

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA



EFFECTO ECOTOXICOLÓGICO DE UN FLORECIMIENTO CIANOBACTERIAL
SOBRE DIFERENTES ESPECIES NATIVAS DE CLADÓCEROS

T E S I S

QUÉ PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

P R E S E N T A

FRAGOSO RODRÍGUEZ MARCOS EFRÉN

DIRECTOR DE TESIS

DR. CESAR ALEJANDRO ZAMORA BARRIOS

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México (2023)





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.

Dedicatoria

A mis padres:

Marcos Fragoso Ávila y Elsa Rodríguez Ponce, quienes han sido mi apoyo incondicional y total a lo largo de toda mi vida, por inculcarme valores que me han formado y quienes sin esperar nada a cambio lo dan todo por mí. Por siempre estaré agradecido.

A mis hermanos:

A mi hermana Fernanda por ser un ejemplo a seguir de esfuerzo y dedicación, quien me ha aconsejado para poder superar los obstáculos que se presenten.

A mi hermano Gael, quien me enseñó a sonreír en momentos difíciles de mi carrera y que siempre ha estado para mí.

A mi familia:

Quiero dedicarles mi trabajo a mis abuelas, quienes con amor siempre que lo he necesitado me brindan su apoyo y son mis segundas mamás, a mis tíos y tías quienes estuvieron pendiente de mis estudios y me aconsejaron de la mejor manera, gracias a toda mi familia Fragoso y familia Rodríguez.

A mi primo:

A la memoria de Jesús Alejandro Fragoso Ávila, quien fue un pilar de inspiración para terminar mis estudios universitarios y no darme por vencido, gracias por formar parte de lo que soy ahora, siempre te querré y extrañare.

Agradecimientos

A la UNAM, principalmente a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, por brindarme la gran oportunidad de concluir mis estudios universitarios como un profesional en la biología.

Al Dr. Cesar Alejandro Zamora Barrios, quien ha sido mi tutor desde el último año de la licenciatura, gracias a sus enseñanzas, constancia, paciencia y pasión por la materia, pude concluir este trabajo. Todos sus consejos e ideas siempre fueron de gran importancia para poder escribir lo que hoy he logrado. Formó parte importante de mi historia académica por sus conocimientos profesionales que lo caracterizan, muchas gracias por las palabras de aliento para no rendirme, por estar allí cuando las horas de trabajo se hacían confusas y por aconsejarme de la mejor manera. Gracias por todo.

A la Dra. Nandini Sarma, que me brindó la oportunidad de entrar a su laboratorio de Zoología acuática para poder desenvolverme en esta rama. Por cada regaño, por cada uno de sus reconocimientos, por todas las reflexiones que sembró en mí y por enseñarme a superarme cada día. Gracias.

A mis sinodales: Dr. S. S. S. Sarma, Dr. Pedro Ramírez García y Dra. Michael Anaí Figueroa Sánchez, por su tiempo y atención para poder pulir este trabajo.

A todos mis compañeros de laboratorio, que estuvieron presentes para transmitirme sus conocimientos en las diferentes áreas de investigación, por los momentos divertidos y pláticas que retroalimentaron mi idea de cómo ser un mejor investigador, gracias: César, Michael, Sergio, Andrea, Nayeli, Tony, Mayra, Lety, Mafer, Agustín, Dayana, Ron, Sara y Giovani.

A mis hermanos biólogos; Damián, Carlos, Pedro, Michelle, Dayana, Jair, gracias, por las pláticas, risas y la aventura en la carrera.

Índice

Introducción	8
Cianotoxinas	11
Zooplancton	12
Antecedentes	14
Justificación	17
Hipótesis.....	19
Objetivos	20
Objetivo General	20
Objetivos Particulares	20
Materiales y métodos	21
Resultados	29
Identificación y cuantificación de las cianobacterias	29
Determinación de la concentración de microcistinas	29
Prueba de toxicidad aguda con el tóxico de referencia (CL ₅₀)	29
Sensibilidad relativa con el toxico de referencia (dicromato de potasio)	31
Sensibilidad relativa con extracto crudo.....	33
Prueba de toxicidad aguda con extracto crudo de cianobacterias (CL ₅₀)	34
Pruebas de toxicidad crónica	37
Discusión.....	57
Perspectivas e Implicaciones	64
Conclusiones	65
Literatura citada.....	66
ANEXO 1	76
ANEXO 2	77

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Sitio de recolección de la muestra en la laguna de Zumpango, Estado de México. Tomado de Google Earth. 20
- Figura 2.** Especies de cladóceros encontrados en la laguna de Zumpango en el mes de enero; A. *Daphnia laevis*, B. *Simocephalus vetulus*, C. *Ceriodaphnia dubia* y la especie proporcionada por el Instituto de Mexicano de Tecnología del Agua; D. *Daphnia magna*. 22
- Figura 3.** Especies de cianobacterias encontradas en los florecimientos de cianobacterias de la laguna de Zumpango; A. *Planktothrix agardhii*. 23
- Figura 4.** a *Daphnia magna*, b *Daphnia laevis*, c *Ceriodaphnia dubia*, d *Simocephalus vetulus*, expuestos a diferentes concentraciones del tóxico (0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 y 1.5 mg L⁻¹) dicromato de potasio a una temperatura de 20 ± 2°C. 30
- Figura 5.** Sensibilidad relativa con dicromato de potasio expresada como proporción logarítmica (CL₅₀) en relación con la sensibilidad de *Daphnia magna*. 31
- Figura 6.** Sensibilidad relativa con extracto crudo expresada como proporción logarítmica (CL₅₀) en relación con la sensibilidad de *Daphnia magna*. 33
- Figura 7.** A *Daphnia magna*, B *Daphnia laevis*, C *Ceriodaphnia dubia*, D *Simocephalus vetulus*, expuestos a diferentes proporciones del extracto crudo (1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 %) correspondiente a valores de 0.12 a 4.03 µg L⁻¹ a una temperatura de 20 ± 2°C. 35
- Figura 8.** Curvas de supervivencia de *Daphnia laevis* en presencia de tres concentraciones subletales de extracto crudo de cianobacterias (5, 10 y 20% de extracto), un control (con alimento) y un control negativo (ausencia de extracto y ausencia de alimento). Los símbolos representan los promedios ± error estándar de cuatro réplicas de una cohorte de 20 individuos. 36
- Figura 9.** Fecundidad de *Daphnia laevis* de tres concentraciones subletales de extracto crudo de cianobacterias (5, 10 y 20% de extracto) y controles (ausencia de extracto y ausencia de alimento). Los símbolos representan los promedios ± error estándar de cuatro réplicas de una cohorte de 20 individuos. 38
- Figura 10.** Promedio y Esperanza de Vida de *Daphnia laevis*, sometida a bioensayos crónicos con tres diferentes concentraciones de extractos crudos (5, 10, 20%), usando *Scenedesmus acutus* a 1x10⁶ cels ml⁻¹ como alimento. Se presenta la media de cuatro replicas ± error estándar. Letras similares indican que no existen diferencias significativas (P>0.05, Tukey). 38
- Figura 11.** Tasa de Reproducción bruta y Reproducción neta de *Daphnia laevis*, sometida a bioensayos crónicos con tres diferentes concentraciones de extractos crudos (5, 10, 20%), usando *Scenedesmus acutus* a 1x10⁶ cels ml⁻¹ como alimento. Se presenta la media de cuatro replicas ± error estándar. Letras similares indican que no existen diferencias significativas (P>0.05, Tukey). 39
- Figura 12.** Tiempo Generacional y Tasa de Crecimiento poblacional de *Daphnia laevis*, sometida a bioensayos crónicos con tres diferentes concentraciones de extractos crudos (5, 10, 20%), usando *Scenedesmus acutus* a 1x10⁶ cels ml⁻¹ como alimento. Se presenta la media de cuatro réplicas ± error estándar. Letras similares indican que no existen diferencias significativas (P>0.05, Tukey). 40
- Figura 13.** Curvas de supervivencia de *Simocephalus vetulus* en presencia de tres concentraciones subletales de extracto crudo de cianobacterias (5, 10 y 20% de extracto), un control (con alimento) y un control negativo (ausencia de extracto y ausencia de alimento). Los símbolos representan los promedios ± error estándar de cuatro réplicas de una cohorte de 20 individuos 43
- Figura 14.** Fecundidad de *Simocephalus vetulus* de tres concentraciones subletales de extracto crudo de cianobacterias (5, 10 y 20% de extracto) y controles (ausencia de extracto y ausencia de alimento). Los símbolos representan los promedios ± error estándar de cuatro réplicas de una cohorte de 20 individuos. 44

Figura 15. Promedio y Esperanza de Vida de *Simocephalus vetulus*, sometida a bioensayos crónicos con tres diferentes concentraciones de extractos crudos (5, 10, 20%), usando *Scenedesmus acutus* a 1×10^6 cels ml^{-1} como alimento. Se presenta la media de cuatro replicas \pm error estándar. Letras similares indican que no existen diferencias significativas ($P > 0.05$, Tukey). 44

Figura 16. Tasas de Reproducción bruta y neta de *Simocephalus vetulus*, sometida a bioensayos crónicos con tres diferentes concentraciones de extractos crudos (5, 10, 20%), usando *Scenedesmus acutus* a 1×10^6 cels ml^{-1} como alimento. Se presenta la media de cuatro réplicas \pm error estándar. Letras similares indican que no existen diferencias significativas ($P > 0.05$, Tukey). 45

Figura 17. Tiempo Generacional y Tasa de Crecimiento poblacional de *Simocephalus vetulus*, sometida a bioensayos crónicos con tres diferentes concentraciones de extractos crudos (5, 10, 20%), usando *Scenedesmus acutus* a 1×10^6 cels ml^{-1} como alimento. Se presenta la media de cuatro réplicas \pm error estándar. Letras similares indican que no existen diferencias significativas ($P > 0.05$, Tukey). 46

Figura. 18. Curvas de supervivencia de *Daphnia magna* en presencia de tres concentraciones subletales de extracto crudo de cianobacterias (5, 10 y 20% de extracto), un control (con alimento) y un control negativo (ausencia de extracto y ausencia de alimento). Los símbolos representan los promedios \pm error estándar de cuatro réplicas de una cohorte de 20 individuos. 49

Figura 19. Fecundidad de *Daphnia magna* de tres concentraciones subletales de extracto crudo de cianobacterias (5, 10 y 20% de extracto) y controles (ausencia de extracto y ausencia de alimento). Los símbolos representan los promedios \pm error estándar de cuatro réplicas de una cohorte de 20 individuos. 50

Figura. 20. Promedio y Esperanza de Vida de *Daphnia magna*, sometida a bioensayos crónicos con tres diferentes concentraciones de extractos crudos (5, 10, 20%), usando *Scenedesmus acutus* a 1×10^6 cels ml^{-1} como alimento. Se presenta la media de cuatro réplicas \pm error estándar. Letras similares indican que no existen diferencias significativas ($P > 0.05$, Tukey). 51

Figura 21. Tasa de Reproducción bruta y Reproducción neta de *Daphnia magna*, sometida a bioensayos crónicos con tres diferentes concentraciones de extractos crudos (5, 10, 20%), usando *Scenedesmus acutus* a 1×10^6 cels ml^{-1} como alimento. Se presenta la media de cuatro replicas \pm error estándar. Letras similares indican que no existen diferencias significativas ($P > 0.05$, Tukey). 52

Figura 22. Tiempo Generacional y Tasa de Crecimiento poblacional de *Daphnia magna*, sometida a bioensayos crónicos con tres diferentes concentraciones de extractos crudos (5, 10, 20%), usando *Scenedesmus acutus* a 1×10^6 cels ml^{-1} como alimento. Se presenta la media de cuatro replicas \pm error estándar. Letras similares indican que no existen diferencias significativas ($P > 0.05$, Tukey). 53

Resumen

Los florecimientos algales nocivos de cianobacterias (CianoFANs) tienen efectos adversos sobre miembros del zooplancton debido a la producción de cianotoxinas, alterando así, las redes tróficas de los sistemas acuáticos. Para dimensionar esos daños se utiliza al cladócero *Daphnia magna*, la cual ha sido utilizada ampliamente en los ensayos ecotoxicológicos sin embargo se cuestiona su uso en aguas tropicales donde su presencia de forma natural es nula. Por lo tanto, es esencial buscar alternativas con organismos aislados de sistemas epicontinentales tropicales y subtropicales que permitan un diagnóstico adecuado. Es así que se evaluó la sensibilidad de tres especies nativas (*Daphnia laevis*, *Ceriodaphnia dubia* y *Simocephalus vetulus*), y como especie de referencia a *D. magna* ante el efecto de diferentes proporciones de un extracto crudo de cianobacterias.

De las muestras de florecimientos cianobacteriales del Lago de Zumpango, Edo. Mex colectados en el mes de febrero del 2022, se obtuvo un extracto crudo a través de cinco ciclos de Congelación/Descongelación/Sonicación a 20 MHz. Los extractos se mantuvieron en congelación hasta su uso en los bioensayos. Se evaluó la concentración de equivalentes de microcistina-LR disueltas mediante el Kit inmunológico de ELISA. La muestra de campo estuvo dominada por *Planktothrix cf. agardhii* con una densidad de 1.16×10^6 ind ml⁻¹. Se desarrollaron pruebas agudas (CL₅₀) y crónicas (Tabla de Vida). La concentración letal media para *D. magna* fue de 17.83% ($1.79 \mu\text{g L}^{-1}$) a 24 horas y 6.92% ($0.69 \mu\text{g L}^{-1}$) para *S. vetulus*, esta última fue la especie más sensible. Se concluye la importancia de usar especies nativas para el monitoreo y análisis de sistemas acuáticos con problemas por CianoFANs.

Introducción

Las cianobacterias son microorganismos fotosintéticos que subsisten en diversos entornos terrestres y acuáticos, son responsables de crear una atmósfera de oxígeno respirable desde hace más de 3500 millones de años, proporcionando la primera capa de ozono en el planeta (Briand *et al.*, 2003; Schopf, 2012). En general, la mayoría de los géneros de cianobacterias se desarrollan en sistemas acuáticos como lagos, estanques y ecosistemas marinos, donde representan una parte importante de los productores primarios (Moss, 2018). La presencia de cianobacterias está aumentando, sin embargo, la diversidad de los productores primarios ha disminuido en el último siglo (Boyce *et al.*, 2010). Sin embargo, por su amplia historia evolutiva, las cianobacterias han colonizado diversos nichos ecológicos, por ejemplo, algunas especies pueden llegar a vivir en condiciones extremas como en el círculo polar Ártico y Antártico o en las regiones ecuatoriales extremadamente cálidas (Tang *et al.*, 1997).

Existe una gran diversidad morfológica de cianobacterias, entre ellas esféricas, ovoides, cilíndricas, así como presentar formas multicelulares, coloniales y filamentosas, estas características hacen que sean difíciles de identificar. La clasificación taxonómica de las cianobacterias a lo largo de los años se ha ido modificando en diferentes estudios a través de la historia, debido a que presentan diversas características que se deben considerar para su identificación, como rasgos morfológicos, análisis filogenéticos moleculares, caracteres ecofisiológicos, bioquímicos y ecológicos (Komárek, 2010).

Mediante un enfoque polifásico moderno que incluye la secuenciación del gen 16S rADN. Actualmente se reconocen las familias heteróclitas (presencia de heterocito): *Nostocaceae*, *Hapalosiphonaceae*, *Fischerellaceae*, *Nostochopsidaceae*, *Chlorogloeopsidaceae*, *Tolypothrichaceae*, *Rivulariaceae*, *Microchaetaceae*, *Coleospermaceae*, *Simphyonemataceae* y *Scytonemataceae*. Por otro lado, algunos géneros de cianobacterias filamentosas sin heterocistos definidos: *Cyanobium*, *Halothece*, *Anathece*, *Gloeobacter*, *Nodosilinea*, *Oculatella*, *Willmottia*, *Synechococcus*, entre otros (Komárek, 2014).

Las cianobacterias presentan reproducción asexual, principalmente por división celular; a su vez, existen especies que forman filamentos, talos pluricelulares o colonias que pueden

dividirse por fragmentación. Otras especies forman hormogonios que son distintos segmentos de tricomas que, al separarse, actuaran en la reproducción, originando un nuevo organismo (Komárek & Johansen, 2014). Algunas especies se pueden diferenciar por células especializadas como los heterócitos (especializada en fijación de nitrógeno) y los acinetos que les permiten sobrevivir cuando se enfrentan a condiciones estresantes como períodos de sequía (Briand *et al.*, 2003).

Diversas especies tienen la capacidad de desarrollar vesículas de gas que les permite mantener una flotabilidad positiva, que es una ventaja cuando la tasa de mezcla vertical de la columna de agua es relativamente baja (Whitton, 2012). Entre los macronutrientes necesarios para el crecimiento de las cianobacterias se encuentra el fósforo (P) y el nitrógeno (N), en los sistemas enriquecidos con ambos nutrientes, las relaciones N:P pueden ser altas, llegando a presentarse en exceso y así favoreciendo la formación de los florecimientos, especialmente por géneros no fijadores de N_2 (Paerl & Fulton, 2006). Las cianobacterias que tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico (N_2) por medio de una estructura llamada heterocisto, sintetizan la enzima nitrogenasa, que les confiere una ventaja competitiva cuando las concentraciones combinadas de nitrógeno son bajas (Whitton, 2012).

En diversos sistemas acuáticos, algunas especies de cianobacterias llegan a constituir gran parte de la biomasa fitoplanctónica, especialmente durante el verano, formando con frecuencia fenómenos de crecimiento masivo denominados como florecimientos de algas nocivos "CianoFANs" (en inglés: blooms o scums) (Sevrin-Reyssac & Pletikosic, 1990; Ger *et al.*, 2014). Un CianoFAN es caracterizado por la dominancia de unas cuantas especies de cianobacterias, representando más del 80% de la biomasa total entre los productores primarios (Humbert & Fastner, 2017).

Las cantidades, proporciones y composición química de las diversas fuentes de N y P están relacionadas con la composición, magnitud y duración de los florecimientos en los sistemas acuáticos. Sin embargo, existen otros factores adicionales que son importantes en la determinación de la composición de los CianoFANs y su biomasa; la disponibilidad de materia orgánica, la atenuación de la luz, la descarga de agua dulce, las tasas de descarga

(tiempo de residencia) y la estabilidad de la columna de agua (Paerl, 2008; Paerl & Otten, 2013).

Las cargas de N y P excesivas por las modificaciones antropogénicas (agricultura, aguas residuales, la industria, etc.), aceleran el proceso de eutrofización y promueven los florecimientos de cianobacterias en los ecosistemas marinos y de agua dulce (Elmgren & Larsson, 2001). La eutrofización antropogénica, se presenta como un incremento en la concentración de nutrientes introducidos a un sistema acuático, originados principalmente por intervención humana, que aumenta la concentración de compuestos nitrogenados y fosfatados, lo cual, favorece la abundancia de cianobacterias, causando impactos ecológicos, sanitarios y económicos en diferentes sectores públicos (Ledesma *et al.*, 2013). Los cambios que se han presentado a través de los últimos años se deben al incremento en la aplicación de fertilizantes con gran cantidad de compuestos nitrogenados, escorrentías fluviales, desechos humanos y la deposición atmosférica, cada uno de ellos contiene diversas concentraciones de estos compuestos inorgánicos, que a su vez, conduce a altas cargas en cuerpos de agua que presentaban un estado oligotrófico (nutrientes escasos) y transformándolos en sistemas eutróficos (Paerl, 1997; Boyer *et al.*, 2006; Paerl, 2017).

Además, otro factor que favorece a las cianobacterias es el incremento térmico, estas alcanzan una tasa de replicación muy alta con temperaturas muy cálidas, en un rango de 25 a 35°C, favoreciendo a los géneros formadores de CianoFANs superficiales (Butterwick *et al.*, 2005; Reynolds, 2006). El calentamiento global, los niveles altos de dióxido de carbono atmosférico (CO₂) y el cambio climático global han aumentado a través de los años y por consecuencia modificado las redes tróficas de los sistemas acuáticos en el mundo, favoreciendo la intensidad y duración de estos (Ullah, *et al.*, 2018).

Cianotoxinas

Existen diversas especies de cianobacterias que tienen la capacidad de producir metabolitos secundarios que pueden ser tóxicos para diferentes organismos vivos que se encuentren en contacto directo con plantas, el zooplancton, peces, mamíferos entre ellos los seres humanos y así modificando gravemente las redes tróficas dónde se encuentran (Merel, *et al.*, 2013; Svirčev, *et al.*, 2017). Entre estos metabolitos se incluyen péptidos cíclicos como las Microcistinas y las Nodularias; entre los alcaloides se encuentran la Anatoxina-a, Anatoxina-a(S), Cilindrospermopsina, Saxitoxinas, Aplysiatoxinas y la Lyngbyatoxina. Recientemente, se han descrito aminoácidos no proteicos como el Beta-metilamino-L alanina (BMAA) y una gran variedad de Lipopolisacáridos (Moosová *et al.*, 2019; Sazdova *et al.*, 2022).

Entre los principales géneros productores de cianotoxinas en los sistemas acuáticos destacan *Microcystis*, *Nostoc*, *Cylindrospermopsis*, *Nodularia*, *Umezakia*, *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Raphidiopsis*, *Lyngbya*, *Planktothrix*, *Aphanizomenon*, *Cuspidothrix*, *Dolichospermum*, *Aphanizomenon*, *Phormidium*, *Anabaenopsis*, *Leptolyngbya*, *Synechococcus* (Carmichael, 2001; Huisman *et al.*, 2018)

Actualmente no se tiene un estudio exacto sobre el motivo por el que las cianobacterias producen estas toxinas, pero existen experimentos donde se ha destacado que su biosíntesis es influenciada por distintas concentraciones de nitrógeno y fósforo, son importantes para la regulación de la transcripción de ciertos genes promotores de los metabolitos secundarios como las *mcy* para las microcistinas, la salinidad, la baja concentración de hierro (nutrientes y metales traza), la intensidad de luz, el pH y la temperatura (Neilan, *et al.*, 2013). También, las cianotoxinas podrían funcionar como elementos disuasorios contra el pastoreo, una clara adaptación coevolutiva entre las cianobacterias y el zooplancton (Jiang, *et al.*, 2016).

Entre las cianotoxinas más estudiadas destacan las microcistinas-LR que su exposición tiene un efecto de alto riesgo en los mamíferos incluyendo los humanos, inhiben las proteínas fosforiladas, (PP1- PP2B, PP4 y PP6) lo que ocasiona la formación de tumores o daños asociados al sistema hepático, con síntomas de intoxicación relacionados a gastroenteritis,

necrosis, cáncer primario hepático que finalmente podría concluir en la muerte de los organismos expuestos (Fontanillo & Kohn 2018), es por eso que la Organización Mundial de la Salud ha establecido un valor guía de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ para fuentes de abastecimiento de agua potable (Chorus & Bar 1991).

Se ha relacionado la biomasa de las cianobacterias con la concentración de microcistinas que un florecimiento puede producir; sin embargo, recientes investigaciones han demostrado que su biosíntesis está más relacionada en los genes implicados en su producción (mcy). La presencia o ausencia de este clúster genético es una herramienta para discriminar entre cepas con potencial tóxico y de aquellas que no lo son (Salmazo *et al.*, 2016)

Zooplancton

El zooplancton forma parte de las redes alimentarias acuáticas, debido a su gran abundancia y funciones vitales en el ecosistema, estos organismos proporcionan la vía principal para la transferencia de energía desde los productores primarios hasta los consumidores en niveles tróficos superiores (Moss, 2018). Los organismos del zooplancton, (rotíferos, cladóceros, copépodos, etc.), son el principal alimento de diversos organismos acuáticos como los peces, principalmente durante las etapas iniciales de su ciclo de vida debido a su tamaño y alta calidad nutricional (Lampert & Sommer, 2007). Es un grupo muy diverso y por lo tanto realizan diferentes funciones (transferencia energética de los productores primarios y secundarios a los productores terciarios en las redes tróficas) en los sitios donde habitan.

