



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**ECOLOGÍA Y DISTRIBUCIÓN DE
CIANOBACTERIAS EN LOS LAGOS DEL PARQUE
NACIONAL “LAGUNAS DE MONTEBELLO”,
CHIAPAS Y SU POTENCIAL RIESGO
TOXICOLÓGICO.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

AÍDA ISABEL SÁNCHEZ SALAS



DIRECTORA DE TESIS:

DRA. ANGELA PIEDAD CARO BORRERO

Ciudad Universitaria, CD. MX., 2021



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.

1. Datos del alumno

Sánchez

Salas

Aída Isabel

5517593781

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

312546599

2. Datos del tutor

Dra.

Angela Piedad

Caro

Borrero

3. Datos del sinodal 1

Dr.

Enrique Arturo

Cantoral

Uriza

4. Datos del sinodal 2

Dra.

Marisa

Mazari

Hiriart

5. Datos del sinodal 4

Dra.

Hilda Patricia

León

Tejera

7. Datos del sinodal 5

Dra.

Itzel

Becerra

Absalón

7. datos del trabajo escrito

Ecología y distribución de cianobacterias en los lagos del Parque Nacional "Lagunas de Montebello", Chiapas y su potencial riesgo toxicológico.

87p

2021

Agradecimientos académicos

La presente investigación se llevó a cabo gracias al financiamiento otorgado por la DGAPA (PAPIIT IT200618) proyecto “*Vulnerabilidad Socio-Ambiental del Río Grande-Lagos de Montebello, Chiapas, México*” y con el apoyo de *CYTED-Ibero-American Science and Technology Program for Development* (CYTED-2019), a través del proyecto TALGENTOX (920PTE0102).

A la Universidad Nacional Autónoma de México, la “máxima casa de estudios” del país, y a la Facultad de Ciencias, por brindarme la oportunidad de realizar mi formación académica en la carrera de Biología.

Al Laboratorio de Ecosistemas de Ribera por tener siempre las puertas abiertas y darme la oportunidad de realizar mi proyecto de investigación. Gracias por brindar un espacio

A mi tutora, Dra. Ángela Caro Borrero, por su compromiso, dedicación, confianza, guía y enseñanzas al dirigir este trabajo.

A el Dr. Javier Carmona Jiménez, por participar constantemente en este proyecto, por guiarme, asesorarme y apoyarme para realizar esta investigación.

A los miembros de mi jurado:

Dr. Enrique Arturo Cantoral Uriza

Dra. Marisa Mazari Hiriart

Dra. Hilda Patricia León Tejera

Dra. Itzel Becerra Absalón,

por sus valiosos comentarios y observaciones a este trabajo.

A la Doctora Marisa Mazari Hiriart, por su guía, asesoramiento y colaboración en el proyecto.

A la Maestra en Ciencias Beatriz Zúñiga Ruiz del Taller de Química por su apoyo técnico, en la extracción de los metabolitos secundarios de las muestras de cianobacterias, por medio del rotavapor.

Al Laboratorio de Ficología, al Dr. Gustavo Alberto Montejano Zurita y a la Dra. Itzel Becerra Absalón, por brindar el equipo necesario y su asesoramiento en el proceso de identificación genética.

A la Maestra en Biología María Eugenia Muñiz Días de León, del Taller de Biología de Plantas I y II, por su apoyo en la medición de la concentración de ADN, por medio del espectrofotómetro de microplacas.

A la Maestra en ciencias Verónica Aguilar, por su apoyo en la elaboración del mapa del área de estudio de este proyecto.

A Kenia Márquez, por formar un gran equipo conmigo y orientarme con los análisis moleculares, tu ayuda fue muy importante.

Agradecimientos personales

A mis papás y a mi hermano, por siempre brindarme su amor y apoyo incondicional. Gracias a ustedes he llegado a ser lo que soy, por lo que cada logro mío es también de ustedes.

A la Dra. Angela Caro y al Dr. Javier Carmona, por su interés y apoyo tanto personal como académico, y por permitirme ser parte de su equipo de trabajo.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Ecología de Ribera, por brindarme su consejo y amistad, incluso antes de formar parte del equipo del laboratorio. Son personas increíbles y el mejor equipo.

A mis amigas y amigos de la Facultad de Ciencias, tanto a los que fueron efímeros, como a los que espero sean por muchos años más, todos son parte importante de mi vida y los llevaré siempre en mi corazón.

Índice

1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Las cianobacterias	3
1.2 Taxonomía	5
1.3 Florecimiento de cianobacterias	5
1.4 Cianotoxinas	8
1.4.1 Clasificación de las cianotoxinas	10
1.4.2 Riesgo del potencial toxicológico de las cianobacterias	12
1.5 Normatividad del agua relacionada con cianotoxinas	14
1.6 Métodos de detección y análisis	16
1.7 Parque Nacional “Lagunas de Montebello”	17
2. ANTECEDENTES	19
2.1 Cianobacterias y cianotoxinas en México	19
2.2 Investigación en las “Lagunas de Montebello”	20
3. JUSTIFICACIÓN.....	23
4. OBJETIVOS	24
4.1 Objetivo general.....	24
4.2 Objetivos particulares	24
5. ÁREA DE ESTUDIO	24
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
6.1 Toma de muestras.....	26
6.2 Abundancias	28
6.3 Análisis de los parámetros físico-químicos con base en las abundancias.....	28
6.4 Caracterización fenética de las muestras.....	30
6.5 Biología Molecular.....	30
6.5.1 Extracción de ADN.....	30
6.5.2 Amplificación de la secuencia del gen 16S de ARN ribosomal.....	31
6.5.3 Clonación.....	31
6.5.4 Secuenciación y alineamiento	32
6.6 Caracterización molecular de las toxinas de los consorcios de las muestras naturales ...	33
6.7 Bioensayo	33
6.7.1 Extracción de metabolitos secundarios	33
6.7.2 Cultivo de <i>Artemia salina</i>	34

6.7.3	Bioensayo	34
7.	RESULTADOS Y DUSCUSIÓN	34
7.1	Caracterización físico-química de los sitios de estudio.....	34
7.2	Identificación de cianobacterias mediante el enfoque polifásico	39
7.2.1	Análisis morfométrico de las poblaciones del orden Oscillatorial.....	40
7.2.2	Identificación genética	42
7.2.3	Descripción de las poblaciones identificadas.....	44
7.2.4	Análisis estadístico de los parámetros físico-químicos y las abundancias.....	56
7.3	Distribución	58
7.4	Detección molecular de toxinas, bioensayo y potencial riesgo toxicológico.....	59
8.	CONCLUSIONES	64
9.	RECOMENDACIONES	66
9.1	Identificación de especies	66
9.2	Análisis del potencial riesgo toxicológico.....	66
9.3	Dispersión de las cianobacterias	67
9.4	Principio precautorio.....	67
10.	REFERENCIAS.....	68

RESUMEN

El Parque Nacional “Lagunas de Montebello” se encuentra bajo presión de actividades antropogénicas, que han provocado cambios en la coloración del agua. Este fenómeno se relaciona como una respuesta del ecosistema al aumento en la biomasa de fitoplancton, consecuencia de la creciente eutroficación de los lagos. Parte del fitoplancton son las cianobacterias, organismos que pueden llegar a formar floraciones y que se han reportado como productoras de toxinas, representando un riesgo para la salud humana. Es por ello, que el objetivo de este estudio es caracterizar la diversidad de cianobacterias planctónicas presentes en el sistema hidrológico del Parque Nacional “Lagunas de Montebello” mediante métodos fenéticos y moleculares, así como su potencial toxicológico.

Las muestras fueron tomadas en agosto del 2019 con una red de arrastre en nueve diferentes sitios del Parque Nacional “Lagunas de Montebello”, así como de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) y su efluente. Se realizó la caracterización morfológica de las poblaciones de cianobacterias encontradas en las muestras y se calculó la abundancia de cada población con el conteo en cámaras de Neubauer.

Los análisis morfométricos se realizaron para las poblaciones pertenecientes al orden Oscillatorial, y los análisis moleculares se llevaron a cabo a partir cinco de las muestras de campo, donde se encontraron las mayores concentraciones de biomasa (PTAR, el efluente, El Carrizal, Balamtetik y Chaj Chaj). La identificación genética, se realizó a partir de la extracción de ADN y su secuenciación, utilizando el fragmento del gen 16S rRNA. La identificación a partir de la secuencia se obtuvo comparando con la base de datos de GenBank.

Para el análisis del potencial toxicológico de las muestras, se realizaron pruebas PCR para la detección de cianobacterias que potencialmente pudieran ser productoras de las toxinas microcistina y anatoxina; y se llevó a cabo un bioensayo con *Artemia salina*, utilizando los extractos de las muestras de campo de los mismos cinco sitios.

Con base en los datos analizados en este estudio (morfológicos, morfométricos, genéticos y ecológicos), se encontraron 13 especies, correspondientes a nueve géneros pertenecientes a tres órdenes diferentes: Oscillatoriales, Nostocales y Chroococcales. La especie con mayor distribución fue *Planktothrix agardhii*, encontrándose en siete de los 11 sitios estudiados. Con base en el análisis BLAST, se determinó, que la conductividad, la turbiedad y la concentración de BGA se encuentran dentro de los factores ambientales con mayor influencia sobre la comunidad de cianobacterias. Las pruebas de PCR no confirmaron la presencia del gen analizado para la codificación de microcistinas y anatoxinas; sin embargo, este resultado no descarta el potencial de las cianobacterias de estas muestras como productoras de las mismas. Por otro lado, el bioensayo demostró que hay un efecto letal en los metabolitos secundarios extraídos de las muestras.

El enfoque polifásico ayudó a confirmar y a complementar la identificación de las cianobacterias, para caracterizar la diversidad de las mismas en estos sitios. Sin embargo, hacen falta estudios complementarios, para determinar el potencial toxicológico de estos organismos.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Las cianobacterias

Las cianobacterias son consideradas como un grupo de organismos procariontes gram-negativos, capaces de llevar a cabo fotosíntesis oxigénica (Whitton y Potts, 2002). Esto es posible, gracias a que tienen la capacidad de sintetizar pigmentos fotosintéticos, como la clorofila-a, común en las algas eucariontes y plantas, y las ficobilinas (ficocianina y ficoeritrina), características de las cianobacterias. Estas últimas son las que, en altas concentraciones y con la clorofila-a, les confieren su característico color verde-azulado (Whitton y Potts, 2002).

Se ha estimado, que el origen de este grupo data de hace aproximadamente 3.5 millones de años (Shopf y Walter, 1982), por lo que tienen una larga historia evolutiva que les ha conferido una gran variedad de estrategias metabólicas y estructurales, que les permite tolerar un amplio espectro de condiciones ambientales (Whitton y Potts, 2002).

Dentro de este grupo se encuentran diversos niveles de organización desde unicelulares a coloniales y filamentosas, las cuales pueden encontrarse en solitario o agrupadas en colonias. Algunas especies filamentosas están rodeadas por una vaina, así como algunas especies coloniales se encuentran unidas por una estructura mucilaginosa (Whitton y Potts, 2000).

Una de las adaptaciones que presentan es la presencia de vacuolas de gas en su interior, éstas les permiten regular su posición en la columna de agua, para cambiar así su distribución en el cuerpo de agua que habitan, en función de condiciones ambientales como temperatura, luz y concentración de nutrientes. Por otro lado, algunas especies filamentosas tienen la capacidad de formar heterocitos, células especializadas para fijar nitrógeno atmosférico (N_2), y acinetos, estructuras de resistencia para la propagación y conservación de la especie en condiciones ambientales adversas (van den Hoek *et al.*, 2002).

Otras capacidades de adaptación incluyen la tolerancia a intensidades variables de luz, a la desecación y la radiación ultravioleta; además de una efectiva absorción de nutrientes en bajas concentraciones, por lo que un ambiente eutrófico no es

necesario para su presencia (Whitton y Potts, 2002); e interacciones simbióticas con hongos, plantas y animales (Ward *et al.*, 1994).

En cuanto a su reproducción, es asexual y puede ser mediante endoesporas, exoesporas o por propagación vegetativa (fragmentos de filamentos o colonias) (van den Hoek *et al.*, 2002).

Gracias a sus adaptaciones morfológicas, fisiológicas y reproductivas, han colonizado exitosamente diversos ecosistemas tanto acuáticos (límnicos y marinos), como semi-acuáticos y terrestres (Whitton y Potts, 2002; Bonilla y Aubiot, 2009), encontrándose ampliamente distribuidas en el mundo; incluso se han encontrado en ambientes extremos como manantiales termales, ambientes hipersalinos y desiertos (Whitton y Potts, 2002).

La presencia y abundancia de las cianobacterias se ven favorecidas por diferentes factores ambientales. Entre éstos se encuentra un pH de entre 6 y 9, temperatura de 20-25°C; alta concentración de nutrientes, principalmente fósforo y nitrógeno; poco viento; estancamiento del agua; baja precipitación pluvial y alta intensidad de luz (Oliver y Ganf 2002; Ramírez *et al.*, 2004; Msagati *et al.*, 2006; O'Neil *et al.*, 2012). La importancia de este grupo recae en sus funciones ambientales como la producción primaria, la fijación de nitrógeno atmosférico (N₂), siendo los principales fijadores en los océanos, y dióxido de carbono (CO₂).

Las cianobacterias cumplen un papel importante en diferentes ámbitos. Por un lado, en cuanto a sus funciones ambientales, contribuyen a la fertilidad del suelo, ya que fijan el nitrógeno atmosférico (N₂) (Rai, 1990), así mismo, son los principales fijadores de este nutriente en los océanos (Díez *et al.*, 2008) y del dióxido de carbono (CO₂) (Howarth *et al.*, 1988). También son importantes como productores primarios, ya que son microorganismos quimiotróficos y otros organismos en interacciones simbióticas, aprovechan su actividad metabólica (Atlas y Bartha, 2002). Por otro lado, se les han dado diferentes usos de importancia antropocéntrica como fuente de nutrientes, producción de energía y de materia prima para la producción de sustancias de interés farmacéutico (Falch *et al.*, 1995).

1.2 Taxonomía

La identificación específica de las cianobacterias es compleja, debido a que presentan una amplia variación morfológica y morfométrica, tanto en poblaciones naturales como en cultivo (Komárek y Anagnostidis, 2005). El sistema tradicional de identificación de las Cyanoprokaryota está basado principalmente en rasgos morfológicos y se ha estimado, que cerca del 50% de las cepas pertenecientes a cultivos de colecciones han sido erróneamente identificadas (Castenholz y Norris, 2005). No obstante, el antiguo sistema ha sido modificado por el uso de herramientas moleculares que han introducido nuevos caracteres de identificación. Sin embargo, la taxonomía fenotípica sigue siendo importante en la identificación, y por ello, de acuerdo con Palinska y Krumbein (1998), no debe ser reemplazada por los métodos moleculares, sino que deben ser usados integralmente.

El enfoque integrativo en el sistema taxonómico se basa en la combinación de criterios genéticos, morfológicos y ecológicos para la identificación; éste es conocido como enfoque polifásico (Komárek, 2016). En cuanto al estudio genético, la molécula más ampliamente usada es el 16S rRNA (Woese, 1987) para la identificación y generación de relaciones evolutivas que pueden verse plasmadas en árboles filogenéticos y matrices de similitud. Esta molécula cuenta con diferentes propiedades, como: universal y temprana evolución, regiones variables y regiones conservadas, esencialidad para la vida celular por su función en la síntesis de proteínas, y no hay evidencia de transferencia horizontal para este carácter (Camacho, 2014). En cuanto a la morfología, se describen las características comunes de los géneros y las autopomorfías de las especies. Por último, el análisis ecológico puede incluir la caracterización de su nicho ecológico y su relación con las adaptaciones morfológicas y funcionales.

1.3 Florecimiento de cianobacterias

En condiciones favorables para el crecimiento de las cianobacterias, es común que se presenten florecimientos (*blooms*) o crecimientos masivos. Éstos son eventos de multiplicación y acumulación, de consorcios de fitoplancton, principalmente de cianobacterias, en períodos de pocas horas o días (De León, 2002). Los géneros

que comúnmente forman estos florecimientos en sistemas de agua dulce y que toleran la contaminación son: *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Dolichospermum*, *Microcystis*, *Nodularia*, *Planktothrix* y *Trichodesmium* (Huisman *et al.*, 2008)

Una de las principales causas de la formación de los florecimientos en lagos y ríos es la eutrofización, es decir, el aporte excesivo de nitrógeno (N) y fósforo (P) a los cuerpos de agua (USEPA, 1997), ya que la disponibilidad de N y P influye en el crecimiento, la biomasa, la composición y dominancia de especies del fitoplancton (Xu *et al.*, 2010).

En cuanto a la dominancia en el fitoplancton por parte de las cianobacterias, se ha observado que éstas se ven favorecidas en condiciones donde el N es limitado, es decir, donde la proporción de N a P es baja; esto se debe a la capacidad de algunas especies de cianobacterias para fijar N_2 , lo que les confiere una ventaja sobre el resto del fitoplancton (Beverdorf *et al.*, 2013). Por esto mismo, el N es relevante para determinar la cantidad y especies de cianobacterias presentes en el cuerpo de agua (Ferguson, 1999). Por otro lado, el P suele ser el nutriente determinante más importante sobre la proporción de cianobacterias en las comunidades de fitoplancton en aguas dulces, ya que una concentración de al menos 0.1 mg L^{-1} de P es suficiente para inducir un florecimiento (Ferguson, 1999).

En este aspecto, la corriente en el cuerpo de agua juega un papel fundamental, ya que, generalmente, los lagos tienen un mayor tiempo de retención del agua, comparado con los ríos. Esto permite que en los lagos haya una mayor concentración de nutrientes y sedimento, el cual puede contribuir a la retención y abastecimiento de los mismos (Ferguson, 1999).

En general, el abastecimiento de nutrientes es principalmente de origen antrópico, producto de la agricultura, minería, urbanización, descarga de aguas residuales y desechos de la industria alimenticia (Ramírez *et al.*, 2004). Debido al aumento en la eutrofización de los ambientes acuáticos, se favorecen estas floraciones, las cuales tienen diferentes consecuencias, generalmente nocivas.

Otros factores que dan lugar a los florecimientos en lagos son el aumento de la temperatura, las precipitaciones, la estratificación térmica, la estabilidad de la columna de agua y el cambio del uso del suelo (Brookes y Carey, 2011). Aunque son varios los factores que se han estudiado en relación con los florecimientos de cianobacterias, estos eventos son complejos y, normalmente, son causados por una serie de factores ambientales que ocurren simultáneamente (Heisler *et al.*, 2008; O'Neil *et al.*, 2012).

Por otro lado, las especies que conforman el florecimiento cambian con el tiempo, con base en diferentes factores y la interacción entre los mismos organismos. La dinámica de la población puede variar entre hábitats similares, y en el mismo hábitat en diferentes tiempos (Wu *et al.*, 2015). Esto, ya que son varios los factores que influyen en la dominancia y sucesión. Entre estos se encuentran los nutrientes (como nitrógeno y fósforo), la temperatura, intensidad de la luz, el pH, salinidad, alcalinidad, la estratificación térmica; así como la presencia de competidores, depredadores y parásitos (Scheffer y Carpenter, 2003; Likens, 2010). Por lo tanto, aunque los florecimientos se caracterizan por tener una especie dominante, por regla general son un consorcio de especies que a lo largo del tiempo y con el cambio en los factores ambientales pueden modificar sus abundancias y, como consecuencia, la representatividad dentro del florecimiento,

La formación de los florecimientos tiene impacto en el ecosistema, ya que aumentan la turbidez del agua, afectando negativamente al epifiton, las algas bentónicas y la vegetación subacuática (Scheffer *et al.*, 1993). Por otro lado, al cambiar el flujo de energía y nutrientes, estos crecimientos tienen un impacto en la biodiversidad y en la funcionalidad y estructura de la red alimentaria de los ecosistemas acuáticos (Oliver *et al.*, 2012). El dióxido de carbono (CO₂) disponible en la columna de agua tiende a disminuir con el aumento de cianobacterias, debido a la actividad fotosintética de las mismas; sin embargo, las cianobacterias que son capaces de moverse en la columna de agua y acercarse a la superficie no se ven limitadas por este aspecto, ya que toman el CO₂ del aire. Esto da lugar a la acumulación de cianobacterias en la superficie, donde se forman las natas (Paerl y Ustach, 1982).

Cuando el florecimiento colapsa, se disminuye la concentración de oxígeno disuelto, debido a la degradación microbiana de las cianobacterias muertas, causando un ambiente anoxigénico que provoca la muerte de peces e invertebrados bentónicos (Rabalais *et al.*, 2010).

Desde un punto de vista antropocéntrico, los florecimientos provocan un olor y sabor desagradable en el agua, impidiendo su consumo, uso doméstico y recreativo. Esto tiene un impacto económico negativo, debido a la pérdida de los ingresos por actividades de recreación y el costo monetario para las comunidades y los gobiernos dedicado al tratamiento del agua (Dodds *et al.*, 2009).

Otro factor relevante se relaciona con la capacidad de algunos géneros de cianobacterias de producir toxinas. Se ha observado que, a nivel mundial, el 60% de las muestras de cianobacterias contienen toxinas (WHO, 2003), las cuales afectan negativamente al zooplancton, a los macroinvertebrados, peces, aves y otros animales que las consuman o que interactúan de manera directa y/o indirecta con ellas (Havens, 2008). La presencia de cianotoxinas también ocasiona afectaciones económicas, debido a los efectos letales que pueden llegar a tener en los peces y el ganado.

Finalmente, los florecimientos son importantes para la salud pública, ya que pueden afectar la calidad del agua para beber y para uso recreativo y, por lo tanto, tener repercusiones y riesgos asociados a salud. Actualmente, como consecuencia del aumento en la contaminación de cuerpos de agua, han incrementado las floraciones de cianobacterias productoras de toxinas, por lo que su presencia en medios acuáticos se ha vuelto más común (Kaebernick y Neilan, 2001; Watson *et al.*, 2015; Pick, 2016).

1.4 Cianotoxinas

Las cianotoxinas son metabolitos secundarios que se generan durante la producción de ftopigmentos (Quesada *et al.*, 2006), éstas se acumulan principalmente en el citoplasma de las cianobacterias, liberándose en el ambiente cuando estos organismos mueren y se produce una lisis celular. Algunas

cianotoxinas no son producidas exclusivamente por las cianobacterias, como las saxitoxinas y las endotoxinas de lipopolisacáridos, mientras que otras no se han encontrado relacionadas con ningún otro organismo, como las microcistinas y las anatoxinas (Metcalf y Codd, 2012).

Un factor que es importante tener en cuenta al analizar la toxicidad de las cianobacterias es que las especies que se han documentado como productoras de cianotoxinas, no necesariamente las producen en cualquier hábitat que se encuentren. La producción de toxinas puede variar además entre cepas de la misma especie, entre especies del mismo género y entre géneros (Svirčev *et al.*, 2019). Éstas pueden ser morfológicamente indistinguibles unas de las otras y pueden tener un alto grado de polimorfismo genético, lo cual conduce a una co-ocurrencia de subpoblaciones tóxicas y no tóxicas (Vichi *et al.*, 2016). Esto se debe a que diversos factores ambientales y bióticos influyen en la producción de toxinas.

Actualmente no es clara la función natural de las cianotoxinas, siendo posible, que una sola cianotoxina lleve a cabo diferentes funciones (Svirčev *et al.*, 2019). Una función puede ser presentar una ventaja competitiva ante diferentes organismos, como otros fotótrofos, bacterias y hongos, disminuyendo su crecimiento cuando el ambiente es limitante (Arnold, 1971; Smayda, 1974; Flores y Wolk, 1986; Gross *et al.*, 1991; Patterson y Bolis, 1997). También se les ha atribuido un rol como auxiliares fisiológicos, interviniendo en diferentes vías metabólicas (Holland y Kinner, 2013; Makover *et al.*, 2015). Por otro lado, se han llevado a cabo diferentes estudios que relacionan esta toxicidad con factores como la temperatura, disponibilidad de nutrientes, competencia, biomasa, entre otras.

