

## EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO Y TOXIGENICIDAD DE *Microcystis* EN AGUAS ENRIQUECIDAS CON NUTRIENTES

Growth assessment and toxigenicity of *Microcystis* in nutrient-enriched waters

Aldo AQUINO-CRUZ\*, Daniela Melissa TORRES CALDERÓN,  
Erick Adolfo BARRIOS GARCÍA y Celia BULIT

Laboratorio de Plancton y Bioenergética, Departamento El Hombre y su Ambiente, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, 04960 Ciudad de México, México.

\*Autor para correspondencia: aldoaqcz@yahoo.com

(Recibido: octubre de 2019; aceptado: junio de 2020)

Palabras clave: aguas epicontinentales, nutrientes disueltos, cianotoxicidad, Ciudad de México.

### RESUMEN

El crecimiento de diversas cianobacterias nocivas (*Microcystis*) se ha intensificado a nivel mundial como resultado de numerosas y rápidas alteraciones ambientales. En este estudio la cianobacteria *Microcystis* fue aislada de la Pista Olímpica de Remo y Canotaje Virgilio Uribe de la Ciudad de México y se investigaron: 1) la influencia del aumento de nitrógeno (N) y fósforo (P) en el crecimiento de *Microcystis* y 2) la toxigenicidad potencial de *Microcystis* mediante bioensayos de mortalidad de *Artemia* sp. En 2017, dos cepas clonales de *Microcystis* (Mc17C2 y Mc17C3) se establecieron en condiciones controladas de laboratorio. Dichas cepas crecieron en una cámara iluminada con irradianza de  $19.6 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  con un fotoperiodo de 12 h luz:12 h oscuridad a temperatura ambiente ( $\sim 24 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Se cultivó *Artemia* sp. y se seleccionaron juveniles del crustáceo para alimentarlos con diferentes concentraciones de *Microcystis*. El aumento en la concentración de N y P se asoció con mayores tasas de crecimiento de *Microcystis*; sin embargo, su crecimiento óptimo no coincidió con los niveles más altos de nutriente en los cultivos. La ingestión de *Microcystis* por juveniles de *Artemia* causó mortalidad del 50 al 100 % en un lapso de 48-72 h cuando la abundancia fluctuó entre  $3 \times 10^5$  y  $3 \times 10^6$  cel/mL. En general, *Artemia* sp. no mostró sensibilidad al consumo de *Microcystis* en las primeras 24 h. Se concluye que el incremento y la disponibilidad de nutrientes disueltos conducen a mayores tasas de crecimiento de *Microcystis* con efecto potencial sobre el zooplancton.

Key words: epicontinental waters, dissolved nutrients, cyanotoxicity, Mexico City.

### ABSTRACT

The growth of several harmful cyanobacteria (*Microcystis*) has increased worldwide as a result of numerous and rapid environmental alterations. In this study, the toxigenic cyanobacterium *Microcystis* was isolated from a water body in Mexico City (Pista Olímpica de Remo y Canotaje Virgilio Uribe) with the aim to investigate: (1) the influence of increasing nitrogen (N) and phosphorus (P) on the growth of *Microcystis* and (2) the potential toxigenicity of *Microcystis* using mortality bioassays of *Artemia* sp.

In 2017, two clonal strains (Mc17C2 y Mc17C3) of *Microcystis* were established in monoculture under controlled laboratory conditions. *Microcystis* strains were grown in a culture chamber *in vitro* with irradiance  $19.6 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  with a 12 h light:12 h dark photoperiod, and at room temperature ( $\sim 24 \pm 2^\circ\text{C}$ ). *Artemia* sp. was cultured and juvenile organisms were used and fed on different quantities of *Microcystis* strains. Increasing N and P concentrations lead to higher growth rates of *Microcystis*; however, its optimum growth rate did not match with the highest nutrient concentrations in the cultures. *Microcystis* ingestion by juvenile *Artemia* caused 50 to 100 % of mortality in 48-72 h, when fed on abundance between  $3 \times 10^5$  y  $3 \times 10^6$  cells/ml. In general, *Artemia* was not susceptible to *Microcystis* ingestion within a time of 24 h. In conclusion, higher availability of dissolved nutrients in the water leads to increasing growth rates of *Microcystis* which may cause potential effects on zooplankton.

## INTRODUCCIÓN

Diversos sistemas acuáticos epicontinentales del territorio mexicano están siendo alterados negativamente debido a una compleja interacción de cambios y procesos ambientales, por ejemplo, la contaminación, la urbanización, la eutrofización, el cambio climático, alteraciones hidrológicas y los florecimientos algales nocivos (FAN) (Winder y Sommer 2012, Harke et al. 2016). Los FAN son fenómenos provocados por la abundancia y reproducción excesiva de microorganismos fotosintéticos, cianobacterias y algas de una o varias especies, en la columna de agua de ambientes acuáticos (García-Mendoza et al. 2016). En las últimas décadas, la frecuencia, permanencia, distribución geográfica e intensidad de los FAN se han incrementado en todo el mundo (Harke et al. 2016).

Distintas cianobacterias planctónicas formadoras de florecimientos (*Microcystis*, *Planktothrix*, *Aphanizomenon*, *Nodularia*, *Cylindrospermopsis*, *Limnothrix*) causan graves problemas ambientales, socioeconómicos y de salud reconocidos a nivel mundial (Paerl y Huisman 2008). *Microcystis* es uno de los géneros cianobacteriales dominantes en aguas epicontinentales (Harke et al. 2016), cuyos florecimientos pueden resultar perjudiciales debido, entre otras cuestiones, a la presencia de microcistinas, toxinas oxidantes generadoras de diferentes problemas de salud (O'Neil et al. 2012). Existen más de 100 variedades identificadas globalmente de microcistinas que pueden causar la muerte en vertebrados por hemorragia del hígado (Merel et al. 2013, Puddick et al. 2016). La ruta más común de intoxicación humana por microcistinas es la vía oral por ingestión de agua, plantas o animales contaminados, aunque también ocurre por inhalación o por contacto directo con la piel (WHO 2003). Los efectos negativos de las microcistinas pueden

presentarse desde algunos minutos hasta varios días después de la exposición a las biotoxinas (Zanchett y Oliveira-Filho, 2013).

Numerosas cianobacterias planctónicas tienen, en general, una tasa de crecimiento mayor que la de muchos autótrofos eucariontes y pueden competir exitosamente cuando la temperatura aumenta (Paerl y Huisman 2009). Tal es el caso de *Microcystis*, cuyo crecimiento óptimo está regulado, entre otros factores, por la disponibilidad de nitrógeno (N) y fósforo (P) (Harke et al. 2016). Asimismo, su capacidad de almacenar nutrientes le permite crecer en cuerpos de agua desde mesotróficos hasta hipertróficos (Gobler et al. 2016).

