano *et al.*, 2007). Por lo cual es importante realizar un estudio químico que permita delimitar la presencia de microcistinas de estas poblaciones en la presa de Guadalupe.

OBJETIVO

Caracterizar y cuantificar las microcistinas de las poblaciones de *Microcystis* de la presa del Lago de Guadalupe.

Objetivos Particulares

1. Reconocer los *taxa* específicos de las poblaciones del género *Microcystis* de la presa de Guadalupe, ubicada en el municipio Cuautitlán Izcalli, Estado de México.
2. Extraer y cuantificar las microcistinas del FAN a través de la prueba de inmunoafinidad por competencia (ELISA).
3. Identificar las microcistinas mediante el uso de la técnica de HPLC.

ÁREA DE ESTUDIO

El sitio de estudio corresponde a la Presa de Guadalupe que se encuentra entre las coordenadas 19°38'02" latitud Norte, 99°15'36" longitud Oeste (figura 2), a una altitud de 2350 msnm, comprende un área de 4,610 000 m², con una capacidad de 66x10⁶ m³ (Lugo *et al.*, 2007). El abastecimiento de agua proviene principalmente de los ríos: Campestre, Xinté, San Idelfonso y San Pedro. Estos llevan grandes volúmenes de aguas residuales sin previo tratamiento, sobre todo del municipio Nicolás Romero, que más tarde son depositados en el vaso de la presa de Guadalupe. La estimación del volumen de descarga de aguas residuales de todos los municipios de la cuenca hacia la presa de Guadalupe es de 15x10⁶ m³ al año (www.itesm.mx).

La presa de Guadalupe, se terminó de construir en 1943, como vaso regulador para controlar inundaciones del valle de México. Adicionalmente, se planteó la posibilidad del uso de sus aguas para el riego agrícola. También es un sitio de esparcimiento y recreación, ubicado en los Municipios de Cuautitlán Izcalli y Nicolás Romero del Estado de México (Hidalgo Wong y Pulido Navarro, 2006).

En la cuenca Presa Guadalupe se mantienen acciones de conservación del hábitat. En los últimos años han llegado 30 mil especies de patos de por lo menos ocho especies distintas y hasta 2500 pelicanos blancos, lo cual es un escenario muy distinto del humedal casi seco y totalmente cubierto de lirio que se había observado durante 1996 (de Sucre *et al.*, 2009).

Por su importancia hidrológica, forestal y su riqueza biológica, fue decretada el 19 de marzo de 2004 como Parque Estatal Santuario del Agua Presa de Guadalupe (www.itesm.mx/rzc/cuenca/).

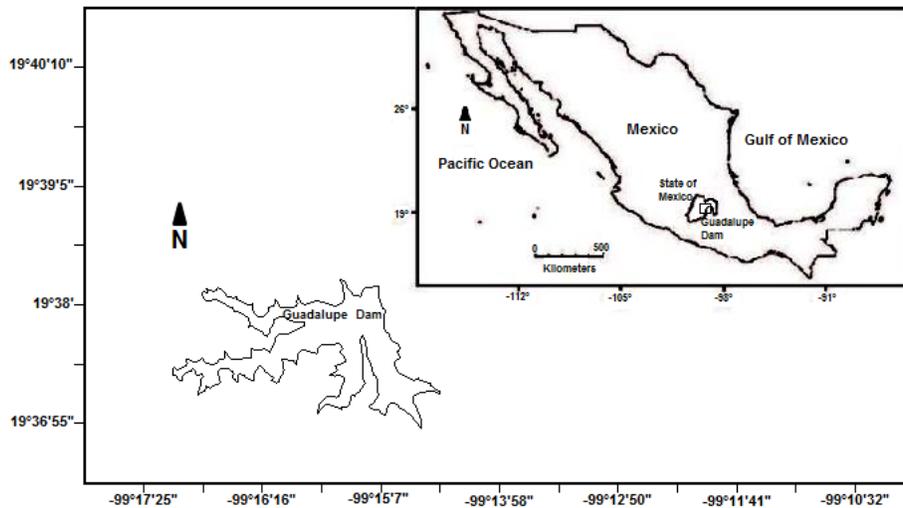


Figura 2. Localización de la presa de Guadalupe Estado de México (tomado de Garduño *et al.*, 2011).

Clima

Tomando como fuente de información la base de datos meteorológicos y climatológicos del Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, se reconoce para el área de estudio el Clima de la parte baja de la cuenca es C (w1), lo cual significa que es templado subhúmedo, con la mayor cantidad de lluvia en el verano, que es fresco y largo. El porcentaje de lluvia invernal representa menos de 5 al 10.2% del total anual. La temperatura media anual es de 14°C, siendo los meses más cálidos mayo y junio, con temperaturas medias de 12 a 18°C. Los meses más fríos son diciembre y enero, con temperaturas promedio de -3 y 18°C. La precipitación anual registrada durante el periodo 1960 a 2001 fue de 706 mm y julio es el mes con la mayor precipitación con 141mm. El régimen pluvial presenta un periodo prolongado de la época de lluvias pues, inicia en abril y termina en octubre, mientras que la época de estiaje se observó entre los meses de noviembre a marzo (Hidalgo Wong y Pulido Navarro, 2006).



Figura 3. Foto panorámica del aspecto de la Presa de Guadalupe (foto de Dra. Patricia Ramírez Bastida).

MATERIAL Y MÉTODO

Apoyados en los resultados del diagnóstico limnológico de los humedales del municipio de Cuautitlán Izcalli del ciclo 2005 (Lugo *et al.*, 2006), durante junio-julio del 2006 en la presa de Guadalupe, se colectó el material biológico de la época de sequía.

La metodología se dividió en seis secciones: obtención del material biológico, registro de características Físicoquímicas del cuerpo acuático, determinación taxonómica, obtención del extracto, cuantificación de la concentración de microcistinas por ensayos inmunológicos (prueba de ELISA), y la determinación de microcistinas por el método analítico, Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

Obtención del material biológico

Durante el FAN que se presentó el 24 de julio de 2006 en la presa de Guadalupe, se colectó el material biológico en botellas de plástico. Para ello se colectaron 18 litros de la población de *Microcystis*, las cuales se localizaban en sitios estancados y formaban gruesas natas verdes en la parte superficial del embalse. Las muestras se transportaron en hieleras hasta el laboratorio con el fin de preservar lo más posible las características originales (Stefan *et al.*, 2005).

En el lugar de colecta se midió la temperatura del agua con un termómetro marca Brannan y las variables fisicoquímicas: fueron consideradas con base en el proyecto 18330-615-11-V-06 financiado por el municipio de Cuautitlán Izcalli, la temperatura (termómetro marca Brannan), el pH (potenciómetro marca Cole Parmer), la concentración de clorofila *a* (espectrofotómetro), los fosfatos y nitratos por el método de molibdovanato y reducción de cadmio respectivamente (Lugo *et al.*, 2006).

Determinación taxonómica

En una botella de 200 ml se preservó la muestra biológica con formol al 4% para su determinación taxonómica (Cronberg y Annadotter, 2006).

La determinación taxonómica se efectuó utilizando un microscopio óptico marca Nikon a través de observaciones *in vivo*, tinción de tinta china, registro del diámetro en un promedio de 50 células, apoyadas en las referencias de Cronberg (2005), Desikachary (1959), Komárek *et al.*, (2002), Prescott (1981) y Whitton (2002), Komárek, Komárkova, Sant'Anna, Azevedo & Senna., 2002. También se obtuvieron fotografías de los organismos a través de una cámara digital marca Sony de 12 mega pixeles.

Obtención del extracto

El material colectado fue congelado a - 7°C hasta el momento en que se procesó la separación del extracto (Mikhailov *et al.*, 2001), en un periodo menor a un mes

llevándose a cabo en el Instituto de Química, UNAM bajo el asesoramiento del Dr. Tirso Ríos.

Para lograr la separación del extracto, se pasaron los 18 litros de material biológico a través de un trozo de tela de manta de cielo, donde se obtuvo la primera fracción del concentrado celular de las poblaciones de *Microcystis* (MP1). El residuo (R1) fue filtrado por vacío a través de un embudo Buchners, utilizando papel Watmann, donde se obtuvo la segunda fracción de la muestra problema (MP2). Se filtró el residuo obtenido (R2) y al producto se le agregó Diclorometano (DCM).

La primera y segunda fracción del filtrado (MP1+MP2), se deshidrató en una campana de extracción por cinco días para lograr el secado total del material, a temperatura ambiente. Posteriormente, la tela de manta de cielo y el papel Wathman fueron recortados en pequeños trozos y se les agregó un litro de metanol absoluto por 24 hr a temperatura ambiente. Para concentrar el extracto obtenido se utilizó un rotavapor a 50°C y al vacío para separar el metanol (Lawrence y Menard, 2001 modificado). Este procedimiento permitió obtener aproximadamente 5 ml de extracto problema (E1).

