



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Construcción de un modelo matemático para la
predicción de la Microcistina-LR intracelular
a partir de la biomasa y la clorofila *a***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

MARTHA XÓCHITL SEGURA GUZMÁN



**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. ROSALUZ TAVERA SIERRA
2012**



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.

Hoja de datos del Jurado

1. Datos del alumno

Segura
Guzmán
Martha
Xóchitl
55781492
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
30257883-2

2. Datos del tutor

Dra.
Tavera
Sierra
Rosaluz

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Miramontes
Vidal
Pedro

4. Datos del sinodal 2

M. en C.
Cárdenas
Pérez
Jorge

5. Datos del sinodal 3

Dr.
Padilla
Longoria
Pablo

6. Datos del sinodal 4

Dr.
Reyes
Chilpa
Ricardo

7. Datos del trabajo escrito

Construcción de un modelo matemático para la predicción de la
Microcistina-LR intracelular a partir de la biomasa y la clorofila *a*
87 p.
2012

Agradecimientos

En primer lugar a mis padres, quienes desde siempre han plasmado en mí la importancia de salir adelante en el ámbito académico, y me han apoyado infinitamente para llegar a este momento. Les agradezco de corazón por ser ejemplo de respeto, generosidad y alegría.

A mis hermanos, a quienes admiro tanto por su forma de pensar y ser. Son un puñado de maestros: cada uno me ha enseñado a ser perseverante, tener fortaleza en momentos difíciles y a vivir cada momento. Disfruto enormemente compartir cada día con ustedes.

A los pilares del laboratorio: Rosaluz, Eberto y Lupita. Cada uno ha tenido un impacto distinto en mí. En conjunto logran una combinación especial del trabajo académico, libertad de pensamiento y sentido humano, que me inspira para dar lo mejor de mí. Sin Eberto, esta tesis no existiría, pero su insistencia y confianza en mí, abrieron las puertas a mi interés por las algas. A Rosi agradezco especialmente su disposición inagotable a guiar, enseñar, cuestionar y platicar. Su forma de trabajar tan dinámica y segura y su visión amplia dan un ambiente ideal para trabajar. A Lupita por apoyarme en cada momento y por hacer del laboratorio un lugar acogedor donde siempre haya entusiasmo.

A quienes son (o fueron) parte del laboratorio y es grato convivir y compartir nuestras inquietudes y logros. En primer lugar a Raquel, por su apoyo y dedicación durante todo el proceso de este trabajo. Su esfuerzo y determinación lograron que la parte química de la tesis fuera un éxito. A Nonor, Jimena, Erika, Eva, Jorge, Zitlali, Ale y Halina.

Fuera del laboratorio, a quienes me han acompañado. A MR por su apoyo y paciencia en estos años y no dejar que me desvíe del camino. Por ser como es y enseñarme tantas cosas. A Hilda, por ser el lado divertido de lo *serio* y compartir tantas experiencias a partir de aquel *primer día*. A Fabiola, por darme una visión tan bonita del trabajo académico que no había considerado antes.

A quien –sin saberlo– me ha inspirado en la última parte de este camino: L Vargas, por despertar en mí el interés explosivo de conocer y aprender mucho más sin que

existan fronteras. Por esa forma tan fresca y apasionante de enseñar y divulgar la ciencia.

En la parte técnica, el apoyo brindado hizo posible la realización de esta tesis. Al Dr. Reyes por ser la conexión con el Instituto de Química, y dentro de este, a la M. en C. Carmen Alonso, quien con gran disposición nos enseñó y permitió hacer uso del equipo del Laboratorio de Cromatografía. Al Dr. Ricardo Reyes, M. en C. Jorge Cárdenas y la Dra. Patricia Cano por el préstamo del equipo y material de sus laboratorios.

Índice

Apartado/Sección	Página
Resumen	7
1. Introducción	8
2. Antecedentes de la importancia del estudio de las cianoprocariontes tóxicas	13
3. Objetivos. General y Particulares	16
4. Material, métodos y equipo	17
4.1 Trabajo de campo	17
4.1.1 Determinación de parámetros fisicoquímicos del lago	17
4.1.2 Recolección de agua para la determinación de clorofila <i>a</i> , densidad celular y determinación taxonómica	18
4.1.3 Recolección de biomasa de fitoplancton para la determinación y cuantificación de Microcistina-LR	18
4.2 Estudio del florecimiento del Lago Mayor	18
4.2.1 Determinación de clorofila <i>a</i>	18
4.2.2 Densidad celular y cálculo de biomasa de <i>Microcystis</i>	19
4.2.3 Determinación taxonómica	20
4.3 Análisis de la Microcistina-LR	21
4.3.1 Extracción de la Microcistina-LR	21
4.3.2 Instrumentos analíticos y sustancias utilizadas para el análisis de la Microcistina-LR	21
4.3.3 Cuantificación de la Microcistina-LR por HPLC-MS	21
4.4 Análisis de regresión y modelo de predicción para la Microcistina-LR	22
5. Resultados	23
5.1 Condiciones fisicoquímicas del Lago Mayor	23
5.2 Morfoespecies que componen el florecimiento de <i>Microcystis</i>	23
5.3 Densidad celular de <i>Microcystis</i> en el lago	30

5.3.1 Cálculo de la biomasa de <i>Microcystis</i> spp. en el lago	31
5.4 Cuantificación de la Microcistina-LR intracelular	34
5.5 Modelo de predicción de la Microcistina-LR intracelular	37
6. Discusión	41
6.1 El Lago Mayor es eutrófico y tiene un florecimiento de <i>Microcystis</i> spp.	41
6.2 Diversidad de <i>Microcystis</i> en el florecimiento del Lago Mayor y en otros lagos urbanos recreativos de México	42
6.3 Concentración intracelular de Microcistina-LR en el Lago Mayor y en otros lagos urbanos alrededor del mundo	44
6.4 Riesgos a la salud	46
6.5.1 Construcción del modelo de predicción de la Microcistina-LR	48
6.5.2 Interpretación del modelo de predicción de la Microcistina-LR a partir de la biomasa	49
7. Conclusiones	52
8. Referencias	54
9. ANEXOS	64
1 Generalidades de las Cianoprocariontes	64
2 Florecimientos de cianoprocariontes	65
3 Calidad del agua y Eutrofización	72
4 Cianotoxinas	74
5 Proceso de calibración externa en un análisis cuantitativo de HPLC	79
6 Tablas y Figuras de Resultados y Discusión	81
7 Interpretación del análisis de regresión lineal realizado en este trabajo	85

Resumen

El Lago Mayor de la segunda sección de Chapultepec es uno de los espacios recreativos más importantes de México por su contenido histórico y cultural. Desafortunadamente, se encuentra en deterioro al estar muy eutrofizado y presentar florecimientos de cianoprocariontes productores de microcistinas. El objetivo de este trabajo fue lograr un acercamiento biológico y toxicológico al estudio de estos florecimientos a partir de la cuantificación de la Microcistina-LR intracelular, la biomasa de las cianoprocariontes y concentración de clorofila *a*.

Los resultados obtenidos muestran que las condiciones microclimáticas del Lago Mayor permiten el desarrollo de un florecimiento tóxico productor de Microcistina-LR, dominado por algunas morfoespecies del género *Microcystis*. A través de un modelo predictivo se evaluaron las relaciones entre la concentración intracelular de toxina, la biomasa de *Microcystis* spp. y la concentración de clorofila *a*.

Se resalta y discute la importancia de conocer la diversidad y biomasa de las cianoprocariontes y la concentración intracelular de la Microcistina-LR en un florecimiento, para averiguar el peligro potencial del mismo para la salud humana. Se discute, con base en la interpretación del modelo obtenido, la posibilidad y limitaciones de aplicar parámetros subrogados (biomasa) para la inferencia de la Microcistina-LR en un florecimiento de *Microcystis*.

1. Introducción

En las ciudades más pobladas de mundo, la necesidad de recreación y bienestar demanda espacios que promuevan el contacto con el medio natural, por ejemplo un cuerpo de agua inmerso en un área verde de grandes dimensiones, tal como los lagos del Bosque de Chapultepec, el área verde urbana más extensa de México y Latinoamérica.

Los lagos urbanos son cuerpos de agua dulce que se encuentran dentro o en la periferia de una ciudad; son someros y de superficie pequeña. Por su naturaleza y ubicación es común que sean utilizados como sitios para nadar, pasear en bote, pescar o practicar esquí acuático. Ya que los lagos urbanos son sitios de descanso, relajación y ejercicio, la percepción sobre su aspecto estético, como la apariencia de las orillas y el olor que despiden, es de suma importancia. La conservación del área recreativa se vuelve una necesidad por la importancia cultural que tiene para la población (Falconer et al., 1999, WHO, 2003).

Barica (1992) considera que una de las características principales de los lagos urbanos es que son afectados principalmente por la población urbana, a tal grado que los percibe como *"...indicadores vivos del manejo o mal manejo del ecosistema, así como indicadores de la salud del ambiente urbano."* A través de numerosos estudios se ha evidenciado que la mayoría de los lagos urbanos tienen problemas de contaminación que se relacionan con la eutrofización de los mismos y se reflejan en la composición de la comunidad del fitoplancton. Por lo tanto, el fitoplancton se convierte en un indicador biológico de las condiciones de salud o deterioro de un lago.

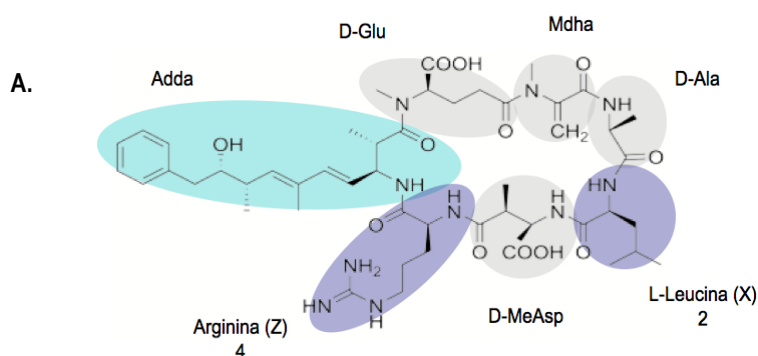
En los lagos eutróficos, es muy común que se desarrollen poblaciones muy abundantes de cianoprocariontes (generalidades de las cianoprocariontes en ANEXO 1), llamadas *florecimientos* (Burch, 2008) (el ANEXO 2 proporciona más información sobre dicho término). Los florecimientos, que van en aumento alrededor del mundo, pueden presentarse en cualquier época del año (Howard,

1994; Carmichael, 1996; Codd et al., 1999; Oliver & Ganf, 2002) y permanecer por tiempo indefinido (Lampert & Sommer, 2007). Los florecimientos en ocasiones disminuyen la calidad del agua¹ y el valor estético de los lagos, pero la consecuencia más importante es que implican un riesgo a la salud de la población humana ya que las cianoprocariontes formadoras de florecimientos tienen la capacidad de producir una serie de toxinas que son dañinas para los mamíferos. Del total de los florecimientos de cianoprocariontes estudiados, más del 65% albergan cianotoxinas, principalmente microcistinas (Lawton et al., 1994; Sivonen & Jones, 1999). El género *Microcystis* es reconocido como el más cosmopolita y muchas de sus especies producen microcistinas.

Las microcistinas son un grupo de heptapéptidos cíclicos producidos por una gran variedad de especies de cianoprocariontes (Tabla 1) que tienen la propiedad de causar daño al hígado de mamíferos, por eso se les clasifica como "hepatotoxinas" (Carmichael, 1994). Existen más de 70 variantes de microcistinas que determinan también su grado de toxicidad². La diferencia principal entre ellas es la variación de dos residuos de aminoácidos que constituye a su vez la base para su nomenclatura (Codd, 1999; Harada, 1996; Sivonen & Jones, 1999; Neilan et al., 1999; Babica et al., 2006). Por ejemplo, la Microcistina-LR tiene leucina (L) y arginina (R) y ambos aminoácidos la hacen la variante más tóxica (Figura 1) (Sivonen & Jones, 1999). No se sabe con certeza la función de las microcistinas en las células de las cianoprocariontes, sin embargo se sugiere que tienen un papel en la adaptación a la luz (Hesse et al., 2001) y que su contenido podría ser regulado por reacciones de la fotosíntesis (Deblois & Juneau, 2010).

¹ La calidad del agua se refiere al estado en el que se encuentra un cuerpo de agua para sostener determinados usos para los que está destinado. Por las actividades del hombre, es común que la calidad del agua sea afectada (disminuya). En el ANEXO 3 se ahonda en este concepto así como en el principal problema relacionado con esta condición: la eutrofización.

² La toxicidad es el efecto nocivo que las microcistinas provocan a diversos organismos, y se determina por medio de bioensayos con ratones a través del valor DL₅₀, que representa la dosis a la que la mitad de los animales expuestos muere. Este tipo de ensayos son un indicador indirecto de la concentración de toxina, pues mientras mayor sea esta, más grave será el efecto tóxico que cause. Para una revisión más amplia de todas las variantes de microcistinas, consultar Sivonen & Jones (1999).



B.

Posición X (2)	Posición Z (4)	Variante de MC
Leucina (L)	Arginina (R)	MC-LR
Arginina (R)	Arginina (R)	MC-RR
Triptofano (Y)	Arginina (R)	MC-YR

Figura 1. A. Estructura química de la Microcistina-LR. B. Ejemplos de aminoácidos de las microcistinas que las convierten en variantes de esta toxina.

Tabla 1. Destino principal de las microcistinas y especies que las producen. (tomado de Sivonen & Jones (1999) y modificado con Ressom et al., 1994; Carmichael, 2001 y Fastner et al, 1999).

Clasificación por órgano o sistema principal	Grupo de toxina	Órgano principal afectado	Especies de cianoprocariontes que las producen ^a
Hepatotoxina	Microcistinas	Hígado	<i>Anabaena circinalis</i> , <i>A. flos-aquae</i> , <i>A. lemmermannii</i> ; <i>Anabaenopsis arnoldi</i> , <i>A. millerii</i> ; <i>Aphanocapsa cumulus</i> , <i>A. elachista</i> ; <i>Arthrospira fusiformis</i> ; <i>Hapalosiphon hibernicus</i> ; <i>Microcystis aeruginosa</i> , <i>M. botrys</i> , <i>M. ichthyoblabe</i> , <i>M. viridis</i> ; <i>Nostoc linckia</i> , <i>N. muscorum</i> , <i>N. punctiforme</i> ; <i>Oscillatoria limosa</i> ; <i>Planktothrix agardhii</i> , <i>P. mougeotii</i> , <i>P. rubescens</i> ; <i>Snowella lacustris</i> ; <i>Woronichinia naegeliana</i>

^a tal vez otras especies del género también produzcan toxinas.

Se conocen diversos factores que determinan si un florecimiento puede ser tóxico o no, entre ellos condiciones del ambiente, como la temperatura, pH, intensidad de luz y concentración de nutrientes; y características propias de las

cianoprocariontes, como la etapa de crecimiento y la composición genética (Watanabe & Oishi, 1985; Ransom et al., 1994). Sin embargo, dentro de un mismo florecimiento existe la posibilidad de que exista una mezcla de cepas³ tóxicas y no tóxicas (Sivonen & Jones, 1999). Morfológicamente no es posible determinar si un florecimiento o incluso un grupo de células es tóxico (Sivonen & Jones, 1999), por lo que es necesario recurrir al uso de herramientas analíticas, como la cromatografía líquida. En el ANEXO 4 se encuentran los métodos más conocidos para el análisis de las microcistinas.

Desde el momento en que son producidas, las cianotoxinas se mantienen en el interior celular, es decir son intracelulares, hasta el momento de la muerte de la célula, cuando son liberadas al agua (Sivonen & Jones, 1999). En tanto las poblaciones de cianoprocariontes aumenten, la concentración de microcistinas dentro de las células aumentará y con esto su potencial liberación al agua, lo que incrementaría en ambos casos el riesgo de daño a la salud humana (Sivonen & Jones, 1999), pues la población se encuentra expuesta a las cianotoxinas por medio de los florecimientos mismos y del agua, a través de diversas rutas de exposición: dérmica, respiratoria, sanguínea y gastrointestinal (Carmichael, 2001).

Nuestro interés en los sistemas acuáticos de las zonas recreativas deriva de la poca atención que se les ha dado, a pesar de los riesgos mencionados. En estos cuerpos de agua, un acercamiento biológico proporciona un diagnóstico de su estado de salud y calidad para la población. Específicamente, los lagos que son parte del Bosque de Chapultepec (Figura 2), uno de los principales centros recreativos y culturales de la Ciudad de México, y que presentan problemas de deterioro evidenciados por la presencia de cianoprocariontes toxigénicas en la superficie del agua.

Un estudio reciente muestra que el Lago Mayor de la segunda sección de Chapultepec (Figura 2) presenta florecimientos de *Microcystis* y microcistinas en el

³ Una cepa es un subgrupo genético específico dentro de una especie en particular, y cada especie puede tener decenas o cientos de cepas, cada una con características un poco diferentes (Sivonen & Jones, 1999).

agua (Vasconcelos et al., 2010). Ante esta realidad, decidimos abordar el estudio del florecimiento del Lago Mayor desde los puntos de vista biológico y toxicológico, de tal manera, que después de unirlos, proporcionen una herramienta para conocer cuál es el comportamiento de la Microcistina-LR intracelular respecto a la densidad del florecimiento. Esta herramienta se presenta de una manera útil a través de un modelo matemático. Nosotros pensamos, de acuerdo con Sivonen & Jones (1999), que en tanto las poblaciones de cianoprocariontes aumenten en el florecimiento del Lago Mayor, la concentración de la toxina dentro de las células aumentaría, y con ello su potencial daño a la salud humana.

En general, los modelos de predicción de microcistinas documentados son muy escasos y además particulares para cada sitio estudiado, ya que se construyen con aquellas variables que muestran la mejor correlación con las toxinas, por ejemplo la abundancia de las cianoprocariontes formadoras de florecimientos o la concentración de un nutrimento en particular (Kotak et al., 1995; Rantala et al., 2006). En particular, Fastner et al. (2000) reconocen que la elaboración de una relación entre la concentración de microcistina y la biomasa de cianoprocariontes es más viable en muestras con presencia o dominancia de un solo taxón productor de microcistina, ya que permite que a estos organismos se les atribuya la producción de la toxina (Fastner et al., 2000). Lo anterior, aunado a los antecedentes de florecimientos formados por un solo género de cianoprocariontes en Chapultepec, resalta la importancia de generar un modelo específico para este sitio. La generación del modelo tiene importancia para la predicción del comportamiento de la microcistina, lo que se vincula directamente con el metabolismo de las células. La determinación de toxinas en agua es una evaluación efímera y desde nuestro punto de vista inapropiada en términos de la generación de modelos.

El presente estudio es el primero en determinar la concentración de Microcistina-LR intracelular en un florecimiento de cianoprocariontes en México. Martínez (2002) realizó la determinación dentro de un florecimiento en el embalse Valle de Bravo, sin embargo sus resultados sobre la toxina no son claros y no pueden ser comparados con los resultados de esta tesis.

2. Antecedentes de la importancia del estudio de cianoprocariontes tóxicas

Las observaciones de lagos con altas concentraciones de cianoprocariontes y su posible daño a animales silvestres y ganado, datan de más de cien años, y provienen de unos cuantos países europeos. En los años cincuenta y sesenta, se hizo evidente que existía una relación entre casos de personas con alergias y cianoprocariontes de agua dulce (como *Microcystis* y *Planktothrix*) presentes en sitios recreativos. La toxicidad de varios florecimientos fue confirmada más adelante por bioensayos con ratones (Ressom et al., 1994). En la década de los ochenta los reportes de personas afectadas por haber practicado deportes acuáticos se hicieron comunes tanto en Europa como en algunas regiones de Estados Unidos y Canadá (Sivonen & Jones, 1999).

Al mismo tiempo, en países como Japón e Inglaterra comenzó el estudio formal de las microcistinas, al aislarlas de las cianoprocariontes; se caracterizó su estructura química y se cuantificaron en muestras de agua, florecimientos o cepas cultivadas. Pocos años más tarde, aumentaron a cientos los estudios sobre florecimientos, cepas aisladas y microcistinas, dando a conocer un problema de índole global. En América Latina, los estudios sobre florecimientos son escasos y recientes. En países como Cuba, Uruguay y Brasil, tanto en sitios recreativos como de uso más amplio, se han observado algunas de las morfoespecies⁴ de cianoprocariontes que han sido registradas en el Lago Mayor de Chapultepec (Sección 5.2), (Komárek, 1984; Moschini et al., 2009; Vasconcelos et al., 2010; De Leon & Yunes, 2011; Gomez et al., 2011).

En México se ha reportado la presencia de florecimientos de cianoprocariontes en cuerpos de agua de abastecimiento y de recreación, principalmente de la zona del

⁴ En este trabajo se emplea el término *morfoespecie* para designar las diferentes morfologías que reconocimos al microscopio. Los nombres que identifican a cada entidad no representan un compromiso taxonómico porque actualmente se reconoce que en el género *Microcystis* podría haber identidad genética en la diversidad que desde el punto de vista de su sistemática, se ha reconocido como especies distintas (Otsuka et al., 2001).

centro del país, que incluyen el lago de Chapala, el embalse de Valle de Bravo, varios cuerpos de agua que son parte del sistema Cutzamala; en los principales lagos de Chapultepec, el lago de Zumpango, el lago Tezozomoc y la Pista de Remo y Canotaje de Xochimilco, entre otros (Alcocer et al., 1988; Martínez, 2002; Ramírez et al., 2004; Arzate, 2008; Oliva et al., 2008; Ortiz et al., 2010; Vasconcelos et al., 2010).

Los trabajos que anteceden al presente y que estudian la presencia de florecimientos tóxicos y sus microcistinas en México son principalmente tres. El primer trabajo del que tenemos conocimiento es el de Martínez (2002), realizado en el embalse Valle de Bravo en el periodo 1999 – 2001. Este estudio es el primer antecedente de la determinación intracelular de Microcistina-LR en un florecimiento de cianoprocariontes, sin embargo dado que dicho estudio proviene de una publicación informal y que sus resultados son poco claros en las unidades de medida de las microcistinas, no apoya el análisis de los resultados del presente trabajo.

El segundo trabajo, con un enfoque toxicológico, es el de Arzate (2008), quien hizo evidente que en distintos lagos urbanos recreativos cercanos o dentro de la Ciudad de México, incluido el de la primera sección de Chapultepec, existen cepas tóxicas de *Microcystis* spp. El autor encontró que las cepas aisladas de seis lagos, contaban con la información genética para producir microcistinas y detectó su presencia en el agua, en concentraciones cercanas a $3.0 \mu\text{g l}^{-1}$ (Arzate, 2008), sin embargo este trabajo no cuenta con la determinación de especies.

