



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**DETECCIÓN DE SECUENCIAS QUE CODIFICAN
ENZIMAS PRODUCTORAS DE CIANOTOXINAS, SU
EXPRESIÓN Y RELACIÓN CON LAS
CARACTERÍSTICAS DEL AGUA EN CENOTES DEL
NORESTE DE LA PENÍNSULA DE YUCATÁN**

Tesis que presenta

GERARDO ÁVILA TORRES

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología
Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2023

*CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS*



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Gerardo Ávila Torres** titulado “**Detección de secuencias que codifican enzimas productoras de cianotoxinas, su expresión y relación con las características del agua en cenotes del noreste de la Península de Yucatán**”, fue realizado en la unidad de Bioquímica y Biología Molecular y la Unidad de Ciencias del Agua, en la línea de investigación interacción Planta-Ambiente, en el laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del **Dr. Oscar Alberto Moreno Valenzuela** y la codirección de la **Dra. Cecilia Hernández Zepeda**, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente

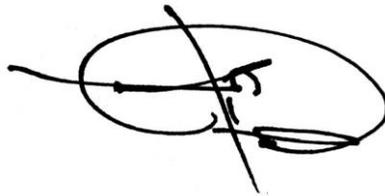


Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 18 de agosto de 2023

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de investigación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



Gerardo Ávila Torres

AGRADECIMIENTOS

Económicos

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de doctorado otorgada, número 705622.

La investigación no recibió subvención de institución o proyecto específicos.

Todos los reactivos fueron provistos por el Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C.

Académicos

La investigación de laboratorio se llevó a cabo en la Unidad de Ciencias del Agua (UCIA) del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección del Dr. Oscar Alberto Moreno Valenzuela director de tesis y la Dra. Cecilia Hernández Zepeda codirectora de tesis.

Al personal técnico de la UCIA, la M. en C. Gabriela Rosiles González, por su apoyo para la colecta de muestras y en el laboratorio para la cuantificación de clorofila y mc, la Quim. Daniela Ortega Camacho por su apoyo para la cuantificación de iones y nutrientes, al M. en C. Victor Hugo Carrillo por su apoyo en laboratorio para la clonación de secuencias del gen *mcyA*, al Dr. Gilberto Acosta González por la elaboración de los diagramas y análisis de Redundancia, así como del Modelo Aditivo Generalizado GAM.

Personales

Dr. Oscar Moreno Valenzuela y Dra. Cecilia Hernández Zepeda directores de tesis por quienes se hizo posible este trabajo y a quienes agradezco su entereza y profesionalismo como investigadores y su conocimiento, orientación y paciencia como Profesores.

Agradezco y menciono a las personas que aportaron trabajo, análisis y acompañamiento en la investigación; Dr. Antonio Almazán Becerril, Dr. Eduardo Cejudo, Dr. Ignacio Rodrigo Islas Flores, Dr. Jorge Adrián Perera Burgos, M. en C. Jorge Carlos Peniche Pérez, M. en C. Carlos Eduardo Muñoz Cortés, M. en C. Ramón Vega Vázquez, Ing. Rodrigo Rosemberg Hernández Ordoñez, Lic. Verónica Elizabeth Ochoa Guerrero, Alejandra Arceo García, Nancy O. Sulub Herrera y Liligelia García Cano, Nidia, Osvaldo, Adriana, Daniel, Carlos, Lucía, Alejandro, Erick Rubiel

DEDICATORIAS

Agradezco a mi compañera de camino y esposa Verónica, por otro logro compartido.

A nuestras amadas luces del camino, Ximena y Amelia.

PRODUCTO GENERADO

Ávila-Torres, G.; Rosiles-González, G.; Carrillo-Jovel, V.H.; Acosta-González, G.; Cejudo-Espinosa, E.; Ortega-Camacho, D.; Hernández-Zepeda, C.; Valenzuela, O.A.M. Microcystin Concentrations and Detection of the mcyA Gene in Water Collected from Agricultural, Urban, and Recreational Areas in a Karst Aquifer in the Yucatan Peninsula of Mexico. *Microbiol. Res.* **2023**, *14*, 1168–1184. <https://doi.org/10.3390/microbiolres14030078> <https://www.mdpi.com/2036-7481/14/3/78>

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	3
ANTECEDENTES	3
LAS CIANOBACTERIAS	3
1.1.1 Estructura celular	3
1.1.2 Clasificación de las cianobacterias	4
1.1.3 Géneros de cianobacterias de ambientes planctónicos de agua dulce	6
1.1.4 Metabolitos secundarios de cianobacterias	7
1.1.5 Rutas metabólicas de la síntesis de Microcistina (MC)	9
1.1.6 Floraciones de cianobacterias en agua dulce	12
1.1.7 Cianobacterias citotóxicas en la República Mexicana	14
1.2 LA PENÍNSULA DE YUCATÁN	16
1.2.1 Cambio de uso de suelo en el NE de la Península de Yucatán	17
1.2.2 Eutrofización del acuífero de la PY	18
JUSTIFICACIÓN	20
HIPÓTESIS	21
OBJETIVOS	21
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	22
CAPÍTULO II	23
RESUMEN	23
2.1 INTRODUCCIÓN	24
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	26
2.2.1 Muestreo y mediciones	27
2.2.2 Análisis de datos ambientales	28
2.2.3 Indicadores de la Calidad del agua	29
2.3 RESULTADOS	29
2.3.1 Parámetros Físicoquímicos	29
2.3.2 Hidroquímica	30
2.3.3 Nutrientes	33
2.3.4 Análisis Estadístico de datos ambientales	33

2.4	DISCUSIÓN	36
2.5	CONCLUSIÓN	39
	CAPÍTULO III	41
	RESUMEN	41
3.1	INTRODUCCIÓN	42
3.2	MATERIALES Y MÉTODOS	45
3.3.1	Área de estudio.....	45
3.3.2	Parámetros Físicoquímicos.....	46
3.3.3	Nutrientes, análisis hidroquímicos y cuantificación de clorofila-a	46
3.3.4	Detección y cuantificación de microcistina	47
3.3.5	Concentración del fitoplancton	47
3.3.6	Extracción del ADN.....	47
3.3.7	Amplificación por PCR y clonación del gen <i>mcyA</i>	48
3.3.8	Análisis de secuencias.....	48
3.3	RESULTADOS	50
3.3.1	Variables físicoquímicas.....	50
3.3.2	Hidroquímica.....	50
3.3.3	Nutrientes	51
3.3.4	Clorofila-a	52
3.3.5	Microcistinas	52
3.3.6	Microcistina y factores ambientales	52
3.3.7	Gen <i>mcyA</i>	55
3.3.8	Análisis filogenético <i>mcyA</i>	56
3.4	DISCUSIÓN	58
3.5	CONCLUSIÓN	62
	CAPÍTULO IV	63
4.1	DISCUSIÓN GENERAL	63
4.2	CONCLUSIÓN	63
4.3	PERSPECTIVAS.....	64

LISTADO DE FIGURAS

FIGURA 1.1 ESTRUCTURA CÉLULAR DE CIANOBACTERIA <i>ANABAENA VARIABILIS</i>	4
FIGURA 1.2 <i>MICROCYSTIS FLOS AQUAE</i> . FOTOGRAFÍA, ARRIBES DEL DUERO, FLICKS. TOMADO DE:.....	7
FIGURA 1.3 ENZIMAS NRPS-PKS Y GENES QUE LAS CODIFICAN. MODELO BASADO EN <i>MICROCYSTIS AERUGIN</i> ..	10
FIGURA 1.4 MODELO BIOSINTÉTICO PARA MC-LR Y ESTRUCTURA DE DOMINIO PREDICHA DE <i>McyE</i> , <i>McyA</i> ,	11
FIGURA 1.5 PAÍSES DONDE SE HA REPORTADO EL FLORECIMIENTO DE CIANOBACTERIAS. (COMPILADO DE	13
FIGURA 1.6 MAPA QUE MUESTRA LOS PAÍSES EN LOS QUE SE HAN REPORTADO FAN, EL GÉNERO <i>MICROCYSTIS</i>	14
FIGURA 1.7 NÚMERO DE INVESTIGACIONES DE CIANOBACTERIAS <i>MICROCYSTIS</i> Y MC EN MÉXICO. (ANALIZADO	15
FIGURA 1.8 SITIOS DE LA REPÚBLICA MEXICANA DONDE SE HAN REPORTADO MC O FLORACIONES CON.....	16
FIGURA 1.9 DIAGRAMA DE LA ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	22
FIGURA 2.1 MAPA DEL NORESTE DE LA PENÍNSULA DE YUCATÁN, DONDE SE SEÑALA EN CÍRCULOS NEGROS.....	27
FIGURA 2.2 PORCENTAJE DE LAS CONCENTRACIONES EN MG/L DE LOS ANIONES OBTENIDOS DEL AGUA DE LOS..	31
FIGURA 2.3 PORCENTAJE DE LAS CONCENTRACIONES EN MG/L DE LOS CATIONES OBTENIDOS DEL AGUA.	31
FIGURA 2.4 DIAGRAMA DE PIPER. MUESTRA EN LOS TRIÁNGULOS INFERIORES LOS VALORES EN MEQ/L, LAS.....	32
FIGURA 2.5 GRÁFICO DE LAS CONCENTRACIONES DE NUTRIENTES EN CADA SITIO MUESTREADO DON.	33
FIGURA 3.1 MAPA DEL NE DE LA PY CON IDENTIFICACIÓN DE LOS SITIOS EN CÍRCULOS NEGROS, TRES EN LA	45
FIGURA 3.2 ANÁLISIS DE REDUNDANCIA (RDA). LOS FACTORES NO PRESENTAN COLINEALIDAD CON LOS SITIOS .	53
FIGURA 3.3 RDA (ANÁLISIS DE REDUNDANCIA). EL FACTOR PH PRESENTA UNA COLINEALIDAD CON LAS.	54
FIGURA 3.4 ANÁLISIS GAM (MODELO ADITIVO GENERALIZADO). EXPRESIÓN GRÁFICA QUE MUESTRA LAS	54
FIGURA 3.5 RECONSTRUCCIÓN FILOGENÉTICA BASADA EN LAS RELACIONES FILOGENÉTICAS INFERIDAS POR LA.	57

LISTADO DE TABLAS

TABLA 1.1 CLASIFICACIÓN DE LAS CIANOBACTERIAS DE ACUERDO CON EL <i>BERGEY'S MANUAL SYSTEMA</i>	5
TABLA 1.2 CANTIDADES DE AGUA (10 ⁶ M ³) CONCESIONADA POR CONAGUA EN LOS ESTADOS DE YUCATÁN Y...	18
TABLA.2.1 VALORES MÁXIMO Y MÍNIMO DE LOS PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS OBTENIDOS <i>IN SITU</i> EN LOS.....	30
TABLA.2.2 PRUEBA DE CORRELACIÓN DE SPEARMAN (P) CON DATOS NO PARAMÉTRICOS OBTENIDOS DE.	34
TABLA.2.3 RESULTADO DE LA PRUEBA DE MAN-WHITNEY Y TUKEY, LOS DATOS DE LAS ÁREAS URBANA,	35
TABLA.2.4 INDICADORES DE LA CALIDAD DEL AGUA. VALORES DEL ÍNDICE DE CALIDAD DEL AGUA, (SÁNCHEZ....	36
TABLA.3.1. SITIOS INVESTIGADOS. NOMBRE Y LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA PARA CADA UNO DE LOS SITIOS POR.	46
TABLA 3.2 CONCENTRACIONES DE NUTRIENTES PARA CADA UNO DE LOS SITIOS POR USO DEL SUELO. (C).....	51
TABLA 3.3 ANÁLISIS DE SECUENCIA DEL GEN MCYA QUE DESCRIBE EL ID DE SECUENCIA Y LOS RESULTADOS	55

LISTADO DE ABREVIATURAS

NID	Nitrógeno inorgánico disuelto
FRS	Fósforo soluble reactivo
IET	Índice del Estado Trófico
ICA	Índice de Calidad del Agua
LmD	Límite mínimo de detección
LMD	Límite máximo de detección
<i>Mcy</i>	Complejos multienzimáticos PKS/NRPS de Microcistina
<i>mcyA</i>	Gen péptido synthetase de la microcistina
N-NO ₃ ⁻	Nitrato
N-NO ₂ ⁻	Nitrito
N-NH ₄ ⁺	Amonio
P-PO ₄ ³⁻	Fosfatos
CO ₂	Dióxido de carbono
O ₂	Oxígeno
N ₂ o N	Nitrógeno
P	Fósforo
H ₂	Hidrógeno
Na ⁺	Sodio
K ⁺	Potasio
Ca ²⁺	Calcio
Mg ²⁺	Magnesio
Cl ⁻	Cloro
SO ₄ ²⁻	Sulfato
T	Temperatura
TSD	Total Sólidos Disueltos
CE	Conductividad Eléctrica
DO	Oxígeno Disuelto
FAN	Floraciones algares nocivas
PY	Península de Yucatán
NE	Noreste
ARN	Ácido ribonucleico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
16S	Componente de la subunidad menor de la unidad 30S del ARN ribosomal
23S	Componente de la subunidad 50S del ARN ribosomal
PCR	Polymerase Chain Reaction
MC	Microcistinas
MC-LR	Variante de Microcistina más tóxica
UV	Ultravioleta
UV-VIS	Ultravioleta a visible
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
PSI	Fotosistema I
PSII	Fotosistema II
CYN	Cianobacteria
SXT	Saxitoxina
ANA	Anatoxina
PP1	Protein phosphatase 1
PP2A	Protein phosphatase 2

NRPS	Non-ribosomal Peptide Synthetase Gene Clusters
PKS	Polyketide synthase
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
SEMARNAT	Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales
SEDUE	Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecología
COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios
CONAGUA	Comisión Nacional del Agua
CICY	Centro de Investigación Científica de Yucatán
UCIA	Unidad de Ciencias del Agua
EPA	Environmental Protection Agency
WHO	World Health Organization
ONU	Organización de las Naciones Unidas
M-W	Prueba de Mann-Whitney
A-D	Prueba de Anderson-Darling
K-W	Prueba de Kruskal-Wallis
ANOVA	Análisis de varianza
RDA	Redundancy análisis
GAM	Generalized Additive Model
mEq/L	Miniequivalentes por litro
HDPE	High Density polyethylene

RESUMEN

La eutroficación del agua permite la proliferación de cianobacterias que producen metabolitos secundarios, como las microcistinas (MC) hepatotóxicas. EL objetivo principal del presente estudio es determinar las concentraciones de MC y detectar el gen *mcyA* en aguas subterráneas de cenotes ubicados en áreas agrícolas, urbanas y recreativas en el acuífero kárstico en la península de Yucatán, México. Se colectaron muestras de agua (100 L) de 14 cenotes y se filtraron a través de una red con tamaño de poro de 22 μm . La calidad del agua se determinó mediante la medición de variables fisicoquímicas e hidroquímicas, además de la clorofila-*a* y nutrientes (nitrógeno y fósforo). Las concentraciones totales de MC se cuantificaron usando una prueba de ELISA basada en anticuerpos. El ADN total se aisló de los filtros y se utilizó para la amplificación por PCR de un fragmento (~300 pares de bases) del gen *mcyA*. Los amplicones se clonaron y secuenciaron para identificar las cianobacterias productoras de toxinas presentes en las aguas subterráneas. Los resultados mostraron diferentes estados tróficos en el agua subterráneas en los cenotes de la muestra de acuerdo con el índice de estado trófico de Carlson. Las concentraciones de nitrógeno inorgánico disuelto (DIN por sus siglas en inglés) se detectaron en un rango de 0.077 a 18.305 mg DIN/L, mientras que las concentraciones de fósforo se detectaron en un rango de 0.025 a 2.5 mg P-PO₄³⁻/L. Todos los sitios muestreados presentaron concentraciones detectables de MC, dentro de un rango de >0.14 $\mu\text{g/L}$ a >5.0 $\mu\text{g/L}$ y en el 21% (3/14) de los sitios estudiados, las concentraciones de MC excedieron el límite establecido en los estándares de calidad del agua para consumo (1 $\mu\text{g/L}$). El fragmento del gen *mcyA* se detectó en el 28 % (4/14) de los sitios, de las 23 secuencias, obtenidas el 87 % (20/23) compartieron >95 % de identidad de nucleótidos con el género *Microcystis* y el 13% (3/23) de las secuencias compartieron >87 % de identidad de nucleótidos con secuencias de cianobacterias no cultivadas. De todas las variables evaluadas, sólo el pH y las concentraciones de MC mostraron una correlación no lineal ($p < 0,05$).

ABSTRACT

The eutrophication of freshwater bodies allows the proliferation of cyanobacteria that can produce secondary metabolites such as hepatotoxic microcystins (MC). The main aim of this study was to determine the microcystin concentrations and to detect the *mcyA* gene in groundwater from sinkholes located in agricultural, urban, and recreational areas in a karst aquifer in the Yucatan peninsula, Mexico. Water samples (100 L) were collected from 14 sinkholes and filtered through a 22 μm pore size. Water quality was determined by measuring physicochemical and hydrochemical variables together with chlorophyll-a, and nutrients (nitrogen and phosphorus). Total, microcystin concentrations were quantified using antibody-based ELISA test. Total DNA was isolated from filters and used for PCR amplification of a fragment (~300 base pair), of the *mcyA* gene. Amplicons were cloned and sequenced to identify toxin producing cyanobacteria present in groundwater. Results showed that groundwater had different trophic status based on Carlson's index. Dissolved inorganic nitrogen (DIN: $\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$) and phosphates (P- PO_4^{3-}) concentrations were within a range of 0.077-18.305 mg DIN /L and from 0.025 -2.5 - mg P- PO_4^{3-} /L, respectively. All sampled sites presented detectable microcystin concentrations, within a range of <0.14 $\mu\text{g/L}$ to >5.0 $\mu\text{g/L}$, and 21% (3/14) of the sites exceeded the microcystin concentration limit established in water quality standards for water consumption (1 $\mu\text{g/L}$). The *mcyA* gene fragment was detected in 28% (4/14) of the sites, from the 23 sequences obtained, 87% (20/23) shared >95% nucleotide identity with the genus *Microcystis* and 13% (3/23) of sequences shared >87% nucleotide identity with uncultured cyanobacteria. From all the variables evaluated, only alkaline pH and microcystin concentrations showed a non-linear correlation ($p < 0.05$).

INTRODUCCIÓN

Las cianobacterias son los organismos fotosintetizadores más antiguos y principales productores primarios (Gaysina, 2019). Son una fuente de metabolitos secundarios, entre los cuales destacan por sus propiedades tóxicas, inhibidoras de enzimas animales las MC (heptapéptidos no ribosómicos), las cilindroespermopsinas (derivado del uracilo con guanidina), así como las anatoxinas y las saxitoxinas (alcaloides), entre otras hepatotóxicas y/o neurotóxicas (Boyer, 2008; Falconer & Humpage 2006; Namikoshi & Rinehart, 1996; Sivonen, 1996; Oswald, 1988).

Desde la primera detección y descripción de las cianobacterias en el año 1878 por George Francis, se han reportado en todo el mundo crecimientos excepcionales de poblaciones de cianobacterias llamadas Floraciones Algares Nocivas (FAN). En algunos lugares se han reportado intoxicaciones o muertes por contacto o consumo accidental de estas sustancias bioactivas, debido a que las personas entran en contacto con las FAN tóxicas mediante actividades recreativas o por consumo del agua contaminada (Mohamed *et al.*, 2022; Berry & Lind, 2010; Vasconcelos *et al.*, 2010; Codd, 1994).

En la península de Yucatán (PY) los cenotes son ambientes de agua dulce donde las especies de cianobacterias proliferan. En la zona se han reportado estudios de cianobacterias describiendo su morfología y/o secuenciando fragmentos de las unidades 16S y 23S del ARN ribosomal, con los que se han descrito géneros y especies de cianobacterias conocidas por contener cepas posibles productoras de microcistinas (MC), pero no se ha analizado la presencia de la toxina asociada a estas cepas (Carrillo, 2019; Ravell *et al.*, 2019, Valadez, 2013). En el 2021 se reportó por primera vez la presencia de MC en cenotes de la PY, con concentraciones menores a 0.18 µg/L (Cagle *et al.*, 2021).