Extracto de Agua residuo

El residuo (R2) fue tratado de la siguiente forma: por cada dos litros de agua se añadió un litro de diclorometano dividiéndolo en tres partes para lograr una mayor efectividad en el arrastre de los compuestos y agitando el embudo de separación (cuidando los gases que despiden el diclorometano). Para concentrar los compuestos extraídos se utilizó un rotavapor en una temperatura entre 30 y 40°C obteniendo 1ml de extracto aproximadamente (E2).

Ensayos inmunológicos: Prueba de ELISA por competencia

Para cuantificar la concentración de microcistina en los extractos, se utilizó el KIT “QuantiPlate™ Kit for Microcystins (USA)” con el procedimiento propuesto por Mikhailov *et al.*, (2001).

Se utilizó un bastidor porta pozos para pruebas de placa de ELISA en el que se colocó 2 tiras de 8 pozos cada una, porque cada evento se realizó por duplicado, por lo que en total fueron 16 pozos. Se agregaron 125 µl de diluyente en los 16 pozos para que los anticuerpos que reconocen a las microcistina, que se encontraban adheridos a los pozos se rehidrataran y además el diluyente sirviera como tal para las microcistinas.

Inmediatamente después se añadió 20 µl de control negativo en los pozos A1 y A2, en los pozos B1, B2, C1, C2, D1 y D2 se agregó 20 µl de calibrador a tres concentraciones diferentes de microcistinas para realizar la curva patrón y en los pozos E1, E2, F1, F2, G1 y G2 se añadieron 20 µl de la muestra problema a tres concentraciones diferentes y finalmente en los pozos H1 y H2 se agregó 20 µl de agua para el blanco (Tabla 1).

	1	2
A	Control negativo	Control negativo
B	Calibrador 1 0.16 ppm	Calibrador 1 0.16 ppm
C	Calibrador 2 0.34 ppm	Calibrador 2 0.34 ppm
D	Calibrador 3 1.16 ppm	Calibrador 3 1.16 ppm
E	Muestra Concentrada	Muestra Concentrada
F	Muestra diluida 1:100	Muestra diluida 1:100
G	Muestra diluida 1:1000	Muestra diluida 1:1000
H	Blanco Agua	Blanco Agua

Tabla 1. Matriz de muestras analizadas en la placa de cuantificación de la prueba de ELISA.

Para evitar la evaporación los pozos se cubrieron con parafilm y se mezcló el contenido de los pozos agitando con movimientos circulares y rápidos entre 20-30 segundos, para que las microcistinas se unieran a los anticuerpos que se encontraban adheridos previamente en el pozo. Se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos en agitación constante. Después de la incubación se retiró el contenido de los pozos con un golpe vigoroso y se absorbió el resto sobre un papel absorbente con sacudidas sutiles. Posteriormente se lavaron los pozos cuatro veces con solución de lavado (PBS 0.1M pH 7.1 con Tween 20 al 1%), se absorbió el resto de la solución de lavado sobre el papel absorbente. El lavado se realizó para eliminar el excedente de microcistinas que no se adhirieron a los anticuerpos que se encontraban adheridos en los pozos, ya que este excedente podría provocar una lectura falsa.

A continuación se añadió a cada pozo 100 µl de Conjugado de enzima peroxidasa con microcistina, se cubrieron los pozos con parafilm y se mezcló el contenido de los pozos agitando con movimientos circulares y rápidos durante 20-30 segundos. Se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos en agitación constante, para que el Conjugado de enzima peroxidasa con microcistina se adhiriera a los anticuerpos libres unidos a los pozos, que no habían formado conjugados con la microcistina del calibrador o de la muestra problema. Es en este paso donde los conjugados de enzima peroxidasa compiten con la microcistina del calibrador o de la muestra problema para unirse a los anticuerpos antimicrocistina unidos a los pozos.

Después de la incubación se removi6 con un golpe vigoroso el contenido de los pozos y se absorbi6 el resto sobre un papel absorbente con sacudidas sutiles. Posteriormente se lavaron los pozos cuatro veces con soluci6n de lavado y se absorbi6 el resto de la soluci6n de lavado sobre el papel absorbente. El lavado se realiz6 para eliminar el excedente del conjugado de enzima peroxidasa con microcistina que no se uni6 a los anticuerpos que ya estaban adheridos en los pozos.

Posteriormente, se añadió a cada pozo 100 µl de sustrato (H₂O₂) unido a un cromógeno y se cubrieron los pozos con parafilm y se mezcló los contenidos por 20 o 30 segundos. Se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos en agitación constante. Para que el sustrato reaccionara con la enzima y con ayuda del cromógeno, poder obtener una solución colorida, ya que en esta prueba la concentración es inversamente proporcional a la concentración de color, esto quiere decir que un color claro indica una concentración elevada.

Al término de la incubación se agregó 100 µl de solución Stop (HCl) para detener la acción de la enzima. En un tiempo menor a 30 minutos se realizó la lectura de absorbancia en un espectro para placas de ELISA Marca Labsystem modelo Thermolab System Multiskan Ascent. Las muestras se leyeron a 450 y 620 nm, en la Unidad de Biomedicina de la FESIztacala, UNAM.

Se calculó el %B0 (equivale a la cantidad del conjugado microcistina – enzima) usando la siguiente fórmula:

$$\% B0 = \frac{(\text{promedio abs calibrador o muestra} - \text{promedio blanco}) * 100}{\text{promedio control negativo}}$$

Se construyó una curva de calibración graficando en escala semilogarítmica %B0 para cada estándar contra la concentración y se obtuvo la ecuación de la recta para calcular la concentración de microcistina en la muestra en mg L⁻¹.

Método analítico por HPLC

Los extractos obtenidos fueron analizados por HPLC con un equipo Hewlett-Packard series 1100 Automated Quaternary LC3D System, con un detector de arreglo de diodos (DAD) a 238 nm, un barrido completo de 200 a 400 nm, se utilizó una columna SUPELCOSIL LC-18 25cm x 4.6 mm de diámetro interno, 5µm de partícula, con un flujo de 1ml min⁻¹ (Lawrence y Menard, 2001). Esta técnica se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) FES-Iztacala con el apoyo del M. en C. Luis Barbo Hernández Portilla, según los criterios de Mehto *et al.*, (2001) y Mikhailov *et al.*, (2001). Como estándar externo se utilizó MC-LR de SIGMA-ALDRICH. M2912 de *Microcystis aeruginosa*.

Las condiciones de corrida para el HPLC fue en Gradiente y la composición de la fase móvil A fue Acetonitrilo:Agua (20:80) más Acido Tricloro Acético (TCA) al 0.05%(v/v). La composición de la fase móvil B fue Acetonitrilo-Agua (80-20) conteniendo Acido Tricloro Acético (TCA) al 0.04%(v/v). Finalmente, el gradiente se corrió con las siguientes condiciones: 0 min – 90% de A y 10% de B, 7 min – 71% de A y 29% de B, 14 min – 40% de A y 60% de B, 15 min - 20% de A y 80% de B, 20 min - 20% de A y 80% de B.

Para la muestra problema se elaboró una mezcla con el extracto y metanol en una relación 1:1. También se realizó una dilución a la muestra 1:100 utilizando 900 µl de metanol y 100 µl de muestra.

RESULTADOS

Determinación taxonómica

En el florecimiento algal estudiado, se reconocieron cuatro especies del género *Microcystis* (*Microcystis aeruginosa*, *M. botrys*, *M. panniformis* y *M. flos-aquae*).

Microcystis aeruginosa (Kuetzing) 1846. Lámina1 (a).

Colonias cuando jóvenes redondas y sólidas, maduras llegan a ser clatradas hasta 900 µm de largo. Con células esféricas esparcidas en ella, de color verde-azul con muchos aerotopos; el diámetro es de 3.7-4.6µm., con mucilago difluente incoloro, algunas veces formando un margen estrecho alrededor de las células; puede modificarse dependiendo de las estaciones del año.

En condiciones adecuadas forman grandes *blooms* en aguas eutróficas templadas y tropicales (Cronberg, 2005, Desikachary, 1959, Prescott, 1981 y Whitton, 2002).
Distribución en México: **Distrito Federal**, Lago Viejo de Chapultepec (Alcocer *et al.*, 1988, Alcocer *et al.*, 2007, Komárek y Komarková 2002)., **Estado de México**, Laguna de Victoria, Lago el Sol Nevado de Toluca (Mendoza-González 1985, Banderas-Tarabay 1997)., **Hidalgo**, Laguna de Atezca, Actopan, Presa Requena (Sánchez *et al.*, 2007, De la Lanza *et al.*, 2007, Díaz Pardo *et al.*, 2002)., **Michoacán**, Lagos de Pátzcuaro, Cráter Espinos y Cuitzeo (Ortega 1984, Rosas *et al.*, 1993, Rendón-López *et al.*, 2007, Chacón-Torres *et al.*, 2007)., **Oaxaca**, San Juan Bautista, Tuxtepec Teotitlan (Tavera y González 1990)., **Puebla**, Laguna de Xochiltepec (Ortega 1984)., **Tabasco**, Campo SEN (Moreno Ruiz 2005)., **Veracruz**, Lago Chalchoapan (Vázquez *et al.*, 2007)., **Guanajuato**, Embalse Ignacio Allende (López Lopez y Serna Hernandez 1999)., **Yucatan**, Cenote (López Adrian *et al.*, 2005).