El estudio más reciente y que nos aporta más información sobre la composición de las especies de los florecimientos de cianoprocariontes y su producción de microcistinas es el trabajo de Vasconcelos et al. (2010), realizado en nueve cuerpos de agua de la zona central del país, incluyendo sitios de abastecimiento y lagos urbanos recreativos del Estado de México y la Ciudad de México, entre ellos el Lago Mayor de Chapultepec. Por medio de un acercamiento múltiple con diversas técnicas, los autores identificaron las especies de cianoprocariontes presentes en los florecimientos, la capacidad genética para producir microcistinas de poblaciones de cianoprocariontes en estado natural, la diversidad de variantes de microcistinas

presentes en los cuerpos de agua y la concentración de microcistinas totales en el agua de los mismos.

Vasconcelos et al. (*op. cit.*) encontraron que de las especies de *Microcystis* más comunes en la mayoría de los cuerpos de agua, las dominantes fueron *M. aeruginosa*, *M. flos-aquae*, *M. panniformis*, *M. novacekii* y *M. wesenbergii*. Esta última dominó en el embalse Valle de Bravo. Es notable que excepto en Valle de Bravo, detectaron genes responsables de la biosíntesis de las microcistinas. En cuatro de estos lagos se detectó la Microcistina-LR, además de una o más variantes de microcistinas que difirieron en cada sitio, haciendo que cada lago tuviese un perfil de toxinas particular. La concentración de microcistinas totales en agua, determinada en los cuatro lagos, varió entre 4.9 y 78 $\mu\text{g l}^{-1}$; este último valor correspondió al Lago Mayor de Chapultepec (Vasconcelos et al., 2010).

3. Objetivos

General

Proporcionar un enfoque toxicológico y biológico del florecimiento de cianoprocariontes que ocurre en el Lago Mayor de la segunda sección de Chapultepec, y proporcionar un modelo con el que sea posible aproximar la concentración de Microcistina-LR a partir de la densidad celular y la clorofila *a*, y de esta manera facilitar el acercamiento al estudio de florecimientos tóxicos de cianoprocariontes.

Particulares

- Identificar las especies de cianoprocariontes que componen el florecimiento del lago.
- Determinar la concentración de clorofila *a* y la densidad celular del florecimiento en diez puntos del lago.
- Determinar en diez puntos del lago, la concentración de Microcistina-LR intracelular de las cianoprocariontes que componen el florecimiento, utilizando un sistema HPLC-MS.
- Obtener una relación entre la concentración de clorofila *a*, la biomasa de las cianoprocariontes del florecimiento y la concentración intracelular de Microcistina-LR. Elaborar un modelo con el que se pueda aproximar la concentración de la toxina a partir de los otros dos parámetros.

4. Material, métodos y equipo

Este apartado contiene la descripción de los métodos que se aplicaron en este trabajo de investigación, y se divide en cuatro secciones. La Sección 4.1 comprende la medición de parámetros fisicoquímicos del lago y la toma de muestras de agua y de fitoplancton para fines biológicos y toxicológicos. En la Sección 4.2 se abordan los aspectos biológicos que corresponden a la caracterización del fitoplancton en cuanto a diversidad de especies y abundancia de la comunidad en el lago, ambos a partir de la observación de muestras de agua. En la Sección 4.3 se describen las técnicas químicas analíticas utilizadas para detectar y cuantificar la Microcistina-LR intracelular. Por último, la Sección 4.4 hace referencia a la conjunción de los resultados de las secciones 4.2 y 4.3 para realizar un análisis estadístico que permita conocer las relaciones entre el aspecto biológico y el químico de los organismos del lago.

4.1 Trabajo de campo

El Lago Mayor de la segunda sección de Chapultepec se localiza al poniente de la Ciudad de México, en las coordenadas 19° 24' 98'' N, 99° 11' 97'' O (Figura 2). La recolecta se realizó en el mes de octubre de 2010, temporada seca. Del perímetro del lago se definieron diez puntos de muestreo aproximadamente equidistantes (Figura 2) de los que se midieron parámetros fisicoquímicos y se obtuvieron muestras de agua para determinar la concentración de clorofila *a* y densidad celular, y muestras concentradas del florecimiento para cuantificar la Microcistina-LR. La recolección de todo el conjunto de datos y muestras se realizó de las 10 a las 12 horas aproximadamente.

4.1.1 Determinación de parámetros fisicoquímicos del lago

En un bote de plástico de boca ancha se recolectó un litro de agua en cada punto de muestreo, del cual se determinó la temperatura, pH y conductividad con un potenciómetro de campo (Conductronic). Terminado este procedimiento, el agua se devolvió al lago. Con un sensor de irradianza (Hobo Temperature/Light Pendant Data Logger [#UA-002-64K]) se determinó la irradianza subacuática (30 cm de profundidad).

4.1.2 Recolección de agua para la determinación de clorofila *a*, densidad celular y determinación taxonómica

Se recolectó un litro de agua de cada punto en botellas de polietileno tereftalato (PET). Las diez botellas se mantuvieron en refrigeración y protegidas de la luz hasta su llegada al laboratorio. De estas muestras de agua se obtuvo el material para la determinación de clorofila *a*, la obtención de la densidad celular y la biomasa (Sección 4.2.2) de cada sitio y la determinación taxonómica de las cianoprocariontes en el Laboratorio de Algas Continentales.

4.1.3 Recolección de biomasa de fitoplancton para la determinación y cuantificación de Microcistina-LR

Por otro lado, se recolectó biomasa del fitoplancton al filtrar de 15 a 50 litros de agua de la superficie en cada punto, utilizando redes de fitoplancton de poro de 75 µm. El agua se filtró repetidamente para concentrar la biomasa, la cual se almacenó en pequeños frascos de vidrio de 30 ml, mantenidos en refrigeración y oscuridad hasta su llegada al Instituto de Química, donde la biomasa se liofilizó, pesó y almacenó a -20°C hasta su utilización para preparar los extractos a analizar por HPLC-MS. Los resultados de este proceso se reportan como cantidad de toxina por peso seco de biomasa de fitoplancton.

4.2 Estudio del florecimiento del Lago Mayor

4.2.1 Determinación de clorofila *a*

En sistemas de filtración Millipore, se filtraron 50 ml de agua de cada punto utilizando filtros de fibra de vidrio, a los que se les retiró el exceso de agua y se mantuvieron en refrigeración y oscuridad hasta el momento de la determinación de clorofila *a*. La extracción del pigmento se hizo con acetona 90%, y después de un proceso de centrifugación, la clorofila *a* se determinó por fluorimetría (Luorómetro Turner AU10) por el método 445.0 (Arar & Collins, 1997).



Figura 2. Ubicación del Lago Mayor de la segunda sección de Chapultepec y de los puntos de muestreo de los bordes del lago para el muestreo de octubre 2010.

4.2.2 Densidad celular y cálculo de biomasa de *Microcystis*

De las muestras de agua de cada sitio de recolección y agitando suavemente cada botella de PET (Sección 4.1.2), se prepararon submuestras de 20 ml fijadas con formalina al 3%, las cuales fueron incorporadas al Herbario de la Facultad de

Ciencias en la colección particular de Biodeterioro Algal (BA), con claves designadas para el sitio de la recolección (Chapultepec, Distrito Federal). A partir de las submuestras fijadas, se realizaron preparaciones permanentes por duplicado utilizando un volumen de 10 μl , las cuales se añadieron también a la colección del Herbario con su clave correspondiente. Con estas preparaciones se obtuvo la densidad celular al contar todas las células observadas y también se hizo la determinación taxonómica, cuyo registro fotográfico se realizó con una cámara Nikon Coolpix S10 acoplada a un microscopio Nikon Optiphot-2.

Para un posterior análisis de relaciones entre la Microcistina-LR y la cantidad de organismos de *Microcystis* presentes, se obtuvieron valores de biomasa a partir de las colonias observadas durante el conteo celular. El biovolumen es el estimado de biomasa más comúnmente utilizado para las microalgas. El cálculo de biovolumen se basa en aproximaciones geométricas (sobre dimensiones lineales) aplicadas lo más cercanas a la figura real de los organismos; en el caso de *Microcystis*, se tiende a aplicar la forma de una esfera a las colonias (Hillerbrand et al., 1999). En los casos en que se observaron formas geométricas, se les aplicó la fórmula del volumen de la figura correspondiente, por ejemplo, de elipses, cubos y prismas. Para cada una de estas formas, se tomaron las medidas correspondientes de 25 colonias y se obtuvo un valor promedio. Este valor se utilizó como un factor por el que se multiplicó cada colonia de acuerdo a su forma y así se obtuvo el biovolumen por cada punto de muestreo.

Posteriormente, los valores de biovolumen se transformaron a biomasa calculando la densidad de la célula bajo el supuesto de que el 95% del contenido celular y la mayor parte del mucílago es agua. Los valores de biomasa se expresaron entonces como $\mu\text{g g}^{-1}$.

4.2.3 Determinación taxonómica

La determinación taxonómica se realizó a partir de duplicados de preparaciones permanentes de las submuestras fijadas con formalina al 3%; en algunos casos fue necesario hacer tinciones con nigrosina para observar el perfil de las envolturas mucilaginosas. Se consultaron los trabajos de Komárek & Anagnostidis (1999) para el grupo de las Chroococcales, el de Sant' Anna et al. (2004) para la revisión de *Microcystis protocystis* y Komárek & Komárková (2002) para la revisión de *M. panniformis*.

4.3 Análisis de la Microcistina-LR

4.3.1 Extracción de la Microcistina-LR

Para la extracción de la toxina se siguió el método de Prakash et al. (2009) con algunas modificaciones. Se pesaron 100 mg de material de cianoprocariontes liofilizado y se le agregaron 5 ml de metanol acuoso 75% (Fastner et al., 1998; Lawton et al., 1994). La muestra se sonicó de forma discontinua por 10 minutos con una potencia que osciló entre 36-39 W seguida por agitación ininterrumpida por 45 minutos. Los restos celulares se separaron por medio de centrifugación por 5 minutos a 10 000 rpm; el sólido se extrajo de nuevo mientras que el sobrenadante se mantuvo en refrigeración. Después de tres procesos de extracción, los sobrenadantes se reunieron y se concentraron por evaporación hasta alcanzar un volumen de un mililitro. Este extracto se almacenó a -20°C hasta su análisis por HPLC-MS (siguiente sección), y antes de ser inyectado, se centrifugó a 13 000 rpm por 30 minutos a 4°C para limpiar la muestra de partículas que pudieran interferir en el análisis. El volumen de inyección de las muestras varió entre 5 y 10 μ l.

4.3.2 Instrumentos analíticos y sustancias utilizados para el análisis de la Microcistina-LR

El equipo utilizado para la separación de la Microcistina-LR fue un cromatógrafo Agilent 1200 con un inyector automático. Se utilizó una columna de fase reversa y una elusión por gradiente, en las condiciones descritas en la Tabla 13 (ANEXO 6). Se probaron distintos gradientes para conocer el tiempo de retención de la toxina. Los disolventes utilizados fueron grado HPLC. La identificación de la toxina se llevó a cabo por comparación con el tiempo retención de un estándar analítico de Microcistina-LR en solución (Agilent, pureza 95%) y por su espectro de masas (m/z 995; $[M+H]^+$) en un Espectrómetro de Masas Esquire 6000 de Bruker, provisto con una interfase Electrospray (ESI) y con trampa iónica (Tabla 13, ANEXO 6). El tiempo de retención y el peso molecular de la toxina permitieron su identificación.

4.3.3 Cuantificación de la Microcistina-LR por HPLC-MS

Para cuantificar la Microcistina-LR se elaboró una curva de calibración por el modelo de puntos múltiples, utilizado para métodos que cubren concentraciones de hasta varios órdenes de magnitud (Dolan, 2009a). La curva se construyó utilizando una serie de cantidades de toxina conocidas a partir del estándar analítico, las cuales se

inyectaron por duplicado en el instrumento. La curva de calibración se obtuvo al graficar las áreas de los picos como una función de la cantidad de Microcistina-LR. Esta gráfica de calibración se obtuvo para determinar el intervalo de linealidad, y con la ecuación obtenida se estimó la cantidad de toxina en las muestras, valor que posteriormente se extrapoló para reflejar las concentraciones en microgramos (μg) de Microcistina-LR por gramo (g^{-1}) de peso seco de biomasa seca de fitoplancton. En la Sección 5.4 de Resultados, la concentración de Microcistina-LR intracelular se expresa como $\mu\text{g g}^{-1}$.

4.4 Análisis de regresión y modelo de predicción para la Microcistina-LR

A través de un análisis de regresión (programa estadístico SPSS 17.0) se evaluó la relación entre la biomasa de *Microcystis* y la concentración de la clorofila *a* (variables predictivas o independientes) con la concentración de Microcistina-LR intracelular (variable dependiente), con el objeto de conocer si una determinada concentración de Microcistina-LR puede predecirse a partir de concentraciones determinadas de biomasa celular y/o clorofila *a*. Este análisis se expresó mediante la *ecuación de la regresión lineal* y produjo un modelo resumido de lo que será esa predicción.

A lo largo del análisis de regresión, una serie de pruebas y valores evaluaron si las variables independientes eran confiables para conformar un modelo de predicción de la variable dependiente. Estas pruebas incluyeron la correlación de Pearson, para conocer la correlación entre las variables; una ANOVA y pruebas de significación, para evaluar si las variables independientes eran adecuadas para formar el modelo. Antes del análisis, todas las variables fueron transformadas a valores logarítmicos para que fuesen comparables y para asegurar la normalidad de los datos.

5. Resultados

En este apartado se encuentran cinco secciones con los resultados obtenidos en esta tesis. Las primeras tres contienen la caracterización del lago desde el punto de vista fisicoquímico (5.1) y biológico (5.2 y 5.3). Dentro de la Sección 5.2 se encuentra la descripción de las morfoespecies de *Microcystis* observadas en el lago, y en la Sección 5.3, se presenta la abundancia del florecimiento de *Microcystis*. La Sección 5.4 contiene la información de la parte química del trabajo, donde se muestra la presencia y concentración de Microcistina-LR intracelular. La Sección 5.5 indica la relación encontrada entre la clorofila *a*, la biomasa de *Microcystis* y la concentración intracelular de Microcistina-LR que resultó en un modelo de predicción de la toxina. A lo largo del apartado, se presentan tablas y gráficos que documentan la información obtenida.

5.1 Condiciones fisicoquímicas del Lago Mayor

La información completa de los datos del muestreo se presenta en la Tabla 12, ANEXO 6. La temperatura más baja fue 17.5 °C y la más alta 21.9 °C, con un promedio de 19.13 °C. El pH se encontró entre valores de 10.0 y 11.0, y la conductividad en valores cercanos a 500 $\mu\text{S cm}^{-1}$. Los valores de irradianza tuvieron un promedio de $7.93 \times 10^{-4} \mu\text{E} \cdot \text{m}^2 \text{ s}^{-2}$, con un valor mínimo de $3.38 \times 10^{-5} \mu\text{E} \cdot \text{m}^2 \text{ s}^{-2}$ y máximo de $3.52 \times 10^{-3} \mu\text{E} \cdot \text{m}^2 \text{ s}^{-2}$.

5.2 Morfoespecies que componen el florecimiento de *Microcystis*

El florecimiento de cianoprocariontes estuvo dominado en su totalidad por cinco morfoespecies del género *Microcystis*, descritas a continuación. Para su identificación se consideraron aspectos como la morfología de las colonias, el arreglo de las células y su diámetro. En el florecimiento de Chapultepec se observó que las medidas de las células se sobreponen entre las poblaciones. Con respecto a las medidas registradas en la literatura, sólo *M. aeruginosa* presentó intervalos más pequeños (Komárek & Anagnostidis, 1999).

***Microcystis* cfr. *ichthyoblabe* Kützing 1843**

Figura 3A-D

Las colonias son grandes y globosas, irregulares. La consistencia de la vaina de la colonia es difluente, fina y hialina; es de color pardo claro. Las células se encuentran densamente dispuestas, en arreglos de subgrupos rodeados de vaina. Las células son esféricas, sin vaina celular individual, formando pares después de la división; su color es verde azul amarillento, con presencia de aerotopos. Las colonias miden aproximadamente 320 x 270 μm . En el margen de la colonia, el mucílago tiene una amplitud de 2.5-11 μm . Las células tienen un diámetro de 2.79-3.5 μm .

Herbario: DFCh-5.3 (Fig. 3A-B) y DFCh-7.3 (Fig. 3C-D).

Ecología: Komárek & Anagnostidis (1999) señalan que esta especie ocurre en aguas mesotróficas o poco eutróficas y que probablemente no se encuentra en países tropicales, al no estar comprobada su existencia en numerosas muestras de países de esa región, incluido Brasil (Komárek et al., 2002). Esto indica que las condiciones de Chapultepec permiten el desarrollo de organismos cuyas características se asemejan en morfología y talla a aquellos que habitan en distintas latitudes y en condiciones de menor eutrofia.

Notas: En Chapultepec se determinaron pocas colonias como esta morfoespecie, y de ellas, algunas presentaron características distintas de las referidas en la literatura, como la ausencia de subcolonias claramente definidas y el diámetro celular un poco por arriba del descrito originalmente (Komárek & Anagnostidis, 1999). De ninguna de las colonias examinadas tuvimos la oportunidad de observar la desintegración de subcolonias en etapas de desarrollo tardías. La descripción basada en caracteres morfológicos puede llevar a errores en la identificación de especies, y considerando la presencia dudosa de esta especie en zonas tropicales decidimos que será necesario confrontar las poblaciones de Chapultepec con otros futuros registros.

***Microcystis panniformis* Komárek 2002**

Figura 3E-H

Colonias pequeñas, amorfas, alargadas, no clatradas, de forma aplanada hasta formar monocapas, con vaina difluente y hialina. El margen mucilaginoso es indistinto y no se traslapa en los conjuntos de células; en las colonias viejas el margen es irregular. Las colonias son verdosas, algunas veces con agujeros pequeños e indistintos. Las células se disponen en arreglos de hileras; su forma es esférica y no tienen vaina individual; las células están distribuidas densa y regularmente, algunas veces en filas indistintas; su color es verde azul brillante,

con presencia de aerotopos. Las colonias son de tallas 150 x 50 μm aproximadamente y el diámetro de las células es de 2.9-3.3 μm .

Herbario: DFCh-8.2 (Fig. 3E-F) y DFCh-10.1 (Fig. 3G-H).

Ecología: En Chapultepec esta morfoespecie coexiste con *M. aeruginosa*, descrita en este trabajo. La coexistencia de ambas morfoespecies ha sido reportada en Brasil (Komárek et al., 2002).

Notas: No observamos estadios jóvenes de la morfoespecie, en los que las colonias fueran esféricas y con agujeros, como se indica en la descripción original (Komárek, 2002). Esta especie descrita recientemente es de distribución tropical, probablemente pantropical (Komárek & Komárková, 2002) y es común en aguas eutróficas, en diversos cuerpos de agua de Brasil (São Paulo) (Komárek et al., 2002).

***Microcystis flos-aquae* (Wittrock) Kirchner 1898**

Figura 3J-L

= *Microcystis prasina* (Wittrock) Lemmermann 1904 ?; *Microcystis aeruginosa* f. *flos-aquae* (Wittrock) Elenkin 1938.

Colonias pequeñas, microscópicas, de forma globosa, más o menos esférica o irregulares en los bordes, no lobuladas, rodeadas de vaina difluente o firme, fina y hialina. La envoltura mucilaginoso no excede los conjuntos de células. El color de las colonias es pardo y su aspecto puede ser pulvurulento (Figura 3I) o compacto (Figura 3K). Las células se encuentran densamente dispuestas en la colonia; las células son esféricas, sin vaina individual y de color verde azul amarillento, con presencia de aerotopos. El margen de las colonias puede ser menor o igual al diámetro celular. Las colonias son de talla aproximada de 240 x 180 μm ; el diámetro de las células es de 2.6-3 μm .

Herbario: DFCh-5.1 (Fig. 3I-J) y DFCh-5.3 (Fig. 3K-L).

Ecología: En Chapultepec, las colonias de esta morfoespecie fueron principalmente esféricas y con los bordes regulares. Esta morfoespecie originalmente descrita para aguas claras o poco eutróficas (Komárek & Anagnostidis, 1999), recientemente se ha observado en la Ciudad de México, en cuerpos de agua eutróficos (Chapultepec, este trabajo) e hipereutróficos y en altas densidades (lago Tezozomoc; Oliva et al., 2008).

