



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

**EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD POTENCIAL EN  
CIANOBACTERIAS Y SUS EFECTOS ECOLÓGICOS EN LA  
COMUNIDAD DE MACROINVERTEBRADOS BENTÓNICOS  
ASOCIADOS EN RÍOS DE MONTAÑA**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS  
(LIMNOLOGÍA)**

PRESENTA:

**KENIA PAOLA MÁRQUEZ SANTAMARIA**

**TUTORA PRINCIPAL: DRA. ANGELA PIEDAD CARO BORRERO**

FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DRA. ITZEL BECERRA ABSALÓN**

FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

**DR. ENRIQUE ARTURO CANTORAL URIZA**

UMDI-FACULTAD DE CIENCIAS JURQUILLA, UNAM

**DR. ATILANO CONTRERAS RAMOS**

INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

**DR. GERARDO RIVAS LECHUGA**

FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

**CD. MX., SEPTIEMBRE, 2021**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



**EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD POTENCIAL EN  
CIANOBACTERIAS Y SUS EFECTOS ECOLÓGICOS EN LA  
COMUNIDAD DE MACROINVERTEBRADOS BENTÓNICOS  
ASOCIADOS EN RÍOS DE MONTAÑA**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS**  
(LIMNOLOGÍA)

PRESENTA:  
**KENIA PAOLA MÁRQUEZ SANTAMARIA**

**TUTORA PRINCIPAL: DRA. ANGELA PIEDAD CARO BORRERO**  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM  
**COMITÉ TUTOR: DRA. ITZEL BECERRA ABSALÓN**  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM  
**DR. ENRIQUE ARTURO CANTORAL URIZA**  
UMDI-FACULTAD DE CIENCIAS JURQUILLA, UNAM  
**DR. ATILANO CONTRERAS RAMOS**  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM  
**DR. GERARDO RIVAS LECHUGA**  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

**MÉXICO, CD. MX., SEPTIEMBRE, 2021**

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, *mi alma máter* y al Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, por darme la oportunidad de seguir creciendo profesionalmente en una de las mejores instituciones del país.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante mis estudios de maestría.

Al proyecto PAPIIT DGAPA-UNAM, IN307219. Conservación y manejo de cuencas hidrológicas: indicadores socioecológicos y sistemas de gobernanza ambiental local.

A mi tutora principal, la Dra. Angela Caro Borrero, por tomar la responsabilidad de dirigir este trabajo y por confiar en mi capacidad para desarrollarlo. Así como por todo su apoyo con las técnicas de biología molecular y la obtención del material fotográfico.

A los miembros de mi comité tutor y jurado de tesis, la Dra. Itzel Becerra Absalón, el Dr. Enrique Arturo Cantoral Uriza, el Dr. Atilano Contreras Ramos y el Dr. Gerardo Rivas Lechuga, por sus observaciones, comentarios, correcciones y aportaciones al proyecto.

Al Laboratorio de Ecosistemas de Ribera de la Facultad de Ciencias y a todo su equipo por el apoyo durante el trabajo de campo y de gabinete, particularmente a mi compañera Aída Sánchez Cuevas.

Al Dr. Javier Carmona Jiménez por su apoyo con el material fotográfico de las cianobacterias, y por seguir siendo uno de mis guías académicos, por sus constantes observaciones y comentarios.

Al Laboratorio de Ficología, particularmente a la Dra. Itzel Becerra Absalón y el Dr. Gustavo Alberto Montejano Zurita, por el espacio, equipos y materiales brindados.

A la M. en B. María Eugenia Díaz de León y al Taller de Biología de Plantas I y II, por su apoyo con el espectrofotómetro de placas.

A la M. en C. Beatriz Zúñiga Ruiz y al Taller de química, por el apoyo con la preparación de los extractos empleados en los bioensayos.

A la Dra. María Edith Ponce Márquez y al Taller de Biología de Procariontes, por el espacio otorgado.

## AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A mis padres, por seguir alimentando y apoyando cada uno de mis sueños, por todos los consejos, enseñanzas y valores que me permiten ser la persona que hoy soy. Esto sigue siendo por ustedes y para ustedes.

A mi madre, por estar siempre presente, por ser una mujer admirable y mi mayor ejemplo de vida, por enseñarme a no darme nunca por vencida, por apoyarme, aconsejarme o simplemente abrazarme.

A mi padre, por todo lo que me ha inculcado y en cierta forma heredado, la disciplina, el orden y el esfuerzo que hoy me permiten ejercer una profesión con el debido respeto y ética que se merece.

A mi tía Elena, por estar siempre pendiente de mí, por cuidarme, escucharme y aconsejarme, por ser una segunda madre.

Al resto de mi familia, por confiar en mí y por hacerme saber en todo momento lo orgullosos que están de todas las cosas que he logrado, por todo el apoyo y amor que tengo con ustedes.

A la Dra. Angela Caro y al Dr. Javier Carmona, por seguir confiando en mí y permitir que siga formando parte de su equipo de trabajo, por ser mis mentores académicos, por todo lo que he aprendido de ustedes con el paso de los años, y por todo el apoyo en múltiples formas que me han brindado a mí y a mi familia.

A mis compañeros y amigos de laboratorio: Karla, Víctor, Arantza, Aída, Pablo, Edgar, Sonia y Juan, por la familia que hemos conformado, por aprender unos de los otros, por todo el apoyo académico y personal que tengo con ustedes, por los buenos momentos que hemos compartido y seguramente seguiremos compartiendo.

A Eric, Manuel, Jazmín y Jessica, por seguir aquí después de tanto tiempo, por convertirse en mis compañeros de vida, por hacerme saber que cuento con ustedes en todo momento, por amarme, cuidarme y apoyarme a pesar del tiempo y la distancia, por ser como son.

A Eli, por ser mi amiga, colega y cómplice, por escucharme, aconsejarme y ser mi momento de calma cuando más lo he necesitado, por ayudarme a seguir siendo una mejor persona, por compartir buenos y malos ratos, por estar conmigo siempre.

A Eduardo, por coincidir y compartir tantas cosas conmigo, por ayudarme, escucharme y motivarme en todo momento, por ser para mí, un ejemplo para seguir.

A Abigail, por ser el mejor regalo que pudo darme el posgrado, por ser mi compañera de aventuras durante esta etapa, por adentrarme en un mundo maravilloso y compartirlo conmigo, por convertirte en una de mis más grandes amigas.

## ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	III
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
ABREVIATURAS.....	V
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN	
1.1. Las cianobacterias bentónicas y su rol ecológico dentro de los ríos.....	3
1.2. Interacción con los ensamblajes de macroinvertebrados bentónicos.....	4
1.3. La producción de toxinas como un posible factor regulador de las interacciones.....	6
2. JUSTIFICACIÓN.....	12
3. HIPÓTESIS.....	14
4. OBJETIVOS	
4.1. Objetivo general.....	15
4.2. Objetivos particulares.....	15
5. DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO.....	16
6. MÉTODO	
6.1. Colecta de poblaciones de cianobacterias y ensamblajes de macroinvertebrados bentónicos asociados.....	19
6.2. Caracterización ambiental de los ríos.....	20
6.3. Caracterización taxonómica y morfo-funcional de los grupos biológicos.....	20
6.4. Reconocimiento de la potencial toxicidad de las poblaciones de cianobacterias .....	26
6.5. Análisis de datos.....	28

7. RESULTADOS	
7.1. Caracterización ambiental de los ríos .....	30
7.2. Caracterización taxonómica y morfo-funcional de los grupos biológicos.....	31
7.3. Reconocimiento de la potencial toxicidad de las poblaciones de cianobacterias.....	48
7.4. Factores ecológicos y morfo-funcionales que regulan el establecimiento de las interacciones bióticas.....	52
8. DISCUSIÓN	
8.1. Caracterización ambiental de los ríos.....	65
8.2. Caracterización taxonómica y morfo-funcional de los grupos biológicos.....	66
8.3. Potencial toxicidad de los crecimientos de cianobacterias.....	72
8.4. Factores ecológicos y morfo-funcionales que regulan el establecimiento de las interacciones bióticas.....	73
9. CONCLUSIONES.....	82
10. PERSPECTIVAS A FUTUTO.....	84
REFERENCIAS.....	85
ANEXO	
1. Protocolo para la extracción de DNA.....	99
2. Protocolo para la purificación de producto de PCR.....	100
3. Protocolo para la extracción y purificación de plásmidos.....	101
4. Riqueza de Macroinvertebrados Bentónicos asociados.....	102

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Descripción del área de estudio.....	16-17
Tabla 2	Ciclos térmicos en la PCR para la amplificación del gen 16S rRNA.....	22
Tabla 3	Ciclos térmicos de la PCR para la detección de clones.....	24
Tabla 4	Ciclos térmicos de la PCR para detección de genes anaF y mcyE.....	27
Tabla 5	Parámetros ambientales evaluados para la caracterización ambiental de los sitios de estudio.....	30
Tabla 6	Resultados del análisis BLAST correspondiente a las secuencias obtenidas para las poblaciones de cianobacterias registradas.....	40
Tabla 7	Identidad taxonómica de las poblaciones de cianobacterias correspondiente a la asignación de nombres derivados de los análisis filogenéticos.....	34-35
Tabla 8	Asignación de grupos funcionales a partir del nivel de organización y forma de crecimiento de las diferentes poblaciones de cianobacterias encontradas.....	41
Tabla 9	Abundancia y Grupos Funcionales Alimenticios (GFA) de MIB asociados a las poblaciones de cianobacterias distribuidas en sitios con origen geológico silíceo.....	46
Tabla 10	Abundancia y Grupos Funcionales Alimenticios (GFA) de MIB asociados a las poblaciones de cianobacterias distribuidas en sitios con origen geológico calcáreo.....	47
Tabla 11	Resultados obtenidos a partir de la PCR para la detección de los genes mycE y anaF.....	48
Tabla 12	Valores de correlación obtenidos a partir del Análisis de Correspondencia Canónica para el reconocimiento de preferencias ambientales por parte de las poblaciones de cianobacterias.....	60
Tabla 13	Valores de correlación obtenidos a partir del Análisis de Correspondencia Canónica para el reconocimiento de preferencias ambientales por parte de los MIB asociados.....	62-23

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Área de estudio.....	18
Figura 2	Valores promedio de los parámetros ambientales evaluados en función del origen geológico de los sitios de estudio.....	31
Figura 3	Filogenia Nostocales.....	36
Figura 4	Filogenia <i>Placoma</i> sp.....	37
Figura 5	Filogenia Oscillatoriales.....	38
Figura 6	Cianobacterias correspondientes al orden Nostocales.....	39
Figura 7	Cianobacterias correspondientes al orden Chroococcales y Oscillatoriales.....	40
Figura 8	Composición taxonómica de los ensamblajes de MIB a nivel de orden.....	42
Figura 9	Composición taxonómica de los ensamblajes de MIB a nivel de familia distribuidas en función del origen geológico de los sitios de estudio.....	43
Figura 10	Riqueza biológica de MIB asociados a las distintas poblaciones de cianobacterias.....	44
Figura 11	Abundancia de MIB asociados a las distintas poblaciones de cianobacterias.....	45
Figura 12	Proporción de GFA correspondientes a los diferentes géneros de MIB asociados.....	45
Figura 13-23	Geles de electroforesis correspondientes a las distintas PCR empleadas en la detección de los genes <i>anaF</i> y <i>mycE</i> .....	49-51
Figura 24-26	Resultados del Análisis de similitud (ANOSIM).....	52
Figura 27	Resultados del Análisis de porcentaje de similitud (SIMPER).....	55-56
Figura 28	Géneros afines a las dos formas de crecimiento reconocidas en las poblaciones de cianobacterias.....	57
Figura 29	Géneros afines a los tres niveles de organización celular reconocidas en las poblaciones de cianobacterias.....	58
Figura 30	Géneros afines a las poblaciones de cianobacterias reconocidas como potencialmente tóxicas y no tóxicas.....	59
Figura 31	Análisis de Correspondencia Canónica para el reconocimiento de preferencias ambientales por parte de las poblaciones de cianobacterias.....	61
Figura 32	Análisis de Correspondencia Canónica para el reconocimiento de preferencias ambientales por parte de los MIB asociados.....	64
Figura 33	Red de interacciones entre MIB y cianobacterias bentónicas.....	80
Figura 34	Sincronización entre el ciclo de vida de <i>Nostoc</i> sp., <i>Placoma</i> sp. y <i>Cricotopus</i> sp. ....	81

## LISTA DE ABREVIATURAS

AB	Agua Blanca
ACC	Análisis de Correspondencia Canónica
AM	Arroyo Monarca
anaF	Anatoxinas
ANOSIM	Análisis de Similitud
CC	Colonias Compactas
CH	Colonias Huecas
CM	Colonias Mucilaginosas
CSR	Canal San Rafael
EC	Carrizal
D	Depredador
FF	Filamentos Filiformes
FRS	Fósforo Reactivo Soluble
FU	Filamentos Uniseriados
MA	Monte Alegre
mcyE	Microcistinas
ME	Meco
MIB	Macroinvertebrados Bentónicos
NH <sub>4</sub>	Amonio
NO <sub>2</sub>	Nitritos
NO <sub>3</sub>	Nitratos
OD	Oxígeno Disuelto
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PI	Presa Iturbide
PT	Potencialmente tóxica
Ra	Raspador
Re	Recolector
S	Riqueza biológica
SD	Segundo Dinamo
SDT	Sólidos Disueltos Totales
SIMPER	Análisis de Porcentajes de Similitud
SM	San Miguel
T	Temperatura
TA	Tabaque
TH	Triturador herbívoro

## RESUMEN

Considerando la potencial producción de toxinas por parte de las cianobacterias bentónicas, es necesario reconocer si esta característica conforma uno de los factores que intervienen en el establecimiento de sus asociaciones con los ensamblajes de macroinvertebrados bentónicos (MIB). El objetivo de este trabajo fue caracterizar desde el punto de vista ambiental y biológico estas asociaciones en 10 ríos de montaña de México, con la finalidad de determinar si existe un patrón y/o especialización por parte de los individuos involucrados; así como, estudiar el potencial tóxico de las cianobacterias como un factor que regula su establecimiento.

En cada río se evaluaron parámetros físico-químicos y se colectaron los crecimientos macroscópicos de cianobacterias coloniales y filamentosas. Los MIB fueron identificados, y asignados a un grupo funcional alimenticio (GFA), las cianobacterias se identificaron mediante la construcción de filogenias con secuencias del gen 16S, la asignación de grupos funcionales fue a partir del nivel de organización celular y forma de crecimiento. Mediante PCR se reconoció la potencial toxicidad de las cianobacterias. Los factores que se encuentran regulando el establecimiento de las interacciones se evaluaron mediante un ANOSIM y las preferencias ambientales de ambos grupos biológicos mediante SIMPER y ACC.

Se reconoció una red de interacciones entre siete cianobacterias y 33 géneros de MIB, donde *Placoma sp.*, *Wilmottia sp.* y *Oxynema sp.* resultaron ser potencialmente tóxicas. La dominancia de dípteros indica una especialización de sustrato, mientras que la dominancia de recolectores señala la obtención indirecta de alimento. Los MIB establecen asociaciones unilaterales con cianobacterias filamentosas y asociaciones multilaterales con cianobacterias coloniales. Existe una preferencia por el género *Cricotopus sp.* sobre las poblaciones de *Nostoc sp.* y *Placoma sp.*, demostrando que estas asociaciones no son de carácter mutualista. Dentro de las interacciones, la morfología de las cianobacterias determina el grado de especificidad, la potencial toxicidad determina la diversidad de MIB asociados y los eventos reproductivos propios de los diferentes MIB determina la recurrencia de estas interacciones.

**Palabras clave:** *Cianobacterias, Macroinvertebrados bentónicos, Interacciones bióticas, Asociaciones ecológicas, Cianotoxinas.*

## ABSTRACT

Taking into consideration the potential production of toxins by benthic cyanobacteria, it is necessary to understand whether this trait is one of the factors that promotes the establishment of their associations with benthic macroinvertebrate assemblages (MIB). In this work, we aimed to characterize these associations in 10 mountain rivers of Mexico from an environmental and biological perspective to determine if there is a specialization on the individuals involved and to study the toxic potential of cyanobacteria as a factor that regulates their establishment.

In each river, we evaluated the physicochemical parameters and we collected macroscopic growths of colonial and filamentous cyanobacteria. We assigned the MIB and classified them into a feeding functional group (GFA). We identified the Cyanobacteria by the construction of phylogenies with 16S gene sequences, while the functional group assignment was based on the level of cellular organization and growth form. Furthermore, we recognized the potential toxicity of the cyanobacteria by PCR analysis. The factors regulating the establishment of the interactions were evaluated by ANOSIM and the environmental preferences of both biological groups by SIMPER and CCA.

We identified a network of interactions between seven cyanobacteria and 33 genera of MIB, where *Placoma* sp., *Wilmottia* sp., and *Oxynema* sp. were identified as potentially toxic. The dominant presence of Diptera indicates a substrate specialization, while the dominant presence of collectors shows the indirect food obtention. The MIB establish unilateral associations with filamentous cyanobacteria and multilateral associations with colonial cyanobacteria. Particularly with the genus *Cricotopus* sp over the populations of *Nostoc* sp. and *Placoma* sp., demonstrating that these associations are not mutualistic. Within the interactions, the morphology of the cyanobacteria determines the specificity degree; the potential toxicity determines the associated MIB diversity, and the reproductive events of the different MIB determine the interactions recurrence.

**Keywords:** *Cyanobacteria, Benthic Macroinvertebrates, Biological Interactions, Ecological Associations, Cyanotoxins.*

## 1. INTRODUCCIÓN

### *1.1. Las cianobacterias bentónicas y su rol ecológico dentro de los ríos*

Las cianobacterias bentónicas son organismos ampliamente distribuidos dentro de la gama que conforman los ambientes acuáticos epicontinentales. Sin embargo, es en los ríos donde su diversidad y abundancia incrementan considerablemente, cobrando así gran importancia dentro del componente biológico de los ecosistemas lóticos (Sheath y Cole 1992; Vincent, 2009; Necchi, 2016). En los ríos, la mayoría de las cianobacterias se hacen presentes en forma de comunidades altamente estructuradas, razón por la que pueden ser consideradas como ecosistemas a microescala, en donde se exhiben interacciones ecológicas complejas entre diferentes especies, mismas que se encuentran definidas a partir de los requerimientos ambientales de cada una (Whitton, 2012).

Dentro de todo el complejo ecosistémico que representan los ríos, se enlista un conjunto de factores ambientales que determinan la diversidad y abundancia de la comunidad cianobacteriana. En términos generales, se considera que la perturbación física ocasionada por los flujos turbulentos característicos de los ríos, los regímenes de precipitación, los ciclos de luz y oscuridad, la temperatura, la disponibilidad de nutrientes y la herbivoría sobre sus poblaciones son los principales factores que regulan la estructura de sus comunidades (Whitton, 2012). Por lo tanto, el rol ecológico de las cianobacterias está restringido por una combinación de factores hidrológicos, microambientales y macroambientales presentes en cada río, que a su vez se ven afectados por la estacionalidad climática propia de cada región (Sheath y Cole 1992).

En los ambientes lóticos, las cianobacterias representan una parte importante de la producción primaria, particularmente en sistemas oligotróficos, por lo tanto, son responsables de la entrada de materia y energía al ecosistema (Whitton, 2012). Juegan un papel esencial dentro de los ciclos biogeoquímicos, principalmente a partir de la fijación de nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ), una de las vías por la cual este nutriente es incorporado al sistema (Marcarelli *et al.*, 2008). Además de esto, las cianobacterias cuentan con

estructuras celulares que les permiten el almacenamiento de nutrientes limitantes dentro del río, como el nitrógeno y el fósforo, repercutiendo así en la disponibilidad de estos nutrientes para otros organismos. Por lo tanto, se convierten en una fuente importante de energía para consumidores de diferentes niveles, asumiendo un papel clave en las redes tróficas de los ríos (Casamatta y Hašler, 2016).

Como resultado de la variedad de estrategias morfológicas, fisiológicas y reproductivas que han desarrollado las cianobacterias a lo largo de su historia evolutiva, la adaptación a sistemas extremos como los ríos se ve reflejada en el papel ecológico que tienen dentro de estos ambientes, esencial para mantener el funcionamiento del ecosistema. Las cianobacterias, además de ser productores primarios, son elementos importantes para el establecimiento de otros organismos bentónicos, por ejemplo, los ensambles de macroinvertebrados bentónicos (MIB), con quienes se ha demostrado que logran establecer relaciones ecológicas estrechas (Tourville Poirier y Cattaneo, 2010; Caro-Borrero y Carmona-Jiménez, 2018; Márquez-Santamaria, 2019).

### *1.2. Las cianobacterias y su relación con los ensambles de macroinvertebrados bentónicos*

Como parte de la importancia ecológica que tienen las cianobacterias bentónicas en los ríos, se encuentra su papel como sustrato para otras comunidades acuáticas. Dentro de estos ambientes, las cianobacterias incrementan la complejidad física del hábitat bentónico debido a su capacidad para formar crecimientos macroscópicos (Walker *et al.*, 2013). Uno de los grupos que ha logrado explotar esta característica es el de los MIB, particularmente el grupo de los insectos, mismo que juega un papel indispensable dentro de la conectividad hidrológica, ya que, al ser consumidores primarios y secundarios, son responsables de la incorporación, transporte y reciclaje de materia y energía dentro del ecosistema acuático, además de representar el vínculo con el medio terrestre (Wallace y Webster, 1996; Merritt y Cummins, 2008).

La composición, estructura y diversidad de los ensambles de MIB está en función de la heterogeneidad ambiental presente en el hábitat bentónico, por lo que comúnmente

ambos grupos biológicos se encuentran asociados (Beisel *et al.*, 2000; Merritt y Cummins, 2008; Reid *et al.*, 2010). Existen tres factores principales que pueden influir en el establecimiento de una asociación entre las comunidades de cianobacterias y los MIB: obtención de alimento, de refugio contra depredadores y evitar el desprendimiento por la abrasión de la corriente, principal desafío dentro de los ecosistemas lóticos (Dudley *et al.*, 1986; Liston y Tlexler, 2005; Caro-Borrero y Carmona-Jiménez, 2018; Márquez-Santamaria, 2019).

El establecimiento de estas asociaciones es complejo y en ocasiones es aparentemente específico. Uno de los casos mayormente documentado es el de la larva del díptero *Cricotopus* sp. y la cianobacteria del género *Nostoc* spp. (*N. parmeloides* (Brock, 1960; Ward y Cummins, 1985; Dodds, 1989) y *N. verrucosum* (Sabater y Muñoz 2000)), una asociación que formalmente y por mucho tiempo ha recibido la categoría de mutualismo (Brock, 1960; Dodds, 1989). Se ha dicho que la larva se desarrolla y vive dentro de las colonias de *Nostoc* hasta su eclosión como organismo adulto, alimentándose y refugiándose al mismo tiempo. Dentro de este complejo, se ha observado que la larva favorece la adhesión de las colonias de *Nostoc* al sustrato, además es capaz de modificar la forma de las colonias, aumentando la superficie de contacto, lo que maximiza su exposición a la luz e incrementa su rendimiento fotosintético. Así mismo, se reconoce que cuando el organismo adulto de *Cricotopus* sp. emerge y rompe la colonia, favorece la propagación vegetativa de la cianobacteria (Ward y Cummins, 1985; Dodds, 1989; Sabater y Muñoz, 2000).

Pese a la especificidad descrita anteriormente, existen trabajos en los que se ha observado que *Cricotopus* sp. no se asocia de manera exclusiva con las poblaciones del género *Nostoc* spp., sino que es capaz de asociarse a crecimientos morfológica y ecológicamente similares, por ejemplo, las poblaciones de *Placoma regulare* o *Phormidium* spp., mismo que a pesar de que no es morfológicamente similar, puede encontrarse en los mismos sitios que *Nostoc* (Caro-Borrero y Carmona-Jiménez, 2018; Márquez-Santamaria, 2019). Esto demuestra que las asociaciones entre las poblaciones de cianobacterias y los ensambles de MIB podrían estar relacionadas con los ciclos de vida de las diferentes poblaciones de cianobacterias, ya

que éstas presentan picos de abundancia que propician las interacciones de manera diferencial a lo largo del año, regulando la selección de hábitat a escala local. Esta regulación local, además responde a características como afinidades ambientales de los diferentes organismos que componen los ensambles, diferencias en los ciclos de vida asociadas a las características regionales como el clima, las cuales pudieran favorecer o no un mayor número de eventos de reproducción y por lo cual, los organismos requieren de una búsqueda activa de un sustrato.

Esta selección, tan cuidadosa en algunos casos, responde a características puntuales de las poblaciones de cianobacterias, por ejemplo, su complejidad morfológica, que está en función del nivel de organización y forma de crecimiento. Las colonias mucilaginosas, filamentos filiformes y ramificados que favorecen la formación de tapetes son mayormente preferidas por los MIB, probablemente por el incremento en la heterogeneidad física del sustrato que propician estas formas (Liston y Trexler, 2005; Allan y Castillo, 2007; Caro-Borrero y Carmona-Jiménez, 2018). Aunado a la selección de hábitat en función de su complejidad morfológica, algunas investigaciones han reportado que la mayoría de los organismos asociados son dípteros de hábitos recolectores, mostrando que dicha selectividad también puede estar íntimamente relacionada con sus requerimientos ecológicos, principalmente la obtención de alimento y refugio. Favoreciendo la idea de que algunos organismos dentro del ensamble de MIB presentan preferencias sobre las comunidades de cianobacterias, otorgando patrones de especificidad a las asociaciones (Caro-Borrero y Carmona-Jiménez, 2018; Márquez-Santamaria, 2019).

### *1.3. Las cianobacterias y su potencial producción de toxinas como un posible factor regulador de las interacciones*

Otro aspecto que podría estar involucrado en la regulación de las asociaciones está relacionado con el metabolismo secundario de las cianobacterias y la producción de múltiples compuestos bioactivos, los cuales han sido objeto de aplicaciones en diferentes industrias. Dentro de este metabolismo y particularmente durante la síntesis de ftopigmentos se da la producción de una serie de compuestos tóxicos reconocidos

actualmente como cianotoxinas (Paerl y Millie, 1996; Pérez *et al.*, 2008). Estos metabolitos se encuentran mayoritariamente retenidos dentro de las células y son expuestos a partir de la lisis celular por acción mecánica. No obstante, también se reconoce que una fracción menor de estos metabolitos se hace presente en el medio de forma extracelular a partir de los eventos de senescencia celular, esta fracción se encuentra de manera disuelta en el agua o unida a diferentes materiales como el sedimento, exponiendo directamente las toxinas y poniendo en riesgo a todos los organismos que entren en contacto con ellas (Drobac *et al.*, 2016; Buratti *et al.*, 2017).

Su descubrimiento se da a partir de eventos de muertes masivas y sin razón aparente en diferentes animales. Lo que al principio parecía no tener explicación, más tarde se correlacionó con un fenómeno de intoxicación tras haber estado en contacto con cuerpos de agua en donde se habían hecho presentes una serie de crecimientos en masa de cianobacterias (Sivonen y Jones, 1999; Echenique-Subiabre *et al.*, 2016; Buratti *et al.*, 2017). Estos crecimientos, mejor conocidos como *blooms* o floraciones, típicamente se asocian con eventos de eutrofización como consecuencia de una diversidad de actividades antrópicas, principalmente la actividad agrícola, por el uso de fertilizantes y herbicidas que ocasionan un incremento en la concentración de nutrientes como nitrógeno y fósforo favoreciendo la proliferación celular (Bláha *et al.*, 2009). Aunado a ello, actualmente se reconoce que estos crecimientos en masa también se encuentran asociados de manera directa con los efectos del calentamiento global, ocasionado cambios en los regímenes naturales de flujo en los sistemas acuáticos por periodos de sequía más prolongados y de lluvias mucho más intensas, alterando la dinámica de las poblaciones de cianobacterias (Quiblier *et al.*, 2013; Buratti *et al.*, 2017).

El primer registro de mortandad debido a un florecimiento de cianobacterias registrado en la literatura corresponde a la muerte de animales de ganado por beber agua de un lago en Australia (Francis, 1878). Sin embargo, este hallazgo únicamente se correlacionó con la presencia de cianobacterias. Tras la recurrencia de estos eventos en diferentes animales y en diferentes partes del mundo, fue hasta el siglo XX que comenzaron los estudios con la

intención de reconocer lo que causaba la intoxicación y muerte de los animales. Bajo este escenario, fue que se comenzó a asociar a los florecimientos con la síntesis de compuestos tóxicos, iniciando la experimentación con bioensayos y aislamiento de estos metabolitos. En 1959 se logró aislar una de las primeras toxinas (Bishop *et al.*, en 1959) y con ello, años más tarde vino un periodo de identificación de una gran diversidad de metabolitos tóxicos y el reconocimiento de los organismos capaces de producirlos (Skulberg *et al.*, 1984; Carmichael, 1992; Codd, 1995; Svrcek y Smith, 2004; Codd *et al.*, 2005). De esta manera los casos de intoxicación y envenenamiento en múltiples animales comenzaron a tener respuesta, por lo que la investigación en materia de cianotoxinas cobró gran importancia a nivel mundial. Si bien los reportes de intoxicación por cianotoxinas en humanos son menores, existe un caso que dentro del campo de estudio ha llamado la atención: en el año 1996, en un hospital de Brasil, 53 de 130 pacientes hemodializados fallecieron tras haber sido tratados con aguas contaminadas por cianotoxinas. Lo que demuestra el riesgo latente que representan las cianotoxinas en múltiples ecosistemas acuáticos y los organismos que hacen uso de ellos, incluidos los humanos, razón por la que sigue siendo importante la identificación de poblaciones productoras y la caracterización de estos compuestos (Jochimsen *et al.*, 1998; Codd *et al.*, 2005; Quiblier *et al.*, 2013; Buratti *et al.*, 2017).

Actualmente, se reconocen cinco grandes grupos de cianotoxinas: microcistinas, anatoxinas, nodularinas, cilindrospermopsinas y saxitoxinas. Cada uno de estos grupos contempla una serie de isoformas o variantes, por ejemplo, para el grupo de las microcistinas se reconocen al menos 100 variantes, debido a esto incrementa la diversidad de cianotoxinas y su complejidad para estudiarlas, ya que su detección puede volverse específica y pasar por desapercibida aun estando presente en una forma diferente. Las cianotoxinas se clasifican en función de su mecanismo de acción como neurotoxinas, hepatotoxinas, dermatotoxinas y citotoxinas, o por su estructura química y blanco de acción como lipopolisacaridos endotóxicos, alcaloides dermatotóxicos, alcaloides citotóxicos, alcaloides neurotóxicos y péptidos cíclicos hepatotóxicos (Svrcek y Smith, 2004; Quiblier *et al.*, 2013; Pearson, 2016; Buratti *et al.*, 2017).

Existen diferentes métodos para la detección de cianotoxinas, estos se clasifican en biológicos y fisicoquímicos, por ejemplo, bioensayos con organismos acuáticos, estudios inmunológicos mediante un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas: ELISA (por sus siglas en inglés) y moleculares mediante la reacción en cadena de la polimerasa: PCR (por sus siglas en inglés), o las aproximaciones genéticas, a partir de la obtención de secuencias de rRNA y DNA que en su conjunto permiten diferenciar a nivel de género cepas tóxicas en las poblaciones naturales (Tillett *et al.*, 2001; Ramírez-García *et al.*, 2004; Cantoral-Uriza *et al.*, 2017). Debido a la complejidad estructural y número de variantes que pueden presentar las cianotoxinas, es común evaluar la toxicidad mediante una combinación de estos métodos pues además de que se complementan, las técnicas moleculares disminuyen la necesidad de aislar y cultivar los microorganismos (Svrcek y Smith, 2004).

A pesar de representar un riesgo latente en múltiples ecosistemas acuáticos, el estudio de las cianotoxinas se ha centrado en poblaciones de ambientes lénticos, por lo que prácticamente toda la caracterización actual fue obtenida a partir del estudio de comunidades planctónicas. Probablemente, porque es donde se hace más evidente el fenómeno de los crecimientos en masa y porque muchas veces estos eventos ocurren en las fuentes principales de abastecimiento del recurso hídrico para las poblaciones humanas, incrementando el riesgo para la salud pública. Esto significa que el estudio en sistemas riparios de las cianotoxinas producidas por cianobacterias bentónicas, ha recibido poca atención, aun cuando también representan un riesgo para los organismos incluido el humano. Pese a este sesgo, a nivel mundial se ha logrado reconocer que géneros de cianobacterias bentónicas como *Anabaena*, *Aphanothece*, *Calothrix*, *Chroococcus*, *Cyanothece*, *Fischerella*, *Geitlerinema*, *Gloetrichia*, *Lyngbya*, *Microcoleus*, *Microseira*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Plancktothrix*, *Plectonema*, *Pleurocapsa*, *Pseudanabaena*, *Rivularia*, *Schizothrix*, *Scytonema*, *Synechococcus*, *Tolypothrix* y *Westiellopsis* son productores de toxinas en ambientes como los ríos, particularmente anatoxinas y microcistinas (Sabater *et al.*, 2003; Teneva *et al.*, 2005; Quiblier *et al.*, 2013; McAllister *et al.*, 2016; Wood *et al.*, 2020).