Microcystis botrys Teiling 1942. Lámina1 (b).

Colonias más o menos esféricas, células densamente agregadas y con mucilago, formando subcolonias. El mucilago alrededor de la colonia es ancho e incoloro,

también se forman tubos radiales. Las células compactadas, con muchos aerotopos, con diámetro de 5-6 μm .

En lagos eutróficos es planctónica, común en florecimientos algales junto con otras especies de *Microcystis*, muy tóxica porque produce microcistinas (Cronberg, 2005).

Distribución en México: **Distrito Federal**, Lagos de Tezozomoc y Chapultepec (Alcocer *et al.*, 2007, Sánchez *et al.*, 2007), **Estado de México**, Valle de Bravo (Gaytán Herrera *et al.*, 2011).

Microcystis flos-aquae (Wittrock) Kirchner 1898. Lámina1 (c).

Colonias esféricas o irregulares con un margen liso y una capa muy delgada de mucílago. Células densamente arregladas en la colonia, con aerotopos; el diámetro es de 2.5-5.0 μm . Crecen en ambientes mesotróficos y eutróficos, comúnmente formando *blooms* con otros cianoprocariontes. Distribuidos principalmente en zonas templadas, la toxicidad aún no se ha comprobado (Cronberg, 2005, Desikachary, 1959, Prescott, 1973 y Whitton, 2002).

Distribución en México: **Distrito Federal**. Lago de Tezozomoc (Sánchez *et al.*, 2007). **Estado de México**, Valle de Bravo (Gaytán Herrera *et al.*, 2011), **Michoacán**, Lago de Pátzcuaro (Ortega 1984), **Oaxaca**, Ejutla de Crespo y San Juan Bautista, Tuxtepec (Ortega 1984), **Tabasco**, Jalapita, Río González, Horizonte (Moreno Ruiz, 2005).

Microcystis panniformis

Komárek, Komárkova, Sant'Anna, Azevedo & Senna., 2002. Lámina1 (d).

Colonias micro y macroscópicas, inicialmente irregulares, estrechamente agregadas en la superficie, y con pocas células arregladas en tres dimensiones en una parte hueca; cuando son maduras la mayoría de las células se arreglan en la superficie. De color verde azul amarillento, verde olivo o pardo oscuro. El margen de la colonia irregular no delimitado. Células esféricas con diámetro de 3.2-4.6 μm con una capa delgada de mucílago difuso, aerotopos muy pequeños y numerosos. Tóxica, con distribución pantropical y tropical; pueden formar *blooms* monoespecíficos (Cronberg, 2005, Desikachary, 1959).

Distribución en México: *Distrito Federal*, Lagos de Tezozomoc y Chapultepec (Sánchez *et al.*, 2007, Komárek y Komarková 2002, Komárek *et al.*, 2002).

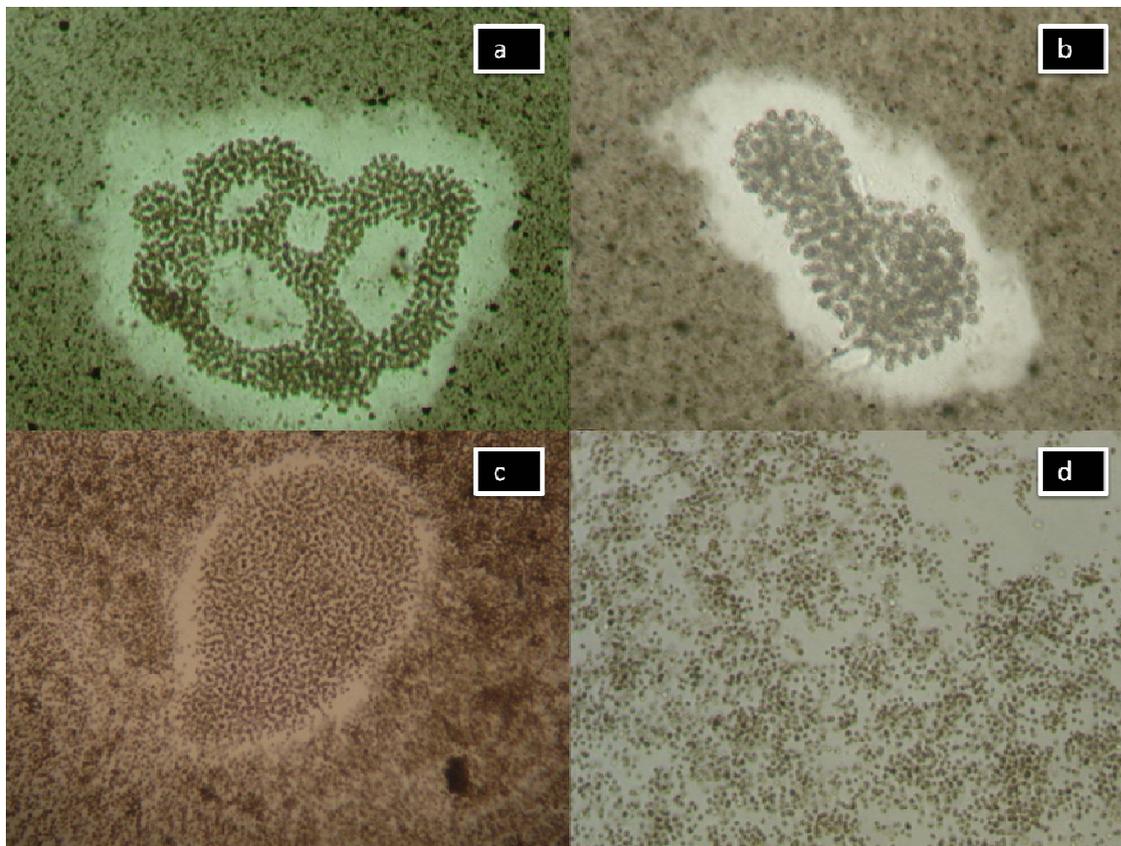
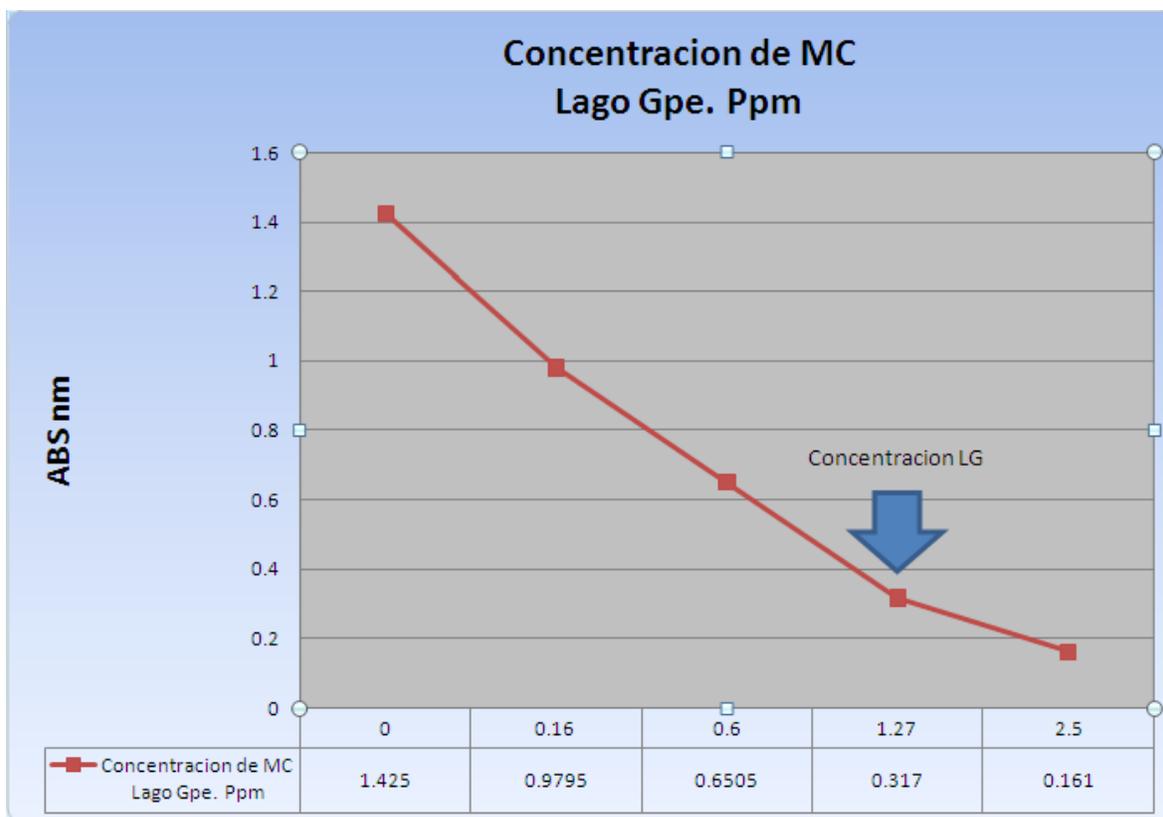


Lámina 1. a) *Microcystis aeruginosa* 400X. b) *Microcystis botrys* 400X. c) *Microcystis flosoaquae* 100X d) *Microcystis panniformis* 1250X (original).