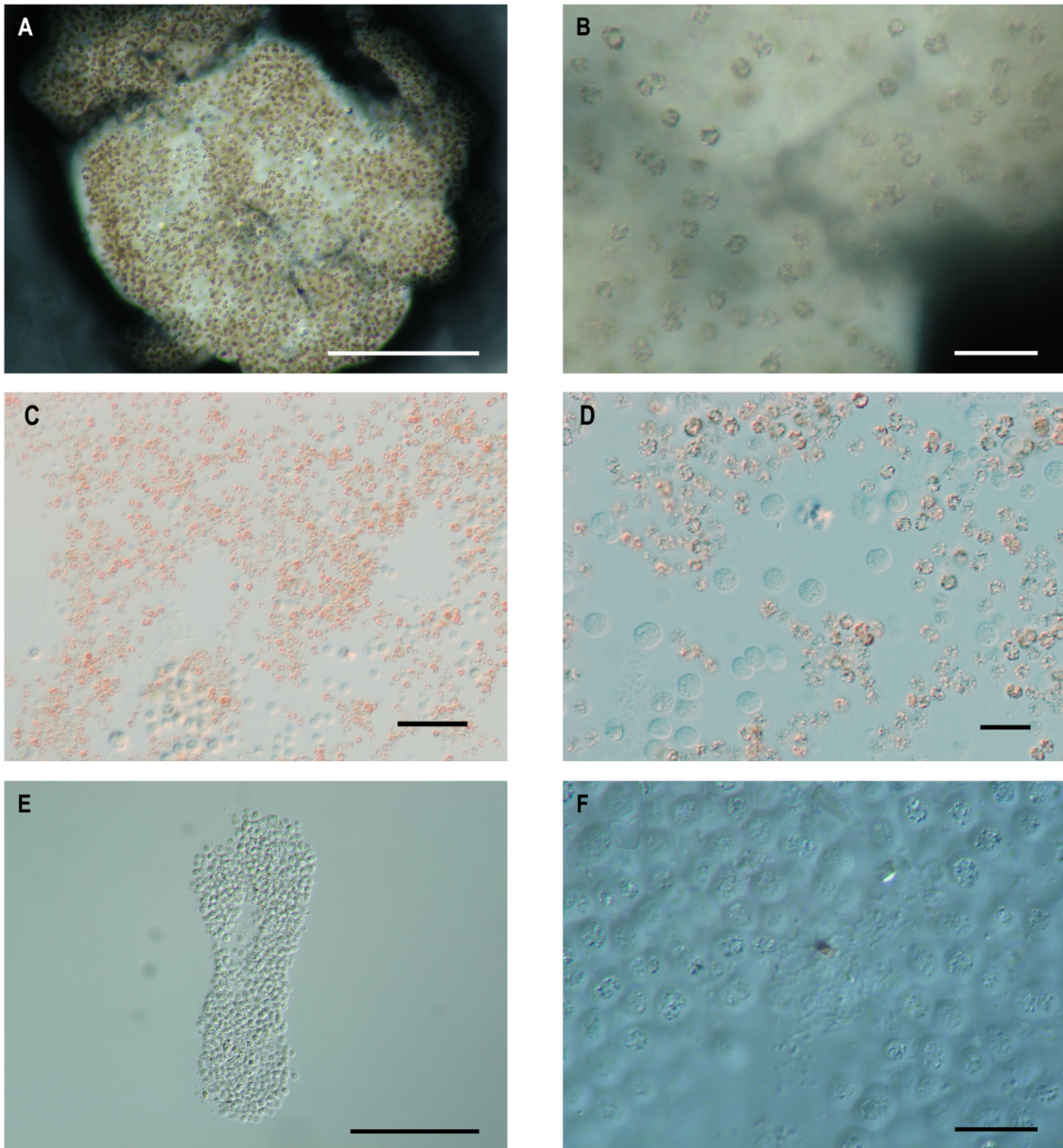


Figura 3. Ejemplares de las cinco morfoespecies de *Microcystis* observadas en el florecimiento del Lago Mayor en octubre de 2010. Las fotografías de la izquierda muestran las colonias representativas de cada morfoespecie y junto a ellas se muestra un acercamiento de las células que las componen. A-D *Microcystis* cfr. *ichthyoblabe*. En C y D se observa la coexistencia de otra morfoespecie con diámetro celular más grande. E-H *Microcystis panniformis*. Su arreglo celular se observa en hileras. J-L *Microcystis flos-aquae*. Se observaron colonias con aspecto pulverulento (I) y otras con margen definido (K). M-N *Microcystis protocystis*. En algunas colonias se observaron células con vaina individual (N, flecha). O-R *Microcystis aeruginosa*. En las colonias se observan espacios libres de células, conformando un arreglo clatrado, típico de la especie, así como la coexistencia de otra cianoprocarionte filamentosa (R). Barras = 100 µm (A, C, E, G, I, K, M, O, Q), 10 µm (B, D, F, H, J, L, N, P, R).

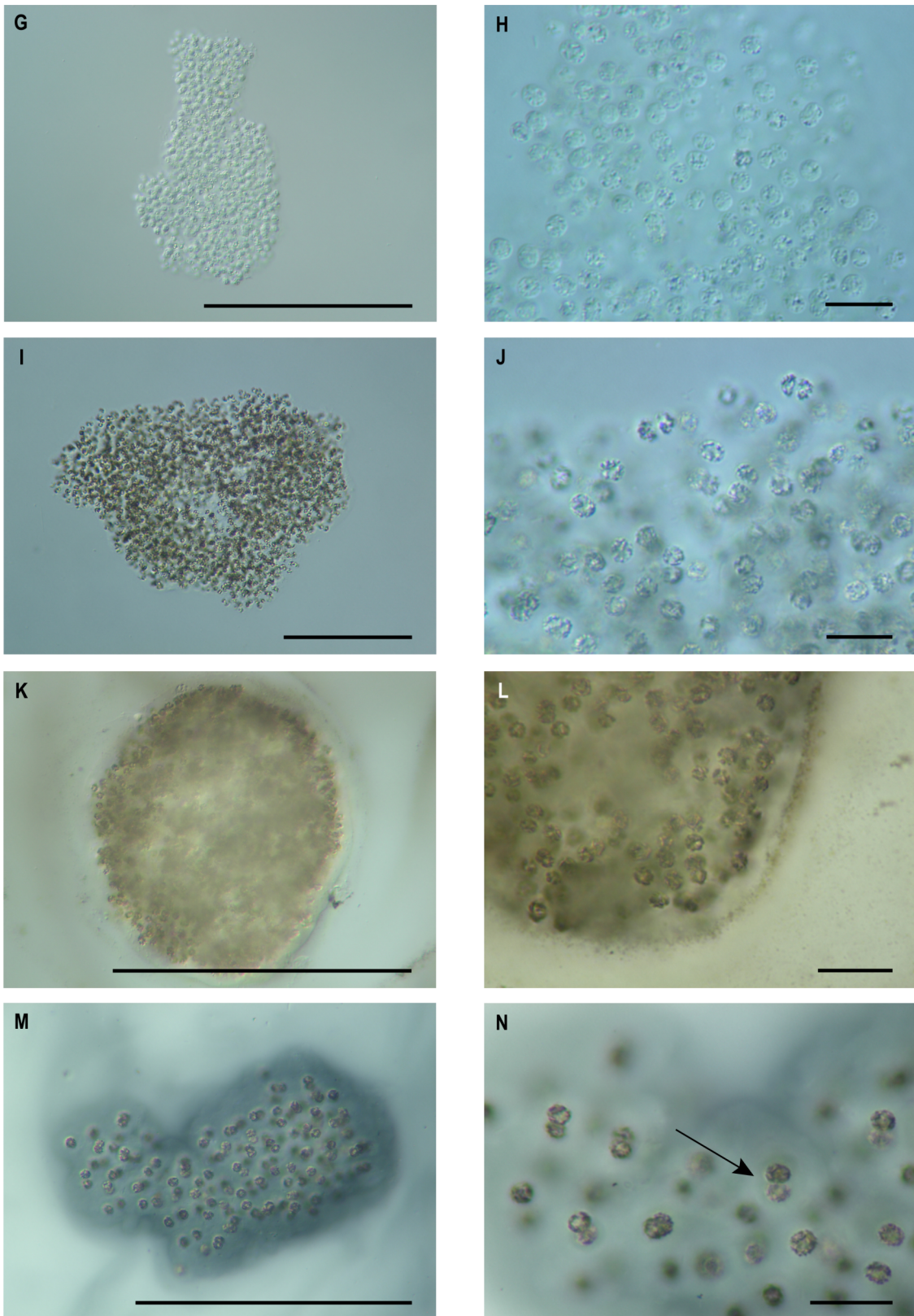


Figura 3. Continuación.

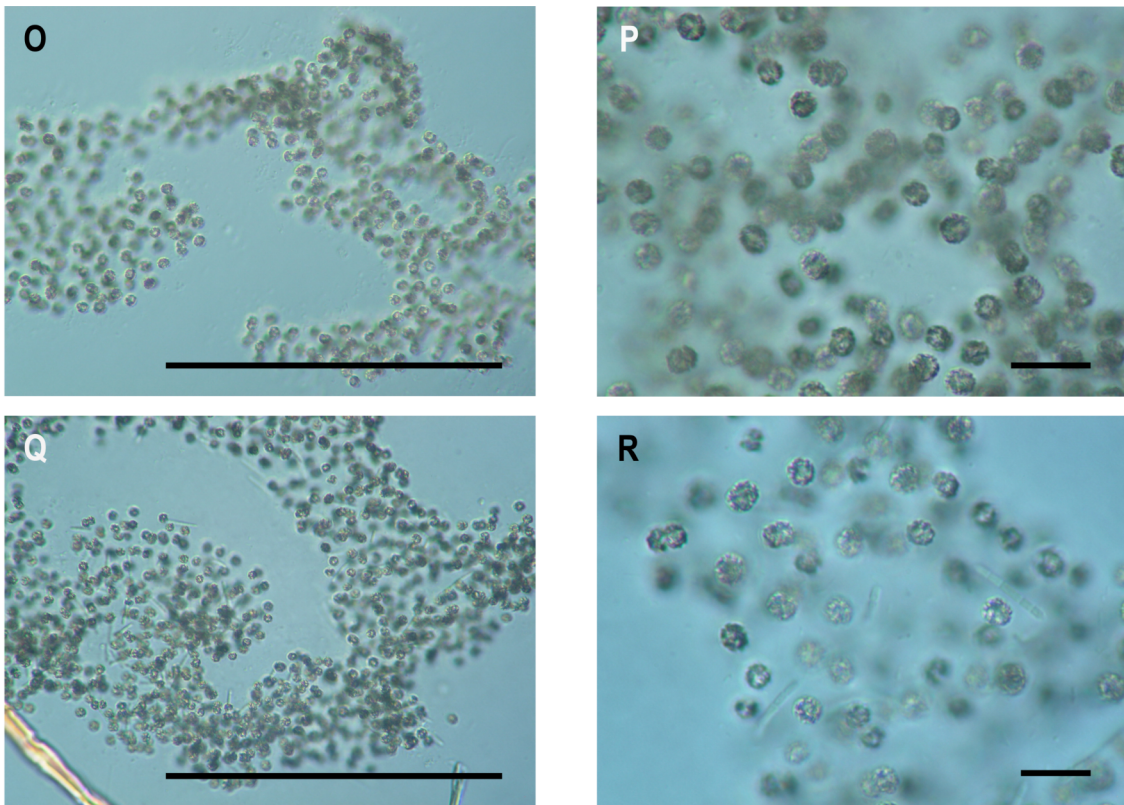


Figura 3. Continuación.

Notas: Otras especies de *Microcystis* también se han encontrado recientemente en sitios con un nivel de eutrofia mayor al del momento de su descripción, como *M. smithii*, que ha aumentado su frecuencia en sitios eutróficos de China, donde forma florecimientos (Liu et al., 2011).

***Microcystis protocystis* Crow 1923**

Figura 3M-N

Las colonias son pequeñas, amorfas, con vaina de consistencia difluente, amplia, fina y hialina, de color pardo a rojizo. Las células están laxamente dispuestas en la colonia, son de forma esférica y presentan una vaina individual que puede observarse después de la división. Las células están agrupadas en pares, y son de color verde azul a rojizo, con presencia de aerotopos. El margen de las colonias mide 3.3-9.9 μm y las dimensiones de las colonias 115 x 78 μm ; el diámetro de las células es de 3.3 μm .

Herbario: DFCh-5.3 (Fig. 3M-N).

Ecología: En Chapultepec, no en todas las colonias se lograron observar las vainas individuales de las células, sin embargo, la amplitud del margen y la disposición de las células en la colonia fueron elementos importantes para la identificación. En algunas colonias se observó una cianoprocarionte filamentosa embebida en el margen mucilaginoso, posiblemente *Pseudoanabaena voronichini* Anagnostidis; esta asociación se ha observado en cuerpos de agua de Brasil (São Paulo) (Komárek & Komárková, 2007), y parece ser frecuente también en lagos mexicanos (Tavera, no publicado).

Notas: Probablemente la distribución de esta morfoespecie sea principalmente pantropical (Komárek & Anagnostidis, 1999).

***Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing 1846**

Figura 30-R

= *Micraloa aeruginosa* Kützing 1833 sine typo; *Diplocystis aeruginosa* (Kützing) Trevisan 1848; *Clathrocystis aeruginosa* (Kützing) Henfrey 1856; *Microcystis ochracea* (Brand) Forti 1907 ?; *Anacystis cyanea* (Kützing) Donet et Daily 1952 p.p. excl. Typo; y otros numerosos.

Las colonias son grandes, alargadas, amorfas, comúnmente clatradas en forma de red con agujeros, con borde regular; la vaina es de consistencia difluente, sin estructura y hialina. El color de las colonias es pardo. Las células están dispuestas de apretada a laxamente, irregularmente y más o menos empaquetadas; su forma es esférica, sin vainas individuales, de color pardo, y con aerotopos. Las colonias pueden ser de tallas diversas, llegando a medir 380 x 203 μm . Las células presentaron un diámetro 3.5 μm , poco por debajo de lo descrito originalmente para la especie (Komárek & Anagnostidis, 1999).

Herbario: DFCh-5.3 (Fig. 30-R).

Ecología: En las colonias de Chapultepec no se pudo observar el límite del margen mucilaginoso. Por otro lado, el diámetro de las células fue menor al descrito para la especie (Komárek & Anagnostidis, 1999). Se observó la coexistencia de esta morfoespecie con *Microcystis panniformis*. Al igual que en *M. protocystis*, en el mucílago de algunas colonias se observaron filamentos de la cianoprocarionte *Pseudoanabaena voronichini* (Tavera, no publicado) (Fig. 9R).

Notas: Ocurre en aguas eutróficas y es de distribución cosmopolita a excepción de las regiones polar y subpolar (Komárek & Anagnostidis, 1999).

5.3 Densidad celular de *Microcystis* en el lago

La concentración de clorofila *a* se encontró en un intervalo de 4.65 a 95.70 $\mu\text{g l}^{-1}$ clorofila *a*, con un valor promedio de 42.90 $\mu\text{g l}^{-1}$ clorofila *a*. Las concentraciones del pigmento variaron hasta más de diez veces en puntos de muestreo adyacentes (punto 3 y 4, por ejemplo; Tabla 2). No se observó una correspondencia entre los valores de clorofila *a* y de densidad celular, es decir, que en el punto de muestreo donde se cuantificó la concentración más alta del pigmento no se encontró la mayor abundancia de células de *Microcystis* spp. y viceversa (Figura 4).

La Tabla 2 muestra que la densidad celular fue variable, superando en varios sitios el millón de células. Estos resultados indican una variación de hasta más de un orden de magnitud en puntos de muestreo muy cercanos entre sí. Estas diferencias se deben comúnmente a que las poblaciones son transportadas por el viento y tienden a acumularse en zonas particulares de los bordes del lago (Fastner et al., 1999).

Tabla 2. Concentración de clorofila *a* y densidad celular en cada punto de muestreo del Lago Mayor. Los datos de ambos parámetros se presentan en una misma tabla debido a la comparación con los estimados de Falconer et al. (1999) sobre los riesgos a la salud que representan los valores de densidad celular de cianoprocariontes^a.

Sitio	Concentración clorofila <i>a</i> ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Densidad celular (No. de células ml^{-1})	Riesgo a la salud por la densidad celular ^a
1	6.36	727 150	Moderado
2	75.80	1 260 200	Alto
3	63.50	924 150	Moderado
4	4.65	773 650	Moderado
5	5.15	3 419 650	Alto
6	77.70	191 600	Moderado
7	9.17	438 850	Moderado
8	18.00	585 500	Moderado
9	95.7	689 050	Moderado
10	73.00	1 058 650	Alto

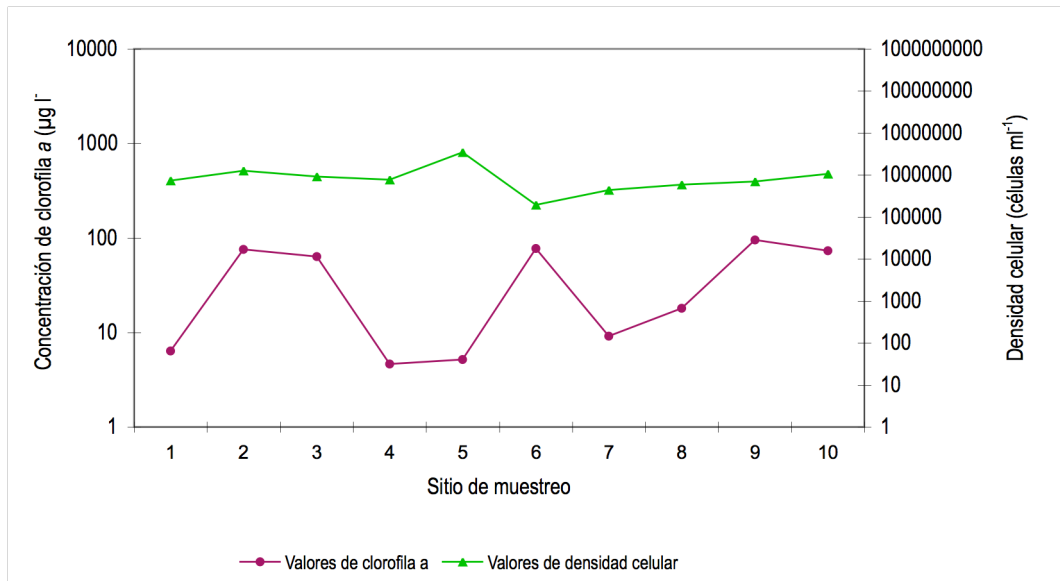


Figura 4. Correspondencia de la concentración de clorofila a y la densidad celular por sitio de muestreo.

5.3.1 Cálculo de la biomasa de *Microcystis* spp. en el lago

En la Tabla 3 se muestran los factores de conversión de biomasa obtenidos para las colonias de *Microcystis* observadas. Los valores de biomasa se expresan como microgramos de las células por gramo de poblaciones de cianoprocariontes, $\mu\text{g g}^{-1}$.

Tabla 3. Factores de conversión de biomasa para las colonias de *Microcystis* spp. contadas.

Figura geométrica	Factor de biomasa ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Esferas	637231.084
Cubos	1825778.790
Elipses	171449.033
Prismas	65458.512

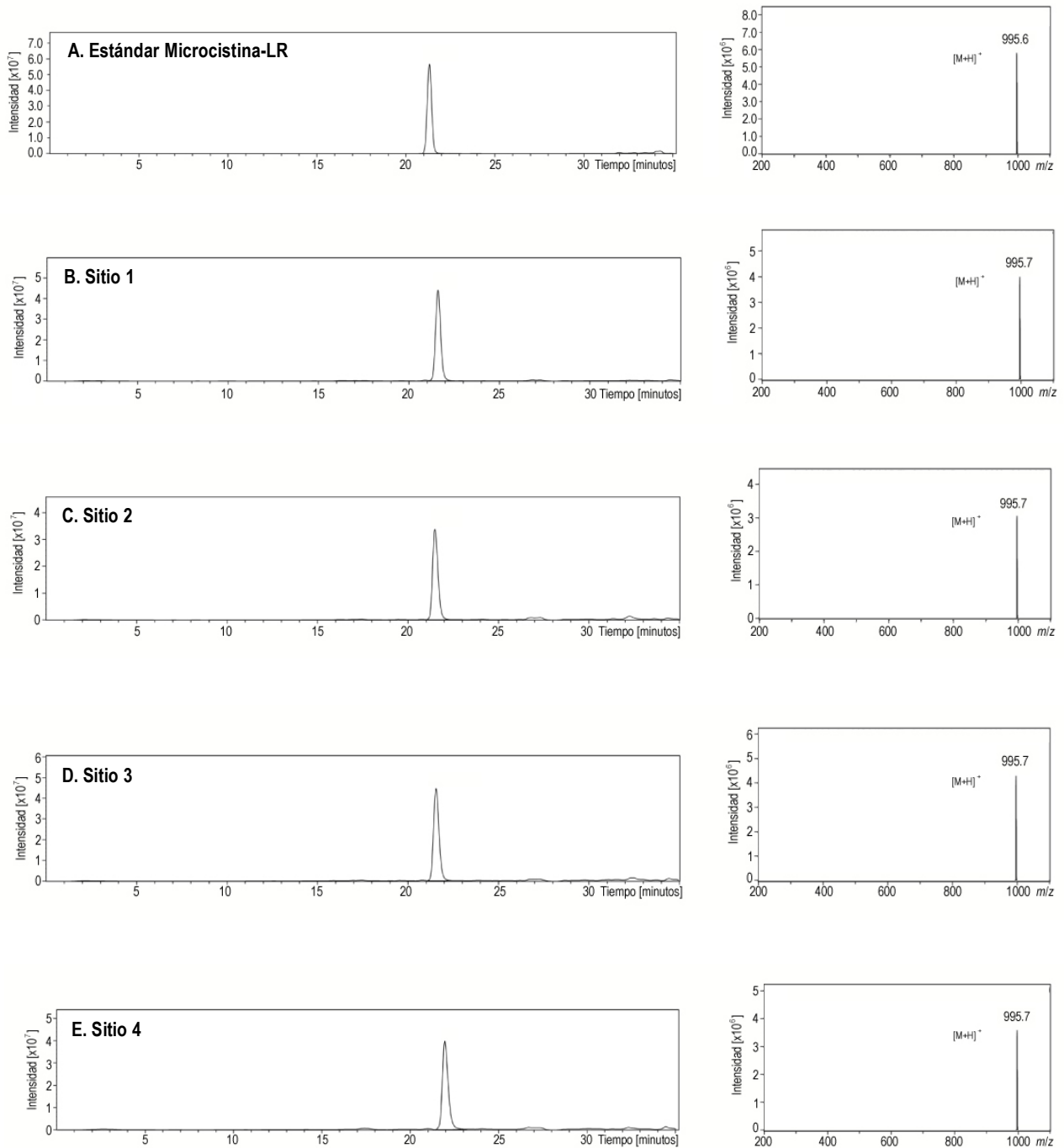


Figura 5. Separación y detección de la Microcistina-LR por HPLC-MS. Ionogramas y espectros de masas correspondientes del estándar comercial de Microcistina-LR (A) y de las muestras recolectadas del florecimiento del Lago Mayor (B-K). Los ionogramas representan la separación de la toxina en un tiempo de retención de 21.5 minutos aproximadamente mientras que el espectro de masas muestra la detección de la toxina a través del aislamiento del ion m/z 995 $[M+H]^+$.