La porosidad y la delgada capa de suelo del acuífero kárstico de la PY crea un ambiente vulnerable a la entrada de contaminantes al agua subterránea, la cual es el único recurso hídrico de la región (Marín & Perry, 1994). Además de los materiales naturales que entran solubilizados por la lluvia, diferentes contaminantes antropogénicos ingresan al acuífero, producto del cambio del uso de suelo con las actividades agropecuarias, la urbanas y la turísticas, preponderantes en la región (INEGI, 2018; Kruk *et al.*, 2015; Gasca *et al.*, 2011; Metcalfe *et al.*, 2011; Herrera & Castillo, 2006). Los contaminantes orgánicos introducidos son transformados por la acción microbiana en especies químicas de nitrógeno N y fósforo P ($N-NO_2^-$, $N-NO_3^-$, $N-NH_4^+$, $P-PO_4^{3-}$)

disponibles para la comunidad acuática, lo cual altera el equilibrio energético y la estructura de las poblaciones (Pacheco *et al.*, 2012; Park y Marshall, 2000; Rojo *et al.*, 2000). Uno de los grupos más sensibles al incremento de nutrientes (eutroficación) son las especies fotosintetizadoras, especialmente las cianobacterias, cuyas poblaciones florecen incrementando por diferentes mecanismos, la liberación de los metabolitos secundarios que afectan significativamente la calidad del agua (Voloshynovych *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019; Chatziefthimiou *et al.*, 2016; Metcalf *et al.*, 2012; Ahn *et al.*, 2011; Rawat *et al.*, 2011; Bogarín y Artavia, 2010; Gilbert, 1996). Diversas organizaciones reguladoras en el mundo, como la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) en México, la World Health Organization (WHO) de la ONU y la Environmental Protection Agency (EPA) en Estados Unidos, han establecido un máximo de concentración de las MC de 1µg/L. Las MC son las toxinas con más presencia y frecuencia en las FAN en aguas ambientales de uso y consumo humano.

La detección de cianobacterias productoras de MC se hace generalmente utilizando características morfológicas o mediante el análisis de secuencias obtenidas a partir de fragmentos de los genes 23S o del 16S del ARN ribosomal. Aunque esta última metodología, a pesar de que es taxonómicamente informativa, no permite distinguir las cepas con la capacidad de producir las toxinas de las que no. Los investigadores han identificado fragmentos conservados del clúster *mcy* que codifican las enzimas productoras de MC, con los cuales se plantea una alternativa molecular para diferenciar la capacidad tóxica de las poblaciones (Sidelev, 2019).

En este trabajo se propone analizar la concentración de la MC y determinar la presencia del gen *mcyA* en poblaciones de cianobacterias de cenotes ubicados en zonas con diferentes tipos de uso de suelo, como urbano, agrícola y recreativo.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

LAS CIANOBACTERIAS

Las cianobacterias son bacterias gram-negativas fotoautotróficas relacionadas con la presencia del oxígeno atmosférico (1,500 mda) (Rasmussen *et al.*, 2008). Son un grupo de eubacterias morfológicamente diversas, ubicuas en ecosistemas acuáticos y terrestres, incluidos los ambientes extremos de todo el mundo, desde los polos hasta las aguas termales (Genuario *et al.*, 2019; Komárek, 2016; Nabout *et al.*, 2013; Leao *et al.*, 2012; Chorus *et al.*, 2000). Su historia evolutiva (3,500 mda), muestra la presencia de adaptaciones a diversos hábitats gracias a factores como la tolerancia a bajos niveles de oxígeno y sulfuro, la plasticidad metabólica para asimilar el CO₂ y el O₂, además del N₂ y H₂ (la mayoría de ellas) y una fuerte tolerancia a la radiación de rayos UV (B y C) (Newton, 2007 Capone *et al.*, 2005; Schopf, 2000; Whitton & Potts, 2000; Wilmotte, 1994). La mayoría de las cianobacterias son de vida libre y en menor proporción se asocian simbióticamente con toda la gama de organismos eucariotas (Casamatta *et al.*, 2012; Adams 2002; Sings & Rinehart, 1996; Ahern y Staff, 1994; Hinde *et al.* 1994; Honegger, 1993). A la fecha, se han descrito 270 géneros que contienen más de 3, 000 especies de cianobacterias (Komárek, 2014; 2005).

1.1.1 Estructura celular

Las cianobacterias son células formadas por una pared celular constituída por ácido murámico y glucopéptidos (Castenholz & Waterbury, 1989), en su interior se encuentran laminillas tilacoides individuales conteniendo pigmentos carotenoides, clorofila *a*, ficobilina y la ficocianina que les confiere un color azul verdoso característico (Lee, 1999; Cheung *et al.*, 2013). Las cianobacterias son procariotas, por lo tanto tienen un solo cromosoma que no está asociado a histonas, poseen ribosomas 70S dispersos en el protoplasma, contienen sustancias de reserva como los gránulos de cianoficina (multi-L-arginil-poli o ácido L-aspartico,), carboxisomas (enzimas fijadoras de CO₂), gránulos de volutina (almacén de polifosfato), gránulos de poliglucano (en células fotosintéticas), vesículas de gas de naturaleza proteica y no presentan reproducción sexual, pero si un tipo de esporas llamados

acinetos (Fogg *et al.*, 1973) (Figura 1.1). La forma y el tamaño son importantes criterios para su identificación, las cianobacterias unicelulares tienen formas esféricas, ovoides y cilíndricas y se reproducen por fisión binaria. Pueden estar aisladas o agregadas en colonias irregulares y su forma es afectada por el medio ambiente (Dorador *et al.*, 2008). La repetida división de las células da lugar a estructuras filamentosas multicelulares llamadas tricomas con formas que pueden ser rectas, espirales, difusas, entre otras (Moreno *et al.*, 2012). Algunas especies que forman tricomas poseen células fijadoras de nitrógeno atmosférico llamadas heterocistos, son de mayor tamaño a las vegetativas y poseen pared gruesa que impide el paso de oxígeno, sin granos de almacenamiento y sin pigmentos (Mur *et al.*, 1999). La organización celular y los sistemas metabólicos son similares a los que poseen las bacterias y su fotosíntesis oxigenada es similar a la que ocurre en células de plantas eucariotas (Whitton & Potts, 2000, 2012).

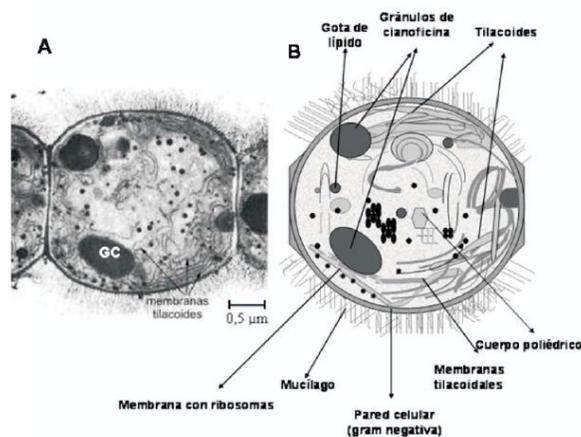


Figura 1.1 Estructura celular de cianobacteria *Anabaena variabilis*. A. Fotografía (Peter Wolk) B Diagrama (Cardemil y Squeo, 2007).

1.1.2 Clasificación de las cianobacterias

Este grupo de organismos se ha clasificado utilizando marcadores cito-morfológicos y ecológicos, como las más simples de las algas unicelulares eucarióticas y fueron reconocidas como un grupo taxonómico separado como el Orden Mixoficeae por Stitzenberger en 1860, fue cambiado a Cianoficeae por Sachs en 1874 por su pigmentación azul. Otros nombres utilizados fueron Cianofita por Smith, 1938 y Cianocloronta por Bold y Wynne en 1978 (Moestrup, 2001; Komarek, 2020). A partir de los esquemas de clasificación

basados en criterios botánicos proporcionados por Geitler (1925), seguido por Frémy (1929) y Geitler (1942), se formó la clasificación inicial de las cianobacterias. Stanier y van Niel (1962) las nombraron cianobacterias apoyados en la estructura celular procariótica y la propuesta de clasificación de Rippka *et al.* (1979), la cual está basada en los criterios botánicos y fue aceptada como base del Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey. Actualmente, el Manual se sigue en la mayoría de las monografías y tratados sobre las cianobacterias (Bagchi y Singh, 2019; Castenholz, *et al.*, 2001) (Tabla 1.1). En los últimos años ya con la utilización de los análisis filogenéticos basados en datos de secuencias moleculares, la clasificación de las cianobacterias ha sido objeto de revisiones basadas en comparaciones de secuencias moleculares, como un complemento a las características morfológicas, los caracteres ecofisiológicos y otros marcadores bioquímicos y moleculares, en un sistema llamado "enfoque polifásico" que hace persistir las controversias entre los enfoques tradicionales y modernos (Komárek *et al.*, 2014; Rott *et al.*, 2018).

Tabla 1.1 Clasificación de las cianobacterias de acuerdo con el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Los nombres en paréntesis se corresponden con los nombres de los taxa según el sistema botánico (Basado en "Phylum BX. Cyanobacteria Oxygenic Photosynthetic Bacteria", Castelholtz 2001).

CLASE	Subsección	Parte	Géneros
CIANOBACTERIA	I (Chroococcales)	I	<i>Chamaesiphon, Chroococcus, Cyanobacterium, Cyanobium, Cyanothece, Dactylocopsis, Gloeobacter, Gloeocapsa, Gloeotheca, Microcystis, Prochlorococcus, Prochloron, Synechococcus, Synechocystis</i>
	II (Pleurocapsales)	I	<i>Cyanocystis, Dermocarpella, Stanieria, Xenococcus</i>
		II	<i>Chroococcidiopsis, Myxosarcina, Pleurocapsa</i>
	III (Oscillatoriales)	I	<i>Arthrospira, Borzia, Crinalium, Geitlerinema, Halospirulina, Leptolyngbya, Limnothrix, Lyngbya, Microcoleus, Oscillatoria, Planktothrix, Prochlorothrix, Pseudanabaena, Spirulina, Starria, Symploca, Trichodesmium, Tychonema</i>
	IV (Nostocales)	I	<i>Anabaena, Anabaenopsis, Aphanizomenon, Cyanospira, Cyndrospermopsis, Cyndrospermum, Nodularia, Nostoc, Scytonema</i>
II		<i>Calothrix, Rivularia, Gloeotrichia, Tolypothrix, Microchaete</i>	
V (Stigonematales)	I	<i>Chlorogloeopsis, Fischerella, Geitleria, Iyengariella, Nostochopsis, Mastigocladopsis, Westiella, Stigonema, Doliocatella</i>	

Las cianobacterias son procariotas que siguen las reglas y condiciones específicas de las bacterias (gram negativas) como son: la ausencia de reproducción sexual y la transferencia horizontal de genes, así como la recombinación homóloga (Dvořák *et al.*, 2015). Las características principales que definen a todos estos procariotas fotosintéticos oxigénicos es que sólo contienen clorofila *a*, presentan dos fotosistemas (PSII y PSI) y utilizan el H₂O como fotorreductor en la fotosíntesis y todos los miembros conocidos son capaces de fotoautotrofia (utilizando CO₂ como fuente primaria de carbono celular) (Rott *et al.*, 2018; Castenholz *et al.*, 2001; Moestrup, 2001).

1.1.3 Géneros de cianobacterias de ambientes planctónicos de agua dulce

Las cianobacterias son organismos importantes en la producción primaria en ambientes acuáticos. En agua dulce la diversificación de especies es amplia debido a las variaciones en las condiciones ambientales (Middelburg, 2019). En sedimentos y aguas del Lago Changai en Yunnan Plateau, suroeste de China, de acuerdo con las secuencias obtenidas de los fragmentos de ADNr 23S, la comunidad de fitoplancton en muestras de agua está compuesta por los géneros *Microcystis*, *Aphanizomenon*, *Synechococcus*, *Anabaena*, *Scenedesmus*, *Planctonemas* y *Planktothrix* (Yan *et al.*, 2019). En la región desértica fría de Himachal Pradesh, India, se utilizaron las secuencias del gen 16S ARNr a partir de las cuales se identificaron los géneros *Nostoc*, *Nodularia*, *Geitlerinema*, *Limnothrix* y *Planktothrix* en la comunidad de cianobacterias. En los lagos Chandra Tal, Suraj Tal y Deepak Tal las comunidades de cianobacterias están conformadas por los géneros *Gloeocapsopsis*, *Leptolyngby*, *Pseudanabaena* y *Nostoc* (Singh *et al.*, 2014). Otros géneros reportados como comunes en agua dulce son: *Chroococcus*, *Cyanodictyon*, *Merismopedia*, *Coelosphaerium*, *Coelomoron*, *Snowella*, y *Gomphosphaeria* (Komárek, 2003; Komárek and Anagnostidis, 1999). En la PY se utilizaron secuencias de la región V4 del gen 16S ARNr, para determinar la composición de la comunidad de cianobacterias en cenotes del acuífero, donde se reportaron las especies de los géneros *Cyanobium*, *Roseofilum*, *Prochlorothrix*, *Ewamiania*, *Arthrospira*, *Dapisostemonum*, *Nostoc*, *Geitlerinema*, *Cylindroespermum*, *Phormidium*, *Microcystis* y *Leptolyngbya* (Figura 1.2) (Carrillo, 2021; Cagle *et al.*, 2021).

Entre los géneros de cianobacterias conocidos al momento que son productores de MC se encuentran: *Radiocystis*, *Arthrospira*, *Calothrix*, *Fischerella*, *Annamia*, *Pseudoanabaena*,

Phormidium, *Aphanocapsa*, *Hapalosiphon*, *Nodularia Anabaenopsis*, *Microcystis*, *Dolichospermum*, *Planktothrix*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Aphazinomenon*, *Anabaena* y *Anabaenopsis* (Puddick *et al.*, 2019; Guo *et al.*, 2017).

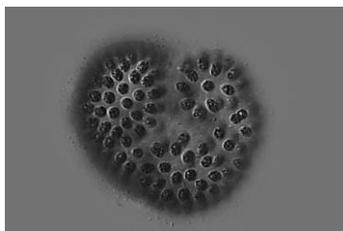


Figura 1.2 *Microcystis flos aquae*. Fotografía, Arribes del Duero, Flickr. Tomado de: <https://www.flickr.com/photos/microagua/37500210430>

1.1.4 Metabolitos secundarios de cianobacterias

Durante muchos años las cianobacterias se consideraron únicamente como productores primarios (Knoll, 2008). En su metabolismo primario se derivan metabolitos secundarios que están sujetos al control fisiológico y responden a los factores ambientales. Los metabolitos secundarios producidos por las cianobacterias causan mal olor en el agua y consumidos pueden acumularse en animales acuáticos comestibles, afectando su producción y venta (Kurmayer y Christiansen, 2009; Smith *et al.*, 2008; Carmichael, 1992; Vining, 1992; 1990). Las sustancias que causan el mal olor asociado son la geosmina (10-dimethyl-E-9-decalol) y la MIB (2-methylisoborneol) o compuestos con menor actividad y menos frecuentes como los terpenoides (β -cyclocitral) (Zimba and Grimm, 2003). Se incluyen como metabolitos secundarios algunos compuestos farmacéuticos, bioplaguicidas y factores de crecimiento compuestos bioactivos, biocombustibles, biopolímeros, colorantes, medicamentos, suplementos alimenticios y biofertilizantes (Al-Haj *et al.*, 2016; Abed *et al.*, 2009; Welker & Von Döhren, 2006; Namikoshi y Rinehart, 1996). La mayoría de los metabolitos secundarios pertenece a los alcaloides, terpenoides, moléculas derivadas de la ruta del shikimato, aminoglucósidos y un grupo de compuestos peptídicos, los cuales pueden ser policétidos o péptidos no ribosómicos. Algunos de los compuestos son bioactivos tóxicos (Voloshynovych *et al.*, 2019; Arnison *et al.*, 2013; Welker y von Döhren, 2006; Sivonen, 1996).

Cuatro grupos de metabolitos secundarios producidos por las cianobacterias son reconocidos como tóxicos, las MC, heptapéptidos con un efecto inhibitor sobre las fosfatasas PP1 y PP2A (Raven, 2010), la cilindroespermopsina (CYN), un derivado de uracil guanidina de actividad citotóxica que incrementa el estrés oxidativo, la saxitoxina (SXT) la cual funciona como un potente neurotóxico bloqueando los canales de sodio, y la anatoxina (ANA) que actúa bloqueando los receptores de acetilcolina provocando parálisis, también es un potente neurotóxico (Rutkowska *et al.*, 2019; O'Neill, *et al.*, 2016). La vía de exposición a los cuatro metabolitos bioactivos puede ser por contacto o ingesta directa o indirecta de alimentos o aerosoles, dando como resultado, el que su ingreso sea a nivel intestinal y en dosis altas (por arriba de 20 µg/kg para MC pueden ser fatales (Chorus y Welker, 2021; Koreiviené *et al.*, 2014; Falconer, 2005; Sivonen y Jones, 1999).

Aún faltan explicaciones de porqué algunas especies de cianobacterias producen una amplia variedad de toxinas o porqué, sin presentar ventajas aparentes, existen especies con cepas productoras de toxinas y otras que no las producen. Muchas especies de cianobacterias, como las productoras de MC, la retienen intracelularmente, por el contrario, las productoras de cilindroespermopsina (Cyn) liberan grandes proporciones de toxina al ambiente. Tampoco existe consenso sobre las funciones para cada una de las toxinas y se continúan investigando los efectos de los diferentes factores abióticos en especies productoras de toxinas (Omid *et al.*, 2018; Oullette & Wilhelm, 2003; Codd, 1995).

Los factores abióticos pueden causar diferentes efectos en la producción de toxinas (Xue *et al.*, 2018). La limitación o disposición de nitrógeno atmosférico eleva los niveles de cianotoxinas con especies fijadoras de N₂ y las no fijadoras alcanzan picos de crecimiento poblacional cuando hay altas concentraciones de nitrógeno (Griffiths & Saker, 2003, Kaebernick & Neilan, 2001; Sivonen y Jones, 1999). La concentración de fósforo en el ambiente acuático influye en la producción de la toxina Cyn (Cirés *et al.*, 2011; Dyble *et al.*, 2010; Berry *et al.*, 2010; Bácsi *et al.*, 2006).

Se ha observado que el aumento en la población de cianobacterias está asociado con la disminución de Cyn en diferentes intensidades de luz (Griffiths & Saker, 2003). Las variaciones en el cambio de intensidad y longitud de onda tienen un efecto en la transcripción de los genes *mcy* (Kaebernick *et al.*, 2000). De igual forma, se ha observado que la temperatura regula la producción de las toxinas Cyn, ANA y MC, a menor

temperatura, mayor producción de toxinas, lo cual tiene una correlación negativa con el crecimiento celular (Griffiths & Saker, 2003; Kaebernick y Neilan, 2001; Rapala y Sivonen, 1998). Se reporta un crecimiento máximo de *Microcystis aeruginosa* y una producción de cianotoxina mayor, a pH 9. Por arriba y por debajo de este valor el crecimiento de la población fue más lento (Jaiswal *et al.*, 2008; Radhakrishnan, 2006; Van der Westhuizen y Eloff, 1983). Se ha comprobado que las cepas productoras de la toxina MC son más eficientes en la absorción de Fe que las que no lo producen (Lyck *et al.*, 1996; Utkilen & Gjolme, 1995).

1.1.5 Rutas metabólicas de la síntesis de Microcistina (MC)

Al igual que otros grupos taxonómicos, las cianobacterias utilizan enzimas péptido-sintetasas no ribosomales (NRPS) y policétido sintetasas (PKS) para la síntesis de un enorme número de metabolitos secundarios con diversas estructuras y funciones (Pancrace, 2017; Sivonen, 2009). Los péptidos no ribosómicos se biosintetizan por condensación secuencial de monómeros de aminoácidos, mientras que los policétidos se obtienen mediante la adición repetitiva de dos unidades de cétidos de carbono derivadas de tioésteres de acetato u otros ácidos carboxílicos cortos. Las enzimas NRPS y las PKS son enzimas multi-modulares, que muestran similitud en la estructura modular de sus multidominios catalíticos (Tillet *et al.*, 2000).

Las enzimas que participan en un módulo NRPS básico tienen los siguientes dominios: Dominio de activación (A): Adenilación, Dominio de tiolación o "Peptidyl Carrier Protein" (PCP). Dominio de Condensación (C): y el Dominio tioesterasa (Te) (Mootz *et al.*, 2002). Las enzimas del módulo PKS básico se conforma de: Dominio Aciltransferasa (AT), Proteína transportadora de Acilos (ACP), Dominios "tailoring", Cetosintetasa (KS), (Staunton y Weissman, 2001).