Extracción y cuantificación de MC

El extracto del FAN de las poblaciones de *Microcystis* pesó 10.8 gr, el cual se utilizó para realizar los análisis moleculares de las toxinas.

Los resultados de la Concentración de microcistina por el ensayo inmunológico de la Prueba de ELISA por competencia fueron en promedio 1.270 mg/l, ± 0.028 .



Gráfica 1. Medición de la concentración de microcistina y la concentración determinada.

Técnica de HPLC para el registro de las microcistinas

Para la estandarización del método analítico HPLC nos basamos en el modelo usado por Lawrence y Menard (2001). La Figura 4 muestra que el estándar Sigma de MC-LR tiene un tiempo de detección de 15.6 min. Y una intensidad aproximada de 100 mAU. Las Figuras 5 y 6 corresponden a las muestras de los extractos metanólicos de las poblaciones de *Microcystis* spp a diferentes concentraciones (1:1000 y 1mg/ml respectivamente). Y la Figura 7 muestra la superposición de los Cromatogramas obtenidos.

Se puede observar que no hay presencia de la MC-LR, en ninguna de las muestras, sin embargo en la muestra que corresponde a 1mg/ml se observa la presencia de otros compuestos. Finalmente se comparan las dos muestras con el estándar de la MC-LR y se ratifica que no hay la presencia de MC.

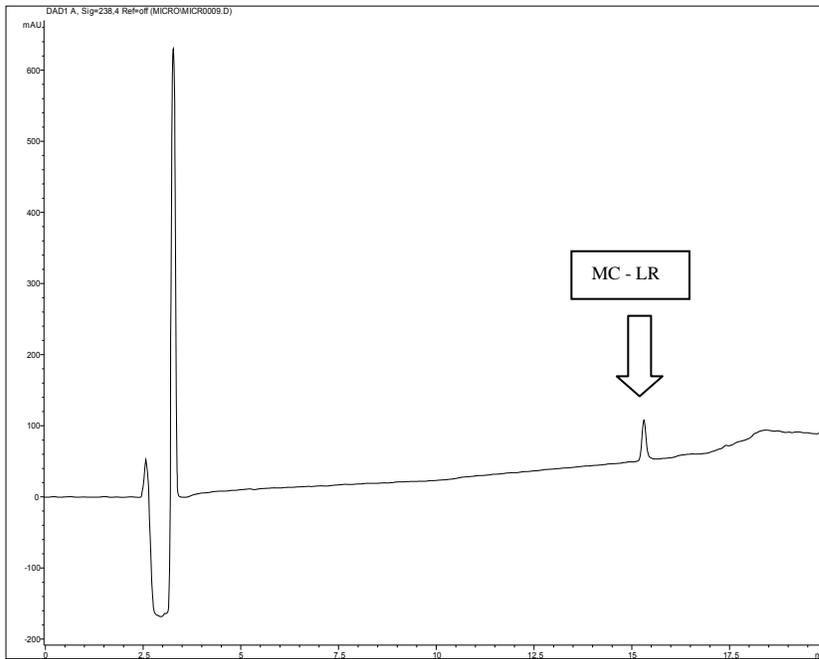


Figura 4. Cromatograma obtenido del estándar de MC-LR Sigma (1:100). La flecha indica el pico correspondiente de la toxina.

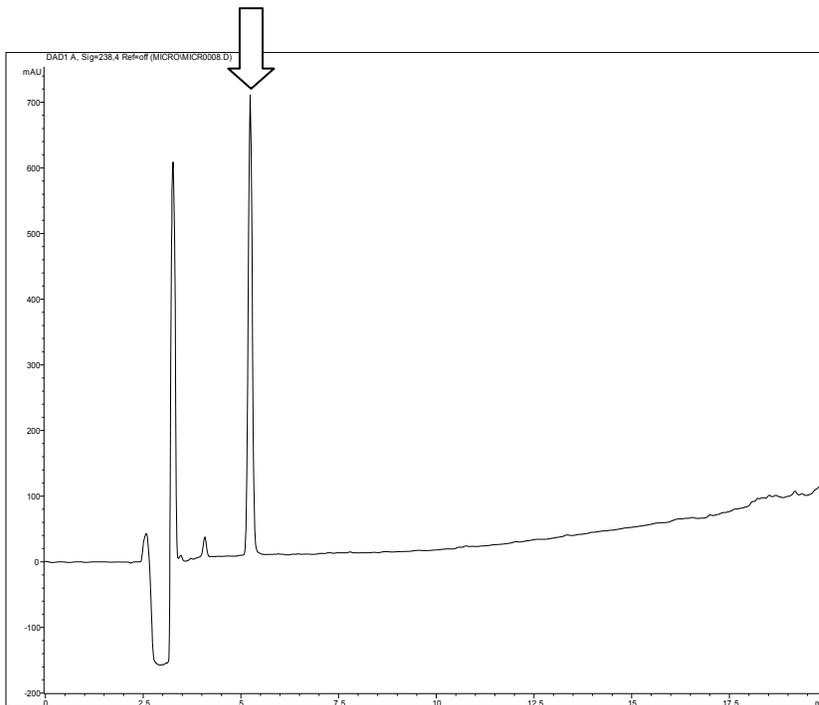


Figura 5. Cromatograma obtenido de la Muestra del FAN de las poblaciones de *Microcystis* spp (1:1000) La flecha indica una lectura de 226nm abs.

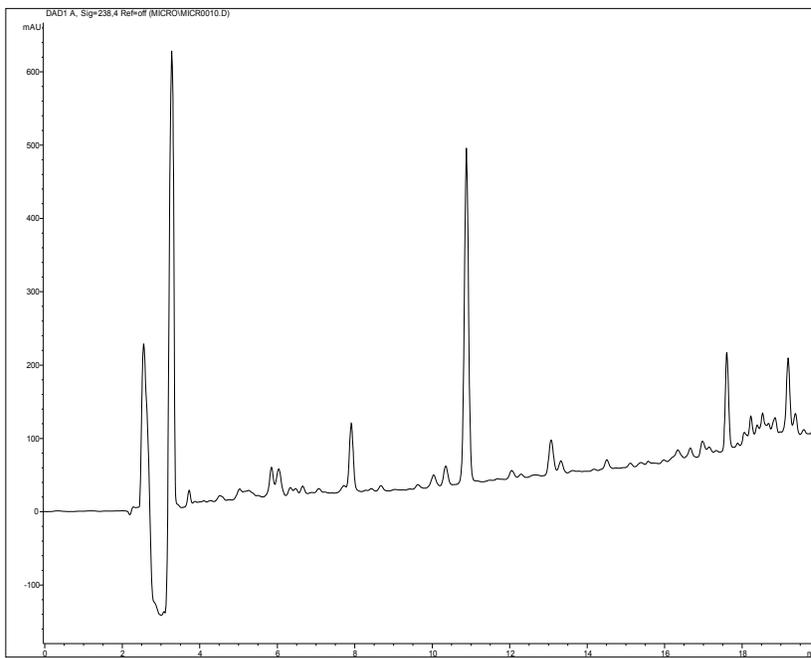


Figura 6. Cromatograma obtenido de la Muestra concentrada del FAN de las poblaciones de *Microcystis* spp (1mg de muestra/ml)

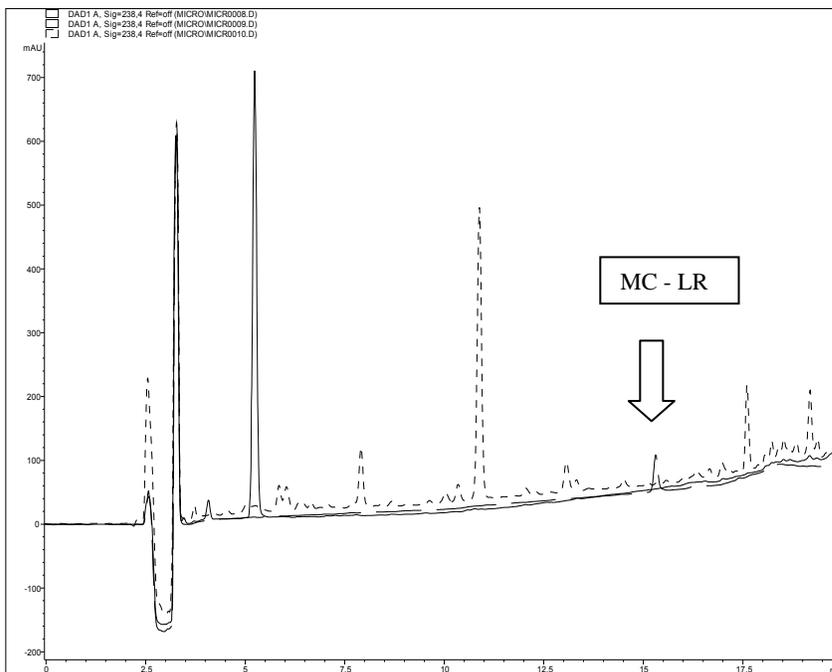


Figura 7. Superposición de los Cromatogramas obtenidos, Línea punteada muestra 1 mg/ml, Línea continua muestra 1:1000, Línea discontinua estándar de MC -LR Sigma (1:100).