De manera particular, el estudio de las cianotoxinas en México también se ha visto sesgado hacia los ecosistemas lénticos, en lugares como Chiapas, Ciudad de México, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nayarit y Oaxaca se ha identificado a los géneros *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Geitlerinema*, *Leptolyngbya*, *Limnothrix*, *Microcystis*, *Nodularia*, *Phormidium*, *Planktolyngbya*, *Planktothrix*, *Pseudoanabaena* y *Spirulina* como típicos formadores de *blooms* en presas, lagos y lagos urbanos, así como géneros productores de los cinco grupos de toxinas (Martínez *et al.*, 2002; Arzate-Cárdenas *et al.*, 2010; Torres-Ariño y Mora-Heredia 2010; Vasconcelos *et al.*, 2010; Ibarra-Montoya *et al.*, 2012; Pineda-Mendoza *et al.*, 2012; Alillo-Sánchez *et al.*, 2014; Hernández-Morales *et al.*, 2014; Pérez-Morales *et al.*, 2018; Pineda-Mendoza *et al.*, 2020). A pesar de esto, a la fecha no existe algún trabajo que se enfoque en la detección de cianotoxinas a partir de cianobacterias bentónicas en ríos, lo que deja al descubierto la necesidad de trabajar en estos ambientes, ya que a pesar de que se ha confirmado que las poblaciones bentónicas también sintetizan toxinas, sigue siendo necesario ampliar la investigación, considerando diferentes aspectos de las cianobacterias bentónicas, incluido su papel ecológico con otras comunidades, sobre todo en países como México en el que el conocimiento respecto al tema es prácticamente nulo.

Como resultado del desarrollo que ha tenido la investigación en materia de cianotoxinas a nivel mundial, existen muchos estudios acerca de los efectos que tienen sobre una amplia gama de organismos acuáticos, incluidos vertebrados e invertebrados. Además del efecto letal que ha sido documentado en múltiples animales, se tiene conocimiento de que la intoxicación por cianotoxinas repercute en el comportamiento, desarrollo y degeneración severa del tejido muscular en peces (Baganz *et al.*, 1998; Drobac *et al.*, 2016), o propician un cambio en la composición de la comunidad por alteración en los patrones de riqueza, diversidad y fecundidad en moluscos (White *et al.*, 2005; Lance *et al.*, 2008; Gerad *et al.*, 2009). En MIB se ha observado que los ensamblajes que se asocian a las poblaciones de cianobacterias bentónicas productoras de toxinas son poco diversos y/o se encuentran dominados por dípteros (Aboal *et al.*, 2002). Además, se han hecho evidentes efectos negativos en organismos como efímeras, tricópteros y plecópteros, organismos clave

dentro de la bioindicación de la calidad ecológica en sistemas acuáticos, así mismo, se habla del potencial de bioacumulación y transferencia de estos compuestos a otros niveles de la red trófica, lo que significaría efectos a nivel ecosistémico (Ferrão-Fiho y Kozlowask-Suzuki, 2011; Wood *et al.*, 2012; Liarte *et al.*, 2014).

Por tal motivo, es necesario reconocer si existe una potencial producción de cianotoxinas en aquellas poblaciones de cianobacterias que presentan asociaciones ecológicas con los ensamblajes de MIB, ya que la toxicidad significa un problema latente para las comunidades biológicas ribereñas, para sus interacciones con otros organismos y por lo tanto, para el ecosistema y su funcionamiento (Haya-Trueba, 2016; Gallardo-Vega, 2018).

## 2. JUSTIFICACIÓN

Las cianobacterias bentónicas además de ser productores primarios representan un elemento importante en heterogeneidad física de los ecosistemas lóticos, mientras que los MIB son responsables de la incorporación de materia y energía al ecosistema, lo que les otorga un papel indispensable dentro de la conectividad hidrológica de los ríos. Estos organismos, a lo largo de su historia evolutiva han desarrollado estrategias que facilitan su éxito dentro de estos ambientes, como el establecimiento de interacciones bióticas que potencializan su rol ecológico y permiten el funcionamiento integral del ecosistema. A pesar de que existe una tendencia de selección por parte de los MIB hacia las cianobacterias, la caracterización de estas interacciones no cuenta con un nivel de definición suficiente para categorizarlas dentro de los nombres formales que reciben las interacciones bióticas aparentemente bien definidas. Por lo tanto, sigue siendo necesario explorar aquellos factores que pudieran estar ejerciendo un control en su establecimiento, que permitan reconocer su nivel de especificidad e incluso su costo-beneficio. La potencial producción de toxinas por parte de las cianobacterias es uno de esos nuevos factores por explorar.

Considerando lo anterior, se debe destacar la importancia de realizar investigaciones como esta, pues además de contribuir con el conocimiento respecto al tema, se genera información en múltiples niveles, identificando géneros o especies de cianobacterias potencialmente tóxicas mediante caracteres morfológicos y genéticos, que nos permite además de aclarar la identidad taxonómica de las poblaciones dentro de estos ambientes, reconocer géneros o especies que no han sido reportados como productores de toxinas y que representan un riesgo latente para otras comunidades biológicas, particularmente los MIB. De igual forma permite identificar las condiciones ambientales bajo las que se hacen presentes las cianotoxinas en ambientes como los ríos, proporcionando datos que ayuden a reconocer la calidad del agua y la salud de los ecosistemas lóticos. La información generada no sólo es importante para identificar riesgos para el equilibrio ecológico del ecosistema ribereño, sino que puede ayudar a determinar potenciales riesgos a la salud humana.

### **3. HIPÓTESIS**

En función de los antecedentes sobre las cianobacterias como proveedoras de hábitat para organismos como los macroinvertebrados bentónicos, se espera encontrar de manera recurrente asociaciones entre los ensambles de MIB y poblaciones de cianobacterias coloniales y filamentosas formadoras de crecimientos macroscópicos, aprovechándolas como un sustrato potencial capaz de brindar refugio y/o alimento.

Tomando en cuenta la potencial producción de cianotoxinas y las nuevas evidencias sobre su síntesis en comunidades bentónicas, se espera reconocer esta característica en por lo menos alguna de las poblaciones evaluadas. De reconocerse, se espera que no presenten asociación con los ensambles de MIB, o que éstos sean menos abundantes respecto aquellas en las que no se detecte ningún potencial.

Finalmente, se espera poder asociar este potencial tóxico con alguna característica ambiental, morfo-funcional de las cianobacterias y/o la presencia de MIB, logrando identificar patrones ambientales que regulen o definan las interacciones ecológicas entre estos organismos.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO PRINCIPAL**

Caracterizar desde el punto de vista ambiental y biológico las asociaciones entre poblaciones de cianobacterias y MIB en ríos de montaña de México, con la finalidad de determinar si existe un patrón y/o especialización por parte de los individuos involucrados; así como, estudiar el potencial tóxico de las poblaciones de cianobacterias como un factor ecológico que determina y regula el establecimiento de dichas asociaciones.

### **4.2 OBJETIVOS PARTICULARES:**

- I. Caracterizar el micro y macro ambiente de los crecimientos de las cianobacterias coloniales y filamentosas formadoras de crecimientos macroscópicos como poblaciones recurrentes dentro de las interacciones con MIB, para tratar de reconocer preferencias ambientales que delimitan la selección de hábitat en ambos grupos biológicos y, por lo tanto, podrían estar regulando el establecimiento de las interacciones.
- II. Identificar taxonómicamente las poblaciones de cianobacterias mediante la amplificación del principal marcador filogenético en procariontes, el gen 16S rRNA.
- III. Determinar y analizar la composición taxonómica y morfo-funcional de los ensamblajes de MIB que se encuentren asociados a las poblaciones de cianobacterias estudiadas.
- IV. Analizar la presencia de los genes productores de toxinas en las poblaciones de cianobacterias colectadas con la intención de reconocer el papel potencial a nivel ecológico de la toxicidad dentro del establecimiento de las interacciones.

## 5. DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

Este trabajo comprende un total de 10 sitios de estudio (Tabla 1, Figura 1): Monte Alegre (MA), Segundo Dinamo del río Magdalena (SD), Presa Iturbide (PI), San Miguel (SM), Canal San Rafael (CSR), Arroyo Monarca (AM), Agua Blanca (AB), Meco (ME), Tambaque (TA) y Carrizal (EC), situados en cuatro cuencas diferentes; cuenca de México, cuenca del Río Balsas, cuenca del río Pánuco y cuenca del río Usumacinta. El propósito de trabajar en cuatro cuencas diferentes es poder comparar entre diferentes áreas geográficas e incluso diferente origen geológico aquellos factores que propicien tanto el establecimiento de las interacciones como la potencial producción de toxinas. De esta manera, es posible reconocer si aquellas poblaciones de cianobacterias que son morfológicamente similares y de las cuales ya se tienen antecedentes de que establecen interacciones con alguna parte de los ensambles de MIB, son efectivamente los mismos géneros o especies que se tienen reportados, y, si en diferentes regiones del país se asocian con los mismos organismos bajo las mismas condiciones ambientales.

Tabla 1. Descripción del área de estudio.

CUENCA	ORIGEN GEOLÓGICO	SITIO	ID	GEOREFERENCIA Y ALTITUD	VEGETACIÓN Y CLIMA
México	Silíceo	Monte Alegre	MA	19° 13' 49.3" N 99° 17' 22.2" O 3349 msnm	Bosque templado, matorral xerófilo, vegetación halófila y vegetación gipsófila (Cuevas <i>et al.</i> , 2010).  Clima templado subhúmedo, con una temperatura anual que oscila entre los 12 y 18°C (García, 2004).
		Segundo dinamo	SD	19° 17' 62.5" N 99° 16' 28.7" O 2775 msnm	
		Presa Iturbide	PI	19° 32' 5" N 99° 27' 38" O 3205 msnm	
		San Miguel	SM	19° 16' 46.5" N 99° 18' 59.3" O 3310 msnm	
		Canal San Rafael	CSR	19° 11' 54" N 98° 43' 20" O 2915 msnm	

Tabla 1. Continuación.

Balsas	Síliceo	Arroyo Monarca	AM	19° 11' 27.8" N 99° 55' 43.3" O 2888 msnm	Bosque templado y matorral xerófilo (Cuevas <i>et al.</i> , 2010). Clima templado subhúmedo y semicálido subhúmedo, con una temperatura anual que oscila entre los 5 y 12 °C (Fernández-Nava <i>et al.</i> , 1998; Ramírez-Lynn, 2010; Bojorge-García <i>et al.</i> , 2010).
		Agua Blanca	AB	19° 04' 52.41" N 99° 50' 7.83" O 3920 msnm	
Panuco	Calcáreo	Meco	ME	22° 34' 04.7" N 99° 20' 40" O 318 msnm	Bosque templado, selva húmeda, subhúmeda y matorral xerófilo (Cuevas <i>et al.</i> , 2010).  Clima cálido subhúmedo, con una temperatura anual que oscila entre los 27 y 29°C (García, 2004; Montejano-Zurita <i>et al.</i> , 2004).
		Tambaque	TA	21° 41' 8.83" N 99° 02' 36.72" O 395 msnm	
Usumacinta		Carrizal	EC	16° 08' 42.93" N 91° 49' 15.53" O 1480 msnm	Bosque templado y mesófilo, selva húmeda y subhúmeda (Cuevas <i>et al.</i> , 2010).  Clima cálido subhúmedo con una temperatura anual que oscila entre los 22 y 24 °C (Soares y García, 2017).

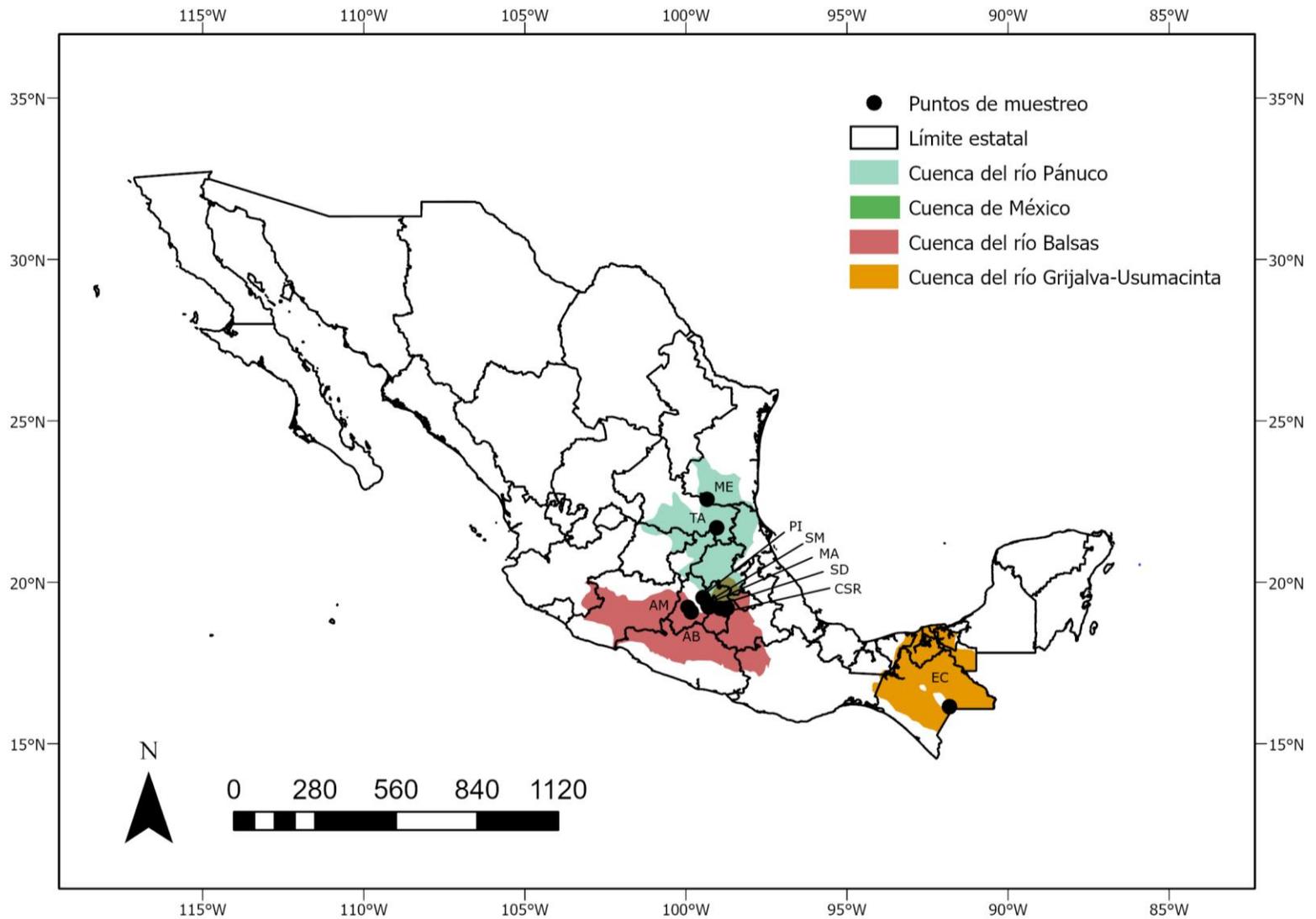


Figura 1. Área de estudio. Se muestra la localización de los diferentes sitios de estudio y la cuenca a la que corresponden. Nombres y características de cada uno de los sitios se presentan en la tabla 1.

## 6. MÉTODO

### *6.1 Colecta de poblaciones de cianobacterias y ensambles de macroinvertebrados bentónicos asociados*

El muestreo de las poblaciones de cianobacterias fue dirigido sobre los crecimientos macroscópicos conformados a partir de la agregación de colonias o filamentos. Estas morfologías previamente se tenían catalogadas como preferentes dentro del establecimiento de relaciones ecológicas recurrentes con organismos que forman parte de los ensambles de MIB en los sitios de estudio (Caro-Borrero & Carmona Jiménez, 2018; Márquez-Santamaria, 2019).

Una vez localizadas estas poblaciones dentro de cada uno de los ríos, se tomó muestra de ellas a lo largo de un transecto de 10 metros aproximadamente, buscando obtener al menos tres réplicas de las poblaciones dentro de este transecto. En cada punto donde fueron localizadas las poblaciones se registró el porcentaje de cobertura de los crecimientos con ayuda de una unidad de muestreo circular de 26.5 cm de diámetro (551.54 cm<sup>2</sup> de área total). Registrada la cobertura, se midieron los parámetros microambientales de: velocidad de corriente (VC) y profundidad (PROF), considerando diez réplicas por cada uno de ellos. Finalmente, se tomó muestra de aquellas poblaciones que presentaron crecimientos abundantes de la siguiente manera:

- a) Una parte del crecimiento macroscópico fue depositada en frascos de polipropileno (50mL), intentando llenar el frasco por la mitad con agua del río, este material fue empleado para identificar y caracterizar las interacciones establecidas con los ensambles de MIB, considerando aproximadamente 20mL de muestra.
- b) Otra parte del crecimiento fue depositada por triplicado en tubos Eppendorf sin agua (2mL), estas muestras fueron preservadas a -20 °C hasta su posterior uso en las técnicas de biología molecular.

De esta manera, las muestras fueron transportadas en refrigeración (4°C) hasta el laboratorio, donde posteriormente fueron revisadas para su identificación taxonómica, la separación de los MIB asociados a cada población y el desarrollo de las técnicas que permitirían identificar su potencial toxicidad, para finalmente, proceder a la preservación de ambos grupos biológicos.

### *6.2 Caracterización ambiental de los ríos*

Utilizando una sonda multiparamétrica YSI 6600 (Ohio, USA), se tomaron medidas de temperatura (T°), pH, sólidos disueltos totales (SDT) y oxígeno disuelto (OD). Por su parte, se tomaron muestras por duplicado de un litro de agua para realizar el análisis químico de nutrientes, las muestras fueron depositadas en frascos de polipropileno previamente lavados y esterilizados (APHA, 1995), mismas que fueron transportadas en refrigeración (4°C) para su posterior análisis en el laboratorio.

El análisis químico del agua se llevó a cabo en el laboratorio de Ecosistemas de Ribera de la Facultad de Ciencias, UNAM. De esta manera, se pudo determinar la concentración de nutrientes en el agua de los diferentes sitios de estudio. Lo anterior se realizó por duplicado, mediante espectrofotometría (Hach DR/39000: Colorado, USA) evaluando así concentraciones de fósforo reactivo soluble (FSR), y nitrógeno en sus diferentes formas: amonio (NH<sub>4</sub>), nitritos (NO<sub>2</sub>) y nitratos (NO<sub>3</sub>).

### *6.3 Caracterización taxonómica y morfo-funcional de los grupos biológicos*

Utilizando un microscopio estereoscópico Olympus© 52X7 (Tokio, Japón) se realizó la separación manual mediante pinzas entomológicas de todos los MIB que se encontraban asociados a cada una de las poblaciones de cianobacterias. Separados los organismos, fueron preservados en alcohol al 70%. Posteriormente se realizó la identificación taxonómica de todos los organismos (Merritt y Cummins, 2008; Bueno-Soria, 2010). Como objetivo principal se tuvo que llegar a la máxima resolución taxonómica posible, en este caso fue a nivel de

género. Una vez identificados los organismos, se realizó la asignación de Grupos Funcionales Alimenticios (GFA) siguiendo el esquema propuesto por Merritt & Cummins (2008).

La identificación taxonómica de las poblaciones de cianobacterias se realizó a partir de un enfoque polifásico, mediante la identificación de caracteres fenotípicos (Komárek J. y Anagnostidis K., 2005; Komárek, 2013), contrastados con registros previos de las poblaciones de cianobacterias distribuidas en los sitios de estudio (Rodríguez-Flores, 2014; Carmona-Jiménez *et al.*, 2016; Márquez-Santamaria, 2019; Cartajena-Alcántara *et al.*, 2020; Montejano-Zurita *et al.*, 2004), y mediante la identificación genética a partir de la amplificación del gen 16S RNA, que permitió llegar a la identificación a nivel genérico. En lo que respecta a la asignación de grupos funcionales, en este caso se catalogó a las poblaciones conforme su nivel de organización celular y forma de crecimiento. Para llevar a cabo la identificación genética a partir de la amplificación del gen 16S RNA, se siguió el siguiente procedimiento:

a) Extracción de DNA:

La extracción de DNA correspondiente a los diferentes crecimientos de cianobacterias se realizó utilizando el Kit DNeasy UltraClean Microbial (QIAGEN) siguiendo el protocolo incluido (Ver Anexo 1). Este protocolo fue modificado en el primer paso del mismo debido a que algunas poblaciones de cianobacterias presentan paredes celulares muy gruesas, por lo que fue necesario someter estas muestras a tres ciclos de choques térmicos iniciando con la congelación con nitrógeno líquido y posterior calentamiento en baño maría seco en un AccuBlock (Labnet International Inc.) a 65°C. Inmediatamente después se realizó la ruptura mecánica de las células con un taladro y un pistilo de plástico entre cada uno de los ciclos empleando la primer solución del protocolo de extracción. Una vez realizada la ruptura celular, se procedió a continuar con el resto de los pasos del protocolo original. Finalizado el proceso de extracción, se realizó una electroforesis en gel de agarosa (0.8%), se usó GelRed con la intención de teñir y confirmar la presencia del DNA, así como evaluar su calidad. Por último, en el Taller de Biología de Plantas de la Facultad de Ciencias, UNAM se midió la

concentración de DNA obtenido mediante un espectrofotómetro de microplacas (Epoch: BioTek Instruments Inc., USA).

b) Amplificación del gen 16S rRNA mediante PCR:

La amplificación de la secuencia del gen 16S rRNA se realizó mediante PCR utilizando el termociclador Biometra TOne Thermal Cyclers (Analytik Jena; Göttingen, Alemania). Para poder llevar a cabo este procedimiento fue empleada la siguiente mezcla de reacción: agua milli-Q, 10x PCR buffer, Cl<sub>2</sub>Mg (50 mM), desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP 50 µM), albúmina sérica bovina (BSA, 0.1%), DNA polimerasa (Ultratools DNA Polymerase: 1 unit/µL, y Thermoscientific DreamTaq DNA Polymerase: 20 y 500 unit/µl). Como primers (10 pM) fueron utilizados los oligonucleótidos 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') (Wilmette *et al.*, 1993) y 23Sr (5'-CTTCGCCTCTGTGTGCCTAGGT-3') (Lépere *et al.*, 2000). Empleando agua milli-Q como negativo. Los ciclos térmicos empleados fueron los siguientes:

Tabla 2. Ciclos térmicos empleados en la PCR para la amplificación del gen 16S rRNA.

Número de ciclos	Fase	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
1	Desnaturalización	94	5
30	Hibridación	94	45
		57	45
		68	2
1	Elongación	68	7

Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa (1.5%) con RedGel para revelar el producto de PCR. Obtenidas las bandas positivas, se procedió a purificar el producto de PCR mediante el Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante (Ver Anexo 2). Una vez purificado el producto de PCR, se realizó un procedimiento de clonación utilizando el Kit de ligación Pgem-t Easy Vector System (Promega). Este procedimiento se realizó con la intención de obtener un mayor número de copias de las secuencias, ya que al ser muestras provenientes de campo

existe la posibilidad de haber obtenido secuencias de organismos acompañantes como las algas epífitas. De esta manera, se obtiene mayor certeza de que las secuencias obtenidas son en realidad de los organismos de interés. La clonación se realizó conforme los siguientes pasos:

1. *Ligación*: 2x Rapid Ligation Buffer, pGEM-T Easy Vector, T4 DNA Ligase (3U) y el producto purificado de PCR. Preparada la mezcla de ligación, se incubó a temperatura ambiente por dos horas y a 65°C por 10 minutos.
2. *Transformación*: durante este proceso fueron empleadas células competentes provenientes de una cepa de *Escherichia coli* (cepa DH5a, PROMEGA), de las cuales fueron añadidas 100 µL en cada uno de los tubos de ligación, mismos que fueron incubados en hielo. Transcurrida una hora, fueron añadidos 400 µL de medio líquido LB (Bertani *et al.*, 1951), posteriormente, los tubos fueron incubados a 37°C con movimiento horizontal a 200 rpm en un Benchtop Shaking incubator (Labnet International Inc) por una hora.
3. *Siembra de clones*: Obtenidas las bacterias transformadas, éstas fueron inoculadas (250 µL) en cajas Petri con medio LB sólido, ampicilina (0.1 mg/mL) con la intención de evitar crecimiento de otras células, X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (0.04 mg/mL) e IPTG: isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (0.5 mM). Los cultivos fueron incubados a 37°C por 24 horas.
4. *Selección*: El reconocimiento de clones positivos se realizó mediante la técnica de detección "*Blue–white screen*" la cual consiste en una distinción de colonias blancas y azules ocasionadas por la hidrólisis de X-Gal a partir de la presencia la β-galactosidasa; si el material genético se insertó de manera correcta, la enzima no es funcional, y por lo tanto no puede darse la hidrólisis de X-Gal. Por otro lado, si el material genético no se logró insertar, la enzima es funcional y puede hidrolizar el compuesto, provocando la coloración azul. De esta manera, fueron seleccionadas las colonias positivas de color blanco sobre las colonias negativas de color azul para cada una de las colonias bacterianas transformadas. Seleccionadas las colonias

correspondientes a los clones positivos, fueron sembradas en otra caja Petri con medio LB, ampicilina, X-Gal e IPTG.

Con la intención de confirmar la presencia del inserto se realizó una PCR de 16S y una electroforesis siguiendo el mismo método anteriormente señalado. Para obtener el DNA se tomó una muestra de al menos una de las colonias positivas (clones) con ayuda de puntas para micropipeta estériles, posteriormente se resuspendió la muestra en 10 µl de agua milli-Q. La mezcla de reacción empleada para la PCR fue la siguiente: agua milli-Q, 10x PCR buffer, Cl<sub>2</sub>Mg (50 mM), desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP 50 µM) y DNA polimerasa (Ultratools DNA Polymerase: 1 unit/µL y Thermoscientific DreamTaq DNA Polymerase: 20 y 500 unit/µl). Como primers (10 pM) fueron utilizados los oligonucleótidos T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') y SP6 (5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3') (Melton *et al.*, 1984). Los ciclos térmicos empleados fueron los siguientes:

Tabla 3. Ciclos térmicos de la PCR para la detección de clones.

Número de ciclos	Fase	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
1	Desnaturalización	94	5
30	Hibridación	94	1
		49	1
		68	2
1	Elongación	67	7

c) Obtención de secuencias genéticas:

Confirmada la presencia del inserto, las bacterias transformadas fueron cultivadas en medio LB líquido con ampicilina a 37°C y movimiento horizontal de 250rpm durante 24 horas. Posteriormente se realizó la extracción y purificación de los plásmidos para lo cual fue utilizado el Kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) siguiendo el protocolo proporcionado (Ver Anexo 3). Obtenido el DNA plasmídico, se midió su concentración (Epoch: BioTek Instruments Inc., USA), para finalmente ser enviado a secuenciar. El proceso de secuenciación se realizó mediante la Unidad de Síntesis y

Secuenciación de DNA (USSDNA) del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Los cebadores empleados para la secuenciación de las muestras fueron T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'), SP6 (5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3') (Melton *et al.*, 1984) y 684F (5'-GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA-3') (Mateo *et al.*, 2011).

d) Determinación taxonómica a partir de las secuencias obtenidas:

Las secuencias obtenidas fueron ensambladas con ayuda del programa BioEdit 7.2 (Hall, 2005) con la intención de obtener una secuencia consenso, que permitiera posteriormente realizar un análisis BLAST (Basic Local Alignment Search Tool): (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), un algoritmo que compara la secuencia consenso y obtiene mediante porcentajes de similitud la mayor relación con las secuencias disponibles en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Fueron consideradas aquellas identidades que estuvieran por encima del 98% de similitud, en los casos posibles ya que en algunas de las secuencias de los individuos analizados no se encontraron similitudes en la base de datos y simplemente se tomaron aquellos resultados con las mayores similitudes posibles para tener un referente en la construcción de las filogenias.

El siguiente paso que consideró el análisis de secuencias del gen 16S ARNr fue la construcción de árboles filogenéticos. Se construyeron tres árboles con la intención de posicionar las secuencias obtenidas en este trabajo dentro de una filogenia construida con secuencias conocidas. Este procedimiento permite mediante un análisis de similitud, la construcción de clados que agrupan las secuencias con mayor parecido y por lo tanto, facilita el proceso de asignar una identidad taxonómica mucho más robusta que la que inicialmente se puede establecer con el análisis BLAST. La incorporación de los análisis filogenéticos a los datos obtenidos a partir de la taxonomía fenética de las poblaciones analizadas representa un análisis circular que proporciona una explicación clara de la relación evolutiva y morfológica de los organismos de interés.

Fueron empleadas las secuencias obtenidas para cada una de las poblaciones de estudio, aquellas que resultaron similares mediante el análisis BLAST y de manera adicional se incorporaron secuencias de algunos géneros representativos de cada uno de los grupos a analizar, construyendo así, una filogenia para el orden Nostocales, una para el orden Chroococcales y una para el orden Oscillatoriales. Estas secuencias fueron consultadas y descargadas mediante las bases de datos CyanoDB (<http://www.cyanodb.cz/>) y el NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), así mismo se incorporó la secuencia de *Gloeobacter violaceus* Rippka, J.B. Waterbury & Cohen-Bazire, nom. cons. 1974 como grupo externo. De esta manera se construyó una matriz diferente de secuencias para cada grupo, obteniendo una matriz con 62 secuencias para el grupo de las Nostocales, con 53 secuencias para el grupo de las Chroococcales y con 47 para el grupo de las Oscillatoriales.

Una vez construidas las matrices, se realizó un alineamiento múltiple empleando el programa BioEdit, posteriormente cada alineamiento fue revisado y alineado de forma manual empleando los programas BioEdit y PhyDE-1 V 0.9971 (Müller *et al.*, 2010). El alineamiento manual se realizó bajo un criterio de parsimonia, buscando alinear las secuencias con la menor cantidad de cambios evolutivos posibles, priorizando eventos como sustituciones en lugar de cambios como inserciones o deleciones, evitando introducir un exceso de gaps y cuidando que éstos quedaran anidados con un mismo principio y fin. Con la intención de obtener mayor coherencia en el alineamiento, en algunos casos fue necesario eliminar las primeras y/o últimas bases de las secuencias.

Una vez alineadas las secuencias, se creó un archivo en formato FASTA para cada una de las matrices correspondientes a los diferentes grupos biológicos de estudio. La construcción de filogenias se realizó con el programa MEGA V.7.0.26 (Kumar *et al.*, 2016), usando los siguientes algoritmos: 1. unión de vecinos más cercanos (Neighbor Joining), 2. máxima parsimonia (Maximum Parsimony) y 3. máxima verosimilitud (Maximum Likelihood) para cada una de las matrices. Se realizaron un total de nueve análisis, de los cuáles se obtuvieron los diferentes valores de soporte (bootstrap) para cada uno de los clados formados, permitiendo así comparar las diferentes filogenias y la verosimilitud de estos.

#### 6.4 Reconocimiento de la potencial toxicidad

La determinación de la potencial toxicidad se realizó a partir del reconocimiento de genes que han sido reportados como productores de toxinas, particularmente anatoxinas (gen *anaF*) y microcistinas (gen *mcyE*). Para la identificación de estos genes se empleó nuevamente la técnica de PCR. La amplificación de los genes productores de toxinas se realizó siguiendo el mismo protocolo empleado para la amplificación del gen 16S. El DNA extraído al comienzo del análisis molecular de las muestras también fue empleado en la detección de la potencial toxicidad.

La mezcla de reacción empleada para las PCR fue la siguiente: agua milli-Q, 10x PCR buffer, Cl<sub>2</sub>Mg (50 mM), desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP 50 μM), (BSA, 0.1%) y DNA polimerasa (Ultratools DNA Polymerase: 1 unit/μL y Thermoscientific DreamTaq DNA Polymerase: 20 y 500 unit/μl). En este caso como primers (10 pM) fueron utilizados los oligonucleótidos *atxof* (5'-TCGGAAGCGCGATCGCAAATCG-3') y *atxar* (5'-GCTTCCTGAGAAGGTCCGCTAG.3') para anatoxinas (Ballot *et al.*, 2010) y HEPF (5'-TTTGGGGTTAACTTTTTGGGCATAGTC-3') y HEPR (5'-AATTCTTGAGGCTGTAAATCGGGTTT-3') para microcistinas (Jungblut y Neilan, 2006). Empleando agua milli-Q como negativo. Los ciclos térmicos empleados fueron los siguientes:

Tabla 4. Ciclos térmicos de la PCR para detección de genes *anaF* y *mcyE*

Anatoxinas			Microcistinas		
Número de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Número de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
1	94	5	1	92	2
30	94	0.5	35	94	0.33
	55	0.5		52	0.5
	72	45		72	1
1	72	7	1	72	5

Obtenido el producto de PCR, se realizó una electroforesis con la intención de reconocer las bandas correspondientes a cada gen (404 pb para anatoxina y 472 pb para microcistinas) y así poder determinar si las muestras eran positivas para alguno de los genes productores de toxinas analizados. De aquellas muestras que resultaron positivas para alguno de los dos genes (o incluso los dos) se realizó un procedimiento de purificación de producto de PCR, clonación y secuenciación como se describió anteriormente, esto con la intención de confirmar que las bandas obtenidas fueran correspondientes a las toxinas y no a un fragmento de anillamiento aleatorio no específico.