Por ejemplo, Walls *et al.* (2018) determinaron, que la liberación de microcistinas por parte de *Planktothrix agardhii*, aumenta en temperaturas altas (20-25°C). Por el contrario, de acuerdo con Aguayo (2001) y Jiang (2008), la producción de las toxinas se ve favorecida cuando se presentan las condiciones de crecimiento óptimas de las cianobacterias, por lo que se observa una producción directamente proporcional al aumento de la biomasa.

Por otro lado, dos Santos Severiano *et al.* (2018) evaluaron la influencia del aumento en la biomasa del zooplancton en la comunidad de fitoplancton y en las microcistinas y saxitoxinas en la reserva de Ipojuca en Brasil. Encontraron, que el aumento en la biomasa de zooplancton reduce la biomasa de *Microcystis*, pero no la de cianobacterias filamentosas; esto podría ayudar a reducir las cianotoxinas asociadas a dicho género. Sin embargo, de acuerdo con Jang *et al.* (2003), la presencia del zooplancton tiende a aumentar la producción de toxinas.

1.4.1 Clasificación de las cianotoxinas

Las cianotoxinas se clasifican comúnmente con base en su estructura química en: péptidos cíclicos, alcaloides y lipopolisacáridos (Sivonen y Jones, 1999; Brena y Bonilla, 2009; O'Neil *et al.*, 2012); o por los efectos que producen en: hepatotoxinas, neurotoxinas, citotoxinas, dermatoxinas y toxinas irritantes (Quesada *et al.*, 2006).

Hepatotoxinas

Péptidos, caracterizados como hepatopéptidos cíclicos (microcistinas) y pentapéptidos (nodularinas). Son causantes de daños adversos al hígado y promotoras de tumores, ya que ocasionan que el hígado pierda su arquitectura y desarrolle graves lesiones internas (Svirčev *et al.*, 2019).

Algunos de los géneros a los cuales pertenecen las especies que se han identificado como productoras de esta toxina son: *Microcystis*, *Anabaena*, *Cylindrospermopsis*, *Oscillatoria*, *Planktothrix*, *Nodularia*, *Anabaenopsis*, *Phormidium*, *Arthrospira*, *Nostoc* (Svirčev *et al.*, 2019).

Las microcistinas son producidas por diferentes especies de cianobacterias que habitan en ambientes acuáticos (marinos y de agua dulce) y terrestres. Ésta es la cianotoxina con mayor número de registros a nivel mundial, seguida por cilindrospermopsina, anatoxinas y saxitoxinas (Svirčev *et al.*, 2019). Es por ello que las microcistinas son unas de las cianotoxinas más estudiadas.

Estas toxinas cuentan en su estructura con dos sitios donde los aminoácidos varían, influyendo en su nomenclatura, por lo que son la cianotoxina con más variantes (Carmichael *et al.*, 1988); se conocen más de 80 tipos químicos de microcistinas

(Uriza *et al.*, 2017). Las microcistinas más encontradas son MC-LR, MC-RR y MC-YR (Ramírez-García *et al.*, 2004); éstas deben su acrónimo al aminoácido que presentan, siendo leucina (L), arginina (R) y tirosina (Y), respectivamente. La MC-LR presenta una alta toxicidad, ya que es un estimulador extremadamente potente de tumores en animales de laboratorio (Nishiwaki-Matsushima *et al.*, 1992) y se considera el más eficaz carcinógeno del hígado.

Por otro lado, las nodularinas presentan una estructura menos variable (Sivonen y Jones, 1999). Se ha encontrado, que las microcistinas y las nodularinas no sólo afectan el hígado, sino que pueden llegar a acumularse en otros tejidos y órganos de mamíferos y de peces como el corazón, las gónadas, pulmones, el cerebro y el riñón; causando un daño fisiológico, tisular y celular (Wang *et al.*, 2008). Sólo se tiene registro de la producción de las nodularinas por parte de *Nodularia spumigena* (Metcalf y Codd, 2012).

Neurotoxinas

Compuestos heterocíclicos de nitrógeno que afectan el sistema nervioso, ya que pueden polarizar o despolarizar a las células nerviosas. Dentro de éstas se encuentra la anatoxina-a, producida por especies de los géneros de cianobacterias *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Planktothrix* y *Aphanizomenon*, los tres primeros géneros también producen la anatoxinas-a(s); y las saxitoxinas son producidas por *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Lyngbya* y *Cilindrospermopsis* (Carmichael, 2001).

La anatoxina-a (ATX-a) compite con la acetilcolina en las uniones neuromusculares, lo que provoca que los nervios sigan propagando pulsos neuronales, ocasionando la despolarización de los mismos. Como consecuencia final, esto puede dar lugar a un paro respiratorio y, por lo tanto, la muerte. Se han investigado signos de envenenamiento que se pueden presentar en diferentes organismos, entre ellos se encuentran: tambalearse al caminar, fasciculaciones musculares, respirar con dificultad, convulsiones y rigidez (en aves) (Cantoral-Uriza *et al.*, 2017). La producción de ATX-a ha sido identificada en géneros de especies planctónicas y bentónicas (*Anabaena*, *Arthrospira*, *Aphanizomenon*, *Planktothrix*, *Raphidiopsis* y *Oscillatoria*) (Metcalf y Codd, 2012).

La anatoxina-a(s) (ATX-a(s)) es un potente inhibidor de acetilcolinesterasa, que provoca hipersalivación y lacrimación en mamíferos. Esta toxina puede llegar a provocar síntomas similares a los de la anatoxina-a, así como ataxia (falta de coordinación en diferentes partes del cuerpo), diarrea, hipersalivación y temblores (Cantoral-Uriza *et al.*, 2017).

Las saxitoxinas (STX) inhiben la generación de un potencial de acción funcional en las fibras musculares y nerviosas, dando lugar a parálisis o paro respiratorio. Esto por medio del bloqueo de canales de sodio regulados por voltaje en las membranas excitables (Bricelj *et al.*, 2005; Llewellyn 2006, 2009).

Citotoxinas

Toxina que inhibe la síntesis de proteínas y causa daño necrótico en las células de órganos como el hígado, pulmones, riñón e intestino. Sólo la cilindropermopsina (CYN) pertenece a esta clasificación. Hasta el momento se han identificado tres variantes estructurales de esta toxina (Metcalf y Codd, 2012). Los géneros de cianobacterias que se han registrado como productores de esta toxina son: *Cylindropermopsis*, *Lyngbya*, *Oscillatoria* y *Anabaena* (Svirčev *et al.*, 2019).

Dermatoxinas

Normalmente alcaloides, que producen dermatitis severa al contacto cutáneo e inflamación gastrointestinal al ingerirse. Parte de éstas son la lynbyatoxina y la aplisiatoxina. Estas proteínas son activadoras de la proteína quinasa C, la cual cumple un papel fundamental en la regulación del crecimiento celular (Smith *et al.*, 2008), provocando que sean potentes promotores de tumores.

1.4.2 Riesgo del potencial toxicológico de las cianobacterias

Se han reportado aproximadamente 183 casos sobre intoxicación por cianobacterias tanto en animales, como en seres humanos (Svirčev *et al.*, 2019).

El primer caso registrado de una investigación experimental que relacionaba la muerte de animales con los florecimientos de cianobacterias fue llevado a cabo por Francis (1878), quien realizó un experimento de toxicidad con ovejas, a las cuales les subministró de forma oral muestras de un florecimiento algal, donde se había

identificado *Nodularia spumigena*. Como resultado de dicho experimento, las ovejas perecieron, por lo tanto, analizó el contenido estomacal, encontrado filamentos de cianobacterias. El agente específico responsable de la intoxicación no se pudo identificar, ya que no se contaba con los avances moleculares necesarios, pero se supone que se trataba de la toxina nodularina (Metcalf y Codd, 2012).

Animales de ganado están expuestos a la intoxicación por cianotoxinas, ya que normalmente beben agua de cuerpos de agua que pueden tener florecimientos de cianobacterias. A la fecha se tiene registro de muertes de vacas por intoxicación con microcistinas, anatoxinas (Metcalf y Codd, 2012) y cilindrospermopsinas (Saker *et al.*, 1999)

Así mismo, los animales domésticos corren el riesgo de intoxicarse accidentalmente por ingestión al beber agua contaminada por cianobacterias tóxicas. Se han investigado las muertes de perros a orillas de cuerpos de agua y se ha encontrado que la principal causa de su muerte fue la ingesta de cianotoxinas (Codd *et al.*, 1992).

Por otro lado, en la vida silvestre, algunos animales filtradores se alimentan directamente de microalgas y cianobacterias, siendo directamente susceptibles a la intoxicación por cianotoxinas. Un ejemplo es *Phoeniconaias minor*, una especie de flamenco de la cual se han registrado muertes masivas periódicas en los lagos del Valle del Rift de África. Se cree que estas muertes pueden ser debido a intoxicación por microcistinas y anatoxina-a, ya que se han encontrado en su contenido estomacal (Codd *et al.*, 2003).

En el Parque Nacional Kruger, en Sudáfrica, se asoció la muerte de rinocerontes blancos, cebras y ñus con la presencia de microcistinas, lo cual se pudo relacionar con la ingesta de agua procedente de un cuerpo de agua con florecimientos de *Microcystis* (Oberholster *et al.*, 2009).

Es más común que existan casos registrados de intoxicación por cianotoxinas en animales que en seres humanos, esto se atribuye a diversas causas. Por un lado, la probabilidad de ingestión de agua contaminada es menor, ya que el agua potable

suele recibir cierto nivel de tratamiento, que previene altas concentraciones de cianotoxinas, y porque se suelen evitar las aguas con florecimientos notorios y aquellas que han afectado a animales (Carmichael *et al.*, 2001; Hilborn y Beasley, 2015). Otra posible causa es que los síntomas no llegan a ser diagnosticados como intoxicación por cianotoxinas por diversas razones: la falta de conocimiento sobre este tipo de intoxicación por parte del personal de atención médica; que el cuadro clínico es inespecífico; o que no se confirme la intoxicación, por la limitada disponibilidad y el costo de los análisis (Hilborn y Beasley, 2015).

Sin embargo, esto no quiere decir que las cianotoxinas no representen un riesgo a la salud del ser humano. Uno de los episodios más conocidos sobre intoxicación por cianotoxinas en seres humanos fue registrado en Brasil, donde 56 pacientes de hemodiálisis murieron tras haber sido tratados con agua contaminada

Se ha demostrado, que las cianotoxinas pueden bioacumularse en órganos de diferentes organismos acuáticos como el músculo de los peces, el abdomen de los camarones, y el pie de los caracoles y los mejillones (Esposito *et al.*, 2019). Como consecuencia, puede biomagnificarse dentro de la cadena alimenticia, generando un alto riesgo para los consumidores finales.

1.5 Normatividad del agua relacionada con cianotoxinas

Las cianotoxinas constituyen una de las categorías de mayor riesgo de sustancias biológicas tóxicas presentes en el agua. Es por ello, que la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó en 1999 una guía que pone de manifiesto las consecuencias en la salud pública, el monitoreo y el manejo de las cianotoxinas en el agua dulce (Chorus y Bartram, 1999).

La mayoría de los países que regulan las cianotoxinas, define los límites principalmente para el agua de uso y consumo humano, y en menor frecuencia, para aguas de uso recreativo. Aunque existen varias cianotoxinas que pueden llegar a representar un riesgo para la salud, tanto por su consumo como por entrar en contacto con ellas, en la mayoría de las regulaciones se establecen los límites para las microcistinas, mientras que otras cianotoxinas son rara vez reguladas (Ibelings

et al., 2014). Once países han desarrollado regulaciones para las microcistinas en agua potable y aguas recreativas. La mayoría de las pautas de agua potable se basan en valor provisional de la OMS para MC-LR de 1.0 µg/L (EPA, 2014). En cuanto a los lineamientos para las aguas recreativas, es más común que se utilice el número de células y/o la biomasa en términos de densidad de células, biovolumen o clorofila-a, como indicadores. Esto para facilitar el monitoreo, acelerar la intervención y tomar en cuenta la presencia potencial de otros metabolitos de cianobacterias que puedan causar síntomas dermatológicos (Ibelings *et al.*, 2014).

En Brasil, Uruguay, la República Checa, Francia y España, el valor estándar legal para la concentración de MCYST-LR en el agua del grifo es de 1 µg/L. En Canadá, la concentración provisional máxima permisible de la misma microcistina en el agua potable tratada es de 1.5 µg/L (Ibelings *et al.*, 2014).

En algunos países también se toman en cuenta otras cianotoxinas en sus regulaciones para agua potable. Por ejemplo, en Australia, Nueva Zelanda y Brasil, son reguladas las concentraciones de CYN, siendo el máximo recomendado 1 µg/L en los primeros dos, y 15 µg/L en el último, siendo ésta una gran diferencia de concentración; y de STX, 3 µg/L en los tres países. En Canadá y Nueva Zelanda, se regula la concentración de ATX-a, siendo los límites máximos permisibles de 3.7 µg/L y 6 µg/L, respectivamente (Ibelings *et al.*, 2014).

Por otro lado, países de la Unión Europea, como Alemania, Dinamarca, Grecia, Hungría y los Países Bajos, no regulan explícitamente las cianotoxinas en sus legislaciones nacionales que aplican al agua potable.

En Estados Unidos de América, la Agencia de protección del medio ambiente (*EPA*, por sus siglas en inglés) agregó la MC-LR, ATX-a y la CYN a la lista de contaminantes candidatos. Sin embargo, no existen pautas regulatorias federales para las cianobacterias o sus toxinas en el agua potable y aguas recreativas.

En el caso de México, la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994 de la Secretaría de Salud, Norma Federal que aplica para agua de uso y consumo humano, no incluye límites permisibles para número de cianobacterias, ni para

cianotoxinas por volumen de agua, a pesar de que se ha demostrado que las cianotoxinas tienen un efecto negativo en la salud. Estas regulaciones no se han implementado, a pesar de que ya se han encontrado tanto especies productoras de toxinas, como concentraciones con cifras mayores a los rangos de la OMS en cuerpos de agua que son fuentes de abastecimiento de agua potable. Un ejemplo es la presa de Valle de Bravo, ésta es una de las fuentes de abastecimiento de agua potable más importantes para la Ciudad de México, en un estudio sobre el efecto de cianotoxinas en el zooplancton, llevado a cabo de junio del 2010 a mayo del 2011 por Figueroa-Sánchez *et al.* (2014), se encontró que los cuatro taxa más comunes son *Microcystis*, *Anabaena* spp., *Aphanizomenon* spp. y *Lyngbya* sp. Aunque en ese mismo estudio, la concentración de microcistinas se registró por debajo del límite recomendado por la OMS, en un estudio realizado Ramírez-García *et al.* (2004) registraron cifras por arriba del límite en julio del 2001.

1.6 Métodos de detección y análisis

Debido a la importancia de la presencia y concentración de cianotoxinas en el agua, por representar un riesgo potencial para la salud humana y animal, actualmente, se hace uso de diversos métodos para la detección de cianotoxinas.

Por un lado, éstos se encuentran orientados a la identificación de las especies por morfología, apoyados con la valoración de la toxicidad mediante bioensayos. Los bioensayos se han llevado a cabo en ratones, peces y otros organismos acuáticos pertenecientes a los géneros *Daphnia* o *Artemia*, y anfibios (Cantoral-Uriza *et al.*, 2017).

Por otro lado, se cuenta con análisis fisico-químicos para detección de toxinas, como el HPLC (*High Performace Liquid Chromatography*) y técnicas genéticas, para diferenciar géneros e incluso cepas tóxicas dentro de una misma especie, a partir de determinadas secuencias de material genético (Roset *et al.*, 2001; Hisberger y Christiansen, 2003).

También se han empleado kits de *ELISA* (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, por sus siglas en inglés); estudio inmunológico donde se emplean anticuerpos monoclonales y se pueden visualizar las cianotoxinas en microgramos,

gracias a una reacción de la enzima peroxidasa (Chu *et al.*, 1990). Gracias a los avances tecnológicos se desarrolló un sensor fotoeléctrico con alta sensibilidad y selectividad, que es capaz de medir la MC-LR (Chen *et al.*, 2012)

Como se mencionó, dentro de una misma especie de cianobacteria, existen cepas productoras y no productoras de toxinas. Por ello, más recientemente, se ha usado como alternativa pruebas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (*PCR*, por sus siglas en inglés), para la detección específica de los genes responsables de la producción de las toxinas, sin embargo, la presencia de los genes no asegura que estén activos, produciendo toxinas. Durante este proceso, las cadenas individuales del ADN blanco son duplicadas por una enzima en cada ciclo de la reacción, y las cadenas nuevas resultantes vuelven a ser duplicadas por la misma enzima. Con ello se logra una producción de copias del gen o segmento de ADN sometido al proceso (Lo, 1998).

1.7 Parque Nacional “Lagunas de Montebello”

El Parque Nacional “Lagunas de Montebello” se encuentran en una zona de origen kárstico, es decir, que se forma a partir de la disolución del sustrato de carbonato de calcio; esto genera rocas con alta porosidad y permeabilidad, “favoreciendo el intercambio de agua y materia orgánica desde la superficie a las cavidades subsuperficiales o viceversa” (Mora *et al.*, 2016). Debido a la propiedad kárstica del sitio, se han formado alrededor de 59 lagos y, a su vez, se han creado sistemas subterráneos, como canales, que conectan los lagos unos con otros.

Cabe recalcar que, a pesar de que el nombre del sitio es “Lagunas de Montebello” los cuerpos de agua que se encuentran en el mismo son lagos. Las lagunas son cuerpos de agua poco profundos, que se encuentran separados de un cuerpo de agua de gran extensión (como el océano) por barreras naturales, como bancos de arena y arrecifes. Por otro lado, los lagos se definen como un gran depósito natural de agua en una depresión del terreno, que puede o no tener fuentes de abastecimiento y/o desembocaduras. Es por ello, que a lo largo de este trabajo los cuerpos de agua se denominarán como lagos y el sitio y sistema como “Lagunas de Montebello”.

En cuanto a los nutrientes, su agua se caracteriza por ser siempre rica en bicarbonato cálcico y, frecuentemente, en sulfatos. A su vez, la alta concentración de calcio determina la pobreza de fósforo (Margalef, 1983).

Esta región tiene una gran importancia ecológica, cultural y económica para el país, por lo que se constituyó como Área Natural Protegida mediante decreto presidencial, publicado en el Diario Oficial de la Federación (16 de diciembre de 1959) y fue designado como sitio RAMSAR en 2003 (DOF, 2004). Entre los bienes y servicios ecológicos que proporcionan los ecosistemas de esta región se incluyen la regulación climática, el resguardo del patrimonio genético, la absorción de gases de efecto invernadero, el mantenimiento de recursos hídricos, la conservación de suelos, la producción de recursos forestales maderables y no maderables, la preservación de valores paisajísticos y hábitat para una amplia diversidad de flora y fauna (SEMARNAT-CONANP, 2007).

Este sistema hidrológico se considera muy vulnerable a la contaminación debido a las características de permeabilidad de la roca y a la profundidad del nivel estático, siendo las fuentes potenciales de contaminación la lixiviación e infiltración de residuos sólidos municipales, la descarga de aguas residuales no tratadas, entre otros (CFE, 2012). Por ello, diversas actividades que se llevan a cabo en esta zona representan un riesgo para el sistema acuático, entre estas actividades se encuentran: la agricultura, la pesca, la ganadería y el turismo.

Como parte de las acciones tomadas para reducir el impacto de las actividades humanas en el sistema acuático, en el poblado de Comitán se construyó una PTAR de aguas residuales, basada en lagunas de oxidación, cuya descarga se vierte en el Río Grande. Sin embargo, se ha reportado que esta planta ha tenido un impacto negativo sobre el sistema lótico, ya que su operación no es la adecuada y, en lugar de mejorar la calidad del agua descargada, la disminuye (Alvarado Velázquez, 2017).

2. ANTECEDENTES

2.1 Cianobacterias y cianotoxinas en México

En México se han llevado a cabo diferentes estudios en los que se describe la diversidad de cianobacterias encontradas en diferentes cuerpos de agua, así como la detección de cianotoxinas por diversas técnicas, donde prevalecen la microscopía y los ensayos ELISA.

Uno de ellos fue realizado por Martínez Romero *et al.* (2002), quienes a través de la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), llevó a cabo la identificación y cuantificación de microcistina-LR en el embalse Valle de Bravo en el Estado de México entre los años 1999 al 2001, destacando la importancia de ampliar el estudio de la diversidad y toxicidad de cianobacterias en México, así como la necesidad de tomar medidas preventivas en agua para consumo humano y uso recreativo.

En el 2002, se publicó un estudio donde se describieron 51 morfoespecies planctónicas encontradas en varios cuerpos de agua de la región central de México en 1992 y 1993 (Komárek y Komárkova-Legnerová).

Vasconcelos *et al.* (2010) utilizaron técnicas moleculares, inmunológicas y químicas, para determinar la concentración de microcistinas en lagos naturales y urbanos, en reservorios y en canales antropogénicos. En este estudio se encontraron concentraciones de MC-LR que representan un riesgo para la salud humana. Debido a los diversos usos que se les da a estos cuerpos de agua, como uso recreativo y fuente de agua potable y de riego, se hizo evidente el riesgo para la salud que representa al no controlar las concentraciones de cianotoxinas.

Torres-Ariño y Enrique Mora Heredia (2010) evaluaron la toxicidad de 7 cepas de cianobacterias muestreadas en las costas de Oaxaca y Chiapas, identificaron las especies morfológicamente y analizaron su toxicidad por medio de bioensayos con *Artemia sp.*, *Litopenaeus vannamei* y en ratón (*Mus musculus*).

Otras especies que han sido registradas como productoras de toxinas y que se han encontrado en cuerpos de agua del país son: *Aphanizomenon gracile*, *Microcystis*

aeruginosa, *Microcystis pulvera*, *Anabaena affinis* (Tomasini-Ortiz *et al.* 2012), *Anabaena* spp. y *Microcystis* spp (Figuroa-Sánchez *et al.*, 2014).

En el 2013, Quiblier *et al*/realizaron una revisión sobre las cianobacterias bentónicas tóxicas en aguas dulces. Abarcan su ecología, las especies productoras de toxinas, los parámetros que influyen en la formación de los florecimientos bentónicos y la producción de toxinas, así como su impacto en otros organismos, y las estrategias de monitoreo y manejo.

2.2 Investigación en las “Lagunas de Montebello”

Debido a la importancia del sistema acuático “Lagunas de Montebello”, y los cambios de coloración que se ha presentado en el mismo, derivadas de las actividades antropogénicas, se han realizado diferentes estudios en varios campos del conocimiento.

Durante los años 2011 y 2012, la Comisión Federal de Electricidad (CFE) realizó un análisis diagnóstico de las características físico-químicas del agua de diferentes lagunas del Parque Nacional “Lagunas de Montebello”, con el objetivo de presentar un plan integral, así como la cuantificación y diagnóstico hidrográfico de los cauces que confluyen en el sistema.