Se ha demostrado que, entre los nutrientes implicados en el metabolismo, el N, además de sus funciones como elemento nutritivo esencial, puede modular la toxicidad de *Microcystis* (Puddick et al. 2016). La limitación de N retrasa la síntesis de microcistinas (Dai et al. 2008). Por otra parte, el P, en concentraciones ambientales reducidas, tiene poco efecto sobre la producción de microcistinas (Dai et al. 2008), y *Microcystis* tiene la capacidad de usar sulfuros como reemplazo (Puddick et al. 2016).

En la zona urbana de Xochimilco, Ciudad de México, específicamente en las aguas de la Pista Olímpica de Remo y Canotaje Virgilio Uribe, existe un problema ambiental desde hace varias décadas, debido a la presencia y permanencia de florecimientos derivados del crecimiento excesivo de *Microcystis* (Pineda-Mendoza et al. 2011).

Considerando el potencial nocivo de *Microcystis* sobre la biota y el ambiente a nivel mundial, los objetivos de interés del presente trabajo de investigación fueron: 1) determinar la influencia de concentraciones crecientes de N y P sobre el crecimiento de *Microcystis* y 2) evaluar el potencial tóxico de dos cepas de *Microcystis*, tomando como organismo experimental al crustáceo *Artemia*.

La Pista Olímpica, escogida para realizar este trabajo, es un ejemplo de ecosistema eutrófico, debido a descargas de aguas residuales, donde *Microcystis* suele desarrollar frecuentemente florecimientos de diversa intensidad (Tavera et al. 2000, Alva-Martínez et al. 2004, 2007a, 2007b, 2009).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Recolección y aislamiento de *Microcystis*

*Microcystis* fue recolectada en abril de 2017 en la Pista Olímpica (19° 16' 20.58" N, 99° 6' 16.72" O) de la Ciudad de México. Este cuerpo de agua mide aproximadamente 2200 m de largo, 125 m de ancho, tiene 2 m de profundidad y mantiene su volumen mediante aporte pluvial y vertido de aguas tratadas (Pineda-Mendoza et al. 2011).

Se recolectaron 5 l de agua superficial con botella van Dorn. De este volumen se almacenó 1 L del agua en un frasco de plástico, colocado y transportado en una hielera (~ 8 °C) hasta el laboratorio, previo al aislamiento de *Microcystis*. La muestra de agua se mantuvo fresca y en la oscuridad por un tiempo < 30 min antes de llegar al laboratorio. El material se agitó vigorosamente por 1 min para separar las colonias. Los cultivos clonales se realizaron usando el método de micropipetas y diluciones seriadas bajo el microscopio (Andersen y Kawachi 2005), donde una célula de *Microcystis* se aisló y multiplicó clonalmente en tubos estériles con medio basal Bold (0.5 mL). En este estudio se utilizaron dos cepas de *Microcystis* denominadas Mc17C2 y Mc17C3.

Dichas cepas crecieron en monocultivos *in vitro* en una cámara iluminada con irradianza de 19.6  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , con un fotoperiodo de 12 h luz:12 h oscuridad, a temperatura ambiente (~ 24 ± 2 °C). Los cultivos desarrollados de *Microcystis* se transfirieron y mantuvieron en crecimiento exponencial en un volumen de 250 mL antes de los experimentos de crecimiento y mortalidad. Cabe destacar que las cepas de *Microcystis* se distinguieron por su crecimiento unicelular en todos los monocultivos, aunque esporádicamente se observó formación de triadas.

### Influencia del nitrógeno y el fósforo sobre el crecimiento de *Microcystis*

Se utilizó la cepa Mc17C3 para evaluar el efecto de un gradiente de concentración de  $\text{N}_{\text{total}}$  (1.47-29.40 nM) y  $\text{P}_{\text{total}}$  (0.86-17.21 nM) sobre el crecimiento. El medio basal Bold ( $\text{N}_{\text{total}} = 2.94 \text{ mM}$  y  $\text{P}_{\text{total}} = 1.72 \text{ mM}$  [Andersen et al. 2005]) se utilizó como referencia estándar en las combinaciones de N y P empleadas

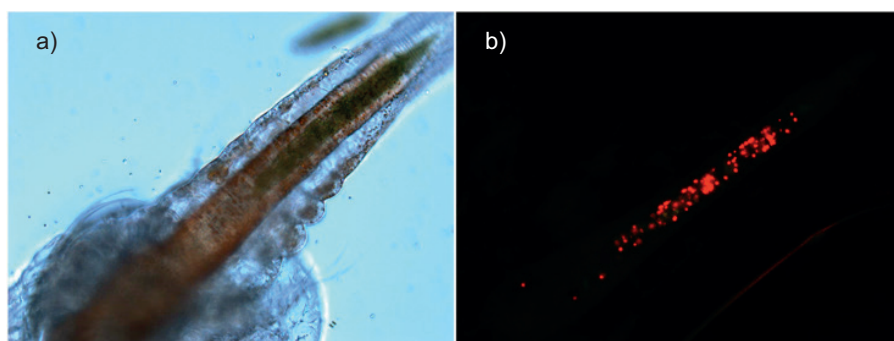
para el crecimiento de *Microcystis*. En este sentido, la combinación de nutrientes asignada a los cultivos experimentales de *Microcystis* se denominó 1/2 ×, 1 ×, 2 ×, 6 × y 10 × (submúltiplos y múltiplos del valor de N y P agregado a los cultivos considerando el contenido del medio basal Bold).

Los experimentos de crecimiento (1/2 ×, 1 ×, 2 ×, 6 × y 10 ×) se realizaron por triplicado en matraces Erlenmeyer (1 L) con un volumen inicial de 700 mL. El crecimiento se evaluó durante 15 días en las condiciones físicas descritas. Los cultivos experimentales iniciaron con abundancias celulares de  $10^4 \text{ cel}/\text{mL}$ . El crecimiento de *Microcystis* se cuantificó usando un microscopio compuesto (Zeiss Standard 25) y cámara de Neubauer (Guillard y Sieracki 2005) cada dos días. La tasa de crecimiento se calculó con base en la pendiente de una regresión lineal transformando a logaritmo natural los datos de abundancia de la fase del crecimiento exponencial (Wood et al. 2005).

La concentración de clorofila *a* en una alícuota de 25 mL se determinó por espectrofotometría siguiendo el método de extracción pasiva (Jeffrey y Humphrey 1975). Los pigmentos clorofílicos fueron extraídos en la oscuridad durante 24 h a 4 °C, utilizando acetona al 90 %.