DISCUSIÓN

Ficoflora

En México la riqueza específica de algas corresponde a 837 especies, de ellas el 80% han sido registradas en los diferentes ambientes del Estado de México; por ello se puede señalar que esta entidad federativa es una buena zona de reserva del potencial ficológico dulceacuícola del país. Las cianobacterias documentadas para este estado corresponden a 3 órdenes, 8 familias, 30 géneros y 65 especies (Garduño *et al.*, 2009).

En particular el género *Microcystis* registra la presencia de seis especies (*M. aeruginosa*, *M. botrys*, *M. flos-aquae*, *M. viridis*, *M. incerta* y *M. protocystis*) en embalses, lagos y lagunas principalmente eutróficos (Gaytan Herrera *et al.*, 2011, Mendoza González, 1985, Quiroz *et al.*, 1999, García Rodríguez y Tavera 2002 y Banderas Tarabay, 1997). Para la presa de Guadalupe, coinciden tres especies (*Microcystis aeruginosa*, *M. botrys* y *M. flos-aquae*) previamente citadas en esta entidad federativa y *M. panniformis* por Vasconcelos *et al.* (2010)

Microcystis aeruginosa es un taxón con amplia distribución en el país, ya que está registrado en: D.F., Estado de México, Hidalgo, Michoacán, Oaxaca, Tabasco, Puebla y Veracruz (Alcocer *et al.*, 1988, Mendoza González, 1995, Moreno Ruiz 2005, Banderas Tarabay, 1997, Rosas *et al.* 1993, Sánchez *et al.*, 2001, Tavera y González González, 1990, Vázquez *et al.*, 2007, Rendón López *et al.*, 2007, Chacón Torres *et al.*, 2007, Komárek y Komárková-Legnerová, 2002). Sin embargo esta condición debe de ser confirmada ya que Komárek *et al.*, (2002) indican que las determinaciones de *M. aeruginosa* y *M. flos-aquae* han sido confundidas con *M. panniformis* debido a su gran semejanza en estadios tempranos.

El registro de FAN en ambientes dulceacuícolas en México está poco documentado. Oliva *et al.*, (2001) señalan el blooms de *Nodularia spumigena*, crecimiento masivo de cianobacterias en la laguna de Alchichica, Puebla, mientras

que Martínez Almeida y Tavera (2005) indican la presencia de un blooms de *Snowella septentrionalis* para el lago de Zirahuén, Michoacán. También registró de FAN, en el lago de Pátzcuaro, ambiente eutrófico donde se han registrado en octubre de 1985 florecimientos de *Aulacoseira granulata*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Gomphosphaeria* y *Microcystis* sp. (Sládecek y Vilaclara, 1993). En la zona central de México, Vasconcelos *et al.*, (2010) han reconocido la presencia de microcistinas en Lagunas Zumpango y Atotonilco, Cienega Chica, reservorios de los Ángeles y Valle de Bravo, canales de Cuemanco, Tlamemecau y el lago urbano de Chapultepec.

Berry y Lind (2010) señalan la evidencia de la presencia de cilindrospermina y saxitoxinas del lago de Catemaco, Veracruz por la bioacumulación de cianobacterias en el Tegogolo *Pomacea patula catemacensis* (Molusco consumido por los lugareños).

En el Estado de México, los embalses de Valle de Bravo como en la presa de Guadalupe, son sistemas que reciben aguas residuales de sus cuencas respectivas donde los FAN de cianobacterias en el primero constituidos de *Microcystis* spp., *Anabaena* spp. y *Snowella septentrionalis* (Gaytan Herrera *et al.*, 2011); y para el segundo por *Microcystis* spp. han sido registrados desde 2002. En todos los casos antes mencionados, lo mismo que la época registrada en el presente estudio, los FAN se han registrado en épocas de sequía cuando los registros de temperatura son altos, alta insolación, poco viento y bajas relaciones de N:P en la columna de agua (Ramírez *et al.*, 2004, Lugo *et al.*, 2006, Gaytan Herrera *et al.*, 2011).

Las condiciones fisicoquímicas registradas en el área de estudio corresponden a las señaladas en la bibliografía para otras regiones, es decir este evento coincidió con las condiciones ecológicas que ya se han registrado por diferentes autores. Roset *et al.*, (2001) indican que en temperaturas altas se incrementa el crecimiento de cianobacterias, ellos registraron hasta 23°C y el blooms analizado creció en 21°C. Por su parte, Vela *et al.*, (2007) señalan pH de 8.5, en la presa de

Guadalupe los registros de pH fueron de 9.0 a 10.5. Ramírez *et al.*, (2004) registran el *blooms* de Valle de Bravo en un ambiente eutrófico de igual manera para el área de estudio donde los registros de $(\text{PO}_4)_3\text{-NO}_3\text{-}$ son mayores a la unidad, característico de cuerpos de agua eutróficos, igual que la cantidad de clorofila *a* ($180 \mu\text{g l}^{-1}$) (Lugo *et al.*, 2006),

La prueba de ELISA por competencia

Para cuantificar la concentración de MC en el cuerpo acuático, fue utilizado el extracto obtenido por el autor. Este método de carácter policlonal identifica principalmente la sección Adda de la molécula y otros fragmentos, dando falsos positivos, y no reconocen las diferencias entre las otras moléculas. Por tal motivo no se pueden reconocer los diferentes tipos de MC aunque el resultado de la concentración sea elevado.

En otros ambientes acuáticos artificiales de la ciudad de México, se ha reconocido el crecimiento masivo de cianobacterias en particular en la Alameda Oriente y en la pista de remo y canotaje. Pineda Mendoza (2009) detectó concentraciones de 0.142 a $2.772 \mu\text{g l}^{-1}$ de microcistinas en cepas de *Spirulina subsalsa* y *Planktothrix agardhii* respectivamente de lagos urbanos de la ciudad de México. Esto señala alerta, ya que estas son áreas de recreación o para realizar actividades deportivas y por tanto pueden ser potencialmente tóxicas para animales y el hombre. Lo mismo puede señalarse para el área de estudio, ya que es un sitio de recreación y ocasionalmente con actividades deportivas.

El análisis de crecimiento masivo de cianobacterias en el mundo indica que en más del 75% de los FAN se detectan microcistinas (De León y Yunes, 2001), por tanto explica su presencia en diferentes ambientes artificiales eutróficos del centro del país.

Según el resultado del análisis inmunológico para determinar la concentración de microcistina en el agua, esta fue de 1.270 mg/L lo cual rebasa por mucho los límites establecidos por la WHO de $1\mu\text{g/L}$ para permitir la ingesta de agua

(Ramírez *et al.*, 2004). Esto es preocupante ya que puede ser un riesgo potencial para la salud humana debido a la cercanía que tiene el cuerpo de agua con la zona habitacional, y que se desarrollan actividades recreativas y deportivas. Citando el caso de Vieira *et al.*, 2005 cuando en la región del Amazonas, Brasil, fue relacionado con la contaminación del agua potable que afecta a la población por medio de la ingesta. Por inhalación durante el desarrollo de actividades acuáticas y por contacto con la piel o de forma intravenosa por diálisis (Vasconcelos, 2001).

Las microcistinas son heptapéptidos cíclicos químicamente de gran estabilidad. La importancia que se le da al estudio de las microcistinas es debido a que no pueden ser destruidos o removidos por los métodos convencionales de purificación (Mikhailov *et al.*, 2001) por tanto es un problema biológico que requiere ser atenuado a partir de las causas que lo provoquen.