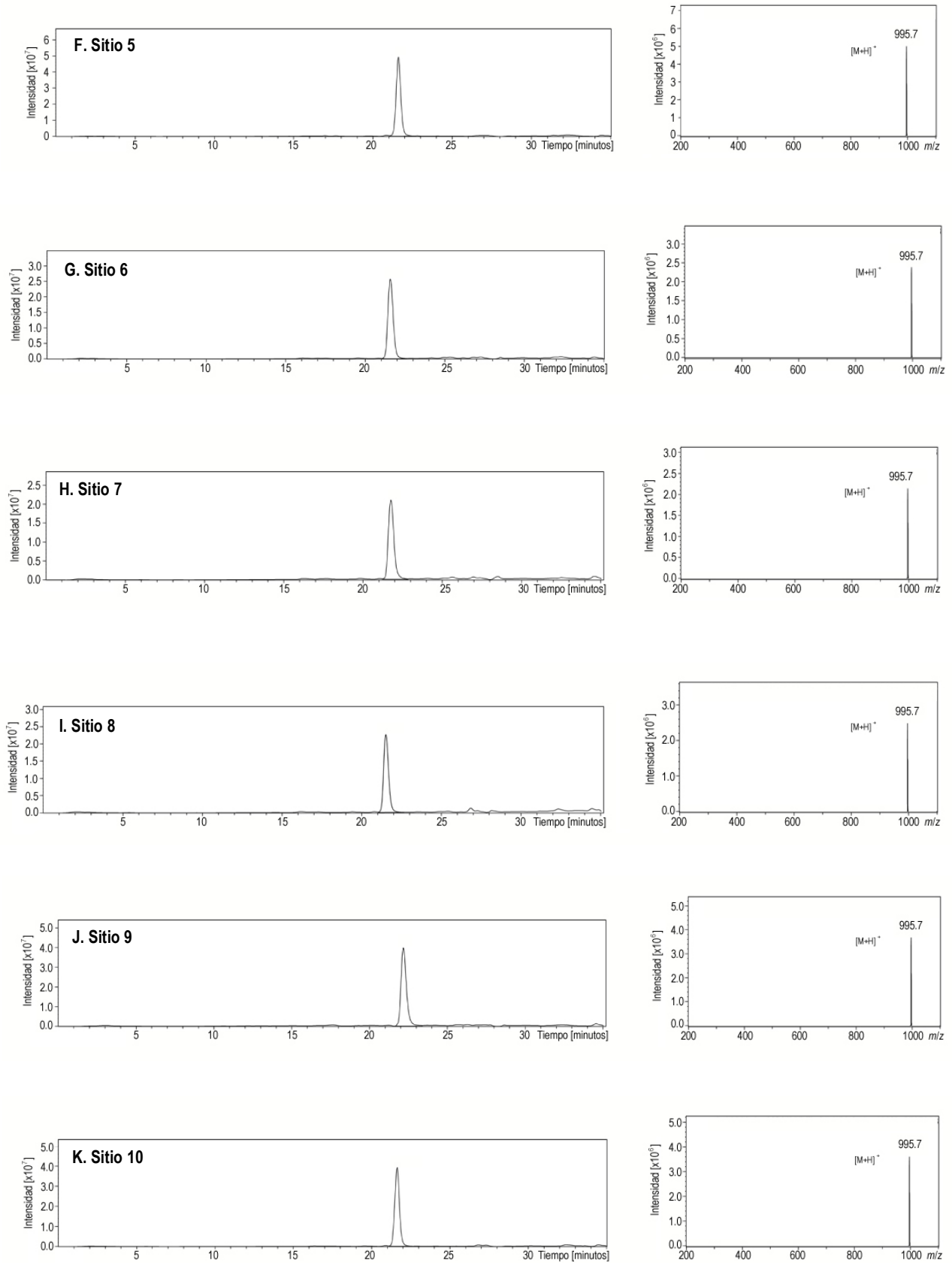


Figura 5. Continuación.

5.4 Cuantificación de la Microcistina-LR intracelular

Con el método de HPLC-MS (Tabla 13, ANEXO 6) se logró extraer y analizar la Microcistina-LR. De acuerdo con el tiempo de retención indicado por el estándar analítico, establecimos un tiempo de 21.5' para la Microcistina-LR (Figura 4A). Este valor comprobó que las cianoprocariontes que componen el florecimiento de Chapultepec en el lago contenían en su interior Microcistina-LR (Figura 5B-K) y fue la referencia para analizar nuestros datos.

Para hacer la cuantificación de la toxina se logró una calibración lineal en un intervalo de 10 a 60 ng de Microcistina-LR (Figura 6), dentro del que se encontraron las respuestas de todas las muestras analizadas (Figura 7). Con la curva de calibración obtenida ($R^2 = 0.9983$), se calculó la cantidad de Microcistina-LR en las muestras para luego expresarla como una concentración en gramos de peso seco, es decir, la cantidad de toxina por cantidad de biomasa seca de cianoprocariontes.

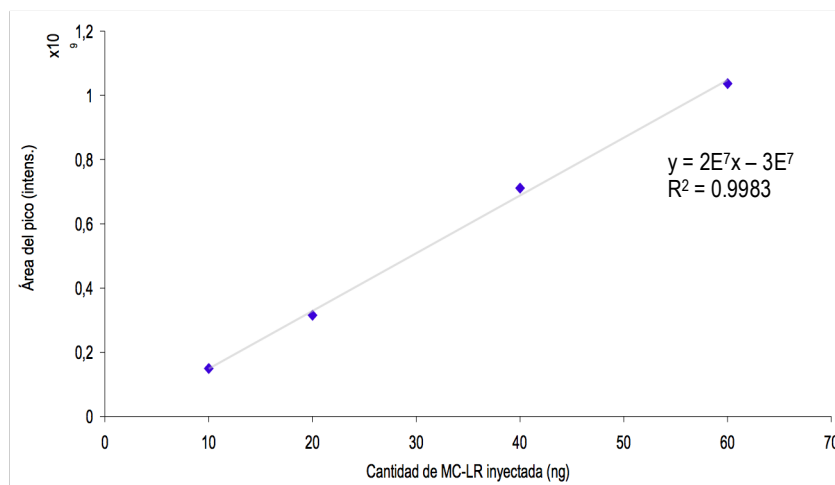


Figura 6. Gráfica de la calibración lineal de la Microcistina-LR. La cuantificación de la toxina en las muestras del fitoplancton se basó en la ecuación que se observa dentro del gráfico.

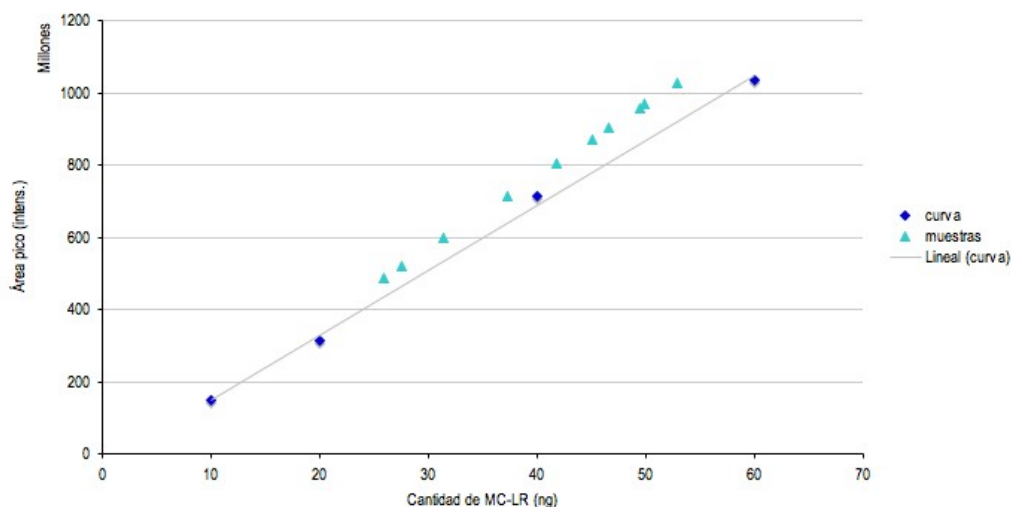


Figura 7. Localización de la concentración de Microcistina-LR de las muestras del Lago Mayor analizadas respecto de la curva de calibración lograda. Como se observa, todas las muestras analizadas se encontraron dentro de los valores de la curva de calibración construida.

Las concentraciones de Microcistina-LR intracelular se encontraron dentro de un intervalo de 25.87 a 93.27 $\mu\text{g g}^{-1}$ MC-LR, con un promedio de 53.65 $\mu\text{g g}^{-1}$ MC-LR. El valor más alto correspondió al sitio 4; la concentración más baja fue 25.87 $\mu\text{g g}^{-1}$ MC-LR, encontrada en el sitio 8. Solamente tres sitios se encontraron por arriba del valor promedio (Tabla 4). La tercera columna de la Tabla 4 muestra la concentración de Microcistina-LR que podría encontrarse en el agua en caso de que las poblaciones de cianoprocariontes equivalentes a un gramo de peso seco decayeran y liberaran su toxina al agua. Este cálculo tiene como objeto comparar la concentración de toxina en el Lago Mayor con el valor de referencia que establece la OMS para el agua potable, y representa una medida de la toxina potencialmente disponible para ser liberada al agua, no es una medida de la microcistina realmente disuelta en el agua.

En la Figura 8 se muestra la concentración de toxina respecto a la densidad celular encontrada en cada sitio de muestreo. En general se observó una correspondencia entre los dos parámetros, es decir que los valores de microcistina y densidad celular como peso fresco, correspondieron en su mayoría.

Tabla 4. Concentración de Microcistina-LR encontrada en las muestras del florecimiento. La concentración de Microcistina-LR está expresada como cantidad de toxina en microgramos por cada gramo de organismos (peso seco) y como concentración de toxina en agua, en caso de que el florecimiento decayera y la toxina se liberara*.

Sitio	Concentración MCLR ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Potencial concentración de MC- LR en agua ($\mu\text{g l}^{-1}$)*
1	90.10	2.31
2	74.49	1.02
3	49.41	0.85
4	93.27	1.50
5	52.82	1.31
6	31.39	0.38
7	27.50	0.28
8	25.87	0.26
9	49.87	0.41
10	41.79	0.34

Tabla 5. Concentración intracelular de Microcistina-LR en florecimientos de cianoprocariontes de países de distintas latitudes, comparados con México.

País	Región	Microcistina	Concentración MC-LR ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Referencia
Alemania ^c	Templada	MC-LR	30 – 1160	Fastner et al., 1999
Australia ^a	Subtropical	MC-LR	8000	Jones & Orr, 1994
Canadá ^b	Templada	MC-LR	1 – 1552	Kotak et al., 1995
Corea del Sur ^a	Subtropical	MC Totales	19 – 1489	Park, 2000
Dinamarca ^c	Templada	MC-LR	Máxima 2800	Maršálek et al., 2000
Finlandia ^a	Templada	MC-LR	< 10 – 900	Lahti et al., 1997
India ^a	Tropical	MC-LR	15 – 124; media 62	Prakash et al., 2009
Japón ^a	Subtropical	MC-LR	Máxima 890	Park et al., 1998
México (Chapultepec)^a	Tropical	MC-LR	25 – 90; media 53.65	Datos originales de este estudio
México (Zumpango) ^a	Tropical	MC-LR	29.82 – 816.86; media 195.40	Ortiz (comunicación personal)
República Checa ^c	Templada	MC-LR	Máximas 4800 y 5804	Maršálek et al., 2000
Sudáfrica ^a	Subtropical	MC Totales	5 – 415	Wicks & Thiel, 1990

^aLago urbano; ^bLago no urbano; ^cInformación no disponible.

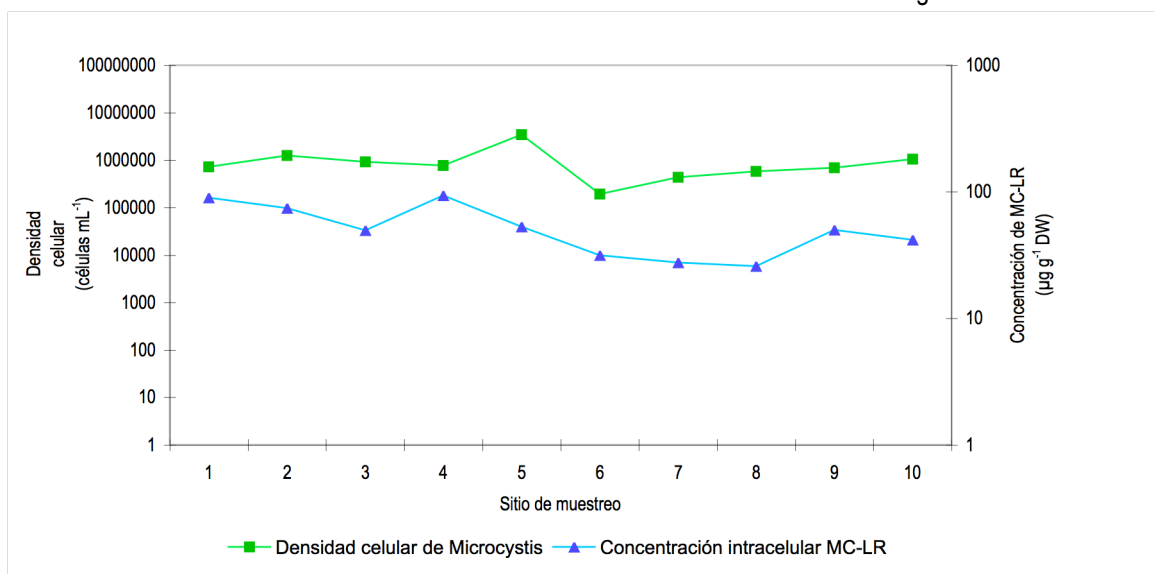


Figura 8. Distribución espacial de la densidad celular de *Microcystis* y la concentración de Microcistina-LR contenida en la biomasa del florecimiento, en octubre 2010.

5.5 Modelo de predicción de la Microcistina-LR intracelular

Antes de obtener el análisis de regresión lineal, examinamos la relación entre la concentración intracelular de Microcistina-LR y la biomasa de *Microcystis* y la concentración de clorofila *a*. Encontramos que la biomasa de *Microcystis* se correlacionó significativamente con la toxina, a diferencia de la clorofila *a*, que no tuvo una correlación significativa. Por lo tanto, la biomasa fue la única variable con la que se construyó el análisis de predicción.

El análisis de correlación de Pearson, mostrado en la Tabla 6, indicó que la concentración intracelular de Microcistina-LR está altamente correlacionada con la biomasa de *Microcystis* de manera positiva (0.901) y estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

Tabla 6. Correlaciones de Pearson entre las variables y su significancia de una vía.

		microcistinaLR	biomasa
Correlación de Pearson	microcistinaLR	1.000	0.901
	biomasa	0.901	1.000
Significancia (1 vía)	microcistinaLR	.	0.0005
	biomasa	0.0005	.

El modelo de regresión considera las relaciones entre las variables a utilizar: a través del valor Durban-Watson cercano a 2 (1.877), se comprobó que el modelo es viable, pues las observaciones experimentales de las variables son independientes entre ellas. Por otro lado, el coeficiente de determinación mostró que la variabilidad de la toxina puede ser explicada en $\approx 80\%$ por la biomasa de *Microcystis* ($R^2 = 0.813$, ver ANEXO 7). Ambos valores se muestran en la Tabla 7. El ANOVA de la regresión (Tabla 8) indicó una diferencia significativa entre las medias de las variables independiente y dependiente ($p < 0.001$), lo que señaló que la biomasa de *Microcystis* fue una variable adecuada estadísticamente.

Otra evaluación del modelo lo aportó el valor de t –valor que indica la probabilidad de que el coeficiente de una variable sea parte del modelo o deba eliminarse de este- y p, su significancia. Un valor alto de t y pequeño de p de la biomasa de *Microcystis* ($t = 5.888$; $p < 0.001$) sugirió que esta variable tuvo un gran impacto sobre la Microcistina-LR intracelular.

En la Tabla 9, la columna β corresponde a los coeficientes de regresión, que representan el efecto de la biomasa de *Microcystis* sobre la concentración intracelular de toxina. Los valores de estos coeficientes formaron la ecuación del modelo de predicción. El valor de la constante fue positivo, lo que indicó que la concentración de Microcistina-LR aumentará intracelularmente en 1.987 unidades cada vez que la biomasa de *Microcystis* aumente en 0.847 unidades.

El modelo de predicción teórico es el siguiente:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_{1i} + \beta_2 X_{2i} + \varepsilon_i \quad i = 1, \dots, 10;$$

en donde ε_i corresponde a los errores de las variables aleatorias, y los cuales se distribuyen normalmente, tienen una varianza constante y son independientes. El modelo estimado para el presente trabajo es:

$$\hat{Y}_i = \hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1 X_{1i}.$$

Por lo tanto el modelo ajustado es

$$\hat{Y} = 1.987 + 0.847 (X_1),$$

donde X_1 es el logaritmo de la biomasa de *Microcystis*. La ecuación resultante interpretada biológicamente es la siguiente:

$$\text{Concentración intracelular de MC-LR} = 1.987 + 0.847 (\text{biomasa } \textit{Microcystis})$$

Tabla 7. Resumen del modelo de predicción. Contiene valores de correlación entre los valores observados y los esperados por el modelo, así como la aportación explicativa de la variable predictiva a la variable dependiente.

Modelo	R	R Cuadrada	R Cuadrada Ajustada	Error Estándar del Estimado	Durbin-Watson
1	0.901	0.813	0.786	0.31985259378	1.877

Se resalta en negritas el valor más importante para el modelo.

Tabla 8. ANOVA de la regresión.

Modelo		Suma de Cuadrados	df	Media Cuadrada	F	Significancia
1	Regresión	3.547	1	3.547	34.673	0.005
	Residual	0.818	8	.102		
	Total	4.366	9			

Tabla 9. Coeficientes no estandarizados, coeficientes estandarizados y estadísticos de colinearidad para cada variable analizada.

Modelo		Coeficientes No Estandarizados			
		β	Error Estándar	t	Significancia
1	(Constante)	1.987	1.954	1.017	0.339
	biomasa	0.847	0.144	5.888	0.005

Tabla 10. Comparación de las características físicas, de estado trófico y de composición de florecimientos que albergan tres lagos urbanos y recreativos del centro de México.

Característica	Modelo (Lago Mayor)^a	Lago Tezozomoc^b	Lago de Zumpango^c
Naturaleza (origen)	Artificial	Artificial	Natural
Superficie	68 088 m ²	17 000 m ²	18 650 000 m ²
Profundidad	No profundo (2 m)	No profundo, mínima 0.5 m, máxima 2.10 m	No profundo (promedio 3 m)
Condición trófica	Eutrófico	Hipertrófico	Hipertrófico
Fuente de enriquecimiento por nutrientes	Abastecimiento con agua tratada	Abastecimiento con agua tratada	Fuentes de descargas de aguas residuales, actividad recreativa, acuacultura
Grupo de fitoplancton dominante	Cianoprocariontes	Cianoprocariontes y Clorofitas	Cianoprocariontes
Temporalidad de florecimientos	Anual	Temporal	Anual
Composición de los florecimientos	<i>Microcystis</i> spp.	<i>Microcystis</i> spp. (2003)	<i>Microcystis</i> spp. y <i>Planktothrix</i> spp. (año 2010)
Latitud	Tropical	Tropical	Tropical

^a Esta tesis. Tomado de: ^b Oliva et al. (2008); ^c Ortiz (comentario personal).

6. Discusión

La caracterización biológica del Lago Mayor se aborda en las dos primeras secciones. En la Sección 6.1 se discuten las condiciones del Lago Mayor que permiten el desarrollo de florecimientos de *Microcystis* tóxicas, y en la Sección 6.2, se discute la diversidad de *Microcystis* observada y se compara con la de otros lagos urbanos recreativos de México. En la Sección 6.3, se compara la concentración intracelular de Microcistina-LR encontrada, con la reportada en México y otros lagos del mundo. La Sección 6.4 muestra las implicaciones a la salud que representa el florecimiento de *Microcystis* por su alta densidad y la concentración de Microcistina-LR. Las últimas dos secciones corresponden al modelo de predicción. La Sección 6.5.1 muestra el proceso de elaboración del modelo, mientras que la Sección 6.5.2 contiene su interpretación biológica y aplicación tanto en el mismo Lago Mayor como en otros lagos urbanos recreativos.

6.1 El Lago Mayor es eutrófico y tiene un florecimiento de *Microcystis* spp.

Las condiciones microambientales medidas en el Lago Mayor corresponden a un lago eutrófico, condición verificada por el valor promedio de clorofila *a*, $42.90 \mu\text{g l}^{-1}$, que se encuentra dentro del intervalo establecido por la OCDE ($25 - 75 \mu\text{g l}^{-1}$ clorofila *a*) (Moreno et al., 2010). El pH alcalino y la presencia de abundantes poblaciones de cianoprocariontes toxigénicas también son características típicas de este tipo de lagos (Paerl, 1988; Howard, 1994; Rantala et al., 2006).

El término florecimiento se ha usado para describir crecimientos masivos de cianoprocariontes y algas que generalmente se presentaban estacionalmente (Paerl, 1988). En la actualidad se ha visto que estos crecimientos masivos pueden mantener las densidades altas todo el año (Te & Gin, 2011). El lago que hemos estudiado presenta también estos crecimientos masivos durante todo el año y nos referiremos a ellos como florecimientos, en el mismo sentido que se aplica el término actualmente, a nivel mundial. En el caso de esta tesis, también al igual que en otros florecimientos de zonas subtropicales y templadas, el florecimiento del Lago Mayor está compuesto por unas cuantas especies de *Microcystis*.

El valor promedio de densidad celular permitió confirmar que las poblaciones de *Microcystis* spp. se encuentran formando un florecimiento, pues superan la cifra de cien mil células ml^{-1} sugerida por Paerl (1988). Como se muestra en la Tabla 2, las densidades celulares de *Microcystis* spp. son altamente variables, al comparar los valores entre sitios es claro que podrían aumentar al menos en un orden de magnitud, de miles a millones de células por mililitro; esta diferencia es de tan sólo de unos metros de distancia entre un sitio y otro, y esta condición puede variar en momentos determinados del día (Falconer et al., 1999).

De acuerdo con la literatura, más del 65% de los florecimientos de cianoprocariontes producen microcistinas por lo que se consideran tóxicos (Sivonen & Jones, 1999); incluso se ha llegado a asumir que cualquier florecimiento compuesto por cianoprocariontes es en realidad tóxico a menos que se demuestre lo contrario (Fastner et al., 1999). No obstante, la documentación de la diversidad de las cianoprocariontes en los crecimientos masivos es un proceso de gran importancia toxicológica, pues la abundancia relativa de cada especie puede dar un indicio del peligro potencial que representa el florecimiento (Sección 6.2). A pesar de que la formación de crecimientos masivos de cianoprocariontes trae consigo la disminución de las actividades recreativas debido al impacto desagradable que causan las natas, lo que representa la mayor preocupación son los niveles de microcistinas que pueden contener y liberar (Newcombe, 2009) (Sección 6.4).

6.2 Diversidad de *Microcystis* en el florecimiento del Lago Mayor y en otros lagos urbanos recreativos de México

Las condiciones microambientales del Lago Mayor, entre ellas la temperatura, el pH y el nivel de eutrofia pueden explicar la presencia del florecimiento de *Microcystis* (Segura et al., 2010), pues los crecimientos masivos de cianoprocariontes en general son comunes en lagos eutróficos e hipereutróficos (Chorus & Bartram, 1991; Paerl, 1988) especialmente en latitudes tropicales.