### Bioensayos de toxigenicidad de *Microcystis*

La potencial toxigenicidad de *Microcystis* (cepas Mc17C2 y Mc17C3) se investigó por medio de bioensayos de mortalidad del crustáceo *Artemia* sp. (Vanhaecke et al. 1981). *Artemia* sp. se cultivó eclosionando quistes comerciales según el método propuesto por Sorgeloos et al. (1986). Antes del cultivo se filtró (0.7  $\mu\text{m}$ ) y esterilizó agua de mar con una salinidad de 34 UPS. Los quistes eclosionaron en agua de mar diluida (salinidad 27 UPS) a temperatura de 25 °C (± 2), con un fotoperiodo de 12 h luz:12 h oscuridad. En los bioensayos se usaron individuos juveniles de *Artemia* sp. con la boca y el sistema digestivo desarrollados. Antes de los bioensayos se confirmó la ingestión de células vivas de *Microcystis* a través de microscopía de epifluorescencia (**Fig. 1**). Todos los bioensayos se realizaron en la oscuridad para no alterar la abundancia celular de *Microcystis*, a temperatura de 23 a 26 °C. Como control experimental negativo, *Artemia* sp. fue alimentada con microalgas no tóxicas de los géneros *Scenedesmus* y *Pseudokirchneriella*. El rango de abundancia y la cepa de *Microcystis* expuesta como alimento a *Artemia* se describen en el **cuadro I**. Los controles negativos y las pruebas experimentales de alimentación se realizaron por sextuplicado en todos los casos. Los bioensayos se realizaron en frascos de cristal (8 mL)



**Fig. 1.** (a) Vista del tracto digestivo de un juvenil de *Artemia* sp. observado en campo claro (100  $\times$ ). (b) Fluorescencia de la ficoeritrina (585 nm) en células de *Microcystis* sp. contenidas en el tracto digestivo de *Artemia* sp. (100  $\times$ ).

**CUADRO I.** ABUNDANCIA DE *Microcystis* UTILIZADA EN LOS BIOENSAYOS DE *Artemia* sp.

Bioensayo	Cepa	Abundancia $\times 10^3$ (cel/mL)
B1	Mc17C2	5, 50 y 300
B2	Mc17C3	21, 100 y 1000
B3	Mc17C3	50, 500 y 5000

con un volumen de 5 mL de agua marina diluida (salinidad 27 UPS), donde un organismo de *Artemia* se alimentó con la abundancia señalada en el **cuadro I**. El gradiente de abundancia empleado en los bioensayos se realizó por dilución (agua de mar y cultivo de *Microcystis*), donde se conservó una salinidad de 27 UPS en todos los casos. La mortalidad se cuantificó a las 24, 48 y 72 h en todos los bioensayos.

Para comparar la toxicidad de *Microcystis* con resultados de otros estudios, se calculó la equivalencia entre la abundancia celular (cel/mL) usada en este trabajo y la biomasa seca (mg/mL) usada por otros autores, considerando que una célula tuvo una equivalencia en peso de  $1.21 \times 10^{-11}$  g (Hu 2014).

### Análisis de resultados

Los datos de abundancia, tasa de crecimiento y concentración de clorofila *a* se promediaron y graficaron con el programa SigmaPlot (v. 13, Systat Software, San Jose, CA, EUA). Además, se graficó el porcentaje de mortalidad de *Artemia* sp. ( $n = 4$ ) de los controles y de los tratamientos con alimentación a las 24, 48 y 72 h. Las tasas de crecimiento determinadas en diferentes concentraciones de nutrientes ( $1/2 \times$ ,  $1 \times$ ,  $2 \times$ ,  $6 \times$  y  $10 \times$ ) se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía (SigmaPlot 13). Previamente se

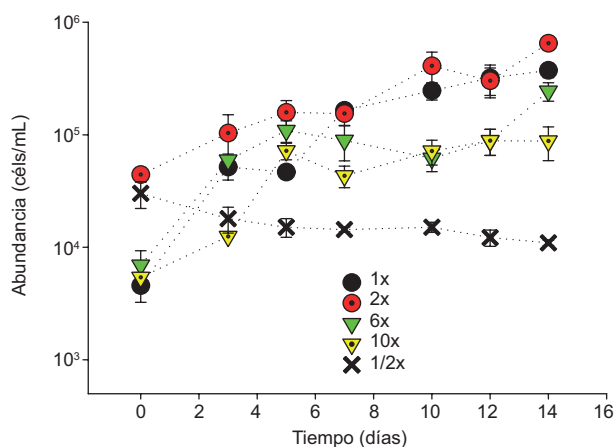
realizaron las pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk) y homocedasticidad que confirmaron las condiciones de parametricidad de los datos de crecimiento. El valor de significancia ( $p$ ) de las pruebas estadísticas fue de 0.05.

## RESULTADOS

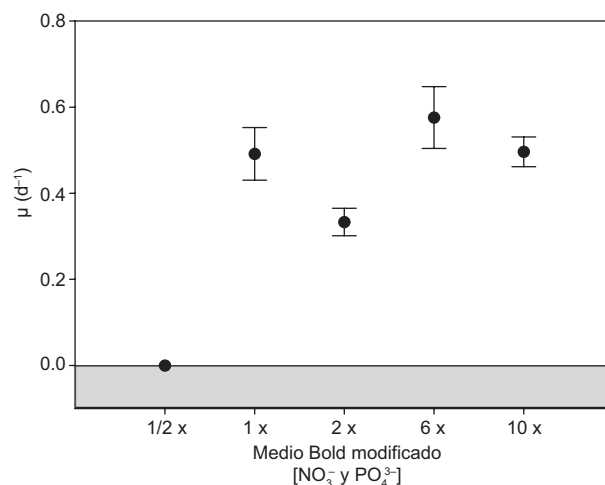
### Crecimiento de *Microcystis* en cultivos enriquecidos

*Microcystis* (cepas Mc17C2 y Mc17C3) fue cultivada y creció satisfactoriamente en condiciones controladas de laboratorio usando los concentrados  $1 \times$  a  $10 \times$  del medio basal Bold (**Fig. 2**). *Microcystis* no creció en el medio Bold diluido ( $1/2 \times$ ) y su crecimiento celular y producción de clorofila *a* declinaron al iniciar el cultivo (**Figs. 2 y 3**). El aumento de la concentración de nutrientes disueltos ( $1 \times$  a  $10 \times$ ) produjo un incremento en las tasas de crecimiento de *Microcystis* (**Fig. 4**), pero el ANOVA ( $n = 3$ ) no mostró diferencias significativas en las tasas de crecimiento de los experimentos  $1 \times$  ( $0.49 \pm 0.10 \text{ d}^{-1}$ ),  $6 \times$  ( $0.58 \pm 0.12 \text{ d}^{-1}$ ) y  $10 \times$  ( $0.50 \pm 0.05 \text{ d}^{-1}$ ) ( $p = 0.05$ , **Fig. 4**). Sin embargo, el crecimiento óptimo de *Microcystis* ocurrió en los cultivos  $6 \times$  ( $0.58 \text{ d}^{-1}$ ). En el medio Bold  $2 \times$ , a pesar de la concentración de nutrientes, *Microcystis* redujo su tasa máxima de crecimiento ( $0.33 \text{ d}^{-1}$ ), pero no mostró diferencias estadísticamente significativas respecto a las tasas determinadas en los cultivos  $1 \times$  y  $10 \times$ , con excepción del medio Bold  $6 \times$  (ANOVA,  $p = 0.05$ , **Fig. 4**). Independientemente de la concentración de nutrientes (medio Bold  $1 \times$  a  $10 \times$ ), la fase del crecimiento exponencial de *Microcystis* tuvo una duración < siete días para todos los tratamientos, y las abundancias máximas fluctuaron entre  $8.83 \times 10^4$  y  $6.52 \times 10^5$  cel/ml (**Fig. 2**).