### *6.5 Análisis de datos*

La composición taxonómica para cada uno de los grupos biológicos de estudio se evaluó en términos de riqueza y abundancia. Para el caso de las poblaciones de cianobacterias, la evaluación se realizó por sitio, mientras que, para las comunidades de MIB asociados, el análisis se realizó para cada una de las poblaciones de cianobacterias colectadas.

Con la finalidad de reconocer aquellos parámetros que pudieran estar interfiriendo en el establecimiento de las asociaciones entre MIB y cianobacterias bentónicas, se realizó una exploración estadística a partir de un Análisis de Similitud (ANOSIM), mismo que proporciona valores de R (Rango de disimilitud) y p (proporción de R que son  $\geq R$ ), lo que permite reconocer diferencias estadísticamente significativas entre los grupos comparados en función de diferentes variables o factores que puedan interferir en la presencia y distribución de los organismos. En este caso, entre los ensambles de MIB asociados a las diferentes poblaciones de cianobacterias, las variables evaluadas fueron el tipo de cianobacteria, su nivel de organización celular y su forma de crecimiento.

Posteriormente se realizó un análisis de porcentajes de similitud (SIMPER), mismo que considera las abundancias de los taxones de MIB registrados y permite reconocer similitudes entre los diferentes ensambles bajo la influencia de alguno de los parámetros evaluados. Este análisis distingue un grupo de taxones representativos correspondientes a los diferentes factores evaluados. Estas similitudes se otorgan a partir de los taxones exclusivos,

compartidos y las contribuciones porcentuales de cada uno de ellos, en función de sus abundancias por muestra, para definir cada uno de los grupos. En este caso se consideraron todos los taxones que contribuyeran por encima del 70% acumulado en cada grupo, siendo éstos los que caracterizan los diferentes ensamblajes de MIB asociados a cada una de las poblaciones de cianobacterias estudiadas. Los factores evaluados fueron: tipo de cianobacteria, cobertura porcentual, forma de crecimiento, nivel de organización celular, potencial toxicidad y origen geológico del sitio donde fueron colectadas. Ambos análisis fueron realizados con el paquete estadístico PRIMER V 1.4. (Clarke & Gorley, 2006). Todos los datos biológicos fueron transformados con el algoritmo de raíz cuadrada y se usaron matrices de disimilitud calculadas con la distancia de Bray-Curtis para correr los análisis estadísticos.

Por último, se realizaron dos Análisis de Correspondencia Canónica (ACC), análisis multiparamétrico que integra parámetros ambientales y biológicos, permitiendo reconocer afinidades ambientales. El primer análisis que se realizó fue para reconocer las preferencias ambientales de las poblaciones de cianobacterias estudiadas, integrando la abundancia de los diferentes crecimientos encontrados medidos en función de su cobertura porcentual y algunos de los parámetros físico-químicos empleados en la caracterización ambiental de los ríos de estudio como temperatura (T), sólidos disueltos totales (SDT), fósforo reactivo soluble (FSR), y nitrógeno inorgánico particulado: amoníaco ( $\text{NH}_4$ ), nitritos ( $\text{NO}_2$ ) y nitratos ( $\text{NO}_3$ ).

El segundo análisis que se realizó fue para reconocer las preferencias de los MIB asociados sobre las diferentes poblaciones de cianobacterias, por lo que se integró la abundancia de cada uno de los géneros identificados que se encontraron asociados a cada una de las poblaciones de cianobacterias y los mismos parámetros físico-químicos del análisis anterior. Ambos ACC se realizaron con el paquete estadístico PAST 3.x (Hammer *et al.*, 2001).

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Caracterización ambiental de los ríos

En los sitios correspondientes a las cuencas de origen silíceo, los valores de los parámetros evaluados indican ambientes de aguas frías-templadas (T: 7.6-15.1 °C), ligeramente ácidas a básicas (pH: 6.2-8.0), bien oxigenadas (OD: 7.87-9.0 mg/L) y oligotróficas (STD: 14.5-88 mg/L, FRS: 0.27-1.41 mg/L, NH<sub>4</sub>: 0.01-0.33 mg/L, NO<sub>2</sub>: 0.003-0.025, y NO<sub>3</sub>: 0.01-1.70 mg/L). Por su parte en los sitios localizados dentro de las cuencas de origen calcáreo, los valores de los parámetros evaluados indican ambientes de aguas templadas-cálidas (T: 23.5-25-6°C), neutras a básicas (pH: 6.9-7.8), bien oxigenadas (OD: 6.13-8.42 mg/L), oligotróficas y en algunos casos eutróficas (STD: 129-766 mg/L, FRS: 0.02-0.95 mg/L, NH<sub>4</sub>: 0.01-3.18 mg/L, NO<sub>2</sub>: 0.002-0.003, y NO<sub>3</sub>: 0.035-29.99 mg/L) (Tabla 5).

Tabla 5. Parámetros ambientales evaluados para la caracterización ambiental en los diferentes sitios de estudio, donde T: temperatura, STD: sólidos disueltos totales, K<sub>25</sub>: conductividad eléctrica, OD: oxígeno disuelto, FSR: fósforo reactivo soluble, NH<sub>4</sub>: amonio, NO<sub>2</sub>: nitritos y NO<sub>3</sub>: nitratos. El código de los sitios se corresponde al presente en la tabla 1.

Origen geológico	SITIO	T (C°)	pH	STD (mg/L)	K25 (μS/cm)	OD (mg/L)	FRS	(NH <sub>4</sub> )	(NO <sub>2</sub> )	(NO <sub>3</sub> )
Silíceo	MA	7.6	8.02	14.5	52.2	8.9	0.275	0.095	0.010	0.0875
	SD-PR	9.2	6.5	44	50	8	0.33	0.015	0.005	1.25
	PI	9.5	7.52	29.05	58.2	7.87	0.445	0.01	0.025	0.001
	SM	14.3	6.28	37.15	74.53	8	0.74	0.15	0.003	0.025
	CSR	9.9	7.29	69.16	141.75	7.99	0.375	0.03	0.003	0.01
	AM	12.7	6.26	45	90	8	1.05	0.12	0.006	1.6
	AB	15.1	7.18	88	176	9	1.41	0.33	0.005	1.70
Calcáreo	ME	25.60	7.39	129	1215	6.13	0.07	0.01	0.003	0.25
	TA	23.5	6.9	766	1528	8.42	0.02	0.06	0.002	0.035
	EC	23.7	7.87	401	602.3	7.76	0.955	3.18	-	29.99

Como se puede observar, el intervalo ambiental no es tan amplio entre los sitios correspondientes a las cuencas con el mismo origen geológico. La mayor diferencia se encuentra entre regiones, de esta manera es posible atribuir los mayores valores de T y SDT, a los sitios localizados dentro de las cuencas de origen calcáreo, mientras que los mayores valores de OD corresponden a los sitios localizados dentro de las cuencas de origen silíceo. El pH fue el único parámetro que presentó valores cercanos entre ambas regiones. A pesar de haber registrado en términos generales concentraciones de nutrientes muy bajas, es posible asociar los mayores valores de  $\text{NH}_4$  y  $\text{NO}_3$  a los sitios de origen calcáreo y los de FRS y  $\text{NO}_2$  a los sitios de origen silicio (Figura 2).

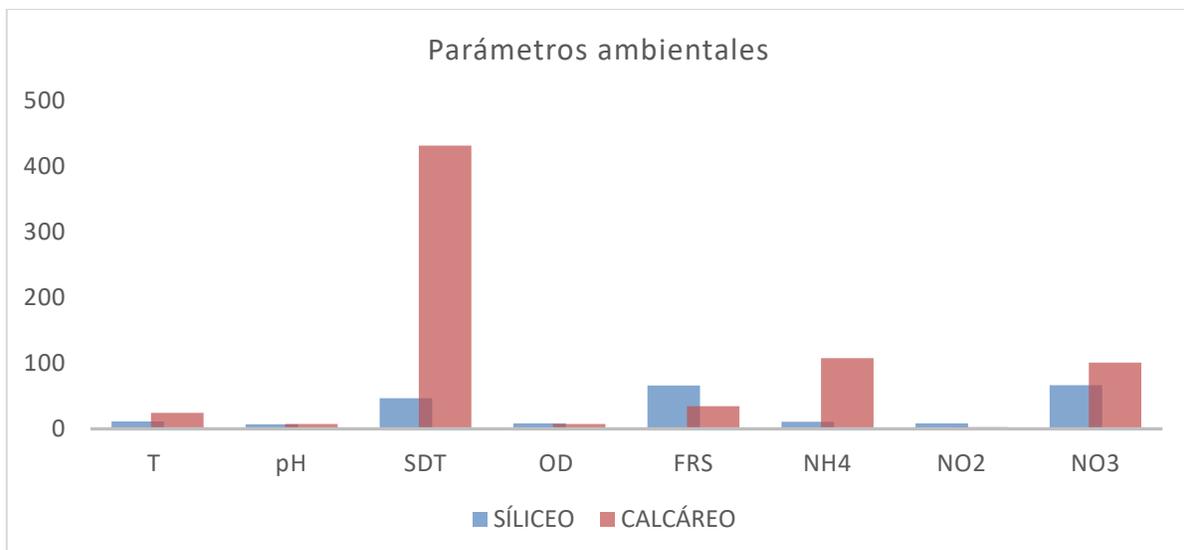


Figura 2. Valores promedio de los parámetros ambientales evaluados en función del origen geológico de los sitios de estudio. Los valores correspondientes a FRS,  $\text{NH}_4$  y  $\text{NO}_3$  están multiplicados x100, mientras que los valores de  $\text{NO}_2$  lo están x1000.

## 7.2 Caracterización taxonómica y morfofuncional de los grupos biológicos

### 7.2.1. Cianobacterias bentónicas

A partir de la identificación morfológica y considerando los antecedentes de distribución y asociación con MIB previamente reportados en los sitios de estudio, se reconocieron 14 poblaciones de cianobacterias pertenecientes a los géneros: *Nostoc* sp., *Placoma* sp., *Phormidium* sp. y *Blennothrix* sp. En los sitios correspondientes a las cuencas de origen silíceo

se encontraron las especies *Nostoc parmelioides*, *Placoma regulare* y *Phormidium autumnale*, mientras que en las cuencas de origen geológico calcáreo se encontraron las especies *Nostoc verrucosum* y *Blennothrix ganeshiii*.

Sin embargo, el análisis de las secuencias obtenidas a partir de la amplificación del gen 16S reveló una mayor riqueza de cianobacterias. En primer lugar, el análisis BLAST, indicó que las poblaciones distribuidas en los sitios de origen silíceo catalogadas como *Nostoc* sp. en realidad pertenecen a dos géneros diferentes: *Nostoc* sp. y *Compactonostoc* sp. De manera particular, las especies *Nostoc verrucosum* y *Compactonostoc shennongjiaensis* en los sitios Miguel (SM) y Canal San Rafael (CSR) respectivamente. Por su parte, el análisis para las poblaciones asociadas al género *Placoma* sp. señaló una similitud con *Chamaesiphon* sp., de manera particular, las especies *Chamaesiphon investiens* en el Segundo Dinamo (SD), *Chamaesiphon subglobosus* en Agua Blanca (AB) y ambas especies en San Miguel (SM) y Arroyo Monarca (AM). En lo que respecta a las poblaciones catalogadas como *Phormidium* sp., se indicó una similitud con *Wilmottia murrayi* en San Miguel (SM) y *Phormidium corium* en el Segundo Dinamo (SD) (Tabla 6).

El análisis para las poblaciones de cianobacterias distribuidas en los sitios con origen geológico calcáreo indicó que la población reconocida como *Nostoc* sp. en Tambaque (TA) sí pertenece a este género, mientras que las poblaciones reconocidas inicialmente como *Phormidium* sp. y *Blennothrix ganeshiii* se encuentran mayormente asociadas con los géneros *Choococcus* sp. y *Hassalia* sp. en Meco (ME), razón por la que fueron incorporadas en los análisis filogenéticos del grupo de las Nostocales, mientras que la población reconocida como *Phormidium* sp. en El Carrizal (EC) presentó una correlación con el género *Ancylothrix* sp. (Tabla 6). Es preciso aclarar que estas secuencias registraron un porcentaje de similitud muy por debajo del 95%, por lo que incluso podría tratarse de un género distinto a lo que se indica en el análisis BLAST, además estos resultados pueden ser indicador de que en la base de datos del NCBI no existen secuencias de organismos similares a los secuenciados en este trabajo.

Tabla 6. Resultados del análisis BLAST correspondiente a las secuencias obtenidas para las poblaciones de cianobacterias registradas y previamente reportadas en los sitios de estudio. El código de los sitios se corresponde al presente en la tabla 1.

Origen geológico	Sitio	Población	BLAST (NCBI)	Número de acceso	% de Similitud
Silíceo	MA	<i>Nostoc parmelioides</i>	<i>Nostoc</i> sp. SKJF1	EU022713.1	98.38
	SD	<i>Placoma regulare</i>	<i>Chamaesiphon investiens</i> UAM 386	JQ070061.1	98.06
	SD	<i>Phormidium autumnale</i>	<i>Phormidium corium</i>	JN382241.1	99.38
	PI	<i>Nostoc parmelioides</i>	<i>Nostoc</i> sp. SKJF1	EU022713.1	98.32
	SM	<i>Nostoc</i> sp.	<i>Nostoc</i> cf. <i>verrucosum</i> <i>Nostoc verrucosum</i> KU005	AB245144.1 AB494996.1	99.85 99.85
	SM	<i>Placoma</i> sp.	<i>Chamaesiphon subglobosus</i> PCC 7430	AY170472.1	98.37
			<i>Chamaesiphon investiens</i> UAM 386	JQ070061.1	98.02
	SM	<i>Phormidium</i> sp.	<i>Wilmottia murrayi</i> ANT.LPE.2	AY493598.1	98.84
			<i>Wilmottia</i> sp. UIC 10069	KT899572.1	98.72
			<i>Wilmottia murrayi</i> A27	HQ873486.1	98.60
CSR	<i>Nostoc</i> sp.	<i>Nostoc</i> cf. <i>verrucosum</i> <i>Nostoc verrucosum</i> <i>Compactonostoc shennongjiaensis</i> CHAB 5781	AB245144.1 AB511947.1 MH598843.1	99.56 99.52 98.12	
AM	<i>Placoma regulare</i>	<i>Chamaesiphon subglobosus</i> PCC 7430	AY170472.1	98.23	
		<i>Chamaesiphon investiens</i> UAM 386	JQ070061.1	98.02	
AB	<i>Placoma regulare</i>	<i>Chamaesiphon subglobosus</i> PCC 7430	AY170472.1	98.16	
Calcáreo	ME	<i>Phormidium</i> sp. 1	<i>Chroococcus</i> sp. JJCM	AM710384.1	94.55
	ME	<i>Blennothrix ganeshii</i>	<i>Hassallia</i> sp.	MH688855.1	94.41
			<i>Tolypothrix distorta</i> CAU1	MG641913.1	94.21
	TA	<i>Nostoc verrucosum</i>	<i>Nostoc</i> sp. SKJF1	EU022713.1	97.64
EC	<i>Phormidium</i> sp.	<i>Ancylothrix terrestris</i> strain 10PC	NR_149292.1	93.76	

Por su parte, como último paso en la identificación definitiva de las poblaciones de cianobacterias, los análisis filogenéticos indicaron la existencia de siete taxones diferentes, distribuidos en tres órdenes, cinco familias y seis géneros. La definición taxonómica se estableció hasta nivel de género en casi todas las poblaciones, únicamente la identidad de una población permaneció nivel de familia.

Los géneros *Nostoc* sp., *Compactoconostoc* sp. (Fam. Nostocaceae) y un taxón perteneciente a la familia Rivulariaceae del orden Nostocales fueron identificados para los sitios Monte Alegre (MA), Presa Iturbide (PI), San Miguel (SM), Canal San Rafael (CSR), Tambaque (TA) y Meco (EM) (Tabla 7; Figura 3 y 6). El género *Placoma* sp. (Fam. Entophysalidaceae) del orden Chroococcales se identificó para los sitios Segundo Dinamo (SD), San Miguel (SM), Agua Blanca (AB) y Arroyo Monarca (AM) (Tabla 7; Figura 4 y 7). Mientras que los géneros *Wilmottia* sp. (Fam. Entophysalidaceae), *Oxynema* sp., y *Ancylothrix* sp. (Fam. Microcoleaceae) del orden Oscillatoriales se identificaron para los sitios San Miguel (SM), Segundo Dinamo (SD), Meco (ME) y Carrizal (EC) (Tabla 7; Figura 5 y 7).

Tabla 7. Identidad taxonómica de las poblaciones de cianobacterias correspondiente a la asignación de nombres derivados de los análisis filogenéticos. El código de los sitios se corresponde al presente en la tabla 1.

Origen geológico	Sitio	Identidad taxonómica a partir de caracteres morfológicos	Identidad taxonómica a partir de la secuenciación del gen 16S	ID de la población
Silíceo	MA	<i>Nostoc parmelioides</i>	<i>Nostoc</i> sp. Vaucher ex Bornet & Flahault)	MA-NOS
	SD	<i>Placoma regulare</i>	<i>Placoma</i> sp. Schousboe ex Bornet & Thuret	SD-PLA
	SD	<i>Phormidium autumnale</i>	<i>Wilmottia</i> sp. O. Strunecky, J. Eister & J. Komárek	SD-WIL
	PI	<i>Nostoc parmelioides</i>	<i>Nostoc</i> sp.	PI-NOS

Tabla 7. Continuación.

Origen geológico	Sitio	Identidad taxonómica a partir de caracteres morfológicos	Identidad taxonómica a partir de la secuenciación del gen 16S	ID de la población
Silíceo	SM	<i>Nostoc</i> sp.	<i>Compactonostoc</i> sp. F.F. Cai & R.H. Li	SM-COM
	SM	<i>Placoma</i> sp.	<i>Placoma</i> sp.	SM-PLA
	SM	<i>Phormidium</i> sp.	<i>Wilmottia</i> sp.	SM-WIL
	CSR	<i>Nostoc</i> sp.	<i>Compactonostoc</i> sp.	CSR-COM
	AM	<i>Placoma regulare</i>	<i>Placoma</i> sp.	AM-PLA
	AB	<i>Placoma regulare</i>	<i>Placoma</i> sp.	AB-PLA
Calcáreo	ME	<i>Phormidium</i> sp.	<i>Oxynema</i> sp. Chatchawan, Komárek, Strunecky, Smarda & Peerapornpisal	ME-OXY
	ME	<i>Blennothrix ganeshii</i>	Rivulareaceae Bornet & Flahault	ME-RIVU
	TA	<i>Nostoc verrucosum</i>	<i>Nostoc</i> sp.	TA-NOS
	EC	<i>Phormidium</i> sp.	<i>Ancylothrix</i> sp. M.D. Martins & L.H.Z. Bronco	EC-ANCY

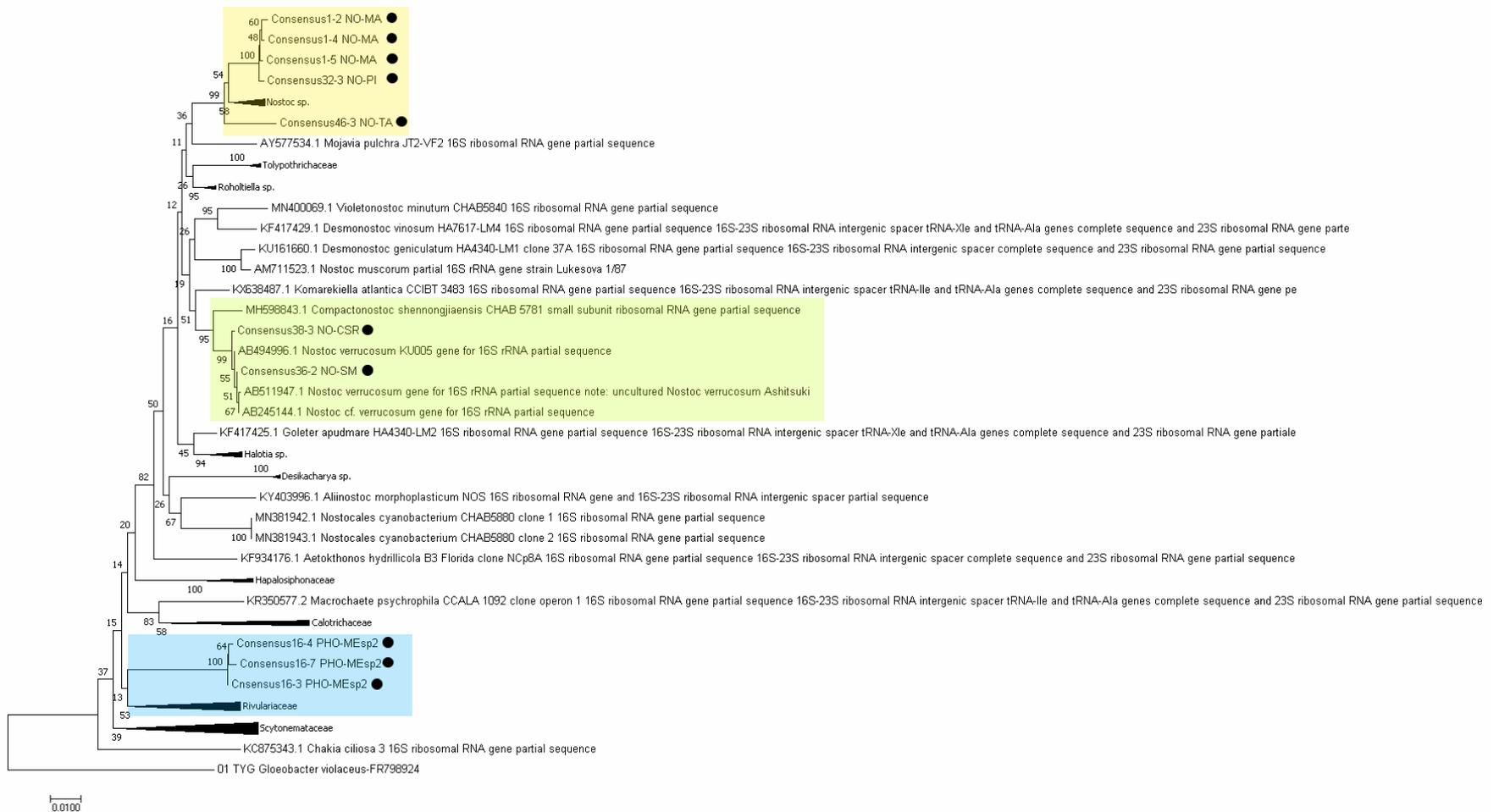


Figura 3. Filogenia correspondiente al grupo de las poblaciones de cianobacterias asociadas originalmente al género *Nostoc* sp. Las secuencias “consensus”, señaladas con un punto negro corresponden a las poblaciones de estudio, por lo que se encuentran seguidas del código correspondiente al sitio de estudio donde fueron encontradas y el nombre inicial bajo el que fueron colectadas. El código de los sitios se corresponde al presentado en la tabla 1.

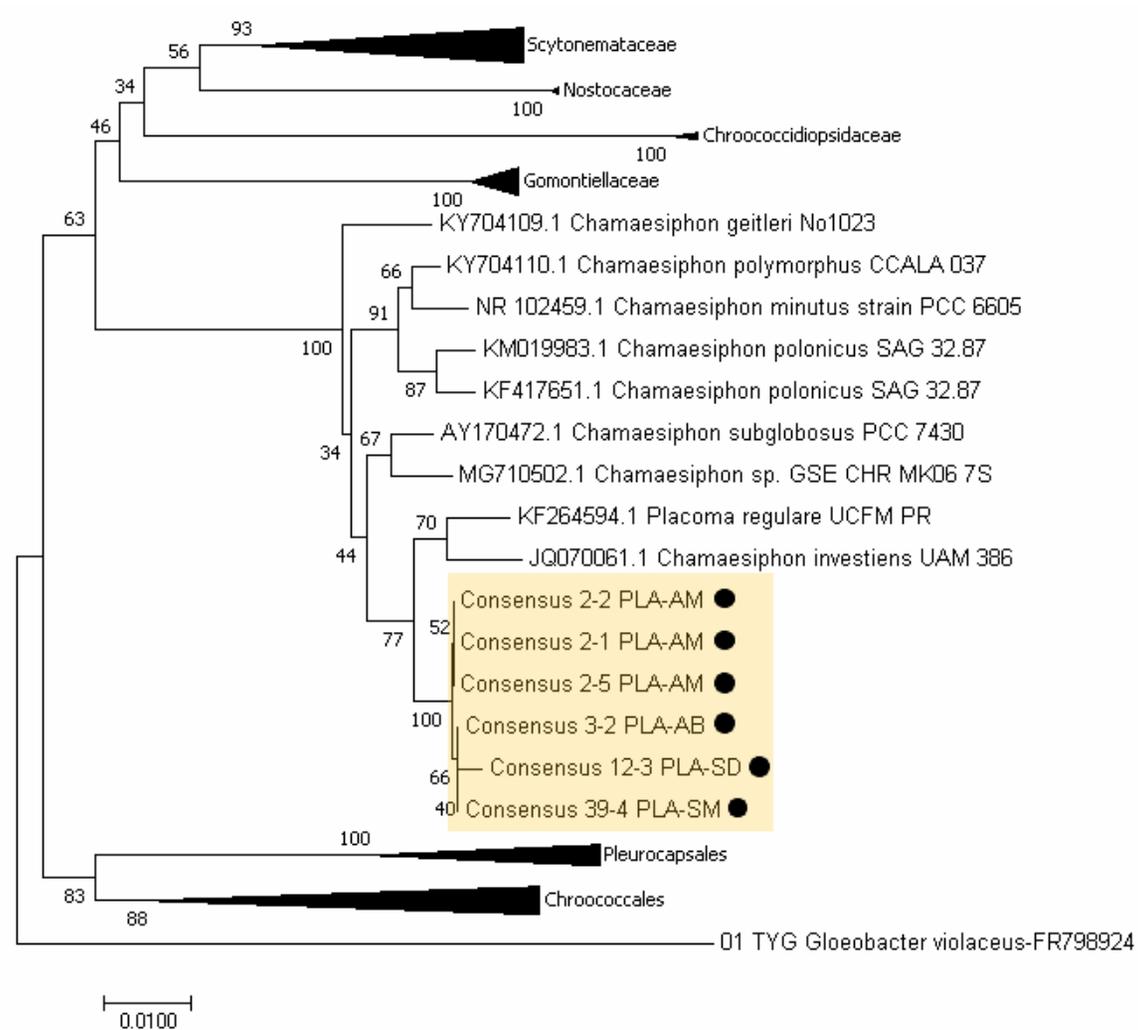


Figura 4. Filogenia correspondiente al grupo de las poblaciones de cianobacterias asociadas originalmente al género *Placoma* sp. Las secuencias “consensus”, señaladas con un punto negro corresponden a las poblaciones de estudio, por lo que se encuentran seguidas del código correspondiente al sitio de estudio donde fueron encontradas y el nombre inicial bajo el que fueron colectadas. El código de los sitios se corresponde al presentado en la tabla 1

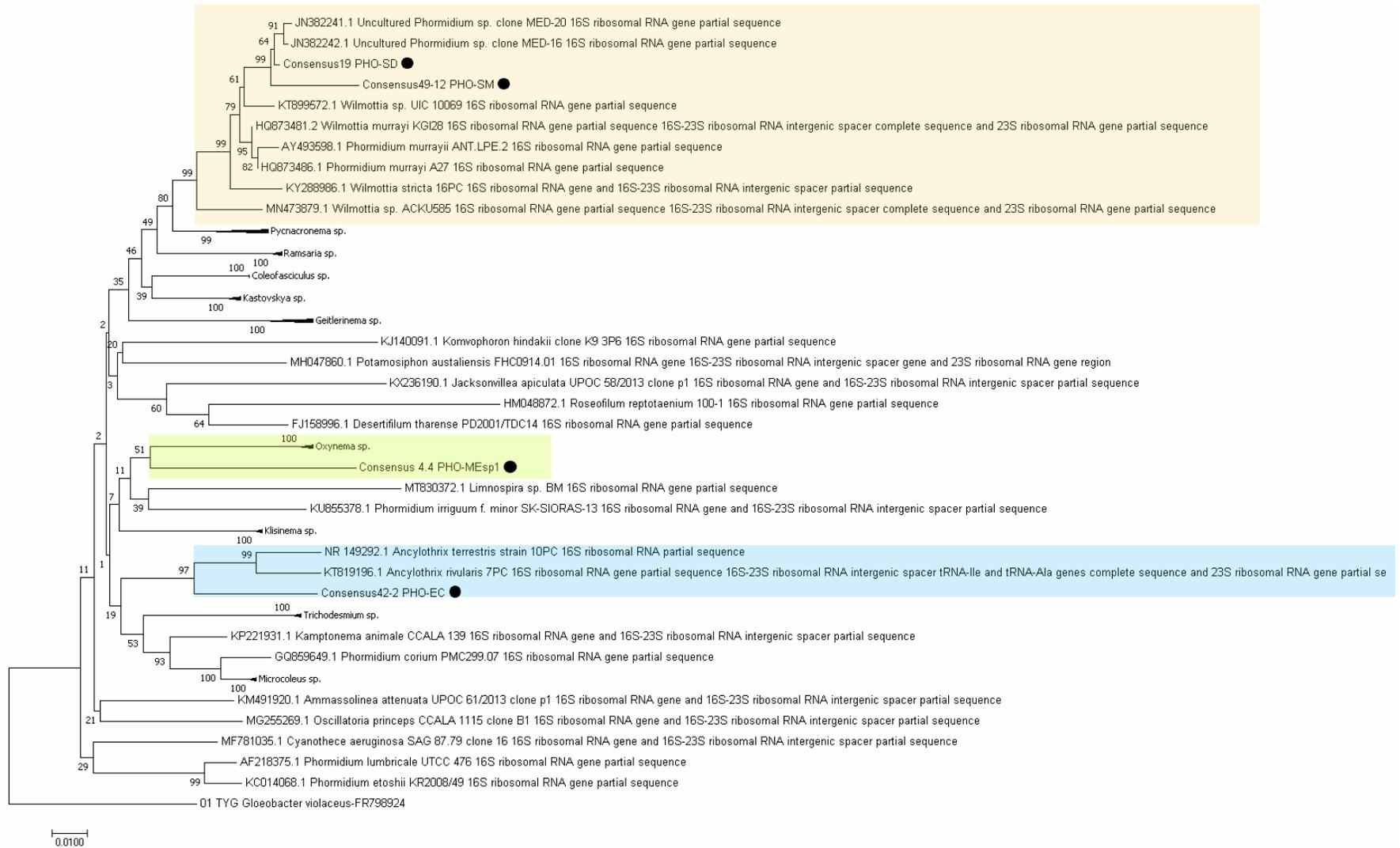


Figura 5. Filogenia correspondiente al grupo de las poblaciones de cianobacterias asociadas originalmente al género *Phormidium* sp. Las secuencias “consensus”, señaladas con un punto negro corresponden a las poblaciones de estudio, por lo que se encuentran seguidas del código correspondiente al sitio de estudio donde fueron encontradas y el nombre inicial bajo el que fueron colectadas. El código de los sitios se corresponde al presentado en la tabla 1.