En el Lago Mayor se observó la presencia de cinco morfoespecies de *Microcystis* (Sección 5.2). En el caso de *M. cfr. ichthyoblabe*, su identidad es dudosa puesto que la existencia de esta morfoespecie no ha sido comprobada en países tropicales (Komárek & Anagnostidis, 1999; Komárek et al., 2002). La presencia de colonias de morfología y dimensiones similares a dicha morfoespecie muestra que en Chapultepec se pueden desarrollar formas de *Microcystis* spp. que se asemejan a aquellas documentadas en cuerpos de agua oligotróficos de latitudes distintas

(Komárek & Anagnostidis, 1999). A excepción de esta morfoespecie, las demás han sido observadas anteriormente en el Lago Mayor y en el lago de la primera sección de Chapultepec, así como también en diversos cuerpos de agua del centro y sur del país, incluyendo ríos, lagos, reservorios y ambientes volcánicos (Alcocer et al., 1988; Komárek et al., 1996; Komárek & Komárková, 2002; Moreno et al., 2008; Vasconcelos et al., 2010).

Las morfoespecies encontradas en el lago de Chapultepec han sido reconocidas como productoras de microcistinas. En el caso de *M. cf. ichthyoblabe*, esto se ha observado recientemente en florecimientos en Marruecos (Sabour et al., 2002), y para *M. protocystis*, aunque algunos reportan la ausencia de microcistinas (Bittencourt Oliveira et al., 2009), hay estudios que indican que es una especie tóxica (Komárek et al., 2001), por lo que su situación toxicológica requiere más investigación.

En otros lagos urbanos mexicanos se han observado las morfoespecies de cianoprocariontes que registramos en el Lago Mayor. En el lago Tezozomoc, se ha reportado a *M. cf. botrys* como especie constante y a *M. cf. flos-aquae* como rara. En el Lago de Zumpango (Estado de México), de origen natural, se han observado florecimientos mixtos compuestos por *M. aeruginosa*, *M. protocystis* y *Planktothrix isoethrix* durante la época de secas, aunque existe la posibilidad de su presencia durante periodos más prolongados (Ortiz et al., 2010).

El reconocimiento y documentación de la diversidad de cianoprocariontes toxigénicos es un proceso de gran importancia, pues es posible crear una herramienta útil para conocer el peligro potencial de los florecimientos, ya que algunas especies son reconocidas por ser altamente tóxicas, como *M. aeruginosa*, o por no producir microcistinas, como *M. wesenbergii* (Xu et al., 2008). De aquí que se considere importante la observación microscópica de las poblaciones de los florecimientos como una medida decisiva para continuar o no con estudios de la estimación de la Microcistina-LR y la implementación de medidas de seguridad que restrinjan la actividad recreativa en los lagos, en caso de ser necesario.

Desde una perspectiva biológica, es interesante considerar que hasta el momento, la taxonomía de las especies de *Microcystis* está basada en caracteres morfológicos de organismos de latitudes templadas. Precisamente por razones de identidad, las distintas morfoespecies observadas durante el trabajo presente se describieron cuidadosamente para que en un futuro, cuando se sume el uso de técnicas

moleculares, se determine, en primer lugar, si se trata de especies genéticamente distintas entre sí o si son variaciones morfológicas de una misma especie.

Pensamos que nuestro trabajo incide en la cultura de la población aunque no se trate de especialistas, pues aumentan su conocimiento sobre los riesgos a la salud implícitos al realizar actividades recreativas en lagos urbanos eutróficos. Por esta razón, este trabajo muestra que los estudios que abordan el aspecto biológico y toxicológico de los florecimientos de cianoprocariontes son una inversión con beneficios importantes en la salud y bienestar de la población y en la conservación de los espacios recreativos.

6.3 Concentración intracelular de Microcistina-LR en el Lago Mayor y en otros lagos urbanos alrededor del mundo

Los valores de concentración intracelular de Microcistina-LR y de densidad celular del florecimiento encontrados variaron espacialmente pero no tuvieron correspondencia (Figura 8), pues donde se encontró la mayor concentración de toxina, la densidad celular no fue la más alta, como podría esperarse. De acuerdo con Sivonen & Jones (1999), este comportamiento significa que podría haber una variación de la cantidad de toxina por biomasa de cianoprocariontes independientemente de los cambios en el tamaño de la población de estos microorganismos, debida posiblemente a un contenido distinto de toxina por célula, o bien al cambio en la cuota de la toxina⁵ en una proporción de hasta cinco veces en respuesta a cambios en las condiciones microambientales (Sivonen & Jones, 1999). Además la cantidad de MC que se detecte variará en función de la composición de especies de una localidad de acuerdo con Ozawa et al. (2005). Esto es importante aún cuando la diferencia entre especies-morfoespecies aún no esté bien establecida en la literatura (Otsuka et al. 2001) porque puede afectar la cantidad de toxina que se registre. Claramente un estudio toxicológico debe incorporar una caracterización taxonómica de los organismos que producen las toxinas.

La concentración intracelular de Microcistina-LR se comparó con la encontrada por Ortiz (comunicación personal) en el Lago de Zumpango. Este estudio tuvo en común con la presente tesis el periodo de recolección de muestras y el análisis y cuantificación de la Microcistina-LR, y nos permitió comprender lo que puede estar

⁵ La cuota de toxina es la cantidad de toxina dentro de una célula.

ocurriendo en ambos lagos. En Zumpango, la concentración promedio de Microcistina-LR fue más de tres veces superior que en Chapultepec ($195.40 \mu\text{g MC-LR g}^{-1}$ y $53.65 \mu\text{g MC-LR g}^{-1}$, respectivamente) (Tabla 5); esta diferencia puede deberse a factores biológicos y/o ambientales. Dentro de los primeros, sugerimos que las morfoespecies del florecimiento mixto de Zumpango en el que codominan especies de *Microcystis* y *Planktothrix*, pueden producir en conjunto más cantidad de Microcistina-LR que las morfoespecies de *Microcystis* del Lago Mayor, independientemente de la abundancia celular total, ya que en este último lago, la densidad celular superó por más de dos veces a la de Zumpango ($1\ 006\ 800$ y $387\ 490$ células ml^{-1} , respectivamente). En cuanto a las condiciones ambientales, una mayor irradiación, temperatura y condición hipertrófica en Zumpango (a diferencia de la eutrófica del Lago Mayor; de acuerdo con datos de clorofila *a*), podrían favorecer el desarrollo de una mayor proporción de cepas tóxicas, o bien, una mayor producción de toxinas (Rapala et al., 1997; Sivonen & Jones, 1999; Ortiz, comunicación personal). Sin embargo, estas posibles explicaciones son sólo hipótesis ya que en realidad no conocemos qué factores ambientales disparan la producción de microcistina en el Lago Mayor y por lo tanto en lagos urbanos pequeños, para lo cual se necesitaría un estudio a largo plazo y la determinación de un mayor número de variables particulares reconocidas ampliamente por tener influencia en la producción y/o regulación de las microcistinas, como el fósforo y las formas inorgánicas disueltas del nitrógeno (Watanabe & Oishi, 1985; Zheng et al., 2004; Rantala et al., 2006; Li et al., 2007; Jähnichen et al., 2011).

Al comparar el contenido de toxina de las cianoprocariontes del Lago Mayor con otros cuerpos de agua, algunos de ellos urbanos, de regiones tropicales, subtropicales y templadas y de los que existe información de concentraciones intracelulares de Microcistina-LR, nos damos cuenta de que la concentración en el Lago Mayor es semejante a la registrada recientemente en India, cercano a $100 \mu\text{g g}^{-1}$ MC-LR (Prakash et al., 2009); no obstante, la concentración máxima en Chapultepec es superada de cinco a diecisiete veces por lagos de países como Sudáfrica, Finlandia, Japón, Alemania y Canadá; y de treinta a noventa veces por lagos en Dinamarca, República Checa y Australia, cuya concentración máxima ha sido $2\ 800 - 8\ 000 \mu\text{g g}^{-1}$ MC-LR (Tabla 5). Estas diferencias en los valores sugieren que las poblaciones de *Microcystis* spp. de Chapultepec producen menor cantidad de toxina, es decir, que son menos tóxicas, durante la época se secas, en comparación con otras regiones del mundo.

No hay elementos suficientes para explicar las variaciones de la concentración intracelular de microcistinas, en parte porque no hay información equitativa para comparar entre lagos y porque en México apenas hemos iniciado estos estudios, por ejemplo en Chapultepec y Zumpango. Requerimos ampliar el estudio al menos a la temporada de lluvias y tal vez a periodos mayores al anual. Sin embargo, comparando lo que se conoce de lagos de latitudes tropicales y subtropicales (Tabla 14, ANEXO 6), podríamos suponer que en Chapultepec la concentración de Microcistina-LR se mantiene más o menos constante a lo largo del año, si la composición de morfoespecies se mantiene estable, pues estudios en lagos hipertróficos con florecimientos de *Microcystis* han encontrado que la composición de especies está relacionada con la variabilidad de la concentración intracelular de microcistinas (Park et al., 1998; Ozawa et al., 2005). De acuerdo con Wicks & Thiel (1990), la temperatura también influye pues encontraron que cuando se mantiene constante se registran valores similares de microcistina, de modo que si la temperatura en el Lago Mayor se mantuviera constante podríamos esperar que cuando registremos los mismos valores de temperatura encontrados en este trabajo registraríamos concentraciones de toxina similares.

6.4 Riesgos a la salud

Según los resultados encontrados en este trabajo hay implicaciones a la salud relacionadas tanto con la densidad como con la concentración de Microcistina-LR intracelular, discutidas en este orden. Para cada parámetro existe una base distinta para definir su nivel de riesgo a pesar de que están cercanamente relacionados.

El cambio de densidad celular de cianoprocariontes toxigénicas implica el cambio de la concentración potencial de microcistina intracelular. La acumulación de natas con alta densidad celular, representa una concentración de toxinas, así que incluso en la densidad celular más baja encontrada en Chapultepec puede haber peligro para la salud al concentrarse las natas en las orillas, pues son los sitios más utilizados por personas y mascotas (Newcombe, 2009).

Las microcistinas se pueden cuantificar en el interior de las células o fuera de ellas - es decir en el agua-, dependiendo del objetivo del estudio. Con los valores de toxina intracelular se conoce la concentración en el florecimiento, la cual en un momento dado será liberada al agua (Fastner et al., 2000); por lo tanto con esta cuantificación se estima el riesgo *potencial* que representa el florecimiento. En cambio, la cuantificación de microcistina en el agua se utiliza para conocer el riesgo

actual que tiene la gente al tener contacto con el agua o después de ingerirla como agua potable. Es decir, la estimación puede ser válida para periodos no mayores a veinte días, porque una vez liberadas en el agua, las microcistinas comienzan a ser degradadas por agentes biológicos y del medio ambiente de los que depende su permanencia, estimada en un intervalo de cinco a veinte días de acuerdo con las condiciones particulares de cada lago (Sivonen & Jones, 1999).

En general, es común que la concentración de microcistinas contenida dentro de las células sea más alta que la que puede estar en el agua (Fastner et al., 1999; Akin-Oriola & Lawton, 2005), debido a que dentro de las células, las toxinas permanecen intactas mientras que en el agua se degradan paulatinamente de manera natural (Sivonen & Jones, 1999). Los niveles de toxina intracelular representan el problema más importante (Newcombe, 2009) ya que podrían multiplicarse en cada momento en tanto las poblaciones de cianoprocariontes se acumulen.

Falconer et al. (1999) sugirió tres niveles de riesgo a la salud a los que estarían expuestos los usuarios de cuerpos de agua que tienen poblaciones importantes de cianoprocariontes toxigénicas, en particular del género *Microcystis*. Dichos niveles están basados en el potencial aumento de la concentración de microcistinas en el agua en función del aumento de la abundancia de células y su equivalencia en concentración de clorofila *a*. Como se mencionó en la Sección 5.3, en el Lago Mayor, los valores de densidad celular y clorofila *a* no presentaron el mismo comportamiento entre los puntos de muestreo, y tampoco están dentro de las equivalencias de los mismos parámetros, propuestas por Falconer et al. (1999). Sin embargo, la comparación de concentración de microcistina con el trabajo de Falconer et al. (1999) no es posible porque sus determinaciones fueron hechas en el agua. Entonces, sólo podríamos comparar con base en las densidades celulares de *Microcystis* entre su trabajo y el nuestro.

De acuerdo con las cifras de abundancia de Falconer et al. (*op. cit.*), el florecimiento de *Microcystis* del Lago Mayor puede pasar de un nivel de riesgo *moderado* a *alto*, pues en algunos de los sitios se superó el millón de células por mililitro que representa el nivel *alto* de riesgo a la salud (Tabla 2).

La concentración esperada (potencial) de Microcistina-LR que se encontraría por litro de agua del lago después de la muerte del florecimiento (Tabla 4, columna 3), en promedio representó $0.866 \mu\text{g l}^{-1}$ MC-LR. Este valor se encuentra muy por debajo de aquel señalado por la OMS (WHO, 2003) para aguas recreativas ($20 \mu\text{g l}^{-1}$

MC-LR) pero se aproxima al establecido para las fuentes de consumo humano ($1 \mu\text{g l}^{-1}$ eq. MC-LR⁶); de hecho, en cuatro de los puntos de muestreo se superó dicho valor. Esto quiere decir que en el Lago Mayor, no encontramos niveles de toxina en el agua que representen alta peligrosidad, pues no es de abastecimiento; sin embargo, dadas las actividades que se realizan, existe la posibilidad de casos de dermatitis, afecciones en el tracto respiratorio por aspirar las microcistinas como aerosol o problemas gastrointestinales como diarrea por ingestión accidental mínima, en el caso de personas o mascotas que llegasen a nadar. Las altas poblaciones de *Microcystis* spp. en Chapultepec muestran que la calidad del agua debe mejorarse para que las densidades poblacionales disminuyan. No podemos dejar de advertir que aún no está estudiada la respuesta de toxicidad de un organismo como el humano a los contactos accidentales que describimos aquí, en términos de frecuencia y tolerancia de una manera estudiada formalmente. Sin embargo, se ha documentado ampliamente la toxicidad aguda que las microcistinas causan en ratones, a través de bioensayos toxicológicos. Se conoce que las microcistinas son diez veces más tóxicas cuando se administran vía intraperitoneal que vía oral (van Apeldoorn et al 2007), debido a que la primera es una inyección muy cercana al hígado, el órgano blanco; mientras que en la vía oral, las microcistinas recorren el tracto digestivo y sufren degradación por proteólisis antes de llegar al hígado (Takenaka, 1998).

6.5.1 Construcción del modelo de predicción de la Microcistina-LR

Inicialmente, nuestro objetivo fue hacer un modelo con la biomasa de *Microcystis* y la concentración de clorofila *a* como variables predictivas de la concentración intracelular de Microcistina-LR. En el primer caso, la relación de predicción puede ser evidente, pues mientras más biomasa de *Microcystis* se acumule en los bordes del Lago Mayor, por ejemplo, mayor será la concentración de Microcistina-LR (ver Figura 11A en ANEXO 6). Por otro lado, consideramos que la clorofila *a* también estaría relacionada con la toxina, porque ambos compuestos están involucrados en la fotosíntesis (Sevilla et al., 2012), porque su biosíntesis aparentemente corresponde con respuestas alternativas de la célula (ver Figura 11B en ANEXO 6). Sin embargo encontramos que la clorofila *a* no fue una variable adecuada porque

⁶ Las letras eq. en $1 \mu\text{g l}^{-1}$ eq. MC-LR significa "equivalentes" de Microcistina-LR, y quiere decir que este valor fue calculado para esa toxina por ser la más peligrosa, pero se aplica también a las microcistinas en general. El término es un acercamiento que podría resultar en una estimación del peor caso de concentración de microcistina (Falconer et al., 1999). En HPLC y ELISA se utiliza este término.

no se correlacionó significativamente con la Microcistina-LR. Los resultados del análisis de regresión con las tres variables se describen a continuación.

La correlación de Pearson entre la clorofila *a* y la Microcistina-LR fue negativa y no significativa (Pearson = -0.462; $p = 0.89$), lo que es biológicamente consecuente porque la microcistina es un producto de la fotosíntesis (Sevilla et al. 2012) y aunque el coeficiente de determinación de la regresión fue alto, los valores de Pearson (R^2 ajustada = 0.825, ver ANEXO 7) y del estadístico de *t* no fueron significativos. Estos resultados sugirieron la conveniencia de eliminar esta variable de la construcción del modelo.

Probablemente el pequeño número de puntos muestreados fue el factor limitante que impidió observar una relación entre la clorofila *a* y la toxina, por lo que si se aumentara el número de sitios a estudiar, tal vez se observaría la tendencia esperada del comportamiento de la Microcistina-LR ante la clorofila *a*; de esta manera, podría incluirse como variable predictiva.

El modelo fue más sencillo utilizando sólo la biomasa de *Microcystis* spp., pero fue robusto (estadísticamente significativo). Al eliminar la clorofila *a*, el coeficiente de determinación fue menor ($R^2 = 0.813$, ver ANEXO 7) pero mostró que la sola biomasa podía explicar, igualmente, más del 80% de la variabilidad de la toxina intracelular. Es conveniente resaltar que el número de sitios reducido no fue aparentemente una limitante para correlacionar la biomasa y la microcistina.

6.5.2 Interpretación del modelo de predicción de la Microcistina-LR a partir de la biomasa.

El análisis de regresión de los resultados de este trabajo permitió construir un modelo cuya interpretación estadística se presenta en detalle en el ANEXO 7. Este modelo arroja lo siguiente: en un estudio realizado en época de secas en el Lago Mayor de Chapultepec, en el que se analizaron diez sitios, el florecimiento de *Microcystis* contiene Microcistina-LR intracelular, la cual está correlacionada de forma directa y estadísticamente significativa, con la biomasa de *Microcystis*. Esto quiere decir que la concentración de la Microcistina-LR irá en aumento en tanto la biomasa de las especies de *Microcystis* se incremente. La evaluación de este parámetro indicaría si es posible esperar una concentración alta o baja de Microcistina-LR intracelular en el florecimiento, que podría quedar eventualmente disponible en el cuerpo de agua.

La relación entre la biomasa de *Microcystis* spp., y la concentración de toxina intracelular encontrada en el presente estudio también se ha observado en numerosos cuerpos de agua eutróficos e hipereutróficos, templados y tropicales, la mayoría también urbanos urbanos (Kotak et al., 1995; Welker et al., 1999; Znachor et al., 2006; Te & Gin, 2011). No obstante, existen casos de florecimientos subtropicales de especies de *Microcystis* y *Anabaena* donde esta relación no se ha encontrado (Zheng et al., 2004), o bien de florecimientos de *Microcystis* y *Planktothrix* en latitudes templadas donde la relación es negativa, hecho atribuido a la dominancia de cepas no-tóxicas en condiciones ambientales óptimas y de cepas tóxicas en condiciones subóptimas (Wicks & Thiel, 1990; Welker et al., 2003; Akcaalan et al., 2006). En este contexto, el modelo construido aquí no es absoluto en el sentido que es aplicable sólo a Chapultepec y sólo a la época seca, mientras no exista un estudio de la época de lluvias; sin embargo se considera válido para la época de secas en otros lagos con características similares a las del Lago Mayor, es decir, lagos pequeños, urbanos, tropicales, someros, con concentración de nutrimentos presumiblemente estable, y donde existan florecimientos dominados por morfoespecies toxigénicas de *Microcystis* (Kotak et al., 1995).

Los estudios amplios son importantes. Por ejemplo en lagos naturales, de mayor superficie, con numerosas fuentes que contribuyen a su eutrofización y con florecimientos mixtos, la aplicación de un modelo sencillo como el del Lago Mayor arrojaría resultados erróneos, como lo observó Ortiz (comunicación personal) en el Lago de Zumpango (Tabla 10), en donde, la relación entre la concentración intracelular de toxina y la densidad celular no puede calcularse a través de un análisis de regresión lineal. Esto sugirió a Ortiz la necesidad de un estudio más extenso en tiempo y espacio (comunicación personal).

El modelo construido se puede considerar una herramienta de alerta temprana ante los niveles potencialmente altos de toxina que pueden liberar poblaciones densas de cianoprocariontes en un momento dado, y en caso necesario, reservar el análisis químico de microcistinas, que es muy costoso, a casos especiales. Consideramos que esta es una aportación valiosa de este trabajo. A pesar de algunas limitaciones de infraestructura que no permitieron analizar un mayor número de muestras, consideramos que los resultados cumplieron con los objetivos buscados, y contribuirán además a elaborar programas de control basados en predicciones con respaldo formal, lo cual podría ser importante dentro de los planes de cuidado del medio ambiente de las autoridades locales.

Nuestros resultados respaldan la idea de que para predecir la concentración intracelular de microcistinas en un florecimiento de cianoprocariones no es requisito contar con un presupuesto muy alto, pero sí es necesario conocer a las especies de cianoprocariones tóxicas para cumplir los objetivos buscados.

7. Conclusiones

De entre los escasos trabajos que se han encargado de cuantificar las microcistinas en florecimientos de cianoprocariontes toxigénicos en nuestro país, el presente trabajo es el primero en cuantificar la concentración de Microcistina-LR dentro de las células que componen un florecimiento de especies de *Microcystis* de un lago urbano típico en México. No obstante, se suma a la lista de aquellos estudios que muestran que la presencia de florecimientos es una condición común en los cuerpos de agua urbanos recreativos o de abastecimiento de agua de la zona central del país. En el primer tipo de lagos, es importante que la cuantificación de microcistinas se haga intracelularmente por las implicaciones a la salud que tiene el contacto directo con las masas de cianoprocariontes que se acumulan en la superficie y en los bordes (Falconer et al., 1999; Fastner et al., 1999).

El Lago Mayor es un lago urbano típico (de acuerdo con Barica (1992)) y eutrófico cuyas condiciones climáticas locales y de calidad de agua, además de su poca profundidad, resultan ideales para el desarrollo de florecimientos tóxicos de *Microcystis* spp. (Segura et al., 2010). En la literatura se ha reconocido que, a excepción de *M. protocystis* (cuyo caso es discutido), las morfoespecies que componen el florecimiento documentado en esta tesis producen microcistinas, siendo, de acuerdo con la literatura, *M. aeruginosa* la especie más tóxica. La identificación de las morfoespecies, además de revelar la diversidad de cianoprocariontes, debe fungir como un primer vistazo de la situación de peligrosidad potencial en el cuerpo de agua, ya que con el descubrimiento de abundantes poblaciones de cianoprocariontes toxigénicas, las medidas a tomar a continuación serían, por un lado, el seguimiento del fitoplancton y por otro la interrupción del uso recreativo hasta observar la disminución de las poblaciones de las cianoprocariontes; o en caso contrario, continuar con las medidas anteriores y añadir la cuantificación de las microcistinas.