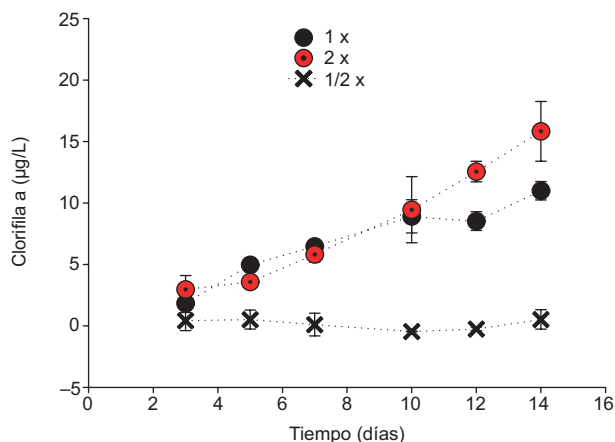




**Fig. 2.** Crecimiento de *Microcystis* (cepa Mc17C3) determinado en diferentes concentraciones de nutrientes. Cada punto indica el promedio del crecimiento de *Microcystis* en el tiempo ( $n = 3$ ). Las barras verticales indican la desviación estándar ( $n = 3$ ).



**Fig. 4.** Tasa de crecimiento ( $\mu$ ) de *Microcystis* (cepa Mc17C3) obtenida en diferentes concentrados del medio de cultivo Bold. Las barras verticales indican la desviación estándar ( $n = 3$ ).



**Fig. 3.** Concentración de clorofila *a* obtenida en cultivos monoclonales de *Microcystis* (cepa Mc17C3) en diferentes concentraciones de nutrientes. Los símbolos representan los promedios y las barras verticales indican la desviación estándar.

La producción de clorofila *a* durante el crecimiento de *Microcystis* no mostró diferencias significativas en los medios  $1 \times$  y  $2 \times$ , donde el máximo registrado fue de  $11.0 \mu g \text{ cl } a/L$  y  $15.8 \mu g \text{ cl } a/L$  (Fig. 3), respectivamente.

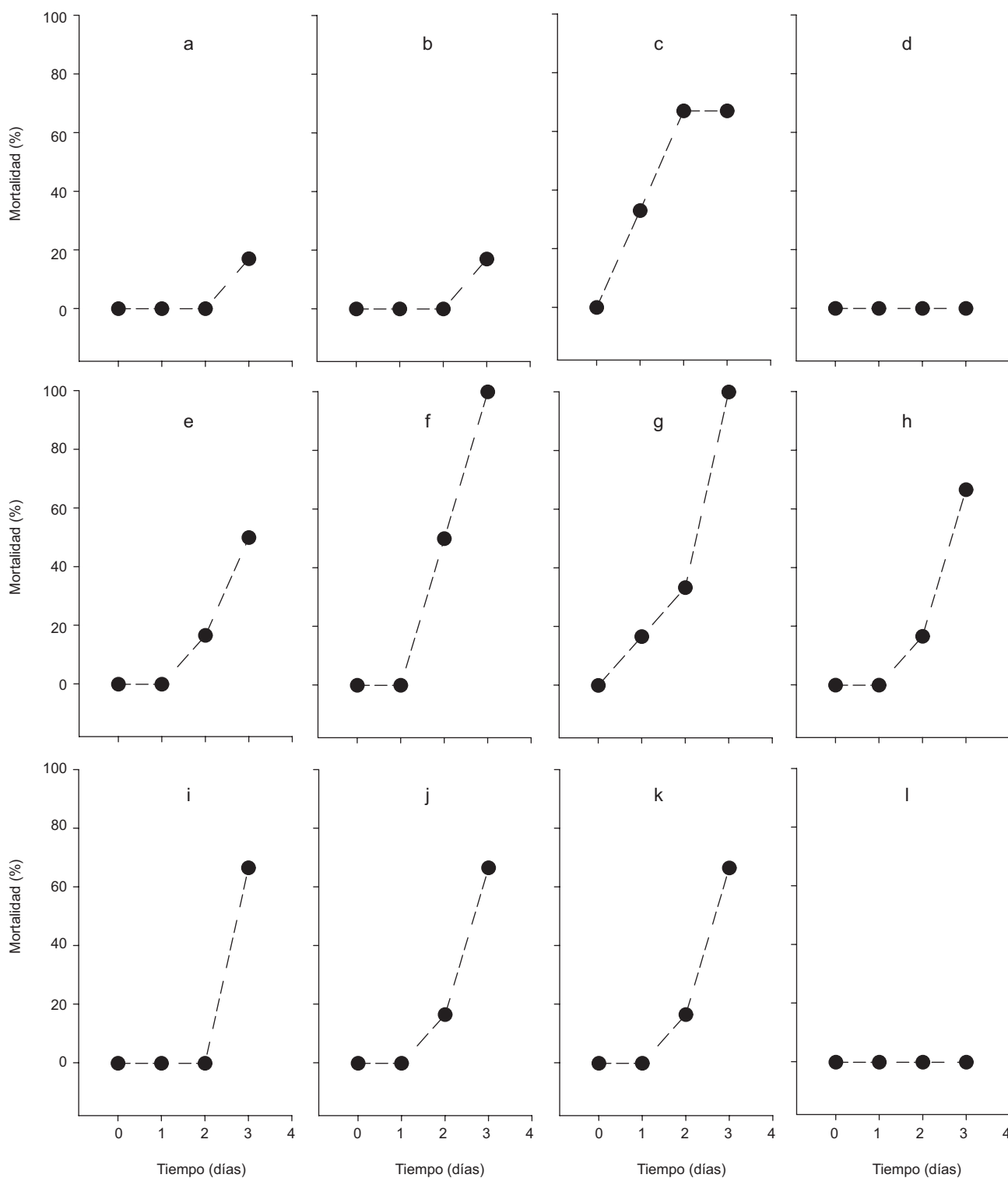
### Mortalidad por ingestión de *Microcystis*