Almeida (2014) comparó la estructura de la comunidad de fitoplancton de 17 lagos del Parque Nacional “Lagunas de Montebello”, con base en la composición funcional y taxonómica, durante la temporada climática cálida-seca. Los grupos más relevantes encontrados, en términos de su biomasa, fueron Cyanobacteria y Heterokontophyta. Clasificó en un grupo a los lagos caracterizados por la dominancia de cianobacterias filamentosas con alta biomasa, dentro del cual se encuentran los lagos: Liquidámbar, Peineta, Vuelta el Agua, Chilpotrero, Bosque Azul, Encantada y Tierra Colorada. Por otro lado, menciona las especies de cianobacterias que se han encontrado en la zona, con fundamento en la base de datos de AlgaeBase (2013):

- *Anabaena* sp.
- *A. spiroides*
- *Anabaenopsis circularis*

- *Aphanothece* sp.
- *Arthrospira* sp.
- *Chroococcus* sp.
- *Coelomoron* sp.
- *Coelsphaerium kuetzingianum*
- *Cyanobacterium synechocoides*
- *Cyanodictyon imperfectum*
- *Cyanothece* sp.
- *Cylindrospermopsis cuspis*
- *Limnothrix mirabilis*
- *Merismopedia marssonii*
- *M. trolleri*
- *Microcystis wesenbergii*
- *Planktothrix suspensa*
- *Pseudoanabaena acicularis*
- *P. limnetica*
- *P. mucicola*
- *Rhabdoderma lineare*
- *Romeria leopoliensis*
- *Synechocystis aquatilis*

Durante el 2014, Fernández *et al.* (2020) realizaron muestreos de zooplancton en 18 de los lagos, para determinar la biodiversidad de comunidades de estos organismos. Se encontró, que los lagos eutróficos presentan una mayor riqueza específica y comparten más especies entre ellos que los lagos oligotróficos. Los resultados demostraron, que son ecosistemas frágiles y su biodiversidad se puede ver afectada por la contaminación.

Nueve de los lagos pertenecientes a este sistema lacustre (Liquidámbur, Bosque Azul, San Lorenzo, Chaj Chaj, Ensueño, Esmeralda, La Encantada, Balamtetik y Patianú) fueron evaluados por Hernández (2015) en cuanto a su estado trófico y distribución vertical de la clorofila fitoplanctónica. En este estudio se determinó que el aumento de la biomasa fitoplanctónica se reflejó en un cambio de coloración del agua en los lagos impactados.

Por otro lado, Mora *et al.* (2016) llevaron a cabo la delimitación de las principales unidades geomofológicas de la cuenca del Río Grande de Comitán, para comprender la diferenciación, evolución del paisaje y los procesos que han

favorecido el desarrollo del mismo, permitiendo comprender mejor el comportamiento hidrológico del sistema lacustre.

Rivera-Herrera *et al.* (2020) realizaron muestreos del 2015 al 2017 en 16 lagos del Parque Nacional “Lagunas de Montebello” con diferentes grados de impacto, para evaluar la diferencia de concentración de biomasa fitoplanctónica entre las columnas de agua de los lagos impactados y los prístinos. Encontraron, que la concentración es mayor en los lagos impactados que en los no impactados, y que la biomasa suele concentrarse en la superficie de los primeros y en el fondo de los segundos. Así mismo, infieren que el mayor desarrollo del fitoplancton en los lagos impactados se debe a la contaminación por descargas del Río Grande de Comitán y al escurrimiento tanto de nutrientes, como de materia orgánica provenientes de los cultivos.

El cambio de coloración en los lagos llamó la atención de diversos investigadores, quienes realizaron estudios para determinar el impacto que han tenido las actividades humanas en los lagos. Uno de los estudios fue realizado por Alcocer *et al.* (2018), en el cual analizaron dos lagos prístinos y dos impactados con el fin de identificar los cambios y las causas probables de éstos. Determinaron, que los lagos impactados se encuentran ubicados en la zona noroeste, éstos son alimentados principalmente por fuentes superficiales (Río Grande y esorrentías), lo que los expone a las actividades humanas y los vuelve vulnerables ante la contaminación del agua y el deterioro ambiental. Mientras que los lagos prístinos se encuentran en el Sureste y son alimentados principalmente por agua subterránea, por ello, se encuentran menos expuestos a las actividades humanas, permitiendo que mantengan una mejor calidad ambiental.

Uno de los últimos trabajos publicados sobre la zona fue el de Segundo (2019), quien realizó un estudio sobre los sedimentos de nueve de los lagos. Para ello analizó textura, carbono, nitrógeno y azufre elemental, así como porcentaje de materia orgánica y carbonatos. La información obtenida la relacionó con las concentraciones de seston, carbono orgánico particulado, clorofila-a y parámetros físico-químicos del agua. Clasificó en cuatro grupos a los lagos, de acuerdo con su

profundidad e impacto: somero prístino (Esmeralda), somero impactado (Balamtetik), profundo prístino (Cinco Lagos, Dos Lagos, Ensueño, Kichail y Patianú), y profundo impactado (La Encantada y San Lorenzo).

3. JUSTIFICACIÓN

A pesar de que el sistema lacustre “Lagunas de Montebello” es un Área Natural Protegida, actualmente muchos impulsores de cambio ejercen presión sobre estos ecosistemas. Los principales problemas que afectan los lagos son los desechos generados por los asentamientos humanos, la presión sobre el agua para uso doméstico y consumo humano, el cambio de uso de suelo para la agricultura, la introducción de pastizales y los incendios forestales (Román y Martínez, 2006).

En el 2003 se reportó un cambio de coloración en los lagos del Parque Nacional “Lagunas de Montebello”, cambiando de un color azulado y transparente a un amarillento-verdoso; también se reportaron natas blancas-amarillentas, un olor desagradable y mortandad de peces (Vargas Sánchez, 2019). Este fenómeno se relaciona en algunos estudios como una respuesta del ecosistema al aumento en la biomasa de fitoplancton, consecuencia de la creciente eutroficación de los lagos (Rask *et al.*, 1993; Planas *et al.*, 2000).

Parte de estos organismos fitoplanctónicos son las cianobacterias, cuya nocividad radica en la producción de metabolitos secundarios, entre ellos las cianotoxinas. Esto representa un riesgo para la salud de los ecosistemas y para la salud humana. Las comunidades aledañas a estos lagos hacen uso del agua, tanto para abastecimiento de agua para uso y consumo humano, como para consumo por parte del ganado. Sin embargo, no hay suficientes estudios que caractericen los florecimientos de cianobacterias a nivel biológico y ecológico, para determinar las causas de estos crecimientos y su potencial efecto en el ecosistema.

Esto último es de gran importancia, ya que el reconocimiento taxonómico sobre la identidad y ecología de estos organismos puede servir para conocer las condiciones que ocasionan que los florecimientos se vuelvan más frecuentes y abundantes. Así mismo, la determinación de los géneros que forman estos florecimientos y su

potencial toxicológico permite evaluar el riesgo que conlleva el aumento en su biomasa a causa de las condiciones ambientales que les favorecen.

Es por estas razones y con el fin de contribuir al conocimiento de los florecimientos, que este estudio cobra importancia, por llevar a cabo la caracterización de la diversidad de cianobacterias presentes en el sistema hidrológico “Lagunas de Montebello”, los factores ambientales que favorecen tanto la presencia como la ausencia de ciertas especies, así como evaluar su potencial toxicológico.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Caracterizar la diversidad de cianobacterias planctónicas y su relación con los factores ambientales presentes en el sistema hidrológico del Parque Nacional “Lagunas de Montebello” mediante métodos fenéticos y moleculares, así como su potencial toxicológico.

4.2 Objetivos particulares

- I. Describir y analizar fenéticamente la comunidad de cianobacterias planctónicas a partir de muestras de campo.
- II. Analizar la relación entre los parámetros ambientales y las abundancias de las poblaciones de cianobacterias.
- III. Corroborar la diversidad e identidad taxonómica de las cianobacterias con base en el fragmento del gen 16S rRNA.
- IV. Determinar la presencia de genes involucrados en la producción de microcistina y anatoxina por medio de técnicas moleculares.
- V. Evaluar la potencial toxicidad de los consorcios de cianobacterias obtenidos a partir de las muestras de campo, y la dosis letal media, por medio de bioensayos con *Artemia salina*.

5. ÁREA DE ESTUDIO

El Parque Nacional “Lagunas de Montebello” se localiza en la región sureste del estado de Chiapas, en la frontera con Guatemala. Abarca una superficie de 6,425 hectáreas y comprende parte de los municipios La Independencia y La Trinitaria,

95% del Área Natural Protegida se encuentra en este último. Sus coordenadas extremas son 16° 04'40'' a 16° 10'20'' para latitud norte y 91° 37'40'' a 91° 47'40'' para longitud oeste. El intervalo altitudinal va de los 1,380 a los 1,740 msnm. Este sistema está comprendido en la Región Hidrológica Nacional No. 30 Grijalva-Usumacinta y forma parte de la subcuenca del Río Grande de Comitán, que a su vez es parte de la cuenca del Río Lacantún (CONANP, 2011).

Según García (1981), en el Parque se presenta un clima de tipo C(fm), templado húmedo con lluvias todo el año y en el extremo noroeste A(cm) cálido húmedo, con abundantes lluvias en el verano. Se presenta una temperatura media mensual de 23.6°C con una oscilación térmica anual de 5.6°C (CONANP, 2011). La precipitación media anual es de 2,279mm (Alcocer *et al.*, 2016).

El afluente principal de la cuenca del Río Grande de Comitán es el Río Grande, el cual es alimentado por el lago Juznajib, ubicado en la parte alta de la cuenca (Mora *et al.* 2016) y recorre zonas urbanas y agrícolas hasta desembocar en el sistema “Lagunas de Montebello”. Las aguas que alimentan esta zona son principalmente subterráneas, lo cual da lugar al origen kárstico del sistema (Vázquez y Méndez, 1994)

El complejo lacustre está constituido por cerca de 59 lagos, los cuales se integran en diferentes sistemas lagunares. El Sistema Tepancoapan es uno de los principales, ya que tiene una extensión de 13km de longitud, es considerado un cuerpo de agua continuo y está compuesto por los lagos San Lorenzo, Bosque Azul, Peninsular, Encantada, Esmeralda, Bartolo y Peñasquito, los cuales se comunican en época de lluvias por la inundación de sus áreas colindantes (CONANP, 2007). En la Tabla 1, modificada de Almeida (2014) se mencionan el uso del suelo y la vegetación circundantes a los sitios naturales muestreados.

Tabla 1. Uso de suelo y vegetación en la periferia de los sitios muestreados (modificado de Almeida, 2014). PTAR: de Tratamiento de Aguas Residuales.

Lago	Vegetación y uso del suelo
PTAR	Pastizal y agricultura en toda la periferia.
Efluente	Pastizal y agricultura en toda la periferia.
El Carrizal	Pastizal al norte y suroeste, bosque de coníferas noroeste y agricultura en el resto de la periferia.
Balamtetik	Pequeña porción de agricultura al norte.
Chaj Chaj	Pastizal inducido al noreste, y bosque de pino-encino con vegetación secundaria arbórea.
San Lorenzo	Zonas de agricultura y pastizal inducido al este y al sur, y bosque mesófilo de montaña en el resto de su periferia.
Chilpotrero	Zona de agricultura al norte, zona de agricultura y pastizal inducido al oeste, y bosque de pino-encino con vegetación secundaria arbórea al este.
Paso del Soldado	Pastizal y bosque mesófilo al norte, agricultura en el resto de la periferia.
Bosque Azul	Pequeña zona de agricultura al norte y al oeste; zona de popal-tular al sur; bosque de pino-encino en la mayor parte de su periferia.
Encantada	Pequeña área de bosque mesófilo de montaña al noroeste; bosque de pino-encino en la mayor parte de la periferia.
Ensueño	Bosque mesófilo en toda la periferia.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Toma de muestras

Los lagos en los que se llevó a cabo el muestreo fueron seleccionados con base principalmente en dos criterios: por un lado, aquellos lagos que, por características visuales (coloración amarillenta-verdosa) parecían presentar florecimientos de cianobacterias; por otro lado, lagos de aguas cristalinas con poca intervención

humana, que pudieran funcionar como controles naturales. Esta selección fue pensada con el fin de generar un gradiente trófico y evaluar así el cambio en las comunidades de cianobacterias planctónicas a causa del aumento en la intervención humana. Los lagos muestreados fueron: Ensueño, San Lorenzo (lagos de poca intervención), El Carrizal, Chilpotrero, Bosque Azul, Paso del Soldado, La Encantada, Balamtetik, Chaj Chaj (lagos intervenidos) (Figura 1). Así mismo se llevó a cabo el muestreo en la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR), tanto en uno de los pozos como en el efluente de la planta (Figura 1), ya que se encontraron florecimientos en dichos sitios y se buscó establecer una conexión entre las aguas tratadas de la PTAR y los lagos.

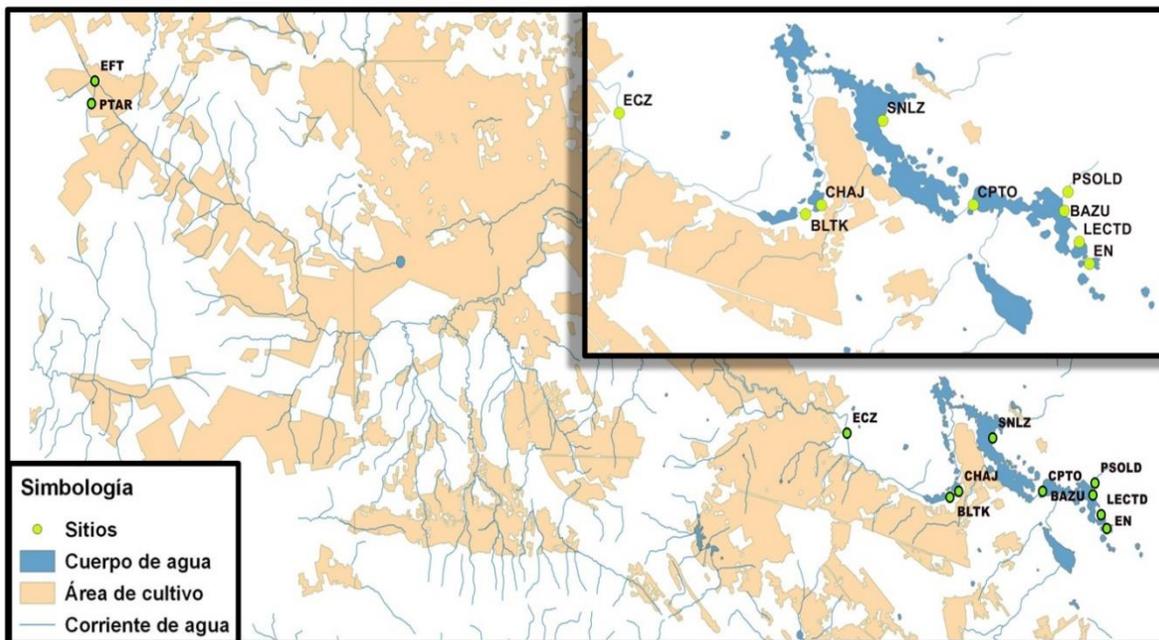


Figura 1. Sitios de muestreo: Efluente (EFT), Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR), El Carrizal (ECZ), Balamtetik (BLTK), Chaj Chaj (CHAJ), San Lorenzo (SNLZ), Chilpotrero (CPTO), Paso del Soldado (PSOLD), Bosque Azul (BAZU), La Encantada (LECTD), Ensueño (EN).

La toma de muestras planctónicas se llevó cabo durante agosto del 2019, con una red de malla con apertura de 40µm y 10m de cuerda. Se realizaron tres arrastres por sitio desde la orilla; el primer arrastre se usó para purgar la red, por lo que sólo se colectó lo extraído del segundo y tercer arrastre como una muestra concentrada. Específicamente, el arrastre se hizo donde el agua presentaba un tono azulado,

indicando la posible presencia de una floración de cianobacterias; usualmente a orillas de los lagos, donde por los efectos del viento, los organismos fitoplanctónicos tienden a acumularse.

Para la caracterización físico-química de los sitios de estudio se midieron los siguientes parámetros *in situ* de la superficie, con la sonda multiparamétrica marca YSI, modelo 6600 V2: temperatura (T), pH, conductividad (K25), sólidos disueltos totales (SDT), oxígeno disuelto (OD), oxígeno total (O₂), turbidez, Clorofila-a (Clor-a), ficocianinas y ficoeritrinas (Bga), amonio (N-NH₄) y nitrato (NO₃).

6.2 Abundancias

Se estimó la abundancia de las morfoespecies a partir del conteo en microscopio óptico usado una cámara Neubauer mejorada, con una profundidad de 0.1mm y un área de 0.0025mm² del cuadrado más chico. Para el conteo se utilizaron los cuadrantes de los extremos, los cuales están divididos en un conjunto de 4x4 y tienen un área total de 1mm². Se examinaron submuestras de 20μL a partir de los 50ml de la muestra inicial fijada, proveniente de los arrastres. Se realizó el conteo de cada morfoespecie en los cuatro cuadrantes extremos y se llevaron a cabo cuatro repeticiones por muestra. Para calcular la abundancia a partir de los conteos se utilizó la siguiente ecuación:

$$Abundancia \left(\frac{cel}{ml} \right) = \frac{\text{número de células}}{\text{número de cuadrantes}} * 10,000$$

6.3 Análisis de los parámetros físico-químicos con base en las abundancias

A partir de la matriz de abundancias y la matriz de parámetros físico-químicos se llevó a cabo un análisis BEST, para determinar aquellos parámetros ambientales que tienen mayor relación con la matriz de abundancias de cianobacterias en los sitios evaluados. Este análisis no discrimina por sitio de muestreo, por lo tanto, los parámetros obtenidos son a nivel de todos los estudiados.

Por otro lado, se analizó por medio del test ANOSIM (análisis de similitud) la existencia de diferencias significativas entre los sitios, con respecto a la matriz de abundancias biológicas, en función de los siguientes factores ambientales: tipo de sistema (río o lago), cercanía a agricultura y urbanización, y conexión superficial con otro lago en tiempos de lluvia (Tabla 2). Estos análisis fueron tomados como significativos cuando la R global fuera menor al 5% y la significancia de 0.05, condiciones que permiten rechazar la hipótesis nula de igualdad en las comunidades biológicas (Clarke y Gorley, 2006).

Para llevar a cabo los análisis, la matriz de abundancias fue transformada con el algoritmo raíz cuadrada y la matriz ambiental fue estandarizada. Para los análisis ANOSIM se construyó una matriz triangular de similitud con base en el algoritmo de Bray-Curtis. Todos los análisis fueron corridos con el programa estadístico PRIMER V (Clarke y Gorley, 2006).

Tabla 2. Factores ambientales utilizados para el análisis ANOSIM. Donde: Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR), Efluente (EFT), El Carrizal (ECZ), Balamtetik (BLTK), Chaj Chaj (CHAJ), San Lorenzo (SNLZ), Chilpotrero (CPTO), Paso del Soldado (PSOLD), Bosque Azul (BAZU), La Encantada (LECTD), Ensueño (EN).

Sitio	Sistema	Agricultura	Urbanización	Conexión superficial
PTAR	Lago	No	Si	No
EFT	Río	No	Si	No
ECZ	Río	Si	Si	No
BLTK	Río	Si	Si	No
CHAJ	Lago	No	Si	No
SNLZ	Lago	Si	No	Si
CPTO	Lago	Si	No	No
PSOLD	Río	Si	No	No
BAZU	Lago	Si	No	Si
LECTD	Lago	No	Si	Si
EN	Lago	No	Si	No

6.4 Caracterización fenética de las muestras

Se llevó a cabo la observación de las muestras vivas y fijas en formol al 4% en microscopio, se caracterizó la morfología y se midieron parámetros a partir de fotografías, con el software computacional ImageJ, para obtener datos morfométricos.

Así mismo, se observaron y describieron los siguientes aspectos: forma y color del filamento, forma de las células vegetativas, presencia/ausencia de heterocitos, así como su forma y distribución en caso de presentarse. La identificación taxonómica se llevó a cabo con el uso de literatura especializada, siguiendo los criterios establecidos por Komárek y Anagnostidis para Oscillatoriales (1999) y Chroococales (2005), y para Nostoccales (1989).

Para cada población identificada morfológicamente como oscillatorial, se midieron en réplicas de 50 medidas el largo y ancho del filamento y de las células vegetativas. A estos datos se les realizó una ANOVA, para determinar la presencia de diferencias significativas, y se llevó a cabo una prueba de Tukey, para identificar las poblaciones que se diferenciaban o asemejaban en cada grupo.

6.5 Biología Molecular

Los análisis moleculares se llevaron a cabo en cinco muestras, correspondientes a los sitios donde se encontraron las mayores concentraciones de biomasa multiespecífica (PTAR, EFT, ECZ, BLTK y CHAJ). Las muestras de los sitios restantes tuvieron una baja densidad de biomasa y no fue posible analizarlas.

6.5.1 Extracción de ADN

De las muestras vivas recolectadas, se realizó la extracción de ácidos nucleicos a partir de dos procedimientos. Primero se llevó a cabo la centrifugación de las muestras para separar el líquido de las células las cuales se sometieron a una ruptura mecánica con el uso de un pistilo de plástico. Posteriormente, se usó el kit de extracción DNeasy UltraClean Microbial de QIAGEN, siguiendo el protocolo de extracción.

6.5.2 Amplificación de la secuencia del gen 16S de ARN ribosomal

La amplificación de la secuencia del gen 16S de ARN ribosomal (16S ARNr) se realizó mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), con la siguiente mezcla de reacción: agua mili-Q, PCR Buffer 10X (Mg²⁺+plus), Cl₂Mg (50 mM) desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP's 50 µM), BSA 0,1% (albúmina de suero bovino) y la Thermoscientific DreamTaq DNA Polymerase: 20 y 500 unidades/µL, utilizando los oligonucleótidos 27F (5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3') (Weisburg *et al.*, 1991) y 23Sr (5'- CTTCGCCTCTGTGTGCCTAGGT- 3') (Lepère *et al.*, 2000)

Los ciclos térmicos usados para la reacción en cadena de la polimerasa fueron los siguientes: desnaturalización a 94°C por 5 min; 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 45 min; alineamiento a 57°C por 45 min.; y elongación a 68°C por 2 min; por último, elongación a 68°C por 7 min.

Posteriormente, se realizó una electroforesis en gel de Agarosa al 0.8% con Red gel (Nucleid Acid Gel Stain) un tipo de tinción de los ácidos nucleicos que facilitan la visualización de las bandas en la electroforesis. El producto de la PCR se purificó con el kit de purificación de Promega Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, siguiendo el protocolo del kit. Los productos purificados se denominaron de la siguiente manera para facilitar su manejo: 40 (BLTK), 41 (CHAJ), 42 (ECZ), 43 (PTAR) y 44 (EFT). Las muestras se almacenaron a -20 °C.

Por último, se llevó a cabo la cuantificación de ácidos nucleicos por medio del espectrofotómetro NanoDrop, para conocer la concentración de ADN en los productos purificados y así determinar el volumen necesario para las siguientes pruebas.

6.5.3 Clonación

A partir del producto purificado de la PCR se realizó la clonación del fragmento de interés con el kit de ligación pGem-T Easy Vector System de Promega con los siguientes reactivos para cada muestra: 5 µL de Rapid Ligation Buffer 2x, 0.5 µL de pGEM-T Easy Vector, 3 µL del producto purificado de PCR y 1 µL de T4 DNA Ligasa. Se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente.

Posteriormente, se llevó a cabo la transformación utilizando la cepa competente de *Escherichia coli* DH5a. Se colocaron 50 µL de la cepa en cada tubo de ligación y se incubaron por 30 min en hielo, después durante 2 min en baño María a 42°C, luego en hielo por 10 min y, por último, se agregaron 400 µL de medio LB líquido (Bertani, 1951) y se incubaron a 37°C con movimiento circular a 200 rpm. Las cepas transformadas se sembraron en placas de medio modificado LB sólido con 30 µl de Ampicilina y X-Gal (1 µL/mL) y 125 µL de IPT6, y se incubaron a 37°C durante 24 horas.

Para verificar la presencia del inserto en las colonias transformadas, se identificaron de manera visual las colonias que por su coloración blanca (que denota la imposibilidad de procesar la lactosa) posiblemente tuviesen el inserto, éstas se numeraron y se seleccionaron aquellas más aisladas y de mayor tamaño, para probar la presencia del inserto por medio de electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Los clones que dieron un resultado positivo fueron: 40-1 (BLTK), 41-1 y 41-2 (CHAJ), 42-2 y 42-9 (ECZ), 43-3 (PTAR) y 44-2 (EFT). Tanto los clones positivos por PCR, como los presuntivos por coloración fueron resembrados para favorecer su crecimiento aislado.