También en el embalse de Valle de Bravo se ha registrado la presencia de MC-LR con valores de $2,551 \text{ mg kg}^{-1}$ en los meses de junio, septiembre y noviembre de 1999. Mientras que durante junio del 2001 las concentraciones de microcistinas fueron de $3,761 \text{ mg kg}^{-1}$ (Ramírez *et al.*, 2004). Recientemente, Vasconcelos *et al.* (2010) determinaron altos niveles de microcistina (4.9 y $78 \mu\text{g MC-LR eq/L.}$) de varios ambientes del centro de México.

Conocer esta información para diferentes ambientes acuáticos permite respaldar algunas soluciones probables a estos problemas, estableciendo un control ya que actualmente las cianobacterias son un componente de la dieta de muchos cíclidos tropicales y de ciprinidos. Según Ramírez *et al.*, (2004), para su remoción se debe eliminar la estratificación, minimizar la incorporación de nutrientes, reducir los tiempos de residencia y no usar alguicidas. La degradación completa de las microcistinas requiere de un tratamiento a refluo con ácido hidroxilórico 6 N y ácido trifluoroacético.

Método Analítico HPLC

La relación entre diferentes métodos de análisis pueden ser usados en la identificación y monitoreo de muestras de algas verde azules, sin embargo las muestras de los ambientes acuáticos fuertemente eutrofizados usualmente son problemáticas para identificar las microcistinas por HPLC Mikhailov *et al.*, (2001). Este fue el caso para el material analizado en este trabajo. Se puede explicar esta situación por las siguientes condiciones técnicas. En el análisis no se usaron cartuchos de inmunoafinidad previos al análisis por HPLC, este procedimiento hace que el extracto de las microcistinas se concentre, se libere de impurezas y de esta forma las mediciones por HPLC sean de mayor facilidad y confiabilidad.

El análisis por HPLC se programó con un barrido 200 a 400 nm, donde se observó en los cromatogramas de las Figuras 6 y 7 una saturación de compuestos y por lo cual no se puede inferir el tipo de microcistina de la muestra problema. Los picos representa diferentes compuestos, que son identificados a principalmente en longitudes de ondas bajas y altas; los primeros leídos entre los 210-290 nm, y los segundos entre los 320-380 nm. Por lo tanto, las lecturas corresponden a compuestos precursores de fenoles como: flavonas, flavonoides, isoflavonoides y antocianinas (Ewald y Kenneth, 2003).

CONCLUSIÓN

El florecimiento de cianobacterias fue observado en la época cálida, cuando el registro de temperatura en el agua fue mayor (21°C), el pH fue básico (10.1), había poco viento, insolación alta y valores altos de $(\text{PO}_4)_3^-/\text{NO}_3$ mayores a la unidad, característica de cuerpos de agua eutróficos. Factores que han sido indicados en la literatura como agentes causales de FAN.

El FAN registrado en junio-julio 2006 en el área de estudio, estuvo constituido de cuatro especies. Con base en caracteres morfológicos se determinaron *Microcystis aeruginosa*, *M. flos-aquae*, *M. botrys* y *M. panniformis*.

A partir de la prueba de ELISA, se cuantificaron altas de concentraciones que rebasan el estándar establecido por la WHO. Además se debe señalar que este tipo de método es confiable y fácil, obteniendo un resultado de manera rápida.

La concentración de MC en el cuerpo acuático fue muy elevada, sin embargo es necesario identificar los tipos de MC's que están presentes por la relación existente entre estructura y toxicidad.

El desarrollo de especies potencialmente productoras de toxinas y el peligro de la exposición de estas toxinas en la población, es el principal motivo de estudio y monitoreo de los ambientes acuáticos, para diseñar planes de vigilancia y control de cianobacterias y sus toxinas para asegurar la calidad del suministro de aguas potables y evitar procesos toxicológicos.

El análisis de HPLC sin el uso de cartuchos inmunoafines, no permitió el reconocimiento del tipo de microcistinas.

PERSPECTIVAS

Es muy conveniente cultivar en sistemas aislados cada una de las especies determinadas y corroborar la cantidad y el tipo de microcistina de cada una.

Utilizar cartuchos de inmutioafinidad antes de realizar la técnica de HPLC para determinar el tipo de microcistinas.

Además de la caracterización morfológica, se recomienda el estudio molecular de los genes *mcy* por PCR para cada una de las especies.

Estudiar *in situ*, en la época cálida las condiciones limnológicas que disparan el FAN, para buscar las mejores acciones de control ante este problema ecológico.

Es importante estudiar los daños Histopatológicos en peces que se encuentren expuestos a la microcistina en sistemas aislados e *in situ*.

BIBLIOGRAFÍA

- Alcocer, J., Kato, E., Robles, E. y Vilaclara, G. 1988, Estudio preliminar del efecto del dragado sobre el estado trófico del lago viejo de Chapultepec. *Contam. Ambient.* 4: 43-56.
- Alcocer, J. A., Lugo, G. Vilaclara, M. del R. Sánchez y M. Chávez. 2007. Los lagos de Chapultepec, ciudad de México. De la Lanza, E. G. (Comp.) S.P. Hernández (Col.). AGT. Editor, S.A. México. 113-124.
- Anagnostidis, K., y Komáreck, J. 1985. Modern approach to the classification system of cyanophytes, 3. Oscillatoriales. *Archiv für Hydrobiologie Supplement.*, 80: 327-472.
- Anagnostidis, K., y Komárek, J. 1988. Modern approach to the clasification system of cyanophytes, 3. Oscillatoriales. *Hydrobiologie/Algological Studies.*, 50/53: 327-472.
- Anónimo., 2005. Sesión de trabajo para la instalación de la estructura de la futura comisión de la subcuenca tributaria afluentes de la Presa de Guadalupe (COSTAPEG). pp. 18.
- Antoniou, M. G., Shoemaker J. A., de la Cruz A. A. y Dionysiou D. D. 2008. LC/MS/MS structure elucidation of reaction intermediates formed during the TiO₂ photocatalysis of microcystin-LR. *Toxicon* 51:1103 –1118.
- Banderas – Tarabay, A. G. 1997. Phycoflora of the tropical high mountain lake El Sol, Central México, and some biogeographical relationships. *Hydrobiología* 354:17-40.
- Berry, J.P., Lind, O., 2010. First evidence of “paralytic shellfish toxins” and cylindrospermopsin in a Mexican freshwater system, Lago Catemaco, and apparent bioaccumulation of the toxins in “tegogolo” snails (*Pomacea patula catamacensis*). *Toxicon* 55: 930-938.
- Briand, E., Gugger M., François J. C., Bernard C, Humbert J. F. y Quiblier, C. 2008. Temporal Variations in the Dynamics of Potentially Microcystin-Producing Strains in a Bloom-Forming *Planktothrix agardhii* (Cyanobacterium) Population. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 3839–3848.

- Bold, H., y Wynne, M. 1985. *Introduction to the algae*, Prentice Hall biological science series. United States of America. pp. 34 -53.
- Chacón-Torres, T. A., C.M. Rosas y J. D. Alvarado. 2007. El Lago Cuitzeo. Las aguas interiores de México: conceptos y casos. De la Lanza, E. G. (Comp.) S.P. Hernández (Col.). AGT. Editor, S.A. México. 303-338.
- Chorus, I., y Bartram, J. 1999. Field work side inspection and samplings. *In: Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management.* E & FN Spon, pp. 329-345.
- CNA, Comisión Nacional del Agua. 2000. Estudio limnológico de la Presa de Guadalupe, Estado de México. Gerencia Regional de Aguas del Valle de México. Gerencia Técnica, México. pp. 85.
- Cousins, I. T., D. J. Bealing, H.A. James y A . Sutton, 1996. Biodegradation of Microcystis –LR by indigenous mixed bacterial population. *Water research* 30: 481-485.
- Cronberg, G. 2005, Photo guide to Cyanobacteria. Workshop on Biology and Taxonomy of Cyanobacteria. (UNAM- Mexico City 21-25 February 2005). Institute of Ecology/Limnology University of Lund, Sweden. 32pp.
- Cronberg, G., y Annadotter, H. 2006. Manual on aquatic cyanobacteria. A photo guide and synopsis of their toxicology. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, International Society for the Study of Harmful Algae. 106pp.
- De la Lanza, G.E., J. García Cabrera, J. Soto Cadena, M. E. Zamudio Resendiz, I. D. Gonzalez Moray, S. Hernandez Pulido, 2007. La Presa Requena y su calidad del agua através de indicadores fitoplanctonicos *In: De la Lanza, E. G., y S Hernandez Pulido (Comp).* Las aguas interiores de México: conceptos y casos. AGT Editor. S. A. México pp. 481-492.
- De León L. y Yunes J. S. 2001. First report of a Microcystin–containing bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in the La Plata River, South America. *Envir. Toxicol.* 16: 110 –112.
- Desikachary, T. V. 1959. *Cyanophyta*, Indian Council of Agricultural Research, Nueva Delhi, India. pp 299.