*Artemia* sp. se alimentó de distintas cantidades de *Microcystis* (Mc17C2 y Mc17C3) en los bioensayos, confirmando que a mayor abundancia de *Microcystis* aumenta la tasa de mortalidad de *Artemia* (Fig. 5). En general, *Artemia* sp. no fue sensible a la ingestión

de *Microcystis* en las primeras 24 h, excepto en el bioensayo B1 con abundancia de  $3 \times 10^5 \text{ cel/ml}$  de la cepa Mc17C2 (Fig. 5). La tasa de mortalidad de juveniles de *Artemia*, producto de una intoxicación potencial, se agudizó a las 48 y 72 h (bioensayos B1 y B3), llegando a producir  $> 50 \%$  de decesos cuando la abundancia fluctuó de  $3 \times 10^5$  a  $3 \times 10^6 \text{ cel/ml}$  (Fig. 5). Cabe destacar que en el bioensayo B2 se obtuvo la máxima tasa de mortalidad (100 %) de *Artemia* a las 72 h de haber sido alimentada con  $1 \times 10^5$  y  $3 \times 10^6 \text{ cel/ml}$  de la cepa Mc17C3. Sin embargo, en el bioensayo B3, a pesar de que se utilizó una mayor abundancia de *Microcystis* ( $\geq 5$  veces) que en el bioensayo B2, únicamente se alcanzó un máximo de mortalidad de 66 % al término de 72 h (Fig. 5). La valoración del efecto máximo de mortalidad indica que la cepa Mc17C3 de *Microcystis* fue potencialmente más letal que la cepa Mc17C2 (Fig. 5). La exposición de *Artemia* sp. a abundancia  $\leq 10^4 \text{ cel/ml}$  de *Microcystis* causó mortalidad inferior al 50 % en la mayoría de los bioensayos.

## DISCUSIÓN

Frecuentemente los florecimientos nocivos de cianobacterias como *Microcystis* provocan múltiples problemas ambientales, socioeconómicos y de salud en ecosistemas acuáticos epicontinentales a nivel global (Harke et al. 2016). En la zona urbana de Xochimilco, específicamente en las aguas de la Pista Olímpica, existe un problema ambiental desde hace décadas debido a la presencia y permanencia de un



**Fig. 5.** Tasa de mortalidad de *Artemia* sp. por exposición e ingestión de *Microcystis* a diferentes concentraciones. (a-c) Bioensayo 1 (5, 50 y  $300 \times 10^3$  cel/mL, respectivamente). (d) Control. (e-g) Bioensayo 2 (21, 100 y  $1000 \times 10^3$  cel/mL, respectivamente). (h) Control. (i-k) Bioensayo 3 (50, 500 y  $5000 \times 10^3$  cel/mL, i-k, respectivamente). (l) Control. Cada punto indica el promedio porcentual de mortalidad en el tiempo (n = 4). En todos los controles *Artemia* se alimentó con fitoplancton no tóxico.

floreCIMIENTO derivado del crecimiento excesivo de *Microcystis* (Pineda-Mendoza et al. 2011). En esta región, los FAN de cianobacterias no han recibido la suficiente atención y, en general, se ignoran los riesgos que representan para la salud humana y la biota (Pérez-Morales et al. 2016).

Numerosos cuerpos de agua de Xochimilco están eutrofizados por exceso de nutrientes. La Pista Olímpica, por ejemplo, recibe aguas tratadas del Cerro de la Estrella desde hace varias décadas (Arcos-Ramos et al. 2012). El efecto de la carga de nutrientes en el agua no sólo ha favorecido la permanencia de los FAN de *Microcystis*, sino que también podría ser factor promotor de la producción y acumulación masiva de toxinas dañinas para la biota, incluyendo el hombre. Por ello, es indispensable comprender los impactos de la eutrofización por altas concentraciones de N y P sobre el crecimiento de *Microcystis*, así como advertir la potencial toxigenicidad de esta cianobacteria en el ambiente.

### Nutrientes y crecimiento de *Microcystis*

En este trabajo, la tasa óptima de crecimiento de *Microcystis* en condiciones de cultivo se asoció con concentraciones elevadas de N y de P (medio Bold 6 ×). Estos resultados coinciden con los realizados en distintas regiones, como en el caso de una cepa aislada de una laguna de Filipinas (Baldia et al. 2007). En ese mismo sentido, Vézie et al. (2002) demostraron que una proporción alta de N:P favorece el crecimiento de *Microcystis*, siempre y cuando la concentración de N supere un nivel mínimo (0.05 mg/L), tomando en cuenta la incapacidad de esta cianobacteria para fijar N atmosférico. Es importante destacar que los nutrientes influyen sobre la abundancia tanto de cepas tóxicas como no tóxicas; estas últimas los requieren en menor concentración para alcanzar la tasa máxima de crecimiento, en tanto que las cepas tóxicas los necesitan en mayores concentraciones (Davis et al. 2009, Burford et al. 2018). La ausencia de crecimiento de *Microcystis* en el experimento con menor concentración de nutrientes podría relacionarse con el aumento o mayor influencia en la síntesis de compuestos de reserva a expensas de la disminución en la división celular (Cordeiro et al. 2017).

Adicionalmente, la respuesta interespecífica de crecimiento de *Microcystis* en diferentes concentraciones de N y P, ha mostrado resultados muy variables (Parrish 2014); por lo anterior, diversos autores coinciden en la dificultad de definir los límites de N y P que promueven el desarrollo y la formación súbita de sus florecimientos. En consecuencia, es importante estudiar el crecimiento de diferentes cepas del

género, ya que las respuestas génicas y fisiológicas de poblaciones de distintas localidades y ambientes pueden diferir significativamente (Vézie et al. 2002).

Las tasas máximas de crecimiento de *Microcystis* obtenidas en este estudio (0.58 y 0.50 d<sup>-1</sup>, medios Bold 6 × y 10 ×) son superiores a las documentadas en otros reportes que usaron el mismo medio Bold. La tasa óptima de crecimiento, obtenida usando el medio Bold 6 ×, permite inferir que una probable eutrofización del ambiente favorecería el mantenimiento y crecimiento de la cianobacteria. En la condición opuesta, en cuanto a limitación de N y de P en cultivo, se ubican tasas de crecimiento menores (0.15-0.18 d<sup>-1</sup> [Imai et al. 2009, Che et al. 2017]), como ocurrió en este caso con el crecimiento en el medio con menor concentración de nutrientes. Por otra parte, también se ha señalado que *Microcystis* puede adaptarse y crecer eficientemente en condiciones reducidas de N, pero no en ausencia de P (Wu et al. 2015). Cabe agregar que la tasa de asimilación de diferentes concentraciones de P varía durante las etapas del crecimiento de *Microcystis*; puede aumentar en los primeros días de cultivo y luego disminuir (Ghaffar et al. 2017), como en los experimentos 1 × y 2 × aquí presentados. Algunos autores consideran que el P es el principal factor limitante en la formación y permanencia de los FAN de *Microcystis* en aguas epicontinentales (Harke et al. 2012).