Los cladóceros son un componente importante en las cadenas tróficas acuáticas y debido a su sensibilidad han sido utilizados para evaluar la interacción entre el zooplancton y las cianobacterias (Ger *et al.*, 2016). Tienen un comportamiento relativamente simple y es susceptible de manipulación experimental y mediciones automatizadas, esto hace que sea más fácil investigar los impactos potenciales de las cianotoxinas que intervienen en su desarrollo natural de una manera más práctica en comparación con niveles tróficos más altos (Richardson, 2008).

Los CianoFANs llegan a dominar los ecosistemas de agua dulce, ya que son resistentes al pastoreo de los organismos zooplanctónicos (De Bernardi & Giussani, 1990). El zooplancton

es un acumulador eficiente de cianotoxinas a lo largo de la cadena alimentaria, (Ferrão-Filho, et al., 2002), pero esto presenta algunas desventajas para los organismos, pues se presentan algunos puntos importantes con el problema de la idoneidad de las cianobacterias como alimento; el primero es la interferencia mecánica; la filtración se ve afectada por las distintas formas que presentan las cianobacterias (colonias, filamentosas, etc.) y las cianotoxinas para los organismos (De Bernardi & Giussani, 1990), además, el mecanismo de toxicidad depende también de cada una de las especies expuestas, aun cuando sean del mismo género (Asselman, et al., 2014).

Diversas agencias ambientales han desarrollado protocolos específicos usando a *Daphnia magna* como centinela del efecto deletéreo de diversos contaminantes (Versteeg et al., 1997). En la norma mexicana (NMX-AA-087-SCFI-2010) para la evaluación de toxicidad aguda se establece el uso de *Daphnia magna* y dicromato de potasio como tóxico de referencia para la medición en aguas y en sustancias solubles en agua en cuerpos de agua dulce, aguas residuales industriales y municipales. Sin embargo, la Comisión Nacional del Agua (CONAGUA) recomiendan usar en ensayos de toxicidad especies nativas de la zona de valoración. Debido a que proporciona una imagen más precisa del riesgo ecológico y reduce la expansión de especies exóticas potencialmente invasoras (Mendoza-Cantú et al., 2007; Lopes et al., 2011).

Las pruebas toxicológicas agudas se basan en la mortalidad de los organismos expuestos a lo largo de un periodo de tiempo (usualmente 24 o 48 h), con la finalidad de determinar la concentración que altera a la mitad de los organismos sometidos (OECD, 2004; Herrera et al., 2015). Por otro lado, las pruebas crónicas evalúan el efecto subletal durante un periodo de tiempo mayor (10 y 20% de la historia de vida de un organismo) a lo largo de la historia de vida. La duración de vida de una especie se puede estudiar mediante experimentos de tabla de vida o crecimiento poblacional, ambos registran las variaciones demográficas relacionadas a los cambios en la supervivencia y la fecundidad; sin embargo, el primero de estos experimentos no está sometido a la presión por competencia intraespecífica. Su uso en ecotoxicología permite valorar el efecto de numerosos estresores ambientales sobre los

organismos, y conocer si existen efectos negativos, sinérgicos, así como la forma de compensarlos (Allan, 1976; Sarma & Nandini, 2006).

Antecedentes

Antoniou *et al.* (2005) realizaron una revisión sobre las toxinas que generan las cianobacterias y los efectos adversos que pueden causar a los cuerpos de agua, las toxinas más preocupantes son los derivados de la Microcistina que son péptidos cíclicos (hepatotoxinas), y Cilindrospermopsina, anatoxina-a, saxitoxina y anatoxina-a (s), que son todos alcaloides (neurotoxinas). Se hace énfasis en una microcistina en particular, la variante-LR (L y R significan leucina y arginina, respectivamente). Su alta estabilidad en condiciones extremas y alta solubilidad en agua se atribuyen a su estructura química cíclica y a sus grupos funcionales, respectivamente. Puede persistir en los sistemas acuáticos durante días antes de que se produzca una degradación significativa. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció el límite de concentración provisional para MC-LR en agua potable de $1 \mu\text{g L}^{-1}$. La OMS también ha establecido el límite de ingesta diaria tolerable (TDI) en $0.04 \mu\text{g Kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ ya que estas toxinas se acumulan en los microorganismos acuáticos que consume el ser humano y por su uso como suplementos alimenticios.

Okumura *et al.* (2007) llevaron a cabo la evaluación de la toxicidad de un extracto crudo de cianobacterias en distintos cladóceros (*Ceriodaphnia silvestrii*, *Ceriodaphnia dubia* y *Daphnia similis*) donde expusieron cinco neonatos (<24 h de edad) de cada especie a diferentes concentraciones de microcistina de dos embalses diferentes de 7.8, 15.5, 31.1, 62.2 y $124.4 \mu\text{g g}^{-1}$ para Barra Bonita y 6.6, 12.2, 26.2, 53.0 y $106.0 \mu\text{g g}^{-1}$ para Ibitinga, sitios ubicados en Brasil, a una temperatura de 25°C . Los resultados muestran que el extracto de material de floración crudo del embalse de Ibitinga tuvo mayor toxicidad para los cladóceros que el de Barra Bonita. Los valores de CE_{50} a las 48 h para Barra Bonita fueron de 73.1 y $80.2 \mu\text{g g}^{-1}$ de material liofilizado para *Ceriodaphnia dubia* y *C. silvestrii*, respectivamente ya que fueron aproximadamente dos veces superiores a las obtenidas para Ibitinga de 32.6 y $35.8 \mu\text{g g}^{-1}$ de material liofilizado para *C. dubia* y *C. silvestrii*, respectivamente, revelando una mayor toxicidad en el material del embalse de Ibitinga.

Vasconcelos *et al.* (2010) realizaron un estudio sobre la ocurrencia de microcistinas en ocho lagos del centro de México, en lagos naturales (Zumpango, Laguna Atotonilco y Ciénega Chica), embalses (Los Ángeles y Valle de Bravo), canales artificiales (Cuemanco, Tlameleca) y lagos urbanos (Chapultepec). Se utilizaron distintas técnicas microscópicas para la identificación y recuentos de cianobacterias, inmunológicas como ELISA, químicos como MALDI-TOF y moleculares utilizando PCR para realizar un análisis de muestras de agua y de los florecimientos recolectados. La densidad mayor de cianobacterias que se obtuvo varió de 1.6×10^3 células mL^{-1} en Tlameleca a 7.5×10^6 células mL^{-1} en Chapultepec (Lago Mayor), lo que representa entre el 67 y 100% de la densidad total de fitoplancton. La concentración de microcistinas totales varió de 4.9 a $78 \mu\text{g L}^{-1}$ de equivalentes de MC-LR. Las especies dominantes encontradas fueron *Microcystis aeruginosa* en Chapultepec, Zumpango y Presa Los Ángeles. *Microcystis panniformis* y *Microcystis protocystis* en Chapultepec, Zumpango y Ciénega Chica, *Plancktothrix agardhii* en Cuemanco, *Merismopedia* sp. para Ciénega Chica y *Pseudanabaena mucicola* en Chapultepec y Zumpango.

Bednarska *et al.* (2011) utilizaron para su experimento cuatro clones de *Daphnia magna* para evaluar el efecto de la cianobacteria *Cylindrospermopsis raciborskii* que tiene sobre este cladóceros en función de la temperatura la cual se utilizó dos medios a 20 y 24°C haciendo referencia a los registros de temperatura que se han encontrado en un lago de Polonia y al cambio que ha sufrido debido a al cambio climático. Se midió la edad de la primera reproducción y la longitud del cuerpo en la primera reproducción, se obtuvo que la temperatura elevada puede reforzar el efecto negativo de las cianobacterias sobre los cladóceros de gran tamaño como *Daphnia magna*, esto puede conducir a una selección de clones mejor adaptados y, por tanto, a cambios microevolutivos en las poblaciones de esta especie.

Han *et al.* (2012) llevaron a cabo un experimento donde se pretendía que la presencia de cianobacterias en un embalse de Liuxihe China, afectaba la distribución de *Daphnia galeata*, se utilizaron tres cepas de *Microcystis aeruginosa*: MC1, MC2 y MC3, y una cepa de *Pseudoanabaena* sp., junto con una microalga *Chlorella pyrenoidosa*, estas cepas son

diferentes en cuanto a su morfología, composición bioquímica y contenido de toxinas celulares pues todas provenían de embalses diferentes. Se realizaron combinaciones de alimento (*Chlorella*) con distintos porcentajes de las diferentes cepas de cianobacterias, 20, 50, 80 y 100% de cada cepa como alimento, y se demostró que los alimentos mixtos afectan la vida útil y la supervivencia de *D. galeata* porque las cianobacterias son un alimento de baja calidad.

Huang *et al.* (2012) realizaron un trabajo donde se evaluó el efecto de la microcistina-LR sobre el crecimiento poblacional de *Brachionus calyciflorus* a diferentes temperaturas, las concentraciones que se utilizaron de la cianotoxina fueron de 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 y 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ y las temperaturas fueron 20, 25 y 30°C. Realizaron cuatro réplicas para cada tratamiento y también un control de medio EPA, se iniciaron introduciendo 10 neonatos, y se demostró que las altas temperaturas estimulan significativamente el crecimiento de los rotíferos y también mostraron una alta tolerancia a la microcistina-LR para todas las concentraciones usadas en este experimento y el crecimiento de la población de los rotíferos se destacó a diferentes concentraciones de MC-LR a 30°C.

Araiza *et al.* (2020) realizaron experimentos donde se expuso a *Simocephalus vetulus* a extractos crudos de *Microcystis aeruginosa* de una pista de remo y canotaje de Xochimilco a dos temperaturas (18 y 25°C). Para las pruebas ecotoxicológicas agudas encontró una concentración letal media de 2.05 $\mu\text{g L}^{-1}$ para 18°C y 1.69 $\mu\text{g L}^{-1}$ para 25°C, en las pruebas crónicas la supervivencia disminuyó en ambas temperaturas para cada tratamiento, mientras que aumentó y disminuyó la fecundidad dependiendo de la temperatura. Se observó que el incremento de la temperatura logró agudizar la respuesta de *S. vetulus* al extracto crudo, ya que debido al aumento de su metabolismo -por ser un organismo ectotérmico- da como resultado que asimilen en menor tiempo sustancias y los efectos se presenten de manera más rápida pues se necesita una menor cantidad de extracto para provocar un efecto.

Bustillos-Guzmán *et al.* (2020) llevaron a cabo un estudio de microcistinas en el lago del cráter Santa María del Oro, México, donde identifican y cuantifican mediante un detector de fluorescencia HPLC y UHPLC-MS/MS las toxinas presentes, demostrando la presencia de

siete análogos de microcistinas (MC-WR, MC-LR, MC-LA, MC-HiIR, MC-LF, MC-YR y MC-LY). Las concentraciones totales de microcistinas fueron de 0.15 y 6.84 $\mu\text{g kg}^{-1}$ y los congéneres MC-WR, MC-LR y MC-LA dominaron el perfil de toxinas, representando el 94.5% de la muestra total sobre una base de concentración porcentual, y cada uno de estos congéneres contribuyó con el 39.8, 38.1 y 16.5% por concentración relativa, respectivamente, se confirmó que el florecimiento fue causado por las cianobacterias *Lyngbya robusta* y *M. aeruginosa*, aunque la primera en cantidades menores.

Justificación

En los últimos años, numerosos estudios han indicado que la eutrofización, el aumento de los niveles de CO_2 y el calentamiento global pueden aumentar la frecuencia, intensidad y duración de las floraciones de cianobacterias en muchos ecosistemas acuáticos de todo el mundo (Paerl & Huisman, 2008; Ullah, *et al.*, 2018). La investigación acerca de los CianoFANS en el país y en el mundo es de suma importancia, pues estos organismos son capaces de generar cambios drásticos en los sistemas acuáticos epicontinentales, modificando las cadenas tróficas y afectando la salud de los seres humanos. En aproximadamente los últimos 500 años las modificaciones antropogénicas en los sistemas lacustres del Valle de México han resultado en un incremento irreversible en la temperatura, generando un microclima regionalmente (Ruiz-Angulo & López-Espinoza, 2015).

Diversos sistemas acuáticos mexicanos han demostrado el incremento térmico debido a la actividad antropogénica, como los cambios de paisaje a zonas agrícolas y de pastoreo, también han contribuido a los cambios del clima a escala regional (Jáuregui *et al.*, 2004). Actualmente, se tiene un registro de los sistemas acuáticos que presentan problemas de contaminación en México, en el año 2020 se registró la red de agua superficial que estuvo constituida por 3,493 sitios y la calidad del agua se midió a través de 8 indicadores: Demanda Bioquímica de Oxígeno a cinco días (DBO_5), Demanda Química de Oxígeno, Sólidos Suspendidos Totales, Coliformes Fecales, *Escherichia coli*, Enterococos, Porcentaje de Saturación de Oxígeno y Toxicidad. De esta manera, se determinan los límites aceptables de calidad de agua teniendo un total de 2,225 cuerpos de agua contaminados equivalente al

63.7% del total de sitios monitoreados (CONAGUA, 2021). Este alto porcentaje de sistemas contaminados, posiblemente con problemas de eutrofización., en conjunto con el calentamiento global propicia escenarios ideales para la proliferación de CianofANs, propiciando cambios en las características ambientales y reducción de la diversidad o abundancia de especies zooplanctónicas que habitan en estos sistemas acuáticos. Aunando a lo anterior; diversas cianobacterias son capaces de producir distintos metabolitos secundarios, lo que conlleva a que existan diferentes especies de cianobacterias y posiblemente diversas cianotoxinas (Merel *et al.*, 2013). Teniendo en cuenta que no hay certeza de que el efecto sólo sea por algunas cianotoxinas específicas como las microcistinas, también puede ser la interacción de otros metabolitos secundarios con características tóxicas (Arzate-Cárdenas *et al.*, 2010).

El uso de extractos crudos está pensado para representar los eventos que ocurren de manera natural al romper las células y liberar las cianotoxinas al medio. Los organismos del plancton son vulnerables a las toxinas debido a que son los primeros expuestos; sin embargo, su respuesta a estos metabolitos es ampliamente variable entre especies, mostrando variaciones morfológicas, fisiológicas, conductuales, etc. Ha sido demostrado que algunas especies tienen la capacidad de tolerar las cianotoxinas debido al desarrollo de tolerancia fisiológica y genética y al proceso de coexistencia con estos productores primarios (Zamora-Barrios *et al.*, 2023, en preparación).

Los cladóceros han sido ampliamente utilizados para evaluar la relación zooplancton-cianobacteria en diversos sistemas acuáticos templados como tropicales, *Daphnia magna* es una especie de zonas templadas utilizada ampliamente en los ensayos ecotoxicológicos, pero se cuestiona su uso en aguas tropicales donde no tiene registros previos, o si existe, es considerada una especie exótica con potencial invasor. Por lo tanto, resulta vital ofrecer alternativas de organismos aislados de nuestros sistemas epicontinentales (especies nativas), que permitan una evaluación eficiente no sólo de las cianotoxinas, sino de cualquier compuesto con potencial tóxico.

Hipótesis

Si el extracto crudo obtenido de un CianoFAN presente en la laguna de Zumpango contiene altas concentraciones de microcistinas; entonces, la exposición aguda y crónica de especies nativas de cladóceros (*Daphnia laevis*, *Simocephalus vetulus* y *Ceriodaphnia dubia*) y una especie de prueba en las directrices internacionales (*Daphnia magna*) a los extractos crudos, estaría asociado a cambios negativos sobre sus variables demográficas seleccionadas.

Objetivos

Objetivo General:

Evaluar el efecto ecotoxicológico que representa el extracto crudo de un CianoFAN presente en la Laguna de Zumpango sobre las características demográficas de *Daphnia magna*, *Daphnia laevis*, *Ceriodaphnia dubia* y *Simocephalus vetulus*.

Objetivos Particulares:

- Realizar un extracto crudo del consorcio de cianobacterias presentes en la Laguna de Zumpango.
- Determinar la concentración de equivalentes de microcistinas-LR disueltas en el extracto crudo, mediante la técnica inmunológica de ELISA.
- Evaluar el efecto toxicológico mediante pruebas agudas (concentración letal 50) con diferentes concentraciones del extracto crudo cianobacterial sobre *D. magna*, *D. laevis*, *C. dubia* y *S. vetulus*.
- Evaluar el efecto crónico del extracto crudo mediante bioensayos de Tabla de vida sobre *D. magna*, *D. laevis* y *S. vetulus*.
- Establecer la sensibilidad relativa de *D. laevis*, *C. dubia* y *S. vetulus* con relación a *D. magna* expuestas a un tóxico de referencia (dicromato de potasio) y a un extracto crudo de cianobacterias.

Materiales y métodos

Recolecta de muestra del florecimiento de cianobacterias

El lago de Zumpango es un embalse de gran altitud (2250 m sobre el nivel del mar), con una capacidad de almacenamiento de agua de $100 \times 10^6 \text{ m}^3$ y una superficie de 20 km^2 . Es un lago poco profundo (1.2–3.8 m) que está ubicado entre los municipios Zumpango de Ocampo y Teoloyucan, ambos en el Estado de México a $19^\circ 48' \text{ N}$ y $99^\circ 06' \text{ W}$ (Zamora-Barrios *et al.*, 2019). Forma parte de la Región Hidrológica Prioritaria “Remanentes del Complejo Lacustre de la Cuenca de México”, donde existen problemas de eutrofización por una mal planificación urbana (Maldonado., 2005; IMTA, 2012).

La mayor parte del agua utilizada, de acuerdo a las concesiones, es destinada al uso agrícola pero no se considera adecuada para el desarrollo de la vida acuática debido a los niveles altos de contaminación, por lo que en la normatividad estos valores sobrepasan los límites establecidos para la calidad del agua (IMTA, 2012). Una muestra directa del florecimiento de cianobacterias se obtuvo de la zona litoral de este sistema (Fig.1). Esta se depositó en un contenedor plástico de 10 L de capacidad, y una submuestra de 50 ml fue fijada con formol al 3% para la identificación y cuantificación de la abundancia de las especies principales presentes en el consorcio de cianobacterias.

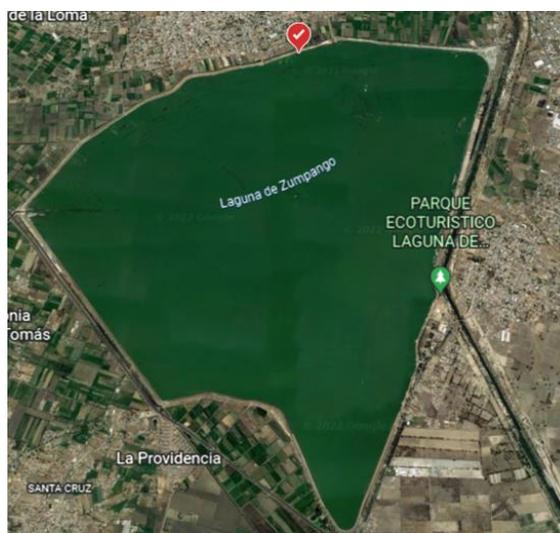


Figura 1. Sitio de recolección en el lago de Zumpango, Estado de México. Tomado de Google Earth.

Aislamiento y mantenimiento de los organismos de bioensayos

La recolección de las muestras se realizó en el mes de enero del 2022. Se filtraron 20 L de la zona superficial con una red para zooplancton de 45 μm de apertura de poro. Posteriormente, en el laboratorio con el uso de un microscopio estereoscópico (Nikon, SMZ645) y pipetas Pasteur se aislaron los cladóceros presentes en ese momento en el sistema. A partir de la inoculación de una hembra partenogénica, se establecieron las poblaciones de *Daphnia laevis*, *Ceriodaphnia dubia* y *Simocephalus vetulus*. Por otra parte, *Daphnia magna* fue proporcionada por el Instituto de Mexicano de Tecnología del Agua. Las poblaciones monoclonales se mantuvieron en contenedores de vidrio de 2 L de capacidad con medio EPA (agua moderadamente dura), previamente preparado disolviendo 1.2 mg de CaSO_4 , 1.2 mg de MgSO_4 , 1.9 mg de NaHCO_3 y 0.04 de KCl en 20 L de agua destilada (este medio se mantuvo a temperatura ambiente), y se alimentaron con una dieta exclusiva de *Scenedesmus acutus*. Para el mantenimiento de los cultivos stock se hizo la renovación del medio cada tercer día, filtrando el medio a través de una malla de 200 μm . Los cultivos fueron mantenidos con un ciclo de luz de 16:8 horas hasta su uso en los bioensayos de toxicidad aguda y crónica.

Como se menciona previamente, la alimentación de los cladóceros consistió en una fuente de carbono provista por el alga verde *Scenedesmus acutus*. Esta fue cultivada en botellas de 2 L desechables, usando medio basal Bold como fuente de nutrientes (Borowitzka & Borowitzka, 1988) y se cosechó hasta alcanzar su fase exponencial (aproximadamente, 8-10 días), después el alga fue sedimentada y decantada junto con agua destilada para su aprovechamiento, finalmente mediante un hematocitómetro (cámara de Neubauer) fue cuantificada su densidad.

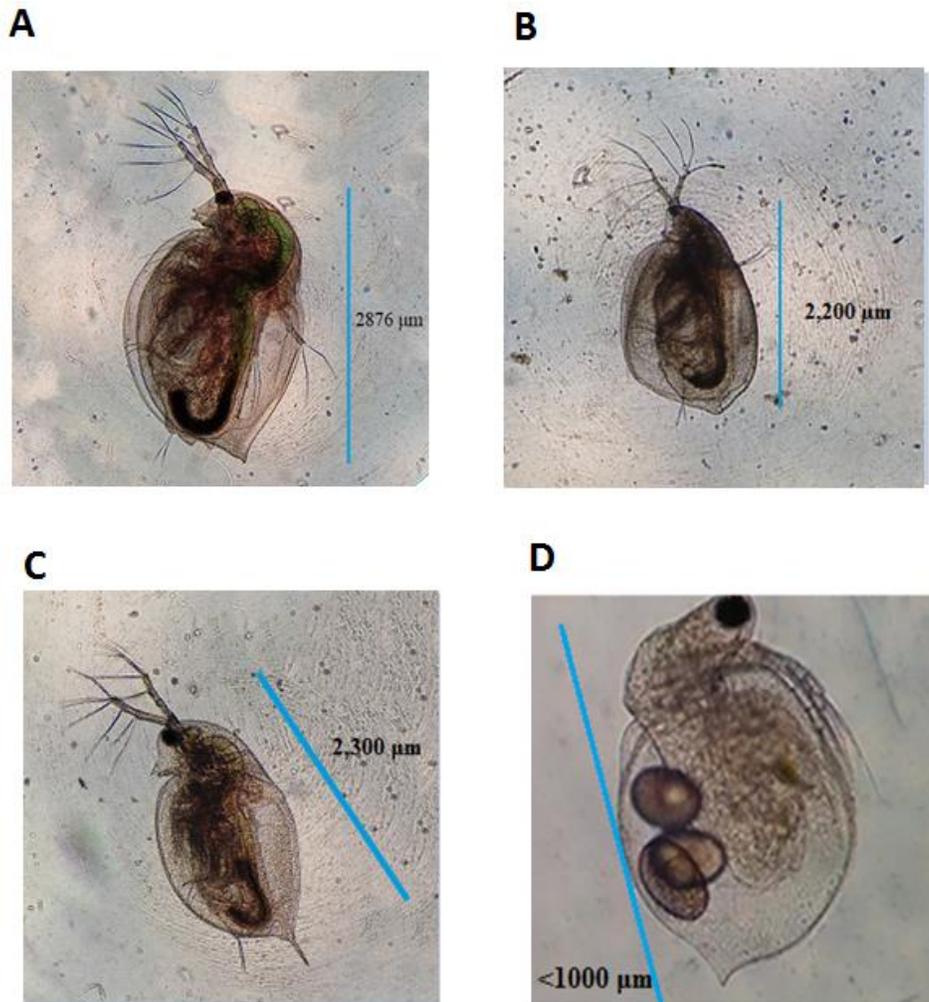


Figura 2. Especies de cladóceros encontrados en la laguna de Zumpango en el mes de enero; **C.** *Daphnia laevis*, **B.** *Simocephalus vetulus*, **D.** *Cerodaphnia dubia* y la especie proporcionada por el Instituto de Mexicano de Tecnología del Agua; **A.** *Daphnia magna*.