- de Sucre, A., Ramírez, P., Gómez, H. y Ramírez, S. 2009. *Aves*. In: La diversidad biológica del Estado de México estudio de estado. Secretaria del Medio Ambiente y CONABIO. (Compiladores G. Ceballos, R. List., G. Garduño, R. López Cano, M.J. Muñoz Cano Quintanar, E. Collado y J.E. San Román), pp.131 – 144.
- Díaz-Pardo, E., G. Vázquez y C. Guerra-Magaña. 2002. Lago de Atezca. De la Lanza, E. G., J.L. García-Calderón (Comp.). Lagos y presas de México. AGT Editor. S.A. México. pp. 109-125.
- Edwards, C. y Lawton, L. A. 2009. Biorremediation of Cyanotoxins. *Adv. Appl. Microbiol.* 67: 109–129.
- Ewald E. y Kenneth R. 2003. Applications of Flavonoid Analisis and identification Techniques: Isoflavones (Phytoestrogens) and 3 Deoxyanthocyanins. In: Flavonoids in health and Disease, Ed Marcel Dekker Inc. 2nd Ed. (Compiladores Rice C. A. y Lester E. P.), pp 100 – 111.
- Fogg, G.E., Stewart, W.D.P., Fay, P., y Walsby, A. E.1973. *The Blue-Green Algae*, Academic Press. London. 459 pp.
- Falconer, I. R. 2005a. Cyanobacterial toxins of drinking water supplies: cylindrospermopsins and microcystins. In: Cyanobacterial Poisoning of Livestock and People, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Falconer, I. R. 2005b. Is there a human health hazard from microcystins in the drinking water supply. *Acta Hydrochim Hydrobiol.*, 33: 64-71.
- Falconer, I. R. y Yeung D.S. K. 1992. Cytoskeletal changes in hepatocytes induced by *Microcystis* toxins and their relation to hyperphosphorylation of cell proteins. *Chem. Biol. Interact.* 81; 181-196.
- Gaytan Herrera, M.L., V. Martínez Almeida., M.G. Oliva Martínez., A. Duran Díaz y P. Ramírez García. 2011. Temporal variation of phytoplankton from the tropical reservoir Valle de Bravo, México. *Journal of Environmental Biology* 32(1): 117-126.
- Geitler, L. 1932. *Cyanophyceae*, Koeltz scientific books for edition arin koeltz. 1196pp.

- González, M.T. 2004. Diagnóstico ambiental de la Presa de Guadalupe, Estado de México, FES Iztacala, UNAM. México. 104pp.
- García, R. J., Tavera, R. 2002, Phytoplankton composition and biomass in a shallow monomictic tropical lake. *Hydrobiologia* 467:91-98.
- Garduño-Solórzano G., Oliva, Ma. G., Lugo, A. y Robles, E. V. 2007. Planktonic Cyanobacteria from some wetlands of Cuautitlan Izcalli, Mexico, *In: 17th Symposium of the International Association for Cyanophyte Research*, June 25-29, Merida Mexico. p. 31.
- Garduño - Solórzano G., M. G. Oliva Martinez y M. Ortega, 2009. Algas En: La Diversidad Biológica del Estado de México. Estudio de Estado. G. Ceballos, R.List, G. Garduño, R. Lopez Cano, M. J. Muñozcano, Quintanar, E. Collado y J. E. San Román, (Compiladores). Conabio, Secretaria de Ecología del Estado de México. Pp 153-62.
- Garduño, G., Oliva, Ma. de G., Lugo, A., Mendoza, Ma. B., Quintanar, R, y Conforti, V. 2011. *Trachelomonas* (Euglenophyta) from an eutrophic reservoir in Central Mexico. *Journal of enviromental Biology* 32: 463–471.
- Hidalgo-Wong M. y Pulido-Navarro, G. 2006. Descripción del Medio Natural de la Cuenca presa de Guadalupe, Estado de México, Memoria Técnica, Instituto Mexicano de Tecnología del agua, coordinación de tecnología de riego y drenaje. 72pp.
- Hoek, C., Van Den Mann, D.G., y Jahns, H.M. 1995. *Algae. An Introduction to Phycology*, Cambrige University Press. U.K. 623 pp.
- Hunter, P. R. 1998. Cyanobacterial toxins and human health. *J. Appl. Microbiol. Symposium Supplement*. 84: 35–40.
- Ito, E., Kondo, F., Terao, K., y Harada, K. 1997. Neoplastic nodular fomation in mouse liver induced by repeated intra peritoneal injections of microcystin-LR. *Toxicon* 35 (9): 1453-1457.
- Jayaraj R., Anand T. y Lakshmana Rao, P. V. 2006. Activity and gene expression profile of certain antioxidant enzymes to microcystin-LR induced oxidative stress in mice. *Toxicology* 220: 136–146.
- Kaebernick, M. y Neilan, B. A. 2001. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 35: 1–9.

- Kardinaal, W. E. y Visser, P. M. 2005. Dynamics of cyanobacterial toxins, sources of cyanobacteria toxins, sources of variability in microcystin concentration. In: Huiman H. C. P. and Visser P. M. (eds.), Springer, Dordrecht. pp 41 – 63.
- Komárek, J. 2003. *Freshwater Algae of North America Ecology and Classification*, 3. Coccoid and colonial cyanobacteria. Academic Press. pp 59-116.
- Komárek, J., y Anagnostidis, K. 1989. Modern approach to the classification system of cyanophytes, 4. Nostocales. *Archiv für Hydrobiologie Supplement.*, 82: 247-345.
- Komárek, J. y J. Komárková-Legnerová, 2002. Contribution to the knowledge of planktic cyanoprokaryotes from central Mexico. *Preslia, Praha* 74, 207-233.
- Komárek, J., Komárkova, L. J., C. Sant'Anna., M.T. Azevedo, and P.A. Senna. 2002. Two common *Microcystis* species (Chroococcales, Cyanobacteria) from tropical America including *M. panniformis* sp. nov. *Cryptogamie Algol.*, 23(2): 159-177.
- Lawrence, J. F., y Menard, C. 2001. Determination of microcystins in blue – green algae, fish and Water using liquid chromatography with ultra violet detection after sample clean-up employing immunoaffinity chromatography. *Journal of Chromatography.*, 922: 111-117.
- López Adrián, S., R. C. Barriento, 2005. Diversidad y Distribución del fitoplancton de agua dulce en la Península de Yucatán, México, Ibugana 13 (2): 3-12.
- López-Sandoval, S., Montejano, G., Carmona, J., y Cantoral, E. 2007. Cyanoprokaryota from a thermal spring in Central México In: 17th Symposium of the International Association for Cyanophyte Research, June 25-29, Merida Mexico. p. 56.
- Lucena, E. 2008. Aspectos sanitarios de las cianotoxinas. *Higiene y Sanidad Ambiental* 8: 291–302.
- Lugo, A., Oliva, Ma. G., y Garduño, G. 2006. Diagnostico Limnológico de los humedales del municipio de Cuautitlán Izcalli (informe al municipio Cuautitlán Izcalli).
- Lugo, A., Oliva, Ma. G., y Sánchez, Ma. R. 2007. Presa de Guadalupe. In: Las aguas interiores de México: conceptos y casos. (Ed. G. de la Lanza y Hernández Pulido). AGT Editor, México, pp. 465-480.

- Lugo, A., Barvo-Inclán, L.A., Alcocer, J. Gaytán, M. C. Oliva, Ma. G., Sánchez, Ma. R., Chávez, M., Vilaclara, G. 1998. Effect on the planktonic community of the chemical program used to control water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) in Guadalupe Dam, Mexico. *Aquate Ecosystem Health & Management* 1: 333–343.
- Martínez-Almeida, V. y R. Tavera. 2005. A hydrobiological study to interpret the presence of desmids in Lake Zirahuén, México. *Limnologica* 35:61-69.
- Marshall D. W. 1987. *Biología de las algas*. Ed. Limusa. México. pp. 16-17.
- Mehto, P., Ankelo, M., Hinkkanen, A., Mikhailov, A., Eriksson, J., Spoof, L., Meriluoto, J. 2001. A time-resolved fluoroimmunoassay for the detection of microcystins, cyanobacterial peptide hepatotoxins. *Toxicon* 39: 831-836.
- Mendoza-González, A. C. 1985. Estudio florístico ficológico estacional de la laguna de Victoria o de Santiago Tilapa, México. *Phytologia* 58(7): 479-488.
- Mikhailov, A., Härmällä, A., Meriluoto, J., Sorokinac, Y., Dietriche, D., y Eriksson, J. 2001. Production and specificity of mono and polyclonal antibodies against microcystins conjugated through N- methyldehydroalanine. *Toxicon* 39:477-483.
- Moreno, I., Repetto, G., y Cameán, A. 2002. Interés toxicológico de las microcistinas, *Toxicology* 20:159-165.
- Moreno Ruiz, J.L. 2005. Fitoplancton. En: J. Bueno, F. Álvarez y S. Santiago (ed.). Biodiversidad del Estado de Tabasco, CONABIO e Instituto de Biología, UNAM. pp. 33-53.
- Mtagati, T. A. M., Siame, B. A. y Shushu, D. D. 2006. Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. *Aquat. Toxicol.* 78: 382–397.
- Oberholster, P. J., Botha, A. M. y Cloete, T. E. 2006. Toxic cyanobacterial blooms in a shallow, artificially mixed urban lake in Colorado, USA. *Lakes and Reservoirs and Management* 11: 111–123.
- Oliva, M.G., A. Lugo, J. Alcocer, L. Peralta y M.R. Sánchez. 2001. Phytoplankton dynamics in a deep tropical, hyposaline lake. *Hydrobiol.*, 466: 299-306.
- Ortega, M. M. 1984. Catálogo de algas continentales recientes de México. Universidad Nacional Autónoma de México. 565 pp.