### Toxigenicidad de *Microcystis* en los consumidores

Las toxinas producidas por cianobacterias afectan a organismos acuáticos a distintos niveles. En este trabajo, las cepas Mc17C2 y Mc17C3 provocaron inmovilidad, letargo y mortalidad de juveniles de *Artemia*, como ocurrió en estudios previos (Arzate-Cárdenas et al. 2010, Vasconcelos et al. 2010, entre otros). En ese sentido, las toxinas producidas por *Microcystis* podrían considerarse un mecanismo de defensa contra organismos fitoplanctívoros y, al mismo tiempo, afectarían las tasas de alimentación, reproducción y supervivencia de algunos depredadores (Holland y Kinnear 2013, Zanchett y Oliveira-Filho 2013).

La mortalidad de *Artemia* en los bioensayos estuvo relacionada directamente con el aumento de la abundancia celular de *Microcystis*, ya que se ha encontrado que al aumentar la abundancia de este microorganismo disminuye la supervivencia de los crustáceos *Artemia* y *Daphnia magna* (Arzate-Cárdenas et al. 2010). Cabe señalar que la biomasa seca de *Microcystis* se ha utilizado en varios bioensayos de toxicidad (**Cuadro II**), en los cuales la mortalidad de *Artemia* sp. ha sido similar a la de este estudio, hecho que revela la utilidad de su potencial nocivo como primer diagnóstico.

**CUADRO II.** ESTUDIOS DOCUMENTADOS SOBRE MORTALIDAD DE *Artemia* POR INGESTIÓN DE *Microcystis*.

Especie	Organismo	Abundancia $\times 10^3$ (cel/mL)	Conversión Peso-célula (cel/mL) (Hu 2014)	Compuesto nocivo aplicado	Compuesto tóxico	Mortalidad (%)	Referencia
<i>Microcystis</i> sp.	<i>Artemia salina</i>	Nd	$8.26 \times 10^8$	10 mg/mL biomasa lío-filizada (24 h)	MC-LR	> 50	Douma et al. 2017
<i>Microcystis aeruginosa</i>	<i>Artemia franciscana</i>	1500	—	3.62 $\mu$ M (24 h)	MC-LR	> 80	D'ors et al. 2013
<i>Microcystis</i> sp.	<i>Artemia salina</i>	Nd	$4.13 \times 10^9$	50 mg/mL biomasa seca (48 h)	MC-LR	> 50	Metcalfe et al. 2002
<i>Microcystis ichthyoblade</i>	<i>Artemia salina</i>	Nd	$3.30 \times 10^9$	40 mg/mL biomasa seca (24 h)	MC-LR	40	Sabour et al. 2002
<i>Microcystis</i> sp.	<i>Artemia salina</i>	Nd	$5.78 \times 10^7$ $-6.52 \times 10^8$	0.7-7.9 mg/mL biomasa seca (24 h)	MC-LR	> 50	Kyselková y Maršálek 2000
<i>Microcystis</i> sp.	<i>Artemia salina</i>	Nd	$8.26 \times 10^8$	10 mg/mL biomasa seca (48 h)	MC-LR	> 65	Vézie et al. 1996
<i>Microcystis aeruginosa</i>	<i>Artemia salina</i>	Nd	$4.13 \times 10^8$ $-7.02 \times 10^8$	5.0-8.5 mg/mL biomasa seca (24 h)	Nd	> 80	Kiviranta et al. 1991
<i>Microcystis</i> (Mc17C2)	<i>Artemia</i> sp.	300	—	Nd	Nd	> 50	Este estudio
<i>Microcystis</i> (Mc17C3)	<i>Artemia</i> sp.	21, 50, 100, 500, 1000 y 5000	—	Nd	Nd	> 50	Este estudio

MC-LR: microcistina LR, Nd: no disponible.

En el **cuadro II** se aprecia que hubo mortalidad significativa (> 50 %) de organismos de *Artemia* alimentados con cultivos de *Microcystis* mucho menos abundantes que los usados en otros estudios. Este resultado permite inferir la potencial toxigenicidad de las cepas Mc17C2 y Mc17C3, ya que existe relación entre el aumento de la mortalidad de *Artemia* y el incremento proporcional en la concentración de hepatotoxinas y neurotoxinas (Kiviranta et al. 1991, Campbell et al. 1994).

La diferencia en la mortalidad de *Artemia* producida por las cepas Mc17C2 y Mc17C3 (67-100 % vs. 50-67 %, respectivamente) podría atribuirse a una mayor concentración de compuestos nocivos. D'ors et al. (2013) señalan diferencias en la producción de compuestos nocivos entre distintas cepas que tienen efectos diferentes sobre los bioensayos. La mortalidad de *Artemia* estaría asociada al efecto de altas concentraciones de compuestos nocivos que inhiben la producción de enzimas digestivas en crustáceos, indispensables para desintegrar y digerir la biomasa fitoplanctónica de sus presas (Agrawal et al. 2005).

## CONCLUSIONES

El incremento y la disponibilidad de nutrientes disueltos (N y P) en cultivos promueven mayores tasas de crecimiento de poblaciones de *Microcystis*. Por tanto, es posible que la descarga de aguas tratadas, ricas en nutrientes, al ambiente acuático de la Pista Olímpica de Remo y Canotaje Virgilio Uribe continúe teniendo implicaciones ecológicas en el mantenimiento, el crecimiento y la potencial producción de toxinas de *Microcystis* en el ambiente. Aunque el presente estudio permitió estimar que *Microcystis* posee un mecanismo de toxigenicidad potencialmente nocivo para la biota acuática, no se identificaron los metabolitos que pudieron causar mortalidad en juveniles de *Artemia*. En consecuencia, se requiere profundizar en el conocimiento y comprensión del funcionamiento de la ecología química de poblaciones toxígenas de *Microcystis* en éste y otros ambientes acuáticos epicontinentales.