## NOSTOCALES

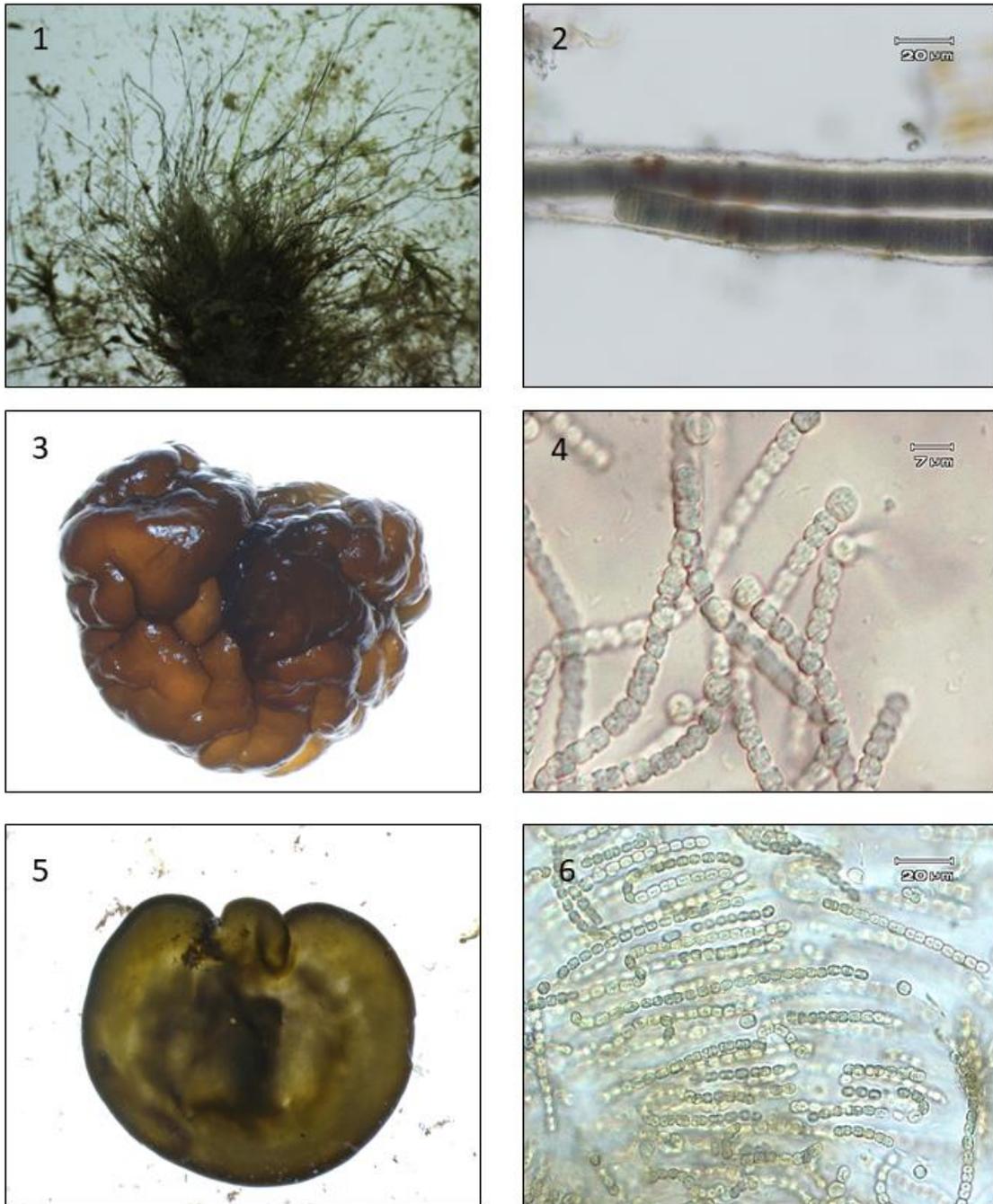


Figura 6. Cianobacterias correspondientes al orden Nostocales. 1: Crecimiento macroscópico de Fam. Rivulariaceae, 2: Fam. Rivulariaceae al microscopio. 3: Colonia de *Nostoc* sp., 4: *Nostoc* sp. al microscopio. 5: Colonia de *Compactonostoc* sp., 6: *Compactonostoc* sp. al microscopio.

## CHROOCOCCALES



## OSCILLATORIALES



Figura 7. Cianobacterias correspondientes al orden Chroococcales y Oscillatoriales. 7: Colonia de *Placoma* sp., 8: *Placoma* sp. al microscopio. 9 y 10: *Wilmottia* sp. al microscopio. 11: *Oxytetrax* sp. al microscopio. 12: *Ancylothrix* sp. al microscopio.

De acuerdo con la asignación de grupos funcionales para las diferentes poblaciones de cianobacterias identificadas, se reconocieron tres niveles de organización celular: colonias compactas (CC), colonias huecas (CH) y filamentos uniseriados (FU), y dos formas de crecimiento: colonias mucilaginosas (CM) y filamentos filiformes (FF) (Tabla 8).

Tabla 8. Asignación de grupos funcionales a partir del nivel de organización y forma de crecimiento de las diferentes poblaciones de cianobacterias encontradas.

<b>Orden</b>	<b>Género</b>	<b>Nivel de organización</b>	<b>Forma de crecimiento</b>
Nostocales	<i>Nostoc</i> sp.	Colonia compacta	Colonia mucilaginosa
	<i>Compactonostoc</i> sp	Colonia compacta	Colonia mucilaginosa
	Rivulariaceae	Filamentos uniseriados	Filamentos filiformes
Chroococcales	<i>Placoma</i> sp.	Colonia hueca	Colonia mucilaginosa
Oscillatoriales	<i>Wilmottia</i> sp.	Filamentos uniseriados	Filamentos filiformes
	<i>Oxynema</i> sp.	Filamentos uniseriados	Filamentos filiformes
	<i>Ancylothrix</i> sp.	Filamentos uniseriados	Filamentos filiformes

### 7.2.2. Macroinvertebrados bentónicos

Se identificaron un total de 964 organismos asociados a las poblaciones de cianobacterias. La estructura de los ensambles se encontró representada por cuatro órdenes de insectos: Ephemeroptera, Coleoptera, Diptera y Trichoptera. De manera particular, las poblaciones de cianobacterias características de los sitios con origen geológico silíceo registraron un total de 805 organismos asociados, distribuidos en los órdenes Diptera (95.03%), Ephemeroptera (4.22%) y Trichoptera (0.74%). Mientras las poblaciones de cianobacterias características de los sitios con origen geológico calcáreo registraron un total de 159 organismos, cuyo porcentaje de abundancia correspondió a Diptera (90.56%), Trichoptera (4.40%), Ephemeroptera (2.51%) y Coleoptera (2.51%).

De acuerdo con esto se reconoce a Diptera como el orden dominante dentro de la composición de MIB asociados a las poblaciones de cianobacterias distribuidas en los sitios de estudio (Figura 8).

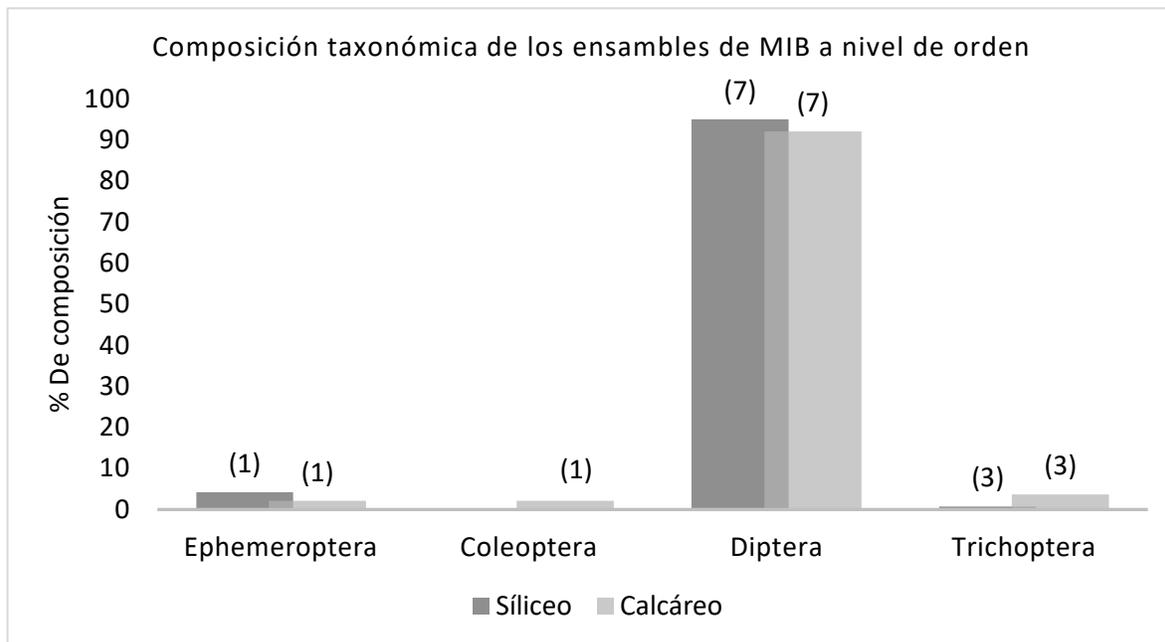


Figura 8. Composición taxonómica de los ensambles de MIB a nivel de orden. Entre paréntesis se indica el número de familias reconocidas para cada uno.

En términos de familias, se identificó un total de 17 familias correspondientes a Ephemeroptera (1), Coleoptera (1), Diptera (10) y Trichoptera (5). Las familias Baetidae (Ephemeroptera), Chironomidae, Pediciidae, Psychodidae, Simulidae (Diptera) y Lepidostomatidae (Trichoptera) fueron encontradas en las poblaciones de cianobacterias asociadas tanto en los sitios de origen geológico silíceo como calcáreo, mientras que las familias Empidinae, Ephydriidae, Muscidae, Tipulidae (Diptera), Glossosomatidae, Helicopsychidae y Xiphoncentronidae (Trichoptera) fueron registradas únicamente en las poblaciones de cianobacterias distribuidas en los sitios con origen geológico silíceo. Por su parte, las familias Elmidae (Coleoptera), Ceratopogoniidae, Stratiomidae, Tabanidae (Diptera), Hydropsychidae y Philopotamidae (Trichoptera) a pesar de tener algunos registros

en ríos con origen geológico silíceo, en esta ocasión sólo se registraron en las poblaciones de cianobacterias distribuidas en los sitios de origen geológico calcáreo (Figura 9).

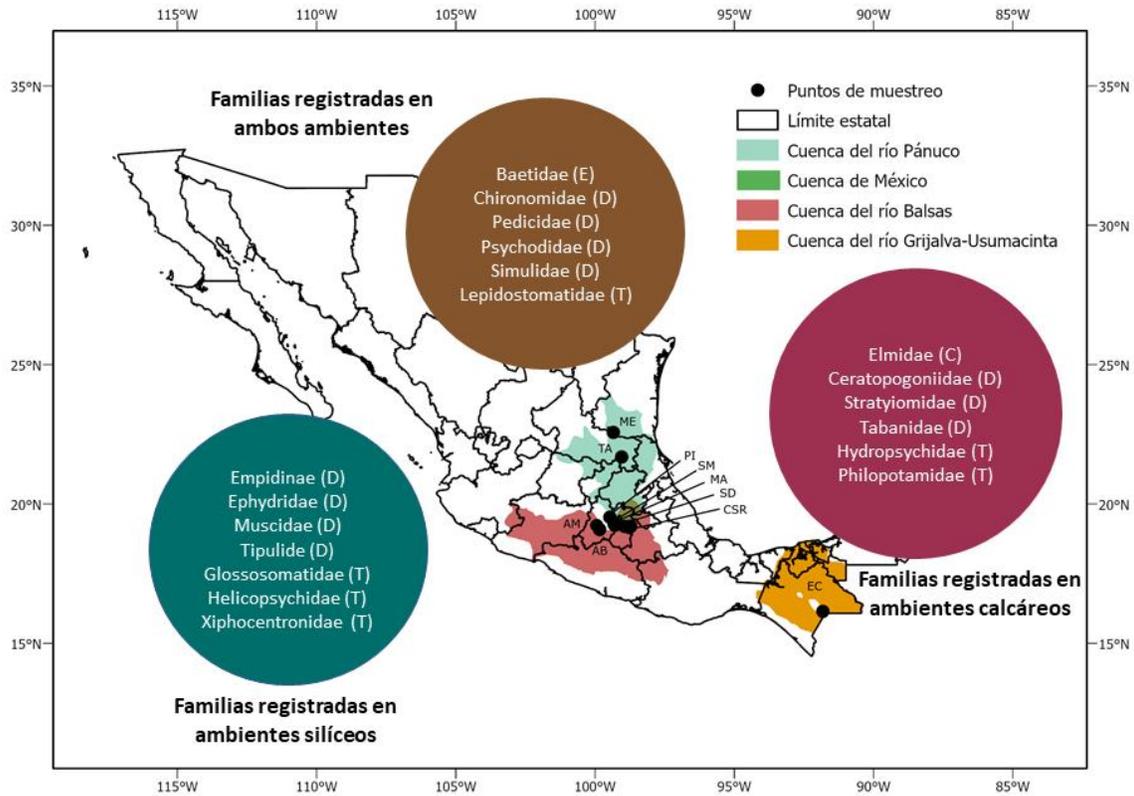


Figura 9. Composición taxonómica de los ensambles de MIB a nivel de familia distribuidas en función del origen geológico de los sitios de estudio. Entre paréntesis se encuentra la inicial del orden al que pertenecen, C: Coleoptera, D: Diptera, E: Ephemeroptera y T: Trichoptera.

Con la intención de tener el mayor nivel de resolución taxonómica posible, se identificó un total de 32 géneros de MIB asociados a las diferentes poblaciones de cianobacterias encontradas (Tablas 9 y 10; Anexo 4), 14 de ellos fueron separados únicamente en las poblaciones distribuidas en los sitios de naturaleza silíceo, otros 13 fueron registrados únicamente en las poblaciones distribuidas en los sitios de naturaleza calcárea, mientras que cinco de ellos fueron registrados en las poblaciones distribuidas en ambos ambientes.

En términos de riqueza se obtuvo un promedio de cuatro taxones asociados a las poblaciones de cianobacterias, siendo en *Compactonostoc* sp. del sitio Canal San Rafael donde se registró la menor riqueza con tan sólo un taxón asociado, mientras que la población correspondiente a la Rivulariaceae del sitio Meco registró la mayor riqueza con ocho taxones asociados (Figura 10). En lo que respecta a los valores de abundancia, se encontró un promedio de 148 organismos asociados por cada población estudiada, sin embargo, los valores extremos se alejan mucho del promedio, siendo nuevamente *Compactonostoc* sp. del sitio Canal San Rafael quien registró el valor mínimo con tan sólo un organismo asociado, mientras que en *Placoma* sp. del sitio Arroyo Monarca se encontró el valor máximo con 250 organismos asociados (Figura 11).

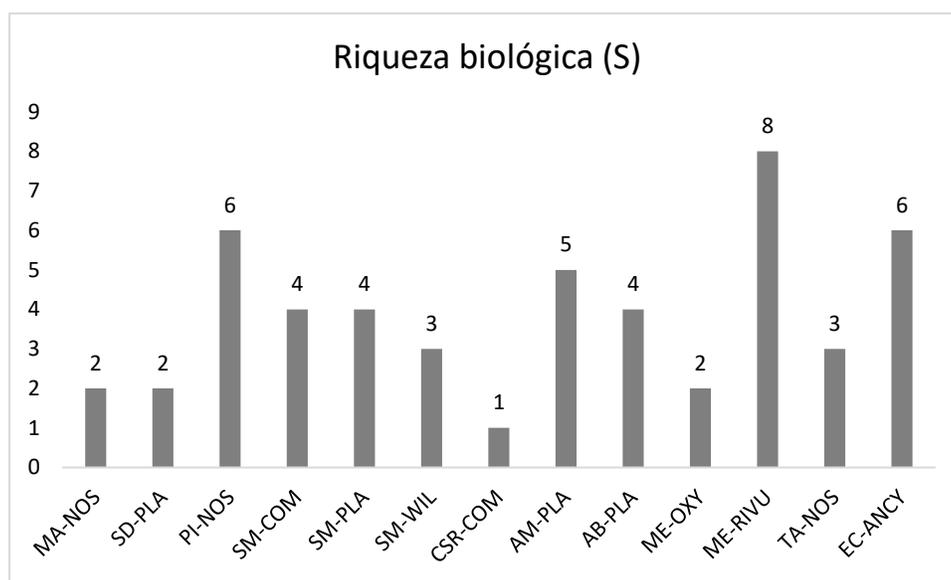


Figura 10. Riqueza biológica de MIB asociados a las distintas poblaciones de cianobacterias. El ID de las poblaciones corresponde al que se muestra en la Tabla 7.

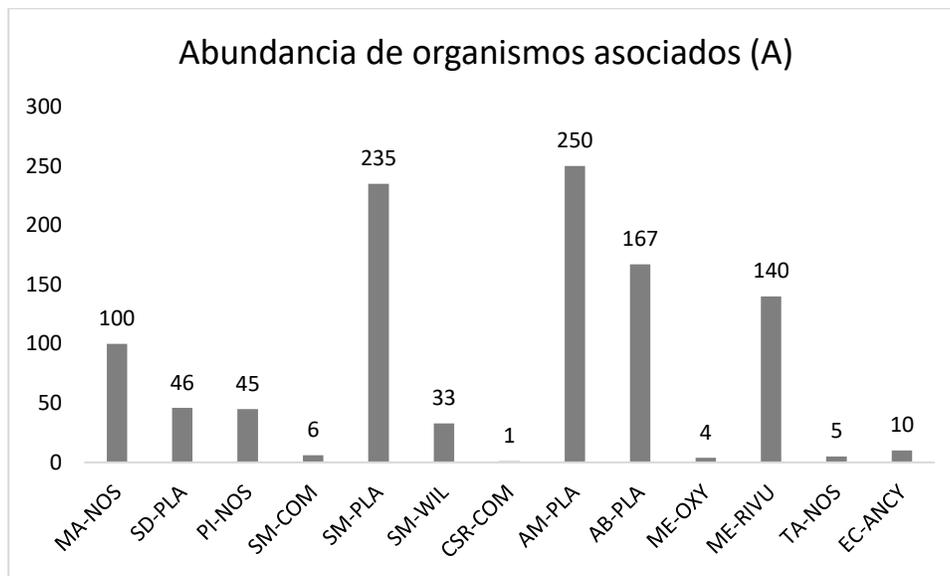


Figura 11. Abundancia de MIB asociados a las distintas poblaciones de cianobacterias. El ID de las poblaciones corresponde al que se muestra en la Tabla 7.

A partir de la asignación de grupos funcionales alimenticios (GFA), se pudo reconocer que el 41% de los géneros de MIB asociados corresponden al GFA de los recolectores (Re), el 28% al de los depredadores (D), 17% al de los raspadores (Ra) y el 14% al de los trituradores (T) (figura 12).

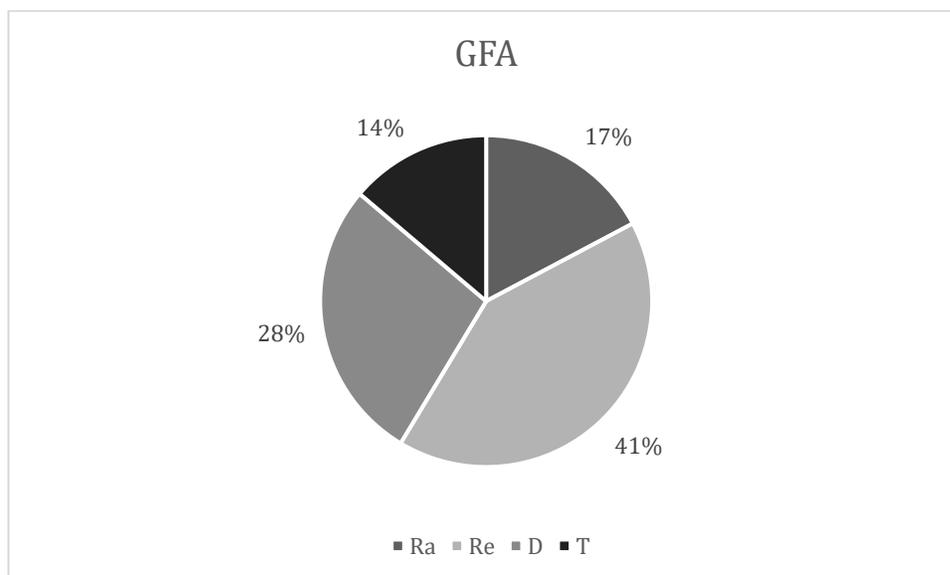


Figura 12. Proporción de GFA correspondientes a los diferentes géneros de MIB asociados

Tabla 9. Abundancia por Grupos Funcionales Alimenticios (GFA) de MIB asociados a las poblaciones de cianobacterias distribuidas en sitios con origen geológico silíceo. AT: Abundancia Total, S riqueza (a nivel de género), NA: No asignado, Ra: Raspador, Re: Recolector, T: triturador, TH: Triturador herbívoro, D: Depredador.

TAXONES DE MACROINVERTEBRADOS BENTÓNICOS ASOCIADOS EN SITIOS DE NATURALEZA SILÍCEA						POBLACIONES DE CIANOBACTERIAS				
ORDEN	FAMILIA	SUBFAMILIA	TRIBU	GÉNERO	GFA	<i>Nostoc</i>	<i>Compactonostoc</i>	<i>Placoma</i>	<i>Wilmottia</i>	
Ephemeroptera	Baetidae			<i>Baetis</i>	Ra/Re	21		13		
Diptera	Chironomidae	Chironominae	Tanytarsini	<i>Cricotopus</i> sp1	TH/Re	97	1	438		
				<i>Cricotopus</i> sp2	TH/Re	20	3			
		<i>Oliveridea</i>	NA				30			
		<i>Paracricotopus</i>	Re				113			
	Empididae				<i>Hemerodromia</i>	D		1		
					<i>Neoplasta</i>	D			10	2
	Ephydriidae				<i>Aff. Scatella</i>	Re			1	
	Pediidae				<i>Pedicia</i>	D			1	
	Psychodidae				<i>Aff. Neomaruina</i>	NA		1		
	Muscidae				<i>Limnophora</i>	D			1	
	Simuliidae				<i>Simulium</i>	Re	2		3	
	Tipulidae				<i>Antocha</i>	Re	2			
					<i>Holorusia</i>	T			1	
					<i>Limonia</i>	TH		1		
Trichoptera	Glossosomatidae			<i>Mortoniella</i>	Ra	1				
	Helicopsychidae			<i>Helicopsyche</i>	Ra	1				
	Lepidostomatidae			<i>Lepidostoma</i>	Ra			4		
	Xiphocentronidae			<i>Xiphocentron</i>	Re				1	
AT						144	7	604	33	
S						7	5	10	3	

Tabla 10. Abundancia por Grupos Funcionales Alimenticios (GFA) de MIB asociados a las poblaciones de cianobacterias distribuidas en sitios con origen geológico calcáreo. AT: Abundancia Total, S riqueza (a nivel de género), NA: No asignado, Ra: Raspador, Re: Recolector, TH: Triturador herbívoro, D: Depredador.

TAXONES DE MACROINVERTEBRADOS BENTÓNICOS ASOCIADOS EN SITIOS DE NATURALEZA CALCÁREA						POBLACIONES DE CIANOBACTERIAS			
ORDEN	FAMILIA	SUBFAMILIA	TRIBU	GÉNERO	GFA	<i>Nostoc</i>	<i>Rivulariaceae</i>	<i>Oxynema</i>	<i>Ancylothrix</i>
Ephemeroptera	Baetidae			<i>Baetis</i>	Ra/Re		4		
Coleoptera	Elmidae			<i>Microcyllloepus</i>	NA	3			
	Ceratopogonidae			<i>Probezzia</i>	D		22		
Diptera	Chironomidae	Chironominae	Tanytarsini	<i>Reothanytarsus</i>	Re	1			2
			Chironomini	<i>Microtendipes</i>	Re				1
	Orthoclaadiinae		<i>Cricotopus</i> sp1	TH/Re			19		2
			<i>Orthocladius</i>	Re					1
			<i>Stilocladius</i>	NA			32		
			<i>Tvetenia</i>	Re	1				
	Tanypodinae		<i>Procladius</i>	D				2	
	Pediciidae		<i>Pedicia</i>	D			14		
	Psychodidae		<i>Aff. Psychoda</i>	Re					1
	Simulidae		<i>Simulium</i>	Re			43		
Stratiomyidae		<i>Brezzia</i>	D				3		
Tabanidae		<i>Tabanus</i>	D					2	
Trichoptera	Hydropsychidae			<i>Cheumatopsyche</i>	Re		1		
	Lepidostomatidae			<i>Lepidostoma</i>	Ra			1	
	Philopotamidae			<i>Wormaldia</i>	Re		5		
AT						4	140	4	11
S						3	8	2	7

### 7.3 reconocimiento de la potencial toxicidad de las poblaciones de cianobacterias

Los resultados obtenidos a partir de la amplificación de los genes *mycE* y *anaF* mediante PCR indicaron que en al menos una de las poblaciones de cianobacterias distribuidas en los sitios con origen geológico silíceo se pudo identificar el gen *mycE*, correspondiente al grupo de las microcistinas, esta población pertenece al género *Placoma* sp. en el sitio San Miguel (Tabla 11, Figura 18). Por otro lado, se pudo identificar el gen *anaF* correspondiente al grupo de las anatoxinas en tres poblaciones, dos pertenecientes al género *Placoma* sp. en los sitios San Miguel y Agua Blanca (Tabla 12, Figuras 14 y 22) y uno correspondiente al género *Wilmottia* sp. en el sitio Segundo Dinamo (Tabla 12, Figura 17). En lo que respecta a las poblaciones de cianobacterias distribuidas en los sitios con origen geológico calcáreo, únicamente se logró identificar el gen *anaF* en la población *Oxynema* sp. de Meco (Tabla 12, Figura 14).

Tabla 11. Resultados obtenidos a partir de la PCR para la detección de los genes *mycE* y *anaF*. El código de los sitios se corresponde a los presentados en la tabla 1.

Origen geológico	Sitio	Población	Microcistinas ( <i>mycE</i> )	Anatoxinas ( <i>anaF</i> )
Silíceo	MA	<i>Nostoc</i> sp.	-	-
	SD	<i>Placoma</i> sp.	-	-
	SD	<i>Wilmottia</i> sp.	-	+
	PI	<i>Nostoc</i> sp.	-	-
	SM	<i>Compactonostoc</i> sp.	-	-
	SM	<i>Placoma</i> sp.	+	+
	SM	<i>Wilmottia</i> sp.	-	-
	CSR	<i>Compactonostoc</i> sp.	-	-
	AM	<i>Placoma</i> sp.	-	-
	AB	<i>Placoma</i> sp.	-	+
Calcáreo	ME	<i>Oxynema</i> sp.	-	+
	ME	Rivulariaceae	-	-
	TA	<i>Nostoc</i> sp.	-	-
	EC	<i>Ancyllothrix</i> sp.	-	-

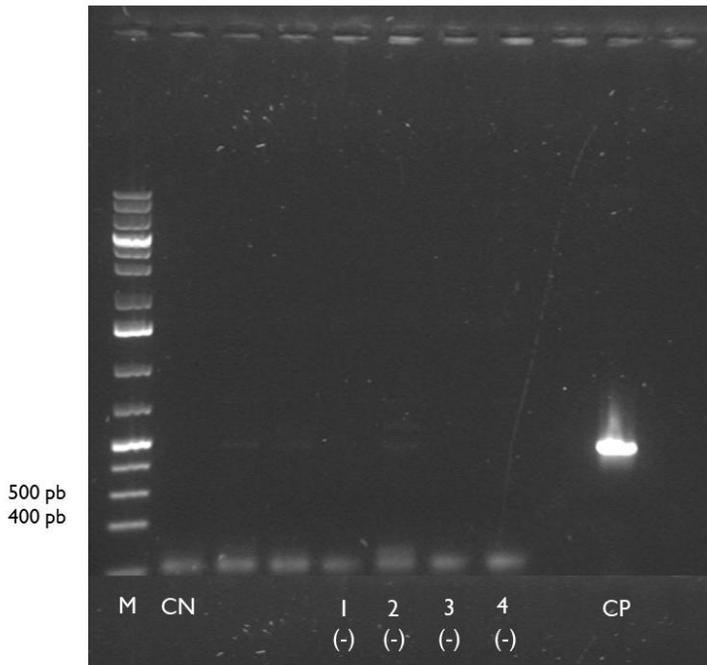


Figura 13. Gel de electroforesis con los productos de PCR para la identificación del gen *mcyE* para las poblaciones MA-*Nostoc* sp. (1), AM-*Placoma* sp. (2), AB-*Placoma* sp. y ME-*Oxytyma* sp. (4). M: marcador molecular, CN: control negativo, CP: control positivo.

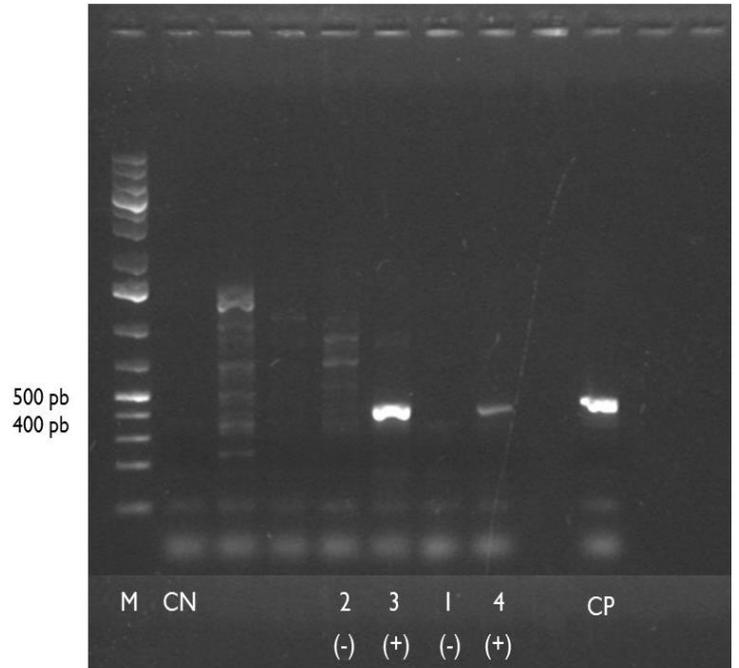


Figura 14. Gel de electroforesis con los productos de PCR para la identificación del gen *anaF* para las poblaciones AM-*Placoma* sp. (2), AB-*Placoma* sp. (3), MA-*Nostoc* sp. (1) y ME-*Oxytyma* sp. (4). M: marcador molecular, CN: control negativo, CP: control positivo.

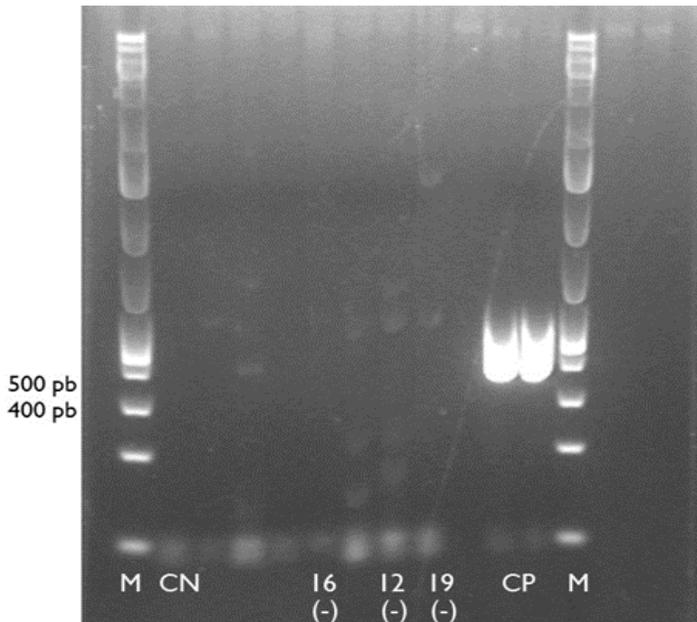


Figura 15. Gel de electroforesis con los productos de PCR para la identificación del gen *mcyE* para las poblaciones ME-Rivulariaceae (16), SD-*Placoma* sp. (12) y SD-*Wilmottia* sp. (19). M: marcador molecular, CN: control negativo, CP: control positivo.

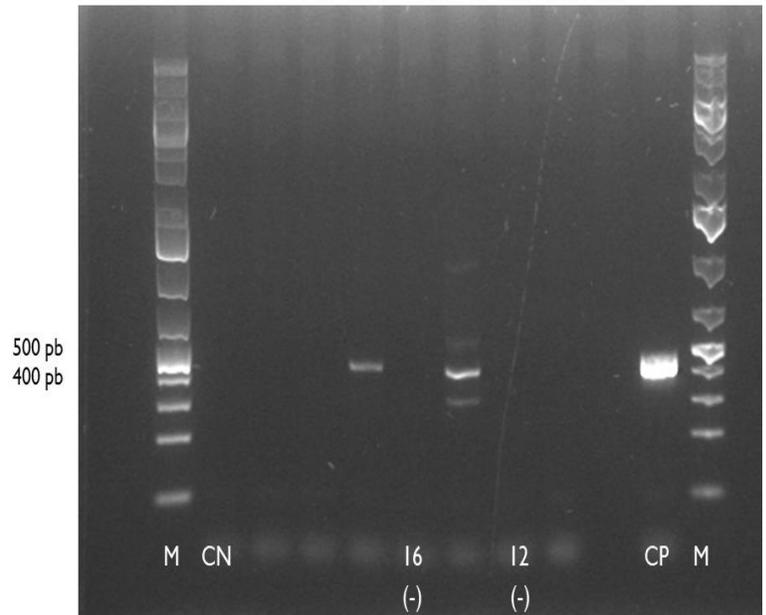


Figura 16. Gel de electroforesis con los productos de PCR para la identificación del gen *anaF* para las poblaciones ME-Rivulariaceae (16) y SD-*Placoma* sp. (12). M: marcador molecular, CN: control negativo, CP: control positivo.