6.5.4 Secuenciación y alineamiento

A partir de las clones positivos por PCR, se realizó la extracción y purificación de los plásmidos de las células competentes obtenidas por medio del kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System de Promega. Los plásmidos obtenidos se enviaron a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología de la UNAM con los primers T7, 684F y SP6, para su secuenciación.

Las secuencias obtenidas se alinearon, limpiaron y ensamblaron con el programa BioEdit versión 7.2.6.1., se guardaron en un archivo FASTA y se introdujeron en el GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) para un análisis BLAST, donde se seleccionaron las secuencias que presentaron entre un 98 a 100% de similitud con la muestra analizada, con el objetivo de generar mayor certidumbre en la identidad taxonómica de los individuos analizados.

6.6 Caracterización molecular de las toxinas de los consorcios de las muestras naturales

Así mismo, se realizaron pruebas PCR a los clones (40, 41, 42, 43 y 44) para la detección de los genes que codifican para las toxinas microcistinas y anatoxinas. Para la amplificación, se utilizaron un par de oligonucleótidos para cada toxina: HEPF (5'-TTTGGGGTAACTTTTTGGGCATAGTC-3') y HEPR (5'-AATTCTTGAGGCTGTAAATCGGGTTT-3') para microcistina (Jungblut y Neilan, 2006); y ATXOAF (5'-TCGGAAGCGCGATCGCAAATCG-3') y ATXAR (5'-GCTTCCTGAGAAGGTCCGCTAG-3') para anatoxinaS. Posteriormente, se siguió el mismo protocolo de purificación, clonación y minipreps mencionados, para el análisis de la secuencia del 16S ribosomal. Los productos fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa, utilizando un control positivo.

6.7 Bioensayo

6.7.1 Extracción de metabolitos secundarios

La extracción se llevó a cabo conforme al procedimiento estándar de extracción de clorofila-a, propuesto en el manual de la Asociación de Salud Pública Americana "Standard Methods for the examination of water and wastewater, 18ª Ed. (Modificado de acuerdo con Wetzel y y Likens, 1991).

Se colocó el alga sobre papel absorbente y se registró el peso fresco. La biomasa obtenida se transfirió a un tubo de centrifuga, se le agregaron 5mL de acetona, se maceró con un pistilo y se aforó a 10 mL. Se envolvieron los tubos con aluminio, para evitar la fotooxidación, y se guardaron en el refrigerador por 24 horas.

Posteriormente, se transfirió el extracto a una celda, para medir la absorbancia a 665 y 750 nm, usando acetona como blanco. El extracto se guardó en el refrigerador en oscuridad.

Se realizó una segunda extracción de la misma muestra, llevando a cabo los mismos pasos y se midió la absorbancia de la segunda extracción, la cual se juntó con la primera extracción y se sumaron los volúmenes.

Los extractos se evaporaron mediante un rotavapor y se conservaron en congelación a -20°C hasta su uso.

6.7.2 Cultivo de *Artemia salina*

Los quistes de *Artemia salina* se cultivaron en matraces estériles con medio salino (33g sal/1L agua destilada) a una temperatura de 21-23°C, un pH de 10, y con aireación continua a baja intensidad (con bomba de pecera). Éstas eclosionaron a las 24 horas y se mantuvieron por 48 horas más en las mismas condiciones, hasta comenzar el bioensayo.

6.7.3 Bioensayo

El bioensayo se llevó a cabo en placas multipocillo, con 96 pocillos. Se colocaron de 10-12 *Artemias* por pocillo con 100 µL de medio salino, se agregaron las distintas concentraciones del extracto (20, 40, 75, 125 y 175 µL) más un control libre de extracto, por triplicado, y se aforó con agua salina para tener un volumen total de 300 µL en cada pocillo. Las placas se cubrieron con parafilm y se mantuvieron a una temperatura de 21-23°C. A las 24 y 48 horas se realizó el conteo de los individuos de *Artemia* muertos (es decir, que no presentaban movimiento).

Para el cálculo de la dosis letal media (DL₅₀) se utilizó el porcentaje de nauplios de *A. salina* muertos a las 48 horas de exposición al extracto. La DL₅₀ se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$Y = a + b * X$$

donde: y = Mortalidad; X = Log (Dosis); a = intercepto; b = pendiente de la recta

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Caracterización físico-química de los sitios de estudio

Las características físico-químicas registradas en el estudio fueron: temperatura (T), pH, conductividad (K₂₅ µS/cm), sólidos disueltos totales (SDT NTU), oxígeno disuelto (OD%), oxígeno total (O₂ mg/L), turbidez (NTU), clorofila-a (Clor-a µg/L), ficocianinas y ficoeritrinas (Bga µg/L), amonio (NH₄ mg/L) y nitrato (NO₃ mg/L) (Tabla 3).

Tabla 3. Características fisicoquímicas de los sitios. Temperatura (T), pH, conductividad (K_{25}), sólidos disueltos totales (SDT), oxígeno disuelto (OD), oxígeno total (O_2), turbidez, Clorofila-a (Clor-a), ficocianinas y ficoeritrinas (Bga), amonio ($N-NH_4$) y nitrato (NO_3).

Sitio	T °C	pH unidades	K_{25} ($\mu S\ cm^{-1}$)	SDT NTU	OD %	[O_2] mg/L	Turbidez NTU	Clor-a $\mu g/L$	Bga $\mu g/L$	N- NH_4 mg/L	NO_3 mg/L
EFT	25.7	7.28	1476.70	946	10.4	8.81	65.71	59.58	9.4	0.63	90.1
PTAR	24.8	9.09	684.40	447	128.2	10.63	207.88	154	144.23	0.41	5.45
ECZ	23.7	7.87	602.30	401	92	7.76	10.08	10.33	1.86	3.18	29.99
CPTO	25.2	8.31	530.10	343	95.5	7.87	5.86	1.99	1.64	0.07	0.83
EN	24.8	8.18	273.30	178	85.8	7.1	0.12	0.13	-0.1	0.02	0.59
BAZU	25.2	8.2	472.10	306	84.1	6.92	1.86	-0.26	-1.14	0.05	0.79
LECTD	24.9	8.14	448.00	292	85.2	7.04	1.37	0.85	-1.18	6.71	24.99
SNLZ	25.5	8.68	589.00	379	119.6	9.78	23.77	5.62	14.63	0.08	15.46
PSOLD	25.0	7.87	469.20	305	54.4	4.48	2.59	1.2	0.32	0.08	0.81
CHAJ	24.0	8.56	620.40	410	61.3	5.17	36.13	33.57	53.84	0.22	3.24
BLTK	23.1	8.49	657.90	444	43.4	3.67	23.39	164.49	32.15	0.58	19.04
Prom.	24.7	8.24	620.31	404.64	78.17	7.20	34.43	39.23	23.24	1.09	17.39
DE	0.8	0.48	307.13	196.12	33.92	2.14	60.87	62.18	43.71	2.07	26.38
CV	3.2	5.81	49.51	48.47	43.39	29.73	176.79	158.52	188.07	189.50	151.70

Es importante destacar que los resultados obtenidos de los parámetros físico-químicos de interés para este estudio sólo representan las condiciones de la superficie de los sitios en el momento en que se obtuvieron las muestras, ya que el muestreo, al ser prospectivo, se llevó a cabo en una única ocasión durante la época de lluvias.

Las temperaturas registradas en los sitios de muestreo se encontraron entre los 23.1-25.7°C, la temperatura mínima se registró en el río Balamtetik, mientras que el efluente de la PTAR presentó la temperatura más alta. Los lagos presentaron temperaturas que oscilaron entre 23.7 y 25.5°C, sin embargo, los lagos tropicales se caracterizan por presentar temperaturas entre 25 y 30°C (Lewis, 1987). A pesar de que los sitios se encuentran geográficamente en una zona tropical, las temperaturas los caracterizan como subtropicales. Esto puede deberse, entre otros factores, a la altitud a la que se encuentran los sitios de estudio (Lewis, 1996).

En la mayoría de los sitios se encontró un pH neutro, con tendencia alcalina, en un intervalo de 7.28 – 8.69, la PTAR presentó el pH más alcalino (9.09), valor que refleja un alto consumo de CO₂, debido a la actividad fotosintética llevada a cabo por el fitoplancton en las lagunas facultativas (UCSC, 2014).

En cuanto a los tres ríos muestreados en este estudio, presentaron temperaturas de 23.1°C (BLTK), 23.7°C (ECZ) y 25.7°C (EFT). La alta temperatura de este último se puede deber a que es un río con muy poca profundidad, por lo que la energía térmica no se distribuye. Respecto a sus pH, también fueron neutros, tendiendo ligeramente a alcalino, el efluente presentó un pH de 7.28, el más bajo registrado en todos los sitios; El Carrizal 7.87 y Balamtetik 8.49.

Las condiciones de estos dos parámetros (temperatura y pH) que presentaron los sitios de estudio favorecen el crecimiento de cianobacterias, ya que se registran dentro del intervalo óptimo para su crecimiento, el cual se encuentra entre una temperatura de 20-25°C un pH que va de 6 a 9.

La PTAR presentó la mayor concentración de oxígeno disuelto (128.2%), seguido de San Lorenzo (119.6%) y el Chilpotrero (95.5%); el efluente de la PTAR fue el sitio

que presentó la menor concentración con 10.4%. Factores que influyen en el oxígeno disuelto (OD) en el agua son la temperatura, el, y los procesos químicos o biológicos que tienen lugar en el sistema. Los altos niveles de OD en los sitios de estudio pueden deberse a un incremento en la actividad fotosintética del fitoplancton (UCSC, 2014), relacionado con el aumento de biomasa del fitoplancton, lo cual se ve sustentado en las altas concentraciones de Clor-a y BGA.

La cantidad de biomasa del fitoplancton puede ser representada por la concentración de Clor-a, un pigmento fotosintético (Aubriot y Bonilla, 2013). se registró una mayor concentración de clorofilas en Balamtetik y la PTAR con valores de 164.49 y 154 $\mu\text{g/L}$, respectivamente. Estas altas concentraciones pueden estar relacionadas con los florecimientos, ya que la zona superficial de estos cuerpos de agua presenta disponibilidad de luz, factor indispensable para el crecimiento del fitoplancton.

Con base en el análisis BEST, se determinó que los factores ambientales con mayor relación con la comunidad de cianobacterias en el sistema lagunar estudiado fueron: la conductividad, la turbidez y la concentración de BGA (ρ 0.714).

La conductividad se encuentra relacionada con factores naturales como la temperatura, el tipo de sustrato, tasas de evaporación, y descargas de aguas residuales que alteran la calidad del agua. Una conductividad mayor a 1,000 $\mu\text{S/cm}$ se considera como alta y puede indicar un impacto negativo en el sistema. El límite máximo permisible en el Proyecto de Ley para modificar la NOM-127, sobre el agua para uso y consumo humano es de 1,200 $\mu\text{S/cm}$. El sitio con mayor conductividad fue el efluente (1,476.70 $\mu\text{S/cm}$), seguido por la PTAR (684.40 $\mu\text{S/cm}$), Balamtetik (657.9 $\mu\text{S/cm}$), Chaj Chaj (620.4 $\mu\text{S/cm}$) y El Carrizal (602.3 $\mu\text{S/cm}$). Por otro lado, el sitio que presentó menor conductividad fue Ensueño (273.30 $\mu\text{S/cm}$). Estos datos corresponden con los sitios donde se registraron las abundancias de cianobacterias más altas y más bajas, respectivamente.

De acuerdo con la NOM-127 sobre calidad del agua, el límite máximo permisible de turbidez es 5 UTN, mientras que el Proyecto de Ley para modificar la NOM-127 establece como el límite máximo permisible 3 UTN. Con base en estos dos datos,

sólo cuatro de los sitios presentan niveles de turbidez bajos: Bosque Azul, Paso del Soldado, La Encantada y Ensueño. Los sitios restantes presentaron niveles de turbidez altos, los cuales fueron notoriamente biogénicos, manifestándose en la coloración verdosa del agua

La concentración de BGA da un equivalente de la cantidad de cianobacterias productoras de ficocianinas en el agua, por lo que se puede suponer, que altas concentraciones de BGA son un indicio de una abundancia alta de cianobacterias. Sin embargo, cabe recalcar, que los sitios con florecimientos y coloraciones verdosas no necesariamente presentarán altas concentraciones de BGA, ya que los florecimientos también están compuestos por clorofitas y diatomeas. En este estudio, la PTAR presentó la mayor concentración de ficocianinas (144.23 µg/L), seguido por Chaj Chaj (53.84 µg/L).

La PTAR presentó el mayor valor de OD y BGA, así como una alta concentración de Clor-a, una alta conductividad y turbidez, estos valores se ven relacionados con la cualidad de este sitio de presentar la mayor abundancia de cianobacterias registrada en el estudio. Por otro lado, Ensueño, el sitio donde no se registraron cianobacterias, presentó valores bajos en los mismos parámetros (Tabla 3).

Respecto a la concentración de nutrientes, el amonio (NH_4) se encuentra de manera natural en los cuerpos de agua, debido a la descomposición de la materia nitrogenada tanto en el agua como en el suelo, y a las excretas de los organismos. En la NOM-127-SSA1-1994 no se establece un límite permisible para este nutriente, sin embargo, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1996) cuando las concentraciones son mayores a 3 mg/L son un indicador de contaminación orgánica por aguas residuales y por escorrentía de fertilizantes. La Encantada (6.71 mg/L) y El Carrizal (3.18 mg/L) presentan las concentraciones más altas de este nutriente, lo que podría indicar este tipo de contaminación, mientras que Ensueño (0.02) y Bosque Azul (0.05) presentaron las concentraciones más bajas.

Al oxidarse el amonio, da lugar a nitritos (NO_2), los cuales, a su vez, dan lugar a los nitratos (NO_3). En los sitios: San Lorenzo, La Encantada, El Carrizal, Balametik, y

el efluente, se registraron concentraciones de NO_3 que rebasan el límite permisible establecido por la NOM-127-SSA1-1994 de 10 mg/L. Así mismo, estos sitios junto con la PTAR, presentan concentraciones mayores a 5 mg/L, indicando que se trata de agua contaminada (WHO, 1996).

Chilpotero, Bosque Azul, Paso del Soldado, Ensueño y Chaj Chaj, son los sitios que tienen niveles bajos tanto de NH_4 , como de NO_3 . De éstos, solo Ensueño y Chaj Chaj no están registrados como sitios con agricultura cercana, sin embargo, sí presentan urbanización en los alrededores. A pesar de que se esperarían altos niveles de nutrientes en Chilpotero, Bosque Azul y Paso del Soldado, por presentar agricultura en sus entornos, cabe recalcar, que se ha analizado el nitrógeno orgánico y no el inorgánico.

7.2 Identificación de cianobacterias mediante el enfoque polifásico

Debido a la complejidad de la identificación de cianobacterias, en los casos donde fue posible, se optó por aplicar un enfoque polifásico, propuesto por Komárek (2016), tomando en cuenta criterios genéticos, morfológicos y ecológicos para la identificación. En este estudio se hace evidente la importancia de este enfoque integrativo.

Con base en los datos analizados en este estudio (morfológicos, morfométricos, genéticos y ecológicos), se encontraron 13 especies, correspondientes a nueve géneros pertenecientes a tres órdenes diferentes: Chroococcales, Nostocales y Oscillatoriales (Tabla 4). En Ensueño no se encontraron poblaciones de cianobacterias.

La identificación y descripción morfológica se llevaron a cabo con base en las características más relevantes de órdenes y géneros descritos por Komárek y Anagnostidis para Oscillatoriales (1999) y Chroococcales (2005) y Nostocales (1989).

Tabla 4. Poblaciones registradas en los sitios de estudio y riqueza de cada sitio. Se encuentran resaltadas las poblaciones cuya identificación fue corroborada genéticamente.

Orden	Especie	PTAR	EF	ECZ	CHAJ	BLTK	SNLZ	CPTO	PSOLD	BAZU	LECTD	EN
Chroococcales	<i>Microcystis</i> sp.				X		X	X	X	X	X	
	<i>Anabaenopsis</i> sp.				X							
Nostocales	<i>Cylindrospermopsis</i> sp.						X	X	X	X		
	<i>Dolichospermum</i> sp.							X	X	X	X	
	<i>Raphidiopsis</i> sp.				X			X	X	X	X	
	<i>Ancyllothrix</i> sp.			X								
Oscillatoriales	<i>Oscillatoria</i> sp.1		X			X						
	<i>Oscillatoria</i> sp.2			X								
	<i>Oscillatoria</i> sp.3		X		X	X						
	<i>Phormidium</i> sp.						X					X
	<i>Planktothrix</i> sp.	X										
	<i>P. agardhii</i>		X		X	X	X	X	X			X
	<i>P. spiroides</i>	X			X							
	Riqueza	2	3	2	5	3	4	5	5	4	5	0

7.2.1 Análisis morfométrico de las poblaciones del orden Oscillatorial

El análisis morfométrico se realizó con las poblaciones identificadas dentro del orden Oscillatorial, para diferenciar y agrupar las poblaciones, ya que el largo y ancho de sus células son caracteres distintivos de los géneros pertenecientes a este grupo.

Para el análisis morfométrico, a las poblaciones identificadas morfológicamente como *P. agardhii*, se les agregó el sufijo “-a”, las identificadas dentro del grupo de *Oscillatoria* sp., se nombraron con el sufijo “-b” y las otras poblaciones de oscillatoriales, con el sufijo “-c”, con el fin de facilitar los comparativos.

En cuanto a la morfometría, al comparar las poblaciones de oscillatoriales por medio de la prueba ANOVA, se encontraron diferencias significativas para los tres caracteres analizados: largo del tricoma ($p=3.975E-05$), largo ($p=2.36E-45$) y ancho ($p=1.178E-48$) de la célula.

Con base en la prueba de Tukey realizada para las medidas del largo del tricoma, se diferenciaron los siguientes grupos: Grupo a,b,c (PTAR-a), Grupo a,c (EFT-a,

CHAJ-a, BLTK-a, PSOLD-a, LECTD-a, BLTK-b, EFT-b, ECZ-b) Grupo a (CHAJ-c, BLTK-c, LECTD-c, SNLZ-c, EFT-c y ECZ-c) (Figura 2).

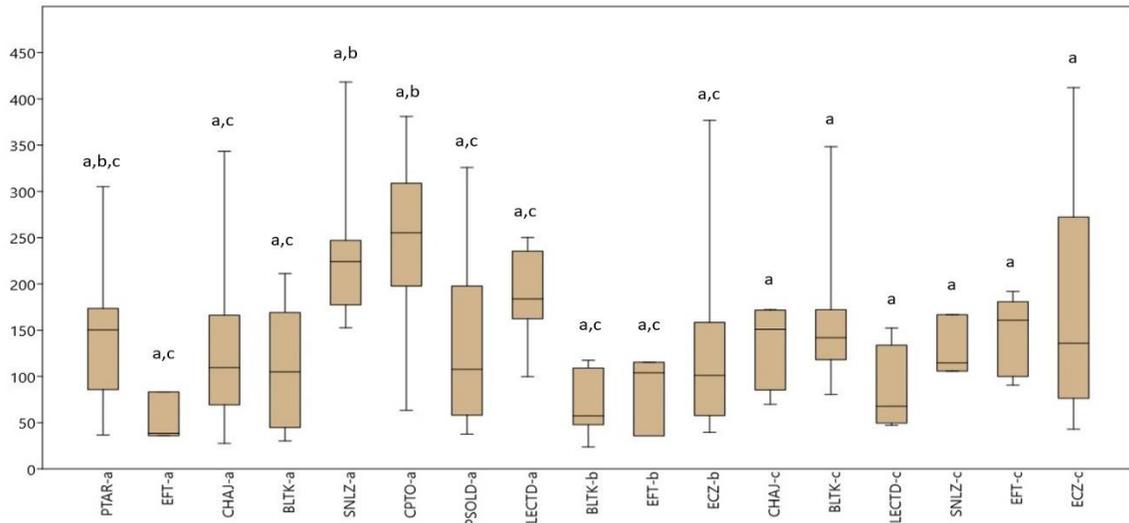


Figura 2. Boxplot de las mediciones del largo del tricoma de las oscillatoriales, con las agrupaciones basadas en la prueba de Tukey.

Al agrupar las poblaciones con base en el largo de sus células, se obtuvieron ocho grupos: Grupo a,c (PTAR-a), Grupo b (SNLZ-a, CPTO-a, BLTK-b y ECZ-b), Grupo b,c (EFT-a, CHAJ-a, BLTK-a y PSOLD-a), Grupo d (LECTD-a), Grupo a,b,c (EFT-b), Grupo a,b (CHAJ-c), Grupo b,d (LECTD-c y SNLZ-c) y el Grupo e (BLTK-c, EFT-c y ECZ-c) (Figura 3).

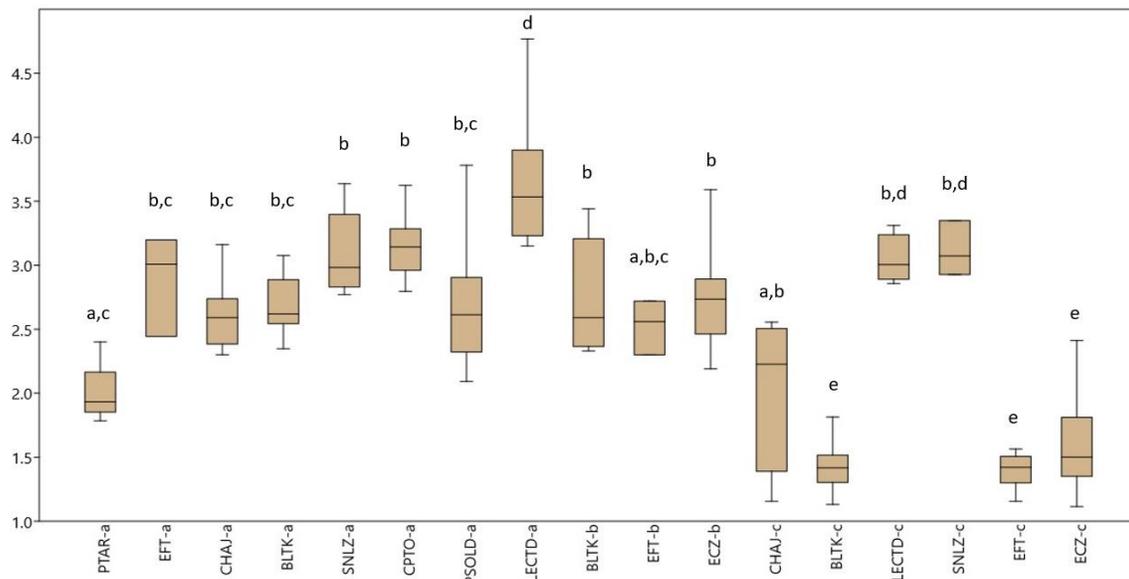


Figura 3. Boxplot de las mediciones del largo de la célula de las oscillatoriales, con las agrupaciones basadas en la prueba de Tukey.

Por otro lado, con base en el ancho de las células, las poblaciones se clasificaron en siete grupos: Grupo a (PTAR-a), Grupo a,b,c (EFT-a, BLTK-b y EFT-b), Grupo b,c (CHAJ-a, BLTK-a, SNLZ-a, CPTO-a, PSOLD-a y LECTD-a), Grupo a,b (ECZ-b), Grupo d (CHAJ-c, BLTK-c y EFT-c), Grupo e (LECTD-c y SNLZ-c) y Grupo g (ECZ-c) (Figura 4).