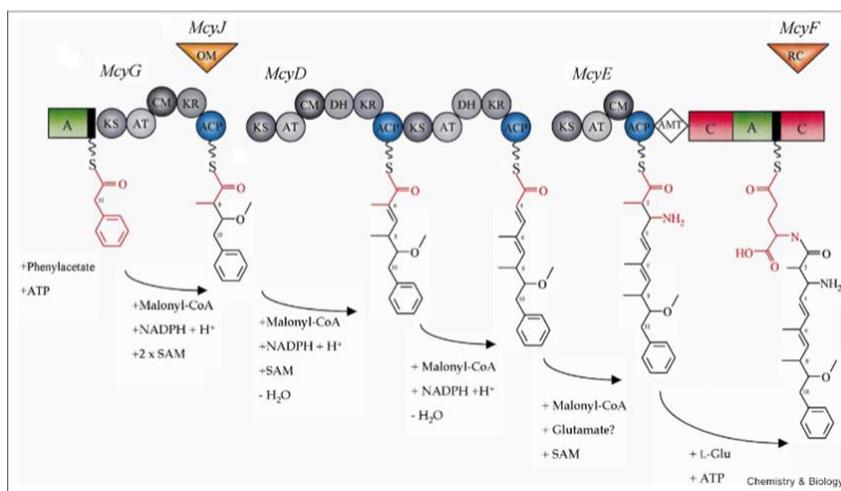


Figura 1.3 Enzimas NRPS-PKS y genes que las codifican. Modelo basado en *Microcystis aeruginosa* PCC780 para la producción de Adda (Siglas en inglés, a.a. no ribosómico, Amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-dienoic acid) y la estructura de dominio predicha de *mcyG*, *mcyD* y *mcyE*. Cada círculo y rectángulo representa respectivamente un dominio enzimático PKS o NRPS. El supuesto dominio aminotransferasa está representado por un diamante. La actividad de los ORF de adaptación, *McyJ* y *F*, se muestran como triángulos invertidos. KS, L-cetoacil sintasa; AT, aciltransferasa; ACP, proteína portadora de acilo; KR, cetoacil reductasa; DH, deshidratasa; MC, C-metiltransferasa; OM, O-metiltransferasa; A, aminoacil adenilación; C, condensación; AMT, aminotransferasa; RC, racemase. El motivo de tiolación NRPS se muestra en negro. El orden de reacción muestra la transferencia y condensación de Adda a D-glutamato (Tomado de Tillet *et al.*, 2000).

Las vías más frecuentes de síntesis híbridas NRPS-PKS son la combinación de enzimas de estas dos rutas que sintetizarán compuestos con propiedades peptídicas y cetídicas (Du *et al.*, 2003). Los metabolitos secundarios como las MC, anatoxinas, saxitoxinas y cilindroespermopsinas son producidos a través de la actividad enzimática de proteínas sintetizadas a partir de agrupaciones (clúster) de genes biosintéticos (*Mcy* para MC, *Ana* Anatoxina, *Sxt* Saxitoxina y *Cyr* cilindroespermopsina) (Huang y Zimba, 2019) (Figura 1.3).

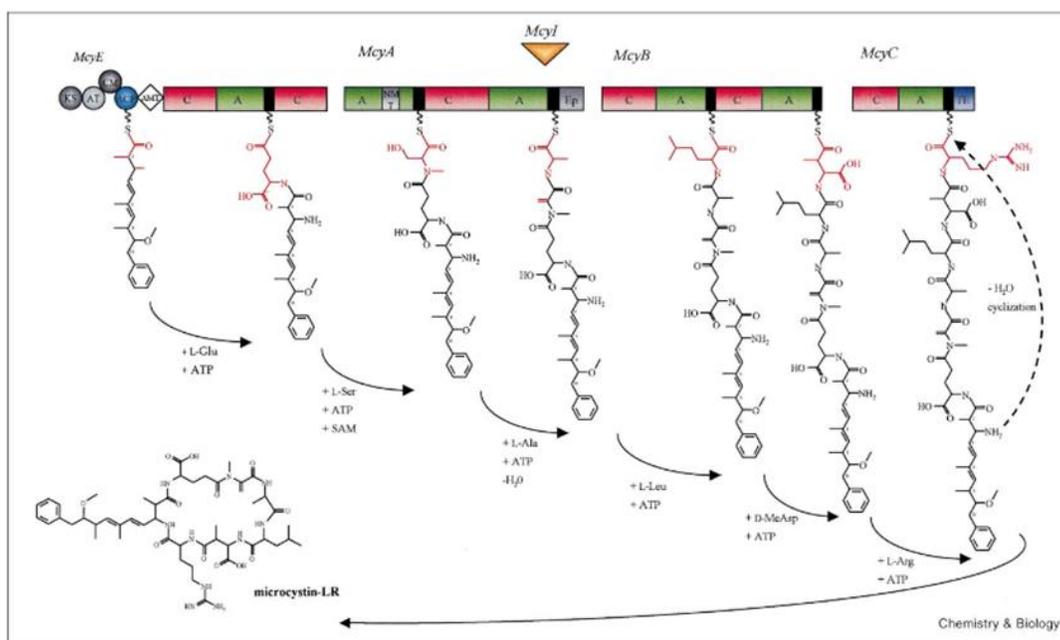


Figura 1.4 Modelo biosintético para MC-LR y estructura de dominio predicha de *McyE*, *McyA*, *McyB* y *McyC*. Cada círculo y rectángulo representa, respectivamente, un dominio enzimático PKS o NRPS. El dominio de las aminotransferasas está representado por un diamante. La actividad del ORF de adaptación putativo, *McyI*, se muestra como un triángulo invertido. KS, β -cetoacil sintasa; AT, aciltransferasa; CM, C-metiltransferasa; ACP, proteína portadora de acilo; A, adenilación de aminoácido; C, condensación; NMT, N-metiltransferasa; Ep, epimerización; TE, tioesterasa; AMT, aminotransferasa. El motivo de tiolación NRPS se muestra en negro. Se predice el orden de activación y condensación de los aminoácidos: L-Z-Adda, L-glutamato, L-metilserina, D-alanina, L-leucina, D metil-aspartato, L arginina, ciclación (Tomado de Tillett *et al.*, 2000).

Las MC son de naturaleza peptídica no ribosómica, hidrosolubles, son heptapéptidos cíclicos que contienen aminoácidos (a.a.) dextrógiros (D) y levógiros (L). Se caracterizan por sus dos aminoácidos D, llamados N-Metil-dihidroalanina (Mdha) y el ácido 3-amino-9-metoxi-2, 6, 8-trimetil-10 fenildeca-4,6 dienoico (Adda). Son de carácter hidrofóbico, lo que les confiere en gran medida su característica tóxica (Tillett *et al.*, 2000). Los aminoácidos L de las posiciones 2 y 4 son variables y son los que diferencian a las MC (Holland & Kinnear, 2013; Moreno *et al.*, 2012) (Figura 1.4). La MC inhibe la función de las fosfatasa PP1, 2A, 2B, 3, 4 y 5 por medio de la porción de deshidro-alanina de la unidad Adda provocando la deformación de la estructura celular, formación de tumores, peroxidación de lípidos, daño en el ADN y la actividad enzimática antioxidante, aumentando el estrés oxidativo y la producción de especies reactivas de oxígeno. Altas dosis de MC causan hemorragia en el

hígado debido al daño de los capilares sinusoidales, a dosis bajas (por debajo de 20 µg/kg de peso corporal) y con exposiciones prolongadas repetidas, la inhibición de la fosfatasa induce la proliferación celular, la hipertrofia hepática y la actividad promotora de tumores (Chorus y Welker, 2021; Raven, 2010; Komatsu *et al.*, 2007; Kehr *et al.*, 2006; Žegura *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2005; Pinho *et al.*, 2005; Beattie *et al.*, 2003; Ding *et al.*, 2001; Bartram y Chorus, 1999; Carbis *et al.*, 1996; Nishiwaki-Matsushima *et al.*, 1991).

1.1.6 Floraciones de cianobacterias en agua dulce

Las Floraciones Algares Nocivas (FAN) son los fenómenos que se presentan cuando la densidad de algunas cianobacterias excede las concentraciones de la población basal (Huang y Zimba, 2019; Cheung *et al.*, 2013; Davis *et al.*, 2009). A partir del reporte en Milang (Australia), en el que se atribuyeron muertes humanas a la ingestión de “la espuma en el agua” la cual contenía toxinas de la cianobacteria *Nodularia spumigena* a orillas del lago Alexandrina (Francis, 1878), se continúan registrando eventos tóxicos fatales por contacto, inhalación o ingestión de cianotoxinas producidos por otra cianobacteria *Microcystis aeruginosa*, en Australia (Falconer *et al.*, 1983), en Salisbury (Zimbabue), África, (Zilberg, 1966; Taylor, 1958), en el Reino Unido (Turner *et al.*, 1990), en Brasil (Pouria *et al.*, 1998), en Serbia (Drobac *et al.*, 2016) y en Uruguay (Vidal *et al.*, 2017), entre otros. Todos estos eventos han estado relacionados con el detrimento de la calidad del agua y/o la eutrofización de las fuentes (Chatziefthimiou *et al.*, 2016).

Diversos factores como el cambio climático y el cambio de uso del suelo, así como las actividades antropogénicas pueden influir en la proliferación de cianobacterias formadoras de FAN en los cuerpos de agua. Recientes eventos a nivel mundial establecen que la presencia de FAN sea reconocida como un problema mundial y de salud pública, por lo que la EPA incluyó a las cianotoxinas en la lista de candidatos contaminantes del agua (Griffit y Gobler, 2020; Ho *et al.*, 2019; Pham y Utsumi, 2018; EPA, 2014; Sinha *et al.*, 2012; Codd *et al.*, 2005). Los eventos producidos por la presencia de cianotoxinas han alertado a las poblaciones a tomar medidas para la detección temprana de floraciones y evitar así las emergencias tóxicas (De Morais *et al.*, 2019; Drobac, *et al.* 2016; Codd *et al.*, 1994).

Los estudios han sido dirigidos a la localización y evaluación de *Microcystis*, las MC y los factores ambientales, metabólicos y moleculares que intervienen en su proliferación en los

diferentes cuerpos de agua. Por ejemplo, con un enfoque polifásico se identificaron poblaciones productoras de MC en el cauce del Río Uruguay y el estuario del Río de la Plata (Kruk *et al.*, 2015). En Tanzania, se vincularon las variaciones de los procesos climáticos e hidrológicos, al cambio en el uso de la tierra y el crecimiento económico con la aparición y distribución de FAN (Kimambo *et al.*, 2019). En lagos de Florida se demostró cómo la eutrofización y la falta de zooplancton crearon un ambiente potencial para las FAN propiciadas por el cambio climático (Havens *et al.*, 2019). Las floraciones de cianobacterias son cada vez más frecuentes a nivel global y tendrán cada vez mayor incidencia y frecuencia en el actual contexto de calentamiento global (Cantoral *et al.*, 2017) (Figura 1.5).

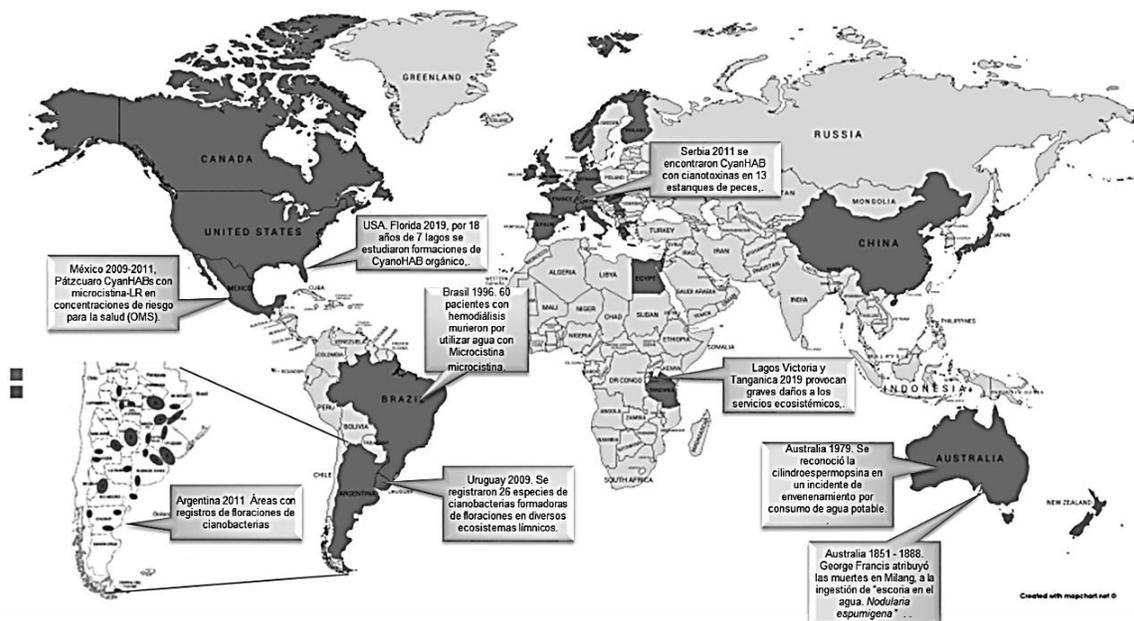


Figura 1.5 Países donde se ha reportado el florecimiento de cianobacterias. (Compilado de Aguilera y Hansen 2011; Aboal y Puig, 2005; Griffith *et al.*, 2003; Sivonen y Jones, 1999; Ohtani *et al.*, 1992; Bourke *et al.*, 1983).

A nivel mundial, el género *Microcystis* es el principal productor de FAN. Los resultados de un análisis bibliográfico encontraron que expansión geográfica de *Microcystis*, con floraciones registradas en al menos 108 países, 79 de los cuales también informan sobre la hepatotoxina MC. En el análisis se encontraron las secuencias genéticas de 27 especies de *Microcystis*, incluidos 15 genomas completos; el análisis de las secuencias indica que

todas las especies de *Microcystis* tienen valores de identidad de nucleótidos promedio superiores al 95 % (Harke *et al.*, 2016) (Figura 1.6).

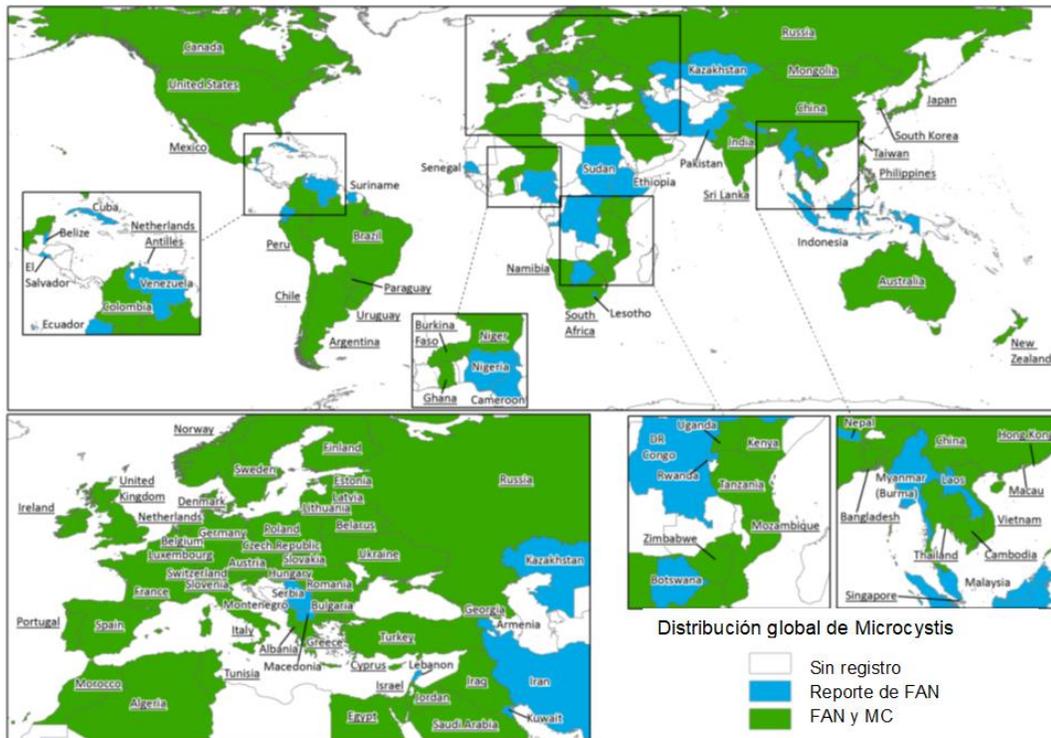


Figura 1.6 Mapa que muestra los países en los que se han reportado FAN, el género *Microcystis* y la presencia de MC. El mapa fue generado con base en la revisión de la literatura disponible que corresponde a 257 países y territorios. El color blanco indica que en esa región no hay registro de floración o MC, el azul indica que se encontró al menos un registro de la aparición de una floración y el verde indica países o territorios donde hubo al menos un registro tanto de floración como de la MC (Tomado de Harke *et al.*, 2016).

1.1.7 Cianobacterias citotóxicas en la República Mexicana

Los estudios de la presencia de MC en el ambiente acuático se han incrementado en los últimos años, como ejemplo, en 2015 se reportaron 192 publicaciones y en 2019 se reportaron 275. En los últimos dos años de la pandemia COVID-19 causada por el virus SARS-Cov-2, de acuerdo con el buscador Pub Med, se publicaron 258 estudios en el 2020, y 245 reportes en el 2021. En México se han publicado entre uno a tres artículos en un año sobre *Microcystis* en el período de 1975 al 2021 de acuerdo con la página web Pub Med Pub ReMiner (Figura 1.7).

En lagos de uso recreativo y deportivo de la Ciudad de México donde existen descargas de agua tratada, se han observado floraciones de cianobacterias y la presencia de secuencias del género *Microcystis*. En dicho estudio, el potencial toxigénico de la cepa se infirió debido a que el gen *mcyA*-Cd estaba presente, así como MC presentes en el extracto de biomasa del filtrado de las muestras (Arzate-Cárdenas *et al.*, 2010).

En los lagos naturales (Zumpango, Laguna Atotonilco y Ciénega Chica), embalses (Los Ángeles y Valle de Bravo), canales artificiales (Cuemanco, Tlameleca) y lagos urbanos (Chapultepec), se reportó la presencia de cianobacterias productoras de cianotoxinas y se comprobó la presencia MC-LR, el metabolito más abundante y tóxico de las MC, en concentraciones de entre 4,9 y 78,0 µg/L, (Vasconcelos *et al.*, 2010) (Figura 1.8).

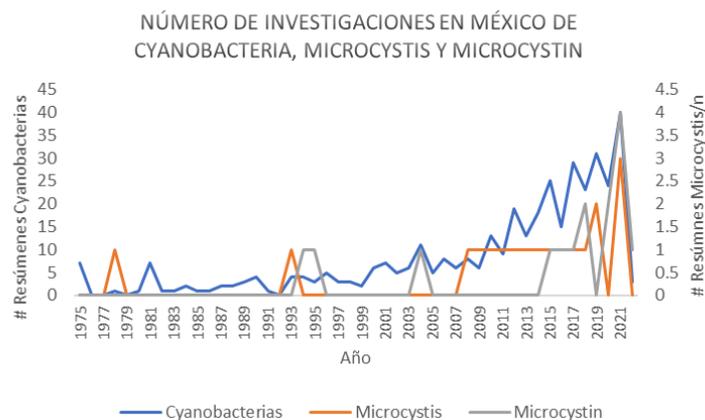


Figura 1.7 Número de investigaciones de Cyanobacterias *Microcystis* y MC en México. (Analizado en Pub Med Pub Re Miner, <https://hgserver2.amc.nl/cgi-bin/miner/miner2.cgi>).

En Catemaco, Veracruz se reportó la presencia de las especies *Cylindrospermopsis catemaco* y *Cylindrospermopsis philippinensis*, especies que producen las “toxinas paralíticas de mariscos” (PST), específicamente la cilindrospermopsina. En el trabajo se corroboró la bioacumulación de esta toxina en el caracol *Pomacea patula catemacensis*, llamado “Tegogolo” un marisco que ocupa el cuarto lugar de importancia en la producción pesquera en Catemaco Veracruz (Capitán *et al.*, 2020; Berry y Lind, 2010) (Figura 1.8)

En el lago de Pátzcuaro, entre el 2009 y el 2011 se detectaron FAN con altas concentraciones de MC-LR, de 20 a más de 2,000 µg/L, lo que representa un riesgo a la

ríos subterráneos y en el camino de la corriente del agua subterránea al disolverse las rocas más superficiales eventualmente provoca derrumbamientos del suelo, creando formaciones geológicas (dolinas o sumideros) llamadas “cenotes”, donde el acuífero asoma a la superficie (INEGI, 2017; González-Herrera *et al.*, 2002; Schmitter-Soto *et al.*, 2002a; Schmitter-Soto, 2002b).