Identificación y cuantificación de las cianobacterias

La muestra preservada fue fotografiada y se obtuvieron las medidas del diámetro y el largo y ancho de las células vegetativas de las cianobacterias filamentosas, mediante la aplicación informática del programa Motic images plus 3.0. Estas características morfológicas fueron utilizadas para la identificación de las especies siguiendo las indicaciones de claves taxonómicas especializadas, basadas en los caracteres anatómicos diacríticos (Anagnostidis & Komárek, 1990; Hindák, 2008). Para la cuantificación de las cianobacterias se utilizó la

cámara de Sedgwick-Rafter, tomando en cuenta tres repeticiones de la muestra fijada y se obtuvo un valor promedio.

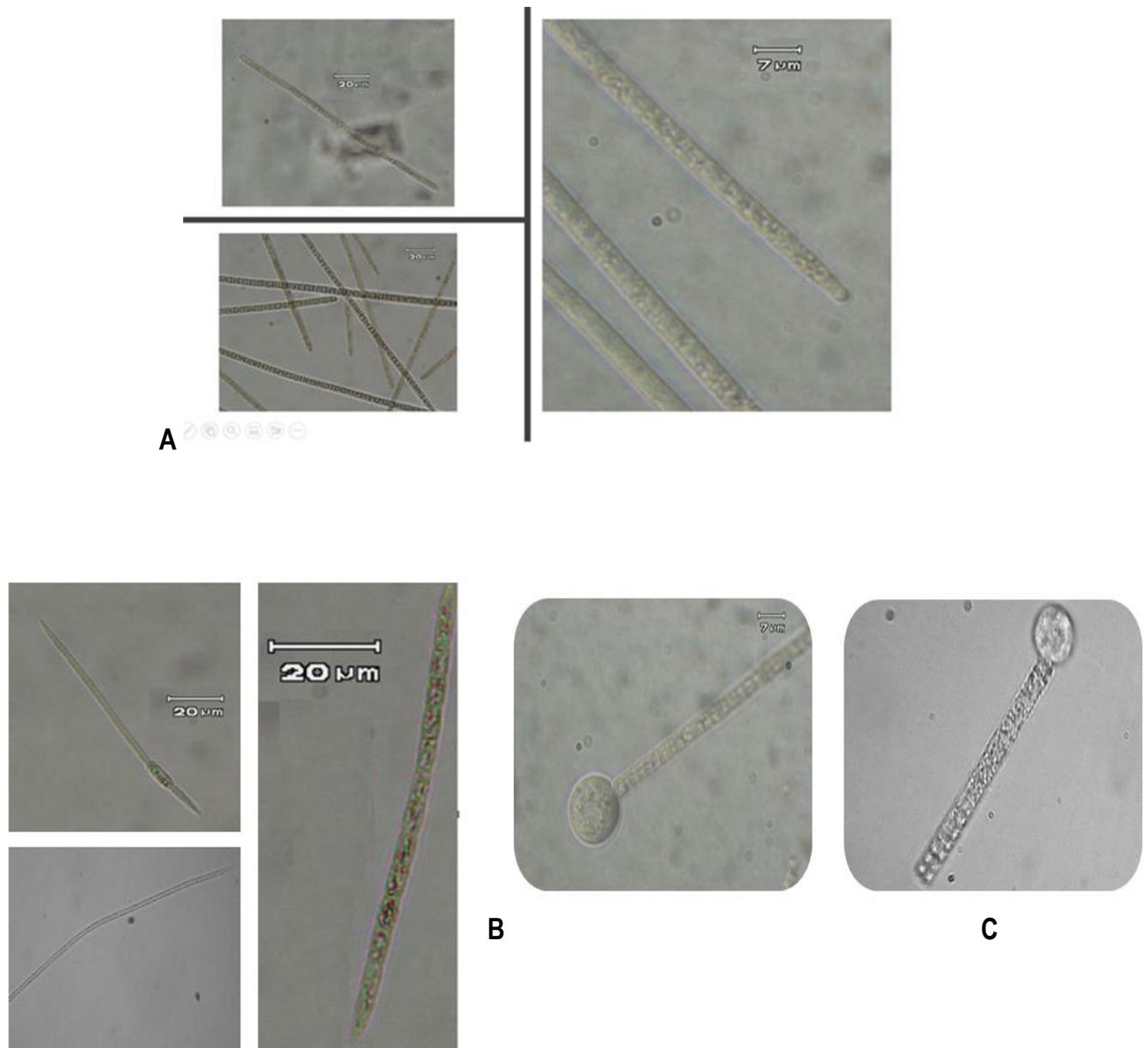


Figura 3. Especies de cianobacterias encontradas en los florecimientos de cianobacterias de la laguna de Zumpango; **A.** *Planktothrix agardhii*, **B.** *Cylindrospermopsis cf. raciborskii* y **C.** *Dolichospermum* sp.

Preparación del extracto crudo del florecimiento cianobacterial

Para poder obtener el extracto crudo del florecimiento la muestra se somete a un ciclo de congelación-descongelación y una posterior sonicación, creando que las células entren en un proceso de lisis y así obtener las cianotoxinas intracelulares. La muestra se congeló a -70°C y se descongeló a temperatura ambiente durante 24 horas. Para sonicar la muestra se mantuvo durante 10 min a 20 MHz, y posteriormente se colocó en el ultracongelador nuevamente hasta alcanzar cinco ciclos (Piestch, *et al.*, 2001; Nandini *et al.*, 2020). Por último, se centrifugó a 4000 rpm por 30 minutos y se filtró a través de membranas Millipore ($0.45\ \mu\text{m}$) para remover todos los restos celulares. Finalmente, la muestra obtenida se mantuvo en congelación hasta su utilización en los bioensayos con los cladóceros.

Determinación de la concentración de microcistinas

Para determinar la concentración de microcistinas-LR se realizó una prueba inmunológica, mediante el kit comercial basado en el ensayo de ELISA “QuantiplateTMKit for Microcystins” de EnvirologixTM (USA), siguiendo las especificaciones del fabricante. Los anticuerpos utilizados con este método son de origen policlonal y se suministran como antisuero de inmunoglobulina purificada, son empleados como conjugados no marcados o enzimáticos y reaccionan con un antigénico determinado, en este caso las microcistinas-LR y sus equivalentes.

Solución estándar (dicromato de potasio)

El estándar utilizado en esta investigación fue de la marca Fermont (Productos Químicos Monterrey) con número de LOTE: 044101, CAS: 7778-50-9. La solución estándar de Dicromato de potasio (de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) se preparó pesando 50 mg aforados en un matraz volumétrico de 100 ml con agua desionizada. Esta solución se conservó en oscuridad y refrigeración a $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ hasta por doce meses. A partir de esta solución se establecieron las concentraciones necesarias para la prueba de toxicidad aguda, de acuerdo con la norma mexicana para el análisis de agua (NMX-AA-087-SCFI-2010).

Prueba de toxicidad aguda con el tóxico de referencia (dicromato de potasio)

Se realizaron los bioensayos de toxicidad aguda con diferentes cladóceros (*Daphnia magna*, *Daphnia laevis*, *Ceriodaphnia dubia* y *Simocephalus vetulus*) para determinar la concentración letal media (CL₅₀) durante la exposición con el dicromato de potasio. El diseño experimental consistió en exponer 20 neonatos (<24 h de edad) de cada una de las especies de cladóceros por separado, en frascos de vidrio con diferentes concentraciones con el dicromato de potasio en medio de cultivo EPA. Se realizaron soluciones con diferentes concentraciones del tóxico, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 y 1.5 mg L⁻¹, todos los tratamientos tuvieron cuatro repeticiones junto con un grupo control negativo. Todos los tratamientos se colocaron en una incubadora a 20 ± 2°C y posteriormente se cuantificó la sobrevivencia de los individuos transcurridas 24 y 48 horas con el uso de un microscopio estereoscópico.

Sensibilidad relativa

Se calculó mediante la siguiente fórmula (Von der Ohe & Liess, 2004):

$$SR = \log (CL_{50} D. magna / CL_{50i})$$

Donde: SR= sensibilidad relativa; CL₅₀ *D. magna* = valor CL₅₀ para *D. magna* y CL_{50i} = valor para la especie i. Un valor cero indica una sensibilidad igual a la de *D. magna*, el valor positivo *D. magna* es menos sensible valor negativo *D. magna* es más sensible.

Prueba de toxicidad aguda con extracto crudo

Se realizaron los bioensayos de toxicidad aguda con diferentes cladóceros (*Daphnia magna*, *Daphnia laevis*, *Ceriodaphnia dubia* y *Simocephalus vetulus*) para determinar la concentración letal media (CL₅₀) durante la exposición al extracto crudo obtenido de Zumpango. El diseño experimental consistió en exponer 20 neonatos (<24 h de edad) de cada una de las especies de cladóceros, en frascos de vidrio a diferentes proporciones, del

extracto crudo en medio de cultivo EPA. Se realizaron soluciones con diferentes porcentajes del extracto empezando desde 1.25 hasta 40%, todos los tratamientos tenían cuatro repeticiones junto con un grupo control negativo. Todos los frascos se colocaron en una incubadora a $20 \pm 2^\circ \text{C}$ y posteriormente se registró la sobrevivencia de los individuos a 24 y 48 horas.

Prueba de toxicidad crónica con extracto crudo (Tabla de Vida)

Para la prueba crónica, se realizó el experimento demográfico de tabla de vida para cada una de las especies. Se colocaron 20 neonatos de cada especie en un volumen de 40 ml, utilizando tres concentraciones subletales del 5, 10 y 20% del LC_{50} , estas concentraciones se mezclaron en medio de cultivo EPA y se añadió *Scenedesmus acutus* a una concentración de 1×10^6 células ml^{-1} como alimento. Cada uno de los experimentos contaba con un grupo control negativo (sin alimento), un control y cada tratamiento con cuatro réplicas.

Todos los días se cuantificó los individuos sobrevivientes. Los neonatos también fueron contados a excepción que cada día fueron retirados de los tratamientos, debido a su ciclo reproductivo todos los cladóceros se cuantifican cada 24 horas. Continuando el experimento hasta que todos los organismos de la cohorte inicial perecieron. A partir de los datos obtenidos se calculó la supervivencia y fecundidad y los parámetros de Tabla de Vida con las fórmulas propuestas por Krebs (1985):

Promedio de vida

l_x = Proporción de organismos que sobreviven al inicio del intervalo x .

$$= \sum_0^{\infty} l_x \infty$$

Esperanza de vida

e_x = Esperanza promedio de vida para los organismos que están vivos al comienzo del periodo de edad x .

T_x = Sumatoria de número de individuos vivos en promedio, durante el intervalo de edad.

n_x = Número de individuos al inicio del intervalo de edad x .

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

Tasa Reproductiva bruta

m_x = Proporción de hembras nacidas en el intervalo de tiempo x.

$$= \sum_0^{\infty} m_x$$

Tasa Reproductiva neta

$$= \sum_0^{\infty} l_x m_x$$

Tiempo generacional

R_0 = Índice de multiplicación por generación o promedio del número de descendientes por hembra.

T= Duración promedio de una generación o periodo promedio que transcurre entre el nacimiento de la hembra progenitora y la descendencia.

$$T = \frac{\sum l_x m_x x}{R_0}$$

Tasa intrínseca de incremento poblacional resuelta iterativamente

r_x = índice de estimación aproximada de incremento poblacional para generaciones traslapadas.

$$\sum_{x=w}^n e^{-rx} l_x m_x = 1$$

El análisis estadístico de los datos obtenidos y las visualizaciones gráficas de ambas evaluaciones fueron realizados con el programa Sigma Plot 11.0.

Resultados

Identificación y cuantificación de las cianobacterias

De la muestra que se obtuvo del florecimiento cianobacterial se identificaron tres especies de cianobacterias, entre ellas *Planktothrix cf. agardhii* que obtuvo una densidad $> 1,166,000$ ind ml^{-1} , seguida de *Cylindrospermopsis cf. raciborskii* y *Dolichospermum sp.* con una densidad < 45 ind ml^{-1} (Tabla. 1).

Tabla 1. Promedios de conteos de cianobacterias por mililitro de la muestra tomada de la Laguna de Zumpango

Especie	Conteo
<i>Planktothrix cf. agardhii</i>	1,166,600 ind ml^{-1}
<i>Cylindrospermopsis cf. raciborskii</i> ,	45 ind ml^{-1}
<i>Dolichospermum sp.</i>	3 ind ml^{-1}

Determinación de la concentración de microcistinas

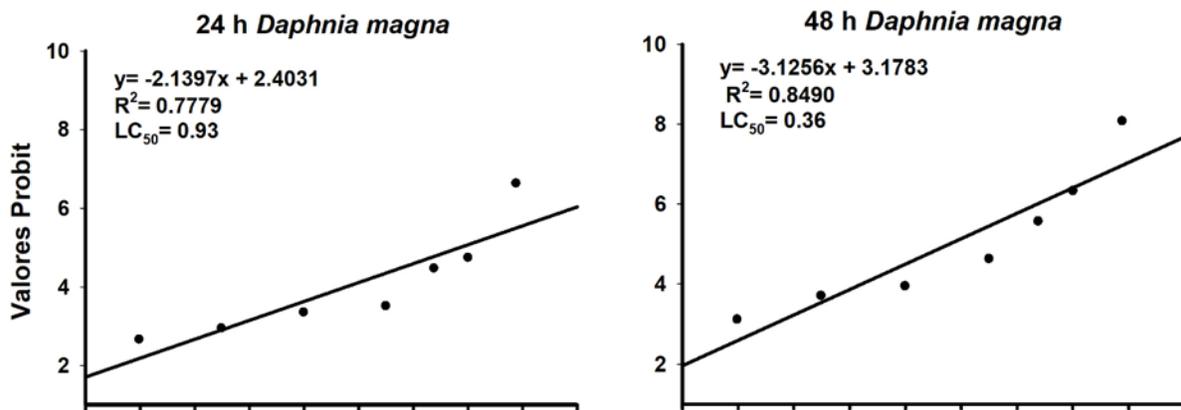
De la muestra que se recolectó, se obtuvo una concentración de $10.0795 \mu\text{g L}^{-1}$ de equivalentes de microcistina-LR del 100% del extracto total, se interpoló a las distintas proporciones para determinar la concentración letal media y a su vez obtener la cantidad de microcistina.

Prueba de toxicidad aguda con el tóxico de referencia (CL_{50})

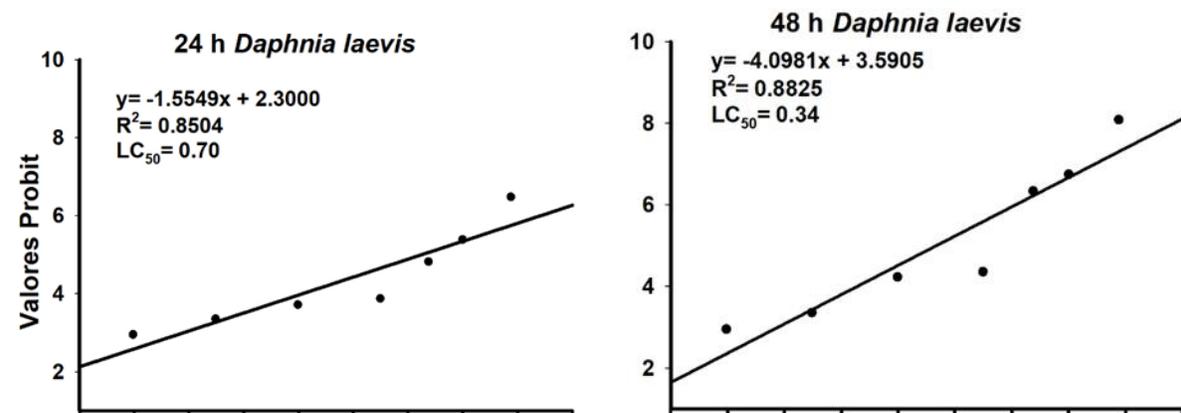
El valor de CL_{50} para *Daphnia magna* fue de 0.93 mg L^{-1} a 24 horas y 0.36 mg L^{-1} a 48 horas (Fig. 1a), representando la especie con mayor tolerancia al dicromato de potasio. Las especies nativas de la Laguna de Zumpango presentaron mayor sensibilidad a concentraciones más bajas en comparación con la especie utilizada en zonas templadas (*D. magna*). *Daphnia laevis* presentó una CL_{50} de 0.70 mg L^{-1} a 24 horas y 0.34 mg L^{-1} a 48 horas respectivamente (Fig. 1b), siendo la especie más tolerante al tóxico. *Ceriodaphnia dubia* con 0.34 mg L^{-1} a 24 horas y 0.20 mg L^{-1} a 48 horas (Fig. 1c). El efecto que tuvo el tóxico sobre *D. laevis* a 48 horas fue el mismo para *C. dubia* a 24 horas (0.34 mg L^{-1}), siendo

la segunda especie del sitio más tolerante al dicromato, tomando en cuenta la diferencia de tamaño con *D. laevis*, *S. vetulus* fue la especie más sensible al tóxico de referencia con una CL_{50} de 0.33 mg L^{-1} a 24 horas y 0.10 mg L^{-1} a 48 horas (Fig. 1d). Las especies que fueron aisladas del lago de Zumpango son más sensibles, *S. vetulus* las más afectada y *D. magna* presentó mayor resistencia a las distintas concentraciones del tóxico.

a



b



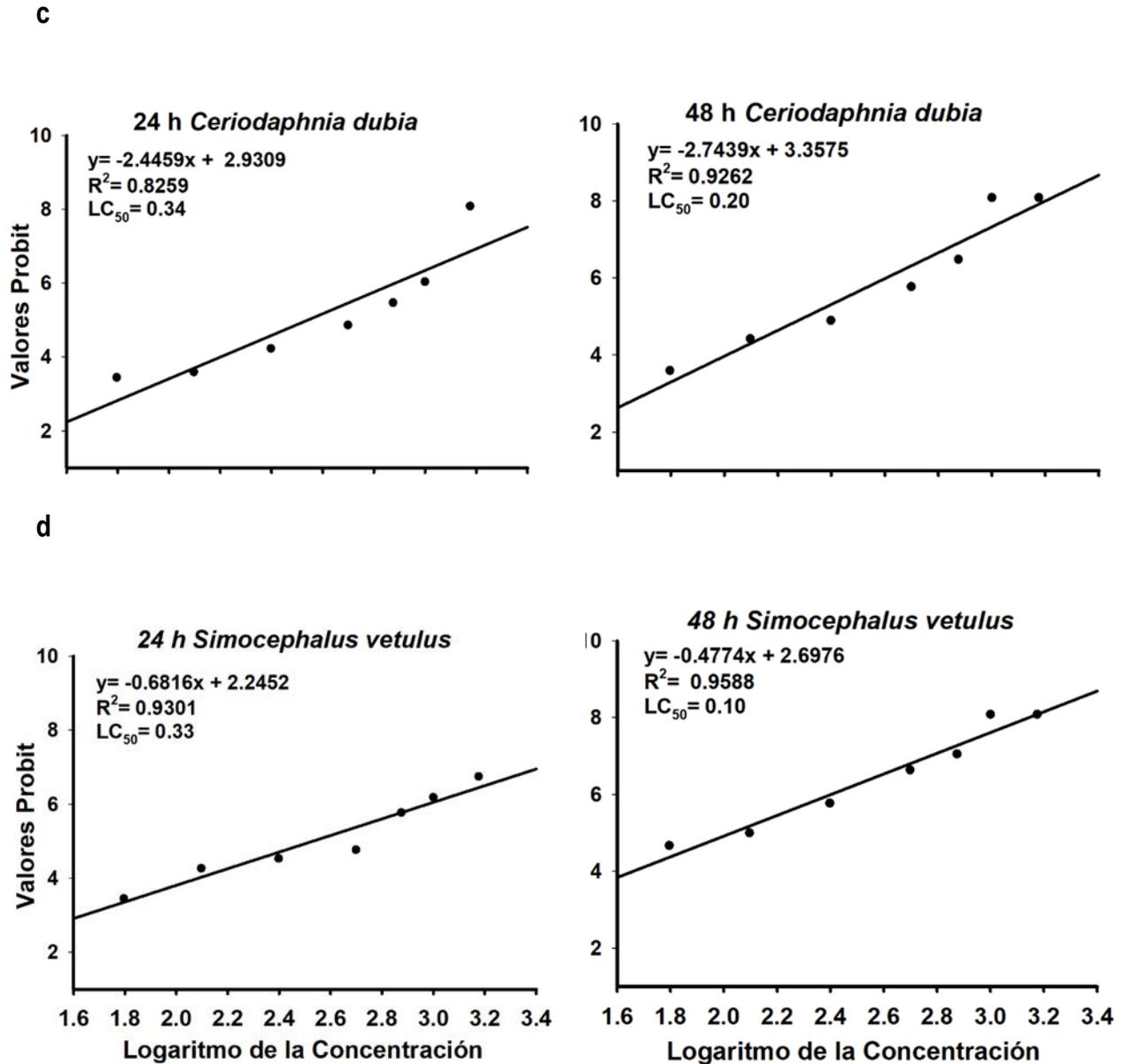


Figura 4. **a** *Daphnia magna*, **b** *Daphnia laevis*, **c** *Ceriodaphnia dubia*, **d** *Simocephalus vetulus*, expuestos a diferentes concentraciones del tóxico (0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 y 1.5 mg L⁻¹) dicromato de potasio a una temperatura de 20 ± 2°C.

Sensibilidad relativa con el toxico de referencia (dicromato de potasio)

A partir de la fórmula y de las concentraciones letales se identificó la sensibilidad relativa por cada especie del sitio. *Simocephalus vetulus* tiene valores entre 0.44 y 0.55 a 24 y 48 horas

respectivamente, en comparación con las otras especies. *Daphnia laevis* tiene una tendencia a la misma sensibilidad que *D. magna* (~5 % de variación) a las 48 horas.

Tabla 2. CL₅₀ con dicromato de potasio y sensibilidad relativa obtenida a partir de la formula $SR = \log (CL_{50} D. magna / CL_{50i})$.

LC _{50i}	24 h	Sensibilidad relativa (24 h)	48 h	Sensibilidad relativa (48 h)
<i>D. magna</i>	0.93 ± 0.05	-	0.36 ± 0.01	-
<i>D. laevis</i>	0.70 ± 0.04	0.12	0.34 ± 0.01	0.02
<i>C. dubia</i>	0.34 ± 0.01	0.43	0.20 ± 0.009	0.25
<i>S. vetulus</i>	0.33 ± 0.02	0.44	0.10 ± 0.006	0.55

Como se puede observar en la tabla 2, *D. magna* es la especie más tolerante al dicromato de potasio a 24 y 48 horas. Las especies nativas presentan un valor positivo del límite para sensibilidad relativa, *S. vetulus* fue la especie que presentó mayor sensibilidad al tóxico, con un valor de SR= 0.44 a 24 horas y 0.55 a 48 horas, mostrando un comportamiento muy sensible, en comparación con *D. laevis* que a las 48 horas presentó un valor muy cercano a 0 que indica ser una especie muy parecida a la sensibilidad que tiene *D. magna*.