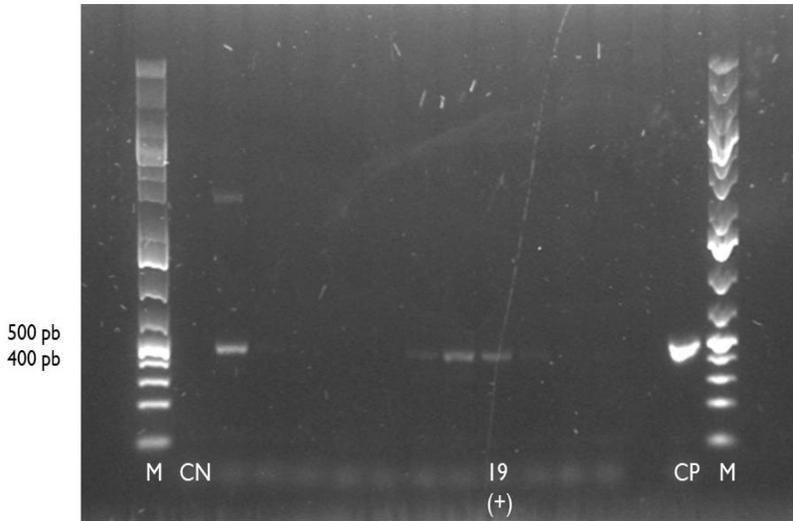


Figura 17. Gel de electroforesis con los productos de PCR para la identificación del gen *anaF* para la población *SD-Wilmottia* sp. (19). M: marcador molecular, CN: control negativo, CP: control positivo.

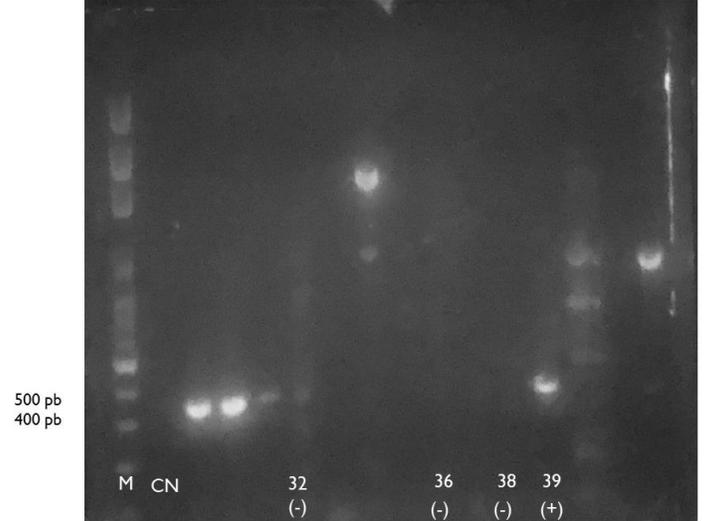


Figura 18. Gel de electroforesis con los productos de PCR para la identificación del gen *mcyE* para las poblaciones *PI-Nostoc* sp. (32), *SM-Compactonostoc* sp. (36), *CSR-Compactonostoc* sp. (38) y *SM-Placoma* sp. (39). M: marcador molecular, CN: control negativo.

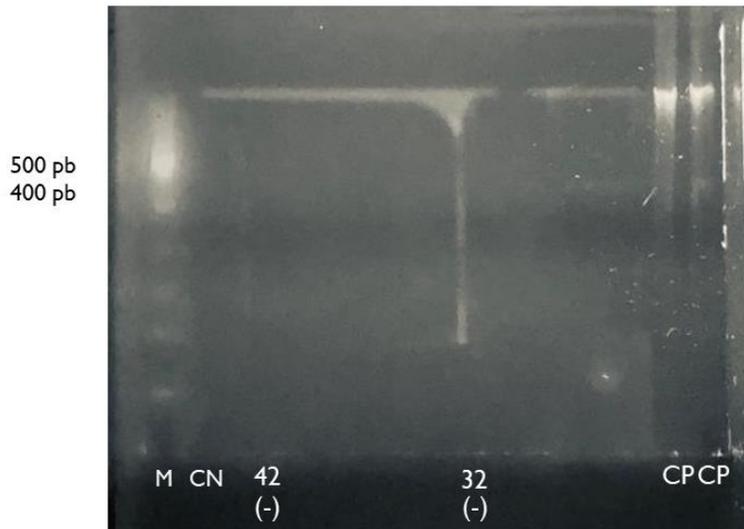


Figura 19. Gel de electroforesis con los productos de PCR para la identificación del gen *anaF* para las poblaciones *EC-Ancyllothrix* sp. (42) y *PI-Nostoc* sp. (32). M: marcador molecular, CN: control negativo, CP: control positivo.

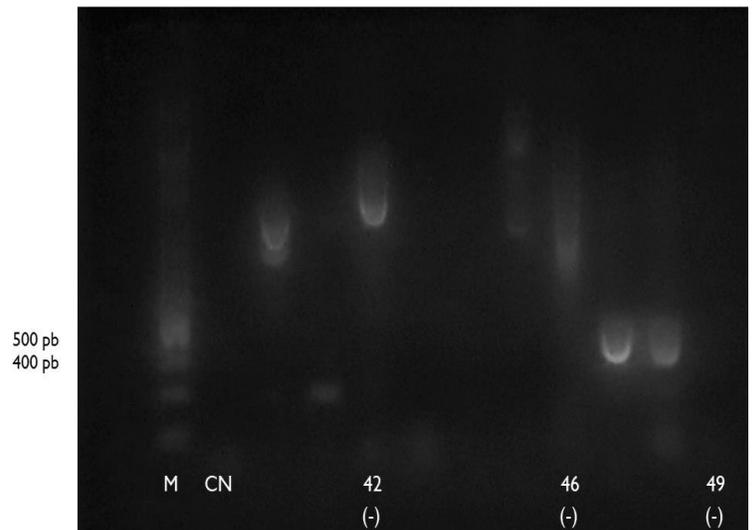


Figura 10. Gel de electroforesis con los productos de PCR para la identificación del gen *mcyE* para las poblaciones *EC-Ancyllothrix* sp. (42), *TA-Nostoc* sp. (46), y *SM-Wilmottia* sp. (49). M: marcador molecular, CN: control negativo.

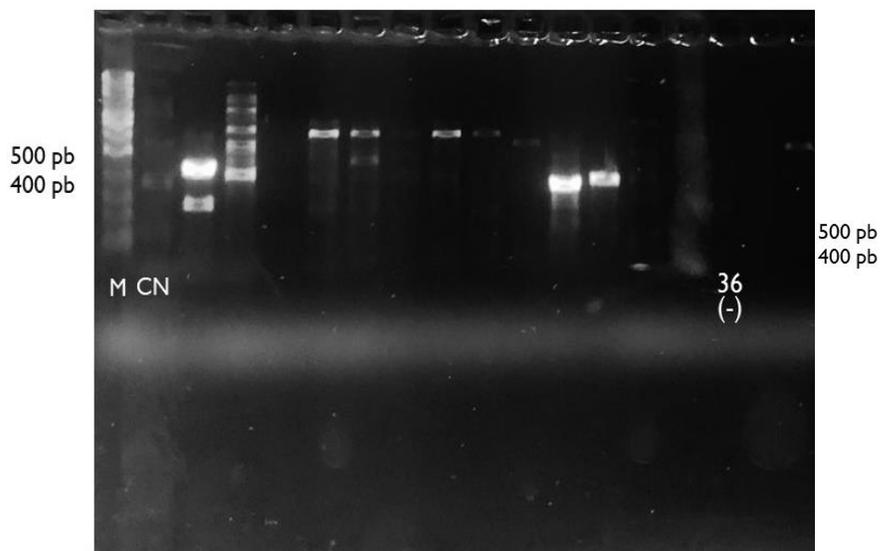


Figura 21. Gel de electroforesis con el producto de PCR para la identificación del gen anaF para la población TA-*Nostoc* sp. (36). M: marcador molecular, CN: control negativo.

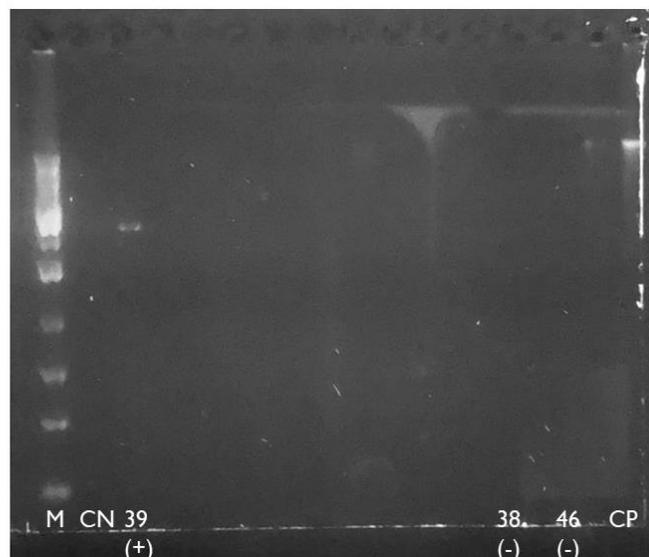


Figura 22. Gel de electroforesis con los productos de PCR para la identificación del gen anaF para las poblaciones SM-*Placoma* sp. (39), CSR-*Compactonostoc* sp. (38) y TA-*Nostoc* sp. (46). M: marcador molecular, CN: control negativo, CP: Control positivo.

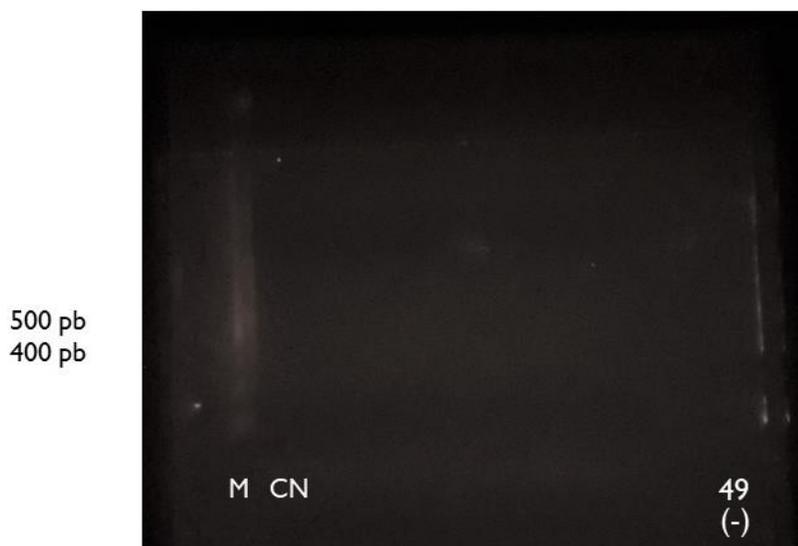


Figura 23. Gel de electroforesis con el producto de PCR para la identificación del gen anaF para la población SM-*Wilmottia* sp. (49). M: marcador molecular, CN: control negativo.

7.4. Factores ecológicos y morfo-funcionales que regulan el establecimiento de las interacciones bióticas

ANOSIM

Los resultados obtenidos a partir del análisis ANOSIM señalan que el único factor que logra establecer diferencias estadísticamente significativas sobre la composición de los ensamblajes de MIB asociados es el tipo de cianobacteria que participa en la interacción ( $R=0.478$ ;  $p=0.02$ ) (Figura 24). Mientras que variables morfofuncionales propias de las cianobacterias como el nivel de organización celular ( $R=0.098$ ;  $p=0.163$ ) (Figura 25) y la forma de crecimiento ( $R=0.118$ ;  $p=0.182$ ) (Figura 26) parecen no ejercer alguna diferencia entre los ensamblajes evaluados en este estudio.

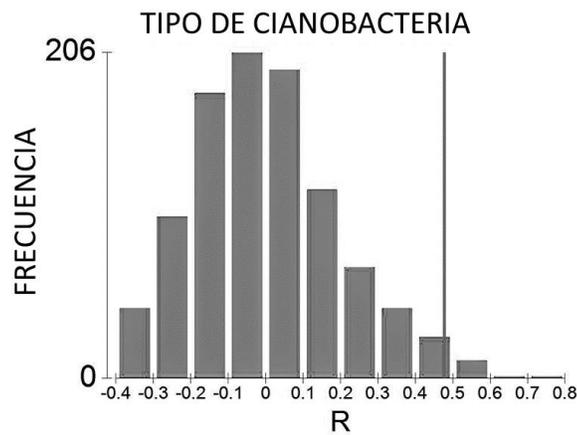


Figura 24. ANOSIM para la variable tipo de cianobacteria.

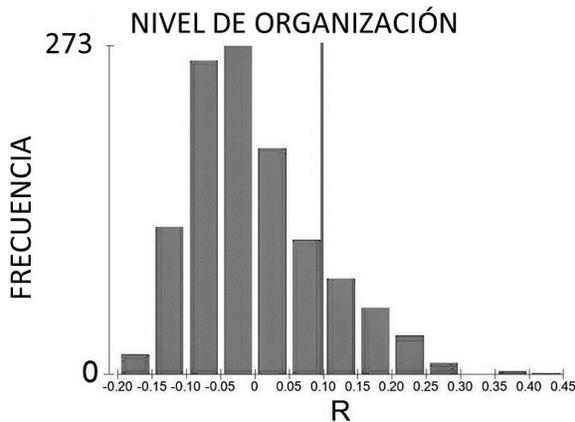


Figura 25. ANOSIM para la variable nivel de organización.

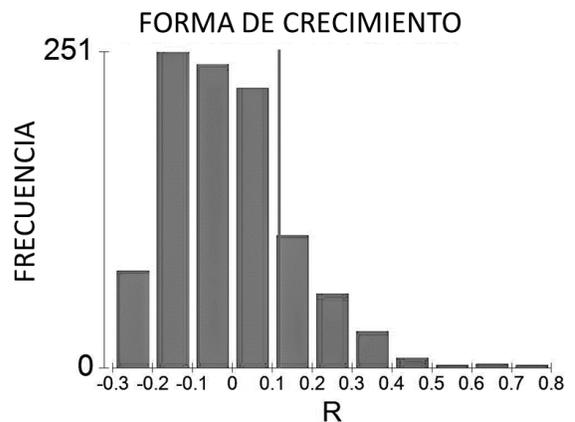


Figura 26. ANOSIM para la variable forma de crecimiento.

## SIMPER

Los resultados obtenidos a partir del análisis SIMPER indican que los ensambles de MIB asociados a las diferentes poblaciones de cianobacterias se componen principalmente y de manera general por los taxones *Cricotopus* sp.1, *Tanytarsini* sp., *Simulium* sp. (Diptera) y *Baetis* sp. (Ephemeroptera). La abundancia promedio y porcentaje de contribución de cada uno de los taxones es lo que permite reconocer qué tan consistente es la estructura de los ensambles asociados, así como aquellos taxones mayormente representativos bajo diferentes escenarios:

### a) Origen geológico de los sitios de estudio

Los géneros *Cricotopus* sp. 1 y *Baetis* sp. otorgan la identidad biológica a los ensambles de MIB asociados a las poblaciones de cianobacterias distribuidas en sitios de naturaleza silíceo ( *Nostoc* sp., *Compactonostoc* sp. *Placoma* sp. y *Wilmottia* sp.), siendo *Cricotopus* sp. 1 el género más abundante. De igual manera, en los ensambles asociados a las poblaciones de cianobacterias distribuidas en los sitios de naturaleza calcárea (*Nostoc* sp., Rivulariaceae, *Oxynema* sp. y *Ancylothrix* sp.), *Cricotopus* sp. 1 es el género dominante. De esta manera, es *Cricotopus* sp. 1 el que otorga el mayor porcentaje de contribución en la composición taxonómica de los ensambles asociados en ambas regiones (Figura 27, inciso a).

### b) Cobertura porcentual de los crecimientos de cianobacterias

El análisis consideró como cobertura *reducida* aquellas poblaciones con porcentajes menores al 50% y una cobertura *media* con porcentajes por encima del 50%. En este sentido, el análisis indica que en los ensambles asociados a las poblaciones de cianobacterias con coberturas reducidas (*Nostoc* sp., *Compactonostoc* sp., Rivulariaceae, *Placoma* sp. *Wilmottia* sp., *Oxynema* sp. y *Ancylothrix* sp.), *Cricotopus* sp. 1, *Tanytarsini* sp. y *Simulium* sp. son los taxones que se encuentran caracterizando los ensambles, siendo *Cricotopus* sp. 1 dominante y el que otorga el mayor porcentaje de contribución en la composición taxonómica. En los ensambles asociados a las poblaciones de cianobacterias que alcanzan coberturas medias (*Nostoc* sp. y *Placoma* sp.), *Cricotopus* sp. 1 otorga la

identidad biológica y el 100% de contribución en la composición taxonómica (Figura 27, inciso b).

c) *Forma de crecimiento de las cianobacterias*

*Cricotopus* sp. 1 y *Tanytarsini* sp. otorgan la identidad biológica de los ensamblajes asociados a las poblaciones de cianobacterias que forman crecimientos a partir de colonias mucilaginosas (*Nostoc* sp., *Comptonostoc* sp. y *Placoma* sp.), siendo *Cricotopus* sp. 1 el más abundante, al igual que en los ensamblajes asociados a las poblaciones formadoras de crecimientos con filamentos filiformes, en donde *Cricotopus* sp. 1 domina y otorga el 100% de contribución a la composición de los ensamblajes (Figura 27, inciso c).

d) *Nivel de organización celular de las cianobacterias*

Los ensamblajes asociados a las poblaciones con un nivel de organización colonial compacto (*Nostoc* sp. y *Comptonostoc* sp.) se encuentran dominados por los taxones *Cricotopus* sp. 1 y *Tanytarsini* sp., siendo el primero el más abundante. En los ensamblajes asociados a las poblaciones con un nivel de organización colonial hueco (*Placoma* sp.) *Cricotopus* sp. 1 es quien otorga la identidad biológica, al igual que en los ensamblajes asociados a las poblaciones de cianobacterias con un nivel de organización filamentososo (Rivulariaceae, *Wilmottia* sp., *Oxynema* sp. y *Ancylothrix* sp.) por lo tanto, *Cricotopus* sp. 1 es el género que otorga la mayor contribución taxonómica de los ensamblajes asociados a los tres niveles de organización celular (Figura 27, inciso d).

e) *Potencial toxicidad*

*Cricotopus* sp. 1, *Tanytarsini* sp. y *Baetis* sp. se encuentran dominando los ensamblajes de MIB asociados a las poblaciones de cianobacterias en las que no se reconoció un potencial de toxicidad (*Nostoc* sp., *Comptonostoc* sp., Rivulariaceae y *Ancylothrix* sp.). Sin embargo, tanto en las poblaciones de cianobacterias no tóxicas como en aquellas en las que sí se detectó una potencial toxicidad (*Placoma* sp., *Wilmottia* sp. y *Oxynema* sp.) *Cricotopus* sp.

1 es el taxón más abundante y el que otorga el mayor porcentaje de contribución en la composición de los ensamblajes (Figura 27, inciso e).

f) Tipo de cianobacteria

Al ser una prueba pareada, el análisis requiere de al menos dos muestras de un mismo grupo, por esta razón, únicamente se pudo comparar los ensamblajes asociados a las poblaciones de los géneros *Nostoc* sp. *Compactonostoc* sp. y *Placoma* sp., en donde fue posible contar con el registro de más de una población. El análisis no indicó similitudes entre los ensamblajes asociados a las poblaciones de *Compactonostoc* sp. En lo que respecta al resto de los ensamblajes, *Cricotopus* sp. 1 es el género que domina y otorga la identidad biológica tanto en asociación con *Nostoc* sp. como con *Placoma* sp. Sin embargo, es más abundante dentro de los ensamblajes asociados a *Placoma* sp. (Figura 27, inciso f).

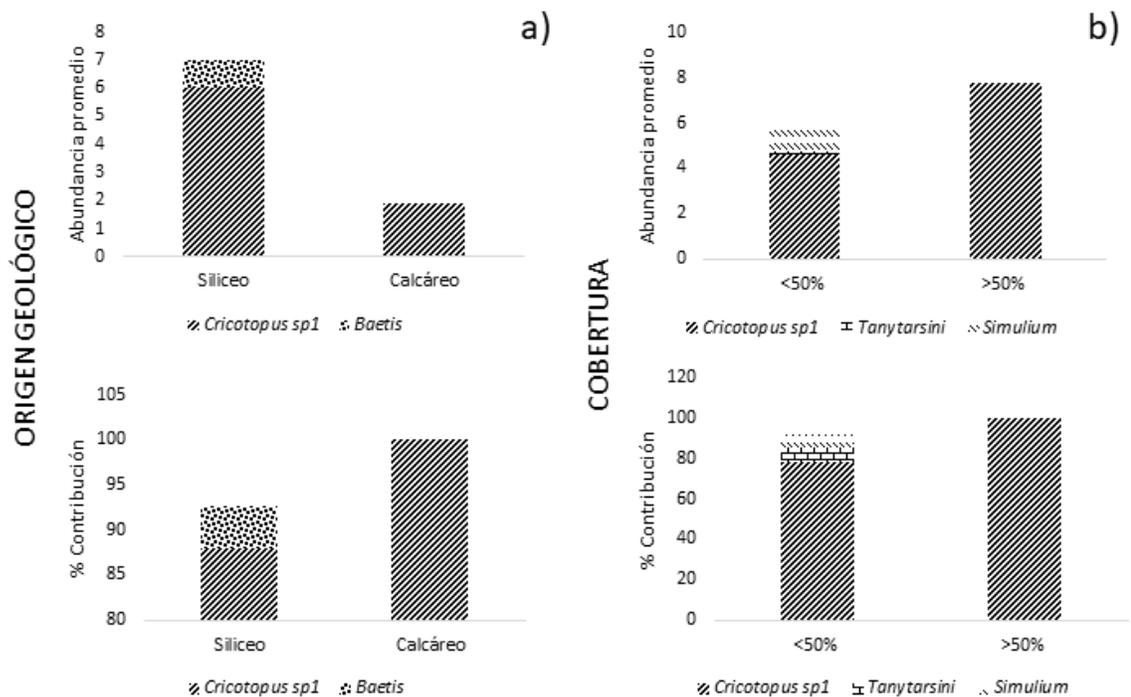


Figura 27. Análisis SIMPER para las variables origen geológico y cobertura. Los gráficos muestran el porcentaje de contribución individual, el porcentaje acumulado, y abundancia promedio de cada uno de los taxa por factor evaluado.

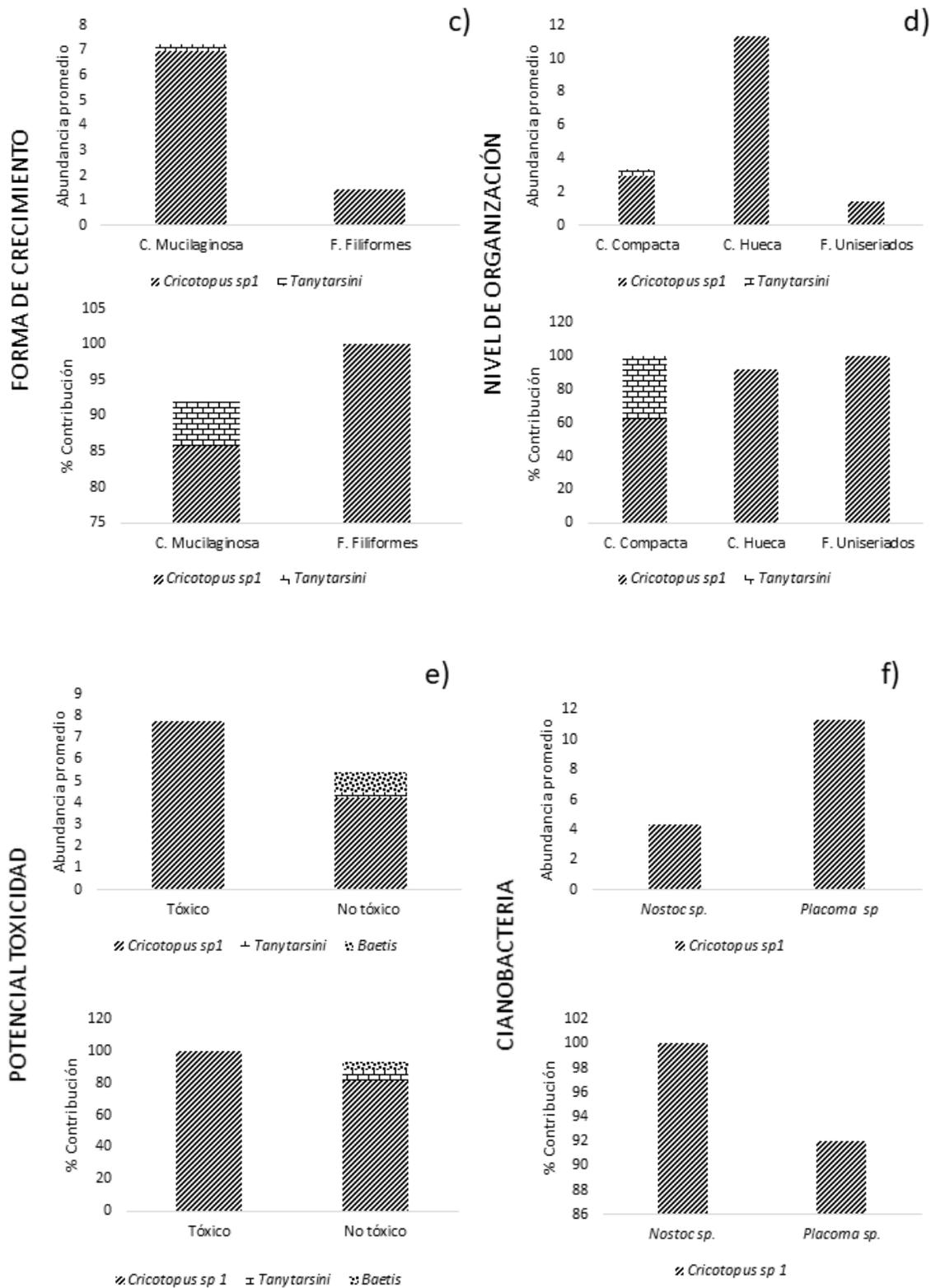


Figura 27. Análisis SIMPER para las variables forma de crecimiento, nivel de organización celular, potencial toxicidad y tipo de cianobacteria. Los gráficos muestran el porcentaje de contribución individual, el porcentaje acumulado, y abundancia promedio de cada uno de los taxa por factor evaluado.

A partir de las diferencias en la composición de los ensambles de MIB asociados es posible reconocer algunos taxones que se encuentran en mayor proporción que otros bajo diferentes escenarios, lo que permite establecer preferencias o afinidades dentro de las interacciones. Considerando las dos formas de crecimiento reconocidas en las poblaciones de cianobacterias, se distinguen 13 géneros de MIB afines a las poblaciones formadoras de colonias mucilaginosas (*Nostoc* sp., *Compactonostoc* sp. y *Placoma* sp.) en donde *Cricotopus* sp.2. y *Paracricotopus* sp. son mayormente abundantes. Otros 13 géneros con afinidad por las poblaciones formadoras de crecimientos filamentosos (Rivulariaceae, *Wilmottia* sp., *Oxynema* sp. y *Ancylothrix* sp.) en donde *Probezzia* sp., *Oliveridea* sp. y *Stilocladius* sp. son mayormente abundantes. Así mismo se reconocen cinco géneros asociados con ambas formas, y de los cuales *Baetis* sp., *Simulium* sp. y *Cricotopus* sp. 1 son mayormente abundantes. Finalmente, en términos de grupos funcionales alimenticios, el grupo de los recolectores resulta dominante bajo cualquiera de las formas de crecimiento evaluadas. (Figura 28).

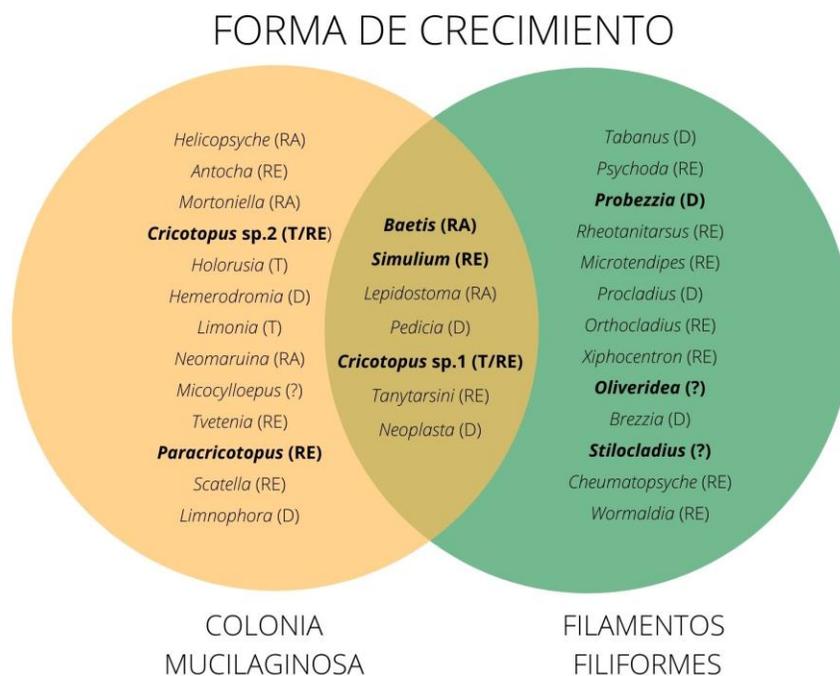


Figura 28. Géneros de MIB afines a las dos formas de crecimiento reconocidas en las poblaciones de cianobacterias. En negritas se muestran los géneros mayormente abundantes en cada escenario. Los códigos correspondientes a los GFA se muestran en las tablas 9 y 10.

Tomando en cuenta los diferentes niveles de organización reconocidos, es posible identificar 10 géneros afines a las poblaciones de cianobacterias con un nivel de organización colonial compacto (*Nostoc* sp. y *Compactonostoc* sp.), siendo *Cricotopus* sp. 2 dominante por sus mayores abundancias. Cuatro géneros afines a las poblaciones con un nivel de organización colonial hueco (*Placoma* sp.), en los cuales *Paracricotopus* sp. es mayormente abundante y 13 géneros afines a las poblaciones con un nivel de organización filamentoso, (Rivulariaceae, *Wilmottia* sp., *Oxynema* sp. y *Ancylothrix* sp.) en los cuales *Oliveridea* sp. y *Stilocladius* sp. son mayormente abundantes. En cualquiera de los niveles de organización evaluados, el grupo de los recolectores resulta dominante. Del mismo modo, se identificaron tres géneros que presentan afinidad tanto por las poblaciones de cianobacterias con un nivel de organización colonial hueco como por aquellas con un nivel de organización filamentoso, siendo *Neoplasta* sp. y *Pedicia* sp. los géneros mayormente abundantes, en este caso el grupo de los depredadores resulta dominante. Finalmente, se registraron tres géneros asociados a los tres niveles de organización celular: *Cricotopus* sp1., *Baetis* sp. y *Simulium* sp. (Figura 29).



Figura 29. Géneros de MIB afines a los tres niveles de organización celular reconocidas en las poblaciones de cianobacterias. En negritas se muestran los géneros mayormente abundantes en cada escenario. Los códigos correspondientes a los GFA se muestran en las tablas 9 y 10.

Por último, considerando el potencial tóxico de las cianobacterias, se reconocen 23 géneros afines a las poblaciones en las que no se reconoció toxicidad (*Nostoc* sp., *Compactonostoc* sp., Rivulariaceae y *Ancylothrix* sp.), en los cuales *Cricotopus* sp. 2, *Probezzia* sp. y *Stilocladius* sp. son los géneros mayormente abundantes. En las poblaciones en las que sí se detectó una potencial toxicidad (*Placoma* sp., *Wilmottia* sp. y *Oxynema* sp.), se registraron seis géneros con mayor afinidad, siendo *Paracricotopus* sp. y *Oliveridea* sp. los mayormente dominantes. Finalmente, se registraron seis géneros que parecen no reflejar afinidad por alguna de estas características, son indiferentes a cualquiera de estas dos condiciones, siendo *Cricotopus* sp.1, *Baetis* sp. y *Simulium* sp. los géneros mayormente abundantes. En términos alimenticios, bajo cualquier escenario, el grupo de los recolectores resultó dominante (Figura 30).