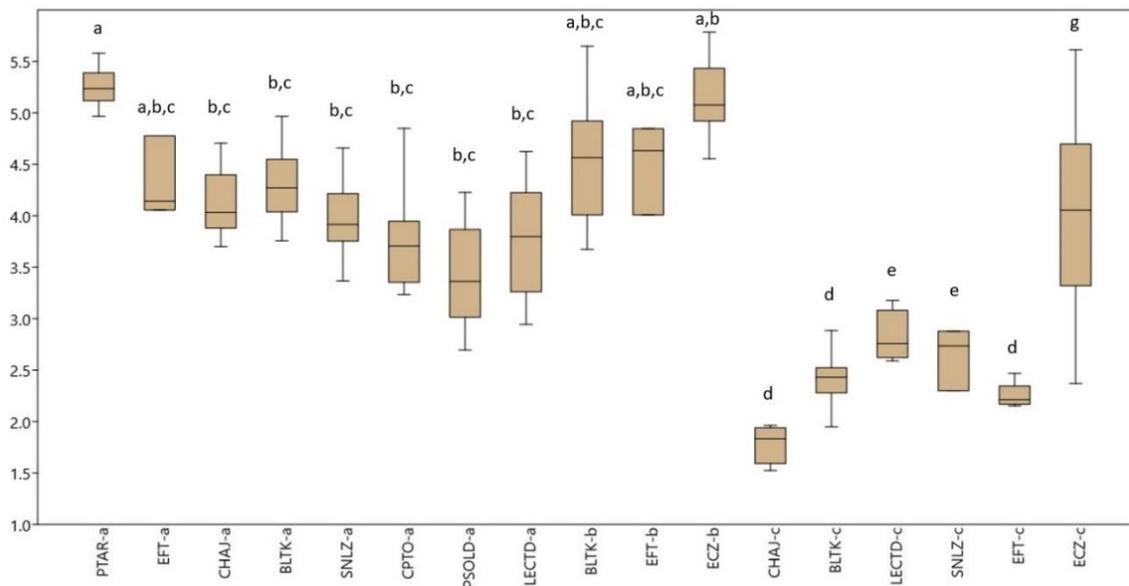


Figura 4. Boxplot de las mediciones del ancho de la célula de las oscillatoriales, con las agrupaciones basadas en la prueba de Tukey.

Con base tanto en la descripción morfológica, como en los análisis morfométricos de los tres caracteres analizados se identificaron los siguientes grupos de oscillatoriales: *Planktothrix agardhii* (EFT-a, CHAJ-a, BLTK-a, SNLZ-a, CPTO-a, PSOLD-a y LECTD-a), *Planktothrix* sp. (PTAR-a), *Oscillatoria* sp.1 (BLTK-b, EFT-b) *Oscillatoria* sp.2 (ECZ-b), *Oscillatoria* sp.3 (CHAJ-c, BLTK-c, EFT-c), *Phormidium* sp. (LECTD-c y SNLZ-c) y Oscillatorial (*Ancylothrix* sp.) (ECZ-c).

7.2.2 Identificación genética

Genéticamente sólo se analizaron las muestras de los cinco sitios (PTAR, EFT, ECZ, BLTK y CHAJ) donde se encontraron las mayores concentraciones de biomasa. Debido a que la extracción se realizó a partir de la muestra de un consorcio, no fue posible secuenciar todas las poblaciones encontradas, sin embargo, la identificación genética ayuda a corroborar y/o refutar la identificación morfológica de algunas poblaciones.

De las poblaciones identificadas, *Ancylothrix* sp., *P. agardhii* y *P. spiroides* fueron corroboradas genéticamente (Tabla 5). La secuenciación de ADN de los clones corroboró la presencia de *P. agardhii* en los sitios Balamtetik (40-1), Chaj Chaj (41-1 y 41-2) y el Efluente (44-2); así como de *P. spiroides* en la PTAR (43-3). Por otro lado, las secuencias de los clones del sitio El Carrizal (42-2 y 42-9) dieron resultados diferentes, por un lado, el clon 42-2 tuvo su mayor porcentaje de identidad relacionado con la especie *Ancylothrix terrestres*, con un porcentaje de 93.67%. Por otro lado, el mayor porcentaje de identidad del clon 42-9 se obtuvo en relación a *Planktothrix* sp., con un porcentaje de 96.22%. Cabe recalcar, que los porcentajes de identidad obtenidos para ambas secuencias de El Carrizal, están por debajo del 98% esperado para la identificación de especie, y la secuencia de El Carrizal (42-2) está por debajo del 96% necesario para la identificación a nivel de género.

Tabla 5. Resultados del análisis BLAST de cada secuencia.

Sitio (clon)	BLAST (NCBI)	Número de acceso	% de identidad
Balamtetik (40-1)	<i>Planktothrix agardhii</i> NIES-1258	LC455655.1	99.80
	<i>Oscillatoria</i> sp.28	AJ133165.1	99.79
	<i>Planktothrix suspensa</i>	LC037449.1	99.64
	<i>Planktothrix rubescens</i> BGSD-500	KC510416.1	99.42
Chaj Chaj (41-1)	<i>Planktothrix agardhii</i> CCAP 1459/15	AB045898.1	99.78
	<i>Oscillatoria</i> sp.28	AJ133165.1	99.72
	<i>Planktothrix rubescens</i> , isolate FEM_CPR108	LT546528.1	99.57
Chaj Chaj (41-2)	<i>Planktothrix agardhii</i> NIES-596	AB045958.1	99.13
	<i>Oscillatoria</i> sp.28	AJ133165.1	99.10
	<i>Planktothrix suspensa</i> NIES-3736	LC037449.1	99.08
PTAR (43-3)	<i>Planktothrix spiroides</i> fs2 16S	HQ912973.1	99.59
	<i>Planktothrix pseudagardhii</i> T1-8-4	NR_112128.1	99.19

	<i>Oscillatoria</i> sp. PCC 9018	GQ351577.1	98.98
Efluente (44-2)	<i>Planktothrix rubescens</i> BGSD-500	KC510416.1	98.76
	<i>Planktothrix agardhii</i> NIES-596	AB045958.1	98.62
El Carrizal (42-2)	<i>Ancylothrix terrestris</i> strain 10PC	NR_149292.1	93.67
El Carrizal (42-9)	<i>Planktothrix</i> sp. CHAB TP201807.3	MT488237.1	96.22

7.2.3 Descripción de las poblaciones identificadas

***Oscillatoria* sp. y *Phormidium* sp.**

Oscillatoria sp.

Filamento solitario, sin constricciones, recto o ligeramente curvado, sin vaina. Las células son más cortas que anchas y no se observan vesículas de gas, pero sí se puede observar un citoplasma granuloso. Presentan un color verde opaco. Las células apicales son redondeadas y pueden presentar caliptra (Figura 5-A). No presentan heterocitos ni acinetos.

Phormidium sp.

Filamento recto o ligeramente curvado que se presenta en solitario o formando agrupaciones, unido a sustrato. Presenta vaina transparente pegada al filamento. Las células son más cortas que largas o isodiamétricas y no presentan aerotopos. Se observan de color verde brillante. Las células terminales son redondeadas. No presentan heterocitos ni acinetos (Figura 5-B).

El género *Oscillatoria* presenta características relativamente simples y no cuenta con caracteres únicos como células especializadas (acinetos y heterocitos), varios de los organismos cumplen con su descripción, por lo que son clasificadas dentro de este género. Se han llevado a cabo diferentes estudios de este género, que han llevado a transferir especies otro género, y a reconocer nuevos taxos (Mühlsteinová *et al.*, 2018). Los géneros *Oscillatoria* y *Phormidium* se diferencian principalmente

por la morfometría de sus células, ya que el primer género tiende a presentar células más cortas que anchas, y el segundo más largas que anchas.

Por otro lado, se ha observado que, en cuanto a la agrupación de especies de estos géneros, el ancho de las células suele ser menos variable que el largo de las mismas, por lo que el género *Oscillatoria* está más fijo genéticamente, mientras que la variabilidad del género *Phormidium* se debe mayormente al efecto de las condiciones de crecimiento en la tasa y frecuencia de la división celular (Lokmer, 2007).

Los resultados del análisis morfométrico de las oscillatoriales (Figuras 2, 3 y 4), y con base en estas dos características (proporción del ancho y largo de la célula, y el ancho celular), se clasificaron las poblaciones pertenecientes a estos dos géneros, y, a su vez, se agruparon en especies diferentes: *Oscillatoria* sp. 1, *Oscillatoria* sp. 2, *Oscillatoria* sp. 3 y *Phormidium* sp.

Así mismo, el análisis morfométrico de las oscillatoriales, en concordancia con los análisis moleculares, confirmó la distinción de *Ancylothrix* sp. con respecto a las otras poblaciones estudiadas.

***Dolichospermum* sp.**

Filamentos solitarios, rectos o ligeramente curvados. Las células tienen forma de barril, presentan vesículas de gas y se observan de color verdoso. Los heterocitos son esféricos y se encuentran intercalados entre las células, así como los acinetos (Figura 5-C).

Actualmente, el género *Dolichospermum* agrupa a aquellas especies planctónicas que han sido identificadas como *Anabaena* (Wacklin *et al.*, 2009), sin embargo, no toda la literatura ha sido actualizada, por lo que en este estudio también se hace referencia a claves taxonómicas donde se le nombra como *Anabaena*.

Este género, se caracteriza por la formación de heterocitos y presenta una morfología de su tricoma similar a *Anabaenopsis*, su diferencia recae en los heterocitos, ya que en *Dolichospermum* estos se encuentran intercalares en el tricoma, mientras que en *Anabaenopsis* suelen encontrarse en la zona terminal del

tricoma (Komárek, 2005). Con base en la clave taxonómica para especies planctónicas de *Anabaena*, propuesta por Li *et al.* (2000), se identificó la especie como *Anabaena planctónica*, sin embargo, la especie encontrada muestra células terminales elongadas, característica distintiva de *Anabaena affinis* (Li *et al.*, 2000). Por otro lado, la primer característica dicotómica para la diferenciación de especies con tricomas rectos se refiere a la formación de fascículos, característicos de *A. affinis*, pero no se presentaron en ninguna muestra. Es por ello, que no fue posible identificar esta población a nivel de especie.

En las muestras se encontró una baja abundancia de individuos de este género, de los filamentos encontrados, sólo uno presentó acineto, y éste no presentaba heterocitos, los cuales, según Carr y Whitton (1982), no son esenciales para la formación de acinetos.

Aunque *Cylindrospermopsis*, *Anabaenopsis* y *Dolichospermum* (*Anabaena*) presenten heterocitos, no es necesario, que su crecimiento se vea favorecido por la falta de nitrógeno en el ambiente o limitado por el exceso del mismo (Dolman *et al.*, 2012).

***Anabaenopsis* sp.**

Filamentos solitarios, generalmente enrollados que forman anillos o espirales. Las células son esféricas o en forma de barril, presentan vesículas de gas y se observan de color verdoso, con detalles amarillos y rojos. Se caracterizan por presentar heterocitos terminales de forma esférica (Figura 5-D). Pueden presentar acinetos esféricos o elipsoidales intercalados entre las células.

De acuerdo con Komárek (2005), *Anabaenopsis* se caracteriza por la formación de heterocitos, los cuales se desarrollan de forma intercalar, metaméricamente en dos, tras una división asimétrica de dos células vegetativas contiguas, que al final da lugar a un tricoma con dos heterocitos en posición terminal. Este género se asemeja morfológicamente a *Cylindrospermopsis*, por su división celular asimétrica previa a la formación de los heterocitos, sin embargo, la forma de sus heterocitos es diferente, siendo los de *Anabaenopsis* generalmente de forma es esférica, oval u

ovoide. Así mismo, se asemeja a el género *Dolichospermum* (*Anabaena*), en cuanto a la morfología de sus tricomas y la presencia de aerotopos en sus células, pero se diferencian por la forma del desarrollo de los heterocitos.

La especie que registró Almeida (2014) en estos lagos fue *A. circularis*, pero las células de la especie encontrada no coinciden con las descritas para esta especie (Komárek, 2005), ya que presentan una forma de barril y no cilíndrica. Cabe destacar, que las especies de este género son difíciles de identificar con base en la morfología, por la variación morfológica intraespecífica, sus formas transicionales y las características compartidas por varias especies (Komárek y Mareš, 2012), por lo que la identificación de estas poblaciones se limitó al género.

Este género se distribuye principalmente en lagos tropicales, subtropicales y templados (Komárek, 2005) y suele formar floraciones durante periodos cálidos (Aguilera *et al.*, 2016).

***Ancylothrix* sp.**

Filamento solitario, sin constricciones, recto, sin vaina. Las células son más cortas que anchas y no se observan vesículas de gas. Presenta un color verdoso. Las células apicales son redondeadas (Figura 5-A). No presentan heterocitos ni acinetos.

El análisis genético de la muestra de El Carrizal dio como resultado una similitud con *A. terrestris*, sin embargo, el porcentaje de identidad (93.67%) fue menor al 98% necesario para identificación a nivel de especie e incluso menor al 96% necesario para identificación a nivel de género.

El género *Ancylothrix* fue reconocido recientemente, a partir de cepas pertenecientes a *Phormidioidea*, ya que presentaban una morfología similar a la del género *Kamptonema*, pero filogenéticamente se situaron en clados separados (Martins *et al.*, 2016). Dentro de este género se distinguieron dos especies: *A. terrestris* y *A. rivularis*, a partir de diferencias bien definidas de su genética y ecología.

A pesar del bajo porcentaje de identidad obtenido (93.67%), con base en el trabajo de Márquez Santamaría (Tesis de maestría en preparación), quién realizó un análisis filogenético de la misma población con la secuencia utilizada en este trabajo, se determinó que una de las poblaciones de oscillatoriales de El Carrizal pertenece al género *Ancylothrix*. Sin embargo, debido a que no concuerda con las descripciones de la población descrita de este sitio, es necesario trabajar aún más en su caracterización taxonómica, para poder definir su identidad.

***Cylindrospermopsis* sp. y *Raphidiopsis* sp.**

Cylindrospermopsis sp.

Filamentos solitarios, rectos o ligeramente curvados, sin vaina. Las células son más largas que anchas y presentan vesículas de gas. Las células terminales son redondeadas y en su mayoría presentan heterocitos con forma cónica en uno o ambos extremos (Figura 5-F). No se observaron acinetos, aunque sí llegan a presentarse en este género.

Raphidiopsis sp.

Filamentos solitarios, ligeramente curvados, sin vaina o envoltura mucilaginosa, pared celular no constreñida. Las células son cilíndricas, generalmente más largas que anchas, presentan granulaciones. Las células apicales son redondeadas. No presenta heterocitos y no se observaron acinetos (Figura 5-G).

El género *Cylindrospermopsis* desarrolla heterocitos únicamente a partir de sus células terminales, debido a esto, sus heterocitos se encuentran siempre en posición terminal del filamento, en uno o ambos extremos del mismo (Shafik *et al.*, 2003); ésta es la característica principal de este género.

Dentro de este género también hay una gran plasticidad morfológica, por lo que su identificación a nivel de especie es complicada. Anteriormente, se registró *C. cuspid* en estos lagos, sin embargo, no sería válido descartar que se pudiera tratar de *C. racibroskii*, especie que presenta características morfológicas muy similares y que se ha encontrado en zonas tropicales y subtropicales (Shafik *et al.*, 2003)

Por otro lado, hay un debate en cuanto a los géneros *Raphidiopsis* y *Cylindrospermopsis*, por su similitud morfológica y genética. El género *Raphidiopsis* se identifica principalmente por la ausencia de heterocitos a lo largo de su ciclo de vida (Aguilera *et al.*, 2018) y sus células apicales suelen ser elongadas, características que se contraponen a la descripción de *Cylindrospermopsis*. Sin embargo, se han observado características similares, sobre todo entre dos especies de estos géneros, *C. raciborskii* y *R. mediterranea*, por lo que, cuando la primera no presenta heterocitos, no es posible distinguirla de la segunda (Wu *et al.*, 2011; Komárek y Mares, 2012). Por ello, se ha propuesto que los filamentos con las características de *R. mediterranea* son morfotipos de *C. raciborskii*, que carecen de heterocitos (Komárková *et al.*, 1999; McGregor y Fabbro, 2000; Moustaka-Gouni *et al.*, 2009).

Se han llevado a cabo estudios filogenéticos, en lo que se han analizado diferentes genes y secuencias intergenéticas (Gugger *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008; Moustaka-Gouni *et al.*, 2009; Stucken *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2011; Komárek, 2013; Li *et al.*, 2016), que demuestran que estos géneros forman parte de un grupo polifilético que debe revisarse. Por otro lado, Aguilera *et al.* (2018) realizó un análisis polifásico, con el cual recomendó que estos dos géneros se unificaran en uno solo. Hasta el momento, no se ha determinado si estos dos grupos son lo suficientemente similares morfológica- y genéticamente, para unirlos y, por lo tanto, el debate continúa abierto.

Cabe destacar, que se han registrado eventos de coocurrencia de ambas especies en reservas templadas, tropicales, y subtropicales (McGregor y Fabbro, 2000; Mohamed, 2007; Fonseca y Bicudo, 2008; Moustaka-Gouni *et al.*, 2009) en este estudio, esto lo podemos observar en los siguientes sitios: Chilpotrero, Bosque Azul y Paso del Soldado.

La presencia de heterocitos en *Cylindrospermopsis* le permiten adaptarse a condiciones de bajas concentraciones de nitratos y amonio, sin embargo, la ausencia de esta estructura no es limitante para el crecimiento de *Raphidiopsis* en las mismas condiciones (Aguilera *et al.*, 2018).

***Microcystis* sp.**

Colonia con forma esférica o en ocasiones irregular, formada por células esféricas que se encuentran rodeadas por un mucílago fino y transparente. Las células son de color café y presentan vesículas de gas (Figura F-H).

Morfológicamente, *Microcystis* se caracteriza por formar colonias unicelulares, mucilaginosas, redondeadas o irregulares, de células esféricas (Jin-Ae *et al.*, 1997). Esta forma de organización permite que resista a severas turbulencias, reduce la presión por parte del zooplankton, le confiere protección ante los metales pesados y sustancias tóxicas.

Las especies de *Microcystis* tienen una distribución global, ya que tienen una amplia tolerancia a la temperatura, se han encontrado en diferentes zonas, desde regiones de bajas temperaturas, hasta trópicos, con temperaturas del agua que van desde los 12 a los 30 °C (Li *et al.*, 2015), siendo compatible con las condiciones de los sitios estudiados.

En el estudio de Almeida (2014) se registró la presencia de *M. wesenbergii* en los lagos, identificación basada sólo en su morfología. No obstante, es complicado llegar a una identificación a nivel de especie con base en ello, debido a que este género presenta una alta plasticidad fenotípica. Cada especie puede presentar diferentes morfotipos, que concuerdan con las características de otras especies de *Microcystis* (Otsuka *et al.*, 2000).

***Planktothrix* sp. Wang y Li 2013 y *Planktothrix agardhii* (Gomont) Anagnostidis y Komárek 1988**

Planktothrix sp. Wang y Li 2013

Filamentos solitarios, rectos o ligeramente curvados, sin vaina, la pared celular está constreñida. Las células son más cortas que anchas, y presentan vesículas de gas distribuidas en la célula. Presenta un color café verdoso. La célula terminal suele ser redondeada y puede presentar caliptra. No presenta heterocitos ni acinetos (Figura 5-1).

Planktothrix agardhii (Gomont) Anagnostidis y Komárek 1988

Filamentos solitarios, rectos o ligeramente curvados, sin vaina, la pared celular está ligeramente constreñida. Las células son más cortas que anchas, y presentan vesículas de gas distribuidas en la célula. Presenta un color verdoso, con detalles amarillos y rojos. La célula terminal suele ser redondeada y puede presentar caliptra. No presenta heterocitos ni acinetos (Figura 5-J).

La identificación morfológica del género *Planktothrix* se basa principalmente en la presencia de vesículas de gas distribuidas por todo el volumen celular, una de las características por las cuales se separó del género *Oscillatoria* (Anagnostidis y Komárek, 1988; Liu *et al.*, 2013). Una de las especies dentro de este género es *P. rubescens*, la cual se distingue por un color púrpura-rojizo o café-rojizo del tricoma (Anagnostidis y Komárek, 1988), esa característica no la presentó ninguna de las poblaciones de *Planktothrix*, descartándola.

Otra característica que se toma en cuenta para identificar a nivel de especie es el ancho de las células. Esta especie presentó dimensiones del ancho de la célula de entre 3.19 y 5.99 μm , con base en ello, se delimitó la identificación entre dos especies: *P. agardhii* y *P. pseudagardhii*; esta última fue diferenciada de la primera por Suda *et al.* (2002), donde las dimensiones del ancho de la célula de la primera se establecen en un rango entre 3 y 6.4 μm , mientras que, de la segunda, se encuentra entre 2.8 y 9.8 μm . Con la guía para *Planktothrix* de Komárek y Komárkov (2004) se identificó la especie como *P. agardhii*. En un estudio anterior, se registró la presencia de *P. suspensa* en los lagos de Montebello, sin embargo, la morfometría de la especie encontrada no concuerda con el ancho de la célula de ésta (2 – 4 μm) (Komárek y Komárkov, 2004).

La identificación morfológica como *P. agardhii* fue respaldada por los resultados de la identificación genética, ya que las secuencias de los clones correspondientes a Balamtetik (40-1), Chaj Chaj (41-1 y 41-2) y el efluente (44-2), sitios donde se presentó esta especie (Tabla 4), tuvieron un porcentaje de identidad mayor a 98% con secuencias de *P. agardhii* reportadas en el GenBank (Tabla 5).

Por otro lado, aunque con base en la morfología, se clasificó la población de la PTAR dentro de *P. agardhii*, el análisis morfométrico indicó que se puede tratar de una especie diferente a la de Chaj Chaj y Balamtetik. En este caso, las características morfológicas y la morfometría no son suficientes para delimitar de qué otra especie se trata, ya que varios caracteres son compartidos entre diferentes especies de *Planktothrix* y los intervalos de las medidas celulares se sobrepone (como en el caso de *P. agardhii* y *P. pseudoagardhii*). Por lo tanto, la población encontrada en la PTAR se considerará como una especie diferente a *P. agardhii* y se denominará *Planktothrix* sp.

Las especies pertenecientes al género *Planktothrix* son de las principales cianobacterias formadoras de florecimientos (Suda *et al.*, 2002; Komárek y Komárková 2004; Lin *et al.*, 2010). *P. agardhii* suele dominar en lagos someros y turbios, ya que tolera bajas intensidades de luz (Scheffer *et al.*, 1997); al ser su propio crecimiento de biomasa lo que puede restringir el campo lumínico para el desarrollo de otras especies, su dominancia se ve favorecida. Otro factor que promueve su crecimiento es la temperatura, siendo su temperatura óptima de crecimiento los 25 °C; sin embargo, también soporta temperaturas más bajas, permitiéndole sobrevivir a lo largo del año (Oberhaus *et al.*, 2007). Por otro lado, gracias a sus vacuolas de gas se pueden situar a la profundidad más favorable para su desarrollo, dispersándose en la columna de agua (Chorus y Bartram 1999; Oliver y Ganf, 2002).