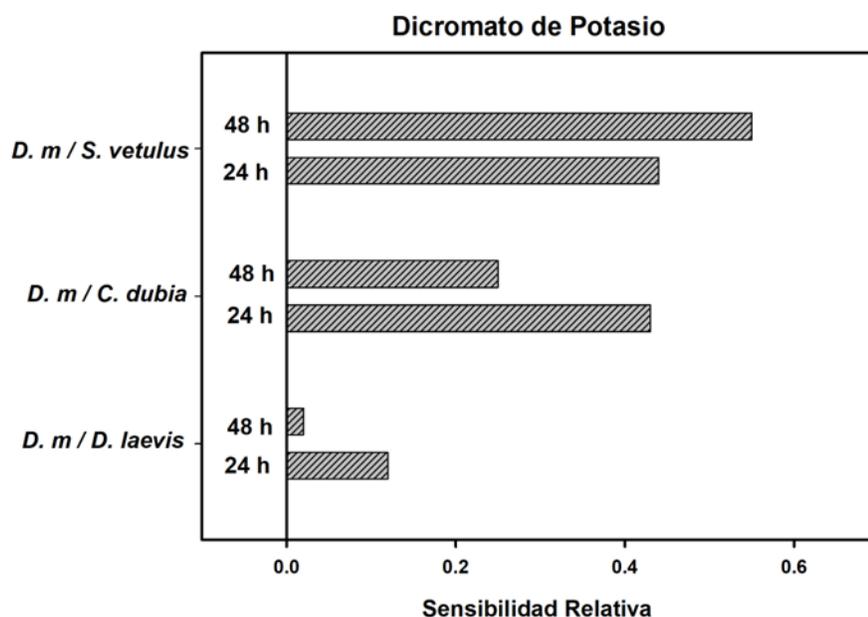


Figura 5. Sensibilidad relativa con dicromato de potasio expresada como proporción logarítmica (CL₅₀) en relación con la sensibilidad de *Daphnia magna*.

Sensibilidad relativa con extracto crudo

De acuerdo con el equivalente de Microcistina-LR en las proporciones obtenidas de la CL_{50} se obtuvo que *Daphnia laevis* fue la especie con mayor resistencia al extracto crudo en 24 h, mientras que *D. magna* en 48 h tuvo un valor más alto que *D. laevis*. A partir de la fórmula y de las concentraciones letales se identificó la sensibilidad relativa.

Tabla 3. CL_{50} con extracto crudo y sensibilidad relativa obtenida a partir de la fórmula $SR = \log (CL_{50} D. magna / CL_{50i})$.

LC_{50i}	24 h ($\mu\text{g/L MC-LR}$)	Sensibilidad relativa (24 h)	48 h ($\mu\text{g/L MC-LR}$)	Sensibilidad relativa (48 h)
<i>D. magna</i>	1.79 \pm 0.08	-	1.19 \pm 0.04	-
<i>D. laevis</i>	3.25 \pm 0.08	-0.25	0.95 \pm 0.05	0.097
<i>C. dubia</i>	1.0 \pm 0.08	0.25	0.56 \pm 0.02	0.32
<i>S. vetulus</i>	0.69 \pm 0.05	0.41	0.43 \pm 0.02	0.44

Las especies nativas presentan un valor positivo del límite para sensibilidad relativa a excepción de *D. laevis* a 24 horas lo que significa que es más tolerante al extracto crudo que *D. magna*, con un valor de $SR = -0.25$ a 24 h, aunque ocurrió lo contrario a 48 horas pues muestra un valor positivo de 0.097. *S. vetulus* muestra un comportamiento muy sensible, en ambos momentos (24 y 48 h) demuestra ser la especie con mayor sensibilidad al extracto crudo y también se presenta que *D. laevis* es la más tolerante al tóxico, presentando valores similares a la CL_{50} de *D. magna*.

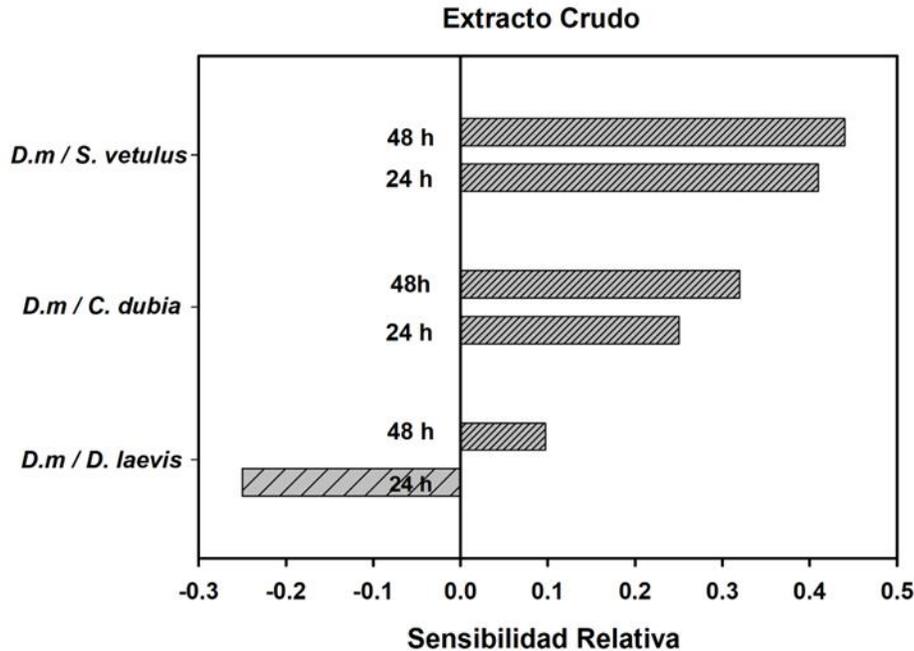


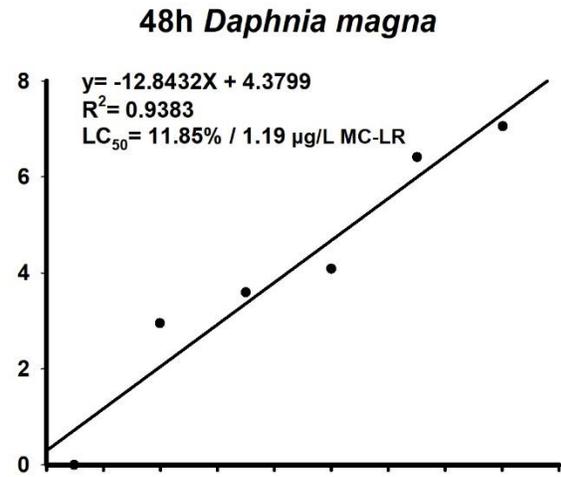
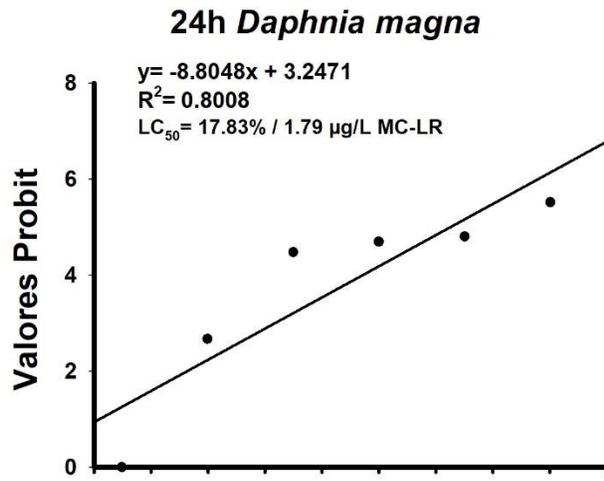
Figura 6. Sensibilidad relativa con extracto crudo expresada como proporción logarítmica (CL_{50}) en relación con la sensibilidad de *Daphnia magna*.

Prueba de toxicidad aguda con extracto crudo de cianobacterias (CL_{50})

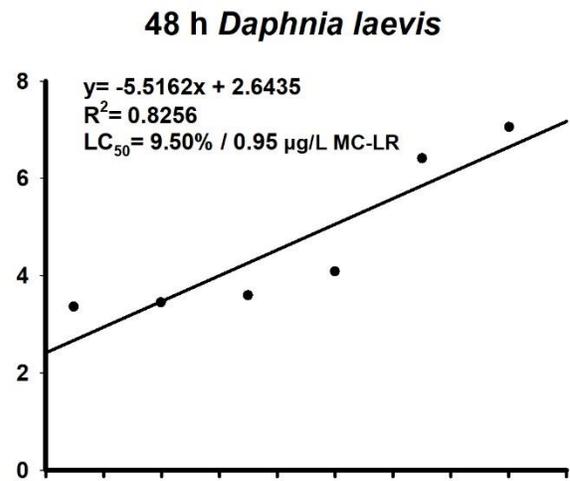
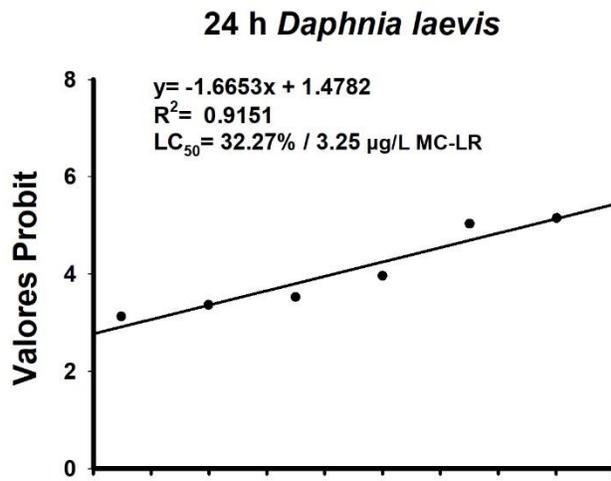
De la muestra obtenida del florecimiento cianobacterial el valor de CL_{50} para *Daphnia magna* fue de 17.83% a 24 horas y de 11.85% a 48 horas lo que corresponde en concentraciones de microcistina-LR de 1.79 y 1.19 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Fig. 7a). En cuanto a las especies nativas *Daphnia laevis* obtuvo 32.27% a 24 horas y 9.50 % a 48 horas (Fig. 7b) siendo la especie con mayor tolerancia al extracto crudo, en comparación con la especie de sistemas templados *D. magna* y también con la microcistina-LR tuvo un valor de 3.25 y 0.95 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Ceriodaphnia dubia tuvo 9.99% a 24 horas y 5.56% a 48 horas (Fig. 7c), mientras que *Simocephalus vetulus* con 6.92% a 24 horas y 4.36% transcurridas 48 horas es la especie que presentó mayor sensibilidad al extracto crudo y menor concentración de Microcistina-LR (ver Fig. 7d).

a



b



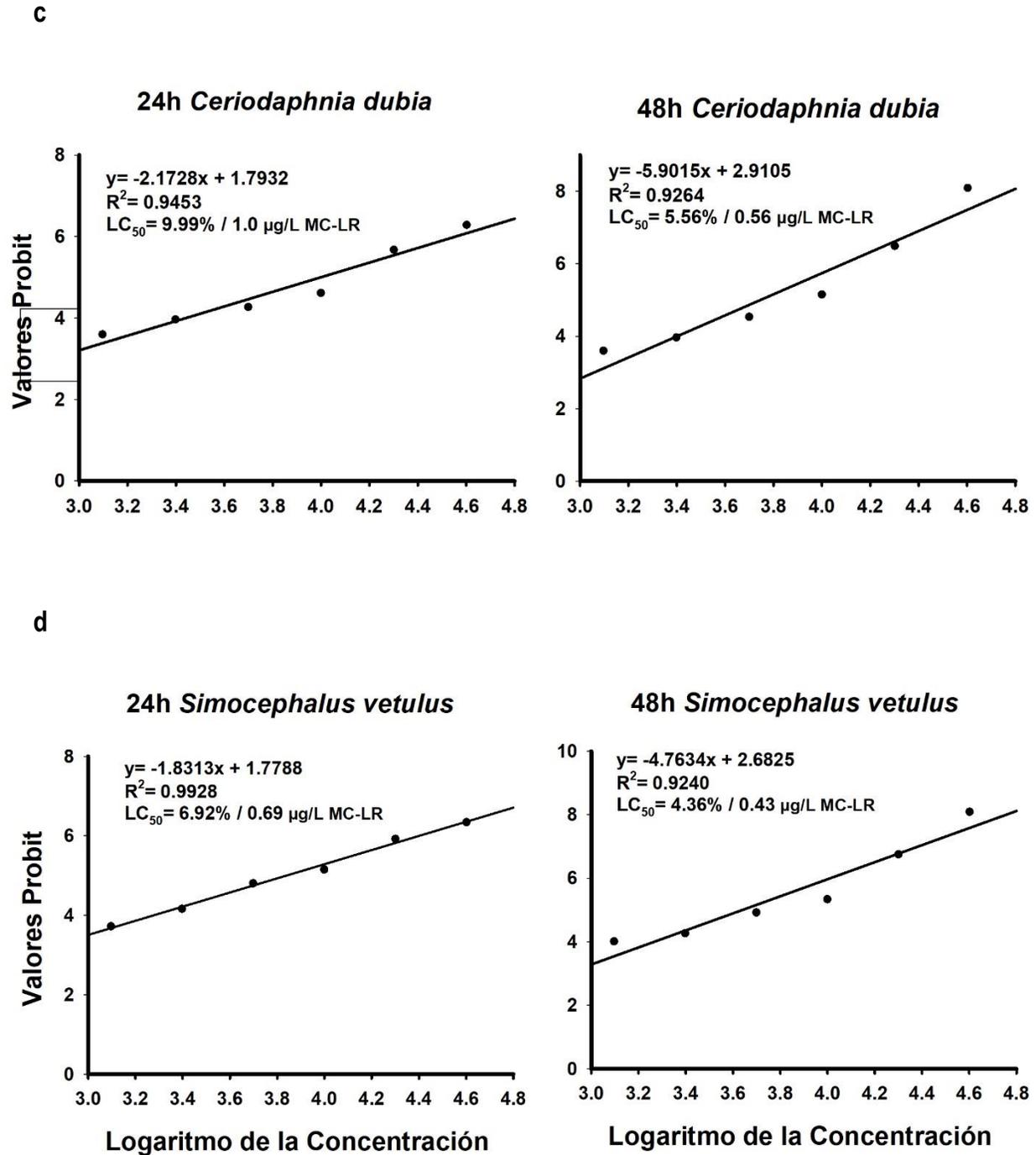


Figura 7. A *Daphnia magna*, B *Daphnia laevis*, C *Ceriodaphnia dubia*, D *Simocephalus vetulus*, expuestos a diferentes proporciones del extracto crudo (1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 %) correspondiente a valores de 0.12 a 4.03 µg L⁻¹ a una temperatura de 20 ± 2°C.

Pruebas de toxicidad crónica

1. Pruebas de toxicidad crónica

1.1 Tabla de vida de *Daphnia laevis*.

Las curvas de supervivencia de *D. laevis* no presentaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos con la muestra de extracto crudo de cianobacterias recolectada en el mes de enero. El control en comparación con los tratamientos expuestos a las diferentes proporciones del extracto (5, 10 y 20%) se comportaron de manera similar, demuestran poca mortalidad a lo largo de la mayor parte del promedio de vida, lo que indica una curva de supervivencia de tipo I a excepción del control negativo donde en el día 35 todos los individuos habían muerto y se comporta como una curva de tipo II (Fig. 8). Como se puede observar en el tratamiento control y 5% tienen una curva muy similar, mientras que el tratamiento con 10 y 20% es notoria una mortalidad más acelerada, aunque se aproximan bastante al día en el que muere por completo el control (día 79).

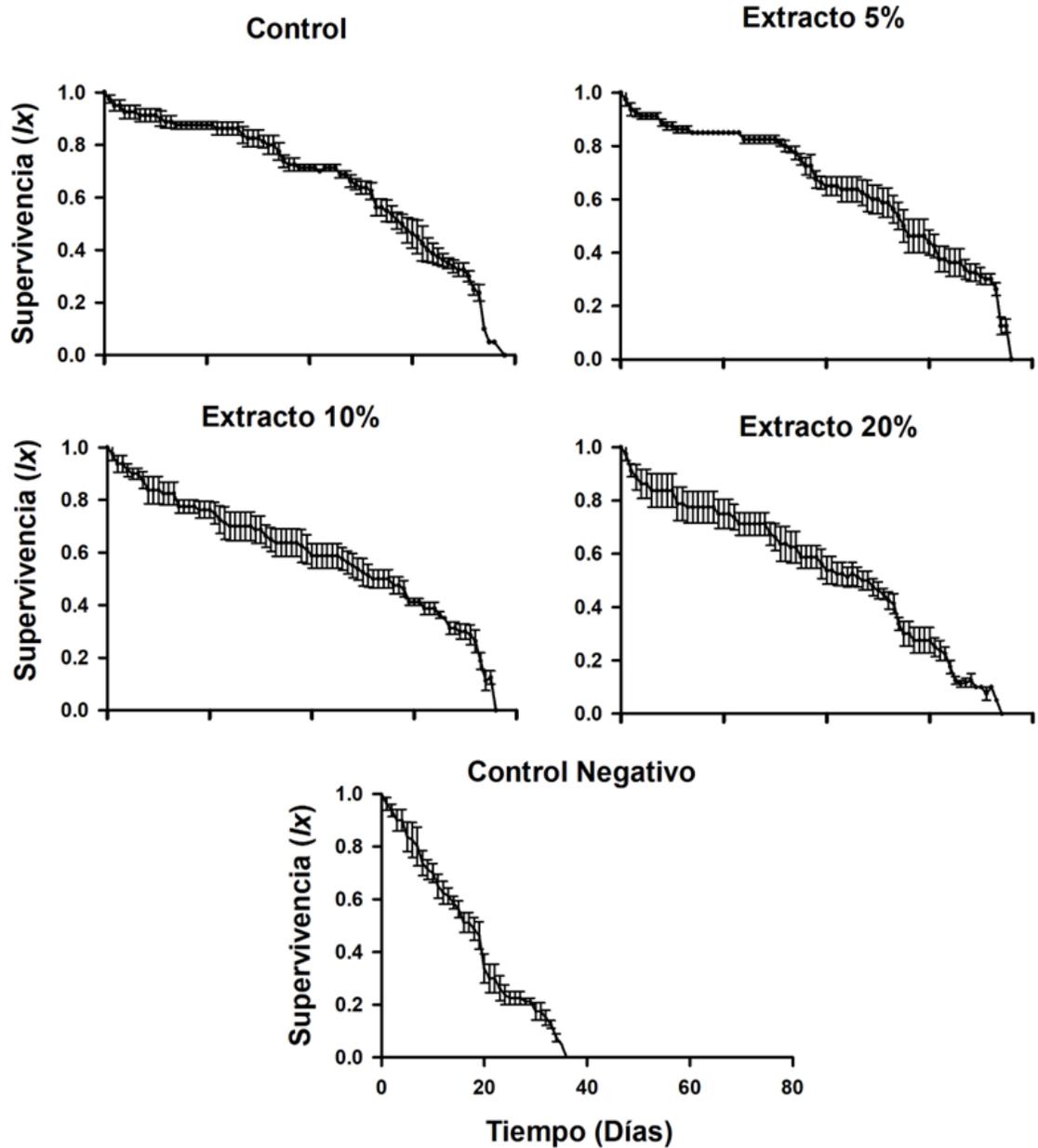


Figura. 8. Curvas de supervivencia de *Daphnia laevis* en presencia de tres concentraciones subletales de extracto crudo de cianobacterias (5, 10 y 20% de extracto crudo), un control (con alimento) y un control negativo (ausencia de extracto y ausencia de alimento). Los símbolos representan los promedios \pm error estándar de cuatro réplicas de una cohorte de 20 individuos.

Las curvas de fecundidad indican el efecto del extracto crudo de cianobacterias sobre la reproducción. Los valores más altos se presentaron en las proporciones con 10 y 20%, oscilando entre 6 y 3 neonatos $\text{ind}^{-1} \text{d}^{-1}$, mientras que el control y el tratamiento con menor

proporción del extracto tuvieron valores de entre 4 y 1 neonatos $\text{ind}^{-1} \text{d}^{-1}$. En el tratamiento con 10% se observa una tendencia idéntica en todo el ciclo de vida de los cladóceros mientras que en 20% hubo una tendencia muy variada en todo el experimento, en los últimos días ambos mostraron el mayor valor de fecundidad (último esfuerzo reproductivo), como respuesta a las altas concentraciones del extracto (ver Fig. 9).

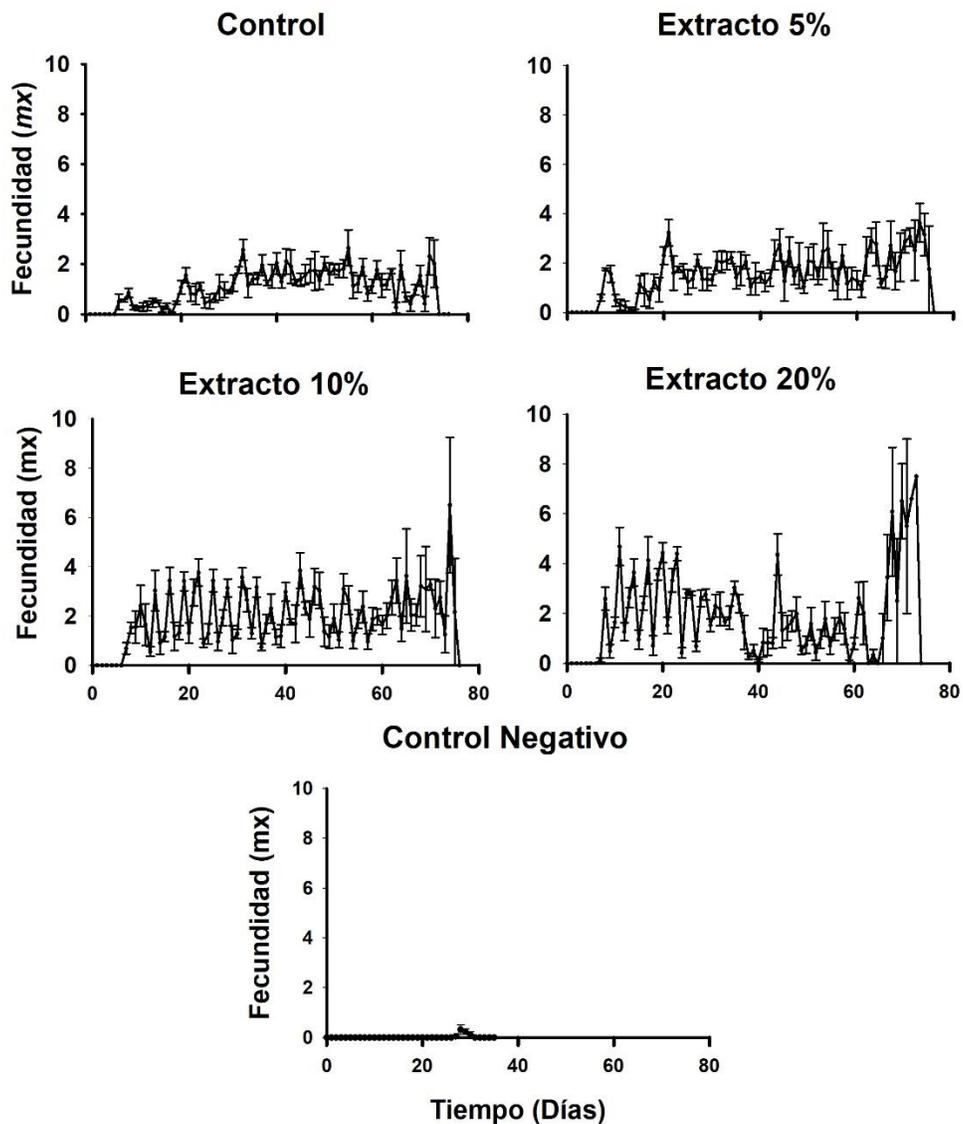


Figura 9. Fecundidad de *Daphnia laevis* de tres concentraciones subletales de extracto crudo de cianobacterias (5, 10 y 20% de extracto) y controles (ausencia de extracto y ausencia de alimento). Los símbolos representan los promedios \pm error estándar de cuatro réplicas de una cohorte de 20 individuos.