1.2.1 Cambio de uso de suelo en el NE de la Península de Yucatán

Se ha reportado la entrada de contaminantes en el acuífero cárstico de la PY, lo que representa una gran preocupación por ser la única fuente de agua de la región (Aguilar-Duarte *et al.*, 2016). La causa principal de la contaminación está asociada con el cambio del uso de suelo y las actividades antropogénicas. En las zonas de estudio de este trabajo, a mediados del siglo pasado la cobertura vegetal se conformaba de selva baja subcaducifolia y manglar en los actuales Municipios de Puerto Morelos, Benito Juárez y sur de Lázaro Cárdenas (Quintana Roo) y de selva mediana subcaducifolia en los Municipios de Dzilam González, Tizimín, Panabá y Sucila (Yucatán; INEGI 2016 b). Hasta el 2016, los Municipios que se encuentran en la costa de Quintana Roo han cambiado el uso de suelo por urbanización, grandes áreas con construcción de hoteles, parques recreativos y en la zona continental, áreas con cenotes, manteniendo todavía una cobertura importante con selva baja subcaducifolia (INEGI, 2016 b).

Por otro lado, la zona de estudio de Yucatán ha cambiado el uso de suelo para el aprovechamiento de la vegetación de pastizal del tipo estacional para explotación de ganado (SEMARNAT, 2012; INEGI, 2016b). Existen en la Península aproximadamente 8,000 cenotes y muchos de ellos han quedado dentro de las zonas mencionadas (Bauer-Gotwein *et al.*, 2011; Kauffer y Villanueva, 2011). Así, la distribución de las áreas con cambio de uso de suelo se da en las tres actividades económicas principales: agrícola (principalmente en municipios de Yucatán), el urbano, (principalmente la ciudad de Cancún y Puerto Morelos) y el turístico (la costa del Caribe y “la ruta de los cenotes” de Puerto Morelos y los “cenotes” aledaños a Nueva Valladolid en Quintana Roo). El uso del agua concesionado en los Estados nos da idea del consumo por cada una de las actividades. En la Tabla 1.2 se aprecian los mayores volúmenes para el sector agrícola en Yucatán y para el sector de la industria turística en Quintana Roo (CONAGUA, 2017).

Tabla 1.2 Cantidades de agua (10^6 m^3) concesionada por CONAGUA en los Estados de Yucatán y Quintana Roo por actividad (CONAGUA 2019).

Entidad federativa	Volumen concesionado	Agrícola	Abastecimiento Público	Industria auto abastecida (Q. Roo Turística)	Energía eléctrica	Población 2018
Yucatán	2,179.4	1853.3	258.3	59	9.1	2.2 mill
Quintana Roo	1,180.9	343.3	212.8	624.5	0	1.7 mill

1.2.2 Eutrofización del acuífero de la PY

La vulnerabilidad del acuífero, las prácticas del uso del agua con el cambio en el uso de suelo y el aumento de la temperatura por el cambio climático dan lugar al deterioro en la calidad del agua en los cenotes en las zonas urbana, agrícola y recreativa (Kruk *et al.*, 2015). El ingreso diferencial en el volumen de aguas residuales al acuífero se debe principalmente a factores antropogénicos como la disposición y manejo de aguas residuales, las entregas clandestinas de aguas negras, las fugas de las fosas sépticas, la filtración por el acarreo del fecalismo al aire libre y los lixiviados por derrame o riego (Herrera y Castillo., 2006; González-Herrera *et al.*, 2002).

Entre las zonas con diferente uso del suelo, los contaminantes orgánicos vertidos al acuífero son diferentes. En la zona urbana predominan los productos de uso doméstico como son fármacos, cosméticos, hormonas, entre otros (Metcalf *et al.*, 2011). En la zona agrícola predominan los plaguicidas, y los fertilizantes (Hoz-Zavala *et al.*, 2018; Álvarez-Góngora *et al.*, 2012; Gasca *et al.*, 2011). En las zonas recreativas, ubicadas generalmente en áreas naturales relativamente conservadas, la entrada de contaminantes es originado por los bañistas quienes liberan heces durante la recreación y por la filtración o acarreo del fecalismo al aire libre de origen humano y de animales silvestres o domésticos (Pacheco *et al.*, 2000; Rosiles *et al.*, 2019). El principal efecto de los contaminantes es el ingreso de nutrientes al acuífero.

La eutrofización o incremento en la tasa de suministro de nutrientes para la generación de biomasa, causa la acumulación de las especies inorgánicas de nitrógeno y fósforo, provocando un desequilibrio en el flujo de energía de los sistemas acuáticos (Rabalais *et al.*, 2009). El efecto de la eutrofización altera el ciclo de nutrientes, modifica la composición de la comunidad, especialmente la autotrófica, eliminando o magnificando poblaciones en

los ecosistemas acuáticos muy vulnerables, provocando la pérdida de diversidad, por ejemplo, los cuerpos de agua superficiales marinos, dulces y salobres en los que se presentan crecimientos desmedidos de cianobacterias causantes de las FAN (Haynes *et al.*, 2007; Teichberg *et al.*, 2010).

En investigaciones previas en el acuífero y en lagunas de la PY, se ha llevado a cabo la caracterización de 220 especies de cianobacterias, la mayoría de ellas con base en su morfología, usando técnicas microscópicas. Tan sólo en Quintana Roo se han identificado 73 especies de cianobacterias, algunas pertenecientes a los géneros productores de cianotoxinas como *Microcystis*, *Cylindrospermopsis* o *Chroococcus* (Ravell *et al.*, 2019). En el trabajo interdisciplinario entre la UCIA (CICY) y Department of Marine Biology, (Texas A & M University) se investigó la abundancia de cianobacterias, la presencia de cianotoxinas y las concentraciones de nitrato en los cenotes, como sistemas kársticos lénticos en Yucatán y se confirmó la presencia de especies productoras de cianotoxinas en ambientes con condiciones de alta producción con potencial de riegos para la salud por presencia de toxinas en el futuro (Cagle *et al.*, 2021).

La identificación de cianobacterias toxigénicas utilizando la morfología tradicional, es en ocasiones imposible debido que las cepas toxigénicas y no toxigénicas son morfológicamente idénticas (Kolman *et al.*, 2017). Por lo tanto, el uso de métodos complementarios como las pruebas moleculares para realizar la amplificación e identificación de genes *mcy* es una alternativa para comprobar la presencia de cianobacterias productoras de MC. El fragmento amplificado con cebadores diseñados por Hisbergues *et al* (2003) los utilizó Pham *et al* (2021) para la detección y diferenciación de cepas de *Microcystis* productoras y no productoras de MC en el reservorio de TRI-An en Vietnam y la detección que hizo Sidelev (2019) con los mismos cebadores para MC y otros tres pares para amplificar fragmentos e identificar cianobacterias productoras de 4 diferentes cianotoxinas (MC, sianotoxina, cilindroespermopsina y anatoxina) en muestras ambientales de lagos Rusos por medio de PCR multiplex.

JUSTIFICACIÓN

La MC es un metabolito secundario tóxico, producido por las cianobacterias de agua dulce y su consumo produce intoxicaciones severas en los eucariontes (animales y plantas). Se han reportado intoxicaciones y muertes en humanos por la presencia de MC en cuerpos de agua dulce utilizados como agua de consumo o recreación de muchos países. En México, existen reportes de lugares donde la MC ha superado las concentraciones máximas normadas por la COFEPRIS (1 µg/L). Al inicio de este estudio, se sabía de la necesidad de conocer la existencia de cianobacterias productoras de MC en el acuífero de la Península de Yucatán, por ser la fuente de agua para consumo y en los cenotes para uso recreativo de turistas y la población en general. En el año 2021 se reportó un estudio sobre los cenotes lénticos y se comprobó la presencia de MC en concentraciones relativamente bajas (<0.18 µg/L) y se identificaron morfológicamente especies de cianobacterias que podrían contener cepas tóxicas. Especies que se suman a las anteriormente reconocidas por los integrantes del mismo grupo, con un fragmento de la unidad 16S del ARNr por métodos moleculares. La presencia de floraciones algales nocivas (productoras de MC) en los cuerpos de agua se atribuye a los cambios climáticos y del uso del suelo.

La determinación de la presencia o ausencia de las cianobacterias productoras de MC en la península de Yucatán no son la excepción por lo que el enfoque de este estudio es conocer los parámetros fisicoquímicos e hidroquímicos, así como la calidad de muestras de agua del acuífero en el epilimnion de cenotes ubicados en las zonas agrícola, urbana y recreativa en la zona noreste de la PY. Al mismo tiempo cuantificar MC con las pruebas de ELISA y reconocer los géneros productores de MC en el Gen Bank por medio de la amplificación por PCR punto final, utilizando el fragmento de ~300 pb del dominio de condensación del gen *mcyA* del operón *mcyA-C* del clúster *mcy*. Con los datos ambientales y moleculares se reportará sobre las características que favorecen la presencia de cianobacterias formadoras de floraciones y productoras de MC en el acuífero kárstico.

HIPÓTESIS

El deterioro en la calidad del agua por efecto del uso de suelo está asociado a la presencia de cianobacterias productoras de MC en cenotes del noreste de la península de Yucatán.

OBJETIVOS

General

Explorar la presencia del gen *mycA* y la presencia y concentraciones de MC en aguas subterráneas, evaluadas en sus parámetros básicos de calidad del agua en cenotes ubicados en áreas agrícola, urbana y recreativa en el acuífero kárstico de la península de Yucatán, México.

Específicos

Determinar la presencia y concentración de MC en el agua de los cenotes en estudio.

Detectar la presencia del fragmento de ~300 pb del gen *mycA* de las cianobacterias por medio de PCR punto final, en los cenotes en estudio.

Determinar los parámetros fisicoquímicos, hidroquímicos, nutrientes y estado trófico de los cenotes ubicados en tres áreas con diferente uso del suelo: urbano, agrícola y recreativo.

Identificar las especies productoras de MC con las secuencias del fragmento ~300 pb del gen *mycA*.

Determinar la correlación entre la calidad del agua y la presencia del gen *mycA* y las MC.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

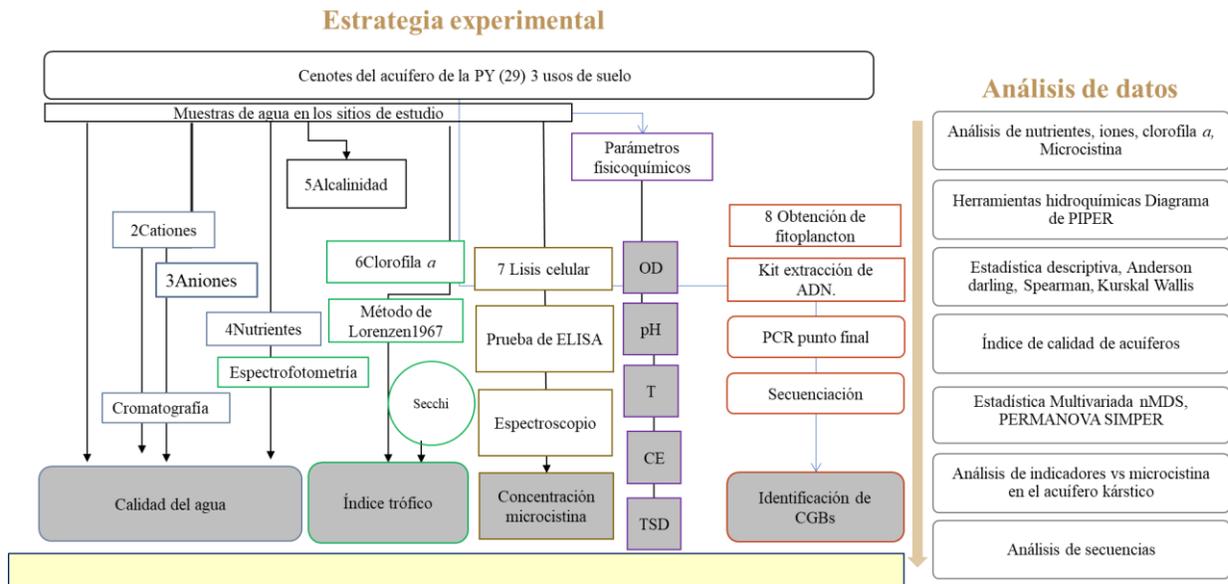


Figura 1.9 Diagrama de la estrategia experimental.

Las muestras de agua se tomaron de manera independiente el mismo día.

- 1 Parámetros fisicoquímicos. Sonda multiparamétrica HACH HQ40D portátil.
- 2, 3 cromatografía iónica utilizando un Cromatógrafo Ion 822 Compact IC Plus (Metrohm)
- 4 espectrofotometría UV-VIS (Espectrofotómetro Evolution 60S de Thermo Scientific) (Cejudo y Ortega, 2018),
- 5 titulación con ácido (NMX-AA-036-SCFI-2001).
- 6 método de Lorenzen 1967
- 7 ensayo de ELISA para detección de MC.
- 8 amplificación por PCR punto final del fragmento de ~300 pb del dominio de condensación del gen *mcyA*.

CAPÍTULO II

LA CALIDAD DEL AGUA DE CENOTES UBICADOS EN ÁREAS AGRÍCOLA, URBANA Y RECREATIVA EN EL ACUÍFERO KÁRSTICO DEL NORESTE DE LA PENÍNSULA DE YUCATÁN

RESUMEN

Para conocer el efecto del cambio de uso del suelo en los cuerpos de agua del acuífero kárstico del NE de la Península de Yucatán (PY) en los factores ambientales y de calidad del agua, se tomaron muestras de agua de catorce cenotes en zonas; urbana, agropecuaria y recreativa durante la temporada de nortes en el NE de la PY. Se utilizaron mediciones fisicoquímicas e hidroquímicas. Se midieron veintinueve parámetros de calidad del agua: los hidroquímicos por métodos colorimétricos; los cationes Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , los aniones Cl^- , SO_4^{2-} , NO_3^- , NO_2^- y HCO_3^- , cuatro nutrientes N-NH_4^+ , N-NO_3^- , N-NO_2^- , P-PO_4^{3-} , parámetros fisicoquímicos medidos con una sonda multiparamétrica, pH, Temp, TSD, CE y DO y por espectrofotometría las concentraciones de Clorofila-a. Para todos los sitios se calcularon, el índice del estado trófico de Carlson, indicador de calidad del agua de 7 factores de Sánchez *et al*, y la relación N/P de Redfield de cada sitio. Los resultados mostraron diferencias en la agrupación por uso del suelo de los cenotes con base en los parámetros ambientales TSD, Cl^- , SO_4^{2-} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ y N-NO_3^- . El análisis estadístico agrupó los sitios de muestreo en función de las similitudes de la calidad del agua que coincidieron con la ubicación geográfica de los cenotes: los sitios cercanos a la costa con aguas cloruradas sódicas, los cenotes agrícolas continentales con aguas cloruradas mixtas y los recreativos ubicados al interior del continente con aguas bicarbonatadas sódicas. Todos los sitios superaron concentraciones de $1.5 \mu\text{M}$ con alguna de las especies químicas de nitrógeno y los resultados ubicaron al fósforo como el nutriente limitante en ocho cenotes. En los cenotes urbanos se encontró N-NH_4^+ como el nutriente principal $>1.5 \mu\text{M}$ y en la zona agrícola se encontraron altas concentraciones de K^+ revelando el uso de fertilizantes, mediciones que indican el origen antropogénico de los contaminantes. Se corroboró que la actividad agrícola, la urbana y en menor grado la actividad recreativa tiene afectación en la calidad del agua subterránea. Con base en el índice de calidad del agua (Sánchez 2016), trece cenotes se clasificaron en condiciones de buena a excelente y uno se clasificó como

de pobre calidad. Con base en el índice del estado trófico (Carlson 1970), se detectaron diferentes condiciones desde eutróficas hasta ultraoligotróficas.

2.1 INTRODUCCIÓN

El desarrollo potencial de los recursos hídricos en el mundo requiere de poner atención a la creciente amenaza de la contaminación del subsuelo, ya que el agua es un recurso finito y actualmente es necesario reciclarla en algunos sitios en el mundo (Carrión-Mero *et al.*, 2021; Valhondo y Carrera *et al.*, 2019; Freeze and Cherry, 1979). La calidad del agua subterránea está influenciada principalmente por dos procesos, uno natural y otro antropogénico: el primero es la interacción roca-agua-aire, que da origen a los procesos químicos principales del agua subterránea, la meteorización mineral y la disolución iónica, así como los procesos de intercambio iónico, oxidación y reducción (Badeenezhad *et al.*, 2020; Vasanthavigar *et al.*, 2010). El segundo, por la entrada de desechos como consecuencia de las actividades humanas y por el cambio del uso del suelo (Rosiles-González *et al.*, 2017; Leal-Bautista *et al.*, 2013; Hem, 1985; Pacheco y Cabrera, 1996). Jiang y Yan, 2010; Helmer y Meybeck, 1996). El uso del suelo es definido como el cambio de cobertura vegetal original modificada, ya sea por contracción o expansión de la actividad del hombre (Davis y Goldman., 2019; Foley *et al.*, 2005). La pérdida de la vegetación nativa perturba el recurso hídrico al alterar la estructura, la porosidad y el almacenamiento de agua del subsuelo, vulnerando los sistemas de agua subterránea (Lerner y Harris, 2009; Scanlon *et al.*, 2005).

El enriquecimiento natural de nutrientes en el agua por la descomposición de la materia orgánica en escalas mayores de tiempo, forman ambientes anóxicos o hipóxicos, aumentando la producción de metano entre otros productos (Beaulieu *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2010; Smith y Schindler, 2009; Richardson y Jorgensen, 1996). Actualmente, la entrada de nutrientes presenta variaciones con el cambio el uso del suelo, las zonas de cultivo y la crianza de ganado con productos agroquímicos y en zonas habitadas con aguas residuales cargadas de productos desechados por el hombre (Gilbert *et al.*, 2020; Glibert, 2020 Saint-Loup *et al.*, 2018; González-Herrera *et al.*, 2014; Rajmohan y Elango, 2005). La materia orgánica introducida queda disponible como nutrientes para la comunidad y el equilibrio energético existente y la estructura de las poblaciones ocasiona la pérdida de la calidad del agua, en escalas de tiempo mucho más cortas y su acumulación provoca la

“eutrofización cultural”. Para medir el grado de eutrofización de un cuerpo de agua se cuantifican las concentraciones de nitrógeno, fósforo, y/o la biomasa resultante de los productores primarios y/o la concentración de clorofila (Beiras, 2018; Qiaoxiang *et al.*, 2008; Marín *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2000; Rojo *et al.*, 2000).

El acuífero de la PY sustenta la economía de la región y los estudios hidroquímicos enfocados a la calidad del agua, cobran importancia en las áreas donde ha cambiado el uso del suelo debido al desarrollo de las principales actividades antropogénicas de la región: la industria turística, el campo agropecuario y el dinamismo residencial (INEGI, 2018; Leal-Bautista, 2013; Carpenter 2013; Gasca *et al.*, 2011; Metcalfe *et al.*, 2011; Herrera y Castillo, 2006, Foley *et al.*, 2005; Marín y Perry, 1994). La pérdida de vegetación y la adecuación urbana que sufren estos lugares, resultan en un aumento de la infiltración del agua superficial al acuífero con cargas importantes de nutrientes y contaminantes, afectando la calidad del agua y la gestión de su uso (CONAGUA, 2011).