- Ortega, M, M., Godínez, J, L., Garduño, G., y Oliva, Ma, G. 1995. *Ficología de México, Algas continentales*. AGT Editor. S.A. 221pp.
- Ortega, Ma. L. 2007. Estado actual del conocimiento de las Cyanophyceae de la Faja Volcánica Transmexicana. Tesis de licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM México. 36pp.
- Ouellette, A. J. A. y Wilhelm, S. W. 2003. Toxic cyanobacteria: the evolving molecular toolbox. *Ecol. Environ.* 1: 359–366.
- Pérez-Gutiérrez, R.M., A. Martínez Flores, R. Vargas Solis y J. Carmona Jimenez, 2008. Two new antibacterial norabietane diterpenoids from cyanobacteria, *Microcoleus lacustris*. *Journal Nat. Med*, 62 (3) : 328–31.
- Pineda-Mendoza, R. M. 2009. Determinación de Cianobacterias toxigenicas productoras de microcistinas por métodos moleculares y bioensayos. Tesis de maestría en Ciencias Quimicobiologicas. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. 98pp.
- Prescott, G. W., Ph. D. 1973. *Algae of the western great lakes area*. Otto koeltz Science Publishers, Gemany. 977pp.
- Prieto, A., Jos, A., Pichardo, S., Moreno, I., y Cameán, A. 2005. Differential oxidative stress responses o micricystis LR and RR in intraperitoneally exposed tilapia fish (*Oreochromis sp.*), *Aquatic Toxicology* 12: 8-37.
- Quiroz Castelan, H., Molina, A. F. I., Ortega, S. A. A. 1999, Abundancia y diversidad del fitoplancton en estanques con policultivo de peces, utilizando fertilizantes orgánicos, inorgánicos y combinados. *Ciencia y mar* 3(8):314.
- Ramírez, P. 2006. Cianobacterias, microorganismos del Fitoplancton y su relación con la salud Humana. Instituto Nacional de Ecología. p. 33.
- Ramírez, P., Martínez, E., Martínez, Ma. D., y Eslava, C. 2004. Cianobacterias, microorganismos del Fitoplancton y su relación con la salud humana. *In: Microbiología ambiental*. (Ed. I. Rosas, A. Cravioto y E. Ezcurra) pp. 83 –105. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México.
- Reguera, B. 2002. Establecimiento de un programa de seguimiento de microalgas tóxicas En: E. A. Sar, M. Ferrairo. Y B. Reguera Instituto Español de Oceanografía p. 21.

- Rendón-López, M.B., A.T. Chacón, & M.J. L. Rendón. 2007. Lago cráter: Alberca los Espinos, Villa Jiménez, Michoacán. Las aguas interiores de México: conceptos y casos. De la Lanza, E. G. (Comp.) S.P. Hernández (Col.). AGT. Editor, S.A. México. pp. 285-301.
- Rosas, I., Velasco, A., Belmont, R., Báez, A., Martínez, A. 1993. The algal community as an indicator of the trophic status of lake Pátzcuaro, Mexico. *Environmental Pollution* 80: 255-264.
- Roset, J., Aguayo, S., y Muñoz, M. 2001. Detección de Cianobacterias y sus toxinas. Una revisión. *Revista Toxicología* 18: 65-71.
- Rositano, J., Newcombe, G., Nicholson, B., y Sztajn bok, P. 2001. Ozonation of NOM and algal toxins in four treated waters. *Wat. Res.*, 35: 23-32.
- Sánchez Rodríguez, M. E., Vázquez, G. 1990, Estudio bioecológico de la laguna de Atezca, Hidalgo, México. II. Análisis de comunidad fitoplanctónica. *Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas* 33:9-19.
- Sánchez, M. del R., M.G. Oliva. J.M. Castillo y A. Lugo. 2007. Lago urbano del parque Tezozomoc, Distrito Federal. Las aguas interiores de México: conceptos y casos. De la Lanza, E. G. (Comp.) S.P. Hernández (Col.). AGT. Editor, S.A. México. 125-139.
- Sangolkar, L. N., Maske, S. S. y Chakrabarti T. 2006. Methods for determining microcystins (peptidehepatotoxins) and microcystin-producing cyanobacteria. *Review. Water Res.* 40: 3485 – 3496.
- Sant'Anna, C., y Azevedo, Ma. T. 2000. Contribution to the knowledge of potentially toxic Cyanobacteria from Brazil. *Nova Hedwigia* 71 (3-4): 359-385.
- Sant'Anna, C., Azavedo, Ma. T., Agujaro, L., Carvalho, M., Carvalho, L., Souza, R. 2006. Manual Ilustrado para Identificação e Contagem de Aguas Continentais Brasileiras, *Ed. Interciência*. 58pp.
- Sládeček, V. y G. Vilaclara, 1993. A Water-bloom in Lake Patzcuaro (Michoacán, Mexico). *Verh International. Verein Limnological.* 25: 431-434.
- Sivonen, K. y Jones, G. 1999. Cyanobacterial toxins. In *Toxic Cyanobacteria in Water*: (Chorus, I. y Bartram, J., eds). London: WHO, E. y F. N. Spoon. pp 41–111.

- Stefan, J., Bettina, C., y Daniel, R. 2005. Occurrence and elimination of cyanobacterial toxins in drinking water treatment plants. *Toxicology and Applied Pharmacology* 203: 231-242.
- Tavera, R. y J. González-González, 1990. Caracterización ficoflorística de los paredones de la Sierra de Juárez, Oaxaca. Importancia de las formas de crecimiento algales de la tipificación de un ambiente. *Bol. Soc. Bot. de México* 50: 121-133.
- Trainor, F. 1978. *Introductory Phycology*, Ed. John Wiley & Sons. Pp. 33-36.
- Vasconcelos, V. 2001. Cyanobacteria toxins: diversity and Ecological effects. *Limnetica* 20: 45–58.
- Vasconcelos, V., A. Martins, M. Vale, A. Antunes, J. Azevedo, M. Welker, O. López & G. Montejano, 2010. First report on the occurrence of microcystins in planktonic cyanobacteria from Central Mexico. *Toxicon* 56 (3): 425-431.
- Vázquez, G., M. Caballero, S. Lozano y A. Rodríguez. 2007. Lagos cráter de la región de los Tuxtlas: limnología, flora algal y estudio paleolimnológico de la deforestación reciente. Las aguas interiores de México: conceptos y casos. De la Lanza, E. G. (Comp.) S.P. Hernández (Col.). AGT. Editor, S.A. México. 213-232.
- Vela, L., Sevilla, E., Martín, B., Pellicer, S., Bes Ma. T., Fillat, M. F. y Peleato, Ma. L. 2007. Las microcistinas. Real Academia de Ciencias. Zaragoza. 62: 135–146.
- Vieira, J., Azevedo, M., Azevedo, S., Yukio, R., y Corre, B. 2005. Toxic cyanobacteria and microcystin concentrations in a public water supply reservoir in the Brazilian Amazonia region. *Toxicon* 45: 901-909.
- Whitton, B. 2002. *Phylum Cyanophyta (Cyanobacteria)*, In D. M. Jhon, B. A. Whitton, and A. J. Brook. Edited, The Freshwater Algal Flora of the British Isles, Cambridge University Press, pp. 25-117
- WHO International Standards for Drinking-water 1998. Guidelines for drinking water quality. Segunda edición. Addendum to volume 1, Recommendations. World Health Organization, Ginebra.

- Wiegand, C., y Pflugmacher, S. 2005. Ecotoxicological effects of selected cyanobacteria secondary metabolites a short review. *Toxicology and Applied Pharmacology* 203: 201-218.
- Yuan, M., y Carmichael, W. 2004. Detection and analysis of the cyanobacterial peptide hepatotoxins microcystins and nodularin using SELDI-TOF mass spectrometry. *Toxicon* 44: 561-570.