Planktothrix spiroides

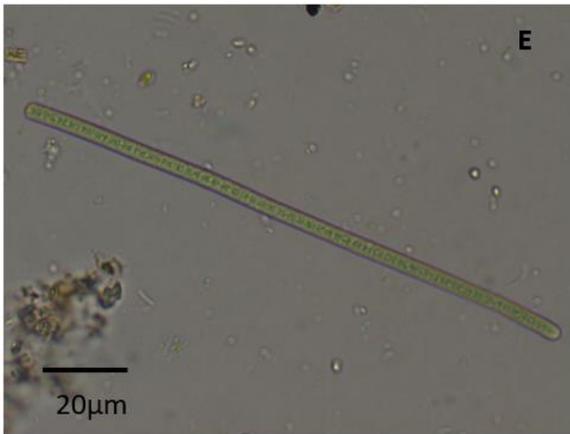
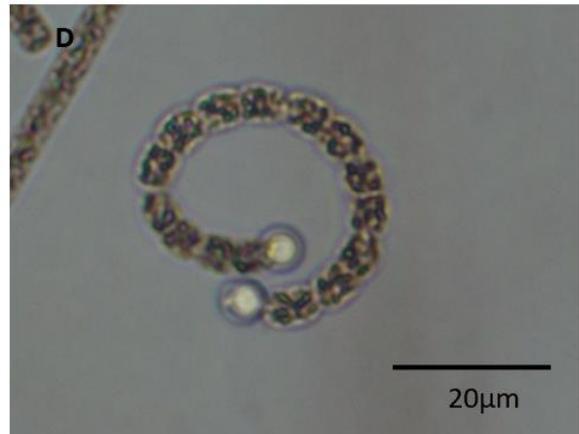
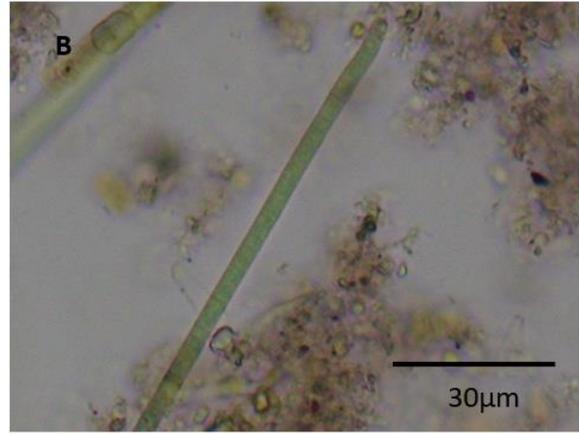
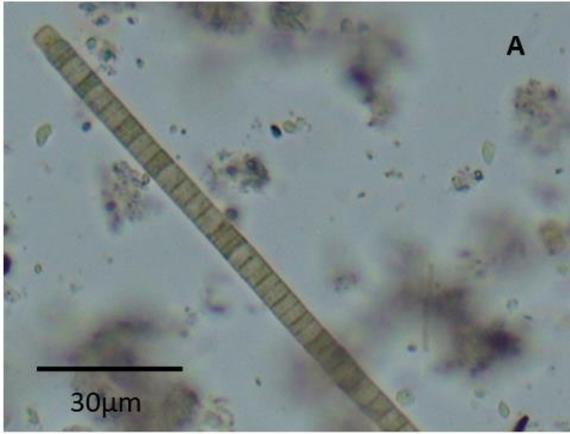
Filamentos solitarios en espiral. Las células son más cortas que anchas o isodiamétricas, presentan vesículas de gas y se observan de color verdoso. Las células terminales son redondeadas. No presentan heterocitos ni acinetos (Figura 5-K).

En la PTAR y Chaj Chaj se detectó la presencia de *Planktothrix spiroides*. Morfológicamente, esta especie se identificó dentro del género *Arthrosipira*, sin embargo, el análisis molecular mostró que de los resultados obtenidos de la

identificación genética de la muestra correspondiente al sitio de la PTAR, se obtuvo como resultado que podría ser la especie *P. spiroides* o *Planktothrix pseudagardhii*.

La especie encontrada en estos sitios concuerda con algunas de las principales características de *Planktothrix*, descritas por Suda *et al.* (2002) y Komárek y Anagnostidis (2005): tricomas solitarios que flotan libremente, atenuados o no en los extremos, sin vaina evidente y vesículas de gas distribuidas en todo el filamento; sin embargo, no concuerda con la forma de los tricomas que se describe como rectos o ligeramente curvos, ya que la forma de esta especie es en espiral, característica principal por la que se podría clasificar como *Arthrospira*. Es común, que especies oscilatorias que presentan una forma en espiral se clasifiquen dentro de este grupo (Anagnostidis y Komárek, 1988; Castenholz *et al.*, 2001; Komárek y Anagnostidis, 2005). En cuanto a su ecología, es poco específica, ya que se ha encontrado en aguas alcalinas, salobres y salinas, tanto en regiones tropicales, como subtropicales (Castenholz, 1989; Vonshak y Tomaselli, 2002), por lo que no es un factor determinante para la identificación de la especie.

Aunque morfológica- y ecológicamente la especie encontrada en la PTAR y Chaj Chaj concuerda con la descripción de *Arthrospira*, genéticamente es evidente que pertenece al grupo de *Planktothrix* (Liu *et al.*, 2013). Por otro lado, debido a la forma en espiral de los tricomas, se descarta que pudiera ser *Planktothrix pseudagardhii*, ya que esta especie no suele presentar una forma en espiral, mientras que *P. spiroides* sí, por lo que se concluye que la especie es *P. spiroides*.



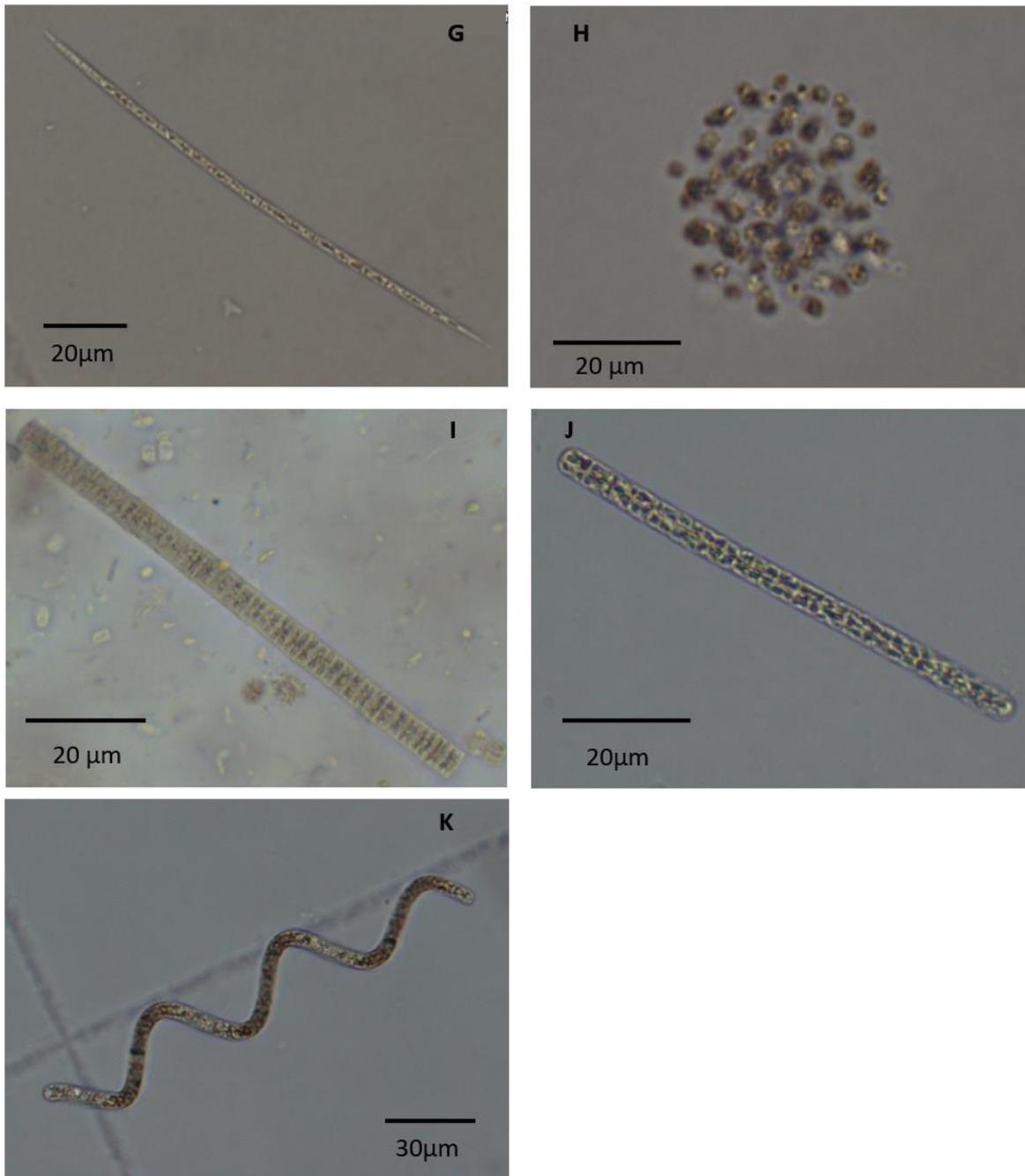


Figura 5. Morfoespecies encontradas: *Oscillatoria* sp. (A), *Phormidium* sp. (B), *Dolichospermum* sp. (C), *Anabaenopsis* sp. (D), *Ancylothrix* sp. (E), *Cylindrospermopsis* sp. (F), *Raphidiopsis* sp. (G), *Microcystis* (H), *Planktothrix* sp. (I), *Planktothrix agardhii* (J), y *P. spiroides* (K).

La clasificación de cianobacterias se ha llevado a cabo tradicionalmente con base en caracteres morfológicos considerados como distintivos, sin embargo, se ha vuelto compleja y poco útil por sí sola, debido a que diversos factores ambientales pueden influir en la morfometría de los mismos, dando lugar a lo que se conoce como morfotipos e incluso ecotipos. Esto da lugar a pequeñas diferencias que pueden ser caracteres que reflejan diferentes genotipos o que son consecuencia de la plasticidad genotípica (Anagnostidis y Komárek, 1985, 1988; Moffitt *et al.*, 2001; Rajaniemi *et al.*, 2005), sin embargo, con sólo el equipo óptico no es posible determinar de qué situación se trata. Así mismo, debido a su gran potencial de adaptación, ecológicamente es complicado verificar o descartar las especies, ya que muchas de ellas pueden conformar subpoblaciones que se pueden encontrar en hábitats con diferentes condiciones.

En relación a lo anterior, el análisis del gen 16S rRNA permitió en este estudio corroborar la identificación taxonómica hecha con base en caracteres morfológicos de la especie con mayor abundancia y distribución dentro de los sitios de colecta, así como la correcta identificación de la especie *P. spiroides*, clasificada inicialmente por su morfología como otra especie.

Los resultados de este estudio muestran la relevancia de los estudios filogenéticos de las cianobacterias, basados en la secuencia del gen 16S rRNA, en conjunto con los rasgos morfológicos para la identificación taxonómica confiable de estos organismos, lo cual también es respaldado por diversos autores (Wilmotte *et al.*, 1994; Nelissen *et al.*, 1996; Nübel *et al.*, 1997).

7.2.4 Análisis estadístico de los parámetros físico-químicos y las abundancias

En la Tabla 6 se presentan los resultados del conteo realizado con la cámara Neubauer, para determinar la abundancia de cada población en cada sitio. Las especies que presentaron mayor abundancia fueron *Planktothrix agardhii* y *Planktothrix* sp., en el efluente y la PTAR, respectivamente. Así mismo, en la PTAR *P. spiroides* se presentó en gran abundancia.

Independiente a estos sitios, la mayor abundancia de *P. agardhii* (900,625 cel/mL) y *Phormidium* sp. (28,125 cel/mL), fueron registradas en Chaj Chaj; mientras que

en La Encantada *P. agardhii* presentó la menor abundancia (2500 cel/mL) y para *Phormidium* sp en el sitio San Lorenzo se registraron las abundancias más bajas (10,000 cel/mL). En cuanto a los géneros *P. spiroides* y *Anabaenopsis* sp. sólo se presentaron en Chaj Chaj, con abundancias de 11,250 cel/mL y 4,375 cel/mL, respectivamente.

Por otro lado, *Microcystis* sp. se encontró en mayor abundancia en Bosque Azul (22,500 cel/mL), y la menor abundancia se registró en San Lorenzo (5,625 cel/mL). *Raphidiopsis* sp. presentó mayor abundancia en el sitio Chilpotrero y menor en Chaj Chaj; mientras que para *Cylindrospermopsis* sp. la mayor abundancia se registró en San Lorenzo y la menor en el sitio Paso del Soldado. El género *Oscillatoria* sp. sólo estuvo presente en Balamtetik con una abundancia de 1,875 cel/mL y en el efluente con 938 cel/mL.

Tabla 6. Abundancias de las morfoespecies en cada sitio en cel/mL. El “0” denota los sitios donde se identificó dicha especie, pero al hacer el conteo no se encontraron ejemplares dentro de las cuadrículas de conteo.

Población	PTAR	EFT	CHAJ	BLTK	SNLZ	CPTO	PSOLD	BAZU	LECTD	EN
<i>Anabaenopsis</i> sp.	-	-	4,375	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cylindrospermopsis</i> sp.	-	-	-	-	20,000	3,750	625	10,000	-	-
<i>Dolichospermum</i> sp.	-	-	-	-	-	0	0	0	0	-
<i>Microcystis</i> sp.	-	-	7,500	-	5625	13,125	10,625	22,500	15,625	-
<i>Oscillatoria</i> sp.1	-	938	-	1,875	-	-	-	-	-	-
<i>Oscillatoria</i> sp.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Oscillatoria</i> sp.3	-	22,500	28,125	45,000	-	-	-	-	-	-
<i>Phormidium</i> sp.	-	-	-	-	10,000	-	-	-	11,250	-
<i>Planktothrix</i> sp.	9.01E+08	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. agardhii</i>	-	9.01E+08	900,625	450,313	129,375	33,750	5,000	-	2,500	-
<i>P. spiroides</i>	1.13E+07	-	11,250	-	-	-	-	-	-	-
<i>Raphidiopsis</i> sp.	-	-	1,875	-	-	55,625	6,250	43,750	16,250	-

Con base en el análisis BEST, se determinó que los factores ambientales con mayor relación con la comunidad de cianobacterias en el sistema lagunar estudiado fueron: la conductividad, la turbidez y la concentración de BGA (rho 0.714).

Por otro lado, el test ANOSIM (Figura 6), mostró que no hay diferencia significativa entre los sitios, con respecto a la matriz biológica de abundancias con base en los

factores ambientales analizados: tipo de sistema (río/lago) ($R=-0.044$; $p=0.525$), cercanía a urbanización ($R=0.056$; $p=0.276$), conexión superficial ($R=0.048$; $p=0.295$) y presencia de agricultura en las inmediaciones de la laguna ($R=-0.222$; $p=0.75$).

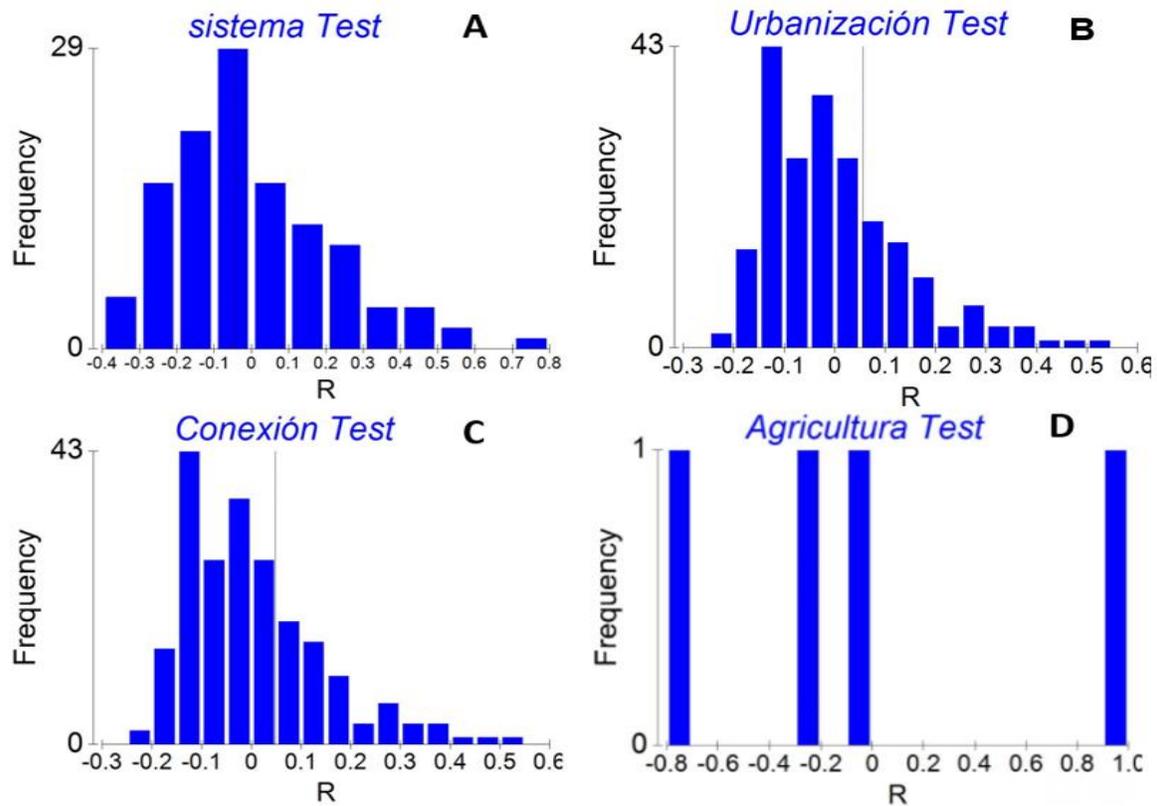


Figura 6. Análisis ANOSIM con base en tipo de sistema (A) ($R=-0.044$; $p=0.525$), cercanía a urbanización (B) ($R=0.056$; $p=0.276$), conexión superficial (C) ($R=0.048$; $p=0.295$), presencia de agricultura en la cercanía (D) ($R=-0.222$; $p=0.75$).

7.3 Distribución

Existe una conexión hidráulica subterránea entre los lagos del PNLM, debido al origen tropical kárstico de los mismos, lo cual promueve la dispersión de contaminantes entre los lagos (Alcocer *et al.*, 2018), los vuelve altamente vulnerables a la contaminación (Pacheco *et al.*, 2001). Por otro lado, hay una conexión superficial entre ellos por medio de canales que se crearon hace más de 500 años y que se han preservado y expandido, y debido a inundaciones durante temporada de lluvias que se producen por el origen kárstico de los mismos (Alcocer *et al.*, 2018).

Así mismo, estas características pueden promover la dispersión de individuos de cianobacterias y/o sus acinetos, tanto por la vía subterránea, como superficial, y su prevalencia y abundancia en los lagos, debido a la contaminación. Otros medios de dispersión naturales podrían ser el viento y animales como aves, insectos e incluso los seres humanos.

Una probable causa antropogénica de la dispersión de las cianobacterias y otros organismos fitoplanctónicos es el uso de las balsas, lanchas y kayaks utilizadas para el turismo. Éstos sirven como vectores de transferencia entre los lagos, al ser utilizados para transporte y recreación dentro de los mismos, sin recibir tratamiento alguno al ser sacados de un cuerpo de agua y ser introducidos en otro. A pesar de que estas actividades humanas son una potencial fuente de transporte de especies entre los lagos, no se han llevado a cabo estudios que permitan evaluar el papel que éstos juegan en la dispersión.

7.4 Detección molecular de toxinas, bioensayo y potencial riesgo toxicológico

En varios de los sitios de estudio se encontró un crecimiento masivo de cianobacterias en el momento de la colecta. Estos eventos se ven favorecidos por la contaminación y se ha detectado en estudios anteriores que, a excepción del lago Ensueño, los sitios muestreados se encuentran influenciados principalmente por actividades agropecuarias y las áreas urbanas que se encuentran dentro de la cuenca (Almeida, 2014; Alcocer *et al.*, 2018; Rivera-Herrera *et al.*, 2019).

Los florecimientos representan un riesgo potencial para la salud humana y sanidad animal, ya que se ha documentado que, a nivel mundial, el 60% de las muestras de cianobacterias contienen toxinas (WHO, 2003). En la zona, se hace uso de los cuerpos de agua tanto para abasto doméstico, como para actividades recreativas y agrícolas. Los lagos donde hay un uso recreativo, como paseos en balsas y kayak son: Bosque Azul, Chilpotrero, La Encantada, Chaj Chaj y Paso del Soldado; en este último también se ha observado que se permite nadar. Por otro lado, Ensueño es una fuente de abastecimiento de agua para uso y consumo humano de la comunidad Antelá (Comité de Cuenca Río Grande-Lagunas de Montebello, 2009),

así mismo los establecimientos en la zona turística aledaña utilizan el agua para la preparación de alimentos.

De las 13 cianobacterias encontradas en este estudio, siete poblaciones se identificaron como géneros que también se han reportado como potenciales productores de toxinas: *Planktothrix* sp., *Microcystis* sp., *Cylindrospermopsis* sp., *Dolichospermum* sp. (*Anabaena*), *Anabaenopsis* sp., *Oscillatoria* sp., *Phormidium* sp. (Carmichael *et al.*, 2001; Vasconcelos *et al.*, 2010; Quiblier *et al.*, 2013; Svircev *et al.*, 2019). De las dos poblaciones identificadas a nivel especie, *P. agardhii* (Svircev *et al.*, 2019) tiene reportes de producción de toxinas, mientras que de *P. spiroides* no se encontraron estudios sobre el tema, sin embargo, como ya se mencionó, su género sí es potencial productor.

Sin embargo, las muestras en las que se llevó a cabo el análisis de PCR no confirmaron la presencia del gen para microcistinas (Figuras 7 y 8) y anatoxinas (Figuras 9 y 10). No obstante, se deben considerar varios puntos: i) el análisis se llevó a cabo sólo para los clones obtenidos, los cuales representan exclusivamente a las poblaciones de *P. agardhii* de los sitios BLTK y CHAJ, a *P. spiroides* encontrada en la PTAR, y a *Ancylothrix* sp. de ECZ; ii) a pesar de los resultados, no es posible descartar que estas poblaciones sean productoras de cianotoxinas, ya que sólo se llevó a cabo el análisis con los oligonucleóticos más comunes para la detección de microcistinas HEPF y HEPR y anatoxinas ATXOAF y ATXAR, pudiendo presentar alguna otra variante de las muchas documentadas en la literatura (Casero *et al.*, 2020); iii) las poblaciones restantes, de los mismos sitios evaluados y de los que no se llevaron a cabo análisis moleculares, pertenecen a especies y géneros que se han documentado como potenciales productores de al menos una cianotoxina, pero no pudieron ser evaluados por la falta de biomasa en las muestras; iv) por último, al hacer la extracción de ADN directamente de la muestra tomada en campo, normalmente se obtiene el ADN de la especie más abundante o de aquella cuya extracción es más fácil al hacer la lisis celular; por ello queda un remanente de organismos que conforman el florecimiento que no se identificaron y a los que no se les hicieron análisis moleculares.

Por otro lado, el Bioensayo mostró que los metabolitos secundarios extraídos de las muestras del efluente, Chaj Chaj, Balamtetik, El Carrizal y la PTAR tienen un efecto letal en *Artemia salina*, ya que la mayoría de los individuos a los que se les agregó el extracto perecieron dentro de las 48 horas que dura el ensayo. Sin embargo, no se pudieron calcular las DL₅₀, ya que mayoría de los individuos perecieron antes del primer conteo, a las 24 horas del ensayo. Esto se puede deber a dos motivos, el primero es que existen otros metabolitos secundarios que requieren de análisis complementarios; el segundo, que se requiere experimentar con concentraciones más bajas a las recomendadas por el protocolo estandarizado. Una limitante experimental fue la escasez de biomasa, por lo que no se pudieron repetir los bioensayos para poner a prueba la segunda hipótesis.

Por todo lo descrito anteriormente, no se puede descartar el riesgo potencial de los sitios donde se encontraron cianobacterias, principalmente donde ocurrieron florecimientos y se registró la presencia de posibles productores de toxinas. De acuerdo con el principio precautorio, es necesario considerar que estas especies representan un riesgo para la salud de la población y, por lo tanto, es prioritario adoptar medidas ante la degradación del ambiente, lo cual favorece el desarrollo de estos organismos y más aún, los crecimientos abundantes o floraciones.

Por otro lado, en el análisis de la muestra de Ensueño no se encontraron cianobacterias y los parámetros físico-químicos analizados no mostraron contaminación del agua y se encontraron dentro los límites permisibles establecidos en el Proyecto de Ley para modificar la NOM-127. Esto demuestra, que el agua de este lago cumple con los requerimientos necesarios para el uso doméstico y consumo humano. Para ello, su cuidado incluye no permitir las actividades recreativas, como nadar o usar embarcaciones de transporte en el lago.