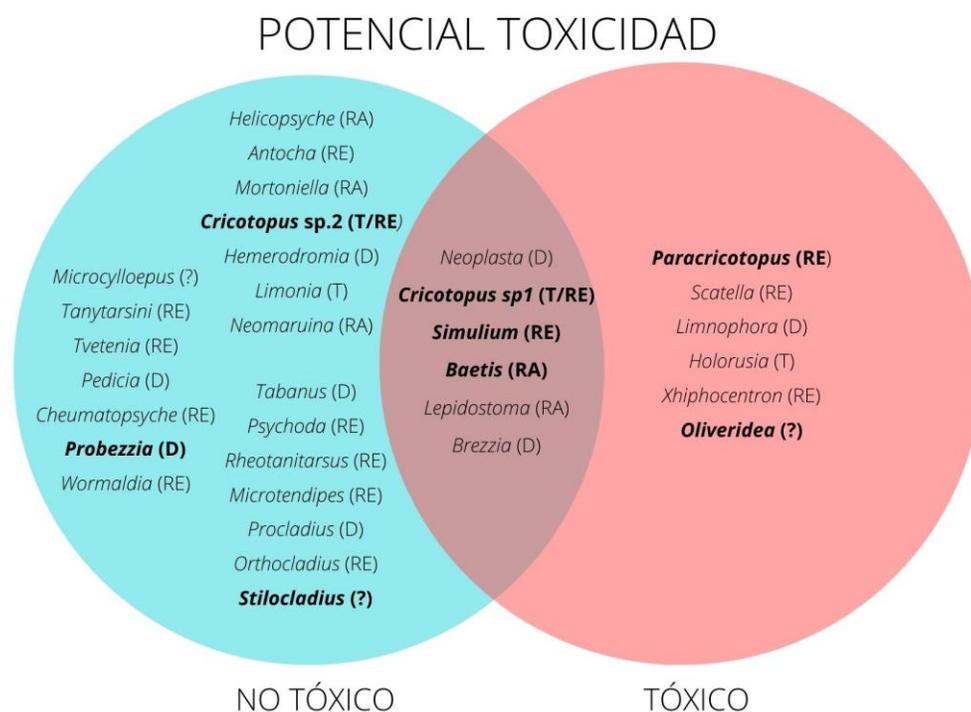


Figura 30. Géneros de MIB afines a las poblaciones de cianobacterias reconocidas como potencialmente tóxicas y no tóxicas. En negritas se muestran los géneros mayormente abundantes en cada escenario. Los códigos correspondientes a los GFA se muestran en las tablas 9 y 10.

ANÁLISIS DE CORRESPONDENCIA CANÓNICA (ACC)

El ACC realizado para reconocer las preferencias ambientales de las diferentes poblaciones de cianobacterias explicó el 69.15% de la varianza en sus dos primeros ejes; 36.15% en el primero y 33% en el segundo, con eigenvalores de 0.99 y 0.90 respectivamente. En el primer eje se ordenaron las poblaciones de cianobacterias y sitios correlacionados con las variables T, SDT, NO<sub>3</sub> y NH<sub>4</sub>. Mientras que en el segundo eje se ordenaron las poblaciones de cianobacterias y sitios correlacionados con las variables FRS y NO<sub>2</sub> (Tabla 12; Figura 31).

Tabla 12. Valores de correlación obtenidos a partir del Análisis de Correspondencia Canónica para el reconocimiento de preferencias ambientales por parte de las poblaciones de cianobacterias. El código de los sitios se corresponde a los presentados en la tabla 1.

Variable		Eje 1	Eje 2
Cianobacterias	<i>Nostoc</i> sp.	0.112279	<b>1.62465</b>
	<i>Compactonostoc</i> sp.	<b>-0.285096</b>	-0.264978
	<i>Placoma</i> sp.	-0.288319	<b>-0.699609</b>
	<i>Wilmottia</i> sp.	-0.293798	<b>-0.527385</b>
	<i>Oxynema</i> sp.	-0.63405	<b>-0.635524</b>
	Rivulariaceae	-0.63405	<b>-0.635524</b>
	<i>Ancylothrix</i> sp.	<b>4.69556</b>	-0.930939
Sitios de estudio	MA	0.112279	<b>1.62465</b>
	SD	-0.293798	<b>-0.527385</b>
	PI	0.112279	<b>1.62465</b>
	SM	-0.293798	<b>-0.527385</b>
	CSR	<b>-0.285096</b>	-0.264978
	AM	-0.288319	<b>-0.699609</b>
	AB	-0.288319	<b>-0.699609</b>
	ME	-0.63405	<b>-0.635524</b>
	TA	0.112279	<b>1.62465</b>
	EC	<b>4.69556</b>	-0.930939
Ambientales	FRS	0.28392	<b>-0.422517</b>
	(NH <sub>4</sub> )	<b>0.98017</b>	-0.263642
	(NO <sub>2</sub> )	-0.160042	<b>0.619028</b>
	(NO <sub>3</sub> )	<b>0.978826</b>	-0.27755
	T	<b>0.28499</b>	-0.209197
	SDT	<b>0.416366</b>	0.304092

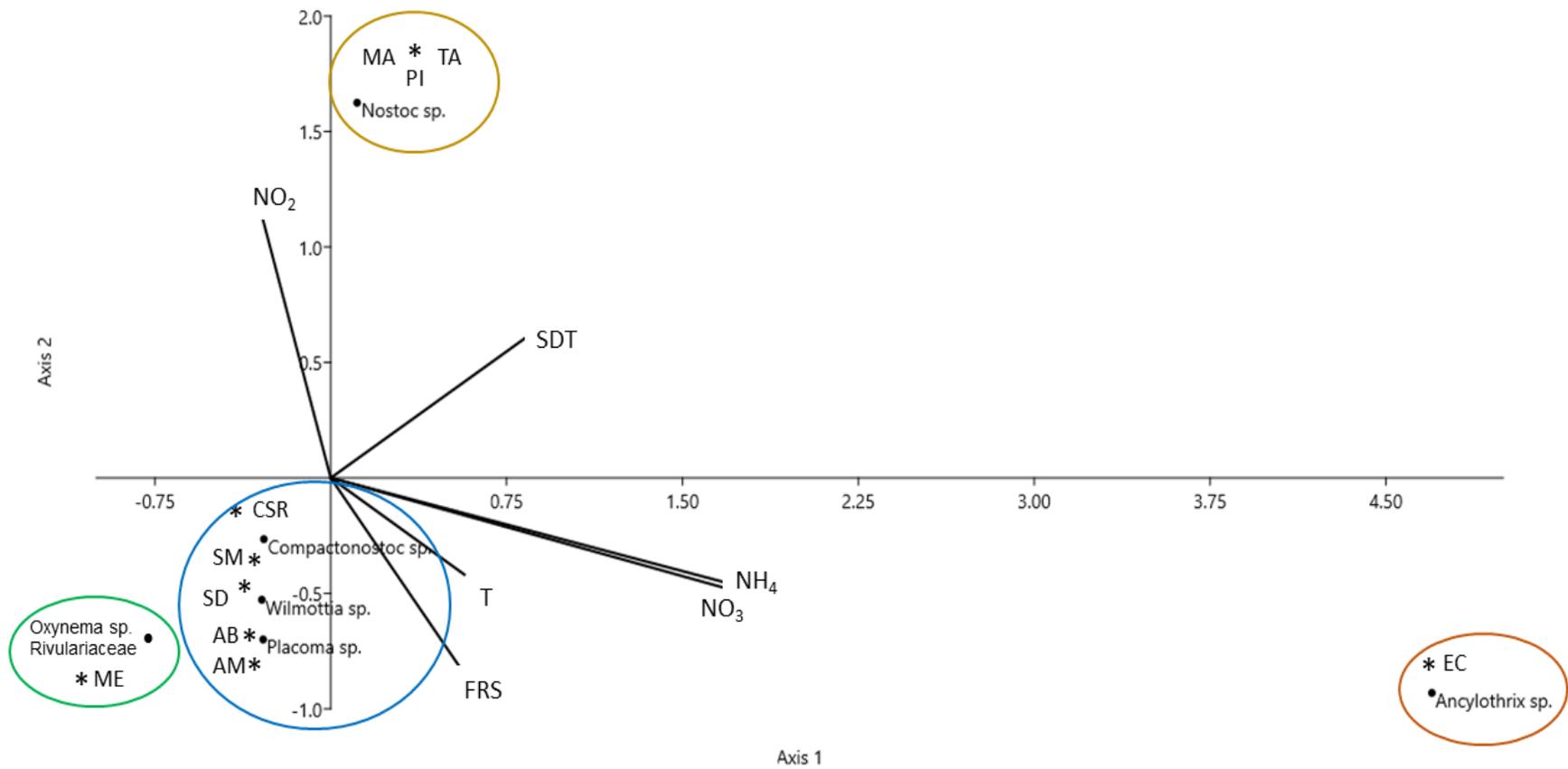


Figura 31. Análisis de Correspondencia Canónica para el reconocimiento de preferencias ambientales por parte de las poblaciones de cianobacterias. El código de los sitios se corresponde a los presentados en la tabla 1.

Por su parte, el ACC realizado para reconocer las preferencias de los diferentes géneros de MIB asociados sobre las diferentes poblaciones de cianobacterias explicó el 70.64% de la varianza en sus dos primeros ejes; 37.45% en el primero y 33.19% en el segundo, con eigenvalores de 0.80 y 0.71 respectivamente. En el primer eje se ordenaron los MIB asociados a las poblaciones de cianobacterias correlacionados con las variables ambientales de NH<sub>4</sub>, NO<sub>3</sub> y SDT. Mientras que en el segundo eje se ordenaron los MIB asociados a las poblaciones de cianobacterias correlacionados con las variables ambientales de T, FRS, y NO<sub>2</sub> (Tabla 13; Figura 32).

Tabla 13. Valores de correlación obtenidos a partir del Análisis de Correspondencia Canónica para el reconocimiento de preferencias ambientales por parte de los MIB asociados El código de los sitios se corresponde a los presentados en la tabla 1.

Variable		Eje 1	Eje 2
Macroinvertebrados Bentónicos Asociados	1: <i>Mycrocylloepus</i> sp.	-0.180134	<b>-0.689296</b>
	2: <i>Tanytarsini</i> sp.	0.180668	<b>-2.63985</b>
	3: <i>Tvetenia</i> sp.	-0.180134	<b>-0.689296</b>
	4: <i>Cricotopus</i> sp. 1	-0.202892	<b>-0.392438</b>
	5: <i>Cricotopus</i> sp. 2	-0.180134	<b>-0.689296</b>
	6: <i>Simulium</i> sp.	1.48245	<b>1.58662</b>
	7: <i>Baetis</i> sp.	<b>0.183114</b>	0.0686169
	8: <i>Helicopsyche</i> sp.	-0.180134	<b>-0.689296</b>
	9: <i>Antocha</i> sp.	-0.180134	<b>-0.689296</b>
	10: <i>Mortoniella</i> sp.	-0.180134	<b>-0.689296</b>
	11: <i>Pedicia</i> sp.	1.55194	<b>1.68232</b>
	12: <i>Lepidostoma</i> sp.	<b>0.136352</b>	0.0338626
	13: <i>Holorusia</i> sp.	-0.249717	<b>-0.415716</b>
	14: <i>Neoplasta</i> sp.	-0.187322	<b>-0.223825</b>
	15: <i>Aff. Scatella</i> sp.	-0.249717	<b>-0.415716</b>
	16: <i>Limnophora</i> sp.	-0.249717	<b>-0.415716</b>
	17: <i>Xiphocentron</i> sp.	0.124654	<b>0.735627</b>
	18: <i>Oliveridea</i> sp.	0.124654	<b>0.735627</b>
	19: <i>Hemerodromia</i> sp.	0.54147	<b>-4.59041</b>
	20: <i>Limonia</i> sp.	0.54147	<b>-4.59041</b>
	21: <i>Aff. Neomaruina</i> sp.	0.54147	<b>-4.59041</b>
	22: <i>Stratiomyidae</i> sp.	1.68063	<b>1.83218</b>
	23: <i>Brezzia</i> sp.	1.68063	<b>1.83218</b>
	24: <i>Probezzia</i> sp.	1.68063	<b>1.83218</b>
	25: <i>Cheumatopsyche</i> sp.	1.68063	<b>1.83218</b>

Tabla 13. Continuación.

Variable		Eje 1	Eje 2
Macroinvertebrados Bentónicos Asociados	26: <i>Wormaldia</i> sp.	1.68063	<b>1.83218</b>
	27: <i>Stilocladius</i> sp.	1.68063	<b>1.83218</b>
	28: <i>Tabanus</i> sp.	<b>-7.41631</b>	5.58132
	29: <i>Psychoda</i> sp.	<b>-7.41631</b>	5.58132
	30: <i>Rheotanytarsus</i> sp.	<b>-7.41631</b>	5.58132
	31: <i>Microtendipes</i> sp.	<b>-7.41631</b>	5.58132
	32: <i>Procladius</i> sp.	<b>-7.41631</b>	5.58132
	33: <i>Orthocladius</i> sp.	<b>-7.41631</b>	5.58132
Cianobacterias	<i>Nostoc</i> sp.	-0.165857	<b>-0.440037</b>
	<i>Placoma</i> sp.	-0.180326	<b>-0.362819</b>
	<i>Wilmottia</i> sp.	0.105746	<b>0.677478</b>
	<i>Compactonostoc</i> sp.	0.170915	<b>-2.51263</b>
	<i>Oxynema</i> sp.	1.50904	<b>1.63236</b>
	<i>Rivulariaceae</i> sp.	1.30848	<b>1.38947</b>
	<i>Ancylothrix</i> sp.	<b>-6.21407</b>	4.58569
Ambientales	T	-0.14393	<b>0.666081</b>
	FSR	-0.182789	<b>-0.411448</b>
	NH4	<b>-0.982963</b>	0.717317
	NO3	<b>-0.96704</b>	0.778358
	NO2	0.264238	<b>-0.446123</b>
	SDT	<b>-0.768642</b>	0.676536

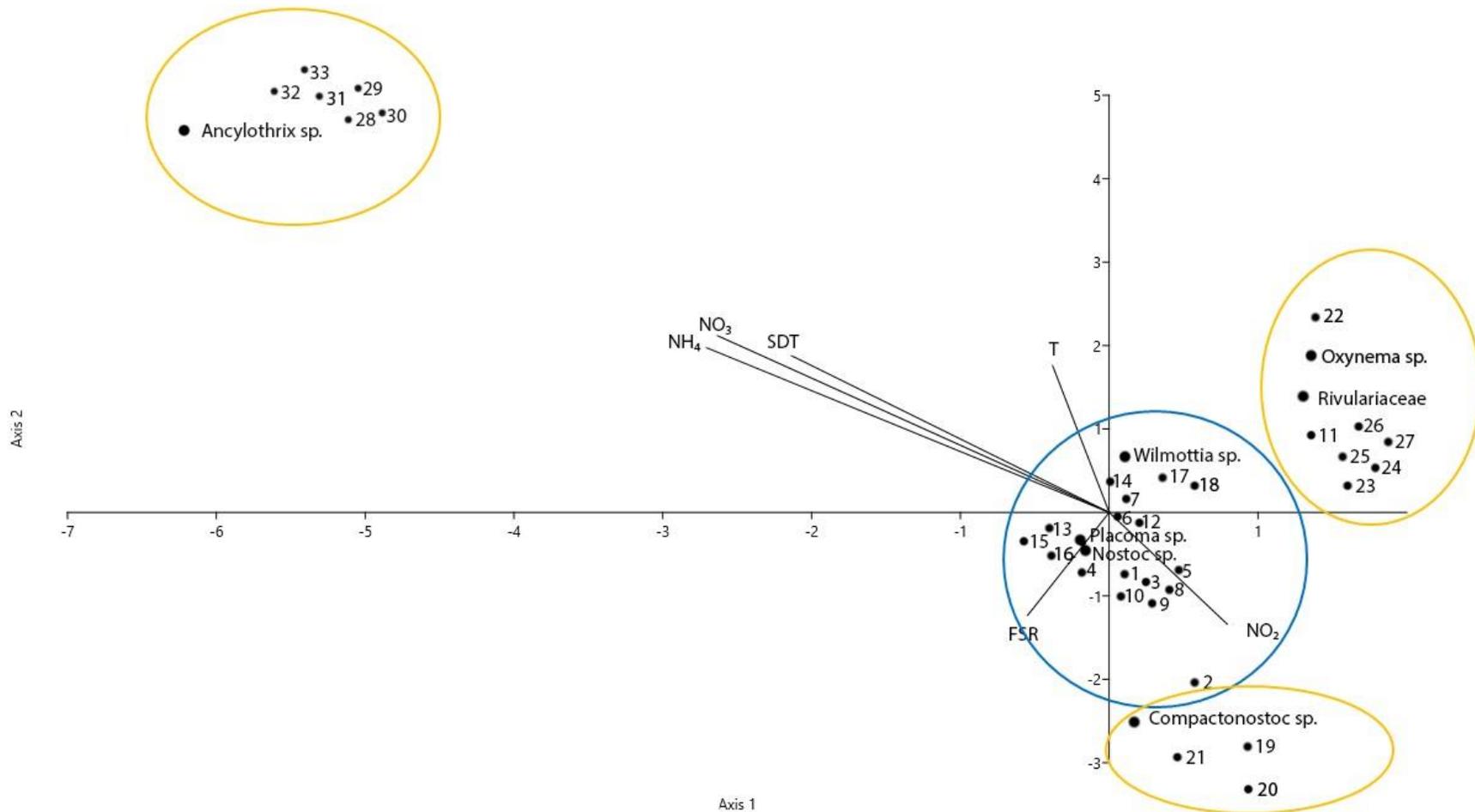


Figura 32. Análisis de Correspondencia Canónica para el reconocimiento de preferencias ambientales por parte de los MIB asociados. El código de los sitios se corresponde a los presentados en la tabla 1.

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1 Caracterización ambiental de los ríos

Considerando la posición geográfica de México, particularmente de las cuencas estudiadas, todos los ríos presentes en este trabajo corresponden a la clasificación de ríos tropicales de montaña, mismos que se definen como sistemas lóticos situados en la intersección de latitudes tropicales y gradientes de elevación, que dan como resultado patrones específicos de factores ambientales que determinan su biodiversidad y una provisión característica de servicios ecosistémicos (Encalada *et al.*, 2019).

A excepción de un sitio, todos los valores de concentración de nutrientes reflejan aguas de condiciones oligotróficas, algo característico de los ambientes epicontinentales de montaña (Wetzel, 2001; Dudgeon, 2008). Sin embargo, la naturaleza geológica de las cuencas en ocasiones puede generar una variación en la disponibilidad de nutrientes, debido al desgaste natural de las rocas. No obstante, y considerando la frecuente intervención humana en los sistemas acuáticos, el cambio en el estado trófico de los ecosistemas puede atribuirse a su cercanía con zonas de agricultura y turismo, favoreciendo el incremento de diferentes nutrientes debido al aporte por medio de descargas domésticas y el uso de fertilizantes (Colbert y Allan, 2001; Encalada *et al.*, 2019). Tal es caso del sitio Carrizal, en donde se registraron los mayores valores de  $\text{NH}_4$  y  $\text{NO}_3$  y por lo cual se reconoce como el único sitio con aguas eutróficas dentro de este trabajo.

Por lo tanto y de acuerdo con los resultados obtenidos a partir de la evaluación de parámetros físico-químicos es posible reconocer dos tipos de ríos tropicales de montaña dentro de los ríos de estudio, cuyas diferencias se atribuyen por un lado al origen geológico de la cuenca que define parámetros como el pH, cantidad de sólidos disueltos totales y disponibilidad de nutrientes, y por otro a la altitud de los sitios, misma que define parámetros como temperatura y oxígeno disuelto.

En primer lugar, se encuentran los *ríos tropicales de montaña fríos*, de aguas oligotróficas con temperaturas frías-templadas y mayormente oxigenadas, correspondientes a los ríos de la cuenca de México y del río Balsas. Estos ríos se localizan a una altitud de entre 2775 y 3920 msnm, presentando pendientes más inclinadas que favorecen la turbulencia de las aguas y una mayor oxigenación. La relación inversa que existe entre temperatura y altitud explica los valores bajos de temperatura característicos de estos ríos (Colbert y Allan, 2001).

En segundo lugar, se encuentran los *ríos tropicales de montaña cálidos*, de aguas mayoritariamente oligotróficas y temperaturas templadas-cálidas, correspondientes a los sitios de la cuenca del río Pánuco y del río Usumacinta. Estos ríos se localizan a una altitud de entre 318 y 1480 msnm, lo que explica el incremento en los valores de temperatura. La naturaleza calcárea de las cuencas, así como la ubicación en la parte media-baja de los ríos estudiados explican las altas concentraciones de SDT debido al arrastre de materiales proveniente de aguas arriba, reflejado en los valores de conductividad específica (Hauer y Lamberti, 2011; Gómez-Márquez *et al.*, 2014).

De acuerdo con esto, es posible reconocer que la altitud es el principal factor de cambio que propicia una diversidad de valores dentro de los parámetros ambientales que caracterizan los ríos de montaña en México, determinando así el gradiente tropical de los mismos, algo característico de un país situado en latitudes tropicales, cuyo clima se encuentra atemperado por el gradiente altitudinal (Krasilnikov *et al.*, 2011).

## *8.2 Caracterización taxonómica y morfo-funcional de los grupos biológicos*

### *8.2.1 Cianobacterias bentónicas*

La caracterización taxonómica de las cianobacterias involucradas en este trabajo comprendió diferentes niveles de análisis y tipo de información que demuestran la importancia de considerar un enfoque polifásico en la determinación de identidades taxonómicas. Inicialmente se colectaron aquellas poblaciones con crecimientos macroscópicos de colonias y filamentos, debido a que eran las morfologías mayormente reportadas dentro de las interacciones. A partir de la identificación fenética fue posible la

distinción de cuatro géneros y cinco especies diferentes, siendo evidencia de que un mismo morfotipo puede asociarse a diferentes cianobacterias, y por lo cual resultó necesario complementar la identificación taxonómica con otros análisis y caracteres.

Debido a esto, uno de los objetivos de este trabajo fue identificar taxonómicamente las poblaciones de cianobacterias mediante el análisis de secuencias del gen 16S. El primer análisis derivado de la obtención de estas secuencias fue el análisis BLAST con el que se logró reconocer de manera preliminar siete géneros y cinco especies diferentes de cianobacterias. Las poblaciones asociadas originalmente al género *Placoma* sp. efectivamente corresponden a un mismo género, probablemente una misma especie, aquellas asociadas a *Nostoc* sp. corresponden a dos géneros distintos, mientras que aquellas asociadas al género *Phormidium* sp. corresponden en realidad a cuatro géneros, indicando que la diversidad de cianobacterias involucradas en este trabajo era mayor a lo esperado, algunas secuencias reportaron porcentajes de similitud muy por debajo de lo requerido para ser considerado el mismo género con la información disponible en la base de datos molecular. Debido a lo anterior, se procedió a la construcción de filogenias con la intención de aclarar la identidad taxonómica de estas poblaciones y rectificar los hallazgos obtenidos mediante el análisis BLAST para el resto, ya que a menudo, problemas como identificaciones erróneas o la existencia de secuencias muy cortas en la base datos, arrojan consensos poco fiables entre las secuencias disponibles en el genbank y las secuencias de estudio.

Los análisis filogenéticos permitieron reconocer que las poblaciones de cianobacterias colectadas corresponden en realidad a siete taxones diferentes, denotando así la existencia de una diversidad todavía mayor a la estimada por el análisis BLAST. De acuerdo con estos análisis, de las poblaciones asociadas originalmente al género *Nostoc* sp. únicamente las poblaciones de los sitios Monte Alegre (MA), Presa Iturbide (PI) y Tambaque (TA) corresponden a este género, ya que las poblaciones de San Miguel (SM) y Canal San Rafael (CSR) corresponden al género *Compactonostoc* sp., un género recientemente descrito y que a pesar de presentar similitudes morfológicas a nivel macroscópico con *Nostoc* sp. es

posible reconocer que a nivel microscópico, los filamentos de *Compactonostoc* sp. no forman las típicas colonias esféricas de *Nostoc* sp., además de que se demostró que es suficientemente distinto en términos genéticos, como para ser considerado un género diferente de *Nostoc* sp. (Cai *et al.*, 2019) (Figuras 3 y 6).

En lo que respecta a la determinación de especies correspondientes al género *Nostoc* sp., la construcción de filogenias no resulta suficiente para poder definir las, sin embargo, a partir de la información obtenida, se puede suponer que, las poblaciones de MA y PI son la misma especie, presentando una distribución afín a las condiciones de los ríos de la Cuenca de México, mientras que la población de TA corresponde a una especie diferente con distribución en la Cuenca del río Pánuco. Por su parte, las poblaciones de *Compactonostoc* sp. podrían pertenecer a una misma especie, ya que ambas se encontraron en sitios de la Cuenca de México. Estas secuencias mostraron una importante afinidad con las secuencias de *Nostoc verrucosum* por lo que es probable que sea necesario realizar una reasignación de nombre, en la que se sugiere realizar un cambio de género, pues de acuerdo con la información obtenida, estas poblaciones morfológicamente se corresponden con la especie *N. verrucosum*, pero genéticamente se corresponden con el género *Compactonostoc* sp. del cual sólo se tiene una especie descrita para China, considerando esto y a partir del valor obtenido de bootstrap se puede suponer que las poblaciones mexicanas correspondan a una especie nueva de este género (Figura 3).

Por su parte, el análisis filogenético de las secuencias obtenidas para las poblaciones de *Placoma* sp., un género que lamentablemente no cuenta con mucha información genética disponible en la base de datos indicó que sí corresponde con este género. Adicionalmente, la agrupación de todas las secuencias en la filogenia sugiere que se trata de la misma especie (Figura 4), cuyas características coinciden con la diagnosis de *Placoma regurale* (Broady y Ingerfeld, 1991), por lo que las poblaciones de estudio pueden considerarse como afín a esta especie, sin dejar de lado la posibilidad de que puede tratarse de una especie diferente, cuya distribución parece restringirse a las cuencas de naturaleza silíceas en México, por lo

que futuras investigaciones deberían profundizar en la determinación de un nivel específico para estas poblaciones (Figuras 4 y 7).

Finalmente, para las poblaciones reconocidas inicialmente como el género *Phormidium* sp., los análisis indicaron que únicamente las poblaciones de Segundo Dinamo y San Miguel pertenecen al género *Wilmottia* sp. mismo que se reconoce como un género distinto y el cual fue separado del género *Phormidium* sp. hace algunos años (Strunecky *et al.*, 2011). Mientras que el resto de las poblaciones corresponde a taxones completamente distintos. Considerando los morfotipos, se tenían dos poblaciones para el sitio Meco, una que bajo el análisis fenético se reconoció como *Blennothrix ganeshi*, mientras que el análisis BLAST indicó una similitud con los géneros *Chroococcus* sp. (94.55%), *Hassallia* sp. (94.41%) y *Tolypothrix* sp. (94.21%) y por lo cual fue incorporada al análisis filogenético del grupo de las Nostocales, a partir de donde se pudo reconocer que esta población corresponde a un potencial género nuevo de la familia Rivulariaceae, debido a que la secuencia obtenida no se asocia con ninguna de las disponibles para esta familia, sin embargo, se agrupa dentro del mismo clado (Figura 3).

En lo que respecta a la otra población de Meco, el análisis indicó que se trata del género *Oxynema* sp., un género descrito en el 2012 y cuyos representantes se encuentran reportados para ambientes halófitos (Chatchawan *et al.*, 2012), considerando esto, así como el valor obtenido de bootstrap (Figura 5), es probable que se trate de un género distinto, por lo que en este trabajo se considera como afín a *Oxynema* sp., destacando la importancia de seguir trabajando con secuencias de esta población, sobre todo porque presenta un potencial de producción de toxinas. El análisis filogenético señaló al género *Ancylothrix* sp., para el sitio El Carrizal, género propuesto en el 2016 y que actualmente cuenta con dos especies descritas, de las cuales una se encuentra reportada para ambientes bentónicos en ríos, dejando la posibilidad de tratarse de una misma especie o incluso una especie nueva (Martins *et al.*, 2016), convirtiéndose en los primeros registros de estos géneros para México, cuya distribución parece restringirse a cuencas de naturaleza calcárea.

A pesar de no poder obtener una resolución taxonómica concluyente a nivel de especie, y para lo cual resulta necesario seguir analizando secuencias genéticas de las poblaciones estudiadas, la construcción de árboles filogenéticos permitió obtener un escenario más definido dentro del mundo de las interacciones entre cianobacterias bentónicas y MIB. Así mismo, se reconoció en al menos una parte de las asociaciones, niveles de interacción mayormente específicos, lo que resulta interesante pues indica que una mayor diversidad de cianobacterias establece asociaciones con los MIB. Estos hallazgos tienen implicaciones directas a nivel de conservación de especies, ya que en muchos casos tanto las poblaciones de cianobacterias como los taxones de MIB resultan en una distribución restringida. Así mismo, estos resultados resaltan la necesidad de involucrar un conjunto de enfoques taxonómicos como el fenético, molecular y ecológico para determinar la identidad de las poblaciones de cianobacterias en los ambientes lóticos mexicanos.

### 8.2.2 *Macroinvertebrados bentónicos*

La composición taxonómica de MIB asociados a los crecimientos de cianobacterias indica una prevalencia de dípteros dentro de los ensamblajes, estos resultados son consistentes con lo reportado en algunas investigaciones previas para México (Caro-Borrero y Carmona-Jiménez, 2018; Márquez-Santamaria, 2019). La dominancia de este grupo, en particular de la familia Chironomidae, ha sido ampliamente señalada para los ecosistemas acuáticos epicontinentales en diferentes partes del mundo, asociada al amplio intervalo de tolerancia ambiental que presentan estos organismos, mismo que les ha permitido colonizar diferentes ambientes (McLachlan y Ladle, 2009; Thorp y Covich, 2010), razón por la cual este grupo conforma más del 90% dentro de los ensamblajes de MIB asociados en los dos tipos de ríos tropicales de montaña reconocidos en este trabajo.

La prevalencia de dípteros sobre los coleópteros o los tricópteros en un sustrato tan característico como las poblaciones de cianobacterias bentónicas indica una especialización por este sustrato (Márquez-Santamaria, 2019). La riqueza biológica y abundancia de organismos asociados a las diferentes poblaciones de cianobacterias son parámetros esenciales que reflejan esta preferencia de sustrato. La riqueza tiende a disminuir mientras

que la abundancia tiende a aumentar cuando los organismos explotan un recurso más que otro, señalando la especialización por ese recurso (Thorp y Covich, 2010).

Bajo este escenario, es posible reconocer que, dentro de los MIB asociados a las cianobacterias estudiadas en este trabajo, existe una preferencia y/o especialización por las poblaciones de los géneros *Nostoc sp.* y *Placoma sp.*, siendo estas cianobacterias las que en términos generales registraron una riqueza biológica baja y mayores abundancias de organismos asociados. Estos resultados ya habían sido observados por Márquez-Santamaria (2019), lo que confirma la hipótesis de que dentro de los sitios de estudio existe una preferencia de asociación entre MIB y poblaciones de cianobacterias de los géneros *Nostoc sp.* y *Placoma sp.* Estos géneros son morfológica y ecológicamente similares, lo que señala la existencia de requerimientos ecológicos por parte de los MIB, particularmente de dípteros pertenecientes a la familia Chironomidae, que se logran satisfacer estableciendo una asociación con las poblaciones de estos géneros de cianobacterias (Caro-Borrero y Carmona Jiménez, 2018; Márquez-Santamaria (2019).

La composición de grupos funcionales alimenticios indica una dominancia de organismos recolectores, lo que refleja la obtención de alimento circulante en la corriente o depositado sobre los sedimentos o sustratos, incluidos los tapetes de algas bentónicas (Merritt y Cummins, 2008; McLachlan y Ladle, 2009). De manera particular, los organismos de la familia Chironomidae cuentan con una variedad muy elaborada de adaptaciones morfológicas en los aparatos bucales que les permiten alimentarse de esta manera. Los resultados obtenidos favorecen la idea de que las asociaciones entre estos organismos se establecen mayormente en términos de la obtención de alimento indirecto, aprovechando los crecimientos de cianobacterias como medios de depósito, coincidiendo con lo descrito por do Nascimento Filho *et al.*, (2019). Lo que constituye un paso más en la definición del costo-beneficio y tipo de interacción biótica que establecen ambos grupos biológicos.

La resolución taxonómica en investigaciones que consideran asociaciones bióticas resulta importante para poder determinar afinidades y preferencias ambientales que reflejen el

establecimiento de dichas asociaciones especializadas o generalistas. La composición taxonómica a nivel de familia en este trabajo refleja afinidades geográficas por parte de los organismos hacia las regiones neártica y neotropical. Sin embargo, la resolución a nivel de género refleja preferencias a escala local sobre las poblaciones de cianobacterias, por lo que resulta importante seguir afinando el nivel taxonómico de los organismos para poder determinar formalmente el tipo de interacción entre ambos grupos biológicos.

### *8.3 Reconocimiento de la potencial toxicidad de las poblaciones de cianobacterias*

De acuerdo con las últimas revisiones (Quiblier *et al.*, 2013; Wood *et al.*, 2020), se reportan al menos 24 géneros de cianobacterias bentónicas productoras de toxinas en ríos a nivel mundial. La presente investigación representa el primer registro formal de potencial producción de cianotoxinas para los géneros *Placoma* sp., *Wilmottia* sp. y *Oxynema* sp., y uno de los primeros registros de potencial producción de cianotoxinas por parte de poblaciones bentónicas de ríos para México. Particularmente para la producción de anatoxinas, cuyo gen se identificó en todas las poblaciones reconocidas como potencialmente tóxicas.

Existen trabajos que señalan la producción de más de una toxina al mismo tiempo por parte de algunas especies de cianobacterias (Park *et al.*, 1993; Buratti *et al.*, 2017; Cantoral-Uriza *et al.*, 2017). Bajo este esquema, se pudo reconocer que el género *Placoma* sp. es potencial productor tanto de anatoxinas como de microcistinas. Caso contrario ocurrió con las poblaciones del género *Nostoc* sp., en donde no se reconoció ningún potencial de producción de toxinas, aun cuando este género ha sido reportado como tóxico en diferentes países y diferentes ambientes (Mohamed *et al.*, 2006; Oudra *et al.*, 2009 y Kurmayer, 2011).