El uso del suelo en la PY es principalmente agropecuario > habitacional > recreativo, por lo que el uso no controlado de agroquímicos y la disposición inadecuada de los desechos con las descargas de aguas residuales son las principales fuentes de la contaminación del agua subterránea (Famiglietti, 2014; Pacheco y Cabrera, 2004, Braga *et al.*, 2000). Las aguas residuales se infiltran acarreado principalmente excedentes de nutrientes siendo el más abundante el nitrógeno en forma de nitrato (NO_3^-), gran parte por fuentes antrópicas con concentraciones en cenotes que van de 0.52 a 500 μM (Menció *et al.*, 2011; Hernández-Terrones *et al.*, 2010; Rodríguez-Castillo, 2006; Smith, 2003; González-Herrera *et al.*, 2002 Schmitter-Soto *et al.*, 2002; Pacheco *et al.*, 2000; Herrera Silveira, 1999; Pacheco y Cabrera, 1997 Pacheco y Cabrera, 1996; Heip, 1995; Nixon, 1995). La concentración de nitrógeno está asociada al uso de fertilizantes, desechos domésticos y pecuarios en aguas residuales, incrementándose por escorrentía en la temporada de lluvias (Pacheco *et al.*, 2000; Pacheco y Cabrera, 1997). El segundo nutriente en abundancia es el fósforo, generalmente se encuentra en bajas concentraciones debido a que se favorece su co-precipitación con el calcio por la saturación de carbonatos del agua del acuífero (Hernández-Terrones *et al.*, 2010; Cervantes-Martínez *et al.*, 2002; Schmitter-Soto *et al.*, 2002; Alcocer *et al.*, 1998). La concentración del fósforo se encuentra de 0.005 a 20 μM (Schimtter-Soto *et al.*, 2002). En 2020 se encontraron diferencias significativas de fosfatos

incrementando su concentración disuelta en la época de lluvia en zonas agrícolas y no agrícolas (Smith *et al.*; 2020). Las bajas concentraciones de fósforo difieren de las altas concentraciones del nitrógeno, comparando con la relación de Redfield (N:P de 16: 1), resultando en una relación mayor, (N:P 31.4 a 5400: 1). Esta relación sugiere al fósforo como el nutriente limitante (Alcocer *et al.*, 1998; Cervantes-Martínez *et al.*, 2002; Hernández-Terrones *et al.*, 2010). Schmitter-Soto (2002) registró el estado trófico de 30 cenotes en la PY basado en el índice del estado trófico (IET), con la técnica de medición de la clorofila-a de Carlson (1977), reportando la eutrofización del 15% de los sitios. En otros trabajos, Cervantes-Martínez *et al.*, (2017; 2009 y 2002) y Villafañe *et al.*, (2015) encontraron con IET con clorofila-a, cenotes de los tipos oligotróficos, mesotróficos (3 a 20 µg/L) y eutróficos.

La vigilancia de las fuentes de agua de la península de Yucatán debe abordarse sistemáticamente, con el fin de mantener en óptimas condiciones la calidad del agua con el fin de eliminar los riesgos a la salud de los ecosistemas y de manera importante en zonas con cambio de uso del suelo. El presente estudio evaluó la calidad del agua de acuerdo con seis parámetros de los nueve contenidos en las especificaciones sanitarias químicas de la Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-127-SSA1-2017 de uso y consumo humano. Se determinaron los parámetros fisicoquímicos, hidroquímicos e indicadores del estado trófico, la calidad del agua para su consumo y su uso por la población y para la protección de la vida acuática.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

La zona de estudio tiene un clima tropical subhúmedo, con una temperatura anual que oscila entre 23-28 °C y una precipitación promedio anual de 1,202 mm³ (promedio del período 1985 al 2021, CONAGUA, 2022), con un máximo de 1836 mm³ el año 2020. Esta investigación se llevó a cabo en los meses de octubre de 2019 y febrero de 2020. Las muestras fueron tomadas de 14 cuerpos de agua en tres diferentes zonas de la PY (Figura 2.1). En el área urbana de la Ciudad de Cancún del Municipio Benito Juárez, **(C1)** Lago "Milagros" (21° 05' 48.5" / 86° 54' 51.7, **(C7)** "Estanque Ucaribe" con agua subterránea (21° 11' 59.4" / 86° 49' 23.6") y **(C8)** laguna salobre "Manatí" (21° 11' 15.5" / 86° 48' 43.4"). En el área agrícola, ubicada en el Estado de Yucatán se eligieron seis cenotes ubicados la zona ganadera de los municipios Panabá y Dzilam González; **(A4)** "Buena Esperanza" (21° 27'

14.8" / 88° 31' 12.3"), **(A5)** "Ceiba Xcaha" (21° 27' 03.3" / 88° 30' 16.6"), **(A6)** "San Manuel Chablé" (21° 26' 25.6" / 88° 30' 25.7"), **(A7)** "San Miguel" (Cenote abierto (21° 18' 01.5" / 88° 19' 58.8"), **(A8)** "San Isidro" (21° 24' 17.9" / 88° 27' 54.9") y **(A9)** "San Miguel Panabá" (21° 16' 08.7" / 88° 14' 56.4"). El último grupo de 5 cenotes ubicados en el área recreativa con servicio turístico, en Lázaro Cárdenas en el Estado de Quintana Roo, la ruta salvaje", **(R6)** "Palapas" (20° 48' 38.6" / 87° 19' 54.4"), **(R7)** "Naktunich" (20° 50' 07.9" / 87° 19' 25.5"), **(R8)** "Llanta" (20° 51' 06.4" / 87° 18' 57.9"), **(R9)** "Abandonado" (20° 53' 36.2" / 87° 18' 56.3") y **(R10)** "San Carlos 8" (20° 54' 29.1" / 87° 18' 26.8") (Figura 2.1).

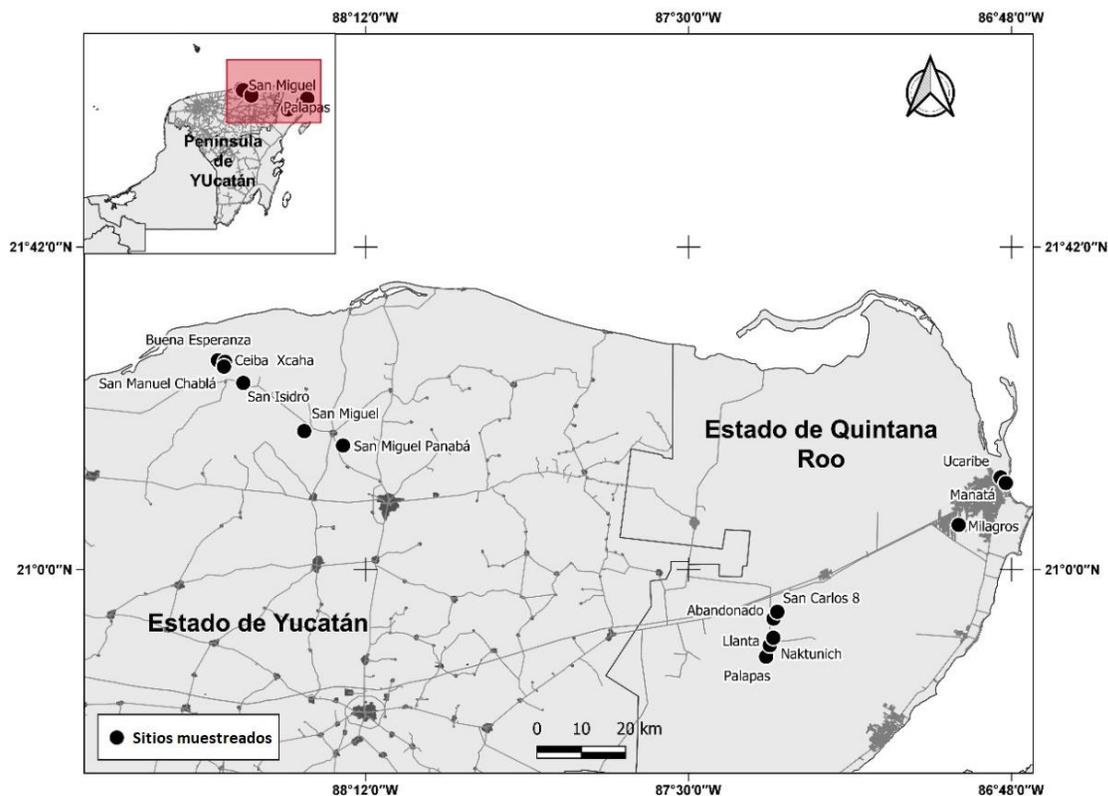


Figura 2.1 Mapa del noreste de la península de Yucatán, donde se señala en círculos negros los sitios estudiados. En Quintana Roo se muestrearon tres sitios urbanos de Cancún y cinco sitios en Lázaro Cárdenas. En Yucatán seis sitios ubicados en Panabá y Dzilam.

2.2.1 Muestreo y mediciones

Las muestras de agua se colectaron directamente de la superficie de los cuerpos de agua, en botellas de HDPE previamente lavadas con detergentes libres de fosfatos. Los

parámetros fisicoquímicos registrados *in situ* fueron: temperatura (°C), pH, conductividad eléctrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$), sólidos disueltos totales (mg/L) y oxígeno disuelto (mg/L), para lo cual se utilizó una sonda multiparamétrica HACH HQ40D portátil. La transparencia se midió con el disco de Secchi. Todas las muestras fueron transportadas en hielo al laboratorio el mismo día. Para la obtención de clorofila-*a*, se colectó un litro de agua en frasco ámbar y se filtró el mismo día (membrana de fibra de vidrio GF/F 0.7 μm) con una bomba de vacío. El filtro de clorofila se colocó en un tubo de vidrio conteniendo 10 ml de acetona 90% y se guardó sin luz y a 4°C toda la noche. Al siguiente día, se centrifugó a 2,500 rpm y se midió dos veces la absorbancia en un espectrofotómetro UV-Visible Biospectrometer Basic, Eppendorf, con y sin HCl, en longitudes de onda a 630, 647, 664, 665 y 750 nm. La concentración de la clorofila-*a* se calculó mediante el método monocromático de Lorenzen (1967). Las muestras de iones y nutrientes se filtraron con membrana de nitrocelulosa de 0.22 μm (Micropore), los filtrados se colectaron en tubos de fondo cilíndrico de 50 mL y se almacenaron a -20°C, hasta su medición. Los análisis de los nutrientes N-NO₃⁻, N-NH₄⁺, N-NO₂⁻, P-PO₄³⁻ y SiO₂, se realizaron mediante espectrofotometría UV-VIS (Espectrofotómetro Evolution 60S de Thermo Scientific) (Cejudo y Ortega, 2018), el límite de detección se calculó a partir de diluciones del último estándar de la curva. Los nitritos se cuantificaron siguiendo el método propuesto por Strickland y Parsons (1972), el amonio con el método salicilato-hipoclorito (Bower y Holm-Hansen, 1980) y los ortofosfatos siguiendo el procedimiento EPA 365.3. (1978). Los nitratos, sulfatos, cloruros y cationes (Na⁺, K⁺, Mg²⁺ y Ca²⁺) se cuantificaron mediante cromatografía iónica utilizando un Cromatógrafo Ion 822 Compact IC Plus (Metrohm), con un límite de detección de 0.1 mg/L, tomando la concentración del último estándar de la curva de calibración. Para la prueba de alcalinidad se tomaron directamente del cuerpo de agua 100 ml y ya en laboratorio se almacenaron a 4°C, hasta su medición. La alcalinidad total se midió mediante titulación con ácido (NMX-AA-036-SCFI-2001).

2.2.2 Análisis de datos ambientales

Se realizaron pruebas estadísticas descriptivas con el software Minitab 19 (<https://www.minitab.com/es-mx/>). Se utilizó la prueba de Anderson-Darling para conocer si los datos siguen una distribución de normalidad para una prueba *t*. Se realizó la correlación de Spearman (σ) de asociación o interdependencia entre dos variables para todos y cada

uno de los factores medidos. Para determinar si las medianas de los grupos difieren, se hicieron pruebas de Mann-Whitney (M-W) por cada factor para los tres grupos de datos por uso del suelo. Para discernir entre los grupos con diferencias significativas se hizo la prueba de Tukey a un nivel de confianza del 95%.

Para graficar el diagrama de Piper, primero se convirtieron las concentraciones mg/L a valores milimolar (mM) y los miliequivalentes (mEq/L) dividiendo el valor mMol entre los equivalentes del ión. Los valores mEq/L se sumaron en dos grupos, aniones y cationes y se calcularon los porcentajes de cada uno. Se utilizó el programa AqQA (RockWare) y se establecieron las características de la matriz hídrica para cada sitio.

2.2.3 Indicadores de la Calidad del agua

Se obtuvieron tres indicadores de calidad de agua: el agua subterránea se evaluó con el Índice de Calidad del Agua desarrollado por Sánchez *et al.* (2016). Este indicador de calidad del agua utiliza siete parámetros (pH, TDS, Alcalinidad, Na⁺, Cl⁻, SO₄²⁻ y NO₃⁻) para calcular los valores relativos del índice se basó en la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-127-SSA1-1994. La cuantificación de la clorofila-a se utilizó para calcular el índice del Estado Trófico de Carlson (1977) (IET). Finalmente, con las concentraciones de los compuestos de nitrógeno y fósforo se obtuvo la relación NID/FRS de Redfield (1958). En los sitios en los que no se obtuvo valores por tener concentraciones por debajo del límite de detección, se decidió tomar el valor de la mitad del límite inferior, para N-NO₃⁻ fue de 0.05 mg/L, para N-NH₄⁺ fue de (0.007 mg/L), para N-NO₂⁻ fue de (0.005 mg/L) y para P-PO₄³⁻ fue de (0.05 mg/L).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Parámetros Fisicoquímicos

Los resultados obtenidos mostraron que los valores más altos de EC y TDS se encontraron en el sitio C8, una laguna de agua salobre. Para los sitios de agua dulce y de acuerdo con los análisis fisicoquímicos, los sitios que presentaron valores extremos para el pH fueron el A5 con un pH de 9.07 y el A9 con un pH de 7.04. Los valores inferiores del pH que superan el valor histórico en +0.7 del sitio A9 y +1.6 el sitio R7. Los sitios con los valores extremos para el Total de Sólidos Disueltos (TDS) fueron el A9 con una concentración de 803 mg/L

y el R9 con una concentración de 211 mg/L. El Oxígeno Disuelto (OD) presentó un rango de concentración de entre 1.1 mg/L para los sitios A9 y C8 y de 15.7 mg/L para el sitio A8. La temperatura osciló entre los 30,4°C del sitio C1 y los 25,2°C del sitio A5). Contrastan los datos de Seduma Yuc (2008 a 2011) con valores de OD por arriba A8 y por abajo A9 y C8 del promedio histórico, (Tabla 2.1).

Tabla.2.1 Valores máximo y mínimo de los parámetros fisicoquímicos obtenidos *in situ* en los sitios de muestreo.

Factor		Urbanos (C) Octubre	Agrícolas (A) Noviembre	Recreativos (R) Febrero
pH	Mayor	C7 8.5	A5 9.1	R9/R10 8.4
	Menor	C8 7.1	A9 7.0	R7 7.9
Temp °C	Mayor	C1 30.4	A8 28.8	R9 28.4
	Menor	C8 27.4	A5 25.2	R6 26.3
Cond µS/cm	Mayor	C8 5,050	A9 1,700	R7 648
	Menor	C1 710	A5 824	R10 459
TDS mg/L	Mayor	C8 2,500	A9 803	R7 306
	Menor	C1 313	A5 401	R10 211
OD mg/L	Mayor	C7 7.9	A8 15.7	R7 13.0
	Menor	C8 1.1	A9 1.1	R10 8.4

2.3.2 Hidroquímica

Las características del sitio salobre juegan un papel importante en las diferencias promedio entre las áreas urbanas y recreativas. La alcalinidad presentó mayor dispersión en las concentraciones de CaCO₃, en los sitios agropecuarios <recreativos <urbanos (Figura 2.2).

Las concentraciones más altas de cloruros con >200 mg/L (Cl⁻) se encontraron en los sitios C7 y C8 en la zona urbana y A7 y A9 en la agrícola, para los sulfatos los sitios con concentraciones >25 mg SO₄²⁻ /L fueron C1, C7 y C8 de la zona urbana, y A4, A6, A7 y A9 en la agrícola. En los sitios agropecuarios A4, A6, A7 y A9 se encontraron las mayores concentraciones de nitratos >2 mg NO₃⁻ /L, al igual que el sitio recreativo R6. Los nitritos tuvieron concentraciones detectables (>0.031 mg NO₂⁻ /L) en los sitios agrícolas A5, A7, A8 y A9, además el sitio recreativo R6. Los sitios recreativos tuvieron los valores más bajos

para aniones, (<41 mg Cl⁻/L, <9 mg SO₄²⁻/L, <0.07 mg NO₃⁻/L) excepto R6, y concentraciones no detectables de NO₂⁻ excepto R6 (Figura 2.2).

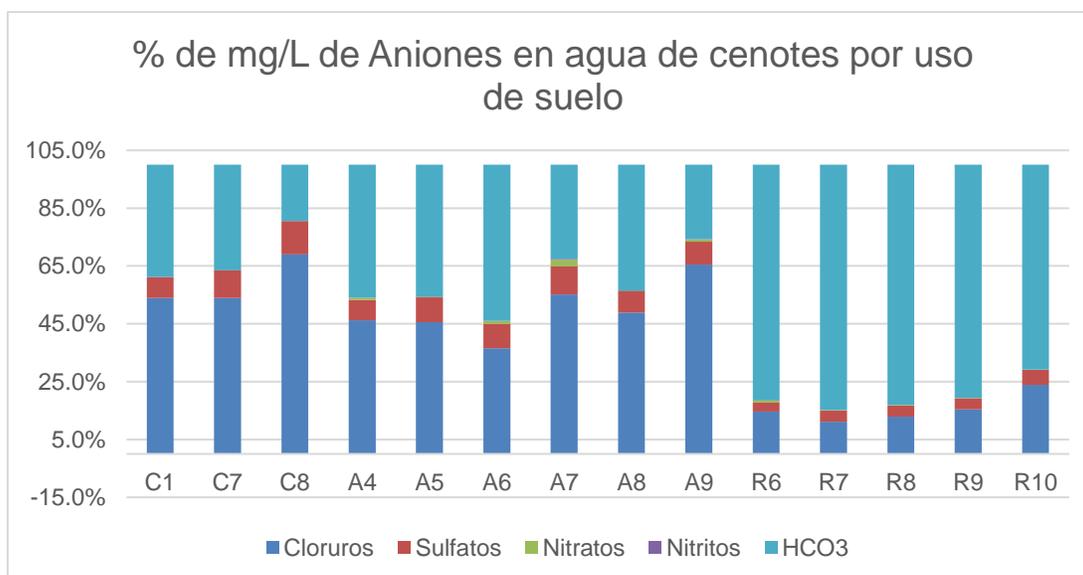


Figura 2.2 Porcentaje de las concentraciones en mg/L de los aniones obtenidos del agua de los cenotes ubicados en las áreas urbana (C), agropecuaria (A) y recreativa (R). Se observa la presencia mayoritaria de cloruros y sulfatos en las zonas agropecuaria y urbana, los bicarbonatos en el área recreativa y presencia de nitratos en el área agropecuaria.

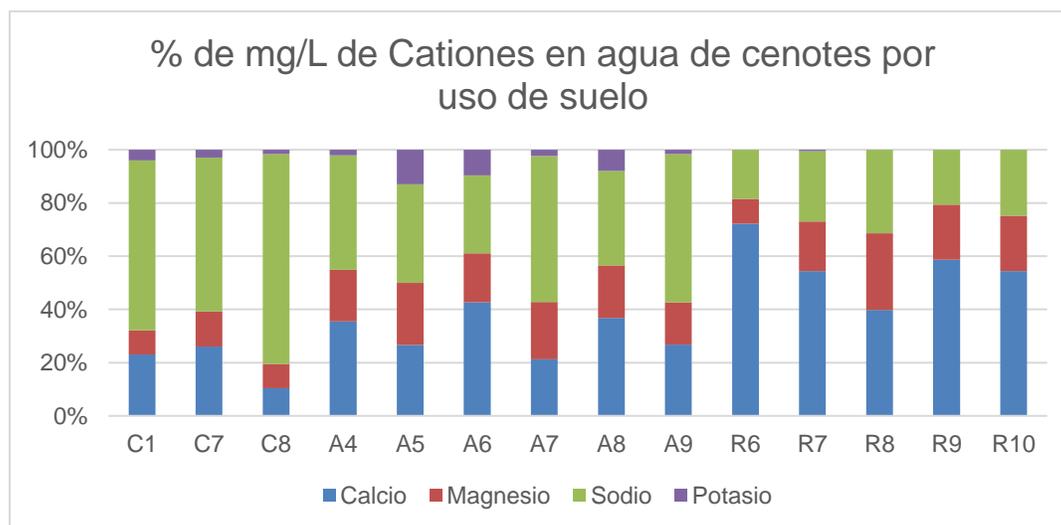


Figura 2.3 Porcentaje de las concentraciones en mg/L de los cationes obtenidos del agua de los cenotes ubicados en las áreas urbana (C), agropecuaria (A) y recreativa (R). Tanto el sodio como el calcio son los cationes con mayor presencia.

En todas las mediciones de cationes, en el área de los sitios recreativos tuvieron valores de concentración menores que los encontrados en el área de los sitios agropecuarios y el área de los sitios urbanos. Para calcio $R < A < C$, para magnesio $R < A < C$, para sodio $R < A < C$. El potasio fue detectado sólo en un sitio recreativo R7 y $A < C$ (Figura 2.3). La distribución de las concentraciones de iones responde principalmente a su localización geográfica y no a efectos del uso del suelo.