En cuanto al promedio y esperanza de vida, *Daphnia laevis* mostró los valores más altos en el tratamiento control con resultados en ambas variables muy parecidas, alcanzando 51 días. Con la proporción más alta (20%) fue evidente el decremento que tuvo en comparación con los otros tratamientos, alcanzando solo 40 días (Fig. 10), mientras que el control negativo mostró el valor más bajo. Se discriminaron las diferencias entre los tratamientos de acuerdo con una ANOVA de una vía (Tabla 4).

Los valores que se obtuvieron en la esperanza de vida son muy parecidos a los del promedio; el control tuvo el valor más alto, donde los organismos se alimentaban con *Scenedesmus acutus* a 1×10^6 cels ml^{-1} y conforme aumentaba la proporción del extracto crudo en los demás tratamientos, decrecían los valores (Fig. 10).

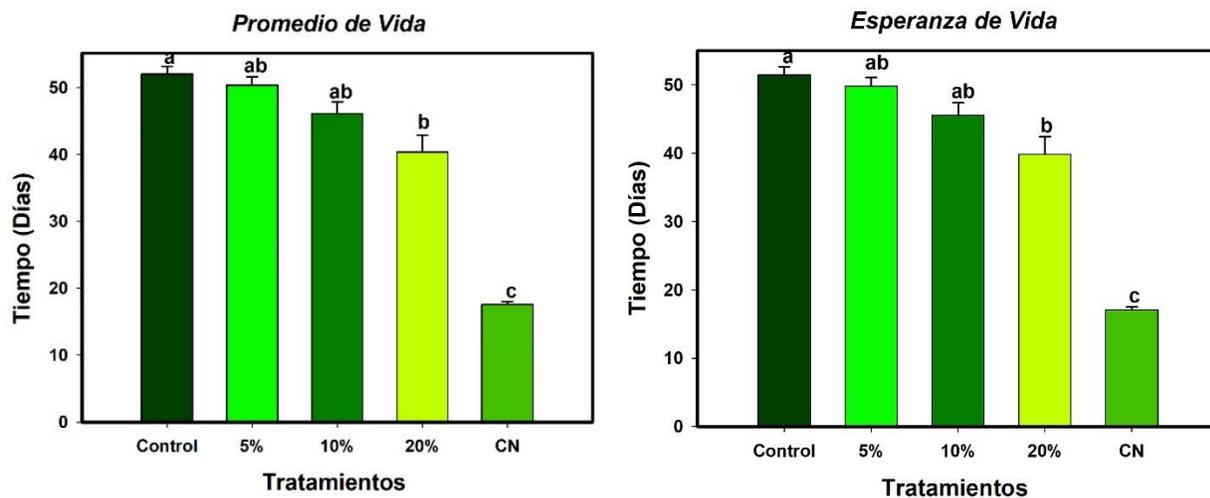


Figura.10. Promedio y Esperanza de Vida de *Daphnia laevis*, sometida a bioensayos crónicos con tres diferentes concentraciones de extractos crudos (5, 10, 20%), usando *Scenedesmus acutus* a 1×10^6 cels ml^{-1} como alimento. Se presenta la media de cuatro réplicas \pm error estándar. Letras similares de diferentes tratamientos indican que no existen diferencias significativas ($P > 0.05$, Tukey).

En la tasa reproductiva bruta se puede apreciar que existe una mayor reproducción con los tratamientos expuestos al extracto, especialmente en el tratamiento con 10%, donde alcanzaron valores >140 neonatos, que a diferencia del control donde hubo menor

reproducción (<80 neonatos). Los tratamientos con 5 y 20% se comportaron de manera muy similar, siendo estadísticamente equivalentes al tratamiento de 10%.

La tasa reproductiva neta mostró la misma tendencia, teniendo una mayor reproducción en el tratamiento con 10% y una menor en el control, donde hay menos de 50 neonatos por día (Fig. 11).

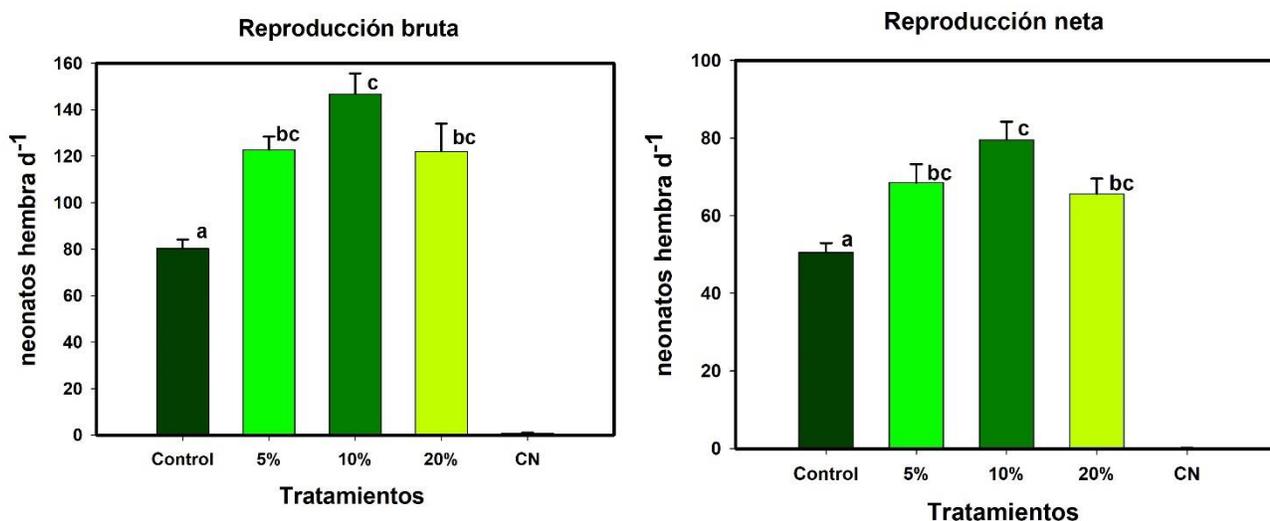


Figura 11. Tasa de Reproducción bruta y Reproducción neta de *Daphnia laevis*, sometida a bioensayos crónicos con tres diferentes concentraciones de extractos crudos (5, 10, 20%), usando *Scenedesmus acutus* a 1×10^6 cels ml^{-1} como alimento. Se presenta la media de cuatro réplicas \pm error estándar. Letras similares de diferentes tratamientos indican que no existen diferencias significativas ($P > 0.05$, Tukey).

Los resultados para el tiempo generacional mostraron que los organismos en el control tienen ciclos generacionales de 41 días, mientras que, los tratamientos expuestos al extracto, entre mayor la concentración menor número de días tardan los organismos desde su nacimiento hasta que su descendencia comienza su proceso reproductivo, como en el tratamiento con 20%, donde tardan 27 días aproximadamente.

La tasa de crecimiento poblacional (r) demuestra que los organismos que están expuestos a las diferentes proporciones del extracto crudo tienen valores altos, como el tratamiento con 20%, presentó un valor mayor a 0.25 d^{-1} , mientras mayor es la proporción, hay un aumento en los valores. Por otra parte, el control mostró un valor de 0.16 d^{-1} y el control negativo solo presentó 0.015 d^{-1} (Fig. 12).

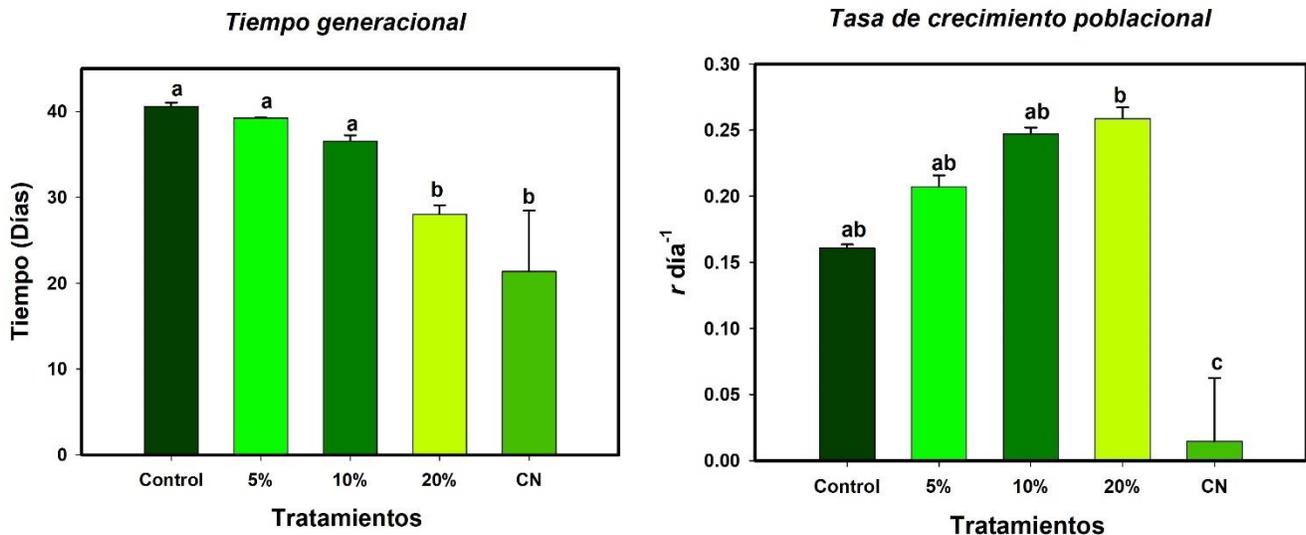


Figura 12. Tiempo Generacional y Tasa de Crecimiento poblacional de *Daphnia laevis*, sometida a bioensayos crónicos con tres diferentes concentraciones de extractos crudos (5, 10, 20%), usando *Scenedesmus acutus* a $1 \times 10^6 \text{ cels ml}^{-1}$ como alimento. Se presenta la media de cuatro réplicas \pm error estándar. Letras similares de diferentes tratamientos indican que no existen diferencias significativas ($P > 0.05$, Tukey).

Tabla 4. Análisis de varianza de una vía (ANOVA), aplicada a diferentes parámetros de tabla de vida (P. V= Promedio de Vida, E. P= Esperanza de Vida, R. B= Reproducción bruta, R. N= Reproducción neta, T. G= Tiempo Generacional y T. P= Tasa de Crecimiento poblacional de *Daphnia laevis*, expuesta a tres proporciones de extracto crudo y un control negativo. DF = grados de libertad, SS = suma de cuadrados, MS = media al cuadrado, F= prueba de Fisher y P = valor de criterio P.

Fuente de Variación	DF	SS	MS	F	P
Entre grupos (P. V)	4	3127.76	781.94	70.92	<0.001
Residual	14	154.36	11.026		
Total	18	3282.12			
Fuente de Variación	DF	SS	MS	F	P
Entre grupos (E. V)	4	3136.611	784.153	75.447	<0.001
Residual	14	145.508	10.393		
Total	18	3282.119			
Fuente de Variación	DF	SS	MS	F	P
Entre grupos (R. B)	4	53176.516	13294.129	62.402	<0.001
Residual	15	3195.587	213.039		
Total	19	56372.103			
Fuente de Variación	DF	SS	MS	F	P
Entre grupos (R. N)	4	15659.186	3914.797	68.282	<0.001
Residual	13	745.323	57.333		
Total	17	16404.509			
Fuente de Variación	DF	SS	MS	F	P
Entre grupos (T. G)	4	1075.362	268.841	6.406	0.003
Residual	15	629.529	41.969		
Total	19	1704.891			
Fuente de Variación	DF	SS	MS	F	P
Entre grupos (T. P)	4	0.157	0.0392	19.774	<0.001
Residual	15	0.0297	0.00198		
Total	19	0.186			

1.2 Tabla de vida de *Simocephalus vetulus*

Las curvas de supervivencia de *S. vetulus* presentan una tendencia de tipo III, mientras mayor es la proporción del extracto crudo del florecimiento cianobacterial menor fue su supervivencia. Se presentó un cambio muy marcado en todos los tratamientos control y la proporción más baja (extracto 5%) tuvieron la misma supervivencia, aunque en presencia del extracto la disminución de individuos fue más rápida los primeros 10 días (Fig. 13). Con la proporción más grande al 20% los organismos presentaron menor capacidad para sobrevivir, pues la mortalidad de todos los individuos se presentó al día 28, siendo aproximadamente la mitad al control.

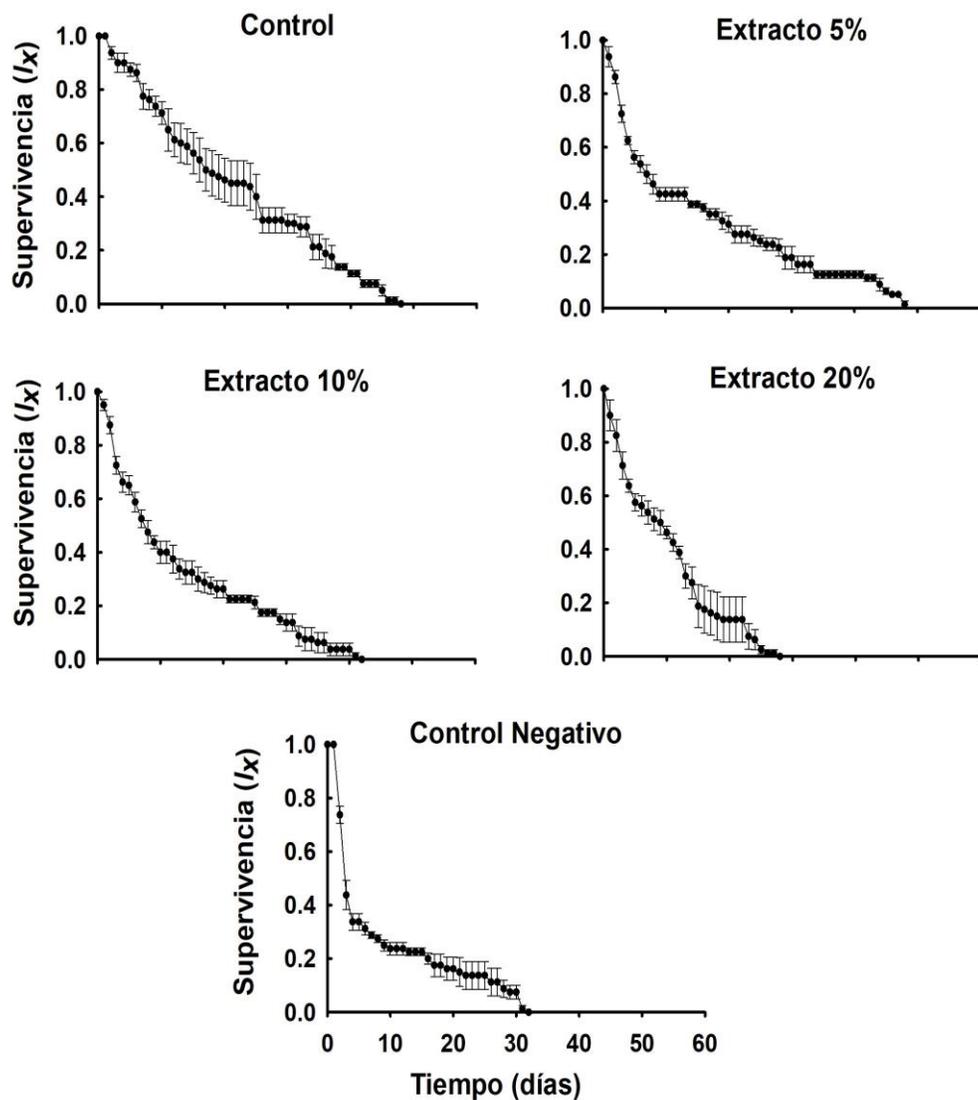


Figura. 13. Curvas de supervivencia de *Simocephalus vetulus* en presencia de tres concentraciones subletales de extracto crudo de cianobacterias (5, 10 y 20% de extracto), un control (con alimento) y un control negativo (ausencia de extracto y ausencia de alimento). Los símbolos representan los promedios \pm error estándar de cuatro réplicas de una cohorte de 20 individuos.

La fecundidad en los tratamientos con 5 y 10% de extracto crudo fueron los más altos, aunque fue después de 9 días cuando ambos tuvieron su primera reproducción a comparación con el control donde se presentó en el día 6. El tratamiento con 10% tuvo el valor más alto de fecundidad, con siete neonatos $\text{ind}^{-1} \text{d}^{-1}$ aproximadamente, debido a que eclosionan más neonatos (15 a 20 individuos) por día. El control negativo y el extracto a la mayor proporción (20%) tuvieron poca reproducción, además fue hasta el día 15 cuando ambos tuvieron su primera reproducción, como se muestra en las gráficas es más tóxico para los cladóceros estar expuestos al extracto crudo que estar sin alimento, cabe resaltar que *S. vetulus* fue la única especie que presentó reproducción en el control negativo en comparación con las demás especies (Fig. 14).

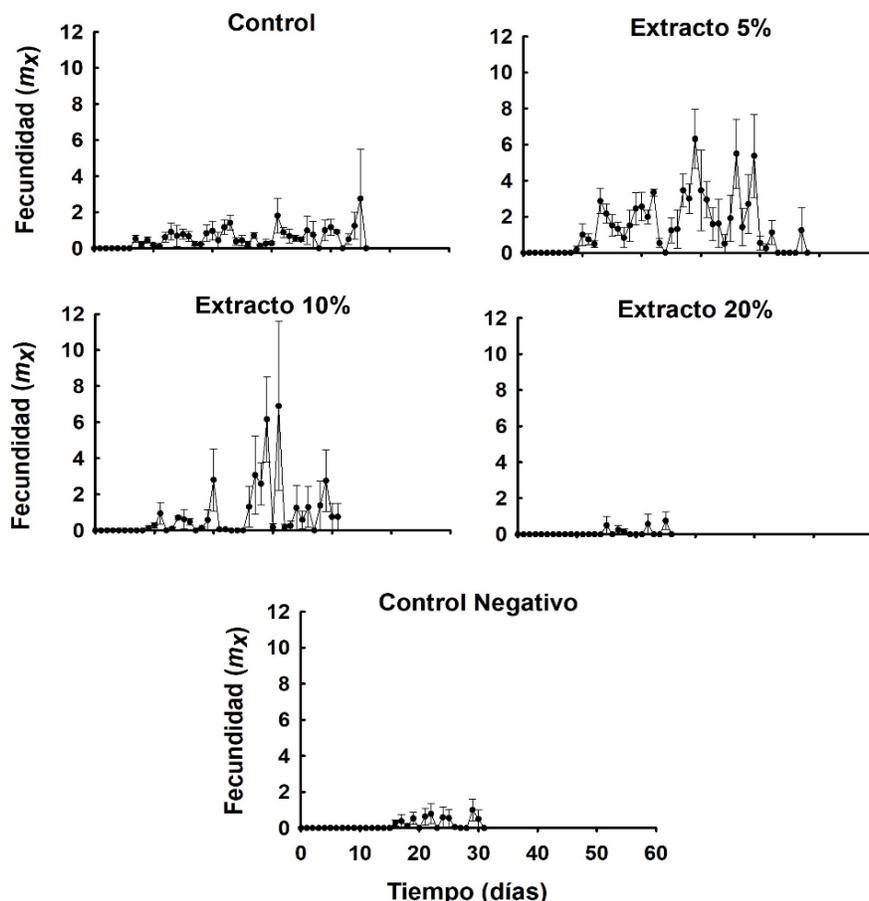


Figura 14. Fecundidad de *Simocephalus vetulus* de tres concentraciones subletales de extracto crudo de cianobacterias (5, 10 y 20% de extracto) y controles (ausencia de extracto y ausencia de alimento). Los símbolos representan los promedios \pm error estándar de cuatro réplicas de una cohorte de 20 individuos.

Los resultados obtenidos demuestran que mientras mayor sea la proporción del extracto crudo se reduce drásticamente el promedio de vida, siendo el 20% el tratamiento con el extracto de menor tiempo (tan solo 10 días), a comparación con el control, donde se presenta más del doble con 21 días. Las diferencias entre todos los tratamientos se verificaron con ANOVA de una vía.

Los valores obtenidos en la esperanza de vida fueron muy similares a los del promedio, el control negativo fue quien presentó el valor más bajo con solo 7 días, lo que, al control, donde fueron alimentados con alga a 1×10^6 cels ml^{-1} , obtuvo el triple del valor más bajo (Fig. 15).

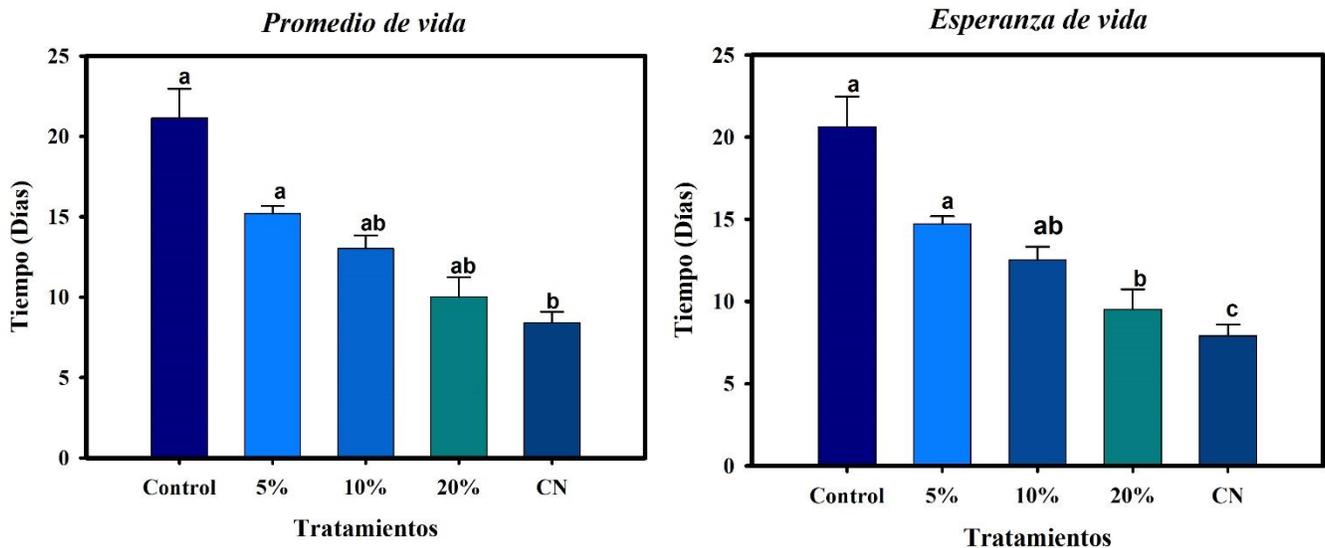


Figura. 15. Promedio y Esperanza de Vida de *Simocephalus vetulus*, sometida a bioensayos crónicos con tres diferentes concentraciones de extractos crudos (5, 10, 20%), usando *Scenedesmus acutus* a 1×10^6 cels ml^{-1} como alimento. Se presenta la media de cuatro replicas \pm error estándar. Letras similares de diferentes tratamientos indican que no existen diferencias significativas ($P > 0.05$, Tukey).

La tasa reproductiva bruta demostró que existe una mayor reproducción cuando los cladóceros son expuestos a proporciones bajas del extracto crudo. El tratamiento 5% tuvo la mayor cantidad de neonatos por día, presentando valores de más de 60 individuos por día, en comparación con el control donde solo hubo ~ 20 neonatos por día (Fig. 16). La proporción más alta (20%) y el control negativo se comportaron de manera muy similar, donde solo tuvieron como máximo 5 individuos por día.