## REFERENCIAS

- Agrawal M.K., Bagchi D. y Bagchi S.N. (2005). Cysteine and serine protease-mediated proteolysis in body homogenate of a zooplankter, *Moina macropa*, is inhibited by the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Comp. Biochem. Physiol.* 141, 33-41. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2005.01.002>
- Alva-Martínez A.F., Sarma S.S.S. y Nandini S. (2004). Population growth of *Daphnia pulex* (Cladocera) on a mixed diet (*Microcystis aeruginosa* with *Chlorella* or *Scenedesmus*). *Crustaceana* 77, 973-988. <https://doi.org/10.1163/1568540042781720>
- Alva-Martínez A.F., Sarma S.S.S. y Nandini S. (2007a). Effect of mixed diets (cyanobacteria and green algae) on the population growth of the cladocerans *Ceriodaphnia dubia* and *Moina macrocopa*. *Aquat. Ecol.* 41, 579-585. <https://doi.org/10.1007/s10452-007-9115-1>
- Alva-Martínez A.F., Sarma S.S.S. y Nandini S. (2007b). Population dynamics of *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus havanaensis* (Rotifera) on mixed diets with *Microcystis aeruginosa* and green algae. *Hidrobiológica* 17, 59-67.
- Alva-Martínez A.F., Fernández, R., Sarma S.S.S. y Nandini S. (2009). Effect of mixed toxic diets (*Microcystis* and *Chlorella*) on the rotifers *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus havanaensis* cultured alone and together. *Limnologia* 39, 302-305. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2009.06.002>
- Andersen R.A., Berges J.A., Harrison P.J. y Watanabe M.M. (2005). Appendix A-recipes for freshwater and seawater media. En: *Algal culturing techniques* (Andersen R.A., Ed.). Elsevier Academic Press, London, Reino Unido, 429-538.
- Andersen R.A. y Kawashi M. (2005). Traditional microalgae isolation techniques. En: *Algal culturing techniques* (Andersen R.A., Ed.). Elsevier Academic Press, London, Reino Unido, 83-100.
- Arcos-Ramos R., Cruz-Martínez P. y Díaz-Hernández I.S. (2012). Estimación de la salinidad del lago de Xochimilco considerando ciertos parámetros químicos (aniones y cationes). En: *Contribuciones al conocimiento de la ecotoxicología y química ambiental en México* (Pica-Granados Y. y Ramírez-Romero P., Eds.). Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, Morelos, México, 410-420
- Arzate-Cárdenas M.A., Olvera-Ramírez R. y Martínez-Jerónimo F. (2010). *Microcystis* toxigenic strains in urban lakes: a case of study in Mexico City. *Eco-toxicology* 19, 1157-1165. <https://doi.org/10.1007/s10646-010-0499-7>
- Baldía S.F., Evangelista A.D., Aralar E.V. y Santiago A.E. (2007). Nitrogen and phosphorus utilization in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* isolated from Laguna de Bay, Philippines. *J. Appl. Phycol.* 19, 607-613. <https://doi.org/10.1007/s10811-007-9209-0>
- Burford M.A., Hamilton D.P. y Wood S.A. (2018). Emerging HAB research issues in freshwater environments. En: *Global ecology and oceanography of harmful algal blooms* (Glibert P.M., Berdalet E., Burford M.A., Pitcher G.C. y Zhou M., Eds.). Springer International Publishing, Cham, Suiza, 381-402. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-70069-4\\_20](https://doi.org/10.1007/978-3-319-70069-4_20)
- Campbell D.L., Lawton, L.A., Beattie K.A. y Codd G.A. (1994). Comparative assessment of the specificity of the brine shrimp and microtox assays to hepatotoxic (*Microcystin*-LR-containing) cyanobacteria. *Environ. Toxic. Water* 9, 71-77. <https://doi.org/10.1002/tox.2530090109>
- Che F., Du M. y Yan C. (2017). Arsenate biotransformation by *Microcystis aeruginosa* under different nitrogen and phosphorus levels. *J. Environ. Sci.* 66, 41-49. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2017.05.041>
- Cordeiro R.S., Vaz I.C.D., Magalhães S.M.S. y Barbosa F.A.R. (2017). Effects of nutritional conditions on lipid production by cyanobacteria. *An. Acad. Bras. Cienc.* 89 (3), 2021-2031. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720150707>
- Dai R., Liu H., Qu J., Zhao X., Ru J. y Hou Y. (2008). Relationship of energy charge and toxin content of *Microcystis aeruginosa* in nitrogen-limited or phosphorus-limited cultures. *Toxicon* 51 (4), 649-658. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.11.021>
- Davis T.W., Berry D.L., Boyer G.L. y Glober C.J. (2009). The effects of temperature and nutrients on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains of *Microcystis* during cyanobacteria blooms. *Harmful Algae* 8, 715-725. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2009.02.004>
- D'ors, A., Bartolomé M.C. y Sánchez-Fortún S. (2013). Toxic risk associated with sporadic occurrences of *Microcystis aeruginosa* blooms from tidal rivers in marine and estuarine ecosystems and its impact on *Artemia franciscana* nauplii populations. *Chemosphere* 90, 2187-2192. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.11.029>
- Douma, M., Manaut, N., Saqrane, S., El Khalloufi, F., Oudra B. y Loudiki M. (2017). Toxicity assessment and detection of cyanobacterial toxins (microcystins) in a Mediterranean natural lake (Dayete Aoua, Morocco). *J. Mater. Environ. Sci.* 8 (9), 3247-3251.
- García-Mendoza E., Quijano-Scheggia S.I., Olivos-Ortiz A., Núñez-Vázquez E.J. y Pérez-Morales A. (2016). Introducción general. En: *Florecimientos algales nocivos en México* (García-Mendoza E., Quijano-Scheggia S.I., Olivos-Ortiz A. y Núñez-Vázquez E.J., Eds.). CICESE, Ensenada, México, 10-19.