El acercamiento biológico y toxicológico de este trabajo permitió elaborar una herramienta con la que se puede estimar la concentración intracelular potencial de Microcistina-LR en florecimientos de *Microcystis* spp. del Lago Mayor de la segunda sección de Chapultepec y posiblemente en otros lagos con características similares. Por esta alta aplicabilidad, el modelo representa una aportación sumamente importante de este trabajo. El objetivo final del modelo es contribuir con la construcción de planes de manejo dirigidos a la remediación y conservación de los

lagos, con la premisa de reducir los riesgos a la salud. La ventaja que tiene el modelo es que está basado en parámetros que son de fácil obtención y bajo costo para cualquier hidrobiólogo, por lo que su aplicación resulta sumamente accesible.

8. Referencias

Akcaalan R., Young F., Metcalf J., Morrison L., Albay M. & Codd G. 2006. Microcystin analysis in single filaments of *Planktothrix* spp. in laboratory cultures and environmental blooms. *Water Research* 40: 1583-1590.

Akin-Oriola G. & Lawton L. 2005. Detection and quantification of toxins in cultures of *Microcystis aeruginosa* (PCC 7820) by HPLC and protein phosphatase inhibition assay effect of blending various collectors at bulk. *African Journal of Science and Technology (AJST) Science and Engineering Series* 6 (1): 1-10.

Alcocer J., Kato J., Robles E. & Vilaclara G. 1998. Estudio preliminar del efecto del dragado sobre el estado trófico del Lago Viejo de Chapultepec. *Contaminación Ambiental* 4: 43-56.

Arar E. & Collins G. 1997. Method 445.0. *In Vitro* determination of chlorophyll *a* and pheophytin *a* in marine and freshwater algae by fluorescence. U.S. Environmental Protection Agency. 23 pp.

Arzate, M. 2008. Detección de cianobacterias toxigénicas pertenecientes al género *Microcystis* mediante marcadores moleculares y ensayos biológicos. Tesis de Maestría. IPN, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. 71 pp.

Babica P., Bláha L. & Mars^válek B. 2006. Review. Exploring the natural role of microcystins – A review of effects on photoautotrophic organisms. *Journal of Phycology* 42: 9-20.

Barica J. 1992. Sustainable management of urban lakes: a new environmental challenge. *Water Pollution Research Journal of Canada* 27 (2): 211-219.

Bittencourt-Oliveira M., Costa M. & Moura A. 2009. Genetic polymorphism in Brazilian *Microcystis* spp. (Cyanobacteria) Toxic and no-toxic through RFLP-PCR of the cpcBA-IGS. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 52 (4): 901-909.

Burch M. 2008. Effective doses, guidelines & regulations. En: Hudnell H. (Ed.). *Cyanobacterial harmful algal blooms: State of the Science and Research Needs*. Springer, New York. 913 pp.

Carmichael W. 1992. Cyanobacteria secondary metabolites – the cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology* 72: 445-459.

Carmichael W. 1994. The toxins of Cyanobacteria. *Scientific American* 270: 78-86.

Carmichael W. 1996. Toxic *Microcystis* and the environment. En: Watanabe M, Harada K-I, Carmichael W. & Fujiki H. (Eds.). *Toxic Microcystis*. CRC Press, Inc. 262 pp.

Carmichael W. 2001. Health effects of toxin-producing cyanobacteria: “The CyanoHABs”. *Human and Ecological Risk Assessment (HERA)* 7 (5): 1393-1407.

Carpenter S. 2008. Phosphorus control is critical to mitigating eutrophication. *PNAS (Proceedings of the Nacional Academy of Sciences of the United States of America)* 105 (32): 11039-11040.

Codd G., Bell S., Kaya K., Ward C., Beattie K. & Metcalf J. 1999. Cyanobacterial toxins, exposure routes and human health. *European Journal of Phycology* 34: 405-415.

Codd G. 2000. Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control. *Ecological Engineering* 16: 51-60.

De Leon L. & Yunes J. 2001. First report of a microcystin-containing bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in the La Plata River, South America. Short Communication. *Environmental Toxicology* 16 (1): 110-112.

Deblois C. & Juneau P. 2010. Relationship between photosynthetic processes and microcystin in *Microcystis aeruginosa* grown under different photon irradiances. *Harmful Algae* 9: 18-24.

Dolan J. 2009a. Calibration Curves, Part 1: To b or Not to b?. LCGC EUROPE. Volume 22, Issue 4. Último acceso en Marzo 2010. Disponible en:
<http://chromatographyonline.findanalytichem.com/lcgc/article/articleDetail.jsp?id=592892&sk=&date=&pageID=3>

- 2009b. Calibration Curves, Part IV: Choosing the appropriate model. LCGC North America. Último acceso en Marzo 2010. Disponible en:

<http://chromatographyonline.findanalytichem.com/lcgc/article/articleDetail.jsp?id=610622&sk=&date=&pageID=3>

Dow C. & Sowboda U. 2002. Cyanotoxins. En: Whitton B. & Potts M. (Eds.). *The Ecology of Cyanobacteria. Their diversity in time and space*. Kluwer Academic Publishers, USA. 735 pp.

Ekman R., Silberring J., Westman-Brinkmalm A. & Kraj A. (Eds.). 2009. *Mass Spectrometry. Instrumentation, interpretation and applications*. Wiley-Interscience Series on Mass Spectrometry. John Wiley & Sons, Inc.

Falconer I., Bartram J., Chorus I., Kuiper-Goodman T., Utkilen H., Burch M. & Codd G. 1999. Safe levels and safe practices. En: Chorus I. & Bartram J. (Eds.). *Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. WHO. 400 pp.

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

Fastner J., Neumann U., Wirsing B., Weckesser J., Wiedner C., Nixdorf B. & Chorus I. 1999. Microcystins (hepatotoxic heptapeptides) in German fresh water bodies. *Environmental Toxicology* 14 (1): 13-22.

Fastner J., Wirsing J., Wiedner C., Heinze R., Neumann U. & Chorus I. 2000. Microcystins and hepatocyte toxicity. En: Chorus, I. (Ed.). *Cyanotoxins. Occurrences, Causes, Consequences*. Springer. Berlín, Alemania. 357 pp.

Fujiki H., Takashi S. & Moore R. 1983. New classes of environmental tumor promoters: indole alkaloids and polyacetates. *Environmental Health Perspectives* 50: 85-90.

Fujiki H., Suganuma M., Hakii G., Bartolini G., Moore R., Takayama S. & Sugimura T. 1984. A two-stage Mouse skin carcinogenesis study of lyngbyatoxin A. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 108 (1): 174-176 (Abstract).

Gomez L., Álvarez I., Rodríguez J. & Álamo B. 2011. Cianobacterias. Un riesgo emergente en embalses de agua de Santiago de Cuba. Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado (CNEA) y Universidad de Oriente, Cuba. 73 pp.

Hayden Y., Boqué R. & Rodríguez M. 2007. Calibration. LCGC EUROPE. Volume 20, Issue 6. Último acceso en Marzo 2010. Disponible en:
<http://chromatographyonline.findanalytichem.com/lcgc/article/articleDetail.jsp?id=434923&pageID=1&sk=&date=>

Hillerbrand H., Dürselen C., Kirschtel D., Pollinger U. & Zohary T. 1999. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of Phycology* 35: 403-424.

Howard A. Problem cyanobacterial blooms: explanation and simulation modeling. *Transactions of the Institute of British Geographers, New Series*, Vol. 19, No. 2 (1994), pp. 213-224.

Jeffrey A. & Liskamp R. 1986. Computer-assisted molecular modeling of tumor promoters: Rationale for the activity of phorbol esters, teleocidin B, and aplysiatoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 83: 241-245.

Jones G. & Orr P. 1994. Release and degradation of microcystin following algicide treatment of a *Microcystis aeruginosa* bloom in a recreational lake, as determined by HPLC and protein phosphatase inhibition assay. *Water Research* 28 (4): 871-876.

Komárek J. 1984. Sobre las cianofíceas de Cuba: 3) Especies planctónicas que forman florecimientos de las aguas (Ciudad de La Habana) [Resumen]. *Acta Botánica Cubana* 19: 1-33. Disponible en:
<http://www.ecosis.cu/resumenactabotanica.htm>

Komárek J., Montejano G., Gold-Morgan M. & Tavera R. 1996. Taxonomic identity and distribution of tropical cyanoprokaryotes (Cyanophyta, Cyanobacteria): An example from central Mexico. *Nova Hedwigia*, Beiheft 112: 49-54.

Komárek J., Azevedo S., Domingos P., Komárková J. & Tichy M. 2001. Background of the Caruaru tragedy: a case taxonomic study of toxic cyanobacteria. *Algological Studies* 103: 9-29.

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

Komárek J., Komárková-Legnerová J., Sant'Anna C., Azevedo M. & Senna P. 2002. Two common *Microcystis* species (Chroococcales, Cyanobacteria) from tropical America, including *M. panniformis* sp. nov. *Cryptogamie Algologie* 23 (2): 159-177.

Kotak B., Lam A., & Prepas E. 1995. Variability of the hepatotoxin Microcystin-LR in hypereutrophic drinking water lakes. *Journal of Phycology* 31: 248-263.

Lahti K., Rapala J., Färdig M., Niemelä M. & Sivonen K. 1997. Persistence of cyanobacterial hepatotoxin, microcystin-LR in particulate material and dissolved in lake water. *Water Research* 31 (5): 1005-1012.

Lampert W. & Sommer U. 2007. Limnoecology. 2nd edition. Oxford University Press. Great Britain. 335 pp.

Lawton L., Edwards C. & Codd G. 1994. Extraction and High-Performance Liquid Chromatography method for the determination of microcystins in raw and treated waters. *The Analyst* 119: 1525-1530.

Lee R. 2008. Phycology. 4th edition. Cambridge University Press. 561 pp.

Liu Y., Tan W., Wu X., Wu Z., Yu G. & Li R. 2011. First report of microcystin production in *Microcystis smithii* Komárek and *Anagnostidis* (Cyanobacteria) from a water bloom in Eastern China. *Journal of Environmental Sciences* 23 (1): 102-107.

Maršálek B., Bláha L., Turánek J. & Neca J. 2000. Microcystin-LR and total microcystins in cyanobacterial blooms in the Czech Republic 1993-1998. 2000 En: Chorus I. (Ed.). Cyanotoxins. Occurrences, Causes, Consequences. Springer. Berlín, Alemania. 357 pp.

Martínez E. 2002. Determinación de toxinas biológicas en una fuente de abastecimiento de agua dulce. XXVIII Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental Cancún, México.

Moreno D., Quintero J. & López A. 2010. Métodos para identificar, diagnosticar y evaluar el grado de eutrofia. *ContactoS* 78: 25-33.

Moschini V., Bortoli S., Pinto E., Nishimura P., Gomes de Freitas L., Pompêo M. & Dörr F. 2009. Cyanobacteria and Cyanotoxin in the Billings Reservoir (São Paulo, SP, Brazil). *Limnetica* 28 (2): 273-282.

M sagati T., Siame B. & Shushu D. 2006. Evaluation of methods for the insolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. Review. *Aquatic Toxicology* 78: 382-397.

Neilan B., Dittman E., Rouhiainen L., Bass A., Schaub V., Sivonen K. & Börner T. 1999. Nonribosomal peptide synthesis and toxigenity of Cyanobacteria. *Journal of Bacteriology* 181 (13): 4089-4097.

Newcombe G. (Ed.). 1999. Internacional guidance manual for the management of toxic cyanobacteria. Global Water Research Coalition (GWRC), London, United Kingdom. 93 pp.

Oliva M., Rodríguez A., Lugo A. & Sánchez M. 2008. Composición y dinámica del fitoplancton en un lago urbano hipereutrófico. *Hidrobiológica* 18 (1): 1-13.

Oliver R. & Ganf G. 2002. Freshwater booms. En: Whitton B. & Potts M. The ecology of Cyanobacteria. Their diversity in time and space. Kluwer Academic Publishers, USA. 735 pp.

Orr P. & Jones G. 1998. Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa* cultures. *Limnology and Oceanography* 43 (7): 1604-1614.

Ortiz R., Tavera R., Márquez C., Reyes R. & Vidal G. 2010. Riesgos de florecimientos tóxicos y su relación con la recuperación del lago de Zumpango, Estado de México. Cartel en la I Reunión de la Sociedad Mexicana de Ficología y VI Congreso Mexicano de Ficología "Ocean. Raúl Aguilar Rosas". Ciudad de Morelia, Michoacán, México.

Otsuka S., Suda S., Shibata S., Oyaizu H., Matsumoto S. & Watanabe M. 2001. A proposal for the unification of five species of the cyanobacterial genus *Microcystis* Kützing ex Lemmermann 1907 under the Rules of the Bacteriological Code. *Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 873-879.

Ozawa K., Fujioka H., Muranaka M., Yokohama A., Katagami Y., Homma T., Ishikawa K., Tsujimura S., Kumagai M., Watanabe M., & Park H-D. 2005. Spatial distribution and temporal variation of *Microcystis* species composition and microcystin concentration in Lake Biwa. *Environmental Toxicology* 20: 270-276.

Paerl H. 1988. Nuisance phytoplankton blooms in coastal, estuarine, and inland waters. *Limnology and Oceanography* 33 (4, part 2): 823-847.

Park H-D., Iwami C., Watanabe M., Harada K-I., Okino T. & Hayashi H. 1998. Temporal variabilities of the concentrations of intra- and extracellular microcystin and toxic *Microcystis* species in a hypertrophic lake, Lake Swa, Japan (1991 – 1994). *Environmental Toxicology and Water Quality* 13 (1): 61–72.

Park H-D. 2000. Cyanotoxins and cyanobacterial blooms in South Korean lakes. En: Chorus, I. (Ed.). Cyanotoxins. Occurrences, Causes, Consequences. Springer. Berlín, Alemania. 357 pp.

Pizzolon L. 1996. Importancia de las cianobacterias como factor de toxicidad en las aguas continentales. *Interciencia* 21 (6): 239-245.

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

Ramírez P., Martínez E., Martínez M. & Eslava C. 2004. Cianobacterias, microorganismos del fitoplancton y su relación con la salud humana. En: Rosas I., Cravioto A. & Ezcurra E. (Compiladores). Microbiología ambiental. SEMARNAT, INE, UNAM y PUMA. México. 134 pp.

Rodríguez M.J. & Morar R. 2002. Estadística Informática: casos y ejemplos con el SPSS. Universidad de Alicante. Servicio de Publicaciones. España. 310 pp.

Rantala A., Rajaniemi-Wacklin P., Lyra C., Lepistö L., Rintala J., Mankiewicz-Boczek J. & Sivonen K. 2006. Detection of microcystin-producing cyanobacteria in Finnish Lakes with genus-specific microcystin synthetase gene E (*mcyE*) PCR and associations with environmental factors. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (9): 6101-6110.

Rapala J., Sivonen K., Lyra C., & Niemelä S. 1997. Variation of microcystins, cyanobacterial hepatotoxins, in *Anabaena* spp. as a function of growth stimuli. *Applied and Environmental Microbiology* 63 (6): 2206-2212.

Ressom R., San Soong F., Fitzgerald J., Turczynowicz L., El Saadi O., Roder D., Maynard T. & Falconer I. 1994. Health effects of toxic cyanobacteria (blue-green algae). National Health and Medical Research Council (NHMRC).

Reynolds C. 1991. Toxic blue-green algae: the "problem" in perspective. *Freshwater Forum* 1 (1); pp. 29-38.

Sabour B., Loudiki M., Oudra B., Vasconcelos V, Martins R., Oubraim S. & Fawzi B. 2002. Toxicology of a *Microcystis ichthyoblabe* waterbloom from Lake Oued Mellah (Morocco). *Environmental Toxicology* 17 (1): 24-31.

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

Sant'Anna C., Azevedo M., Senna P., Komárek J. & Komárková J. 2004. Planktic Cyanobacteria from São Paulo State, Brazil: Chroococcales. *Revista Brasileira de Botânica*. 27 (2): 213-227.

Schindler D., Hecky R., Findlay D., Stainton M., Parker B., Paterson M., Beaty K., Lyng M. & Kasian S. 2008. Eutrophication of lakes cannot be controlled by reducing nitrogen input: Results of a 37-year whole-ecosystem experiment. *PNAS (Proceedings of the Nacional Academy of Sciences of the United States of America)* 105 (32): 11254-11258.

Segura M., Tavera R., Márquez C., Reyes R. & Vidal G. 2010. Presencia de florecimientos tóxicos de cianobacterias en el lago de la segunda sección de Chapultepec, Ciudad de México. Cartel en la I Reunión de la Sociedad Mexicana de Ficología y VI Congreso Mexicano de Ficología "Ocean. Raúl Aguilar Rosas". Ciudad de Morelia, Michoacán, México.

Sevilla E., Martin-Luna B., Bes M.T., Filliat M. & Peleato M.L. 2012. An active photosynthetic electron transfer chain required for *mcyD* transcription and microcystin synthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806.

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

Skulberg O., Codd G. & Carmichael W. 1984. Toxic blue-green algal blooms in Europe: a growing problem. *Ambio* 11(4): 244-247.

Takenaka S. 1998. Formation of 3-amino-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4E,6E-dienoic acid from microcystin LR by the treatment with various proteases, and its detection in mouse liver. *Chemosphere* 36(10):2277-82

Te S. & Gin K-Y. 2011. The dynamics of cyanobacteria and microcystin production in a tropical reservoir in Singapore. *Harmful Algae* 10: 319-329.

van Apeldoorn M., van Egmond H., Speijers G. & Bakker G. 2007. Toxins of cyanobacteria. *Molecular Nutrition & Food Research* 51: 7-60.

van den Hoek C., Mann D. & Jahns H. 1995. Algae. An introduction to phycology. Cambridge. University Press, USA. 623 pp.

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

Walsby, A. 1970. The nuisance algae: curiosities in the biology of blue-green algae. *Water Treatment and Examination* 19.

Watanabe M. & Oishi S. 1985. Effects of environmental factor on toxicity of a cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under culture conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 49 (5): 1342-1344.

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

Welker M., von Döhren H., Täuscher H., Steinberg C. & Erhard M. 2003. Toxic *Microcystis* in shallow lake Müggelsee (Germany) – dynamics, distribution, diversity. *Archives of Hydrobiology* 157 (2): 227-248.

WHO. 2003. Algae and Cyanobacteria in fresh water. En: Guidelines for safe recreational water environments. Volume 1: Coastal and Fresh waters. World Health Organization, Geneva. 253 pp.

Wicks R. & Thiel P. 1990. Environmental factors affecting the production of peptide toxins in floating scums of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in a hypertrophic African reservoir. *Environmental Science & Technology* 24: 1413-1418.

Xu Y., Wu Z., Yu B., Peng X., Yu G., Wei Z., Wang G & Li R. 2008. Non-microcystin producing *Microcystis wesenbergii* (Komárek) Komárek (Cyanobacteria) representing a main waterbloom-forming species in Chinese waters. *Environmental Pollution* 156: 162-167.

Zaccaroni A. & Scaravelli D. 2008. Toxicity of freshwater algal toxins to humans and animals. En: Evangelista et al. (Eds). *Algal toxins: occurrence, effect and detection*. Springer Science.

Zheng L., Xie P., Li Y. L., Yang H., Wang S. B. & Guo N. C. 2004. Variation of intracellular and extracellular microcystins in a shallow, hypereutrophic subtropical chinese lake with dense cyanobacterial blooms. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 73: 698-706.

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

9. ANEXOS

ANEXO 1 Generalidades de las Cianoprocariontes

Las cianoprocariontes pertenecen al Reino Monera, División Eubacteria, Clase Cyanobacteria. A niveles taxonómicos inclusivos, hay desacuerdo en el número de órdenes, familias, géneros o especies comprendidos, lo que genera clasificaciones conflictivas. Sin embargo, los géneros y especies que comprenden cianoprocariontes planctónicas peligrosas o desagradables que forman florecimientos están bien reconocidas (Ressom et al., 1994).

Las cianoprocariontes se encuentran en latitudes templadas y tropicales y habitan lagos, ríos y estuarios, distribuyéndose de acuerdo con condiciones climáticas y meteorológicas que influyen el grado de estratificación y mezcla, la luz y la disponibilidad de nutrientes (Oliver & Ganf, 2002). Estos organismos crecen a cualquier profundidad y área de un cuerpo de agua (Howard, 1994), y componen un elemento ecológico importante en los ambientes acuáticos por contribuir significativamente a la productividad del ecosistema (Burch, 2008).

Algunos grupos de cianoprocariontes que habitan el fitoplancton pueden regular su flotabilidad a través de cámaras huecas, llamadas aerotopos, que almacenan aire y hacen a las células menos densas que el agua, lo que las hace flotar (Walsby, 1970; WHO, 2003) y también regular su posición en distintas zonas de la columna de agua, en parte en función de la concentración intracelular de determinados nutrimentos, como se detalla en el ANEXO 2.

Entre los factores ambientales que limitan el crecimiento de las cianoprocariontes se encuentran la luz, la temperatura y la concentración de nutrientes en el agua, principalmente nitrógeno y fósforo. Por lo general, el crecimiento y proliferación de las cianoprocariontes son óptimos en intervalos de temperatura de entre 15 y 35° C y en aguas duras, con pH de 7.5 a 9.0 (Howard, 1994).

ANEXO 2 Florecimientos de cianoprocariontes

El término "floreCIMIENTO de cianoprocariontes" o "floreCIMIENTO cianobacteriano" se refiere al crecimiento explosivo y abundante de cianoprocariontes potencialmente dañinas, generalmente de una o dos especies coexistentes, que encuentran ventajas competitivas sobre otras microalgas (eucariontes). Las poblaciones de estos microorganismos se desarrollan hasta alcanzar densidades mayores a 100 000 células por mililitro (células ml⁻¹). Las especies que forman los florecimientos componen del 95 al 99 por ciento de la biomasa del fitoplancton (Paerl, 1988; Pizzolon, 1996; Oliver & Ganf, 2002), y gracias a que cuentan con estructuras y capacidades diversas, pueden mantenerse en la superficie o desplazarse a lo largo de la columna de agua (Howard, 1994; Ransom et al., 1994; Oliver & Ganf, 2002), por ejemplo aquellas con aerotopos como *Microcystis* spp y *Planktothrix* spp.