La tasa reproductiva neta mostró valores muy similares a los de la reproducción bruta, aunque el control tuvo un valor menor de 9 neonatos por día, mientras que el tratamiento con 10% obtuvo 6 neonatos por día. Los tratamientos con 20% y control negativo se comportaron de manera muy similar teniendo valores menores a 2 neonatos por día.

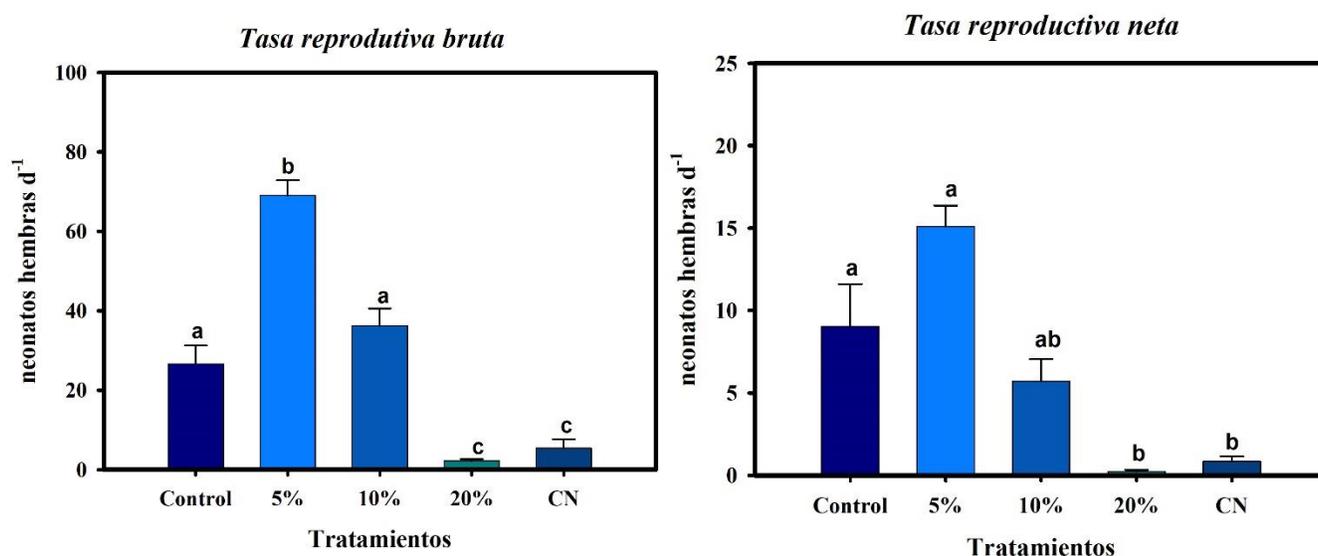


Figura 16. Tasas de Reproducción bruta y neta de *Simocephalus vetulus*, sometida a bioensayos crónicos con tres diferentes concentraciones de extractos crudos (5, 10, 20%), usando *Scenedesmus acutus* a 1×10^6 cells ml^{-1} como alimento. Se presenta la media de cuatro réplicas \pm error estándar. Letras similares de diferentes tratamientos indican que no existen diferencias significativas ($P > 0.05$, Tukey).

El tiempo generacional mostró para el control que los organismos tardan 22 días desde su nacimiento hasta la primera reproducción de su descendencia. Los tratamientos con 5 y 10% presentaron valores más altos, 24 y 26 días correspondientemente y las diferencias entre estos tratamientos con el control no son diferentes según con ANOVA de una vía de valor $P < 0.001$. El tratamiento que mostró una marcada diferencia fue el 20% donde tardan 18 días aproximadamente desde su nacimiento hasta su primera reproducción lo cual es significativo pues el tiempo entre generaciones es más corto. El control negativo tuvo un valor muy similar al control con 21 días.

En la tasa de crecimiento poblacional (r) se puede notar un cambio muy marcado por las altas proporciones del extracto crudo, como es en el tratamiento con 20%, los valores son negativos de -0.11 d^{-1} individuos por día, el control negativo presentó la misma tendencia de un valor negativo. El control y el 5% fueron muy similares con 0.13 d^{-1} (Fig. 17).

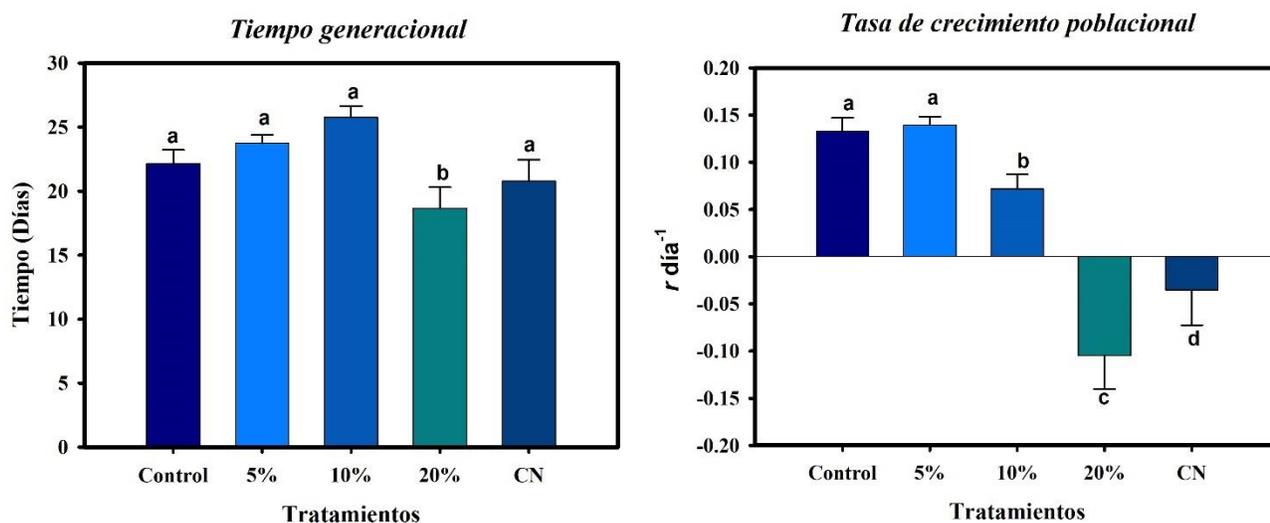


Figura 17. Tiempo Generacional y Tasa de Crecimiento poblacional de *Simocephalus vetulus*, sometida a bioensayos crónicos con tres diferentes concentraciones de extractos crudos (5, 10, 20%), usando *Scenedesmus acutus* a 1×10^6 cells ml^{-1} como alimento. Se presenta la media de cuatro réplicas \pm error estándar. Letras similares de diferentes tratamientos indican que no existen diferencias significativas ($P > 0.05$, Tukey).

Tabla 5. Análisis de varianza de una vía (ANOVA), aplicada a diferentes parámetros de tabla de vida (P. V= Promedio de Vida, E. P= Esperanza de Vida, R. B= Reproducción bruta, R. N= Reproducción neta, T. G= Tiempo Generacional y T. P= Tasa de Crecimiento poblacional) de *Simocephalus vetulus*, expuesta a tres proporciones de extracto crudo y un control negativo. DF = grados de libertad, SS = suma de cuadrados, MS = media al cuadrado, F= prueba de Fisher y P = valor de criterio P.

Fuente de Variación	DF	SS	MS	F	P
Entre grupos (P. V)	4	398.949	99.737	19.315	<0.001
Residual	14	72.29	5.164		
Total	18	471.239			
Fuente de Variación	DF	SS	MS	F	P
Entre grupos (E. V)	4	399.532	99.883	18.092	<0.001
Residual	13	71.773	5.521		
Total	17	471.304			
Fuente de Variación	DF	SS	MS	F	P
Entre grupos (R. B)	4	11709.972	2927.493	59.454	<0.001
Residual	15	738.599	49.24		
Total	19	12448.571			
Fuente de Variación	DF	SS	MS	F	P
Entre grupos (R. N)	4	610.845	152.711	18.12	<0.001
Residual	14	117.99	8.428		
Total	18	728.835			
Fuente de Variación	DF	SS	MS	F	P
Entre grupos (T. G)	4	118.47	29.618	4.73	0.011
Residual	15	93.927	6.262		
Total	19	212.397			
Fuente de Variación	DF	SS	MS	F	P
Entre grupos (T. P)	4	0.185	0.0462	18.264	<0.001
Residual	15	0.0379	0.00253		
Total	19	0.223			

1.3 Tabla de vida de *Daphnia magna*

Las curvas de supervivencia de *D. magna* demuestran una marcada diferencia en todos los tratamientos y se puede apreciar que presentan un comportamiento de tipo II donde hay un índice constante de mortalidad a excepción del control negativo que presenta un tipo III donde indica muertes numerosas en el comienzo del ciclo vital. Los tratamientos control fueron quienes alcanzaron en promedio la mayor supervivencia con 109 días, en el día 20 tuvo una marcada mortalidad representativa y se mantuvo hasta el día 45, siendo así que los próximos sólo fue decayendo (Fig. 18). El extracto tiene un efecto muy marcado en *D. magna*, pues al no ser una especie del sitio de estudio presentó una supervivencia menor, como se puede observar en las gráficas, la proporción con 20% del extracto crudo le permitió llegar hasta el día 37. Lo que también representa una cifra muy parecida a este tratamiento con la proporción más alta fue el control negativo con 33 días de supervivencia y además su mortalidad fue mucho más rápida, considerando que no se presenta alimento en este tratamiento.

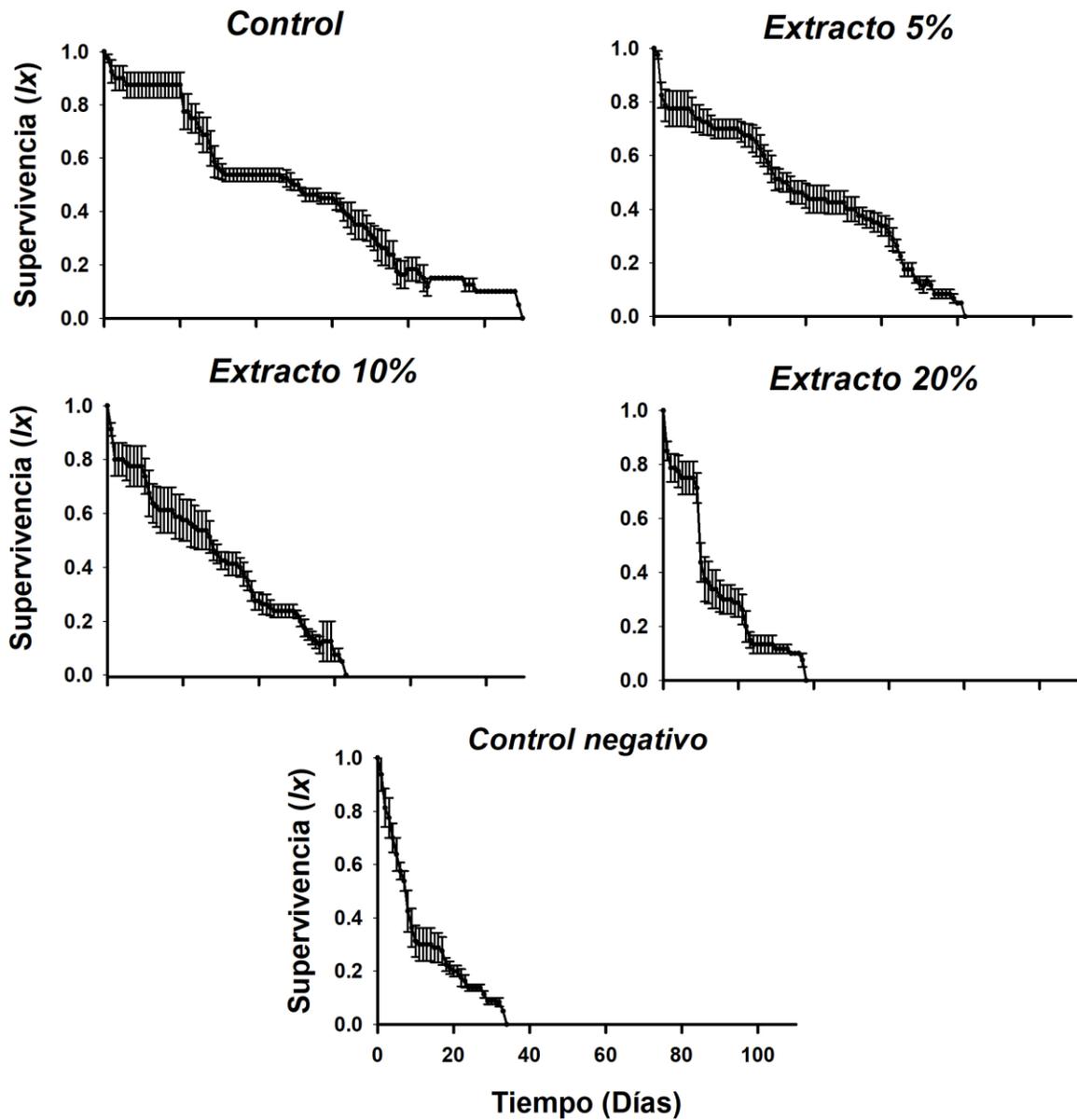


Figura. 18. Curvas de supervivencia de *Daphnia magna* en presencia de tres concentraciones subletales de extracto crudo de cianobacterias (5, 10 y 20% de extracto), un control (con alimento) y un control negativo (ausencia de extracto y ausencia de alimento). Los símbolos representan los promedios \pm error estándar de cuatro réplicas de una cohorte de 20 individuos.

La fecundidad presentó una diferencia muy marcada, en el control se presentaron valores bajos a comparación con los tratamientos como máximo 60 neonatos por día, mientras que para los extractos con 5% y 10% hubo un alcance de entre 75 y 91 neonatos por día, representando la mayor proporción de fecundidad con valores de 6 y 8, aunque mientras la proporción del extracto va aumentado, la supervivencia se ve afectada, siendo menos días, como es el caso del tratamiento con 20% del extracto donde los valores de la fecundidad fueron de 5 (Fig. 19), además en el control negativo no hubo en ningún momento del intervalo de tiempo reproducción.

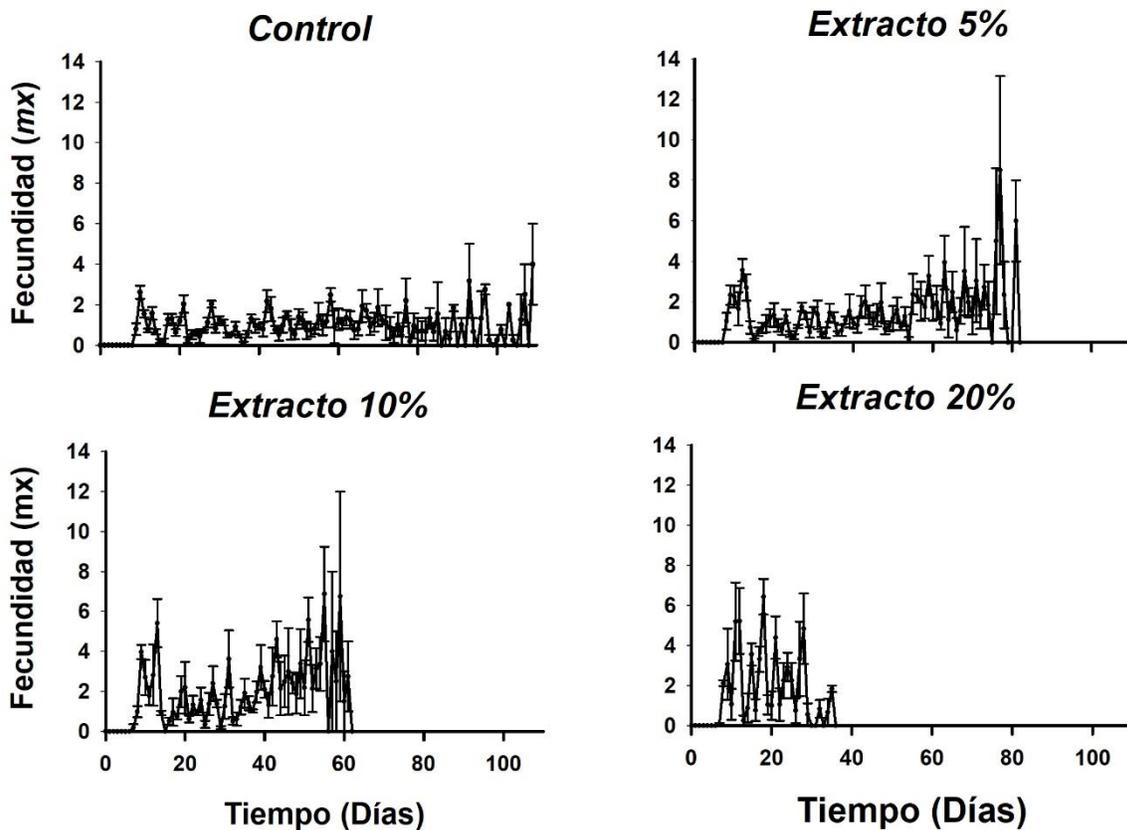


Figura 19. Fecundidad de *Daphnia magna* de tres concentraciones subletales de extracto crudo de cianobacterias (5, 10 y 20% de extracto) y controles (ausencia de extracto y ausencia de alimento). Los símbolos representan los promedios \pm error estándar de cuatro réplicas de una cohorte de 20 individuos.

De acuerdo con los resultados obtenidos el promedio de vida se vio afectado por el extracto crudo de manera gradual, mientras mayor sea la proporción, mayor mortalidad habrá en los cladóceros. Existe una diferencia muy significativa entre los tratamientos, el control presentó el valor más alto con 49 días a excepción del 20% donde solo tuvo 12 días y el control negativo que indican valores muy semejantes, se verificaron con ANOVA de una vía (Fig. 20).

La esperanza de vida tuvo valores muy parecidos a los del promedio, el control se aproxima a los 50 días, alimentados con 1×10^6 cels ml^{-1} , mientras que para el control negativo con el valor más bajo fue de 11 días, donde los cladóceros estaban en ausencia de alimento.

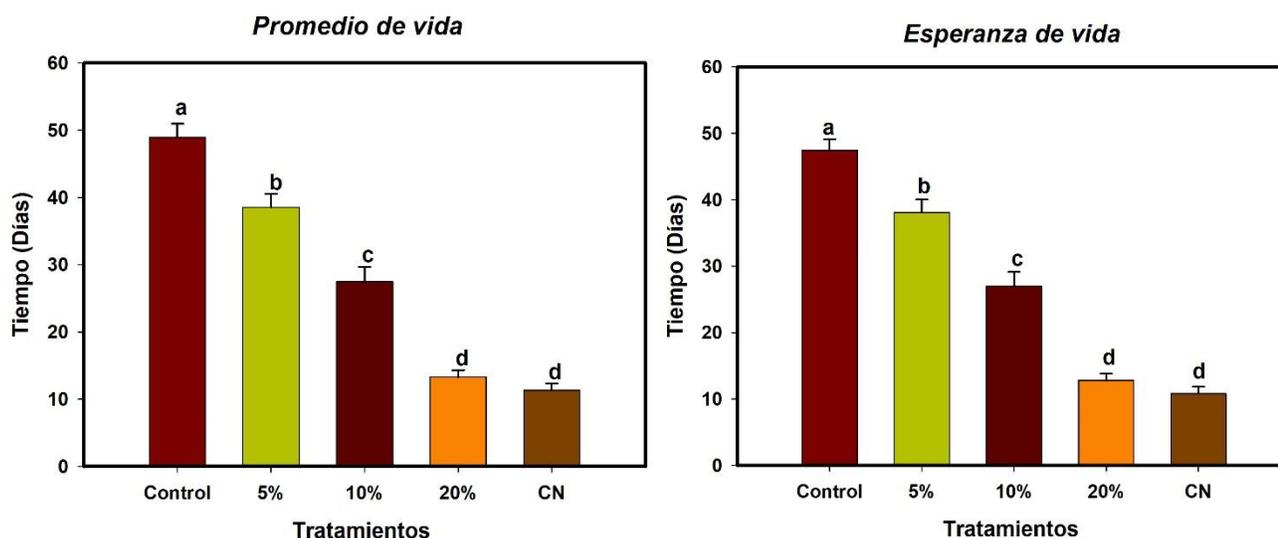


Figura. 20. Promedio y Esperanza de Vida de *Daphnia magna*, sometida a bioensayos crónicos con tres diferentes concentraciones de extractos crudos (5, 10, 20%), usando *Scenedesmus acutus* a 1×10^6 cels ml^{-1} como alimento. Se presenta la media de cuatro réplicas \pm error estándar. Letras similares de diferentes tratamientos indican que no existen diferencias significativas ($P > 0.05$, Tukey).

La tasa de reproducción bruta mostró en los tratamientos con 5 y 10% valores similares de 110 neonatos por día. El control obtuvo un valor aproximado de 90 individuos por día, lo que, según el estadístico ANOVA de una vía, indica que es similar con los tratamientos de bajo

porcentaje. El tratamiento con 20% obtuvo el valor más bajo con aproximadamente 50 neonatos por día, siendo significativamente muy distinto a los tratamientos de 5 y 10% (Fig. 21).

La tasa de reproducción neta muestra que el control y los tratamientos con 5 y 10% obtuvieron valores muy similares, con 40 neonatos aproximadamente, mientras que el tratamiento con 20% solo presentó un valor de 14 neonatos por día, lo que es significativamente diferente contra los demás tratamientos.

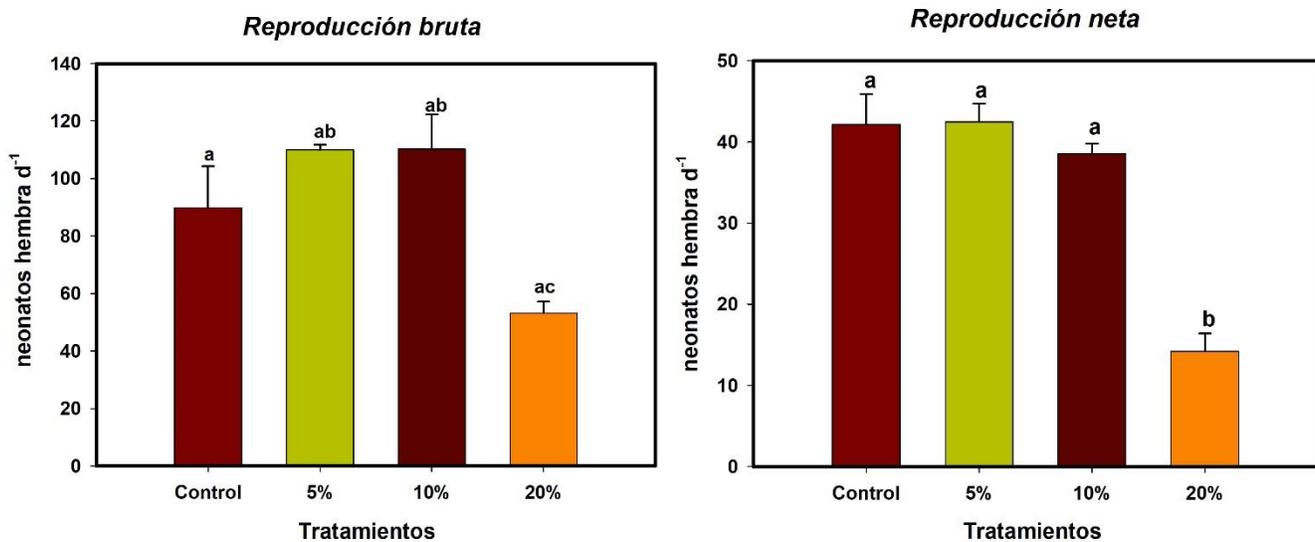


Figura 21. Tasa de Reproducción bruta y Reproducción neta de *Daphnia magna*, sometida a bioensayos crónicos con tres diferentes concentraciones de extractos crudos (5, 10, 20%), usando *Scenedesmus acutus* a 1×10^6 cels ml^{-1} como alimento. Se presenta la media de cuatro replicas \pm error estándar. Letras similares de diferentes tratamientos indican que no existen diferencias significativas ($P > 0.05$, Tukey).