Basado en los valores relativos de las concentraciones de aniones y cationes convertidos en meq/L, se gráfícó el diagrama de Piper. Los sitios se agruparon en tres tipos de familias de agua: los sitios urbanos se ubicaron en el área de las aguas cloruradas sódicas, los sitios agropecuarios en el área correspondiente a las aguas cloruradas mixtas y los sitios recreativos localizados en el tipo de aguas bicarbonatadas de magnesio (Figura 2.4).

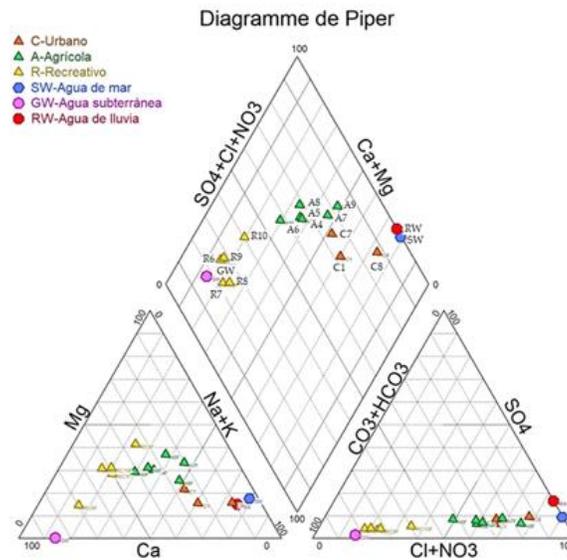


Figura 2.4 Diagrama de Piper. Muestra en los triángulos inferiores los valores en meq/L, las proporciones (%) de aniones (derecha) y cationes (izquierda). El rombo superior son puntos de intersección de líneas paralelas a los ejes verticales que unen los puntos de aniones (triángulo derecho) y cationes (triángulo izquierdo) de cada sitio. Los cuadros son los sitios urbanos C1, C2, y C3 (clorados). Los puntos grises son los agrícolas A4, A5, A6, A7, A8 y A9 (clorados). Los triángulos son los sitios recreativos R6, R7, R8, R9 y R10 (bicarbonatados).

2.3.3 Nutrientes

En los sitios de uso de suelo urbano se encontró al amonio como la principal fuente de nitrógeno y no fue detectado en dos sitios agropecuarios y cuatro sitios recreativos. El nitrato por el contrario fue detectado en todos los sitios de uso agropecuario y recreativo y no fue detectado en los sitios urbanos. En sitios urbanos tampoco se detectó $P-PO_4^{3-}$ y las concentraciones en tres de los seis sitios agropecuarios fue superior a los tres sitios recreativos en los que se detectó $P-PO_4^{3-}$. Del total de sitios, en 9 no se cuantificaron concentraciones de $N-NO_2^-$, que fueron menores al límite de detección (Figura 2.5).

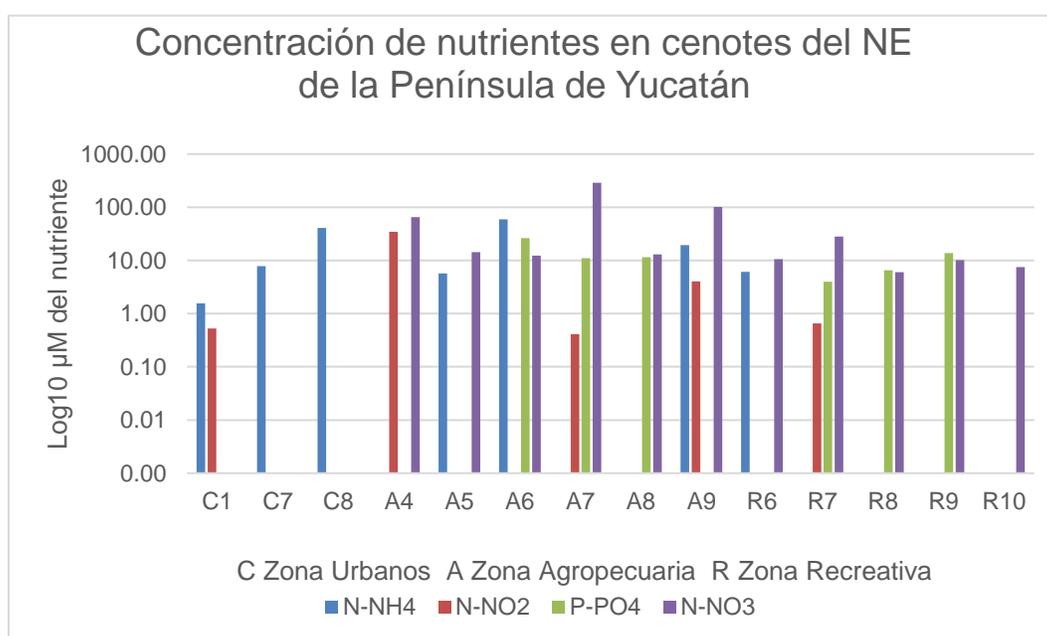


Figura 2.5 Gráfico de las concentraciones de nutrientes en cada sitio muestreado donde se señala su ubicación por uso del suelo; C Urbano, A Agropecuario y R Recreativo. Los valores en $\text{Log}_{10} \mu\text{M}$ muestran la presencia del $N-NH_4^+$ como principal nutriente al nitrógeno, en la zona urbana y como $N-NO_3^-$ en las zonas agropecuaria y recreativa. El $P-PO_4^{3-}$ fue detectado en tres agropecuarios y tres recreativos.

2.3.4 Análisis Estadístico de datos ambientales

Los resultados obtenidos con la prueba de normalidad de Anderson-Darling mostraron que las variables pH, Temperatura, OD y % O son datos paramétricos y con la prueba de ANOVA de un factor no muestran diferencias significativas relacionados con las áreas seleccionadas del uso del suelo y no hubo correlación en la prueba de Pearson, los valores

de significancia fueron $p > \alpha = 0.05$. Las variables TSD, CE, aniones, cationes y nutrientes presentan datos no paramétricos y en la prueba de Spearman reveló que la variable fisicoquímica TSD, los aniones Cl^- , SO_4^{2-} , los cationes Mg^{2+} , Na^+ , K^+ y el nutriente NH_4^+ están correlacionadas con las condiciones de las áreas estudiadas presentando valores de significancia $p < \alpha = 0.05$ (Tabla 2.2).

Tabla.2.2 Prueba de correlación de Spearman (ρ) con datos no paramétricos obtenidos de factores físicoquímicos, hidroquímicos, nutrientes e indicadores. El valor de significancia $p < \alpha = 0.05$ confirma la asociación lineal del factor con el uso del suelo en la proporción del valor de Rho (ρ). Para los parámetros de pH, temperatura, OD y %O se correlacionó con la prueba de Pearson, son datos paramétricos de acuerdo con la prueba de Anderson-Darling.

Correspondencia de Spearman			
	Variable ambiental	ρ del Uso del suelo	Valor p $\alpha = 0.05$
	Fisicoquímicos	pH	-0.066
Temp		-0.290	0.31
Cond Elec		-0.448	0.11
TSD		-0.742	0.01
Oxi Dis		0.441	0.12
%O ₂		0.488	0.08
Hidroquímicos		Cl^-	-0.86
	SO_4^{2-}	-0.87	0.01
	NO_3^-	0.32	0.27
	NO_2^-	-0.04	0.89
	Ca^{2+}	-0.36	0.21
	Mg^{2+}	-0.58	0.03
	Na^+	-0.89	0.01
	K^+	-0.79	0.01
	CaCO_3	0.18	0.55
	HCO_3^-	0.18	0.55
Nutrientes	N-NH_4^+	-0.533	0.05
	N-NO_2^-	-0.129	0.66
	SiO_2	0.429	0.13
	P-PO_4^{3-}	0.312	0.28
	N-NO_3^-	0.234	0.42

El resultado del análisis de las distancias de las medianas de las tres poblaciones de uso del suelo con la prueba estadística de M-W mostraron que existen diferencias en un parámetro fisicoquímico (TSD), dos aniones (Cl^- y SO_4^{2-}), tres cationes (Mg^{2+} , Na^+ y K^+ y

un nutriente (N-NH_4^+). Con el análisis de Tukey se discernió que de los siete factores con diferencias significativas las tenía el grupo de sitios recreativos, donde siete factores fueron diferentes con los agropecuarios y cinco de ellos fueron diferentes con los urbanos, el parámetro fisicoquímico TSD y el catión Mg^{2+} no fueron diferentes entre urbanos y recreativos (Tabla 2.3).

Tabla.2.3 Resultado de la prueba de Man-Whitney y Tukey, los datos de las áreas urbana, agropecuaria y recreativa que son diferentes presentan un valor del nivel de significancia $p = \alpha \leq 0.05$. El grupo de sitios recreativos presentan diferencias significativas con los agropecuarios en los factores fisicoquímicos, TSD, N-NO_3^- , Cl^- , Mg^+ , Na^+ y K^+ y con los urbanos tienen diferencia con los recreativos en Cl^- , SO_4^{2-} , NO_3^- , Na^+ y K^+ .

Factor mg/L	Pruebas de M-W y Tukey	Value p $\alpha \leq 0.05$
TSD	Recreativo \neq Agropecuario	0.008
N-NO_3^-		0.036
Cl^-		0.008
SO_4^{2-}		0.008
Mg^{2+}		0.014
Na^+		0.008
K^+		0.008
Cl^-		Recreativo \neq Urbano
SO_4^{2-}	0.037	
N-NO_3^-	0.037	
Na^+	0.037	
K^+	0.037	

Los resultados obtenidos con el indicador del estado trófico de Carlson mostraron que los sitios C8, A5, A8 y R6 son eutróficos, C7, A4 y A9 son mesotróficos, A7, R7, R8, R9 y R10 son oligotróficos, C1 y A6 son ultraoligotróficos. No se encontró correlación de los valores del estado trófico con las agrupaciones por uso del suelo (Tabla 2.4).

Los valores obtenidos con el índice de calidad de las aguas (Sánchez, 2016), para once sitios (entre ellos todos los recreativos), corresponden a la clasificación de excelente calidad, los sitios agropecuarios A7 y A9 fueron de buena calidad y solamente el salobre C8 fue de muy pobre calidad (Tabla 2.4).

Los resultados de la relación NID/FSR (16 N / 1 P) abarcan un rango muy extenso; siete sitios tienen resultados por debajo de ese valor (C1, C7, A6, A8, R7, R8 y R9). Se obtuvieron valores similares al dato de referencia en los sitios A7 y R10. Se obtuvieron lugares con aproximadamente el doble de ese valor de referencia en los sitios C8, A5 y R6 y por último dos sitios agropecuarios que superan más de diez veces ese valor y son A4 y A9 (Tabla 2.4).

Tabla.2.4 Indicadores de la Calidad del agua. Valores del índice de Calidad del agua, (Sánchez 2016) (ICA). Índice del estado trófico (Carlson 1970) (IET). Radio de NID/FRS de Redfield (NID/FRS) valor de referencia 16.

Sitios	ICA	*** Excelente ** Buena * Pobre	IET (%)	Nivel trófico	NID/FGR	< Debajo = Igual > Encima
C1	33.8	***	26.7	Ultra	3.1	<
C7	41.7	***	46	Meso	6.7	<
C8	195.9	*	55	Eu	30.3	<
A4	41.4	***	45.7	Meso	228.4	>
A5	26.8	***	55.5	Eu	40.3	>
A6	33.5	***		Ultra	0.7	<
A7	57.8	**	42	Oligo	17.6	=
A8	28.2	***	60	Eu	0.8	<
A9	57.2	**	50.2	Meso	277.8	>
R6	22.1	***	58.6	Eu	31.3	>
R7	18.8	***	42.4	Oligo	4.8	<
R8	18.1	***	42.4	Oligo	0.6	<
R9	15.8	***	37.4	Oligo	0.5	<
R10	15.6	***	44.2	Oligo	19.2	=

2.4 DISCUSIÓN

De acuerdo con el Reglamento de la Ley de Protección al Medio Ambiente del Estado de Yucatán en Materia de Cenotes, Cuevas y Grutas expedido por Secretaría de Desarrollo Urbano y Medio Ambiente del Estado de Yucatán, enero 2021 (DOEY, 2021), se establece que el monitoreo de la calidad del agua de cenotes debe realizarse conforme a los límites máximos permisibles de las normas oficiales mexicanas aplicables. Las referencias de la calidad del agua ambiental en México las establecen dos documentos, el “criterio ecológico

CE-CCA 001-89 de la SEDUE” (1989) establece los criterios para evaluar los cuerpos de agua como aptos para ser utilizados como fuente de abastecimiento de agua potable, en actividades recreativas, para riego agrícola, uso pecuario, acuacultura y protección de la vida acuática y el de salud “NOM-127-SSA1-2017” (2017). De las zonas de uso del suelo, los cenotes situados en la zona agropecuaria, la calidad del agua es modificada por la introducción de contaminantes, al comparar con los valores máximos de los componentes y parámetros de la “NOM-127-SSA1-2017”, al menos uno de los sitios agropecuarios y un urbano superan los valores de pH, N-NH_3^+ , N-NO_2^- y N-NO_3^- (Polanco et al., 2019). El análisis estadístico establece diferencias significativas entre los sitios recreativos con agropecuarios y urbanos en el nutriente N-NO_3^- . El K^+ es un catión utilizado como indicador de potenciales fuentes de contaminación. Las concentraciones “naturales” están por debajo de los 5 mg/L, mayores cantidades se atribuyen principalmente a actividades antropogénicas principalmente la agropecuaria por uso de fertilizantes (Skowron et al., 2018).

Se revisaron reportes anteriores de cenotes de la PY y se encontró coincidencia en un dato extremo, el sitio agropecuario A5 obtuvo el valor más alto de pH (9.1), similar al reportado en el cenote Timul pH 9.1, ambos con media unidad de pH arriba del promedio histórico (pH 8.6) (Pérez et al., 2011; Schmitter et al., 2002a; Herrera Silveira et al., 1996). El pH es un factor que no presenta cambios significativos entre las temporadas y en el epilimnion la entrada de CO_2 acidifica el agua al disminuir el O_2 y al mismo tiempo es neutralizado por la disolución de la piedra caliza, la concentración de OD en el sitio A5 (5 mg/L) fue mucho menor al obtenido en el cenote Timul (11.4 mg/L), por lo que las causas del valor de pH obtenido podrían ser otros factores, como la actividad biológica de las cianobacterias, especialmente la presencia de microalgas *Microcystis*, las cuales poseen anhidrasas carbónicas y Rubisco, así como carboxisomas que les permiten almacenar y transformar el CO_2 acuoso en HCO_3^- absorberlo del ambiente y con ello aumentar el pH del ambiente (van der Grinten et al., 2005; Talling, 1976). En este estudio todos los sitios recreativos y dos urbanos ubicados en la zona continental alejados del litoral, tenían aguas alcalinas (en estos sitios urbanos no se detectó P-PO_4^{3-} y cuatro de los agropecuarios más cercanos a la costa tenían aguas menos alcalinas, los otros dos agropecuarios fueron la excepción y presentaron mayor alcalinidad (A5 y A8). Los reportes de la zona afirman que los cenotes cerca de la costa son más ácidos y al interior de la península, son más alcalinos (Moscoso,

2019, Cruz *et al.*, 2018; Schmitter-Soto *et al.*, 2002, Alcocer *et al.*, 1998). El NH_4^+ es mucho más tóxico en agua alcalina que en agua ácida, a valores de $\text{pH} > 8.5$ es más tóxico para la biota acuática, el sitio urbano C8 con ($0.731 \text{ mg/L NH}_4^+$) y el sitio agropecuario A6 ($1.072 \text{ mg/L NH}_4^+$) tiene pH menor a 7.5, por lo que no representó riesgo (Morrison *et al.*, 2001; DWAF, 1996). Los valores máximos de la norma que no fueron rebasados y se obtuvieron similares o por debajo de los máximos encontrados en reportes anteriores son los factores de TNID, temperatura, CE y TSD (Saint-Loup *et al.*, 2018; Schmitter-Soto *et al.*, 2002a). El oxígeno disuelto supera los valores históricos de 8 mg/L (Seduma Yuc. 2008 a 2011), la máxima concentración en los sitios A7 y A8 agrícolas ambos con FAN, las cuales incrementan el O_2 en el medio. En tres sitios agrícolas y uno urbano se observaron concentraciones de oxígeno disuelto muy cercano a los límites de la anoxia/anaerobiosis, de 1.0 mg/L con la consecuente muerte de metazoarios acuáticos principalmente (Saari *et al.*, 2017; Schmitter-Soto *et al.*, 2002a; Wang *et al.*, 1978). La variabilidad de concentraciones de N-NO_3^- se debe a la dinámica de las actividades antropogénicas, ya que los eventos contaminantes son puntuales y no regionales tanto espacial como temporalmente en el acuífero de la PY (Pacheco y Cabrera, 1997). En el área agropecuaria se obtuvieron 5.22 mg/L de N-NO_3^- mostrando una posible tendencia de disminución entre los años 2017 y 2019 (Caamal, 2021). Los límites de las concentraciones de N-NO_3^- señalados en la NOM-127-SSA1-2017 de 11 mg/L está por arriba de los 10 mg/L de nitratos que puede causar desordenes fatales a humanos (infantes) y animales silvestre y domésticos y por debajo de los 41 mg/L en adultos por metahemoglobinemia. Ninguno de los sitios rebasó esas concentraciones. Las altas concentraciones de P-PO_4^{3-} que se obtuvieron en 4 sitios se explican por la entrada de altas concentraciones de materia orgánica al cuerpo de agua, dejando P-PO_4^{3-} en solución, especialmente por la entrada de agroquímicos en tres sitios agropecuarios y un sitio recreativo del que se sospecha tiene entrada de aguas residuales (Cagle *et al.*, 2021; Saint-Loup *et al.*, 2018; Sánchez-Sánchez *et al.*, 2015; Pacheco *et al.*, 2004).

Los resultados de los indicadores de calidad del agua responden a las correlaciones encontradas y los parámetros con diferencias significativas que componen sus formulaciones, a decir el ICA con TSD y N-NO_3^- y la relación de Redfield con las concentraciones de N-NO_3^- y P-PO_4^{3-} . El índice del estado trófico basado en la concentración clorofila-*a* nos da una perspectiva de la calidad del agua diferente, utilizando

los valores medios por uso del suelo, los agropecuarios y recreativos se agrupan en mesotróficos y los urbanos oligotróficos.

Se recomiendan mejores prácticas de gestión en los agroecosistemas de la zona agrícola para asegurar una buena calidad del agua subterránea para uso agrícola y en los sitios recreativos cuidar la calidad de las afluentes y apoyarse en el Reglamento de la Ley de Protección al Medio Ambiente del Estado de Yucatán en Materia de Cenotes, Cuevas y Grutas expedido por Secretaría de Desarrollo Urbano y Medio Ambiente del Estado de Yucatán.

2.5 CONCLUSIÓN

Los tipos de agua encontrados responden a su ubicación geográfica y no al tipo de uso del suelo. Por uso del suelo los sitios utilizados para actividades recreativas presentaron diferencias en la concentración de nutrientes en comparación con los sitios agropecuarios y urbanos.

CAPÍTULO III

DETECCIÓN DEL GEN *mcyA* Y CUANTIFICACIÓN DE MICROCISTINA EN CENOTES LOCALIZADOS EN ÁREAS DE USO DEL SUELO URBANO AGRÍCOLA Y RECREATIVO EN EL ACUÍFERO KÁRSTICO DE LA PENÍNSULA DE YUCATÁN, MÉXICO.

Ávila-Torres, G.; Rosiles-González, G.; Carrillo-Jovel, V.H.; Acosta-González, G.; Cejudo-Espinosa, E.; Ortega-Camacho, D.; Hernández-Zepeda, C.; Moreno-Valenzuela, O.A. Microcystin Concentrations and Detection of the *mcyA* Gene in Water Collected from Agricultural, Urban, and Recreational Areas in a Karst Aquifer in the Yucatan Peninsula of Mexico. *Microbiol. Res.* **2023**, *14*, 1168–1184. <https://doi.org/10.3390/microbiolres14030078>. Publicado MDPI. <https://www.mdpi.com/2036-7481/14/3/78>.