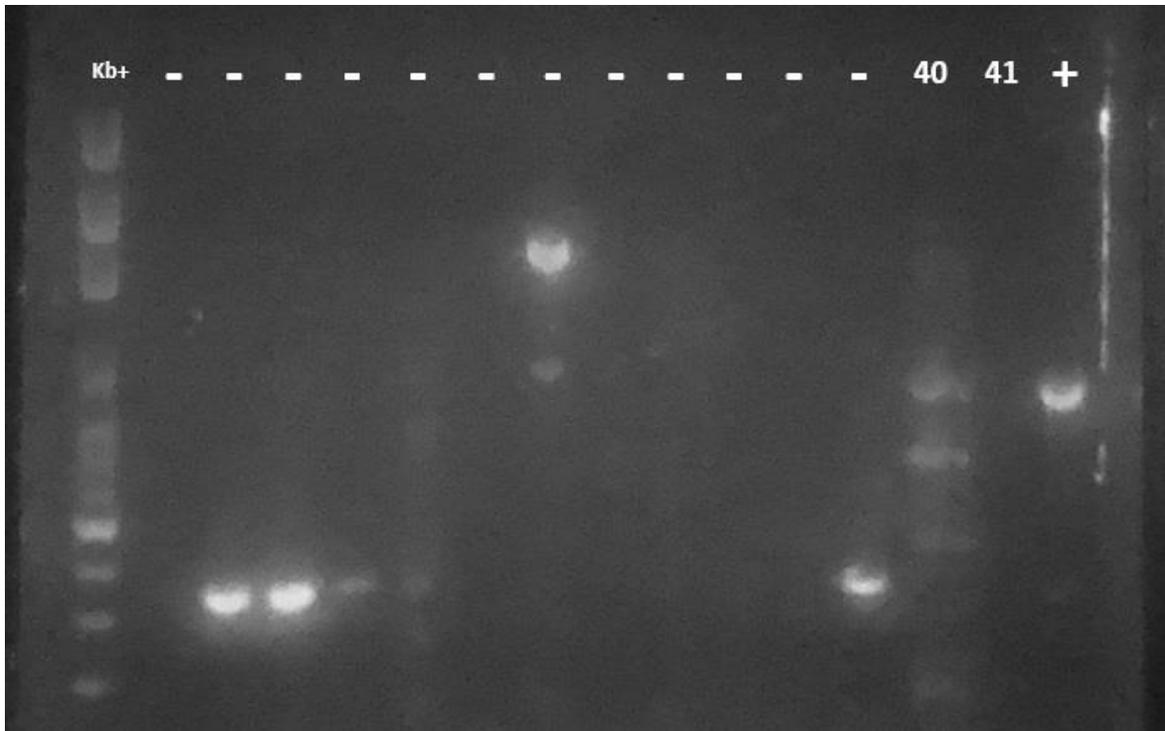


Figura 7. Gel de electroforesis para microcistinas con las muestras 40 (CHAJ) y 41 (BLTK). Las bandas restantes pertenecen a otras muestras no relevantes para este estudio.

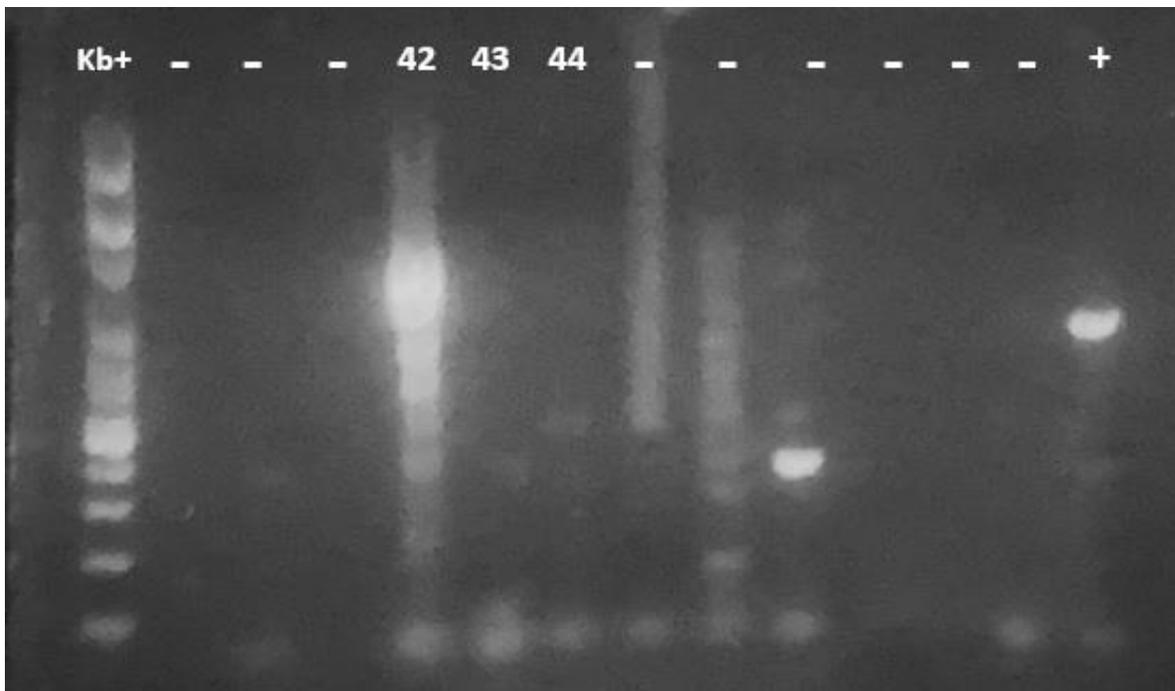


Figura 8. Gel de electroforesis para microcistinas con las muestras 42 (ECZ), 43 (PTAR) y 44 (EFT). Las bandas restantes perteneces a otras muestras no relevantes para este estudio.

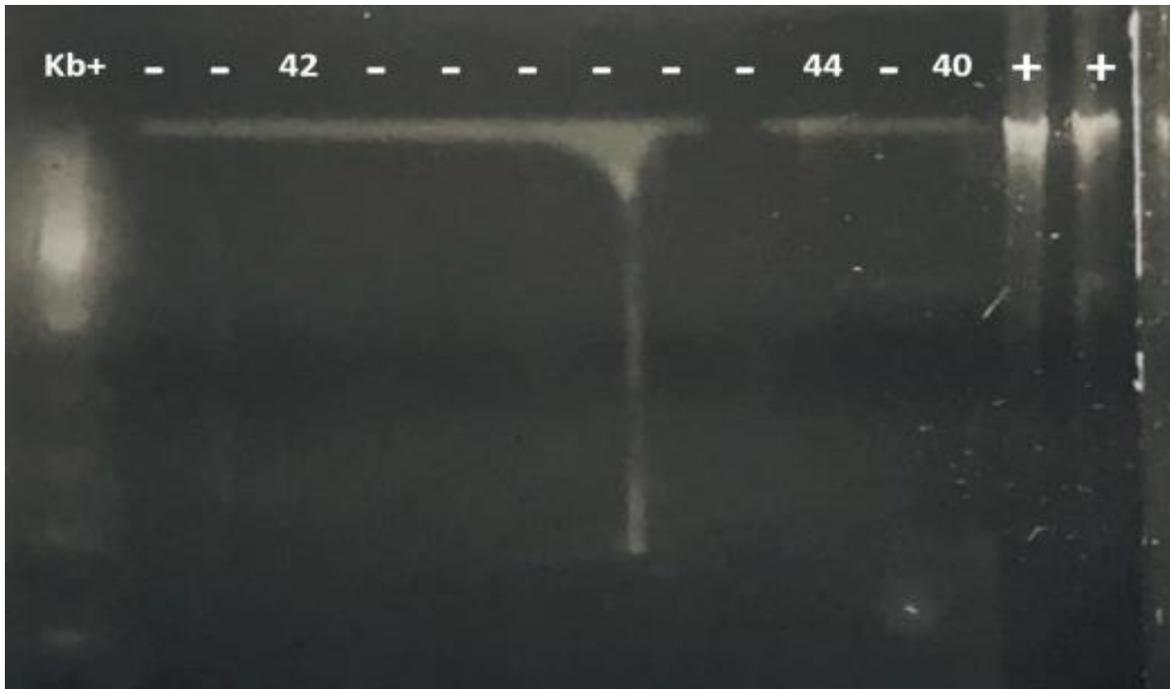


Figura 9. Gel de electroforesis para anatoxinas con las muestras 42 (ECZ), 44 (EFT) y 40 (BLTK). Las bandas restantes pertenecen a otras muestras no relevantes para este estudio.

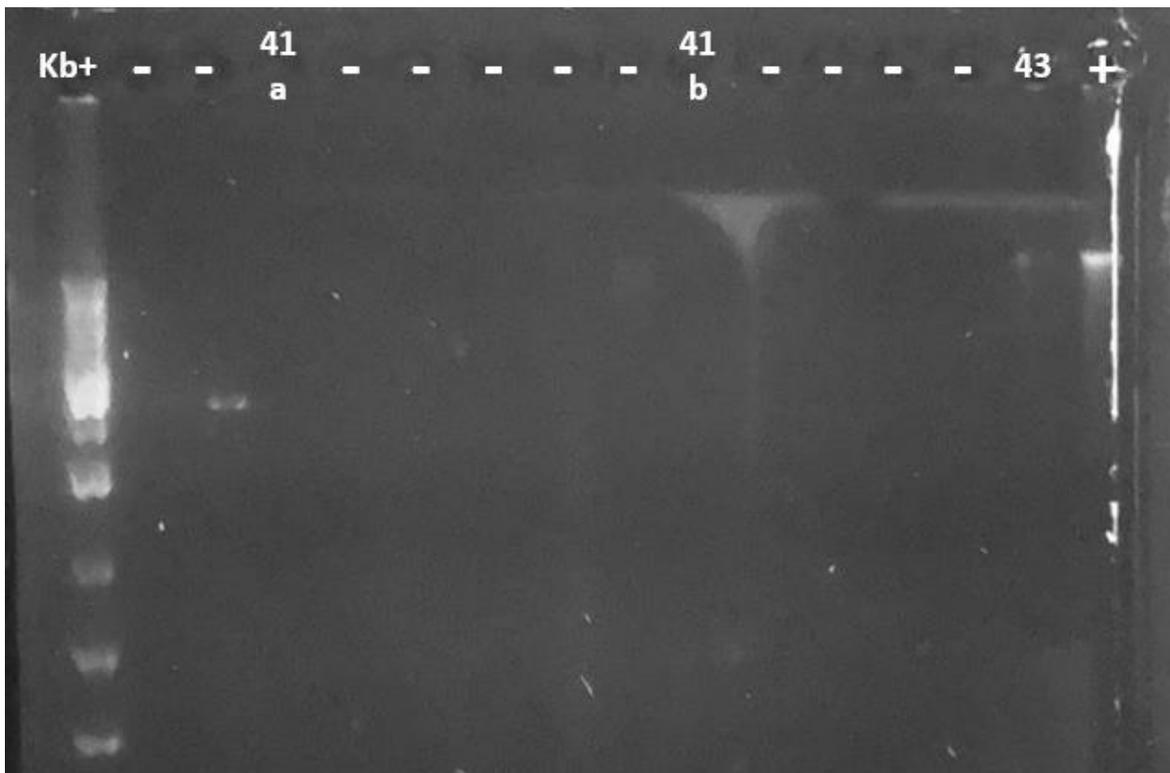


Figura 10. Gel de electroforesis para anatoxinas con las muestras 41a (CHAJ), 41b (CHAJ) y 43 (PTAR). Las bandas restantes pertenecen a otras muestras no relevantes para este estudio.

8. CONCLUSIONES

Los resultados físico-químicos de este estudio, muestran que, los sitios de muestreo presentan condiciones de pH, temperatura y concentración de nutrientes, óptimas para el desarrollo de cianobacterias, lo cual promueve la aparición de floraciones de las mismas. A su vez, la presencia de algunos géneros de cianobacterias como *P. agardhii* se ve relacionada con valor altos en parámetros como la conductividad y la turbidez, ya que son buenas competidoras bajo estas condiciones que son desfavorables para otras especies de cianobacterias.

En cuanto a la identificación de las cianobacterias, se confirma la importancia de aplicar un estudio de taxonomía polifásica, para disminuir la probabilidad de identificaciones incorrectas. Sin embargo, es preciso destacar, que aún con una aproximación polifásica, diversos factores, especialmente con relación a la secuenciación genética, pueden dificultar determinar la totalidad de las especies. En el caso de este trabajo, son las siguientes: i) en las muestras de campo, las cianobacterias planctónicas se presentan en consorcios, dificultando precisar de qué organismo identificado morfológicamente, es la extracción de ADN, sin embargo, se presupone que se está secuenciando e identificando el organismo más abundante; ii) algunas presentan poca biomasa, dependiendo de la especie y de las condiciones ambientales, siendo insuficiente la cantidad de biomasa para llevar a cabo una extracción de ADN; iii) hay una escasez de secuencias de cianobacterias, sobre todo de regiones tropicales, en las bases de datos, limitando la comparación y, por lo tanto, una aproximación a la identificación; iv) la taxonomía de cianobacterias se encuentra en constante evolución, con cambios regulares de especies a diferentes géneros y/o órdenes.

Con base en la caracterización morfológica, morfométrica y genética, se identificaron un total de 13 poblaciones de cianobacterias, pertenecientes a los órdenes Oscillatoriales, Nostocales y Chroococcales. Dos se identificaron a nivel de especie: *P. agardhii* y *P. spiroides*; y las 11 restantes a nivel de género: *Anabaenopsis* sp., *Ancylothrix* sp., *Cylindrospermopsis* sp., *Dolichospermum* sp.,

Microcystis sp., *Oscillatoria* sp. 1, *Oscillatoria* sp. 2, *Oscillatoria* sp.3, *Phormidium* sp., *Planktothrix* sp. y *Raphidiopsis* sp.

A partir de las secuencias 16S rRNA obtenidas, se pudo confirmar la identificación morfológica de *P. agardhii* para las poblaciones de Balamtetik, Chaj Chaj y el efluente. Por otro lado, se rectificó la clasificación de una de las poblaciones de la PTAR, identificada por su morfología como *Arthrospira* sp., modificándola con base en la identificación genética a *P. spiroides*. Así mismo, la población de ECZ se identificó como *Ancylothrix* sp.

En cuanto a la ecología de las especies, *P. agardhii* se encontró con mayor distribución y abundancia, esta especie suele dominar gracias a diferentes adaptaciones, como la presencia de vacuolas de gas y tolerancia a bajas intensidades de luz y a bajas temperaturas.

Las poblaciones identificadas pertenecen a géneros que han sido reportados como potenciales productores de toxinas: *Planktothrix*, *Microcystis*, *Cylindrospermopsis*, *Raphidiopsis*, *Dolichospermum* (*Anabaena*), *Anabaenopsis*, *Oscillatoria* y *Phormidium*.

En cuanto a la determinación del potencial riesgo toxicológico, los resultados del análisis de PCR y del Bioensayo no fueron contundentes, por lo cual no se puede confirmar o refutar la producción de cianotoxinas por parte de las poblaciones encontradas en los diferentes sitios, en particular porque los análisis se hicieron con poblaciones de muestras de campo, que se encontraban en consorcio, en lugar de poblaciones en mono-cultivos, que estarían debidamente aisladas y, porque hay una gran variedad de genes relacionados con las toxinas analizadas.

9. RECOMENDACIONES

Con base en los resultados de este estudio, se hacen las siguientes recomendaciones, para continuar con la investigación relacionada con el objetivo de este estudio.

9.1 Identificación de especies

Para identificar las cianobacterias en su totalidad a nivel de especie, se recomienda realizar cultivos de las diferentes poblaciones, para separar las poblaciones que conforman el consorcio de las muestras de campo, y para obtener la mayor biomasa posible, necesaria para realizar la extracción de ADN y posteriores análisis moleculares. También se sugiere llevar a cabo análisis filogenéticos, para determinar la especie con mayor precisión a nivel genético.

Específicamente, en cuanto a la especie identificada en este estudio como *Ancylothrix* sp., es preciso realizar análisis genéticos, para confirmar el género y determinar la especie, ya que es un género que solo se ha registrado, hasta este momento, en Brasil (Martins *et al.*, 2016).

Por otro lado, es necesario llevar a cabo muestreos en diferentes épocas del año, ya que tanto la diversidad, riqueza y dominancia en los consorcios de cianobacterias planctónicas cambia con base en los factores ambientales, que se pueden ver afectados por las estaciones del año, como temperatura y luz.

9.2 Análisis del potencial riesgo toxicológico

En relación al análisis de producción de cianotoxinas, se hacen las siguientes recomendaciones: I) llevar a cabo análisis de las fracciones intracelulares mediante PCR con oligonucleótidos para otras variantes de microcistinas y anatoxinas, así como para otras cianotoxinas; II) realizar análisis de detección de cianotoxinas en el agua, en los sitios donde la biomasa no sea suficiente para el análisis de PCR; III) se requiere llevar a cabo el Bioensayo con concentraciones del extracto más bajas a las recomendadas por el protocolo de experimentación IV) realizar Bioensayos con extracciones de cultivos de cianobacterias muestreadas, para descartar el sesgo del consorcio y V) se recomienda el cultivo de las especies de

cianobacterias colectadas durante los florecimientos, para reconocer la identidad taxonómica y potencial toxicidad de cada una de ellas.

9.3 Dispersión de las cianobacterias

Para determinar la forma de dispersión de las cianobacterias y otros organismos fitoplanctónicos entre los lagos, se recomienda llevar a cabo estudios enfocados en los embalses utilizados para el turismo y en los canales subterráneos.

9.4 Principio precautorio

Por último, con base en el principio precautorio, es necesario que se adopten medidas para disminuir la degradación del ambiente, que está favoreciendo el desarrollo de las cianobacterias, ya que cabe la posibilidad de que éstas sean productoras de toxinas, y representen un peligro para la salud humana.

10. REFERENCIAS

- Anagnostidis, K. (2001). Nomenclatural changes in cyanoprokaryotic order Oscillatoriales. *Preslia*, 73, 359-375.
- Anagnostidis, K. y Komárek, J. (1985). Modern approach to the classification system of cyanophytes 1: Introduction. *Archiv für Hydrobiologie*, Supplementband 71, Algological Studies, 38/39, 291–302.
- Anagnostidis, K. y Komárek, J. (1988). Modern approach to the classification system of cyanophytes 3: Oscillatoriales. *Archiv für Hydrobiologie*, Supplementband 80, 327-472.
- Alcocer, J., Oseguera, L.A., Sánchez, G., González, C.G., Martínez J.R., González, R. (2016). Bathymetric and morphometric surveys of the Montebello Lakes, Chiapas. *Journal of Limnology*, 75, 56-65.
- Alcocer, J., Merino-Ibarra, M., Oseguera, L. A., Escolero, O. (2018). Anthropogenic impacts on tropical karst lakes: “Lagunas de Montebello”, Chiapas. *Ecohydrology*, 11(8), 1–13.
- Alvarado Velázquez, J. (2017). *Evaluación del transporte de sedimentos y la calidad del agua, utilizando SWAT, en el Río Grande de Comitán, Chiapas*. Tesis de Maestría. Laboratorio Nacional de Ciencias de la Sostenibilidad, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Arnold, D. E. (1971). Ingestion, assimilation, survival and reproduction by *Daphnia pulex* fed seven species of blue-green algae. *Limnology Oceanography*, 16(6), 906–920.
- Atlas, R. y Bertha, R. (2002). *Ecología microbiana y microbiología ambiental* (4ta ed.). Pearson Educación.
- Aubriot, L. y Bonilla, S. (2013). *Protocolo para la extracción y el análisis de clorofila-a por espectrofotometría*. Sección Limnología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República de Uruguay.

- Azevedo, S. M., Carmichael, W. W., Jochimsen, E. M., Rinehart, K. L., Lau, S., Shaw, G. R. y Eaglesham, G. K. (2002). Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. *Toxicology*, 181-182, 441-6.
- Beversdorf, L. J., Miller, T. R., McMahon, K. D. (2013). The role of nitrogen fixation in cyanobacterial bloom toxicity in a temperate, eutrophic lake. *Plos One*, 8(2), e56103.
- Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 62(3), 293–300.
- Bonilla S. y Aubriot L. (2009). Cianobacterias, floraciones y distribución de las cianobacterias (Capítulo 1). En S. Bonilla (Ed.), *Cianobacterias planctónicas del Uruguay: Manual para la identificación y medidas de gestión*. Documento Técnico PHI-LAC, N°16. (1-4). UNESCO Programa Hidrológico Internacional para América Latina y el Caribe.
- Bricelj, V. M., Connell, L., Konoki, K., MacQuarrie, S. P., Scheuer, T., Catterall, W. A., Trainer, V. L. (2005). Sodium channel mutation leading to saxitoxin resistance in clams increases risk of PSP. *Nature*, 434, 763–767.
- Brooks, J. D. y Carey, C.C. (2011). Resilience to Blooms. *Science*, 334(6052), 46-47.
- Cantoral-Uriza, E. A., Asencio Martínez, A. D., Aboal Sanjurjo, M. (2017). Cianotoxinas: efectos ambientales y sanitarios. Medidas de prevención. *Hidrobiologica*, 27(2), 241-251.
- Carmichael, W. W., Beasley, V., Bunner, D. L., Eloff, J.N., Falconer, I., Gorham, P., Harada, K., Krishnamurthy, T., Yu, M. J., Moore, R. E. (1988). Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). *Toxicon*, 26, 971–973.
- Carmichael, W. W. (2001). Health effects of toxin-producing cyanobacteria: “The CyanoHABs”. *Human and Ecological Risk Assessment*, 7(5), 1393–1407.
- Castenholz, R. (1989). Subsection III Order Oscillatoriales. En J. Staley, M. Bryant, N. Pfennig y J. Holt (Eds.), *Bergey’s manual of systematic bacteriology* (1710–1806). William and Wilkins.

- Castenholz, R., Rippka, R., Herdman, M., Wilmotte, A. (2001). Subsection III (Formerly Oscillatoriales Elenkin 1934). En G. Garrity (Ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology* (2da ed.) (539–562). Springer-Verlag.
- Chen, J. y Xie, P., (2005). Seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins in various organs of four freshwater bivalves from the large eutrophic Lake Taihu of subtropical China and the risk to human consumption. *Environmental Toxicology*, 20, 572-584.
- Chorus I. y Bartram J. (1999). *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. E & FN Spon.
- Chu, F. S., Huang X., Wei R. D. (1990). Enzyme-linked immunosorbent assay for microcystins in blue-green algal blooms. *Journal Association of Official Analytical Chemists*, 73(3), 451-456.
- Clarke, K. R. y Gorley, R. N. (2006). PRIMER v6: User Manual/Tutorial (Plymouth Routines in Multivariate Ecological Research). PRIMER-E, Plymouth.
- Codd, G. A., Edwards, C., Beattie, K. A., Barr, W. M., Gunn, G. J. (1992). Fatal attraction to cyanobacteria?. *Nature*, 359, 110–111.
- Codd, G. A., Metcalf, J. S., Morrison, L. F., Krienitz, L., Ballot, A., Pflugmacher, S., Wiegand, C., Kotut, K. (2003). Susceptibility of flamingos to cyanobacterial toxins via feeding. *Veterinary Record*, 152, 722–723
- CONANP (Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas). (2007). *Programa de Conservación y Manejo Parque Nacional Lagunas de Montebello*. CONANP.
- CONANP (Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas). (2011). *Parque Nacional Lagunas de Montebello “Programa de monitoreo de calidad del agua”: Estudio para monitorear los parámetros de calidad de agua de las lagunas comunicadas con el sistema lagunar Tepancoapan*. Comitán de Domínguez, Chiapas. CONANP.
- CFE (Compañía Federal de Electricidad). (2012). *Estudio para conocer la calidad de las lagunas de Montebello, Chiapas*, Tomo I: Hidrometeorología “Caracterización meteorológica e hidrogeográfica”. Subdirección de Proyectos y Construcción.