Para el tiempo generacional se nota un cambio gradual en los valores, mientras más alto sea el porcentaje del extracto, menores son los valores generacionales, como se puede apreciar en el control, donde su valor promedio fue de 40 días, mientras que para la proporción más alta (20%) es de aproximadamente 16 días (Fig. 22).

La tasa de crecimiento poblacional (r) demuestra que en los tratamientos que están expuestos a 5 y 10% del extracto crudo tienen valores altos, de 0.22 y 0.24 d^{-1} aproximadamente, mientras que el tratamiento control y 20% fueron muy similares, con 0.19 d^{-1} , lo que significativamente (ANOVA de una vía) son estadísticamente diferentes en comparación a los otros dos tratamientos.

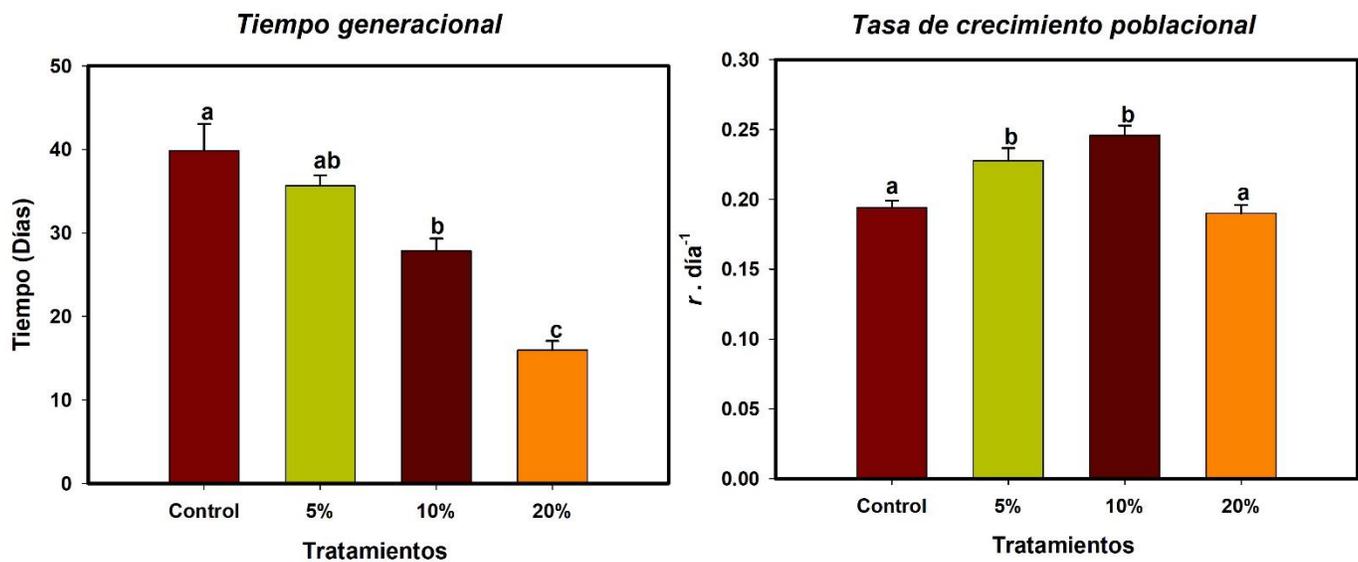


Figura 22. Tiempo Generacional y Tasa de Crecimiento poblacional de *Daphnia magna*, sometida a bioensayos crónicos con tres diferentes concentraciones de extractos crudos (5, 10, 20%), usando *Scenedesmus acutus* a 1×10^6 cels ml^{-1} como alimento. Se presenta la media de cuatro réplicas \pm error estándar. Letras similares de diferentes tratamientos indican que no existen diferencias significativas ($P > 0.05$, Tukey).

Tabla 6. Análisis de varianza de una vía (ANOVA), aplicada a diferentes parámetros de tabla de vida (P. V= Promedio de Vida, E. P= Esperanza de Vida, R. B= Reproducción bruta, R. N= Reproducción neta, T. G= Tiempo Generacional y T. P= Tasa de Crecimiento poblacional) de *Daphnia magna*, expuesta a tres proporciones de extracto crudo y un control negativo. DF = grados de libertad, SS = suma de cuadrados, MS = media al cuadrado, F= prueba de Fisher y P = valor de criterio P.

Fuente de Variación	DF	SS	MS	F	P
Entre grupos (P. V)	4	4207.876	1051.969	99.526	<0.001
Residual	14	147.977	10.57		
Total	18	4355.853			
Fuente de Variación	DF	SS	MS	F	P
Entre grupos (E. V)	4	4007.227	1001.807	90.989	<0.001
Residual	15	165.154	11.01		
Total	19	4172.381			
Fuente de Variación	DF	SS	MS	F	P
Entre grupos (R. B)	3	9078.807	3026.269	8.248	0.004
Residual	11	4036.237	366.931		
Total	14	13115.044			
Fuente de Variación	DF	SS	MS	F	P
Entre grupos (R. N)	3	2202.106	734.035	28.368	<0.001
Residual	12	310.509	25.876		
Total	15	2512.614			
Fuente de Variación	DF	SS	MS	F	P
Entre grupos (T. G)	3	1317.719	439.24	28.993	<0.001
Residual	12	181.796	15.15		
Total	15	1499.515			
Fuente de Variación	DF	SS	MS	F	P
Entre grupos (T. P)	3	0.00866	0.00289	14.892	<0.001
Residual	12	0.00233	0.000194		
Total	15	0.011			

Discusión

México presenta una gran cantidad de lagos eutróficos y el territorio en su mayoría está ubicado en una zona tropical (Alcocer & Bernal-Brooks, 2010). Se han reportado que varios cuerpos de agua tienen presencia de Cianobacterias la mayor parte del año, los cuales, causan distintos problemas a las comunidades que habitan dichos lugares (Berry & Lind, 2010). Las altas densidades de cianobacterias se establecen debido a la combinación sinérgica de nutrientes, altas temperaturas, mayor estratificación vertical y condiciones climáticas extremas, que les permite tener una ventaja en los sistemas acuáticos; a su vez pueden formar colonias evitando a los consumidores de fitoplancton (De Bernardi & Giussani, 1990; Paerl, 2017).

De acuerdo con Figueroa-Sánchez *et al.* (2020) *Microcystis* sp., *Dolichospermum* sp. y *Planktothrix* sp. son cianobacterias presentes casi todo el año en este sistema y son potencialmente tóxicas, mostrando una concentración de Microcistina-LR disuelta de hasta 11.70 $\mu\text{g L}^{-1}$. Esto concuerda con los hallazgos registrados en este trabajo, donde *Planktothrix* cf. *agardhii* fue la especie dominante en la muestra de fitoplancton utilizada para elaborar el extracto crudo. Asimismo, la concentración de Microcistina-LR presentada en el mes de enero en trabajos previos es de 12 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Zamora-Barrios *et al.*, 2019), demostrando similitud con los resultados obtenidos en este estudio (10.0795 $\mu\text{g L}^{-1}$). No obstante, otras evaluaciones en el mismo sistema acuático mostraron otra concentración con 62.4 $\mu\text{g L}^{-1}$ con mayor dominancia de *Microcystins aeruginosa.*, sin embargo, una de las mayores concentraciones es de 78.0 $\mu\text{g L}^{-1}$, con dominancia de *M. aeruginosa*, *M. panniformis*, *M. protocystis* y *Pseudanabaena mucicola* y esta fue registrada en el lago urbano de Chapultepec (Vasconcelos *et al.*, 2010).

La concentración de microcistinas encontrada en este estudio está relacionada a la reportada por Herrera *et al.* (2015), quienes encontraron en dos embalses ubicados en Antioquia, Colombia, concentraciones desde 72 hasta 538 $\mu\text{g g}^{-1}$ (muestra liofilizada). De acuerdo con Zamora-Barrios *et al.* (2019) en el lago de Zumpango, se registran concentraciones desde 0.2 hasta 120 $\mu\text{g g}^{-1}$, ambos lugares se han definido como sitios que

presentan temperaturas subtropicales y donde se desarrollan actividades agrícolas e industriales intensivas.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció el límite de concentración provisional para MC-LR en agua potable de $1 \mu\text{g L}^{-1}$. También, ha establecido el límite de ingesta diaria tolerable (TDI) en $0.04 \mu\text{g Kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ ya que estas toxinas se acumulan en los microorganismos acuáticos que consume el ser humano y por su uso como suplementos alimenticios. Para aguas recreativas, se estableció que una concentración de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de MC-LR representa un nivel de bajo riesgo, pero una $>20 \mu\text{g L}^{-1}$ es un nivel de alto riesgo con efectos adversos sobre la salud humana (WHO, 1998; Zamora-Barrios *et al.*, 2023). Las concentraciones evaluadas en este trabajo están por debajo de estos niveles (0.69 a $3.25 \mu\text{g L}^{-1}$ de equivalentes de MC-LR); sin embargo, de acuerdo con los resultados, estas representaron un potencial ecotoxicológico para los organismos evaluados, alterando su supervivencia y fecundidad.

El dicromato de potasio fue tóxico para todas las especies, mientras mayor fue el tiempo de exposición (48h) menor era la capacidad de los organismos para sobrevivir. *Daphnia magna* fue la especie con mayor tolerancia al tóxico (0.93 y 0.36 mg L^{-1} a 24 y 48 h, respectivamente). De acuerdo con la norma mexicana (NMX-AA-087-SCFI-2010) para la evaluación de toxicidad aguda, se establece que la respuesta aceptable de la CL_{50} a las 48 h es de 0.6 mg L^{-1} a 2.1 mg L^{-1} . Sin embargo, en comparación con los resultados obtenidos, todas las especies están por debajo de ese rango. Kikuchi *et al.* (2017), midieron la toxicidad aguda sobre *Daphnia magna* con dicromato de potasio y obtuvieron concentraciones entre 0.042 a 0.67 mg L^{-1} a 48 horas, lo que indica una similitud con los resultados obtenidos en este estudio. Esta variación en las respuestas coincide con lo reportado por Coors *et al.* (2009), quienes encontraron concentraciones letales para *D. magna* desde 0.55 a 1.2 mg L^{-1} a 48 horas expuestas al mismo tóxico, observaron diferencias de tolerancia entre diez poblaciones de diferentes linajes clonales, y así identificaron que hay variación en la susceptibilidad con base genética, por ello es importante mencionar el factor clon y explicar las relaciones concentración-respuesta.

Aunque, *Daphnia laevis* es la especie nativa que mostró una sensibilidad similar a *D. magna* (0.70 y 0.34 mg L⁻¹ a 24 y 48 h, respectivamente), las especies aisladas de Zumpango fueron más sensibles y esto concuerda con lo reportado por Mohamed (2007), quién comparó la sensibilidad del cladóceros tropical nativo *Ceriodaphnia rigaudii* y *Daphnia magna*, expuestos a diferentes sustancias químicas (incluyendo dicromato de potasio), obteniendo las CL₅₀ a 48 h, y determinando la sensibilidad relativa. Los valores obtenidos sugieren que *C. rigaudii* es más sensible que *D. magna*, esto indica que no puede ser apropiado utilizar especies exóticas para sitios ubicados en zonas tropicales. Santos-Medrano & Rico-Martínez (2019), concuerdan con los hallazgos presentados aquí, al comparar los valores de referencia de *D. magna* con nueve tóxicos diferentes contra los de *D. pulex* y *S. vetulus*, confirmando que las especies autóctonas son más sensibles a los tóxicos que la especie de zonas templadas. El uso de estas especies templadas como *D. magna* para sistemas de zonas tropicales es un problema que se enfrenta el campo de estudio como la ecotoxicología, pues no es adecuado usar especies que no pertenecen al mismo hábitat o que sean de sitios con diferente ubicación geográfica, pues los efectos que tengan no quieren decir que sean los mismo para especies nativas.

Daphnia laevis fue la especie con mayor tolerancia en la prueba aguda con el extracto crudo, de acuerdo con las diferentes proporciones que se utilizaron de la muestra de extracto, se correlacionaron con la concentración total de microcistina, obteniendo 3.25 µg L⁻¹ de equivalentes de microcistina-LR (MC-LR) a 24 h. Esto coincide con lo obtenido por Ferrão-Filho *et al.* (2017), quienes encontraron que este mismo cladóceros presentó una baja mortalidad y no presentó parálisis en los movimientos de natación, cuando fue expuesta a dos cepas de cianobacterias (*Microcystis aeruginosa* y *Cylindrospermopsis raciborskii*) en pruebas agudas. Por otro lado, Pawlik-Skowrońska & Bownik (2021), determinaron que las microcistinas pueden ejercer alteraciones en la motilidad de los cladóceros, no obstante, la combinación de más oligopéptidos inmersos en los extractos crudo de cianobacterias aumenta el grado de toxicidad de manera considerable hacia los organismos. Asimismo, Pawlik-Skowrońska, *et al.* (2019), encontraron que la CL₅₀ a 24 horas en *Daphnia pulex* expuesta a Microcistina-LR purificada fue superior a 3.32 mg L⁻¹ (3,320 µg L⁻¹), pero al

exponerla a extractos crudos de *Planktothrix agardhii* fue más sensible, donde la biomasa extraída se expresó como concentraciones de clorofila-a (Chl-a) y varió de 0.16 a 6.66 mg Chl-a L⁻¹, demostrando que existe una mayor toxicidad en los extractos de cianobacterias que contienen gran mezcla de cianotoxinas y otros metabolitos como los oligopéptidos.

La toxicidad de la gran cantidad de metabolitos es más perjudicial para el zooplancton que las fracciones de cianotoxinas purificadas (Ferrão-Filho & Kozlowsky-Suzuki, 2011), y al estar expuestos por más tiempo, se acrecienta el efecto tóxico. Esto coincide con lo reportado aquí porque todas las especies mostraron un valor de CL₅₀ menor transcurridas 48 h en comparación la evaluación a 24 h (*D. magna*= 1.19, *D. laevis*= 0.95, *C. dubia*= 0.56 y *S. vetulus*= 0.43 µg L⁻¹ equivalentes de MC-LR).

La toxicidad aguda para cada una de las especies fue muy diferente, debido a los diversos modos de acción de cada especie. *Simocephalus vetulus* fue la especie tropical más sensible al extracto crudo y al tóxico de referencia. Esto puede atribuirse a que es un microcrustáceo de gran tamaño (>20 µm), por lo que son menos selectivos en su alimentación, provocando mayor consumo de cianobacterias (Fernandez, R *et al.*, 2012). Además, el tamaño del cuerpo es importante pues involucra mayor retención de tóxicos para los organismos (Krantzberg, 1989). *Ceriodaphnia dubia* tuvo similitud con *S. vetulus* en cuanto los resultados obtenidos en las pruebas de CL₅₀, una posible explicación es que los organismos pequeños (volumen y superficie), presentan tasas metabólicas más aceleradas, incluyendo las tasas de filtración (Williamson, 1980).

En las pruebas agudas con el extracto crudo, tanto *D. laevis* como *D. magna* presentaron resultados similares, mientras que en las pruebas crónicas difirieron totalmente al final. En la supervivencia de *D. laevis*, no se observaron cambios significativos entre los tratamientos, excepto en el control negativo, al estar ausente de alimento solo alcanzó al día 37, mientras que *D. magna*, obtuvo decrementos significativos en todos sus tratamientos, posiblemente debido al compendio de metabolitos secundarios del extracto. Nandini *et al.* (2000) mostraron que *D. laevis* puede crecer adecuadamente con una cepa de *Microcystis aeruginosa* de Valle de Bravo. También, Ferrão-Filho *et al.* (2017) encontraron que esta

misma especie en comparación con *D. similis* y *M. micrura* expuestos a combinaciones de dos cepas tóxicas de cianobacterias (*Microcystis aeruginosa* y *Cylindrospermopsis raciborskii*), no tuvo efectos negativos cuando fue expuesta en pruebas crónicas con estas cepas tóxicas, argumentando que la alta actividad de las enzimas Glutatión-S-transferasa y Catalasa promovían la resistencia de este cladóceros. Estas enzimas son importantes en el proceso de desintoxicación celular a agentes xenobióticos como respuesta al estrés (Amado & Monserrat, 2010).

De esta misma forma, la procedencia de la cepa es una característica importante con relación a la tolerancia de los organismos. Macke *et al.* (2017), demostraron que la microbiota intestinal es dependiente del genotipo lo que impulsa una tolerancia a las cianotoxinas, sus resultados indican que la previa exposición microbiana exógena y la dieta del cladóceros huésped, interactúan para formar la estructura y funcionalidad de la microbiota intestinal del genotipo, favoreciendo a aquellos genotipos aislados de sistemas con presencia de cianobacterias productoras de toxinas.

Otro efecto general de los metabolitos producidos por las cianobacterias es el estrés oxidativo (Wiegand & Pflugmacher, 2005). El estrés provocado en las células requiere de una inducción en las defensas antioxidantes, pero esto presenta un gasto energético. Por lo tanto, aunque en las concentraciones más bajas se presenta una alta supervivencia en *D. magna* y *S. vetulus* del presente trabajo; no obstante, con forme aumenta la concentración del extracto mayor podría ser la inversión energética que se reflejaría en un incremento en la mortalidad en las concentraciones más altas. Asimismo, Peter & Lampert (1989), muestran que la disminución en la abundancia y supervivencia de cladóceros de gran tamaño se relaciona al consumo de especies como *Planktothrix agardhii*, ocasionando una disminución del número de puestas, debido a la reducción en las tasas de alimentación por interferencia mecánica y a la toxicidad de esta cianobacteria. Esto concuerda con los resultados encontrados en los experimentos de tabla de vida con *D. magna* y *S. vetulus*, donde en la concentración mayor (20%) hay una disminución en las variables de fecundidad.

La supervivencia de los cladóceros en los tratamientos con baja concentración de toxina no se vio muy afectada en este estudio. Se puede mencionar que en la investigación de Lüring & Van der Grinten (2003) en la que *D. magna* es expuesta a $3.5 \mu\text{g L}^{-1}$ de MC-LR, no mostraron ningún efecto adverso siendo una concentración mayor a las utilizadas en el estudio. También, Dao *et al.* (2010), utilizaron concentraciones entre 5 y $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de microcistina-LR de un extracto crudo de cianobacterias, y encontraron que los tratamientos con baja concentración de Microcistina-LR afectaron ligeramente al crecimiento y la reproducción de los dáfnidos. Sin embargo, la supervivencia disminuyó durante la exposición crónica con el aumento de la concentración, tanto en la concentración diez veces mayor ($50 \mu\text{g L}^{-1}$) como en los extractos crudos, coincidiendo con lo reportado aquí.

Hulot *et al.* (2012), realizó ensayos de historia de vida con *Daphnia magna* expuesta a extractos de *Planktothrix agardhii* productora de Microcistina-RR, encontraron que la presencia del extracto acelera la historia vital, alterando la fecundidad, provocando una disminución del tiempo generacional y reducción de la supervivencia. Esto concuerda con los resultados obtenidos aquí, dentro de las variables demográficas de tabla de vida, se puede identificar que mientras la proporción de extracto crudo aumenta, la esperanza de vida y tiempo generacional disminuyen, esto ocurre en todas las especies. Cuando aumenta el estrés, los organismos presentan historias de vida alternas, invirtiendo más energía en reproducción y eso es fundamental para prevalecer en el sistema. Nandini *et al.* (2021), mostraron que dos clones del cladóceros *Moina macrocopa*, tenían divergencias reproductivas debido a que la especie aislada de un sistema con presencia de cianobacterias comenzaba prematuramente su reproducción en comparación al clon comercial, incrementando así 15% esta variable y presentando ciclos generacionales más cortos.

D. laevis presentó altas tasas de fecundidad, este mismo patrón fue reportado previamente por Dao *et al.* (2010), donde también expuso a *D. magna* a un extracto crudo de cianobacterias; la fecundidad aumento, pero la supervivencia tuvo una reducción considerable. Cuando existen cambios en el ambiente que son desfavorables para los organismos, una de las respuestas a estos cambios se refleja sobre la fecundidad, lo que

tiene como consecuencia alteraciones significativas en la variable de esperanza de vida (MacArthur, 1972).

En comparación los resultados obtenidos de *D. magna* en el tratamiento con mayor proporción de extracto sólo consiguieron una fecundidad máxima de 5 ind día⁻¹ y una mayor mortandad, algo similar ocurrió con *S. vetulus*, pues hubo poca cantidad de neonatos en el mismo tratamiento, esto sugiere que, la exposición a Microcistinas y distintos metabolitos desconocidos en los extractos de cianobacterias tiene efectos negativos en los procesos de reproducción como fue demostrado por Pawlik-Skowrońska *et al.* (2019) sobre *Daphnia pulex* a extractos de cianobacterias debido a la alta concentración de microcistinas, oligopéptidos, anabaenopeptinas, aeruginosamidas, aeruginosinas, cianopeptolinas.

Existen diversas formas en las que los extractos crudos podrían alterar la eficacia biológica de las especies evaluadas aquí. No obstante, tan sólo las Microcistinas disueltas en el extracto pueden afectar drásticamente a los cladóceros, como lo indicaron Rohrlack *et al.* (2005), quienes presentaron el proceso de intoxicación de *Daphnia galeata* y sus síntomas al consumir una cepa de *Microcystis* productora de Microcistinas. Mostraron que los principales síntomas son agotamiento al grado de promover la inanición, alteraciones en la estructura del epitelio intestinal e incremento en la concentración de microcistinas en sangre. Obtuvieron que había daños estructurales afectado la cohesión de las células epiteliales, favoreciendo la absorción de la cavidad digestiva a la sangre y su distribución a través del torrente sanguíneo, ocasionando cambios en la frecuencia de los movimientos que cumplen funciones esenciales de la vida del organismo, como latidos de las piernas torácicas (movimientos esenciales para la ventilación y para la adquisición de alimentos), mandíbulas (provocan el transporte de alimentos hacia el intestino anterior), intestino anterior (movimientos peristálticos que afectan la ingesta de partículas de alimentos), corazón (contracciones que afectan la circulación sanguínea) y segundo par de antenas (responsables de la natación). Aunque no fue parte de los objetivos, en mis observaciones, al final de los experimentos los movimientos en el segundo par de antenas eran muy lentos y ocasionaba que los organismos se sedimentaran y por último murieran.

Perspectivas e Implicaciones

El extracto crudo de cianobacterias tuvo efecto en todos los organismos experimentales, demostrando que en general la mayoría de las especies nativas fueron más susceptibles. Yo propongo no utilizar a *Daphnia magna* como especie modelo para pruebas de ecotoxicología, en su lugar, *Daphnia laevis* sería buena opción de acuerdo a los resultados obtenidos, sin embargo, es importante considerar a *Simocephalus vetulus* como una especie muy sensible cuando es expuesta a tóxicos, lo que hace necesario proponer a las especies autóctonas como organismos modelos para las futuras pruebas. Comparar las sensibilidades por medio de pruebas agudas y crónicas permiten explorar el campo de toxicidad de los compuestos a los que se vean expuestos los organismos, los modelos nativos presentan una ecología y genética específica para ambientes tropicales o subtropicales y los hacen idóneos para estas pruebas, en lugar de especies provenientes de zonas con climas templados. Además, el desarrollo de pruebas sobre organismos aislados directamente de los sitios de evaluación nos ayudaría a pronosticar cambios estructurales en las poblaciones de cladóceros y probablemente de otros componentes de la biota, y a registrar los efectos de diversos compuestos actuando en conjunto y que tienen un potencial toxicológico. Igualmente, es importante considerar un aspecto general de los extractos crudos de cianobacterias sobre el daño que pueden ocasionar, pues no solo las microcistinas tienen un efecto nocivo, existen diversos metabolitos secundarios aún no caracterizados que pueden ejercer un efecto tóxico mayor.