RESUMEN

La eutrofización de los cuerpos de agua dulce permite el establecimiento de poblaciones de cianobacterias, algunas de las cuales pueden producir metabolitos secundarios como la MC hepatotóxica. El objetivo principal de este estudio fue el de caracterizar los parámetros básicos de la calidad del agua y la detección del gen *mcyA* (productor de MC) y de MC en cenotes localizados en áreas con uso del suelo agrícola, urbano y recreativo del acuífero kárstico del NE de la Península de Yucatán (PY), México. Para ello se colectó agua (100 L) de 14 cenotes y se filtraron a través de filtros de 22 µm de diámetro. La calidad del agua fue determinada utilizando variables fisicoquímicas, hidroquímicas, nutrientes y concentraciones de la clorofila-a. El total de MC fue cuantificado por medio de un kit de ELISA para cada uno de los sitios. El total del ADN fue aislado del plankton de los filtros de nitrocelulosa y fue utilizado para la amplificación por PCR de un fragmento (~300 pb) del dominio de condensación del gen *mcyA*. Los amplicones fueron clonados y secuenciados para identificación de las cianobacterias. Los resultados mostraron que los cenotes presentaban estados tróficos desde ultraoligotrófico hasta eutrófico, de acuerdo con el Índice del estado trófico de Carlson. Todos los sitios presentaron concentraciones de MC detectable, en un rango de >0.14 µg /L a >5.0 µg/L y el 21% (3/14) de ellos excedieron la concentración establecida como estándar (1 µg/L) para el agua de uso y consumo. El gen *mcyA* amplificó en el 28% de los sitios, de los cuales fueron obtenidas 23 secuencias, de las cuales el 87%(20/23) compartieron >95% de identidad de nucleótidos con el género *Microcystis* y el 13% (3/23) de las secuencias compartieron >87% de identidad de nucleótidos con cianobacterias no cultivadas. No se observó una correlación entre la

presencia del gen *mcyA* y la concentración de MC; sin embargo, se observó una correlación entre las concentraciones de MC y pH y Chl-a.

3.1 INTRODUCCIÓN

El cambio climático y el cambio de uso del suelo han incrementado drásticamente la contaminación de los ambientes acuáticos (Wurtsbaugh *et al.*, 2019), afectando la calidad e integridad de los sistemas de agua dulce (Sinha *et al.*, 2012; Beversdorf *et al.*, 2015; Kimambo *et al.*, 2019). Este es un problema global que se ha intensificado, principalmente por la falta de un tratamiento adecuado de las aguas residuales, el uso intensivo del riego y la aplicación de fertilizantes (Beretta-Blanco & Carrasco-Letelier, 2021; Zou *et al.*, 2020). Como resultado, la eutrofización de los ecosistemas acuáticos impulsa la tasa de crecimiento de ciertas especies de cianobacterias, causando que excedan las concentraciones aceptables, fenómeno denominado generalmente Floración Algal Nociva (FAN). La frecuencia y la intensidad de los FAN que ocurren en ecosistemas acuáticos continentales se han incrementado desde las últimas décadas (Zou *et al.*, 2020; Qin *et al.*, 2019; Huang & Zimba, 2019; Paerl, 2018; Álvarez *et al.*, 2017, Carey *et al.*, 2012; Sukenik *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2008). Se han reportado 108 países y territorios con floraciones de *Microcystis* y en el 73% se confirmó la presencia de MC, un conjunto de metabolitos secundarios bioactivos que son producidos por cepas de diferentes especies pertenecientes principalmente a los géneros *Microcystis*, *Dolichospermum* (antes *Anabaena*) *Planktothrix*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Aphazinomenon*, *Anabaenopsis* (Chen *et al.*, 2021; Puddick *et al.*, 2019; Wei *et al.*, 2016; Harke *et al.* 2016; Rawat *et al.*, 2011; Bartram & Chorus 1999 ; Oswald 1988).

Carrillo (2019), con un estudio de metagenómica con los genes ribosomales ARNr 23S y ARNr 16S reportó especies de los géneros *Microcoleus*, *Geitlerinema*, *Roseofilum*, pertenecientes al orden Oscillatorial y especies de los géneros *Nostoc*, *Cylindrospermopsis*, *Phormidium*, perteneciente al orden Nostocales. Cagle *et al* (2021), utilizando el gen 16S ARNr, identificaron especies de los géneros *Synechococcales* y *Nostocales*, todas ellas reportadas con cepas productoras de cianotoxinas en otros estudios (Ravell *et al.*, 2019). Las técnicas de identificación morfológica y molecular, como el análisis de secuencias del ARNr 16S e ITS 16S-23S ARNr o fragmento del gen de la ficocianina no han sido útiles

para discriminar cepas de cianobacterias toxigénicas y no toxigénicas (Feist & Lance 2021; Sidelev, 2019; Pham *et al.* 2015; Li *et al.* 2014; Davis *et al.*, 2009).

Los genes *mcy* codifican para las enzimas productoras de MC y están compuestos por módulos genéticos del polipéptido sintetasa y la policétido sintasa (PKS) (Baxa *et al.*, 2010; Lehman *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2015). Se demostró que la disposición del operón *mcyA-C* se conserva entre las cepas tóxicas de los diferentes géneros. Con base en las secuencias de los genes *mcy* de *Microcystis*, *Anabaena* y *Planktothrix* se diseñó un par de cebadores (Primers *mcyA*-Cd1R 5'AAAAGTGTTTTATTAGCGGCTCAT-3', *mcyA*-Cd1F 5' AAAATTAAGCCGTATCAAA -3'), que codifica para un fragmento que forma parte del dominio de condensación del del gen *mcyA* (Hisbergues *et al.*, 2003; Tillett *et al.*, 2000; Nishizawa *et al.*, 1999). El fragmento amplificado con estos cebadores ha sido utilizado para la detección y diferenciación de cianobacterias tóxicas en ambientes acuáticos en Tri-An Reservoir, un sistema tropical en Vietnam y por su eficiencia y especificidad para la detección de especies productoras de MC, también se ha utilizado PCR multiplex con otros tres pares de cebadores, para la detección de diferentes cianotoxinas en muestras ambientales en Rusia (Pham *et al.*, 2021; Sidelev, 2019; Li *et al.*, 2011).

Las MC son un grupo de heptapéptidos cíclicos, de origen no ribosómico, con más de 240 variantes (Shishido *et al.*, 2019), que son potentes inhibidores de las proteínas fosfatasa eucariotas tipo 1 y 2A (Tillet *et al.*, 2000). Los eventos tóxicos asociados con *Microcystis aeruginosa* a menudo ocurren a través de la ingestión o inhalación de agua que contiene MC (Kubickova, *et al.*, 2019; Schaefer *et al.*, 2020). Desde el primer caso reportado de intoxicación letal en ganado en Australia (Francis 1878), se han registrado múltiples casos, incluso en especies domésticas y de vida silvestre (Codd *et al.*, 1989; Stewart *et al.*, 2008). Los humanos y el ganado que consumen agua contaminada sufren graves problemas de salud por causa de la MC (Park *et al.*, 2021). Las MC causan genotoxicidad dentro del hígado y otros órganos de mamíferos como el riñón, el corazón, los sistemas reproductivos y los pulmones, particularmente después de exposiciones crónicas a dosis bajas (McLellan y Manderville, 2017); en exposiciones mayores puede conducir a la muerte del individuo. Se han reportado informes de muertes humanas causadas por cianotoxinas mediante diálisis renal (Pouria *et al.*, 1998; Azevedo *et al.*, 2002), epidemia de gastroenteritis por agua

potable contaminada (Texeira *et al.*, 1993) y daño hepático por intoxicación de MC en personas que realizaron actividades recreativas acuáticas (Vidal *et al.*, 2017). En las plantas provocan la deformación de la estructura celular (Pappas *et al.*, 2020).

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US EPA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), han declarado al grupo de MC como una amenaza para la salud pública y recomiendan una concentración límite máxima permisible de 1 µg/L de MC para el uso de agua y en agua para consumo humano (Pham y Utsumi, 2018; D'Anglada y Strong, 2015; Codd *et al.*, 2005 a, b). En México, la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), determinó en un Proyecto para establecer la Norma Oficial Mexicana, PROY-NOM-127-SSA1-2017 (SEGOB, 2017), un límite máximo de MC de 1 µg/L con el objetivo de garantizar la calidad del agua de uso y consumo.

Se ha tomado interés en el estudio de las cianobacterias cianotóxicas, ya que en la región NE de la PY la única fuente de agua es el acuífero kárstico, que se ha visto alterado por la contaminación con nutrientes antropogénicos por el ingreso de aguas residuales y el uso de fertilizantes, debido al cambio de uso del suelo ya que las actividades agrícolas, urbanas y recreativas que se realizan en la PY se intensifican por el aumento de la densidad poblacional. (Smith *et al.*, 2020; Bauer-Gotwein *et al.*, 2011; Kauffer y Villanueva, 2011; Smith, 2003). Los cenotes en las diferentes áreas con cambio de uso de suelo poseen condiciones ambientales favorables para la presencia de cepas productoras de MC o cianobacterias que contienen el Operon *mcy*. La confirmación de la presencia de MC es posible mediante la amplificación del gen *mcyA* y la cuantificación de MC en el agua con la técnica ELISA. Para estudiar la presencia de cianobacterias productoras de MC, se analizaron 14 cenotes en áreas con diferentes usos de suelo, donde mediante la caracterización del agua e indicadores de estado trófico, se verificó la relación entre las condiciones ambientales y la expresión de MC. Este estudio tiene como objetivo (a) relacionar la existencia del gen *mcyA* con la presencia de MC, (b) evaluar si las características de las condiciones ambientales del agua de los cenotes de tres usos del suelo (urbano, agrícola y recreativo) están relacionadas con la existencia de los genes *mcyA* y con la presencia de MC.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1 Área de estudio.

Se seleccionaron ocho cenotes en el estado de Quintana Roo, tres en la zona urbana de la ciudad de Cancún y cinco en una zona turística conocida localmente como “ruta salvaje” en el municipio de Lázaro Cárdenas (Fig. 1). Además, se seleccionaron 6 cenotes en la zona agrícola de los municipios de Panabá y Dzilam, en el estado de Yucatán (Figura 3.1 y Tabla 3.1).

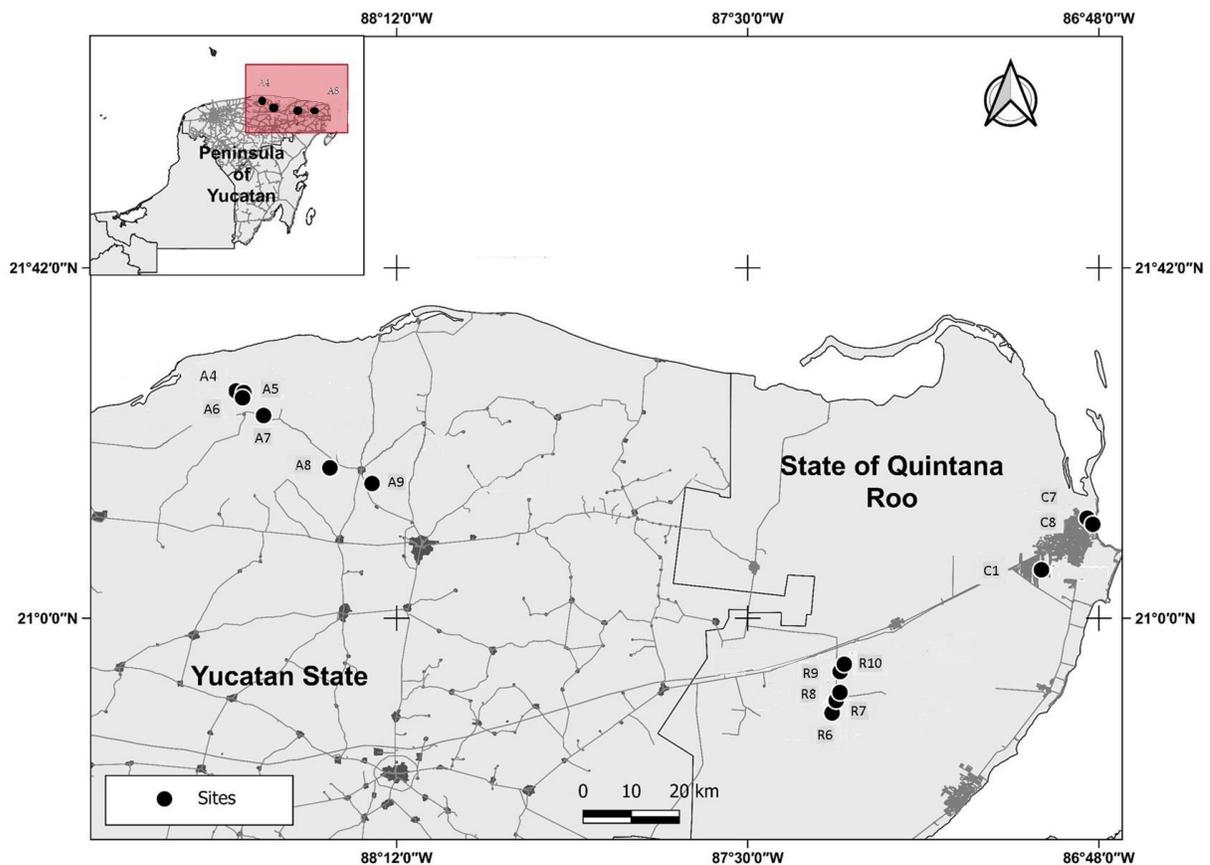


Figura 3.1 Mapa del NE de la PY con identificación de los sitios en círculos negros, tres en la Ciudad de Cancún, cinco en Lázaro Cárdenas ambos de Quintana Roo y seis de Panabá y Dzilam en Yucatán

Tabla.3.1. Sitios investigados. Nombre y localización geográfica para cada uno de los sitios por uso de suelo, presencia y ausencia de FAN y tipo de cuerpo de agua.

Uso de suelo	Codigo sitio	Nombre	Tipo de cuerpo de agua	FAN	Latitud	Longitud
Urbano	C1	Milagros	Sascabera		210548.5N	865451.7W
	C7	Universidad Del Caribe	Estanque	*	211159.4N	864923.6W
	C8	Manatí	Laguna		211115.5N	864843.4W
Agropecuario	A4	Buena Esperanza	Cenote abierto		212714.8N	883112.3W
	A5	Xcaha	Cenote abierto	*	212703.3N	883016.6W
	A6	San Manuel Chablé	Cenote abierto		212625.6N	883025.7W
	A7	San Miguel	Cenote abierto		211801.5N	881958.8W
	A8	San Isidro	Cenote abierto		212417.9N	882754.9W
	A9	San Miguel Panabá	Cenote abierto	*	211608.7N	881456.4W
Recreativo	R6	Palapas	Cenote abierto		204838.6N	871954.4W
	R7	Naktunich	Cenote abierto		205007.9N	871925.5W
	R8	Llanta	Cenote abierto	*	205106.4N	871857.9W
	R9	Abandonado	Cenote abierto	*	205336.2N	871856.3W
	R10	San Carlos	Cenote abierto		205429.1N	871826.8W

3.3.2 Parámetros Físicoquímicos

Los parámetros físicoquímicos de temperatura (°C), pH, conductividad eléctrica (CE en $\mu\text{S}/\text{cm}$), Sólidos disueltos totales (TSDmg/L) y Oxígeno disuelto (ODmg/L), se midieron *in situ* utilizando una sonda multiparamétrica Hach HQd portátil.

3.3.3 Nutrientes, análisis hidroquímicos y cuantificación de clorofila-a

Las muestras de agua fueron colectadas manualmente en recipientes de HDPE, previamente enjuagados con detergente libre de fosfatos. Las muestras de agua se filtraron *in situ* con una membrana de nitrocelulosa de 0.22 μm (Whatman, 7184-002), los filtrados se recogieron en tubos de 50 ml, se transportaron a 4°C y se almacenaron inmediatamente

en laboratorio a -20°C para análisis posteriores. Los análisis de nutrientes se realizaron utilizando métodos colorimétricos con un espectrofotómetro UV-Vis (Eppendorf BioSpectrometer). Los nitratos y nitritos se cuantificaron siguiendo el método reportado en Strickland & Parsons Handbook (1972), el amonio con el método de salicilato-hipoclorito (Bower & Holm-Hansen 1980) y los fosfatos con el procedimiento EPA 365.3 (US EPA Method 365.3 original issue 1978). Los aniones nitratos, nitritos, sulfatos, cloruro (NO_3^- , NO_2^- , SO_4^{2-} y Cl^-) y cationes (Na^+ , Mg^{2+} , K^+ y Ca^{2+}) se cuantificaron por cromatografía iónica utilizando un Ion Chromatograph 822 IC (Metrohm), con un límite de detección de 0,1 mg/l. La alcalinidad total se midió por titulación ácida (NMX-AA-036-SCFI-2001 y Método 310.1 Alcalinidad Titrimétrica). La concentración de clorofila a se calculó con base en el método de Lorenzen (1967). El diagrama de Piper se obtuvo con el programa Qualigraf-Novo software package, (<http://www3.funceme.br/qualigraf/mi/midia/show/3>).

3.3.4 Detección y cuantificación de microcistina

Se rompieron las microalgas de 30 ml de las muestras de agua del cenote por congelación-descongelación, seguido de una centrifugación a 2500 rpm durante 10 minutos. Se utilizó un inmunoabsorbente, un procedimiento con inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA, Microcystins Tube Kit, Enrofins, Abraxis, Warminster, PA, EE.UU.) para detectar y cuantificar MC/nodularina siguiendo las instrucciones del fabricante. El límite de detección fue de 0,09 ppb (ng/L) basado en Microcystina-LR.

3.3.5 Concentración del fitoplancton

Se concentraron 100 L de agua utilizando el muestreador de microplancton Wisconsin (poro 53 μm), para obtener un volumen final de 1 L. Las muestras de agua se transportaron al laboratorio a -4°C y se filtraron con un filtro de nitrocelulosa Micropore® de 0.45 μm (Whatman®, Springfield Mill, PA, USA). Las muestras filtradas se almacenaron a -20°C .

3.3.6 Extracción del ADN

Para la extracción de ADN se utilizó el DNEasy, Plant Mini Kit (QIAGEN® Hilden, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los ácidos nucleicos se eluyeron en 50 μL y se almacenaron a -20°C .

3.3.7 Amplificación por PCR y clonación del gen *mcyA*

Se utilizaron los cebadores *mcyA*-cdF1 5' AAA-ATT-AAA-AGC-CGT-ATC-AAA 3' y *mcyA* cdR1 5' AAA-AGT-GTT-TTA-TTA-GCG-GCT-CAT 3', que amplifican un fragmento de ~300 pares de bases (pb) del gen *mcyA* de la región del dominio de condensación NRPS (Hisbergues *et al.*, 2003). Las amplificaciones por PCR se realizaron utilizando el Applied Biosystem® Model Verti de 96 pocillos. La mezcla de reacción consistió en un volumen final de 25 µl que contenía 5 µl de solución buffer 1X Gotaq® Green Master Mix, 1 µl de dNTPs 200 µM, 0,5 µl de cada cebador 20 µM, 0,2 µl de ADN polimerasa Gotaq® (Promega, Madison, Wisconsin, EE. UU.) (1X). Se utilizaron como moldes alícuotas de 1µl de ADN diluido 1:10. Las condiciones del ciclo de PCR fueron las siguientes: 95 °C durante 3 minutos, seguido de 40 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 53 °C durante 30 segundos y 60 segundos a 72 °C, con una extensión final de 10 minutos a 72 °C.

Los controles negativos se prepararon usando agua libre de nucleasas como templado. Los productos amplificados se visualizaron en geles de agarosa al 1% con bromuro de etidio (0,2 µg/ml) bajo luz ultravioleta. Los productos de PCR del tamaño esperado se ligaron en el vector de clonación PGEM-T Easy (PROMEGA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos ligados se utilizaron para transformar células de *Escherichia coli* T-10 mediante choque térmico (Sambrook y Russel, 2001). Se seleccionaron siete plásmidos recombinantes con fragmentos de tamaño esperado para la secuenciación unidireccional utilizando cebadores M13F, en Macrogen, Seúl, Corea del Sur. Para la prueba de control de inhibición de PCR se utilizó un plásmido previamente secuenciado que portaba un fragmento del gen 23S rDNA. La amplificación del gen 23S rARN se llevó a cabo como lo reportó Sherwood (2007).

3.3.8 Análisis de secuencias

Las secuencias se editaron utilizando el software gratuito Finch-TV (<https://digitalworldbiology.com/FinchTV>) para eliminar las secuencias de los vectores. Las 23 secuencias del fragmento *mcyA* obtenidas se analizaron en el programa informático BLASTn para determinar el porcentaje de similitud de cada fragmento aislado de *mcyA* con las secuencias de *mcyA* disponibles en la base de datos de la National Center for Biotechnology Information NCBI del National Institutes of Health (NIH)

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). En este estudio se obtuvieron un total de 23 secuencias del fragmento del gen *mcyA* y se depositaron las secuencias en el GenBank con los siguientes números de acceso. GenBank con los siguientes números de acceso de secuencias: ON156727, ON156728, ON156729, ON156730, ON156731, ON156732, ON156733, ON156734, ON156735, ON156736, ON156737, ON156738, ON156739, ON156740, ON156741, ON156742, ON156743, ON156744, ON156745, ON156746, ON156747, ON156748 y ON156749.