Los florecimientos no necesariamente se encuentran en la superficie de los cuerpos de agua o son perceptibles a simple vista ya que las células pueden permanecer dispersas en un volumen de agua considerablemente grande o se concentran a cierta profundidad, dependiendo de la naturaleza de las especies que los componen (Pizzolon, 1996).

Si bien la presencia de cianoprocariontes en los cuerpos de agua no está restringida únicamente a la influencia de la actividad humana (Carmichael, 1996), los crecimientos masivos de estos microorganismos suelen ser un síntoma de eutrofización y deterioro de las fuentes de agua (Codd et al., 1999). Sin embargo, algunos de los factores que permiten la dominancia de las cianoprocariontes y formación de florecimientos incluyen temperaturas cálidas, la utilización de determinadas proporciones de fósforo y nitrógeno, la regulación de la flotabilidad, la capacidad de almacenar fósforo y la reducción de la herbivoría. La presencia de aerotopos también es un atributo considerado de suma importancia. Las características morfológicas, fisiológicas y ecológicas de cada especie sugieren que los factores que promueven la dominancia de una no necesariamente promueven otra (Oliver & Ganf, 2002).

Factores ambientales

- Reclutamiento

El crecimiento de cianoprocariontes ocurre todo el año en sitios tropicales (Oliver & Walsby, 1975), a diferencia de sitios templados, donde ocurren generalmente en verano (Howard, 1994). Formas filamentosas y coloniales persisten en el agua ya sea hibernando por meses en los sedimentos o suspendidas en el agua debido a mezcla (Reynolds & Walsby, 1975, en Ressom et al., 1994). Ya sea en sitios templados o tropicales, las células sobrevivientes se vuelven el inóculo para las siguientes estaciones de crecimiento. Lo anterior, descrito para *Microcystis*, explica la persistencia de florecimientos mientras la condición eutrófica continúe (Ressom et al., 1994). El éxito de estos microorganismos se debe muy probablemente a estrategias de adquisición de nutrientes, acumulación de productos de fotosíntesis y reducción de la tasa metabólica (Ressom et al., 1994).

- Nutrientes

Las cianoprocariontes, al igual que todas las microalgas, necesitan de la disponibilidad de nitrógeno y fósforo como nutrientes principales para su crecimiento, pues están relacionados en parte en la síntesis de aminoácidos y proteínas. Las respuestas generales a la limitación de nutrientes incluye la acumulación de carbohidratos, la reducción del nutriente limitante, un aumento en la tasa de toma del nutriente limitante, entre otros. El almacenamiento es un atributo valioso, que permite a las células utilizar reservas de nutrientes que están espacial y temporalmente separadas, para que el crecimiento sea mantenido durante periodos de escasez de nutrientes (Oliver & Ganf, 2002).

Fósforo

Las cianoprocariontes cuentan con estrategias que les permiten sobrevivir e incluso dominar sobre otras cianoprocariontes u otras microalgas cuando se encuentran en condiciones de limitación de fósforo, gracias a la formación de reservas de este elemento y a una utilización muy efectiva en el metabolismo celular. Debido a estas capacidades distintas y a las condiciones del medio, por ejemplo, las especies de *Microcystis* puede desplazar a las de *Oscillatoria*, pues las primeras tiene una mayor rapidez en la toma del fósforo y lo utilizan más eficientemente (Oliver & Ganf, 2002).

Estas características de *Microcystis* concuerdan con su capacidad de regulación de su flotabilidad que les permite ganar acceso al fósforo en aguas profundas (Oliver & Ganf, 2002).

Nitrógeno

El nitrógeno es particularmente importante para las cianoprocariontes con aerotopos ya que este es un componente esencial en la síntesis de estas estructuras. Por lo tanto, la limitación de nitrógeno podría no impactar en el crecimiento de las células, pero sí en la flotabilidad y en la capacidad para regular la flotabilidad. La limitación del nitrógeno es particularmente perjudicial para las cianoprocariontes no fijadoras de nitrógeno⁷ y que forman florecimientos, como *Microcystis* o *Planktothrix*, y puede ser un factor en el reemplazo por otras especies de fitoplancton (Oliver & Ganf, 2002).

Si las células se encuentran en un ambiente con mucho nitrógeno, las reservas de carbohidratos son pequeñas; si, por el contrario, las células están en un medio con nitrógeno limitado, las reservas de carbohidratos son mayores. Estas, por un lado pueden utilizarse como fuentes de energía, pero por otro, hacen a las células más "pesadas", y esto repercute en la regulación de su flotabilidad (Oliver & Ganf, 2002).

La entrada del fósforo a los cuerpos de agua se da principalmente por escurrimiento o por fuentes puntuales, como descargas de aguas residuales, aguas de desecho urbana o desperdicios industriales. A diferencia de este elemento, el nitrógeno se mueve hacia dentro y fuera de los ecosistemas en estado molecular como gas: o bien puede entrar al agua a través de la ruptura de sustancias orgánicas en la forma de amonio, urea o iones inorgánicos como nitratos y nitritos (Ressom et al., 1994).

En los cuerpos de agua, las comunidades de algas pasan por estaciones de crecimiento, sucesión y dominancia de acuerdo con las condiciones ambientales como temperatura y en respuesta a la disponibilidad de nutrimentos, principalmente el fósforo, como se detalla a continuación.

En lagos oligotróficos templados, las bajas temperaturas durante la primavera favorecen el crecimiento y dominancia de diatomeas, las cuales utilizan las altas cantidades de fósforo disponibles después de la circulación y las llevan con ellas al fondo, dejando este elemento no disponible para el verano, cuando las

⁷ Al fijar nitrógeno atmosférico, ciertos géneros de cianoprocariontes como *Anabaena* pueden obtener el nitrógeno que necesitan incluso cuando otras algas han agotado el disponible disuelto en el agua. Las cianoprocariontes que no fijan el nitrógeno, no cuentan con esta ventaja. Ejemplos de cianoprocariontes no fijadoras de nitrógeno son *Microcystis* y *Planktothrix* (van den Hoek et al., 1995).

temperaturas más cálidas son las óptimas para el crecimiento de otros organismos como las cianoprocariontes. Es por esta razón que en dicha época del año, las aguas de estos lagos son claras y no presentan florecimientos de cianoprocariontes (Paerl, 1988; Reynolds, 1991; Carmichael, 1996; Oliver & Ganf, 2002).

En lagos templados con mayor cantidad de fósforo, las cianoprocariontes crecen abundantemente, dominan en verano y pueden permanecer hasta otoño, debido a que no están limitadas por la concentración de nutrimentos y a que están prácticamente libres de herbivoría, pues los animales microscópicos suelen alimentarse poco o nada de ellas (Paerl, 1988; Reynolds, 1991; Carmichael, 1996; Oliver & Ganf, 2002), por ejemplo copépodos, dáfnidos, rotíferos y cladóceros (Zaccaroni & Scaravelli, 2008).

En sistemas donde hay fósforo permanentemente, ya sea por causas naturales o antropogénicas relacionadas con la eutrofización, la composición de especies del fitoplancton se torna hacia las cianoprocariontes formadoras de florecimientos, quienes pueden dominar por periodos más prolongados en sitios templados y hasta por periodos anuales en zonas tropicales (Paerl, 1988; Reynolds, 1991; Howard, 1994; Carmichael, 1996; Codd et al., 1999; Oliver & Ganf, 2002).

En resumen, las cianoprocariontes aumentan su biomasa gracias a que las concentraciones necesarias de nutrimentos están disponibles en las condiciones ambientales adecuadas. A pesar de que todos los organismos requieren macronutrientes, las razones por las que las cianoprocariontes logran dominar es por la combinación de factores que interactúan, uno de ellos es la condición de eutrofía, incluyendo la antropogénica (Ressom, 1994), que estimula el desarrollo de florecimientos tóxicos (Carmichael, 1996).

- Temperatura y luz

La mayoría de los géneros de cianoprocariontes formadoras de florecimientos tienen una temperatura óptima de 25°C o superiores, pero algunas especies varían su respuesta a intervalos de temperatura estrechos o amplios. Se ha encontrado que el efecto de la temperatura es sinérgico⁸ con los efectos de otros factores que interactúan, como la disminución de nutrientes y la estabilidad del cuerpo de agua (Ressom et al., 1994).

⁸ Un efecto sinérgico es el resultado de la acción conjunta de dos o más factores, pero caracterizado por tener un efecto superior al que resulta de la simple suma de dichos agentes.

Los requerimientos de luz de las cianoprocariontes en general pueden ser similares a los de otros elementos del fitoplancton, pero a diferencia de estos, las cianoprocariontes pueden sobrevivir en condiciones de poca luz. Gracias a la presencia de pigmentos accesorios, las cianoprocariontes pueden realizar la fotosíntesis a niveles de irradianza que para otras algas del fitoplancton están limitados. Por otro lado, la sobreexposición de las cianoprocariontes a las intensidades de luz altas ya sea por la intensidad misma o por que las células se encuentren en la superficie, puede causar su muerte o el colapso de los aerotopos, lo que causaría su hundimiento. En condiciones de poca luz, por el contrario, las cianoprocariontes aumentan su flotabilidad (Ressom et al., 1994).

Factores fisiológicos

- Flotabilidad

Las cianoprocariontes que poseen aerotopos pueden regular su flotabilidad, lo que les da la ventaja de acceder a distintas profundidades en respuesta a condiciones de crecimiento cambiantes (Oliver & Ganf, 2002) y encontrar nutrientes no accesibles para otros organismos (Ressom et al., 1994). Ciertamente los aerotopos controlan la distribución vertical, en respuesta a la luz y temperatura, pero también es una función del régimen de mezcla (Oliver & Ganf, 2002).

Los factores que repercuten directa e indirectamente en la distribución de las cianoprocariontes en la columna de agua son su fisiología, las condiciones hidroambientales (Ressom et al., 1994; Howard, 1994) y los cambios en la temperatura e intensidad de luz (Ressom et al., 1994).

Factores ecológicos

- Efecto de sombra, reducción de herbivoría y actividad aleloquímica

La afinidad de las cianoprocariontes por nutrientes en bajas concentraciones y el secuestro de los mismos les permite no hacerlos disponibles para otros organismos y les da la posibilidad de explotar y permanecer por tiempo prolongado en la zona de poca luz, baja en nutrientes. Lo anterior tiene repercusión en la baja posibilidad de establecimiento y permanencia de otros organismos, y en el caso de un florecimiento masivo, estas consecuencias se añaden a la falta de luz que llega al resto de la columna por la sombra del florecimiento (Ressom et al., 1994) y que por lo tanto restringe el crecimiento de otras especies de fitoplancton (Paerl, 1988).

Adicionalmente a la supresión física, las cianoprocariontes pueden inhibir depredadores invertebrados por medio de las cianotoxinas que ellas producen. Estas toxinas también inhiben el crecimiento de macrofitas acuáticas y de otras algas, causando una interacción alelopática⁹, donde un organismo afecta el crecimiento de un segundo organismo. Un ejemplo es la inhibición del dinoflagelado de agua dulce *Peridinium gatunense* por la microcistina producida por *Microcystis* en el Lago Kinnereg (Mar de Galilea), Israel. Las microcistinas inhiben la actividad de la anhidrasa carbónica del dinoflagelado e inhiben su crecimiento. La microcistina se clasifica como un aleloquímico que actúa como un algicida (Ressom et al., 1994; Lee, 2008).

Factores físicos indirectos

- Movimiento del aire y mezcla de los lagos

La velocidad del viento es un factor que determina ciertas condiciones de mezcla de las aguas superficiales y de los movimientos horizontales o verticales a los que las células están sujetas. Cuando esta es muy baja, las células suelen permanecer en la superficie (Ressom et al., 1994; Oliver & Ganf, 2002) mientras son transportadas en el cuerpo de agua, hasta que eventualmente se van acumulando en las orillas, donde se forman agregados densos de poblaciones de estos microorganismos (WHO, 2003).

La mezcla es un factor que influye en la selección de las cianoprocariontes formadoras de florecimientos y favorece la formación de los mismos (Carmichael, 1996; Oliver & Ganf, 2002), pues la turbulencia que la causa redistribuye las cianoprocariontes, así como las fuentes de carbono para permitir la pérdida de flotabilidad (Howard, 1994). No obstante, las cianoprocariontes requieren condiciones climáticas calmadas -que se presentan en verano y otoño en latitudes templadas-, casi siempre asociadas con una concentración de nutrientes mínima en la superficie (Carmichael, 1996; Oliver & Ganf, 2002).

Los impactos de los florecimientos cianoprocariontes son sociales, económicos, de salud y ambientales (Figura 9); las altas biomásas causan problemas estéticos, de

⁹ Una interacción alelopática se refiere a los efectos perjudiciales que son directa o indirectamente el resultado de la acción de compuestos químicos que, liberados por las cianoprocariontes toxigénicas, ejercen su acción en otros organismos. Estos compuestos que desencadenan efectos perjudiciales sobre germinación, crecimiento o desarrollo se denominan sustancias o agentes alelopáticos.

sabor y limpieza a las fuentes de agua (Carmichael, 1996; Howard, 1994; Skulberg et al. 1984). La descomposición de los florecimientos de agua, sobre todo los superficiales, causa la desoxigenación y alteración química del agua y afecta la posibilidad de sobrevivencia de los organismos (Carmichael, 1996; Babica et al., 2006). De particular importancia es la producción y liberación de toxinas al medio (Carmichael, 1996; Howard, 1994; Skulberg et al. 1984), aspecto de interés en este trabajo.

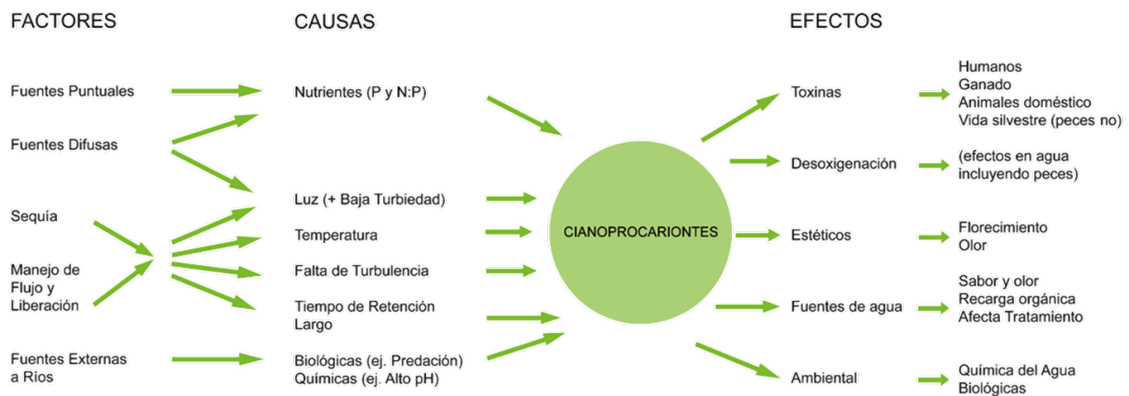


Figura 9. Efectos de los florecimientos de cianoprocariontes (tomado y modificado de Carmichael, 1996).

ANEXO 3 Calidad del agua y Eutrofización

La calidad del agua es la habilidad del agua para sostener varios usos o procesos, y es influenciada por una serie de factores biológicos, geológicos, hidrológicos, meteorológicos y topográficos, los cuales interactúan en los lagos, ríos y estuarios y pueden variar estacionalmente de acuerdo con las diferencias en las condiciones del clima, los volúmenes de escurrimiento y los niveles del agua. La descarga de aguas residuales, agrícolas, industriales y urbanas y el escurrimiento de fertilizantes y pesticidas en cuerpos de agua son la mayor influencia humana en la disminución de la calidad del agua (Codd, 2000). Es decir, que en el caso de cuerpos de agua destinados a la recreación o al abastecimiento de agua potable y que sufren de uno o varios de los tipos de enriquecimientos por descargas antes mencionados, tendrían una calidad por debajo de lo que su actividad o uso lo requiere.

La eutrofización es la respuesta biológica al exceso de la entrada de nutrientes en un cuerpo de agua, y puede deberse a un origen natural, aunque se reconoce más comúnmente como una consecuencia de actividades humanas, pues se sabe que en gran parte por esta razón la frecuencia e intensidad de la eutrofización ha ido en un aumento acelerado en todo el mundo (Ressom et al., 1994; Babica et al., 2006). El resultado es un aumento de la biomasa, ya sea de cianoprocariontes, algas eucariontes o plantas, lo que a su vez lleva a una disminución de la calidad del agua en términos de los usos que la población le da a los cuerpos de agua, pues se vuelve evidente la turbidez del agua, su mal olor y sabor (Codd, 2000).

A nivel biológico, la eutrofización resulta en una reducción en la diversidad de las especies en los cuerpos de agua en todos los niveles tróficos y en aguas eutróficas es común que las cianoprocariontes se vuelvan dominantes (Codd, 2000).

Schindler et al. (2008) recientemente reportaron los resultados de estudios realizados por casi cuarenta años en lagos experimentales sobre el efecto de la variación y/o supresión del fósforo y el nitrógeno con el fin de disminuir la eutrofización de cuerpos de agua, y revelaron que el fósforo causa la eutrofización (Carpenter, 2008) e influencia directamente la presencia de florecimientos de cianoprocariontes, independientemente de la concentración de nitrógeno (Schindler et al., 2008). Otro aspecto que se ha descubierto en este tipo de estudios a largo plazo es que las cianoprocariontes que fijan nitrógeno no son limitadas por bajas concentraciones de nitrógeno disuelto, por lo que son favorecidas

competitivamente, es decir, que el control de las cantidades de nitrógeno podría agravar la dominancia de estos organismos (Schindler et al., 2008), por lo que la disminución de este elemento no mejoraría la calidad del agua sino por el contrario, la disminuiría aún más (Carpenter, 2008). El trabajo de Schindler et al. (2008) también mostró que el manejo de los nutrientes no puede ser extrapolado de estudios a corto plazo, y que además deben ser conducidos a escala ecosistémica y realizados por al menos varios años (Schindler et al., 2008).

Si bien la eutrofización es un problema severo de la calidad del agua que se refleja en la presencia de florecimientos de cianoprocariontes, estos traen consigo la preocupación adicional de la potencial producción de cianotoxinas (Codd, 2000).

ANEXO 4 Cianotoxinas

A continuación se ahonda sobre la naturaleza de la gran diversidad de cianotoxinas y los efectos adversos que causan en animales, especialmente mamíferos (Tablas 1 y 11), comenzando por las hepatotoxinas.

Las microcistinas y las nodularinas son heptapéptidos y pentapéptidos, respectivamente. Son hepatotóxicos para animales, con signos de intoxicación como palidez, extremidades frías, dificultad para respirar, debilidad y dificultad para ponerse de pie, vómito y diarrea. Las microcistinas son promotores de tumores (WHO, 2003). La disrupción de la estructura y función del hígado ocurre con hemorragia dentro del hígado y muerte por arresto respiratorio. A nivel molecular, las microcistinas y las nodularinas inhiben las protein fosfatasas. Las consecuencias de dicha inhibición son de gran alcance, pues estas enzimas tienen numerosas funciones en la regulación de procesos genéticos, de desarrollo, metabólicos y fisiológicos en microorganismos, plantas y animales, como la contracción muscular (Msagati et al., 2006). Las células del hígado son especialmente susceptibles al daño por las microcistinas y nodularinas ya que las toxinas entran a los hepatocitos vía el sistema de transporte de los ácidos biliares de estas células. Sin embargo, se ha acumulado evidencia de que las microcistinas también pueden afectar membranas, invertebrados y plantas sin involucrar transportadores de ácidos biliares (Codd, 2000).

Las neurotoxinas, o toxinas que afectan el sistema nervioso, incluyen la anatoxina-a, la homoanatoxina-a, la anatoxina-a(s) y las saxitoxinas, y todas ellas son de naturaleza alcaloide.

La anatoxina-a y la homoanatoxina-a –análoga de la primera- son agentes bloqueadores neuromusculares. La primera toxina es antagonista de la nicotina colinérgica postsináptica y causa falta de coordinación, jadeo y espasmos musculares en animales, opistónos en aves (doblamiento del cuello a lo largo de la espalda) y muerte por arresto respiratorio (Codd, 2000). La homoanatoxina-a puede causar parálisis corporal severa, provocar convulsiones y llevar a la muerte por arresto respiratorio.

La anatoxina-a(s) causa hipersalivación en animales –de allí la *s*, por *salivación*- y provoca la muerte por la inhibición de la acetilcolinesterasa, enzima que permite la

Llegada de impulsos nerviosos a las neuronas (Codd, 2000). A pesar de que los síntomas son similares a los de la anatoxina-a, ambas toxinas son estructural y fisiológicamente diferentes (Dow & Swoboda, 2002). Las saxitoxinas provocan parálisis y muerte por arresto respiratorio en mamíferos, pues a nivel molecular, bloquean canales de sodio, lo que afecta la generación de impulsos en nervios y fibras musculares (Chorus & Bartram, 1999). Estas toxinas son producidas por dinoflagelados marinos que son consumidos por moluscos e intoxican a la población humana que a su vez consume a estos últimos. La misma familia de neurotoxinas puede ser producida por diversas cianoprocariontes de agua dulce y cerca de 20 variantes de saxitoxinas han sido descritas hasta el momento (Codd, 2000). En la Tabla 11 se muestra información general sobre estas toxinas.

La cilindrospermopsina es un alcaloide hepatotóxico, inhibidor de la síntesis de proteínas; también causa daño por muerte celular en los riñones, los intestinos, el bazo, el corazón y el timo. Los lipopolisacáridos (LPS) son endotoxinas que se encuentran en las paredes celulares de muchas cianoprocariontes y han sido poco estudiados (Codd, 2000).

La aplysiatoxina y la debromoaplysiatoxina son alcaloides que pueden causar distintos signos de intoxicación de acuerdo con la vía de exposición. Se han reportado casos de dermatitis severa en nadadores que realizaron esta actividad en agua con filamentos de *Lyngbya*. Otra forma de intoxicación observada es la oral, después del consumo de organismos marinos que albergan a la cianoprocarionte o que acumulan sus toxinas (Chorus & Bartram, 1999; van Apeldoorn et al., 2007). En ratones, la aplysiatoxina causa efectos tóxicos agudos como hemorragias pulmonares e intestinales y puede causar la muerte, al ser administrada vía respiratoria e intraperitoneal, respectivamente (van Apeldoorn et al., 2007). La aplysiatoxina y la debromoaplysiatoxina son promotores potentes de tumores (la segunda más débil que la primera en piel de ratones (Fujiki et al., 1983; Jeffrey et al., 1986); y a nivel molecular, ambas son activadores de la proteína cinasa C (van Apeldoorn et al., 2007).