Conclusiones

Se elaboró un extracto crudo de cianobacterias que contenía una concentración de equivalentes de Microcistinas-LR disueltas de $10 \mu\text{g L}^{-1}$.

En las pruebas agudas, *Simocephalus vetulus* fue la especie más sensible en comparación con el organismo estándar *Daphnia magna* a las microcistinas inmersas en el extracto crudo del florecimiento de cianobacterias presente en la Laguna de Zumpango.

El extracto crudo de cianobacterias resultó tener un efecto negativo, en diferente grado, para todos los cladóceros evaluados en los bioensayos crónicos, alterando las variables demográficas asociadas a la supervivencia y fecundidad.

Con base a la sensibilidad relativa obtenida, se destacar que las especies nativas presentaron menor tolerancia a la presencia del extracto crudo de cianobacterias en comparación con *Daphnia magna*, por lo tanto, es necesario utilizar especies autóctonas como organismos modelos para las futuras pruebas ecotoxicológicas.

Literatura citada

Alcocer, J. & Bernal-Brooks, F. W. (2010). Limnology in México. *Hydrobiologia*, 644(1), 1-54.

Allan, J. D. (1976). Life history patterns in zooplankton. *The American Naturalist*, 110(971), 165-180.

Amado, L. L., & Monserrat, J. M. (2010). Oxidative stress generation by microcystins in aquatic animals: why and how. *Environment International*, 36(2), 226-235.

Anagnostidis, K., & Komárek, J. (1990). Modern approach to the classification system of Cyanophytes 5-Stigonematales. *Archiv für Hydrobiologie. Supplementband. Monographische Beiträge*, 86, 1-73.

Antoniou, M. G., De La Cruz, A. A., & Dionysiou, D. D. (2005). Cyanotoxins: New generation of water contaminants. *Journal of environmental engineering*, 131(9), 1239-1243.

Araiza-Vázquez, D. A., (2020). Efecto de la temperatura sobre la fisiología y la demografía de *Simocephalus vetulus* en presencia de extractos crudos del florecimiento de *Microcystis aeruginosa* de la Pista olímpica de remo y canotaje "Virgilio Uribe". [Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México]. eTESIUNAM.

Arzate-Cárdenas, M. A., Olvera-Ramírez, R., & Martínez-Jerónimo, F. (2010). *Microcystis* toxigenic strains in urban lakes: a case of study in Mexico City. *Ecotoxicology*, 19(6): 1157-1165.

Asselman, J., Hochmuth, J. D., & De Schampelaere, K. A. C. (2014). A comparison of the sensitivities of *Daphnia magna* and *Daphnia pulex* to six different cyanobacteria. *Harmful Algae*, 39, 1-7.

A.S. Ferrão-Filho, D.A.S. Silva, T.A. Oliveira, V.F. Magalhães, S. Pflugmacher, E.M. Silva. (2017). Single and combined effects of microcystin- and saxitoxin-producing cyanobacteria on the fitness and antioxidant defenses of cladocerans *Environ. Toxicol. Chem.*, 36 (10), pp. 2689-2697.

Bednarska, A., Joanna, Ł. O. Ś., & Dawidowicz, P. (2011). Temperature-dependent effect of filamentous cyanobacteria on *Daphnia magna* life history traits. *Journal of Limnology*, 70(2), 353.

Berry P. & Lind O. (2010). First evidence of “paralytic shellfish toxins” and cylindrospermopsin in Mexican freshwater system, Lago Cuemanco, and bioaccumulation of toxins in “tegololo” snails (*Pomacea patula caremacensis*). *Toxicon*, 55: 930-938.

Borowitzka, M. A., & Borowitzka, L. J. (1988). *Micro-algal biotechnology*. Cambridge University Press.

Boyer, E. W., Howarth, R. W., Galloway, J. N., Dentener, F. J., Green, P. A., & Vörösmarty, C. J. (2006). Riverine nitrogen export from the continents to the coasts. *Global Biogeochemical Cycles*, 20(1).

Boyce, D. G., Lewis, M. R., & Worm, B. (2010). Global phytoplankton decline over the past century. *Nature*, 466(7306), 591-596.

Briand, J. F., Jacquet, S., Bernard, C., and Humbert, J. F. (2003). Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. *Veterinary Research* 34, 361-377.

Bustillos-Guzmán, J. J., Turner, A., Hernández-Almeida, O. U., Band-Schmidt, C. J., Romero-Bañuelos, C. A., Hernández-Sandoval, F. E., ... & Palomino-Hermosillo, Y. A. (2020). Presence of cyanotoxins in a Mexican subtropical monomictic crater lake. *Applied Sciences*, 10(19), 6719.

Butterwick, C., Heaney, S. I., & Talling, J. F. (2005). Diversity in the influence of temperature on the growth rates of freshwater algae, and its ecological relevance. *Freshwater Biology*, 50(2), 291-300.

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

CONAGUA (Comisión Nacional del Agua). (2021). *Calidad del agua en México*. <https://www.gob.mx/conagua/articulos/calidad-del-agua>.

Coors, A., Vanoverbeke, J., De Bie, T., & De Meester, L. (2009). Land use, genetic diversity and toxicant tolerance in natural populations of *Daphnia magna*. *Aquatic toxicology*, 95(1), 71-79.

Chorus, I., & Bartram, J. (Eds.). (1999). *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management* (1st ed.). CRC Press.

Dao, T. S., Do-Hong, L. C., & Wiegand, C. (2010). Chronic effects of cyanobacterial toxins on *Daphnia magna* and their offspring. *Toxicon*, 55(7), 1244-1254.

De Bernardi, R. D., & Giussani, G. (1990). Are blue-green algae a suitable food for zooplankton? An overview. *Hydrobiologia*, 200(1), 29-41.

Elmgren, R., & Larsson, U. (2001). Nitrogen and the Baltic Sea: managing nitrogen in relation to phosphorus. *TheScientificWorldJournal*, 1, 371-377.

Fernandez, R., Nandini, S., & Sarma, S. S. S. (2012). A comparative study on the ability of tropical micro-crustaceans to feed and grow on cyanobacterial diets. *Journal of plankton research*, 34(8), 719-731.

Ferrão-Filho, A. D. S., Kozłowsky-Suzuki, B., & Azevedo, S. M. (2002). Accumulation of microcystins by a tropical zooplankton community. *Aquatic toxicology*, 59(3-4), 201-208.

Ferrão-Filho, A. D. S., & Kozłowsky-Suzuki, B. (2011). Cyanotoxins: bioaccumulation and effects on aquatic animals. *Marine drugs*, 9(12), 2729-2772.

Figuerola-Sánchez, M. A., Nandini, S., & Sarma, S. S. S. (2020). Zooplankton community structure in relation to microcystins in the eutrophic Lake Zumpango (State of Mexico). *Fundamental and Applied Limnology*, 213-225.

Fontanillo, M., & Köhn, M. (2018). Microcystins: Synthesis and structure–activity relationship studies toward PP1 and PP2A. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 26(6), 1118-1126.

Ger, K. A., Hansson, L. A., & Lürling, M. (2014). Understanding cyanobacteria-zooplankton interactions in a more eutrophic world. *Freshwater Biology*, 59(9), 1783-1798.

Ger, K. A., Urrutia-Cordero, P., Frost, P. C., Hansson, L. A., Sarnelle, O., Wilson, A. E., & Lürling, M. (2016). The interaction between cyanobacteria and zooplankton in a more eutrophic world. *Harmful algae*, 54, 128-144.

Hindák, F. (2008). *Colour atlas of cyanophytes*. VEDA, Publishing House of the Slovak Academy of Sciences.

Han, B. P., Lin, X., Lei, L., & Gu, J. (2012). Survivals of *D. galeata* in sub-tropical reservoirs: harmful effects of toxic cyanobacteria in food source. *Ecotoxicology*, 21(6), 1692-1705.

Herrera, N. A., Echeverri, L. F., & Ferrao-Filho, A. S. (2015). Effects of phytoplankton extracts containing the toxin microcystin-LR on the survival and reproduction of cladocerans. *Toxicon*, 95, 38-45.

Huang, L., Xi, Y., Xu, X., & Wen, X. (2012). Responses in population growth and reproduction of the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus* to microcystin-LR at different temperatures. In *Annales de Limnologie-International Journal of Limnology* (Vol. 48, No. 4, pp. 383-390). EDP Sciences.

Huisman, J., Codd, G. A., Paerl, H. W., Ibelings, B. W., Verspagen, J. M., & Visser, P. M. (2018). Cyanobacterial blooms. *Nature Reviews Microbiology*, 16(8), 471-483.

Hulot, F. D., Carmignac, D., Legendre, S., Yepremian, C., & Bernard, C. (2012). Effects of microcystin-producing and microcystin-free strains of *Planktothrix agardhii* on long-term population dynamics of *Daphnia magna*. In *Annales de Limnologie-International Journal of Limnology* (Vol. 48, No. 3, pp. 337-347). EDP Sciences.

Humbert, J. F., & Fastner, J. (2016). Ecology of cyanobacteria. *Handbook on Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*, Wiley, 9-18.

Jáuregui, E. (2004). Impact of land-use changes on the climate of the Mexico City Region. *Investigaciones geográficas*, (55), 46-60.

Jiang, X., Gao, H., Zhang, L., Liang, H., & Zhu, X. (2016). Rapid evolution of tolerance to toxic *Microcystis* in two cladoceran grazers. *Scientific reports*, 6(1), 1-7.

Kikuchi, M., Syudo, A., Hukumori, M., Naito, C., & Sawai, J. (2017). Changes in aquatic toxicity of potassium dichromate as a function of water quality parameters. *Chemosphere*, 170, 113-117.

Komárek, J. (2010). Recent changes (2008) in cyanobacteria taxonomy based on a combination of molecular background with phenotype and ecological consequences (genus and species concept). *Hydrobiologia*, 639(1), 245-259.

Komárek, J. (2014). Modern classification of cyanobacteria. *Cyanobacteria: An Economic Perspective* (eds NK Sharma, AK Rai and LJ Stal), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 21-39.

Komárek, J., & Johansen, J. R. (2015). Filamentous cyanobacteria. In *Freshwater Algae of North America* (pp. 135-235). Academic Press.

Krantzberg G (1989). Metal accumulation by chironomid larvae: the effects of age and body weight on metal body burdens. *Hydrobiologia* 188(189):497–50

Krebs C. J. (1985). *Ecology: The Experimental Analysis of Distribution and Abundance*. 3rd edition. Harper and Row, New York.

Lampert, W., & Sommer, U. (2007). *Limnoecology: the ecology of lakes and streams*. Oxford university press.

Ledesma, C., Bonansea, M., Rodriguez, C. M., & Sánchez Delgado, A. R. (2013). Determination of trophic indicators in Rio Tercero reservoir, Cordoba (Argentina). *Revista Ciência Agronômica*, 44, 419-425.

Lopes, I., Moreira-Santos, M., Rendón-von Osten, J., Baird, D. J., Soares, A. M., & Ribeiro, R. (2011). Suitability of five cladoceran species from Mexico for in situ experimentation. *Ecotoxicology and environmental safety*, 74(1), 111-116.

Lürling, M., Van der Grinten, E., 2003. Life-history characteristics of *Daphnia magna* exposed to dissolved microcystin-LR and to the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* with and without microcystins. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22, 1281–1287.

Nandini, S., Zamora-Barrios, C. A., & Sarma, S. S. S. (2020). A Long-Term Study on the Effect of Cyanobacterial Crude Extracts from Lake Chapultepec (Mexico City) on Selected Zooplankton Species. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 39(12), 2409-2419.

Nandini, S., Araiza-Vázquez, D. A., & Sarma, S. S. S. (2021). *Moina macrocopa* demographic response to harmful cyanobacteria. *Ecohydrology & Hydrobiology*, 21(2), 333-340.

Nandini, S., S. S. S. Sarma., Ramírez-García, P. (2000). Life table demography and population growth of *Daphnia laevis* (Cladocera, Anomopoda) under different densities of *Chlorella vulgaris* and *Microcystis aeruginosa*. *Crustaceana*, 73(10), 1273-1286.

Maldonado Aranda, S. (2005). Perverse effects of hydraulic policies in Mexico: residual drainage of the Valley of Mexico and the creation of an irrigation district. *New anthropology*, 19(64), 75-97.

MacArthur R.H. (1972). *Geographical ecology: Patterns in the distribution of species*. New York: Harper & Row

Macke, E., Callens, M., De Meester, L., & Decaestecker, E. (2017). Host-genotype dependent gut microbiota drives zooplankton tolerance to toxic cyanobacteria. *Nature Communications*, 8(1), 1-13.

Mendoza-Cantú, A., Ramirez-Romero, P., & Pica-Granados, Y. (2007). Environmental legislation and aquatic ecotoxicology in Mexico: Past, present and future scenarios. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 42(10), 1343-1348.

Merel, S., Walker, D., Chicana, R., Snyder, S., Baurès, E., & Thomas, O. (2013). State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. *Environment international*, 59, 303-327.

Mexican Institute of Water Technology (IMTA). (2012). *Strategic plan for the environmental recovery of the Zumpango Lagoon. Diagnosis and identification of challenges, problems, strategies, objectives, actions and priority projects*.

Mohammed, A. (2007). Comparative sensitivities of the tropical cladoceran, *Ceriodaphnia rigaudii* and the temperate species *Daphnia magna* to seven toxicants. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 89(2), 347-352.

Moosová Z, Šindlerová L, Ambrůzová B, Ambrožová G, Vašíček O, Velki M, Babica P, Kubala L. (2019). Lipopolysaccharides from *Microcystis* Cyanobacteria-Dominated Water Bloom and from Laboratory Cultures Trigger Human Immune Innate Response. *Toxins (Basel)*. Apr 11;11(4):218

Moss, B. R. (2018). *Ecology of Freshwaters: Earth's Bloodstream*. John Wiley & Sons.

Neilan, B. A., Pearson, L. A., Muenchhoff, J., Moffitt, M. C., & Dittmann, E. (2013). Environmental conditions that influence toxin biosynthesis in cyanobacteria. *Environmental microbiology*, 15(5), 1239-1253.

Norma mexicana, NMX-AA-087-SCFI-2010, Análisis de agua evaluación de toxicidad aguda con *Daphnia magna*, Straus (Crustacea Cladocera).

OECD. *Daphnia magna* Reproduction Test. Organization for Economic Cooperation and development; Paris: 2012. Guideline for the Testing of Chemicals No 211; p. 202

Okumura, D. T., Sotero-Santos, R. B., Takenaka, R. A., & Rocha, O. (2007). Evaluation of cyanobacteria toxicity in tropical reservoirs using crude extracts bioassay with cladocerans. *Ecotoxicology*, 16(2), 263-270.

Paerl HW (1997) Coastal eutrophication and harmful algal blooms: importance of atmospheric deposition and groundwater as “new” nitrogen and other nutrient sources. *Limnol Oceanogr* 42:1154–1165.

Paerl, H. W., Fulton, R. S., Graneli, E., & Turner, J. (2006). Ecology of harmful marine algae. In *Ecology of Harmful Algae* (pp. 95-107). Springer Berlin.

Paerl, H. (2008). Nutrient and other environmental controls of harmful cyanobacterial blooms along the freshwater–marine continuum. In *Cyanobacterial harmful algal blooms: State of the science and research needs* (pp. 217-237). Springer, New York, NY.

Paerl, H. W., & Huisman, J. (2009). Climate change: a catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. *Environmental microbiology reports*, 1(1), 27-37.

Paerl, H. W., & Otten, T. G. (2013). Harmful cyanobacterial blooms: causes, consequences, and controls. *Microbial ecology*, 65(4), 995-1010.

Paerl, H. W. (2017). Controlling harmful cyanobacterial blooms in a climatically more extreme world: management options and research needs. *Journal of Plankton Research*, 39(5), 763-771.

Pawlik-Skowrońska, B., Toporowska, M., & Mazur-Marzec, H. (2019). Effects of secondary metabolites produced by different cyanobacterial populations on the freshwater zooplankters *Brachionus calyciflorus* and *Daphnia pulex*. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(12), 11793-11804.

Pawlik-Skowrońska, B., & Bownik, A. (2021). Cyanobacterial anabaenopeptin-B, microcystins and their mixture cause toxic effects on the behavior of the freshwater crustacean *Daphnia magna* (Cladocera). *Toxicon*, 198, 1-11.

Peter, H., & Lampert, W. (1989). The effect of *Daphnia* body size on filtering rate inhibition in the presence of a filamentous cyanobacterium. *Limnology and Oceanography*, 34(6), 1084-1089.

Pietsch C., Wiegand C., Áme V., Nicklish A., Wunderlin D. & Pflugmacher S. (2001). The effects of cyanobacterial crude extract on different aquatic organisms: evidence for cyanobacterial toxin modulating factors. *Environ Toxicol*, 16: 535-542.

Reynolds, C. (2006). Growth and replication of phytoplankton. En *The Ecology of Phytoplankton (Ecology, Biodiversity and Conservation, págs. 178-238)*. Cambridge: Cambridge University Press.

Richardson, A. J. (2008). In hot water: zooplankton and climate change. *ICES Journal of Marine Science*, 65(3), 279-295.

Rohrlack, T., Christoffersen, K., Dittmann, E., Nogueira, I., Vasconcelos, V., & Börner, T. (2005). Ingestion of microcystins by *Daphnia*: intestinal uptake and toxic effects. *Limnology and oceanography*, 50(2), 440-448.

Ruiz-Angulo, A., & López-Espinoza, E. D. (2015). Estimation of the thermal response of the Mexico Valley lacustrine basin in the 16th century: A numerical experiment. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*, 67(2), 215-225.

Salmaso, N., Bernard, C., Humbert, J. F., Akçaalan, R., Albay, M., Ballot, A. & Yéprémian, C. (2016). Basic guide to detection and monitoring of potentially toxic cyanobacteria. *Handbook of cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis*, 46-69.

Santos-Medrano, G. E., & Rico-Martínez, R. (2019). Acute sensitivity comparison among *Daphnia magna straus*, 1820 *Daphnia pulex leydig*, 1860 and *Simocephalus vetulus müller*, 1776, exposed to nine toxicants. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 19(7), 615-623.

Sarma, S. S. S., & Nandini, S. (2006). Review of recent ecotoxicological studies on cladocerans. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 41(8), 1417-1430.

Sazdova, I., Keremidarska-Markova, M., Chichova, M., Uzunov, B., Nikolaev, G., Mladenov, M. & Gagov, H. S. (2022). Review of cyanotoxicity studies based on cell cultures. *Journal of Toxicology*, 2022.

Schopf, J. W. (2012). The fossil record of cyanobacteria. In *Ecology of cyanobacteria II* (pp. 15-36). Springer, Dordrecht.

Sevrin-Reyssac, J., & Pletikosic, M., (1990). Cyanobacteria in fish ponds. *Aquaculture*, 88 (1), 1–20.

Svirčev, Z., Drobac, D., Tokodi, N., Mijović, B., Codd, G. A., & Meriluoto, J. (2017). Toxicology of microcystins with reference to cases of human intoxications and epidemiological investigations of exposures to cyanobacteria and cyanotoxins. *Archives of toxicology*, 91(2), 621-650.

Tang, E. P., Tremblay, R., & Vincent, W. F. (1997). Cyanobacterial dominance of polar freshwater ecosystems: Are high-altitude mat-formers adapted to low temperature? *Journal of Phycology*, 33(2), 171-181.

Ullah, H., Nagelkerken, I., Goldenberg, S. U. & Fordham, D. A. (2018) Climate change could drive marine food web collapse through altered trophic flows and cyanobacterial proliferation. *PLOS Biol.* 16, e2003446.

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.

Versteeg, D. J., Stalmans, M., Dyer, S. D., & Janssen, C. (1997). *Ceriodaphnia* and *Daphnia*: A comparison of their sensitivity to xenobiotics and utility as a test species. *Chemosphere*, 34(4), 869-892.

von der Ohe, P. C., & Liess, M. (2004). Relative sensitivity distribution of aquatic invertebrates to organic and metal compounds. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 23(1), 150-156.

Whitton BA (2012) *The ecology of cyanobacteria II: their diversity in time and space*. Springer, Dordrecht, the Net.

Wiegand, C., Pflugmacher, S., (2005). Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. *Toxicology and Applied Pharmacology* 203, 201–218.

Williamson, P (1980) Variables affecting body burdens of lead, zinc and cadmium in a roadside population of the snail *Cepaea hortensis*. *Oecologia* 44:213–220.

World Health Organization (WHO). (1998). Guidelines for drinking-water quality, 2nd ed. Addendum to Vol. 2. Health criteria and other supporting information. World Health Organization, Geneva.

Zamora-Barrios, C. A., Nandini, S., & Sarma, S. S. S. (2019). Bioaccumulation of microcystins in seston, zooplankton and fish: A case study in Lake Zumpango, Mexico. *Environmental pollution*, 249, 267-276.

Zamora-Barrios, CA., Nandini, S., S.S.S., Sarma (en prensa, 2023). Revisión de cianobacterias potencialmente nocivas / Review of potentially harmful cyanobacteria. *Tecnología y ciencias del agua*. DOI: 10.24850/j-tyca-14-3.

ANEXO 1

Cultivo de microalgas; Medio Bold Basal

En el laboratorio de zoología acuática en la unidad de investigación de la FES Iztacala, se utilizó una cepa de *Scenedesmus acutus* para realizar el cultivo de la microalga en botellas diferentes de 2 L aproximadamente cada una. Todas las botellas se lavaron con ácido clorhídrico y con agua destilada para evitar contaminación en los cultivos, se preparó el medio Bold previamente para después inocular la microalga a cada botella, se mantuvieron a una temperatura de 18°C aproximadamente con un fotoperiodo de 24 horas continuas durante una semana y se mantuvieron con aireación todo el tiempo para evitar la sedimentación de las células. Finalmente se colocaron en el refrigerador y se dejaron sedimentar para posteriormente poder decantar y obtener una concentración, de esta manera se tiene disponible alimento para los organismos del laboratorio. También fue utilizado como medio de dilución para las pruebas ecotoxicológicas.

La preparación del medio se basó en las siguientes sales:

1.- NaNO ₃	250gr L ⁻¹
2.- MgSO ₄	75gr L ⁻¹
3.- K ₄ HPO ₄	75gr L ⁻¹
4.- KH ₂ PO ₄	75gr L ⁻¹
5.- NaCl	75gr L ⁻¹
6.- EDTA	50gr + 31gr de KOH L ⁻¹
7.- FeSO ₄	4.98gr L ⁻¹ + (1ml 31gr de H ₂ SO ₄ L ⁻¹)
8.- H ₃ BO ₃	1.42gr L ⁻¹
9.- CaCl ₂	25gr L ⁻¹
10. Elementos traza:	

a) ZnSO ₄	8.82gr L ⁻¹
b) MnCl ₂	1.44gr L ⁻¹
c) MoO ₃	0.71gr L ⁻¹
d) CuSO ₄	1.75gr L ⁻¹
e) Co (NO ₃)	0.49gr L ⁻¹

ANEXO 2

Cultivo de cladóceros; Medio EPA

Todos los organismos fueron cultivados en medio EPA, las cantidades para 20 L de agua destilada (este medio se mantiene a temperatura ambiente) fue preparado al inicio del experimento, con las sales:

CaSO ₄	1.2 mg
MgSO ₄	1.2 mg
NaHCO ₃	1.9 mg
KCl	0.04 mg