- Carr, N. G., Whitton, B. A. (1982). *The biology of cyanobacteria*. Blackwell Scientific Publications.
- Castenhols, R. W. y Norris, T. (2005). Revisionary concepts of species in the Cyanobacteria and their applications. *Algological Studies*, 117(1), 53-69.
- De León, L. (2002). Floraciones de cianobacterias en aguas continentales del Uruguay: causas y consecuencias. En A. Domínguez y R. Prieto (Eds.), *Perfil Ambiental del Uruguay* (28-37). Nordan-Comunidad.
- Díez, B., Bergman, B. y El-Shehawy, R. (2008). Marine diazotrophic cyanobacteria: out of the blue. *Plant Biotechnology Journal*, 25, 221–225.
- Dodds, W. K., Bouska, W. W., Eitzmann, J. L., Pilger, T. J., Pitts, K. L., Riley, A. J., Schloesser, J. T., Thornbrugh, D. J. (2009). Eutrophication of U.S. Freshwaters: Analysis of Potential Economic Damages. *Environmental Science & Technology*, 43, 12-19.
- Dolman, A. M., Rücker, J., Pick, F. R., Fastner, J., Rohlack, T., Mischke, U., Wiedner, C. (2012). Cyanobacteria and Cyanotoxins: The Influence of Nitrogen versus Phosphorus. *Plos One*, 7(6), e38757.
- dos Santos Severiano, J., dos Santos Almeida-Melo, V. L., Bittencourt-Oliveira, M. do C., Chia, M. A., do Nascimento Moura, A. (2018). Effects of increased zooplankton biomass on phytoplankton and cyanotoxins: A tropical mesocosm study. *Harmful Algae*, 71, 10–18.
- Environmental Protection Agency. (2014). *Cyanobacterial and Cyanotoxins: Information for drinking water systems*. Fact Sheet.
- Esposito, G., Teta, R., Marrone, R., De Sterlich, C., Casazza, M., Anastasio, A., Lega, M., Costantino, V.A. (2019). Fast Detection Strategy for Cyanobacterial blooms and associated cyanotoxins (FDSCC) reveals the occurrence of lyngbyatoxin A in campania (South Italy). *Chemosphere*, 225, 342-351.

- Falch, B. S., König, G. M., Wright, A. D., Sticher, O., Angerhofer, C. K., Pezzuto, J. M., y Bachmann, H. (1995). Biological activities of cyanobacteria: evaluation of extracts and pure compounds. *Planta Medica*, 61(4), 321–328.
- Ferguson, A. J. (1999). Toxic Cyanobacteria in Water, editado por Ingrid Chorus y Jamie Bartram. *Journal of Applied Phycology*, 11(6), 595.
- Fernández, R., Oseguera, L. A., y Alcocer, J. (2020). Zooplankton biodiversity in tropical karst lakes of southeast Mexico, Chiapas. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 91, e913184.
- Figuroa-Sánchez, M. A., Sarma, N. y Sarma, S. S. S. (2014). Zooplankton community structure in the presence of low levels of cyanotoxins: A case study in a high altitude tropical reservoir (Valle de Bravo, Mexico). *Journal of Limnology*, 73 (1), 157-166.
- Flores, E. y Wolk, C. P. (1986). Production, by filamentous, nitrogen-fixing cyanobacteria, of a bacteriocin and of other antibiotics that kill related strains. *Archives of Microbiology*, 145, 215–219.
- Fonseca, B. M. y Bicudo, C. E. M. (2008). Phytoplankton seasonal variation in a shallow stratified eutrophic reservoir (Garcas Pond, Brazil). *Hydrobiología*, 600, 267–282.
- Francis, G. (1878). Poisonous Australian lake. *Nautre*, 18, 1-12.
- García, E. (1981). *Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen (Para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana)*. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Geografía.
- Gross, E. M., Wolk, C. P. y Jutter, F. (1991). Fischerellin, a new allelochemical from the freshwater cyanobacterium *Fischerella muscicola*. *Journal of Phycology*, 27, 686–692.
- Gugger, M., Molica, R., Le Berre, B., Dufour, P., Bernard, C. y Humbert, J. F. (2005). Genetic diversity of *Cylindrospermopsis* strains (Cyanobacteria) isolated from four continents. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 1097–1100.

- Havens, K. E. (2008). Cyanobacteria blooms: effects on aquatic ecosystems. En H. Hudnell (Ed.), *Cyanobacterial harmful algal blooms: State of the science and research needs*. Springer-Verlag.
- Heisler, J., Glibert, P.M., Burkholder, J., Anderson, D.M., Cochlan, W.P., Dennison, W.C., Gobler, C.J., Dortch, Q., Heil, C., Humphries, E., Lewitus, A.J., Magnien, R.E., Marshall, H., Sellner, K.G., Stockwell, D., Stoecker, D.K., y Suddleson, M. (2008). Eutrophication and Harmful Algal Blooms: A Scientific Consensus. *Harmful algae*, 8(1), 3-13.
- Hilborn, E. D., y Beasley, V. R. (2015). One health and cyanobacteria in freshwater systems: Animal illnesses and deaths are sentinel events for human health risks. *Toxins*, 7(4), 1374–1395.
- Hisberger M., y Christiansen G. (2003). PCR-based Identification of Microcystin-producing Genotypes of Different Cyanobacterial Genera. *Archive of Microbiology*, 180, 402-410.
- Holland A. y Kinner S. (2013). Interpreting the possible ecological role(s) of cyanotoxins: compounds for competitive advantage and/or physiological aide?. *Marine Drugs*, 11(7), 2239–2258.
- Howarth, R. W., Marino, R., Lane, J. y Cole, J. J. (1988). Nitrogen-fixation in freshwater, estuarine and marine ecosystems. 1. Rates and importance. *Limnology and Oceanography*, 33, 669–87.
- Huisman, J., Codd, G. A., Paerl, H. W., Ibelings, B. W., Verspagen, J. M. H. y Visser, P. M. (2018). Cyanobacterial blooms. *Nature Reviews Microbiology*, 16(8), 471-483.
- Ibelings, B. W., Backer, L. C., Kardinaal, W. E. A., y Chorus, I. (2014). Current approaches to cyanotoxin risk assessment and risk management around the globe. *Harmful Algae*, 40, 63–74.
- Jang, M.-H., Ha, K., Joo, G.-J. y Takamura, N. (2003). Toxin production of cianobacteria is increased by exposure to zooplankton. *Freshwater Biology*, 48(9), 1540–1550.

- Jin-Aee Lee, Ae Ran Choi y Masayuki Watanabe. (1997). Taxonomic Implications of the Genus *Microcystis* (Cyanophyceae) from the Nakdong River. *Algae*, 12(3), 167-176.
- Jungblut, A.-D. y Neilan, B. A. (2006). Molecular identification and evolution of the cyclic peptide hepatotoxins, microcystin and nodularin, synthetase genes in three orders of cyanobacteria. *Archives of Microbiology*, 185(2), 107–114.
- Komárek, J. (2006). A polyphasic approach for the taxonomy of cyanobacteria: principles and applications. *European Journal of Phycology*, 51(3), 346-353.
- Komárek, J. (2013). *Süßwasserflora Von Mitteleuropa: Cyanoprokaryota. 3 Teil/Part 3: Heterocytous Genera*. Springer-Verlag.
- Komárek, J. y Anagnostidis, K. (1989). Modern approach to the classification system of Cyanophytes 4 - Nostocales. *Algological Studies*, 56, 247-345.
- Komárek, J. y Anagnostidis K. (2004). Taxonomic review of the cyanoprokaryotic genera *Planktothrix* and *Planktothricoides*. *Czech Phycology*, 4, 1-18.
- Komárek, J. y Anagnostidis, K. (2005). Modern approach to the classification system of cyanophytes. 3. Oscillatoriales. *Archiv für Hydrobiologie, Supplement*. 80,1/4 (Algological Studies 50/53), 327-472.
- Komárek, J. y Komárková, J. (2004). Taxonomic review of the cyanoprokaryotic genera *Planktothrix* and *Planktotrichoides*. *Czech Phycology*, 4, 1-18.
- Komárek, J. y Mareš, J. (2012). An update to modern taxonomy (2011) of freshwater planktic heterocytouscyanobacteria. *Hydrobiologia*, 698, 327–351.
- Lepère, C., Wilmotte, A., y Meyer, B. (2000). Molecular Diversity of *Microcystis* Strains (Cyanophyceae, Chroococcales) Based on 16S rDNA Sequences. *Systematics and Geography of Plants*, 70(2), 275.
- Lewis, W. M. Jr. (1987). Tropical limnology. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18, 158–184.

- Lewis, W. M. Jr. (1996). Tropical lakes: how latitude makes a difference. En F. Schiemer y K. Boland (Eds.), *Perspectives in tropical limnology* (43-64). SPB Academic Publishing.
- Li, X., Li, S., Kong, R. y Li R. (2016). Molecular separation of two long taxonomically debated cyanobacterial genera *Cylindrospermopsis* and *Raphidiopsis* (Nostocales) based on the ITS-L phylogeny. *Harmful Algae*, 57, 88–97.
- Li, R., Wilhelm, S. W., Carmichael W. W. y Watanabe M. M. (2008). Polyphasic characterization of water bloom forming *Raphidiopsis* species (cyanobacteria) from central China. *Harmful Algae*, 7, 146–153.
- Likens, G. E. (2010). *Plankton of inland waters: A derivative of Encyclopedia of inland waters*. Academic Press/Elsevier.
- Lin S., Wu Z., Yu G., Zhu M., Yu B. y Li R. (2010). Genetic diversity and molecular phylogeny of *Planktothrix* (Oscillatoriales, cyanobacteria) strains from China. *Harmful Algae*, 9, 87–97.
- Llewellyn, L. E. (2006). Saxitoxin, a toxic marine natural product that targets a multitude of receptors. *Natural Product Report*, 23, 200–222.
- Llewellyn, L. E. (2009). Sodium channel inhibiting marine toxins. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, 46, 67–97.
- Lokmer, A. (2007). *Polyphasic approach to the taxonomy of the selected oscillatorian strains (Cyanobacteria)*. University of South Bohemia, Faculty of Biological Sciences.
- Lo, D. (1998). *Clinical Application of PCR* (Vol. 16). Humana Press.
- Margalef, R. (1983). *Limnología*. Ediciones Omega.
- Martins, M. D., Rigonato, J., Taboga, S. R. y Branco L. H. Z. (2016). Proposal of *Ancylothrix* gen. nov., a new genus of Phormidiaceae (Cyanobacteria, Oscillatoriales) based on a polyphasic approach. *International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology*, 66(6), 2396-2405.

- Makower, A. K., Schuurmans J. M., Groth D., Zilliges Y., Matthijs H. C. P. y Dittmann E. (2015). Transcriptomics-aided dissection of the intracellular and extracellular roles of microcystin in *Microcystis aeruginosa* PCC 7801. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 544–554.
- Márquez Santamaría, K. P. (s.f). Evaluación de la toxicidad potencial en cianobacterias y sus efectos ecológicos en la comunidad de macroinvertebrados bentónicos asociados en ríos de montaña. (Tesis de maestría no publicada). Universidad Nacional Autónoma de México.
- McGregor, G. B. y Fabbro, L. D. (2000). Dominance of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanoprokaryota) in Queensland tropical and subtropical reservoirs: implications for monitoring and management. *Lakes and Reservoirs: Research and Management*, 5, 195-205.
- Metcalf, J. S. y Codd, G. A. (2012). Cyanotoxins. En B. Whitton (Ed.), *Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time* (651– 675). Springer.
- Mohamed, Z. A. (2007). First report of toxic *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Raphidiopsis mediterranea* (Cyanoprokaryota) in Egyptian fresh waters. *FEMS Microbiology Ecology*, 59, 749–761.
- Mora, L. P., Lucy, Bonifaz, R. y López-Martínez, R. (2016). Unidades geomorfológicas de la cuenca del Río Grande de Comitán, Lagos de Montebello, Chiapas-México. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*, 68(3), 377-394.
- Moustaka-Gouni, M., Kormas, K. A., Vardaka, E., Katsiapi, M. y Gkelis, S. (2009). *Raphidiopsis mediterranea* Skuja represents non-heterocytous life-cycle stages of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju in Lake Kastoria (Greece), its type locality: evidence by morphological and phylogenetic analysis. *Harmful Algae*, 8, 864–872.
- Msgati, T. A., Siame, B. A. y Shushu, D. D. (2006). Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. *Aquatic Toxicology*, 78, 382-397.

- Mühlsteinová, R., Hauer, T., De Ley, P. y Pietrasiak, N. (2018). Seeking the true *Oscillatoria*: a quest for a reliable phylogenetic and taxonomic reference point. *Preslia*, 90, 151–169.
- Nelissen, B., Wilmotte, A., Neefs, J.-M. y De Wachter, R. (1994). Phylogenetic relationships among filamentous helical cyanobacteria investigated on the basis of 16S ribosomal RNA gene sequence analysis. *Systematic and Applied Microbiology*, 17, 206–210.
- Nishiwaki-Matsushima, R., Ohta, T., Nishiwaki, S., Suganuma, M., Kohyama, K., Ishikawa, T., Carmichael, W. W. y Fujiki, H. (1992). Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 118, 420-424.
- Nübel, U., Garcia Pichel, F. y Muyzer, G. (1997). PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (8), 3327–3332.
- O’Neil, J. M., Davis, T. W., Burford, M. A. y Gobler, C. J. (2012). The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae*, 14, 313-334.
- Oberhaus, L., Briand, J. F., Leboulanger, C., Jacquet, S. y Humbert, J. F. (2007). Comparative effects of the quality and quantity of light and temperature on the growth of *Planktothrix agardhii* and *P. rubescens*. *Journal of Phycology*, 43(6), 1191–1199.
- Oberholster, P. J., Myburgh, J. G., Govender, D., Bengis, R. y Botha, A-R. (2009). Identification of toxigenic *Microcystis* strains after incidents of wild animal mortalities in the Kruger National Park, South Africa. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72, 1177–1182.
- Oliver, R. L. y Ganf, G. (2002). Freshwater blooms. En B. Whitton, M. Potts (Eds.), *The ecology of cyanobacteria* (149-194). Springer Netherlands.

- Olivier, R. L., Hamilton, D. P., Brookes, J. D. y Ganf, G. G. (2012). Physiology, blooms and prediction of planktonic cyanobacteria. En B. Whitton (Ed.), *Ecology of Cyanobacteria II: their Diversity in Space and Time* (155-194). Springer-Verlag.
- Otsuka, S., Suda, S., Li, R., Matsumoto, S. y Watanabe, M. M. (2000). Morphological variability of colonies of *Microcystis* morphospecies in culture. *Journal of General and Applied Microbiology*, 46(1), 39-50.
- Pacheco, A. J., Marin, L. E., Cabrera, S. A., Steinich, B., y Escolero, O. (2001). Nitrate temporal and spatial pattern in twelve water supply wells, Yucatan, Mexico. *Environmental Geology*, 40, 708–715.
- Paerl, H. W. y Ustach, J. F. (1982). Blue-Green Algal Scums: An Explanation for Their Occurrence During Freshwater Blooms. *Limnology and Oceanography*, 27(2), 212.
- Palinska, K. A. y Krumbein, W. E. (1998). Patterns of growth in coccoid, aggregate forming cyanobacteria. *Annales Botanici Fennici*, 35(3), 219-227.
- Patterson, G. M. L. y Bolis, C. M. (1997). Fungal cell-wall polysaccharides elicit an antifungal secondary metabolite (Phytoalexin) in the cyanobacterium *Syntonema acellatum*. *Journal of Phycology*, 33, 54–60.
- Ramírez-García, P., Martínez-Romero, M., Martínez-Salgado, D. y Eslava-Campos, C. (2004). Cianobacterias, microorganismos del fitoplancton y su relación con la salud humana. *Instituto Nacional de Ecología*, 1-18.
- Rabalais, N. N., Díaz, R. J., Levin, L. A., Turner, R. E., Gilbert, D. y Zhang, J. (2010). Dynamics and distribution of natural and human-caused hypoxia. *Biogeosciences*, 7, 585–619.
- Rai, A. N. (1990). *CRC Handbook of Symbiotic Cyanobacteria*. CRC Press.
- Rajaniemi, P., Hrouzek, P., Kastovska, K., Willame, R., Rantala, A., Hoffman, L., Komárek, J. y Sivonen, K. (2005). Phylogenetic and morphological evaluation of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Trichormus* and *Nostoc* (Nostocales, Cyanobacteria). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 11–26.

- Rivera-Herrera, E. M., Vargas-Sánchez, M., Alcocer, J. y Oseguera-Pérez, L.A. (2019). Impacto antrópico en la biomasa fitoplanctónica de lagos kársticos, Chiapas, México. En F. Paz, A. Velázquez y M. Rojo (Eds), *Estado Actual del Conocimiento del Ciclo del Carbono y sus Interacciones en México: Síntesis a 2019* (318-324). Programa Mexicano del Carbono.
- Roset, J., Aguato, S., Muñoz, M. J. (2001). Detección de Cianobacterias y sus Toxinas. Revisión. *Revista de Toxicología*. 18, 65-71.
- Scheffer, M., Rinaldi, S., Gragnani, A., Mur, L. y van Nes, E. H. (1997). On the dominance of filamentous cyanobacteria in shallow, turbid lakes. *Ecology*, 78(1), 272–282.
- Scheffer, M., Hosper, S. H., Meijer, M. L., Moss, B. y Jeppesen, E. (1993). Alternative equilibria in shallow lakes. *Trends in Ecological and Evolution*, 8, 275–279
- Scheffer, M. y Carpenter, S. R. (2003). Catastrophic regime shifts in ecosystems: linking theory to observation. *Trends in Ecology and Evolution*, 18, 648–656.
- Schopf, J. y Walter, M. (1982). Origin and early evolution of cyanobacteria: the geological evidence. En N. Carr y B. Whitton (Eds.), *The Biology of Cyanobacteria* (543-564). Blackwell Scientific Publications.
- Sivonen, K. y Jones, G. (1999). Cyanobacterial Toxins. En: I. Chorus y J. Bartram (Eds.), *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring, and Management* (41-111). E & FN Spon.
- Smayda, T. J. (1974). Some experiments on the sinking characteristics of two freshwater diatoms. *Limnology and Oceanography*, 19, 628–635.
- Smith, J. L., Boyer, G. L. y Zimba, P. V. (2008). A review of cyanobacterial odorous and bioactive metabolites: impacts and management alternatives in aquaculture. *Aquaculture*, 280, 5–20.
- Song, L., Chen, W., Peng, L., Wan, N., Gan, N. y Zhang, X. (2007). Distribution and bioaccumulation of microcystins in water columns: a systematic investigation into the environmental fate and the risks associated with microcystins in Meiliang Bay, Lake Taihu. *Water Research*, 41, 2853-2864.

- Stucken, K., Murillo, A. A., Soto-Liebe, K., Fuentes- Valdés, J. J., Méndez, M. A. y Vásquez M. (2009). Toxicity phenotype does not correlate with phylogeny of *Cylindrospermopsis raciborskii* strains. *Systematic and Applied Microbiology*, 32, 37-48.
- Suda, S., Watanabe, M. M., Otsuka, S., Mahakahant, A., Yongmanitchai, W., Nopartnaraporn, N., Liu, Y. y Day, J. G. (2002). Taxonomic revision of water-bloom-forming species of oscillatoriod cyanobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 1577-1595.
- Svirčev, Z., Lalić, D., Bojadžija Savić, G., Tokodi, N., Drobac Backović, D., Chen, L., Meriluoto, J. y Codd, G. A. (2019). Global geographical and historical overview of cyanotoxin distribution and cyanobacterial poisonings. *Archives of Toxicology*, 93(9), 2429–2481.
- Tomasini-Ortiz, A. C., Moeller-Chávez, G., Sánchez, J. J. y Bravo L. A. (2012). Cianobacterias y cianotoxinas en el lago de Pátzcuaro, Michoacán, México. *Revista AIDS de Ingeniería y Ciencias Ambientales: Investigación, desarrollo y práctica*, 5(2), 93-101.
- Uriza, E. A. C., Martínez, A. D. A. y Sanjurjo, M. A. (2017). Cianotoxinas: efectos ambientales y sanitarios. Medidas de prevención. *Hidrobiológica*, 27(2), 241–251.
- van den Hoek, C., Mann, D. G. y Jahns, H. M. (2002). *Algae: An introduction to phycology*. Cambridge University Press.
- Vargas Sánchez, Mariana. (2019). *Variación del seston en lagos del Parque Nacional "Lagunas de Montebello", Chiapas, México*. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, Coordinación General de Estudios de Posgrado, UNAM.
- Vázquez, M. A., y Méndez, E. (1994). Aspectos generales de la región: Lagos de Montebello, Reporte del trabajo para el curso de conservación de naturaleza y recursos naturales, Maestría en Ciencias: Recursos Naturales y Desarrollo Rural, ECOSUR Chiapas.

- Vichi, S., Buratti, F. M., y Testai, E. (2016). Microcystins: Toxicological Profile. En P. Gopalakrishnakone, V. Haddad Jr., A. Tubaro, E. Kim y W. R. Ken (Eds.), *Marine and Freshwater Toxins* (219–238). Springer Netherlands.
- Vonshak, A., Tomaselli, L. (2000). Arthrospira (Spirulina): Systematics and Ecophysiology. En B. Whitton y M. Potts (Eds.), *The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space* (505-522). Springer Netherlands.
- Wacklin, P., Hoffmann, L. y Komárek, J. (2009). Nomenclatural validation of the genetically revised cyanobacterial genus Dolichospermum (Ralfs ex Bornet et Flahault) comb. nova. *Fottea*, 9(1), 59-64.
- Walls, J. T., Wyatt, K. H., Doll, J. C., Rubenstein, E. M., y Rober, A. R. (2018). Hot and toxic: Temperature regulates microcystin release from cyanobacteria. *Science of the Total Environment*, 610–611, 786–795.
- Wang, Q., Xie, P., Chen, J. y Liang, G. (2008). Distribution of microcystins in various organs (heart, liver, intestine, gonad, brain, kidney and lung) of Wistar rat via intravenous injection. *Toxicon*, 52(6), 721-7.
- Ward, D. M., Ferris, M. J., Nold, S. C., Bateson, M. M., Kopczynski, E. D. y Ruff-Roberts, A. L. (1994). Species diversity in hot spring microbial mats as revealed by both molecular and enrichment culture approaches - relationship between biodiversity and community structure. En L. Stal y P. Coumète (Eds.), *Microbial mats: structure, development and environmental significance* (Vol. 35) (33-44). Springer-Verlag.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. y Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697-703.
- Whitton, B. A. y Potts, M. (2002). Introduction to the cyanobacteria, En B. Whitton y M. Potts (Eds.), *The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space* (1-11). Springer Netherlands.
- Wilmotte, A. (1994). Molecular evolution and taxonomy of cyanobacteria. En D. Bryant (Ed.), *The molecular biology of cyanobacteria* (1–25). Springer, Dordrecht.
- Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, 51(2), 221.

- WHO (World Health Organisation). (1996). Guidelines for drinking-water quality. Vol. 2, Health criteria and other supporting information (2da ed.). World Health Organization.
- WHO (World Health Organisation). (2003). Guidelines for safe recreational water. Coast. Fresh Waters 1, 219. Geneva.
- Wu, Y., Lin, L., Lingling, Z., Gongyuan, D., Haiyan, M., Kun, S., Huadong, W., Qichao, Z., Lirong, S. (2016). Patterns of succession between bloom-forming cyanobacteria *Aphanizomenon flosaquae* and *Microcystis* and related environmental factors in large, shallow Dianchi Lake, China. *Hydrobiologia*, 765, 1-13.
- Xu, H., Paerl, H. W., Qin, B., Zhu, G., y Gao, G. (2010). Nitrogen and phosphorus inputs control phytoplankton growth in eutrophic lake taihu, china. *Limnology and Oceanography*, 55(1), 420-432.