A pesar de no reconocer un patrón en los parámetros físico-químicos que denotara un escenario ambiental particular bajo el cual se presenta esta potencial producción de toxinas, todas las poblaciones reconocidas como potencialmente tóxicas fueron halladas en sitios de aguas oligotróficas con temperaturas frías y templadas. Tradicionalmente la producción de cianotoxinas se ha asociado a poblaciones de cianobacterias presentes en

aguas eutróficas cálidas; sin embargo, existen algunos estudios que han demostrado que a pesar de tener mayor correlación con eventos de eutrofización, la producción de cianotoxinas puede hacerse presente bajo un gradiente trófico que involucra ambientes en donde los nutrientes son limitantes (Loftin *et al.*, 2016; Graham *et al.*, 2020). Lo anterior, podría explicar el hecho de que todas las poblaciones catalogadas como potencialmente tóxicas en este trabajo se encontraran asociadas con aguas oligotróficas, apoyando la hipótesis de que la producción de cianotoxinas es una característica intrínseca de las cianobacterias, por lo tanto, puede hacerse presente bajo un gradiente ambiental muy amplio y por lo cual sigue siendo necesario explorar el macro y microambiente de las cianobacterias potencialmente tóxicas y las interacciones que se establecen con ellas, ya que la presencia de organismos asociados podría ser un factor que desencadene la producción activa de estos metabolitos (Cantoral-Uriza *et al.*, 2017; Wood *et al.*, 2020).

La detección de los genes involucrados en la producción de cianotoxinas mediante técnicas moleculares como la PCR es tan sólo un indicador de un potencial de producción, es decir que las poblaciones en las que se logró identificar la presencia de los genes *anaF* y *mycE* tienen la capacidad de producir alguna de estas toxinas. Sin embargo, se requiere de otras técnicas para reconocer la producción activa de estos compuestos, así como su cuantificación, lo que permitiría conocer qué tan tóxicas son estas poblaciones. Este trabajo consideró las cianotoxinas mayormente reportadas en la literatura, no obstante, no se descarta la posibilidad de que las poblaciones estudiadas en este trabajo sean potenciales productoras o incluso productoras activas de otro tipo de toxinas, tomando en cuenta que según los análisis filogenéticos incluso se podrían reportar géneros y especies nuevas, sin dejar de lado que todas las toxinas tienen una serie de variantes cuya identificación resulta compleja y específica, por lo que sigue siendo necesario explorar la toxicidad en estas poblaciones.

#### 8.4 Factores ecológicos y morfo-funcionales que regulan el establecimiento de las interacciones bióticas

De acuerdo con el ACC (Figura 31) y a partir de la distinción de dos tipos de ríos tropicales de montaña, es posible reconocer que, las cianobacterias estudiadas presentan diferentes afinidades ambientales. Por un lado, se encuentran aquellos géneros afines a ríos de aguas oligotróficas frías como *Compactonostoc* sp., *Placoma* sp. y *Wilmottia* sp., y por otro se encuentran los taxones afines a ríos de aguas oligotróficas cálidas como *Oxynema* sp. y Rivulareaceae, así mismo se reconoce que el género *Ancylothrix* sp. es afín a ríos de aguas eutróficas cálidas, mientras que *Nostoc* sp. presenta un intervalo de tolerancia ambiental que le permite distribuirse en ríos de aguas oligotróficas tanto frías como cálidas. El reconocimiento de estas preferencias ambientales es indispensable para la caracterización de las asociaciones entre ambos grupos biológicos, ya que las condiciones ambientales que determinan el establecimiento de las cianobacterias determinan indirectamente el de los MIB. Dentro de la presente investigación, la temperatura y la disponibilidad de nutrientes son los factores que marcan las afinidades ambientales de las cianobacterias, mismos que se encuentran definidos por factores regionales como el clima y el origen geológico de la cuenca, sin embargo, no hay que dejar de lado que dentro de cada río serán factores locales como la radiación y velocidad de corriente aquellos que regulen el establecimiento y proliferación de las cianobacterias (Sheath y Cole, 1992; Whitton, 2012).

En lo que respecta a la caracterización microambiental de las poblaciones de cianobacterias, los MIB se encuentran estableciendo asociaciones bajo condiciones de profundidades someras y velocidades de corriente moderadas, apoyando la hipótesis de que las cianobacterias son refugios potenciales para los MIB, en donde previenen el arrastre ocasionado por la corriente, y con las cuales establecen asociaciones recurrentes como resultado de una adaptación a las aguas corrientes, ya que las cianobacterias también se establecen en lugares donde la corriente no represente un riesgo de arrastre para toda su población (Mauad y Donato, 2016). Del mismo modo, al encontrarse en profundidades someras, se supone que la mayoría de los MIB pueden aprovechar los crecimientos como

sustrato donde ovopositar, otorgándole a las cianobacterias un papel indispensable dentro del ciclo de vida de los MIB (Pillot, 2014).

De acuerdo con los análisis realizados, el género *Cricotopus* sp. (Fam. Chironomidae), define la identidad biológica en las asociaciones bajo cualquier escenario, es el género más representativo dentro de las interacciones. Se encuentra asociado a diferentes poblaciones de cianobacterias distribuidas tanto en ríos de montaña tropicales fríos como ríos de montaña tropicales cálidos. Así mismo, se encuentra asociado a poblaciones potencialmente tóxicas y no tóxicas, además se asocia tanto a poblaciones filamentosas como coloniales, por lo que se reconoce como un género que establece asociaciones generalistas con las poblaciones de cianobacterias bentónicas en los ríos tropicales de montaña mexicanos.

El reconocimiento de preferencias dentro de las interacciones indica que el género *Cricotopus* sp. prefiere las cianobacterias coloniales sobre las filamentosas, y dentro de las coloniales prefiere aquellas que crecen formando colonias huecas como las de *Placoma* sp. (Figura 7), esto se puede observar de una manera muy clara en el sitio de San Miguel, donde a pesar de que se distribuyen los géneros *Compactonostoc* sp., *Placoma* sp. y *Wilmottia* sp., *Cricotopus* sp. se encuentra mayormente asociado a las poblaciones de *Placoma* sp. Esta preferencia se da aun cuando *Placoma* sp. se encuentra con el mismo porcentaje de cobertura que cualquier otra cianobacteria y aun cuando ésta resulta ser potencialmente tóxica, lo que demuestra que la abundancia de las cianobacterias y la potencial producción de toxinas no son factores que limitan el establecimiento de las interacciones, sin embargo, parecen regular la abundancia y diversidad de organismos asociados, razón por la que el análisis SIMPER indica diferencias estadísticamente significativas únicamente a partir de factores como el tipo de cianobacteria, su nivel de organización celular y su forma de crecimiento.

Los crecimientos mucilaginosos coloniales que presentan algunas cianobacterias pueden ofrecer mayor estabilidad ante las condiciones como el flujo que resultan estresantes para múltiples organismos en los ríos. A pesar de que las formas filamentosas se acoplan a los

flujos y reducen el riesgo de ser arrastradas por las corrientes, la secreción de mucilago extracelular resulta en un potencializador que permite mayor adherencia al sustrato, maximizando la eficiencia de las cianobacterias coloniales como refugio (Dudley *et al.*, 1986; Liston y Tlexler, 2005). Considerando que los MIB que se asocian a estas formas se desarrollan dentro de las colonias y no sobre los crecimientos como en el caso de las poblaciones filamentosas, es probable que sea mayormente conveniente asociarse a una colonia.

En este sentido, las interacciones serán diferentes en función de la morfología de la cianobacteria a la que se asocien los MIB, los crecimientos macroscópicos formados por la agregación de filamentos tienen la capacidad de albergar más de un organismo, ya que aparentemente los MIB únicamente se posan sobre los crecimientos. Por otra parte, en los crecimientos formados a partir de colonias existe una relación uno a uno en la que una larva ocupa una sola colonia, se alimenta de ella y vive en ella hasta su eclosión como organismo adulto, lo que supone que este es uno de los factores que puede determinar el grado de competencia intraespecífica en la búsqueda y colonización de sustrato, y por lo tanto en el establecimiento de las interacciones (Brock, 1960; Ward y Cummins, 1985; Dodds, 1989).

A pesar de que la potencial toxicidad no pareciera ser un determinante en el establecimiento de las interacciones, es posible observar que *Cricotopus* sp. aporta el 100% de identidad biológica dentro de los ensambles asociados a aquellas poblaciones potencialmente tóxicas. A partir de esto se despliegan una serie de hipótesis: por un lado, tomando en cuenta que *Cricotopus* sp. es un organismo recolector, se puede suponer una asociación en la que la cianobacteria ofrece refugio y un medio de depósito para la obtención indirecta de alimento. De acuerdo con algunos autores (Tillmanns *et al.*, 2008; Groendahl y Fink, 2017; do Nascimento Filho *et al.*, 2019), la mayoría de las cianobacterias tienen un bajo nivel nutricional, aunado a su compleja morfología y la producción de múltiples metabolitos secundarios, las convierte en poco palatables para múltiples organismos, disminuyendo la herbívora sobre sus poblaciones. Por lo tanto, resulta natural asociar que el establecimiento de las interacciones no se da principalmente con fines de

obtención de alimento directo. Esto no significa que los MIB no se encuentren alimentándose directamente de cianobacterias, es un escenario posible, sin embargo, es probable que pocos organismos lo hagan, por lo cual se puede suponer que las cianobacterias son más eficientes como medios de depósito de materia orgánica que como alimento mismo (Marten, 2007; Tourville Poirier y Cattaneo, 2010).

Otra de las hipótesis es que, en la cianobacteria involucrada dentro de la asociación, la toxicidad se encuentra presente pero no es expresada o sintetizada, por lo que la cianobacteria es capaz de ofrecer refugio y alimento al mismo tiempo. Como se mencionó anteriormente, es necesario implementar otras técnicas que permitan determinar si la producción de toxinas por parte de alguna cianobacteria es activa o no, sin embargo, los resultados indican que la riqueza de MIB asociados a las poblaciones potencialmente tóxicas tiene una disminución considerable respecto a aquellos asociados a las poblaciones potencialmente no tóxicas, validando una de la hipótesis de este trabajo.

Considerando lo anterior y bajo un escenario en el que la cianobacteria sea productora activa de toxinas, es probable que la producción de estos compuestos no sea suficiente para perjudicar e incluso causar la muerte de los organismos asociados. Así mismo, se puede suponer que organismos como *Cricotopus* sp. han desarrollado cierto nivel de resistencia a las cianotoxinas ya que los quironómidos suelen ser organismos no selectivos con su comida, incluso se ha observado que en otros géneros de la familia Chironomidae, del 52 al 84% del alimento que consumen corresponde a diferentes especies de cianobacterias, incluyendo algunas especies reportadas como tóxicas (Toporowska *et al.*, 2014). Algunos autores proponen que la resistencia a las cianotoxinas se da a partir de un incremento de enzimas antioxidantes promovido por el estrés oxidativo que generan algunas cianotoxinas como las microcistinas, otorgando a los organismos un mecanismo propio de resistencia (Blahá *et al.*, 2004; Toporowska *et al.*, 2014). No obstante, se debe recordar que, al ser toxinas con blancos de acción propios de organismos vertebrados, el efecto negativo sobre invertebrados sigue siendo poco conocido y por lo cual es necesario la implementación de

bioensayos con organismos invertebrados, particularmente MIB que permitan reconocer de mejor manera a qué grado pueden verse perjudicados por el consumo de cianotoxinas.

A partir de la integración de todos los resultados obtenidos es posible reconocer una red de interacciones compuesta por siete taxones de cianobacterias bentónicas y 32 géneros de MIB, de los cuales el 75% pertenece al orden Diptera, particularmente la familia Chironomidae, el 19% al orden Trichoptera y el 6% a los órdenes Ephemeroptera y Coleoptera, con una predominancia de organismos recolectores. La red de interacciones comprende 26 asociaciones unilaterales en las que un género de MIB se asocia de manera exclusiva con una cianobacteria, estas asociaciones se establecen en su mayoría con cianobacterias filamentosas como Rivulariaceae, *Wilmottia* sp., *Oxyenma* sp. y *Ancylothrix* sp. En lo que respecta a las asociaciones multilaterales, en cuatro de ellas los taxones *Tanytarsini* sp., *Pedicia* sp., *Neoplasta* sp. (Diptera) y *Lepidostoma* sp. (Trichoptera) se asocian a dos cianobacterias diferentes, tres asociaciones en las que los géneros *Simulium* sp. y *Baetis* sp. interactúan con tres cianobacterias diferentes y una asociación en la que el género *Cricotopus* sp. se asocia a cuatro cianobacterias diferentes.

De acuerdo con esto, las asociaciones entre MIB y cianobacterias filamentosas son de carácter específico y son poco abundantes, mientras que aquellas establecidas entre MIB y cianobacterias coloniales son de carácter generalista y resultan mayormente abundantes (Figura 33). Estos resultados coinciden con lo obtenido en el CCA para la determinación de preferencias por parte de los MIB sobre las poblaciones de cianobacterias, donde se puede observar una agrupación de aquellos géneros de MIB que establecen asociaciones generalistas con cianobacterias coloniales como *Nostoc* sp. *Placoma* sp. y *Compactonostoc* sp., y una separación de aquellos que establecen asociaciones unilaterales o específicas con poblaciones de cianobacterias filamentosas como Rivulariaceae, *Wilmottia* sp., *Oxyenma* sp. y *Ancylothrix* sp. (Tabla 13; Figura 32).

Estos resultados sugieren la existencia de una especie de sucesión ecológica en la que los MIB se asocian con las poblaciones de cianobacterias en función de sus ciclos de vida, en

donde aquellos organismos que cuentan con más de un número de eventos reproductivos por año van cambiando de huésped conforme la disponibilidad de sustrato existente en ese momento. Lo anterior está fuertemente determinado por la biología de las cianobacterias y la diversidad de estas en ambientes tan particulares, ya que ríos con poca diversidad de cianobacterias tienen una posibilidad muy limitada de ofrecer este recambio hábitat dentro de la red de interacciones bióticas.

El análisis SIMPER señala que los taxones *Cricotopus* sp., *Tanytarsini* sp., *Simulium* sp., y *Baetis* sp. son los más representativos dentro de la red, y son estos taxones los que establecen asociaciones multilaterales con diferentes poblaciones de cianobacterias. Para todos estos taxones se han reportado eventos reproductivos con múltiples generaciones a lo largo del año (Oliver, 1971; Clifford, 1982; Merritt & Cummins, 2008; Domínguez & Fernández, 2009; Pillot, 2014), lo que explica el establecimiento de asociaciones no exclusivas, ya que al tener un ciclo de vida multivoltino surge la necesidad de establecer una asociación con alguna cianobacteria que pueda garantizar el éxito de cada generación, siendo evidencia de que los MIB han desarrollado mecanismos de adaptación dentro de ambientes como los ríos, en donde por la corriente puede ser complicado encontrar refugio que permita completar los ciclos de vida de estos organismos, destacando la importancia de conservar los ecosistemas lóticos, pues representan el hábitat de la comunidad de cianobacterias bentónicas, y éstas a su vez el de los MIB, manteniendo un equilibrio dentro de ecosistema acuático así como su conexión con el ecosistema terrestre.

No obstante, no se descarta la idea de que dentro de esta red existen asociaciones entre organismos que han logrado sincronizar sus ciclos de vida y por lo cual resultan ser más abundantes que otras. El mejor ejemplo de esta sincronía entre ciclos de vida puede verse reflejado en las asociaciones que establece el género *Cricotopus* sp., quien a pesar de que establece asociaciones de tipo oportunista y no mutualista como ha sido reportado anteriormente (Brock, 1960; Ward y Cummins, 1985; Dodds, 1989; Sabater y Muñoz, 2000), es posible reconocer una preferencia de asociación con las poblaciones de *Nostoc* sp. y *Placoma* sp., registrando mayor número de organismos asociados respecto a otras

cianobacterias. *Cricotopus* sp. presenta un ciclo de vida multivoltino, sin embargo, es un género que aparentemente cuenta con un periodo de diapausa obligado entre los meses de otoño e invierno, posteriormente comienza un periodo de crecimiento hasta la fase de pupa, previa a la eclosión de organismos adultos en primavera y verano, esto significa que es posible encontrar un pico de abundancia de larvas en los meses de octubre a febrero (Pillot, 2014), mismos meses en los que *Nostoc* sp. y *Placoma* sp. registran picos de abundancia, siendo evidencia de cómo estos organismos han sincronizado sus ciclos de vida, ejemplo de un evento de co-adaptación a un sistema tan característico como los ríos tropicales de montaña. (Figura 34).

Los resultados obtenidos en la presente investigación contribuyen a la caracterización de las interacciones entre cianobacterias bentónicas y MIB, mismas se encuentran reguladas por factores microambientales a escala local como la radiación y velocidad de corriente que regulan la proliferación de las poblaciones de cianobacterias, temperatura y disponibilidad de nutrientes que están en función de factores regionales como la altitud y el origen geológico de la cuenca y que determinan afinidades ambientales de las cianobacterias. Factores biológicos representados por una selección de hábitat y preferencia de sustrato por parte de los MIB sobre las cianobacterias, misma que se encuentra determinada por la morfología de sus crecimientos macroscópicos y que parece determinar el nivel de especificidad dentro de las interacciones. Factores ecológicos y evolutivos como resultado de una respuesta ante la potencial producción de cianotoxinas y la alternancia de sustratos que garanticen completar el ciclo de vida de los MIB, alimentándose y refugiándose al mismo tiempo.

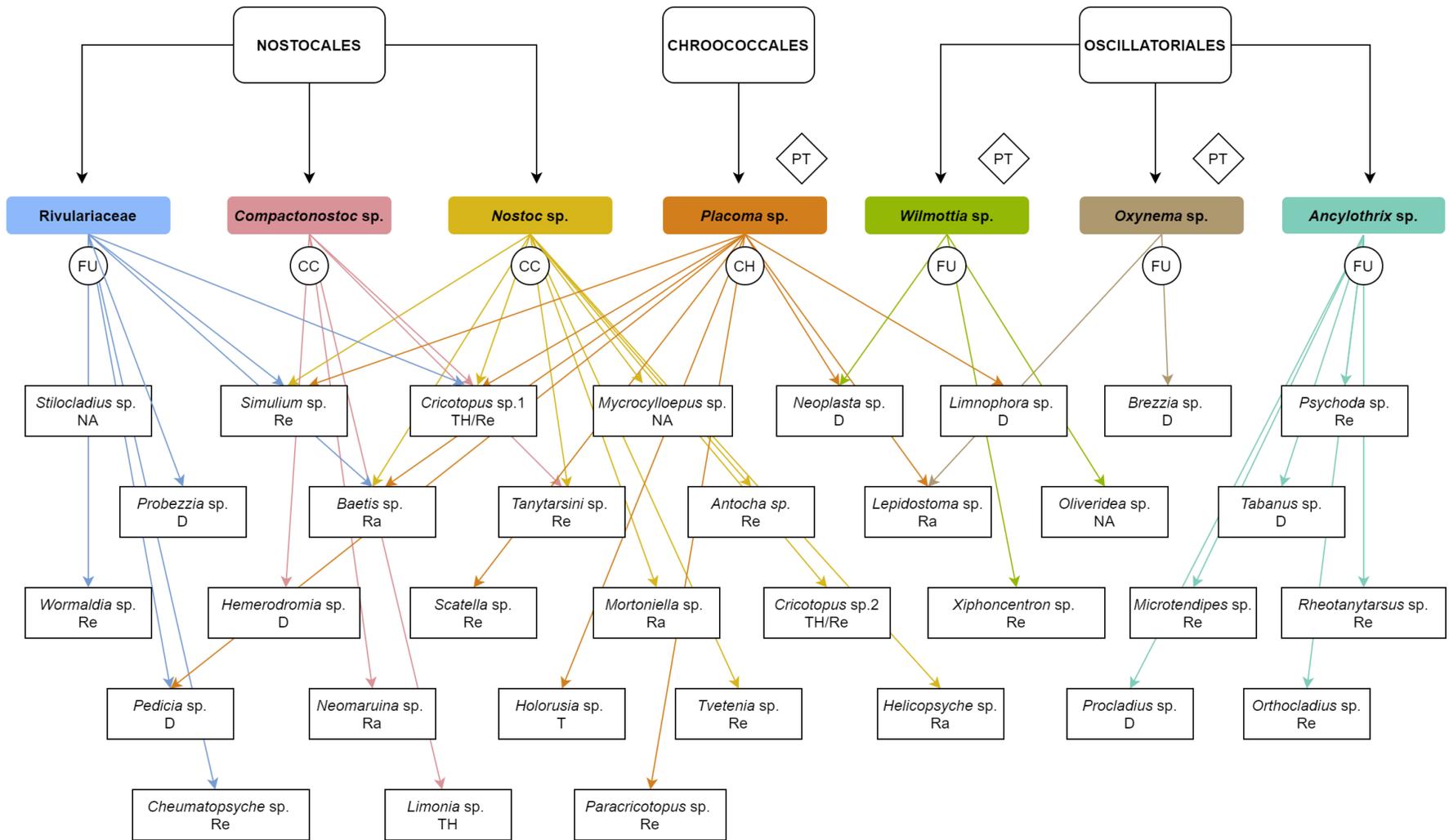


Figura 33. Red de interacciones entre cianobacterias bentónicas y MIB. PT: potencialmente tóxico, FU: filamentos uniseriados, CC: colonia compacta, CH: colonia hueca. NA: No asignado, Ra: Raspador, Re: Recolector, TH: Triturador herbívoro, D: Depredador.

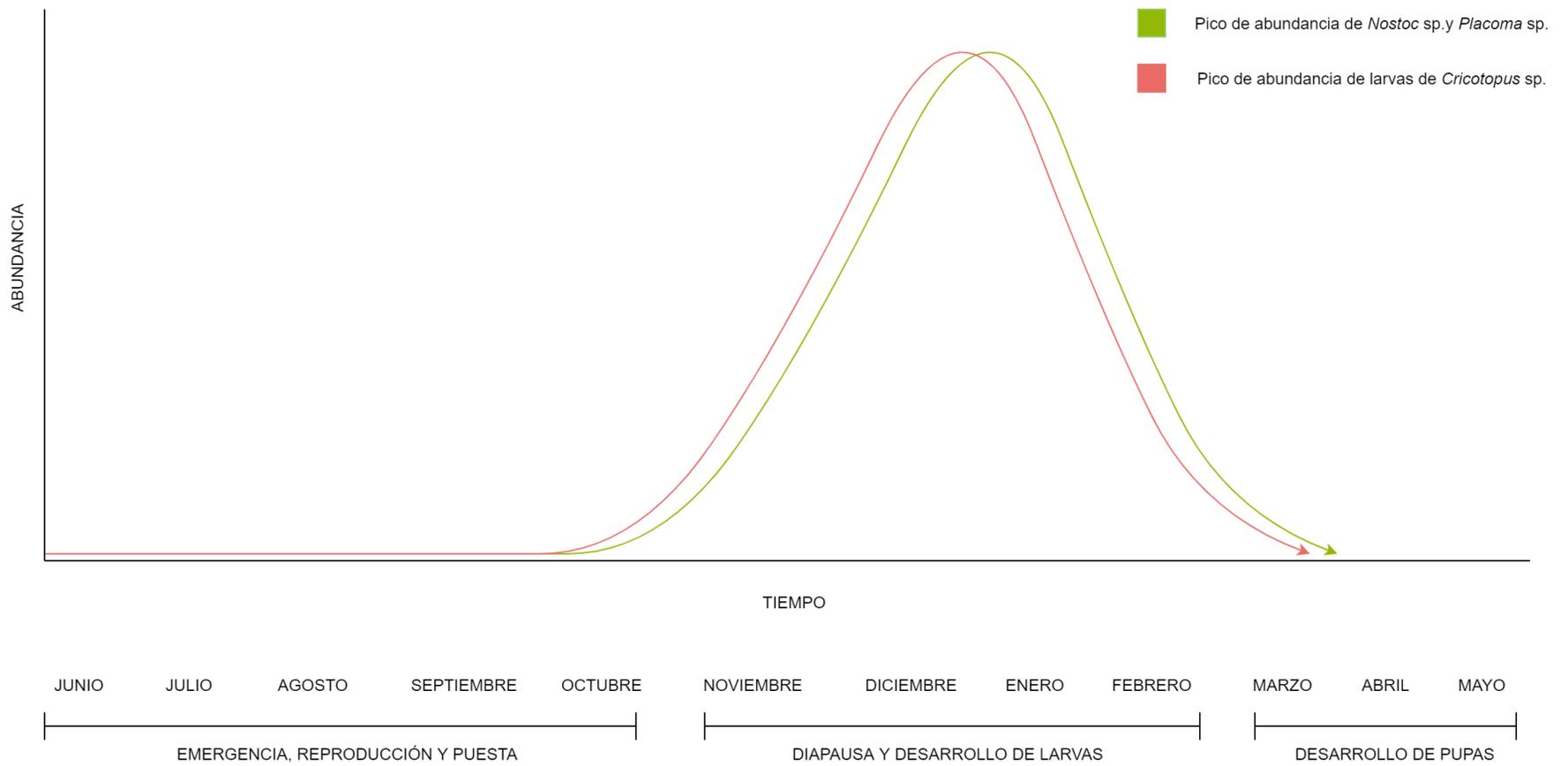


Figura 34. Sincronización del ciclo de vida de *Nostoc* sp., *Placoma* sp. y *Cricotopus* sp.

## 9. CONCLUSIONES

- I. En México existen dos tipos de ríos de montaña, los fríos asociados a cuencas silíceas de mayor altitud y los cálidos, asociados a cuencas calcáreas de menor altitud. Por lo tanto, el origen geológico de la cuenca y la altitud en la que se encuentran situados los ríos determina su gradiente tropical.
- II. El uso de un enfoque polifásico en la determinación taxonómica de las cianobacterias facilita el reconocimiento de la diversidad biológica que como resultado de un proceso adaptativo ante un mismo ambiente, se encuentra representada y subestimada por morfotipos similares e identificaciones exclusivamente fenéticas, el enfoque polifásico permitió demostrar que existe un mayor número de cianobacterias que establecen asociaciones con los ensamblajes de MIB, entre ellas los géneros *Oxynema* sp. y *Ancyllothrix* sp., primeros registros para México. Así mismo, permitió reconocer aquellas identificaciones que requieren de una revisión después de demostrar que genéticamente pertenecen a un género distinto.
- III. *Placoma* sp., *Wilmottia* sp. y *Oxynema* sp. son cianobacterias potencialmente tóxicas, y este trabajo representa el primer registro de toxicidad para estos géneros. En función de los parámetros ambientales evaluados, esta potencial toxicidad no se encuentra asociada directamente con algún factor ambiental, sin embargo, fue detectada en aguas oligotróficas frías y templadas, demostrando que la producción de toxinas no es exclusiva de ambientes eutróficos, sino que es una característica intrínseca de estos organismos y que puede desencadenarse bajo un amplio intervalo de condiciones ambientales y escenarios ecológicos, donde el establecimiento de interacciones con otros organismos podría desencadenar la producción activa de estos metabolitos.
- IV. Los dípteros, particularmente los de la familia Chironomidae presentan una especialización por las cianobacterias bentónicas como sustrato, por lo que son dominantes dentro del mundo de las interacciones entre cianobacterias bentónicas y MIB bajo cualquier escenario.

- V. La mayoría de los MIB asociados son de hábitos recolectores, por lo que el establecimiento de asociaciones con diferentes poblaciones de cianobacterias se encuentra mayormente inclinado en la obtención indirecta de alimento, aprovechándolas como medios de depósito de materia orgánica.
- VI. La potencial toxicidad puede ser un regulador de la diversidad de organismos asociados a las poblaciones de cianobacterias, ya que ésta disminuye cuando la cianobacteria es potencialmente tóxica. Aunado a esto, es muy probable que en las cianobacterias reconocidas como potencialmente tóxicas sí se encuentren expresando la toxicidad y que aquellos organismos asociados a estas poblaciones presenten cierto nivel de resistencia o adaptación metabólica para procesarlas, por lo que la potencial toxicidad sí es un factor que se encuentra regulando el establecimiento de las asociaciones entre estos organismos.
- VII. Dentro de la red de interacciones es posible identificar que los MIB establecen asociaciones unilaterales poco abundantes con cianobacterias filamentosas, y asociaciones multilaterales abundantes con cianobacterias coloniales. Existe una preferencia de asociación sobre las poblaciones de *Nostoc* sp. y *Placoma* sp., particularmente del género *Cricotopus* sp. que, a diferencia de las asociaciones mutualistas reportadas anteriormente para este género, es posible observar que sus relaciones son de carácter generalista y oportunista en donde al asociarse con alguna cianobacteria satisface la necesidad de un sustrato donde completar su ciclo de vida.
- VIII. El establecimiento de las interacciones entre cianobacterias bentónicas y MIB se encuentra regulada por una selección de hábitat activo por parte de los MIB en donde la morfología de las cianobacterias determina el grado de especificidad dentro de las interacciones, la potencial toxicidad determina la diversidad de MIB asociados y los eventos reproductivos propios de los diferentes MIB determina la recurrencia de estas interacción.

## 10. PERSPECTIVAS A FUTURO

La caracterización de las interacciones entre cianobacterias bentónicas y MIB aún requiere de mucho trabajo, por lo tanto, futuras investigaciones deberían considerar y abordar los siguientes aspectos:

- I. Es necesario seguir trabajando a las poblaciones de cianobacterias bajo un enfoque polifásico que permita conocer la diversidad real de las poblaciones que se encuentran interactuando. El trabajo con secuencias genéticas resulta adecuado para ello, y además de la construcción de filogenias se requiere implementar otro tipo de análisis que permita reconocer especies e incluso géneros nuevos para México, pues esto, además de definir de mejor manera las interacciones tiene implicaciones a nivel de conservación de especies y podría ayudar a comprender la línea evolutiva de la toxicidad en cianobacterias.
- II. Si el enfoque polifásico logra afinar una parte de las interacciones, puede afinar la otra parte con los MIBS. Es importante comenzar a implementar técnicas de biología molecular que permitan reconocer a un nivel más específico los MIB que se encuentran interactuando, esto permitiría conocer el verdadero nivel de especificidad dentro de la red de interacciones y facilitaría la determinación y asignación de nombres formales dentro de las mismas.
- III. Implementar técnicas que permitan reconocer la producción activa de cianotoxinas y su cuantificación, así como el desarrollo de bioensayos para la determinación de dosis letales que faciliten la caracterización del daño que pueden ocasionar estos metabolitos en organismos invertebrados, particularmente en aquellos que conforman los ensambles de MIB, pues no debe dejarse de lado que esto tiene implicaciones a nivel ecosistémico y que incluso podría escalar a un daño a la salud humana.

## REFERENCIAS

- Aboal, M., Puig, M. A., Mateo, P., & Perona, E. (2002). Implications of cyanophyte toxicity on biological monitoring of calcareous streams in north-east Spain. *Journal of Applied Phycology*, 14(1), 49-56.
- Allan, D. J., Castillo, M. M. (2007). *Stream Ecology Structure and Function of Running Waters*. Springer, 2nd edition. London 444 p.
- Alillo-Sánchez, J. L., Gaytán-Herrera, M. L., Martínez-Almeida, V. M., & Ramírez-García, P. (2014). Microcystin-LR equivalentents and their correlation with *Anabaena* spp. in the main reservoir of a hydraulic system of Central Mexico. *Inland Waters*, 4(3), 327-336.
- American Public Health Association (APHA). (1995). Standard methods. 19th. Edition. American Public Health Association, Washington, USA. 221 p.
- Arzate-Cárdenas, M. A., Olvera-Ramirez, R., & Martinez-Jeronimo, F. (2010). Microcystis toxigenic strains in urban lakes: a case of study in Mexico City. *Ecotoxicology*, 19(6), 1157-1165.
- Baganz, D., Staaks, G., & Steinberg, C. (1998). Impact of the cyanobacteria toxin, microcystin-LR on behaviour of zebrafish, *Danio rerio*. *Water research*, 32(3), 948-952.
- Ballot, A., Fastner, J., Lentz, M. y Wiedner, C. (2010). First report of anatoxin-a-producing cyanobacterium *Aphanizomenon issatschenkoi* in northeastern Germany. *Toxicon*, 56(6): 964- 971.
- Beisel, J. N., Usseglio-Polatera, P., & Moreteau, J. C. (2000). The spatial heterogeneity of a river bottom: a key factor determining macroinvertebrate communities. En *Assessing the ecological integrity of running waters* (pp. 163-171). Springer, Dordrecht.

- Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis: the mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 62(3), 293.
- Bishop, C. T., Anet, E. F. L. J., & Gorham, P. R. (1959). Isolation and identification of the fast-death factor in *Microcystis aeruginosa* NRC-1. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 37(3), 453-471.
- Bláha, L., Babica, P., & Maršálek, B. (2009). Toxins produced in cyanobacterial water blooms-toxicity and risks. *Interdisciplinary toxicology*, 2(2), 36-41.
- Bláha, L., Kopp, R., Šimková, K., & Mareš, J. (2004). Oxidative stress biomarkers are modulated in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) exposed to microcystin-producing cyanobacterial water bloom. *Acta Veterinaria Brno*, 73(4), 477-482.
- Bojorge García, M., Carmona, J., Beltrán, Y. & Cartajena, M. (2010). Temporal and spatial distribution of macroalgal communities of mountain streams in Valle de Bravo Basin, central Mexico. *Hydrobiologia*, 641: 159–169.
- Broady, P. A., & Ingerfeld, M. (1991). *Placoma regulare* sp. nov. (Entophysalidaceae, Cyanobacteria) from New Zealand streams. *Phycologia*, 30(6), 547-555.
- Brock, E. M. (1960). Mutualism between the Midge *Cricotopus* and the Alga *Nostoc*. *Ecology*, 41: 474-483.
- Bueno Soria, J. (2010). *Guía de identificación ilustrada de los géneros de larvas de insectos del orden Trichoptera de México*. Instituto de Biología, UNAM. México D.F, México. 218 p.
- Buratti, F. M., Manganelli, M., Vichi, S., Stefanelli, M., Scardala, S., Testai, E., & Funari, E. (2017). Cyanotoxins: Producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation. *Archives of toxicology*, 91(3), 1049-1130.

- Cai, F., Li, X., Yang, Y., Jia, N., Huo, D., & Li, R. (2019). *Compactonostoc shennongjiaensis* gen. & sp. nov. (Nostocales, Cyanobacteria) from a wet rocky wall in China. *Phycologia*, 58(2), 200-210.
- Cantoral Uriza, E. A., Ascencio Martínez, A. D. & Aboal Sanjurjo, M. (2017). Cianotoxinas: efectos ambientales y sanitarios. Medidas de prevención. *Hidrobiológica*, 27 (2): 241-251.
- Cantoral Uriza, E. A., Ascencio, A. D., & Aboal, M. (2017). Are we underestimating benthic cyanotoxins? extensive sampling results from Spain. *Toxins*, 9(12), 385.
- Carmichael, W. W. (1992). Cyanobacteria secondary metabolites: The cyanotoxins. *Journal of applied bacteriology*, 72(6), 445-459.
- Carmona Jiménez, J., Ramírez Rodríguez, R., Bojorge-García, M. G., González Hidalgo, B., & Cantoral-Uriza, E. A. (2016). Estudio del valor indicador de las comunidades de algas bentónicas: una propuesta de evaluación y aplicación en el río Magdalena, Ciudad de México. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 32(2), 139-152.
- Caro-Borrero, A. & Carmona-Jiménez, J. (2018). Habitat preferences in freshwater benthic macroinvertebrates: Algae as substratum and food resource in high mountain rivers from Mexico. *Limnologica*, 69: 10-17.
- Cartajena Alcántara, M. G., Carmona Jiménez, J., & Perona Úrizar, E. (2020). Aspectos ecológicos, taxonómicos y de distribución de cianobacterias bentónicas en cinco ríos de la región central de México. *Acta botánica mexicana*, (127).
- Casamatta D.A. & Hašler P. (2016). Blue-Green Algae (Cyanobacteria) in Rivers. En: Necchi O. Jr. *River Algae*. Springer. 287 p.
- Clarke, K., Gorley, R. (2006). User Manual/tutorial. PRIMER-E Ltd. Plymouth.

- Clifford, H. F. (1982). Life cycles of mayflies (Ephemeroptera), with special reference to voltinism. *Quaest. Entomol.*, 18(1), 15-90.
- Codd, G. A. (1995). Cyanobacterial toxins: occurrence, properties and biological significance. *Water Science and Technology*, 32(4), 149-156.
- Codd, G. A., Morrison, L. F., & Metcalf, J. S. (2005). Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicology and applied pharmacology*, 203(3), 264-272.
- Colbert, C. E. & Allan, D., J. (2001). *Streams Their Ecology and Life*. Academic Press. China. 306 p.
- Cuevas, M.L., Garrido, A., Pérez Damían, J. & González, D. (2010). Estado actual de la vegetación en México. En: Cotler Ávalos, H., Mazari Hiriart, M. y de Anda Sánchez, J. (Eds.), (2006). *Atlas de la cuenca Lerma-Chapala construyendo una visión conjunta*. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Ecología. México D.F., México 198 p.
- Dodds, K. W. (1989). Photosynthesis of two morphologies of *Nostoc parmelioides* (Cyanobacteria) as related to current velocities and diffusion patterns, *Journal of Phycology*, 25: 258-262.
- Domínguez, E., & Fernández, H. R. (2009). *Macroinvertebrados bentónicos sudamericanos. Sistemática y biología*. Fundación Miguel Lillo, Tucumán, Argentina, 656.
- do Nascimento Filho, S. L., De França, E. J., De Melo, J., & do Nascimento Moura, A. (2019). Interactions between benthic microalgae, nutrients and benthic macroinvertebrates in reservoirs from the semi-arid Neotropical region. *Fundam. Appl. Limnol*, 19, 237-254.
- Drobac, D., Tokodi, N., Lujić, J., Marinović, Z., Subakov-Simić, G., Dulić, T. & Svirčev, Z. (2016). Cyanobacteria and cyanotoxins in fishponds and their effects on fish tissue. *Harmful Algae*, 55, 66-76.

- Dudgeon D. (2008). *Tropical Stream Ecology*. Academic Press. California 370 p.
- Dudley, L. T. Scott, D. C. & Hemphill, N. (1986). Effects of macroalgae on a stream invertebrate community. *Journal of the North American Benthological Society*, 5 (2): 93-106.
- Echenique-Subiabre, I., Dalle, C., Duval, C., Heath, M. W., Couté, A., Wood, S. A. & Quiblier, C. (2016). Application of a spectrofluorimetric tool (bbe BenthosTorch) for monitoring potentially toxic benthic cyanobacteria in rivers. *Water research*, 101, 341-350.
- Encalada, A. C., Flecker, A. S., Poff, N. L., Suárez, E., Herrera-R, G. A., Ríos-Touma, B., & Anderson, E. P. (2019). A global perspective on tropical montane rivers. *Science*, 365(6458), 1124-1129.
- Fernández Nava, R., Rodríguez Jiménez, C., Arreguín Sánchez, M. y Rodríguez Jiménez, A. (1998). Listado florístico de la cuenca del Río Balsas, México. *Polibotánica*, 9: 1-151.
- Ferrão-Filho, A. D. S., & Kozłowsky-Suzuki, B. (2011). Cyanotoxins: bioaccumulation and effects on aquatic animals. *Marine drugs*, 9(12), 2729-2772.
- Francis, G. (1878). Poisonous australian lake. *Nature*, 18(444), 11-12.
- Gallardo-Vega I. M. (2018). Association between cyanobacterial mats and macroinvertebrates in mountain rivers: ecological strategies and potencial toxicity. Universidad Autónoma de Madrid. Trabajo Master de grado.
- García, E. (2004). *Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen*. Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México, México. 98 p.

- Gerdard C., Poullain, V., Lance E., Acou A., Brient L., & Carpentier A. (2009). Influence of toxic cyanobacteria on community structure and microcystin accumulation of freshwater molluscs. *Environmental Pollution*, 157: 609–617.
- Gómez Márquez, J. L., Blancas Arroyo, G., Constanzo Casillas, E. y Cervantes Sandoval, A. (2014). *Análisis de la calidad de aguas naturales y residuales con aplicación a la microescala*. FES Zaragoza, UNAM, México. 204 p.
- Graham, J. L., Dubrovsky, N. M., Foster, G. M., King, L. R., Loftin, K. A., Rosen, B. H., & Stelzer, E. A. (2020). Cyanotoxin occurrence in large rivers of the United States. *Inland Waters*, 10(1), 109-117.
- Groendahl, S., & Fink, P. (2017). High dietary quality of non-toxic cyanobacteria for a benthic grazer and its implications for the control of cyanobacterial biofilms. *BMC ecology*, 17(1), 1-10.
- Haya Trueba R. (2016). Assessment of anatoxin-a of benthic communities from Rivers. Effects on macroinvertebrates. Universidad Autónoma de Madrid. Trabajo Master de grado.
- Hammer, Ø. (2013). Past 3.x-The Past of the Future. Natural History Museum, University of Oslo.
- Hauer, F. R., & Lamberti, G. (Eds.). (2011). *Methods in stream ecology*. Academic Press.
- Hernández-Morales, R., Hidalgo-Anguiano, M., Murillo, M. D. R. O., & Ríos, M. S. A. (2014). Factores abióticos que rigen la presencia y permanencia del género *Microcystis* Kützing ex Lemmermann en un lago tropical profundo. *Biológicas Revista de la DES Ciencias Biológico-Agropecuarias*, 16(1), 33-42.
- Ibarra-Montoya, J. L., Rangel-Peraza, G., González-Farias, F. A., De Anda, J., Martínez-Meyer, E., & Macias-Cuellar, H. (2012). Uso del modelado de nicho ecológico como una herramienta para

predecir la distribución potencial de *Microcystis* sp (cianobacteria) en la Presa Hidroeléctrica de Aguamilpa, Nayarit, México. *Revista Ambiente & Agua*, 7, 218-234.

Jochimsen, E. M., Carmichael, W. W., An, J., Cardo, D. M., Cookson, S. T., Holmes, C. E. & Jarvis, W. R. (1998). Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *New England Journal of Medicine*, 338(13), 873-878.

Jungblut, A., Hoeger, S.J., Mountfort, D., Hitzfeld, B.C., Dietrich, D.R. y Neilan, B.A. (2006). Characterization of microcystin production in an Antarctic cyanobacterial mat community. *Toxicon*, 47(3): 271-278.

Komárek, J., & Anagnostidis, K. (2005). Cyanoprokaryota, 2nd part: Oscillatoriales Genera. En: B. Büdel, G. Gärtner, L. Krienitz, M. Schagerl (Eds.), *Süßwasserflora von Mitteleuropa* Vol. 19/2. Elsevier Spektrum Akademischer: Italia.

Komárek, J. (2013). Cyanoprokaryota, 3rd part: Heterocytous Genera. En: B. Büdel, G. Gärtner, L. Krienitz, M. Schagerl (Eds.), *Süßwasserflora von Mitteleuropa* Vol. 19/3. Springer Spektrum: Berlin.

Komárek, J. (2016). A polyphasic approach for the taxonomy of cyanobacteria: principles and applications. *European Journal of Phycology*, 51(3), 346-353.

Krasilnikov, P., Jiménez Nava, F. J., & Reyna Trujillo, T. (2011). *Geografía de los suelos de México* (No. 631.47 K7.).

Kurmayer, R. (2011). The toxic CYANOBACTERIUM NOSTOC SP. strain 152 produces highest amounts of microcystin and NOSTOPHYCIN under stress conditions 1. *Journal of phycology*, 47(1), 200-207.

- Lance E., Bugajny E. Bormans M. & Gerdard C. (2008). Consumption of toxic cyanobacteria by *Potamopyrgus antipodarum* (Gastropoda, Prosobranchia) and consequences on life traits and microcystin accumulation. *Harmful Algae*, 7: 464–472.
- Liarte, S., N. Ubero-Pascal, A. García-Ayala & M. A. Puig. 2014. Histological effects and localization of dissolved microcystins LR and LW in the mayfly *Ecdyonurus angelieri* Thomas (Insecta, Ephemeroptera). *Toxicon*, 92: 31-35.
- Liston, E. S. & Tlexler, C. J. (2005). Spatiotemporal patterns in community structure of macroinvertebrates inhabiting calcareous periphyton mats. *Journal of the North American Benthological Society*, 4(4): 832–844.
- Lepère, C., Wilmotte, A., & Meyer, B. (2000). Molecular diversity of *Microcystis* strains (Cyanophyceae, Chroococcales) based on 16S rDNA sequences. *Systematics and Geography of Plants*, 275-283.
- Loftin, K. A., Clark, J. M., Journey, C. A., Kolpin, D. W., Van Metre, P. C., Carlisle, D., & Bradley, P. M. (2016). Spatial and temporal variation in microcystin occurrence in wadeable streams in the southeastern United States. *Environmental toxicology and chemistry*, 35(9), 2281-2287.
- Marcarelli, A. M., Baker, M. A., & Wurtsbaugh, W. A. (2008). Is in-stream N<sub>2</sub> fixation an important N source for benthic communities and stream ecosystems? *Journal of the North American Benthological Society*, 27(1), 186-211.
- Marten, G. G. (2007). Larvicidal algae. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 23(sp2), 177-183.
- Martínez, E., Martínez, M. D., Millán, M., & Ramírez, P. (2002, October). Determinación de toxinas biológicas en una fuente de abastecimiento de agua dulce. In *XXVIII Congreso interamericano de Ingeniería sanitaria y Ambiental* (pp. 1-5).

- Márquez-Santamaria K. P. (2019). Caracterización de las interacciones bióticas entre algas macroscópicas y macroinvertebrados bentónicos: preferencias de hábitat en ríos de la región central de México. Tesis de licenciatura.
- Mauad, M., Siri, A., & Donato, M. (2017). Does type of substratum affects chironomid larvae assemblage composition? A study in a river catchment in Northern Patagonia, Argentina. *Neotropical entomology*, 46(1), 18-28.
- McAllister, T. G., Woodb, S. A. & Hawes, I. (2016). The rise of toxic benthic Phormidium proliferations: A review of their taxonomy, distribution, toxin content and factors regulating prevalence and increased severity. *Harmful Algae*, 55: 282–294.
- McLachlan, A. J., & Ladle, R. J. (2009). The evolutionary ecology of detritus feeding in the larvae of freshwater Diptera. *Biological Reviews*, 84(1), 133-141.
- Merritt, R. W., Cummins, K. W. y Berg, M. B. (2008). *An introduction to the aquatic insects of North America*. 4ª ed. Kendall Hant, Dubuque, United States of America. 1158 p.
- Mohamed, Z. A., El-Sharouny, H. M., & Ali, W. S. (2006). Microcystin production in benthic mats of cyanobacteria in the Nile River and irrigation canals, Egypt. *Toxicon*, 47(5), 584-590.
- Montejano-Zurita G., Cantoral-Uriza E. A. & Carmona-Jiménez J. (2004). Algas de ambientes lóticos en la cuenca baja del río Pánuco. En: Luna I., Morrone J. & Espinosa D. *Biodiversidad de la Sierra Madre Oriental. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad*. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F., México.
- Müller, J., Müller, K., Neinhuis, C., Quandt, D. (2010). PhyDE.
- Necchi, O. Jr. (2016). *River Algae*. Springer International Publishing. Switzerland. 287 p.

- Oliver, D. R. (1971). Life history of the Chironomidae. *Annual review of entomology*, 16(1), 211-230.
- Oudra, B., Dadi-El Andaloussi, M., & Vasconcelos, V. M. (2009). Identification and quantification of microcystins from a *Nostoc muscorum* bloom occurring in Oukaïmeden River (High-Atlas mountains of Marrakech, Morocco). *Environmental monitoring and assessment*, 149(1), 437-444.
- Park, H. D., Watanabe, M. F., Harada, K. I., Nagai, H., Suzuki, M., Watanabe, M., & Hayashi, H. (1993). Hepatotoxin (microcystin) and neurotoxin (anatoxin - a) contained in natural blooms and strains of cyanobacteria from Japanese freshwaters. *Natural toxins*, 1(6), 353-360.
- Paerl, H. W., & Millie, D. F. (1996). Physiological ecology of toxic aquatic cyanobacteria. *Phycologia*, 35(sup6), 160-167.
- Pearson, L.A., Dittmann, E., Mazmouz, R., Ongley, S. E., D'Agostino, D. M., & Neilan B. A. 2016. The genetics, biosynthesis and regulation of toxic specialized metabolites of cyanobacteria. *Harmful Algae*, 54:98–111.
- Pérez D. S., Soraci A. L. y Tapia M. O. (2008). Cianobacterias y cianotoxinas: Rol de las microcistinas en la salud humana y animal y su detección en muestras de agua. *Analecta Veterinaria*, 28 (1): 48-56.
- Pérez-Morales, A., Olivos-Ortiz, A., Quijano-Scheggia, S. I., Espinosa-Rodríguez, C. A., & Jiménez-Santos, M. A. (2016). Estado actual del estudio de cianobacterias dulceacuícolas formadoras de florecimientos en el centro de México. *Florecimientos algales nocivos en México* (García-Mendoza E., Quijano-Scheggia SI, Olivos-Ortiz A. y Núñez-Vázquez EJ, Eds.). CICESE, Ensenada, México, 408-421.

- Pillot, H. K. M. (2014). *Chironomidae Larvae, Vol. 3: Orthoclaadiinae: Biology and Ecology of the Aquatic Orthoclaadiinae* (Vol. 3). Hotei Publishing.
- Pineda-Mendoza, R. M., Olvera-Ramírez, R., & Martínez-Jerónimo, F. (2012). Microcystins produced by filamentous cyanobacteria in urban lakes. A case study in Mexico City. *Hidrobiológica*, 22(3), 290-298.
- Pineda-Mendoza, R. M., Briones-Roblero, C. I., Gonzalez-Escobedo, R., Rivera-Orduña, F. N., Martínez-Jerónimo, F., & Zúñiga, G. (2020). Seasonal changes in the bacterial community structure of three eutrophicated urban lakes in Mexico City, with emphasis on *Microcystis* spp. *Toxicon*, 179, 8-20.
- Poirier, A. M. T., Cattaneo, A., & Hudon, C. (2010). Benthic cyanobacteria and filamentous chlorophytes affect macroinvertebrate assemblages in a large fluvial lake., 29(2), 737-749.
- Quiblier C., Wood S., Echenique-Subiabre I., Heath M., Villeneuve A. & Humbert J. F. (2013). A review of current knowledge on toxic benthic freshwater cyanobacteria e Ecology, toxin production and risk management. *Water research*, 47: 5464-5479.
- Ramírez-García, P., E. Martínez-Romero, M. D. Martínez-Salgado & C. A. Eslava-Campos. (2004). *Cianobacterias, microorganismos del fitoplancton y su relación con la salud humana*. Instituto Nacional de Ecología, México, pp. 1-18.
- Ramírez Lynn, J. E. (2010). Caracterización del ecosistema de ribera y su valor indicador del estado ecológico en la subcuenca Valle de Bravo-Amanalco, Estado de México. Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Tesis de maestría. 121 p.

- Reid, H. E., Brierley, G. J. & Boothroyd, I. K. G. (2010). Influence of bed heterogeneity and habitat type on macroinvertebrate uptake in peri-urban streams. *International Journal of Sediment Research*, 25: 203-220.
- Rodriguez-Flores, R. (2014). Diversidad y distribución de algas macroscópicas en ríos de alta montaña de la cuenca de México. Tesis de Licenciatura.
- Sabater, S. & Muñoz, I. (2000). *Nostoc verrucosum* (cyanobacteria) colonized by a chironomid larva in a mediterranean stream. *Journal of Phycology*, 36: 59–61.
- Sabater, S., Vilalta, E., Gaudes, A., Guasch, H., Munoz, I., & Romani, A. (2003). Ecological implications of mass growth of benthic cyanobacteria in rivers. *Aquatic Microbial Ecology*, 32(2), 175-184.
- Sheat, R. G. & Cole, K. M. (1992). Biogeography of stream macroalgae in North America. *Journal of Phycology*, (28): 448-460.
- Sivonen, K. & G. Jones. (1999). Cyanobacterial toxins. In: I. Chorus & J Bartram (Eds.). *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*. E & FN Spon, London, UK. pp. 41-112.
- Skulberg, O. M. (1984). Toxic blue-green algal blooms in Europe: A growing problems. *Ambio*, 13, 244-247.
- Soares, D., & García, G. (2017). *La cuenca del río Usumacinta desde la perspectiva del cambio climático*. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua: Jiutepec, Mexico.
- Svrcek, C. & Smith, D. W. (2004). Cyanobacteria toxins and the current state of knowledge on water treatment options: a review. *Journal of Environmental Engineering and Science*, 3(3), 155-185.

- Strunecký, O., Elster, J., & Komárek, J. (2011). Taxonomic revision of the freshwater cyanobacterium "Phormidium" murrayi= *Wilmottia murrayi*. *Fottea*, 11(1), 57-71.
- Teneva, I., Dzhambazov, B., Koleva, L., Mladenov, R., & Schirmer, K. (2005). Toxic potential of five freshwater Phormidium species (Cyanoprokaryota). *Toxicon*, 45(6), 711-725.
- Tillett, D., D. L. Parker & B. A. Neilan. (2001). Detection of toxigenicity by a probe for the microcystin synthetase A Gene (mcyA) of the cyanobacterial genus *Microcystis*: Comparison of toxicities with 16S rRNA and phycocyanin operon (Phycocyanin Intergenic Spacer) phylogenies. *Applied and Environmental Microbiology*, 2810-2818.
- Tillmanns, A. R., Wilson, A. E., Pick, F. R., & Sarnelle, O. (2008). Meta-analysis of cyanobacterial effects on zooplankton population growth rate: species-specific responses. *Fundamental and Applied Limnology*, 171(4), 285.
- Toporowska, M., Pawlik-Skowronska, B., & Kalinowska, R. (2014). Accumulation and effects of cyanobacterial microcystins and anatoxin-a on benthic larvae of *Chironomus* spp.(Diptera: Chironomidae). *European Journal of Entomology*, 111(1), 83.
- Torres-Arino, A., & Mora-Heredia, E. (2010). Isolation and characterization of potentially toxic or harmful cyanobacteria from Oaxaca and Chiapas, Mexico. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 45(1), 128-136.
- Thorp, J. H. & Covich, A. P. (2010). *Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates*. Academic Press. Italy. 1021 p.
- Vasconcelos, V., Martins, A., Vale, M., Antunes, A., Azevedo, J., Welker, M., ... & Montejano, G. (2010). First report on the occurrence of microcystins in planktonic cyanobacteria from Central Mexico. *Toxicon*, 56(3), 425-431.

- Vincent W.F. (2009). Cyanobacteria. En: Steven L. Percival, Marylynn V. Yates, David W. Williams, Rachel M. Chalmers, Nicholas F. Gray (Edits). *Microbiology of Waterborne Diseases* (Second Edition). Academic Press. 696 p.
- Walker, D. P., Wijnhoven, S. & van der Velde, G. (2013). Macrophyte presence and growth form influence macroinvertebrate community structure. *Aquatic Botany*, 104: 80–87.
- Wallace, B. J. y Webster, R. J. (1996). The role of macroinvertebrates in stream ecosystem function, *Annual Review of Entomology*, 41: 115-139.
- Ward, A. K., Dahm, C. N. & Cummins, K. W. (1985). Nostoc (Cyanophyta) productivity in Oregon Stream ecosystems: invertebrate influences and differences between morphological types. *Journal of Phycology*, 21: 223-227.
- Wetzel, R. G. (2001). *Limnology: lake and river ecosystems*. Academic Press. B
- White S. H., Duivenvoorden L. J. & Fabbro L. D. (2005). Impacts of a toxic *Microcystis* bloom on the macroinvertebrate fauna of Lake Elphinstone, Central Queensland, Australia. *Hydrobiologia*, 548: 117–126.
- Whitton, B. A. (2012). *Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time*. Springer. 756 p.
- Wilmotte, A., Neefs, J. M. y De Wachter, R. (1994b) Evolutionary affiliation of the marine nitrogen-fixing cyanobacterium *Trichodesmium* sp strain NIBB-1067, derived by 16S ribosomal RNA sequence analysis. *Microbiology*, 140 (8), 2159-2164.
- Wood, S.A., Phillips, N.R., de Winton, M., Gibbs, M. (2012). Consumption of benthic cyanobacterial mats and nodularin-R accumulation in freshwater crayfish (*Paranephrops planifrons*) in Lake Tikitapu (Rotorua, New Zealand). *Harmful Algae*, 20, 175e179.

Wood, S. A., Kelly, L. T., Bouma - Gregson, K., Humbert, J. F., Laughinghouse IV, H. D., Lazorchak, J., ... & Davis, T. W. (2020). Toxic benthic freshwater cyanobacterial proliferations: challenges and solutions for enhancing knowledge and improving monitoring and mitigation. *Freshwater Biology*, 65(10), 1824-1842.

# ANEXO 1

## Protocolo para la extracción de DNA: Kit DNeasy UltraClean Microbial (QIAGEN)

*Puntos importantes antes de comenzar:*

\*Si la solución SL se encuentra precipitada, calentar a 55°C por 5-10 min.

\*Agitar la solución SB antes de utilizar.

\*Realice todos los pasos de centrifugación a temperatura ambiente.

1. Tomar una pequeña cantidad de muestra y colocarla en un tubo Eppendorf de 1.5 ml (la punta del tubo aproximadamente).
2. Adicionar 350 µl de la solución *Bead Solution*.  
*Nota:* Después de realizar estos pasos, la muestra se somete a los ciclos de congelación con nitrógeno líquido, baño maría y trituración con taladro (3 a 5 ciclos dependiendo de qué tanto haya podido ser macerada la muestra).
3. Transferir el contenido a un tubo *Power Biofilm Bead*, adicionar 50 µl de la solución *SL* y homogeneizar con vortex a máxima potencia y de manera horizontal por 10 min (se sugiere emplear un adaptador o pegar los tubos con cinta adhesiva).
4. Centrifugar a 14 000 rpm durante 30 segundos. Transferir el sobrenadante a un tubo colector de 2 ml.  
*Nota:* Se espera 300-500 µl de sobrenadante.
5. Adicionar 100 µl de la solución *IRS*, homogeneizar brevemente con vortex e incubar a 4° C por 5 minutos.
6. Centrifugar a 14 000 rpm por 1 minuto.
7. Transferir el sobrenadante a un tubo colector de 2 ml.  
*Nota:* De espera 450 µl aproximadamente.
8. Adicionar 900 µl de la solución *SB* (calentar si es necesario, evitar precipitados en la solución) y homogeneizar brevemente con vortex.
9. Tomar 700 µl del sobrenadante y colocarlo en un tubo con filtro, centrifugar a 14 000 rpm por 30 segundos. Desechar el líquido. Colocar el resto del sobrenadante en el tubo y repetir el hasta terminar el contenido.
10. Adicionar 300 µl de solución *C13* y centrifugar a 14 000 rpm por 1 minuto.
11. Cambiar la columna a un nuevo tubo colector.
12. Adicionar 50 µl de la solución *EB* en el centro del filtro de la membrana.
13. Centrifugar a 14 000 rpm por 1 minuto.
14. Desprendiendo el filtro, el DNA estará listo para procesarse. Se recomienda almacenarlo en el congelador a -20°C.

## ANEXO 2

### Protocolo para la purificación de producto de PCR: Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega)

1. Adicionar un volumen igual al del producto de PCR de la solución *Membrane Binding*.
2. Insertar una minicolumna en un tubo para coleccionar.
3. Transferir el producto preparado al tubo para coleccionar.
4. Incubar por 1 minuto a temperatura ambiente.
5. Centrifugar a 14 000 rpm por 1 minuto.
6. Desechar el líquido y reinsertar la columna en el tubo colector.
7. Adicionar 700 µl de la solución *Wash membrane*, centrifugar a 14 000 rpm por 1 minuto y desechar el líquido.
8. Repetir el paso anterior con 500 µl de solución, centrifugar a 14 000 rpm por 5 minutos y desechar el líquido.
9. Centrifugar nuevamente a 14 000 rpm por 1 minuto para evaporar el etanol.
10. Transferir la minicolumna a un tubo Eppendorf de 1.5 ml y dejar reposar por 3 minutos para evaporar el etanol.
11. Adicionar 50 µl de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas.
12. Incubar a 55° C por 5 minutos.
13. Centrifugar a 14 000 por 1 minuto.
14. Almacenar a 4° C o -20° C.

## ANEXO 3

### Protocolo para la extracción y purificación de plásmidos: Kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega)

1. Transferir una parte del cultivo a un tubo Eppendorf de 1.5 ml y centrifugar para precipitar las bacterias, desechar el medio de cultivo y repetir hasta terminar el contenido del tubo de cultivo.
2. Resuspender el pellet con 250  $\mu$ l de *Cell Resuspension Solution*.
3. Adicionar 250  $\mu$ l de *Cell Lysis Solution* e invertir el tubo de manera gentil 4 veces para mezclar.
4. Adicionar 10  $\mu$ l de *Alkaline Protease Solution*, invertir el tubo de manera gentil 4 veces para mezclar. Incubar por 5 minutos a temperatura ambiente.
5. Adicionar 350  $\mu$ l de *Neutralization Solution* e invertir el tubo de manera gentil 4 veces para mezclar. Centrifugar a máxima velocidad por 10 minutos a temperatura ambiente.
6. Insertar una columna de centrifugado en un tubo de recolección, y decantar el lisado dentro del tubo.
7. Centrifugar a máxima velocidad por 1 minuto a temperatura ambiente. Descartar el sobrenadante e insertar nuevamente la columna.
8. Adicionar 750  $\mu$ l de *Wash Solution*. Centrifugar a máxima velocidad por 1 minuto. Descartar el sobrenadante y volver a insertar la columna.
9. Repetir el paso anterior con 250  $\mu$ l de solución. Centrifugar a máxima velocidad por 1 minuto a temperatura ambiente.
10. Transferir la columna a un tubo de recolección nuevo y estéril.
11. Adicionar 100  $\mu$ l de agua libre de nucleasas. Centrifugar por 1 minuto a temperatura ambiente.
12. Descartar la columna y conservar el DNA a -20°C.

## ANEXO 4

### Riqueza de Macroinvertebrados bentónicos asociados

#### EPHEMEROPTERA



*Baetis* sp.  
(Baetidae)

#### COLEOPTERA



*Microcylloepus* sp.  
(Elmidae)

#### DIPTERA



*Tanytarsini* sp.  
(Chironomidae)



*Rheotanytarsus* sp.  
(Chironomidae)

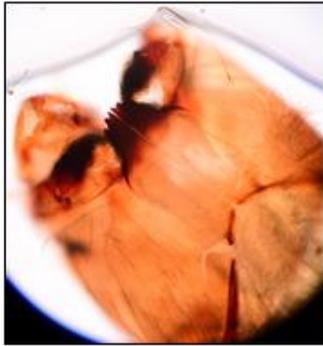


*Microtendipes* sp.  
(Chironomidae)



*Cricotopus* sp. 1  
(Chironomidae)

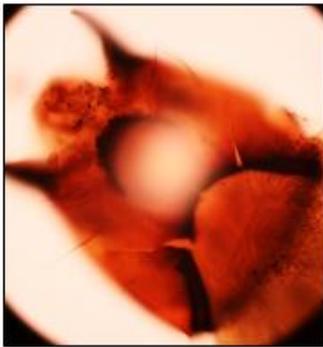
## DIPTERA



*Cricotopus* sp. 1  
(Chironomidae)



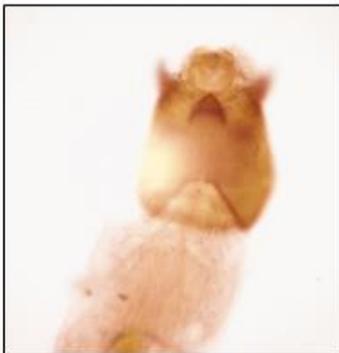
*Cricotopus* sp. 2  
(Chironomidae)



*Oliveridea* sp.  
(Chironomidae)



*Orthocladius* sp.  
(Chironomidae)

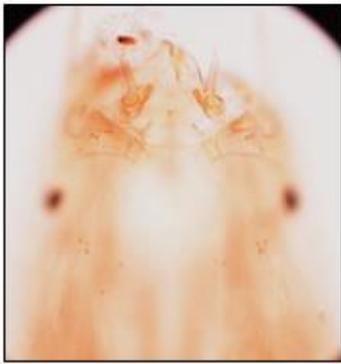


*Tvetenia* sp.  
(Chironomidae)



*Paracricotopus* sp.  
(Chironomidae)

## DIPTERA



*Procladius* sp.  
(Ceratopogonidae)



*Hemerodromia* sp.  
(Empididae)



*Neoplasta* sp.  
(Empididae)



Aff. *Neomaruina* sp.  
(Psychodidae)



Aff. *Psychoda* sp.  
(pupa)  
(Psychodidae)



*Simulium* sp.  
(Simuliidae)

## DIPTERA



*Tabanus* sp.  
(Tabanidae)



*Antocha* sp. (larva)  
(Tipulidae)



*Antocha* sp. (pupa)  
(Tipulidae)



*Limnoria* sp.  
(Tipulidae)

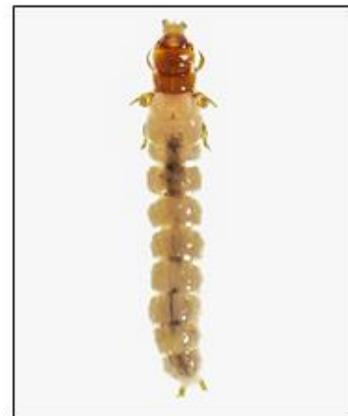
## TRICHOPTERA



*Mortoniella* sp.  
(Glossosomatidae)



*Helicopsyche* sp.  
(Helicopsychidae)



*Xiphocentron* sp.  
(Xiphocentronidae)