La lyngbyatoxina A es un fuerte irritante de la piel, que también tiene una potente actividad de promoción de tumores (Fujiki et al., 1984).

Tabla 11. Destino principal de otras cianotoxinas y las especies que las producen. (tomado de Sivonen & Jones (1999) y modificado con Ressom et al., 1994; Carmichael, 2001 y Fastner, 1999).^a Tal vez otras especies del género también produzcan toxinas.

Clasificación por órgano o sistema principal	Toxina o grupo de toxina	Órgano o sistema principal afectado	Especies de cianoprocariontes que las producen ^a
Hepatotoxina	Nodularinas	Hígado	<i>Nodularia spumigena</i>
Neurotoxinas	Anatoxina-a y Homoanatoxina-a	Sinapsis nerviosas	<i>Anabaena flos-aquae</i> , <i>A. lemmermannii</i> ; <i>Aphanizomenon issatschenkoi</i> ; <i>Cylindrospermum sp.</i> ; <i>Microcystis aeruginosa</i> ; <i>Oscillatoria formosa</i> ; <i>Phormidium favosum</i> ; <i>Planktothrix formosa</i> ; <i>Raphidiopsis mediterranea</i>
Neurotoxinas	Saxitoxinas	Axones nerviosos	<i>Anabaena circinalis</i> ; <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> , <i>Aph. gracile</i> ; <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> ; <i>Lyngbya wollei</i> ; <i>Planktothrix sp.</i>
Citotoxina general	Cilindrospermopsina	Múltiples órganos: hígado, riñones tracto gastrointestinal, corazón, bazo, timo y piel	<i>Anabaena bergii</i> ; <i>Aphanizomenon ovalisporum</i> ; <i>Cylyndrospermopsis raciborskii</i> ; <i>Raphidiopsis curvata</i> ; <i>Umezakia natans</i>
Toxinas no específicas	Lipopolisacáridos	Irritantes potenciales, afecta cualquier tejido expuesto	Todos los géneros
Otras cianotoxinas	Aplysiatoxina, Debromoaplysiatoxina	Piel y probable toxina inflamatoria gastrointestinal	<i>Lyngbya majuscula</i>
	Lyngbyatoxina A	Posible toxina inflamatoria del tracto gastro-intestinal	<i>Lyngbya majuscula</i>

Métodos de análisis de las microcistinas

La diferenciación entre florecimientos tóxicos y no tóxicos no se puede lograr desde una evaluación a nivel microscópico, por lo que es necesario realizar análisis de toxicidad o de cuantificación de toxinas (Sangolkar et al., 2006). La presencia y cantidad de microcistinas en florecimientos, cepas y agua ha sido detectada y cuantificada a través de diferentes métodos, desde técnicas biológicas o bioquímicas, que incluyen la manipulación de ratones o el uso de pruebas inmunológicas que determinan el efecto tóxico de las microcistinas, hasta técnicas más sofisticadas como las fisicoquímicas, que utilizan las propiedades fisicoquímicas de las estructuras de las microcistinas para poder analizarlas cualitativa y cuantitativamente. La utilización de todas estas herramientas dependerá tanto de las facilidades con las que se cuente como del objetivo del estudio (Akin-Oriola & Lawton, 2005; Msagati et al., 2006).

Los bioensayos con ratones pueden considerarse un método cualitativo para determinar si el material concentrado de un florecimiento es tóxico. Los resultados de este tipo de ensayos indican los efectos tóxicos agudos y también la clase de toxinas a partir de las reacciones y patologías de los animales de prueba. En el caso de las microcistinas, los bioensayos con ratón no permiten diferenciar las distintas variantes de microcistinas y no son recomendables para la determinación de las toxinas a bajas concentraciones (Msagati et al., 2006).

La capacidad de las microcistinas de inhibir las enzimas fosfatasa ha llevado a la elaboración de ensayos que determinan esta actividad, relacionada con la hepatotoxicidad de las toxinas y también con la promoción de tumores. La reacción de inhibición puede ser utilizada como una medida de la concentración de toxinas (Msagati et al., 2006).

El ensayo inmunoabsorbente acoplado a enzimas (ELISA por sus siglas en inglés) es una técnica sensible en la que se utilizan anticuerpos contra microcistinas específicas. Por lo general se utiliza para cuantificar las toxinas en muestras de agua poco concentradas (Msagati et al., 2006).

La cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a la detección por espectrometría de masas (HPLC-MS por sus siglas en inglés) es un ejemplo de una técnica fisicoquímica. La primera es una técnica de separación basada en

interacciones hidrofóbicas en la que se utiliza una superficie porosa y una serie de disolventes particulares de acuerdo con el compuesto a separar. La espectrometría de masas, por otro lado, es una técnica que se utiliza comúnmente para detectar, caracterizar y cuantificar compuestos. Después de que un compuesto es separado por HPLC, es llevado al sistema del espectrómetro de masas, donde es ionizado e identificado por la relación entre el peso molecular y la carga (m/z) de sus iones. Esta información permite la identificación y posterior cuantificación del compuesto (Msagati et al., 2006; Sangolkar et al., 2006; Ekmann et al., 2009).

En la espectrometría de masas, las moléculas de muestras biológicas se convierten en iones que son detectados por analizadores de masas, de acuerdo con la relación masa/carga. Dado que las variantes de las microcistinas tienen un peso molecular distinto, la técnica HPLC-MS permite realizar el monitoreo de las masas moleculares de interés y la identificación por tiempos de retención (Sangolkar et al., 2006). El aislamiento de iones tiene la ventaja de que al monitorear una única señal del compuesto de interés, el límite de detección disminuye.

ANEXO 5 Proceso de calibración externa en un análisis cuantitativo de HPLC

Un análisis de cromatografía arroja una señal, como un pico, que es originada por el compuesto de interés, lo cual se confirma utilizando estándares puros, muestras conteniendo sólo el analito, o utilizando un instrumento altamente selectivo (Hayden et al., 2007).

La mayoría de los métodos de cromatografía líquida se utilizan para hacer análisis cuantitativos –es decir, los métodos que responden a la pregunta *¿cuánto hay?* (Dolan, 2009a).

En este tipo de análisis, la concentración de una muestra se puede predecir a partir de su señal medida, es decir, que el pico no es en sí la concentración del compuesto. Se trata de una conversión de la señal medida mostrada en un cromatograma a un resultado analítico que se hace a través de un modelo de calibración (Hayden et al., 2007). La función de un modelo de calibración es comparar la respuesta del detector entre una serie de concentraciones de un estándar de referencia (es decir, concentraciones conocidas) con la respuesta de muestras de concentraciones desconocidas, para después calcular en estas últimas la concentración del analito (Dolan, 2009a).

Es importante hacer notar que la curva de calibración y el análisis de las muestras con cantidades de analito desconocidas se deben hacer bajo las mismas condiciones de análisis del instrumento.

Existen dos tipos de calibración: la externa y la interna. La calibración externa es el método más simple y común de calibración para métodos cuantitativos. En ella se compara la respuesta del detector entre concentraciones conocidas del analito con la respuesta de muestras que contienen concentraciones desconocidas (Dolan, 2009b). En la calibración interna, las muestras que se analizan son en realidad una combinación de solución estándar de concentración conocida con un poco de muestra de concentración desconocida. Ya que en esta tesis realizamos una calibración externa, continuaremos hablando de ella.

Un modelo o curva de calibración externa se comienza a construir al inyectar series de concentraciones distintas pero conocidas del compuesto puro. Más adelante, se

grafica la información de la señal, es decir el área del pico –proporcionada por el cromatograma- contra la concentración que corresponde a dicha señal. Se observará que las varias concentraciones caerán dentro de una línea recta (Figura 10). La linealidad de la curva depende de la respuesta lineal del detector y también de la preparación de los estándares.

Por lo general, las curvas de calibración se elaboran con cinco puntos o concentraciones, y mientras más cercanas caigan dentro de una línea recta, más acertado será el cálculo de concentraciones desconocidas.

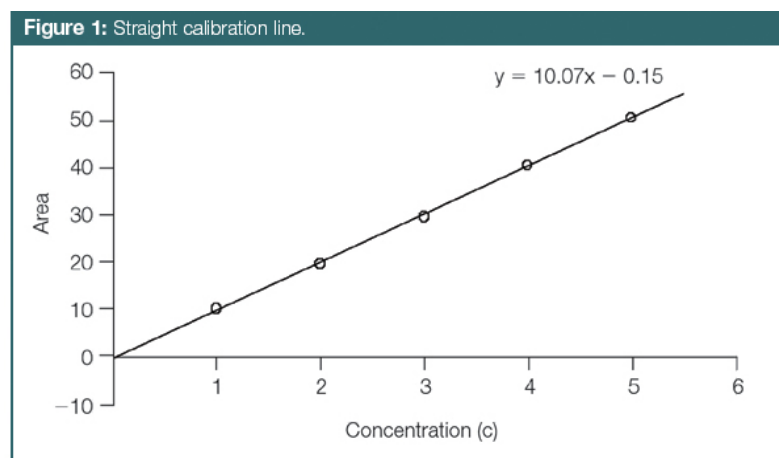


Figura 10. Ejemplo de una curva de calibración lineal. En esta gráfica se observa que el área del los picos es proporcional a la concentración que los genera. Se muestra también la ecuación con la que se puede calcular la concentración del analito (Tomado de Hayden et al. (2007)).

En Excel se pueden introducir los datos de las concentraciones con sus correspondientes señales de los picos y graficarlos. Al obtener la ecuación y el valor de R^2 de dicha gráfica, que es lineal, se procede a calcular la concentración del compuesto de interés a partir de las señales medidas de muestras con concentraciones desconocidas del analito.

ANEXO 6 Tablas y Figuras de Resultados y Discusión

Tabla 12. Parámetros fisicoquímicos medidos durante el muestreo de octubre 2010.

Sitio	Coordenadas		Irradianza ($\mu\text{E} \cdot \text{m}^2\text{s}^{-2}$)		Temperatura (°C)	pH	Conductividad ($\mu\text{S cm}^{-1}$)
	N	O	Superficie	Profundidad			
1	19° 24.986'	99° 11.973'	19289	2927.8	20.0	11.27	480
2	19° 25.047'	99° 11.871'	2238.9	807.3	17.5	11.35	510
3	19° 25.076'	99° 11.891'	24800.2	9300.1	19.5	11.49	530
4	19° 25.093'	99° 11.899'	60622.6	6544.5	21.9	11.55	540
5	19° 25.115'	99° 11.946'	22044.6	3444.5	17.5	11.26	540
6	19° 25.154'	99° 11.965'	11711.2	5511.1	18.6	10.36	570
7	19° 25.201'	99° 11.983'	28933.5	16533.4	20.4	10.64	580
8	19° 25.15'	99° 12.027'	5166.7	1722.2	19.0	10.66	580
9	19° 25.115'	99° 12.005'	4650	1550	18.5	10.49	550
10	19° 24.982'	99° 11.979'	2669.5	484.4	18.4	11.41	510

Tabla 13. Especificaciones de las condiciones de análisis por HPLC-MS.

Chem Station HPLC			MS	
Columna			Fuente de iones	ESI
Fase estacionaria	Synergi Polar RP		Modo detección	MSI
	Longitud	150 mm	Ion detectado	m/z 995
	Diámetro	2.0 mm		
	Tamaño partícula	4 μm		
Fase móvil			Parámetros de la fuente de iones	
Disolventes	A) Metanol B) Ácido fórmico 0.1%		Temperatura de desolve	300 °C
Flujo	0.2 ml min ⁻¹		Control de instrumento, adquisición de datos y procesamiento	Bruker Daltonics Data Analysis
Gradiente	Tiempo %A %B			
	0 30 70			
	30 100 0			
	35 100 0			
Tiempo de corrida	35 minutos			
Temperatura de la columna	40 °C			
Volumen de inyección	10 μl			

Tabla 14. Información recabada de estudios de florecimientos de cianoprocariontes a largo plazo de distintos países.

Información recabada	Lago Mayor, México (Datos originales)	Lago Suwa, Japón (Park et al., 1998)	Hartbeen Dam, Sudáfrica (Wicks & Thiel, 1990)	Lago Durgakund, India (Prakash et al., 2009)
Estado trófico	Lago eutrófico	Lago hipertrófico	Lago hipertrófico	Lago eutrófico
Región climática	Tropical	Subtropical	Subtropical	Tropical
Ocurrencia del florecimiento	Florecimiento anual	Florecimiento estacional	Florecimiento anual	Florecimiento anual
Dominancia relativa de morfoespecies de <i>Microcystis</i>	n. d.	Dominancia de <i>M. aeruginosa</i> sobre otras cuatro morfoespecies	Dominancia anual de <i>M. aeruginosa</i>	n. d.
Comportamiento de la concentración de la toxina	n. d.	Concentración de MC total más alta en verano	Concentración de MC total más alta en verano	Estabilidad anual de concentración de MC-LR
Temperatura correspondiente a la concentración más alta de microcistina	n. d.	n. d.	27 °C	n. d.
Concentración de microcistina en invierno	n. d.	n. d.	Baja o nula (cerca de 5 µg g ⁻¹)	n. d.
Temperatura correspondiente a la concentración más baja de microcistina	n. d.	n. d.	13 °C	n. d.

n. d. = no determinado. MC = Microcistina. n. e. = no especificado.

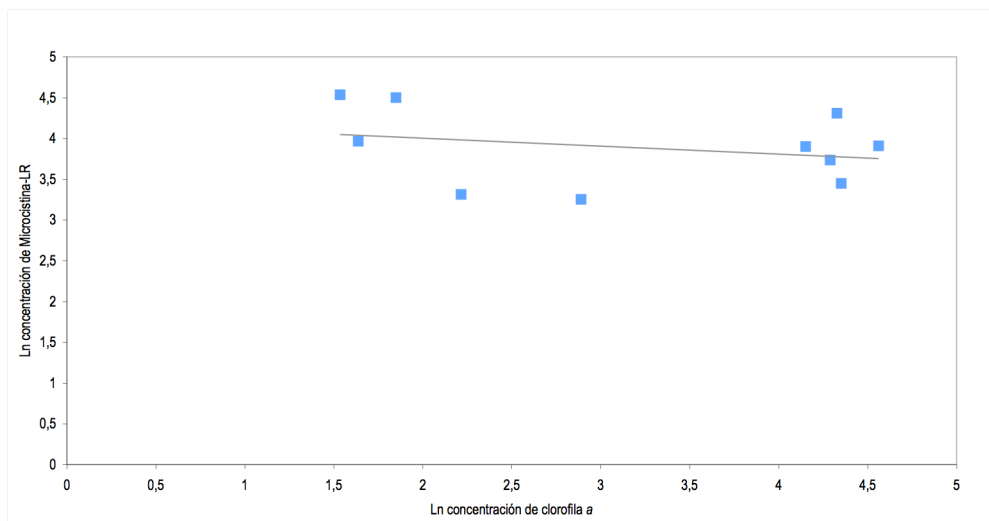
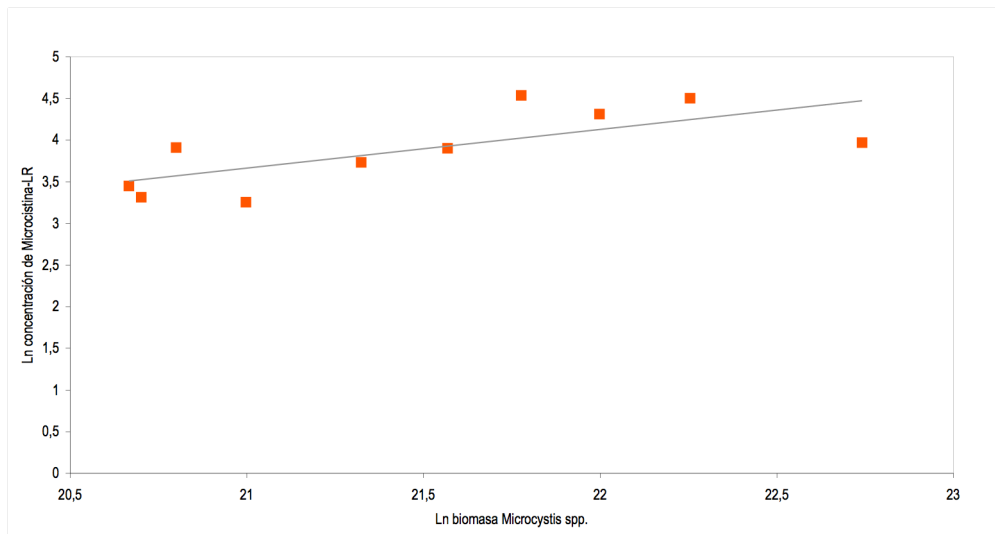


Figura 11. A. Comportamiento de la Microcistina-LR intracelular ante la densidad celular. Se observa que la tendencia de la toxina es aumentar en tanto la densidad celular incrementa. **B. Comportamiento de la Microcistina-LR intracelular ante la concentración de clorofila *a* determinada en el Lago Mayor.** Se observa una tendencia negativa, en la que al ir en aumento la concentración del pigmento, la toxina intracelular tiende a disminuir.

ANEXO 7 Interpretación del análisis de regresión lineal realizado en este trabajo

En este anexo se interpreta, paso a paso, la información más importante que arrojan los análisis de regresión lineal, con la cual es posible construir un modelo de predicción.

El análisis de Regresión Linear permite establecer la relación de variación que se produce entre una variable dependiente Y y una variable independiente (X_1). Existen dos tipos de análisis de regresión lineal, la simple y la múltiple. La diferencia entre ellos es que el primero se realiza con una sola variable independiente mientras que en el múltiple se analiza un conjunto de variables independientes (X_1, X_2, \dots, X_i). Lo más común es que las variables dependiente e independiente(s) sean continuas (Rodríguez & Morar, 2002).

En el análisis de regresión lineal, interesa conocer si existe una relación entre la variable dependiente y la(s) independiente(s), la fuerza de la asociación entre las variables y la dirección de la asociación. El análisis de regresión lineal se compone de una serie de pasos que van evaluando si las variables elegidas deberían permanecer o salir del modelo, y en cada paso, se valora la bondad del ajuste de los datos al modelo y se calculan los parámetros o elementos del modelo.

La anotación matemática de modelos o ecuaciones de regresión, para una regresión simple y una múltiple, son, respectivamente:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_{1i} + \varepsilon_i$$

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_{1i} + \beta_2 X_{2i} + \varepsilon_i \quad i = 1, \dots, 10,$$

en donde:

Y = es la variable a predecir;

β_0, β_1 y β_2 = son parámetros desconocidos a estimar, y

ε_i = es el error que cometemos en la predicción de los parámetros

Correlación de Pearson.

La correlación de Pearson es el primer valor que da el análisis, e indica la correlación de cada variable independiente respecto a la variable dependiente. Este valor tiene asociado un valor de $p \leq 0.05$, según el cual la correlación es significativa. Mientras los valores de Pearson se acerquen a 1, mejor es la correlación.

Bondad del ajuste.

Posteriormente, se estima la bondad de ajuste de los datos al modelo de regresión a través de los estadísticos del mismo nombre (R , R^2 y R^2 corregido), el análisis de varianza y la estimación de los parámetros considerando las variables introducidas. El coeficiente de correlación al cuadrado o coeficiente de determinación (R^2) mide la proporción (o porcentaje al multiplicarlo por 100) de la variabilidad de la variable dependiente que es explicada por las variables independientes que han sido admitidas en el modelo, y representa un grado de relación entre ellas.

El coeficiente de determinación ajustado (R^2 ajustada) mide lo mismo, pero no queda influenciado por el número de variables que se introdujeron. Este coeficiente no cobra importancia en la regresión lineal simple porque hay una sola variable independiente, por lo que el coeficiente importante en dicho caso es R^2 .

El error típico de predicción indica la parte de la variable dependiente que la recta no explica. Es la desviación típica de las distancias existentes entre las puntuaciones en la variable independiente (Y) y los pronósticos calculados con la recta de regresión (\hat{Y}_i), aunque no exactamente, pues la suma de las distancias al cuadrado están divididas por $n-2$:

$$\text{Error típico de predicción} = S_e = \sqrt{\sum (Y_i - \hat{Y}_i)^2 / (n-2)}$$

A medida que se incremente el coeficiente de determinación el error disminuye, por ello un valor alto es preferible.

Independencia de los errores.

Uno de los supuestos del modelo de regresión lineal es el de la independencia entre los errores. El estadístico de Durbin-Watson da información sobre el grado de independencia que existe entre ellos. El valor de D-W oscila entre 0 y 4, y toma el valor 2 cuando los errores son independientes. La independencia entre los errores se asume con valores entre 1.5 y 2.5. Como el valor de D-W en el presente modelo fue 1.877, asumimos que los errores son independientes.

Análisis de Varianza, ANOVA.

En general, informa si existe o no relación significativa entre las variables, con nivel crítico de $p \leq 0.05$.

Obtención de coeficientes de regresión no estandarizados (β).

Para encontrar la recta de regresión capaz de convertirse en el mejor representante del conjunto total de datos, es común seguir el método de mínimos cuadrados, el cual hace mínima la suma de los cuadrados de las distancias verticales entre cada punto y la recta. A través de este método se obtienen también los coeficientes de regresión no estandarizados, columna β , que definen la ecuación de la regresión.

El coeficiente correspondiente a la constante es el origen de la recta de regresión, indicado como β_0 ; el coeficiente correspondiente a la variable independiente de la recta de regresión se denomina β_1 . Este último indica el cambio medio que corresponde a la variable dependiente por cada unidad de cambio de la variable independiente. En el caso del presente trabajo:

$$\text{Concentración de intracelular MC-LR} = 1.987 + 0.847 (\text{biomasa } \textit{Microcystis})$$

A cada valor de biomasa de *Microcystis* le corresponde un pronóstico en Microcistina-LR basado en un incremento constante (1.987) más 0.847 que es el valor de biomasa de *Microcystis*.

En el caso de la regresión lineal múltiple, los coeficientes de regresión no son independientes entre sí. De hecho, reciben el nombre de coeficientes de regresión

parcial porque el valor concreto estimado para cada coeficiente se ajusta teniendo en cuenta la presencia del resto de variables independientes.

Pruebas de significación.

En una regresión lineal múltiple, el modelo puede ser mejorado al introducir en el mismo más variables independientes, siempre y cuando la proporción de variabilidad explicada (R^2) no disminuya. El mismo análisis indica a través de la significancia ($p \leq 0.05$) del estadístico t, cuál de las variables independientes debería permanecer o ser eliminada del análisis. Si $p \leq 0.05$, la variable debería permanecer, no así si $p > 0.05$ (como en el caso de nuestro análisis ocurrió con la clorofila *a*).