- Ghaffar S., Stevenson R.J. y Khan Z. (2017). Effect of phosphorus stress on *Microcystis aeruginosa* growth and phosphorus uptake. *Plos One* 12 (3), 1-17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174349>
- Gobler C.J., Burkholder J.M., Davis T.W., Harke M.J., Johengen T., Stow C.A. y van de Waal D.B. (2016). The dual role of nitrogen supply in controlling the growth and toxicity of cyanobacteria blooms. *Harmful Algae* 54, 87-97. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.01.010>
- Guillard R.R.L. y Sieracki M.S. (2005). Counting cells in cultures with the light microscope. En: *Algal culturing techniques* (Andersen R.A., Ed.). Elsevier Academic Press, Londres, Reino Unido, 239-252.
- Harke M.J., Berry D.L., Ammerman J.W. y Gobler C.J. (2012). Molecular response of the bloom-forming cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*, to phosphorus limitation. *Microb. Ecol.* 63 (1), 188-198. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9894-8>
- Harke M.J., Steffen M.M., Gobler C.J., Otten T.G., Wilhelm S.W., Wood S.A. y Paerl H.W. (2016). A review of the global ecology, genomics, and biogeography of the toxic cyanobacterium *Microcystis* spp. *Harmful Algae* 54, 4-20. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.12.007>
- Holland A. y Kinnear S. (2013). Interpreting the possible ecological role(s) of cyanotoxins: Compounds for competitive advantage and/or physiological aide. *Mar. Drugs* 11, 2239-2258. <https://doi.org/10.3390/md11072239>
- Hu W. (2014). Dry weight and cell density of individual algal and cyanobacterial cells for algae. M.Sc. thesis. Faculty of the Graduate School, University of Missouri-Columbia, Columbia, USA, 68 pp.
- Imai H., Chang K.H. y Nakano S. (2009). Growth responses of harmful algal species *Microcystis* (Cyanophyceae) under various environmental conditions. En: *Interdisciplinary studies on environmental chemistry. Environmental research in Asia* (Obayashi Y., Isobe T., Subramanian A., Suzuki S. y Tanabe S., Eds.) TER-RAPUB, Tokio, 269-275.
- Jeffrey S.W. y Humphrey G.F. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c* and *c2* in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanz.* 167, 191-194. [https://doi.org/10.1016/s0015-3796\(17\)30778-3](https://doi.org/10.1016/s0015-3796(17)30778-3)
- Kyselková I. y Maršálek B. (2000). Use of *Daphnia pulex*, *Artemia salina* and *Tubifex* for cyanobacterial microcystins toxicity detection. *Biologia* 55, 637-643.
- Kiviranta J., Sivonen K. y Niemelä S.I. (1991). Detection of toxicity of cyanobacteria by *Artemia salina* bioassay. *Environ. Toxic. Water* 6, 756-436. <https://doi.org/10.1002/tox.2530060407>
- Merel S., Walker D., Chicana R., Snyder S., Baurès E. y Thomas O. (2013). State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. *Environ. Int.* 59, 303-327. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.06.013>
- Metcalfe J.S., Lindsay J., Beattie K.A., Birmingham S., Saker M.L., Törökné A.K. y Codd G.A. (2002). Toxicity of cylindrospermopsin to the brine shrimp *Artemia salina*: Comparisons with protein synthesis inhibitors and microcystins. *Toxicon* 40, 1115-1120. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00105-8](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00105-8)
- O'Neil J.M., Davis T.W., Burford M.A. y Gobler C.J. (2012). The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae* 14, 313-334. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.10.027>
- Paerl H.W. y Huisman J. (2008). Climate. Blooms like it hot. *Science* 320, 57-58. <https://doi.org/10.1126/science.1155398>
- Paerl H.W. y Huisman J. (2009). Climate change: A catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. *Env. Microbiol. Rep.* 1, 27-37. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2008.00004.x>
- Parrish J. (2014). The role of nitrogen and phosphorus in the growth, toxicity, and distribution of the toxic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*. Master's project and capstones. University of San Francisco, California, USA, 61 pp.
- Pérez-Morales A., Olivos-Ortiz A., Quijano-Scheggia S.I., Espinosa-Rodríguez C.A. y Jiménez-Santos M.A. (2016). Estado actual del estudio de cianobacterias dulceacuícolas formadoras de florecimientos en el centro de México. En: *Florecimientos algales nocivos en México* (García-Mendoza E., Quijano-Scheggia S.I., Olivos-Ortiz A. y Núñez-Vázquez E.J., Eds.). CICESE, Ensenada, México, 408-421.
- Pineda-Mendoza R.M., Martínez-Jerónimo F., Garduño-Solórzano G. y Olvera-Ramírez R. (2011). Caracterización morfológica y molecular de cianobacterias filamentosas aisladas de florecimientos de tres lagos urbanos eutróficos de la Ciudad de México. *Polibotánica* 31 (3), 31-50.
- Puddick J., Prinsep M.R., Wood S.A., Cary S.C. y Hamilton D.P. (2016). Modulation of microcystin congener abundance following nitrogen depletion of a *Microcystis* batch culture. *Aquat. Ecol.* 50, 235-246. <https://doi.org/10.1007/s10452-016-9571-6>
- Sabour B., Loudiki M., Oudra B., Vasconcelos V., Martins R., Oubraim S. y Fawzi B. (2002). Toxicology of a *Microcystis ichthyoblabe* waterbloom from Lake Oued Mellah (Morocco). *Environ. Toxicol.* 17, 24-31. <https://doi.org/10.1002/tox.10028>
- Sorgeloos P., Lavens P., Lè P., Tackaert W. y Versichele D. (1986). Producción de nauplios de *Artemia* y quistes decapsulados para usarlos como alimento en centros

- de puesta de peces y crustáceos. En: Manual para el cultivo y uso de *Artemia* en acuicultura (Sorgeloos P., Lavens P., Lè P., Tackaert W. y Versichele D., Eds.). FAO. Gent, Bélgica, 74-112.
- Tavera R., Novelo E. y Comas A. (2000). Chlorococcalean algae (*s.l.*) from the ecological park of Xochimilco, Mexico. *Algological Studies* 100, 65-94. [https://doi.org/10.1127/algol\\_stud/100/2000/65](https://doi.org/10.1127/algol_stud/100/2000/65)
- Vanhaecke P., Persoone G., Claus C. y Sorgeloos P. (1981). Proposal for a short-term toxicity test with *Artemia* nauplii. *Ecotox. Environ. Safe.* 5, 382-387. [https://doi.org/10.1016/0147-6513\(81\)90012-9](https://doi.org/10.1016/0147-6513(81)90012-9)
- Vasconcelos V., Martins A., Vale M., Antunes A., Azevedo J., Welker M., López O. y Montejano G. (2010). First report and the occurrence of microcystins in planktonic cyanobacteria from Central Mexico. *Toxicon* 56, 425-431. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.04.011>
- Vézic C., Benoufella F., Sivonen K., Bertru G. y Laplanche A. (1996). Detection of toxicity of cyanobacterial strains using *Artemia salina* and Microtox® assays compared with mouse bioassay results. *Phycologia* 35, 198-202. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-35-6s-198.1>
- Vézic C., Rapala J., Vaitomaa J., Seitsonen J. y Sivonen K. (2002). Effect of nitrogen and phosphorus on growth of toxic and nontoxic *Microcystis* strains and on intracellular microcystin concentrations. *Microb. Ecol.* 43 (4), 443-454. <https://doi.org/10.1007/s00248-001-0041-9>
- WHO (2003). Algae and cyanobacteria in fresh water. En: Guidelines for safe recreational water environments. Vol. 1: Coastal and fresh waters. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 136-158.
- Winder M. y Sommer U. (2012). Phytoplankton response to a changing climate. *Hydrobiologia* 698, 5-16. <https://doi.org/10.1007/s10750-012-1149-2>
- Wood A.M., Everroad R.C. y Wingard L.M. (2005). Measuring growth rates in microalgal cultures. En: Algal culturing techniques (Andersen R.A., Ed.). Elsevier Academic Press, Londres, Reino Unido, 269-326.
- Wu J., Liu C., Jia R. y Li B. (2015). The correlation between nitrogen phosphorus nutrients and the growth of *Microcystis aeruginosa*. *Adv. Mater. Res.* 1065-1069, 3110-3113. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/amr.1065-1069.3110>
- Zanchett G. y Oliveira-Filho E.C. (2013). Cyanobacteria and cyanotoxins: From impacts on aquatic ecosystems and human health to anticarcinogenic effects. *Toxins* 5, 1896-1917. <https://doi.org/10.3390/toxins5101896>