La matriz para el análisis filogenético se construyó con secuencias de nucleótidos (nt) de las 23 muestras aisladas de agua de este estudio y 24 secuencias disponibles en GenBank, que se seleccionaron en función del primer resultado después de la búsqueda BLASTn. Se reconstruyó el árbol filogenético de consenso utilizando el software gratuito Mega 11, soportado en el método Neighbor-Joining. El árbol de consenso de Bootstrap se infirió a partir de 1000 repeticiones y los clados con valores por debajo del 50 % en el árbol de consenso fueron colapsados. Hubo un total de 209 posiciones en el conjunto de datos final. Se eliminaron todas las posiciones de las 47 secuencias que contenían gaps y datos faltantes (opción de eliminación completa). El árbol utilizó como grupo Raíz el gen *mcyA* de Nostoc de *Microcystis aeruginosa* (Accession number KC699835).

La estadística descriptiva se realizó con los programas de software Minitab19 y SPC para Excel. Se realizó la prueba de Spearman con todos los factores y la prueba de normalidad con el estadístico Anderson-Darling (A-D). Se decidió utilizar las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis (K-W) y Mann-Whitney (M-W), para distinguir las diferencias significativas entre áreas urbanas, agrícolas y recreativas. Se utilizó el análisis de redundancia (RDA) para explicar directamente la variación en las concentraciones de MC (variables de respuesta) y las variables de parámetros fisicoquímicos y de nutrientes (variables explicativas). Los valores de los parámetros fisicoquímicos y de nutrientes se transformaron utilizando la función logarítmica, con una constante arbitraria adicional de 0,001 para eliminar los ceros antes de la transformación. El procedimiento de análisis RDA se realizó en R.4.1.2. Se utilizaron modelos aditivos generalizados (GAM) para describir las relaciones no lineales de la concentración de MC y los parámetros fisicoquímicos y de nutrientes y parámetros fisicoquímicos Chl-a (mg/m^3), T ($^{\circ}\text{C}$), EC ($\mu\text{S/cm}$), DO (mg/L), pH, N-NH₄ (mg/L), N-NO₂ (mg/L), N-NO₃ (mg/L), P-PO₄³⁻ (mg/L), and SiO₂ (mg/L). Los procedimientos GAM se

utilizaron con el paquete "mgcv" en R.4.1.2. Los grados de libertad (edf) se usaron para determinar la cantidad de suavizado para cada parámetro; cuanto más cerca esté el edf de 1, mayor será la linealidad de la curva. $p < 0.05$ indicó un efecto significativo de las variables sobre las MC. Antes del ajuste no lineal basado en el modelo GAM, los valores de los parámetros fisicoquímicos y de nutrientes se transformaron logarítmicamente con una constante arbitraria adicional de 0.001 para eliminar los ceros antes de la transformación.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Variables fisicoquímicas

Las variables fisicoquímicas junto con las concentraciones de Chl-a y MC obtenidas por sitio se presentan en la Tabla 2.1. Para comparar, todas las variables se agruparon por área (urbana, agrícola y recreativa) y los valores promedio (Tabla 2.1) se usaron para determinar las diferencias de concentración de mayor a menor dentro de cada área. Para el valor promedio de pH se observó diferencia entre las zonas recreativas, urbanas y agrícolas; para EC, la diferencia fue áreas urbanas, agrícolas y recreativas; para DO, la diferencia fue áreas recreativas, agrícolas y urbanas (Tabla 2.1). De todos los parámetros promedio analizados, la CE mostró una diferencia significativa entre grupos (áreas urbanas, agrícolas y recreativas), ya que el análisis de pruebas por pares-P (Perm) confirmaron que los sitios recreativos eran diferentes de los sitios agrícolas (EC A 6= R $p = 0.0019$) y que los sitios urbanos eran diferentes a los recreativos (EC C 6= R $p = 0.0181$).

3.3.2 Hidroquímica

En el diagram de Piper se distinguieron tres tipos de agua con características iónicas diferenciales, la primera del tipo bicarbonatada de calcio y magnesio (Ca^{2+} , Mg^{2+} , HCO_3^-) constituyendo el agua subterránea de los cenotes recreativos R6 a R10. La segunda es agua clorurada de magnesio y calcio una mezcla de Cl^- , Ca^{2+} y Mg^{2+} . tipo de agua obtenida de cuatro sitios agrícolas (A4, A5, A6 y A8); y por último al agua con cloruro de Sodio (Na^+ Cl^-) presente en dos sitios agrícolas (A7 y A9) y tres sitios urbanos (C1, C7 y C8) (Figura 2.4). La composición iónica (aniones Cl^- y SO_4^{2-} y cationes Mg^{2+} , Na^+ y K^+) presentó diferencias significativas mediante la prueba de Mann-Whitney ($p < 0.05$) (Figura 2.4).

3.3.3 Nutrientes

En el 64.3% (9/14) de los sitios, la concentración de N-NO₂ estaba por debajo del límite de detección (LoD) (Tabla 3.2). El rango de concentración de N-NO₃⁻ fue de 0.474 a 18.3 mg/L, donde el valor más bajo se detectó en el sitio R10 (área recreativa) y el más alto en el sitio A7 (sitio agrícola). En el 21.4% (3/14), la concentración de N-NO₃⁻ estaba por debajo del LoD (Tabla 3.2). Para P-PO₄³⁻, el rango de concentración fue de 0.38 a 2.5 mg/L, donde el valor más bajo se detectó en el sitio R7 (área recreativa) y el más alto en A6 (área agrícola). En el 57.1 % (8/14) de los sitios, la concentración de P-PO₄³⁻ estaba por debajo del LoD Microbiol. Res. 2023, 14 1175 (Tabla 3.2). El nitrógeno inorgánico disuelto (NID: NH₄⁺ + NO₃⁻ + NO₂⁻) estuvo dentro de un rango de 0.077–18.305 mg DIN/L por sitio muestreado, donde el valor más bajo se detectó en el sitio C1 y el más alto en el sitio A7, un sitio agrícola

Tabla 3.2 Concentraciones de nutrientes para cada uno de los sitios por uso del suelo. (C) urbanos, (A) Agrícolas y (R) Recreativos.

Site	N-NH ₄ mg/L	s.d.	N-NO ₂ mg/L	s.d.	N-NO ₃ mg/L	s.d.	P-PO ₄ ³⁻ mg/L	s.d.	Chl-a mg/m3	MC µg/L
C1	0.028	0.001	0.024	0.00	LoD		LoD		0.27	0.51
C7	0.140	0.002	LoD		LoD		LoD		53.46	>5.00
C8	0.731	0.001	LoD		LoD		LoD		4.81	0.41
A4	LoD		1.587	0.040	4.12	0.220	LoD		n.d.	0.15
A5	0.103	0.001	LoD		0.902	0.096	LoD		112.86	>5.00
A6	1.072	0.017	LoD		0.776	0.027	2.500	0.053	n.d.	0.81
A7	LoD		0.019	0.00	18.3	2.290	1.040	0.010	2.14	2.77
A8	LoD		LoD		0.824	0.096	1.090	0.005	25.06	0.98
A9	0.350	0.033	0.185	0.02	6.41	0.137	LoD		2.94	0.14
R6	0.110	0.008	LoD		0.669	0.041	LoD		43.44	0.34
R7	LoD		0.030	0.00	1.78	0.096	0.38	0.001	2.67	0.28
R8	LoD		LoD		0.377	0.013	0.62	0.016	1.34	0.54
R9	LoD		LoD		0.640	0.027	1.31	0.022	2.06	0.39
R10	LoD		LoD		0.474	0.013	LoD		1.60	0.25

* = Por debajo del límite de detección (LoD); S.E. = error estándar.

Las concentraciones de nutrientes obtenidas de sitios urbanos, agrícolas y recreativos se agruparon para determinar si existían diferencias significativas entre áreas. Los resultados mostraron que N-NO₃⁻ (mg/L) fue el parámetro que mostró diferencias estadísticamente significativas con el análisis PERMANOVA. Se encontraron diferencias entre urbano-agrícola ($p = 0.0125$) y urbano-recreativo ($p = 0.0197$). No se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) para las concentraciones de N-NH₄⁺, N-NO₂⁻ y P-PO₄³⁻ entre los sitios.

3.3.4 Clorofila-a.

La concentración de clorofila-a se encontró en un rango de entre 10.27 a 112.56 $\mu\text{g/L}$. En dos sitios no se detectó la concentración de clorofila-a (A4 y A6). Las mayores concentraciones por uso del suelo fueron 53.46 $\mu\text{g/L}$ para el sitio C7, 112.68 $\mu\text{g/L}$ para el sitio A5 y 43.44 $\mu\text{g/L}$ para el sitio R6. Las concentraciones de clorofila se utilizaron para calcular el índice de estado trófico de Carlson agrupando los cenotes en cuatro niveles tróficos; no se correspondencia con la agrupación por uso del suelo. Los resultados mostraron que los sitios C8, A5, A8 y R6 presentaron un nivel eutrófico, los sitios C7, A4 y A9 nivel mesotrófico, los sitio sitios A7, R7, R8, R9 y R10 nivel oligotrófico y los sitios C1 y A6 nivel ultraoligotróficos (Tabla 3.2).

3.3.5 Microcistinas

Es destacable que para todos los sitios la cuantificación de MC superó el valor del límite de detección de $>0.09 \mu\text{g/L}$, con un rango de 0.14 a $>5 \mu\text{g/L}$ entre los sitios de estudio y la concentración promedio de MC en los sitios agrupados por uso del suelo fue para los urbanos de 0.46 $\mu\text{g/L}$, para los agropecuarios 0.97 $\mu\text{g/L}$ y para los recreativos 0.36 $\mu\text{g/L}$. Sin embargo, los análisis estadísticos no mostraron diferencias significativas ($p = 0.2582$) entre las concentraciones de MC en sitios urbanos, agrícolas o recreativos. La concentración de MC en el 21.4% (3/14) de los sitios estudiados fue $>1.0 \mu\text{g/L}$ (Tabla 3.2), que es el límite establecido por las normas de calidad del agua para consumo humano (PROY-NOM-127-SSA1-2017). Estos sitios fueron C7 (área urbana) y A5 y A7 (área agrícola) (Tabla 3.2). La concentración más alta de MC de $>5 \mu\text{g/L}$ se detectó en el 14% (2/14) de los sitios, siendo C7 (área urbana) y A5 (área agrícola) (Tabla 3.2).

3.3.6 Microcistina y factores ambientales

Los resultados del análisis de Spearman demostraron que sólo un factor ambiental presenta correlación con las concentraciones de MC. Este factor fue el pH ($\sigma = 0.552$) y con una correlación entre ambas variables (MC y pH) de $p=0.026$ con la tendencia de aumentar las concentraciones de MC al aumentar el valor del pH. Para confirmar el tipo de correlación, se implementó un primer análisis de redundancia (RDA) en la que se seleccionaron variables (Chll-a , N-NO_2^- , P-PO_4^{3-} , HCO_3^- , K^+ y T), ninguna de las cuales presentaron

colinealidad significativa con relación a los sitios o la MC (Figura 3.2). Se hizo un segundo análisis de redundancia (RDA) (Figura 3.3) con el factor pH con relación a los sitios y la MC, presentando colinealidad con significancia estadística $p= 0.05$. Para la interpretación de la correlación entre el pH y la concentración de MC se utilizó el modelo aditivo generalizados (GAM) con el programa R. Los resultados obtenidos con el modelo GAM describieron las relaciones no lineales de las concentraciones de MC con los parámetros fisicoquímicos y de nutrientes. Chl-*a* y el pH tuvieron un efecto significativo sobre las concentraciones de MC ($p < 0.05$). El análisis GAM con la variable Chl-*a* explicó el 58.7% de la desviación en cuanto a las concentraciones de MC (Figura 3.4) (R^2 -ajustado = 0.467), y con la variable pH explicó el 98.5% de la desviación en las concentraciones de MC (R^2 -ajustado = 0.954) (Figura 3.4).

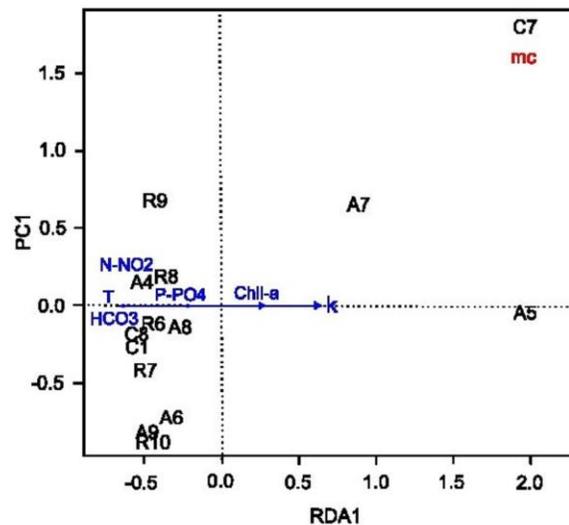


Figura 3.2 Análisis de redundancia (RDA). Los factores no presentan colinealidad con los sitios con respecto a las MC. Gráficamente la ubicación en los sitios negativos sobre la abscisa no define correspondencias. Los valores significativos por encima de $p = 0.05$.

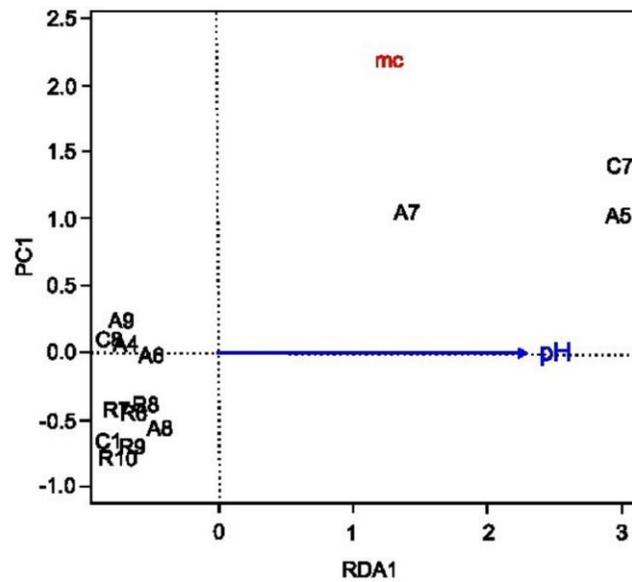


Figura 3.3 RDA (Análisis de redundancia). El factor pH presenta una colinealidad con las concentraciones de pH. Se observó valor de significancia $p < 0.05$ en la tabla de resultados.

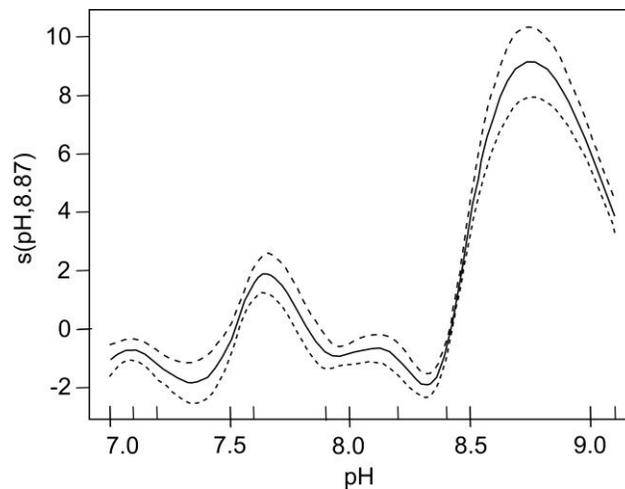


Figura 3.4 Análisis GAM (modelo aditivo generalizado). Expresión gráfica que muestra las relaciones entre la variable de respuesta concentración de MC y la variable explicativa pH. Representa los cambios de pH vs los cambios de concentración de la concentración de MC y delinea una estrecha relación entre ambas variables.

3.3.7 Gen *mcyA*

De las muestras de los 14 sitios, solo en los sitios C7, A5, A7 y R9 se lograron amplificar los fragmentos de ~300pb de *mcyA*. De los cuatro fragmentos se obtuvieron 28 clonas y 23 de ellas se obtuvieron secuencias parciales del gen *mcyA*. Al analizarlos en el GenBank algunas secuencias obtenidas tuvieron identidad por arriba del 95% con fragmentos de secuencias que corresponden a especies formadoras de floraciones algales del género *Microcystis* como la clona de Finlandia (Accesión AJ515452) con identidad del 99% con las clonas A y 5-2, A5-7 y A7-7 (Tabla 3.3) y las clonas obtenidas R9-1 y R9-7 en el estudio tuvieron identidad por arriba del 87% con fragmentos del gen *mcyA* de cianobacterias no cultivadas de Florida con accesión FJ160469 (Tabla 3.3). Los fragmentos obtenidos de todos los cenotes se correspondieron tanto con cianobacterias no cultivadas como con el género *Microcystis* en identidades por arriba de 95% a excepción de una de los sitios C7 (Tabla 3.3)

Tabla 3.3 Análisis de secuencia del gen *mcyA* que describe el ID de secuencia y los resultados de la búsqueda BLASTn.

Sitio-Clona	Nombre científico	Query Cover	Per. Ident	Acceso
A7-1 ON156737		97%	97%	
A7-2 ON156738				
A7-3 ON156739				
A7-6 ON156740	<i>Microcystis aeruginosa</i> NPLJ-4 peptide synthetase (<i>mcyA</i>) gene, partial cds	97%	99%	JQ771629.1 Brasil
C7-3 ON156741				
C7-5 ON156742				
C7-6 ON156743				
R9-5 ON156746				
R9-6 ON156747				
C7-7 ON156744				
A5-1 ON156727	<i>Microcystis aeruginosa</i> NRERC-214 (<i>mcyA</i>) gene, partial cds	95%	95%	MN872296.1 Corea
A5-2 ON156728		95%		
A7-7 ON156733			99%	
A5-5 ON156730	<i>Microcystis</i> sp. 199 partial <i>mcyA</i> gene	98%		AJ515452.1 Finlandia
A5-4 ON156729				
R9-2 ON156734	<i>Microcystis</i> sp. HUB 5.2.4 partial <i>mcyA</i> gene	95%	99.7%	AJ515451.1 Alemania
R9-3 ON156735				
A5-6 ON156731	Uncultured cyanobacterium clone 01LO-IB7 (<i>mcyA</i>) gene, partial cds	95%	98.6%	EF424325.1 Canadá
R9-1 ON156745	Uncultured cyanobacterium clone 1 (<i>mcyA</i>) gene, partial cds	95%	97.3%	FJ160469. Florida EEUU
R9-7 ON156749				
C7-1 ON156748	Uncultured cyanobacterium clone 4 (<i>mcyA</i>) gene, partial cds	95%	87%	FJ160473.1 Florida EEUU
A5-3 ON156736	Uncultured cyanobacterium clone 6 protein (<i>mcyA</i>) gene, partial cds	98%	93.31	KM270503.1 Canadá
A5-7 ON156732				

3.3.8 Análisis filogenético *mcyA*

El análisis filogenético comparó la probable relación entre las secuencias del gen del fragmento *mcyA* de muestras de agua recolectadas en el PY con relación a las secuencias correspondientes del GeneBank. En la reconstrucción filogenética realizada se observó que las 23 secuencias *mcyA* obtenidas en este estudio se agruparon en un clado principal, con tres subclados (IA, IB e IC). El subclado IA (soporte estadístico de 74%) incluyó ocho secuencias aisladas de dos sitios agrícolas (A5 y A7), junto con una cianobacteria no identificada previamente reportada en Brasil (Figura 3.5). El subclado IB (con un soporte estadístico bajo del 61%) incluyó dos secuencias aisladas de un sitio recreativo (R9), que se agrupó con secuencias de genes de cianobacterias no cultivadas y *Microcystis mcyA*. El subclado IC (sin soporte estadístico) incluyó 12 secuencias obtenidas de sitios urbanos (C7), agrícolas (A7) y recreativos (R9), junto con otras secuencias del gen *mcyA* de cianobacterias no cultivadas aisladas de Canadá, Florida y EEUU. (Figura 3.5). La secuencia ON156748 aislada del sitio urbano C7 fue la única secuencia aislada en este estudio que no pertenecía al Clado I, lo que sugiere que podría ser una secuencia con variaciones del gen *mcyA* (Figura 3.5).

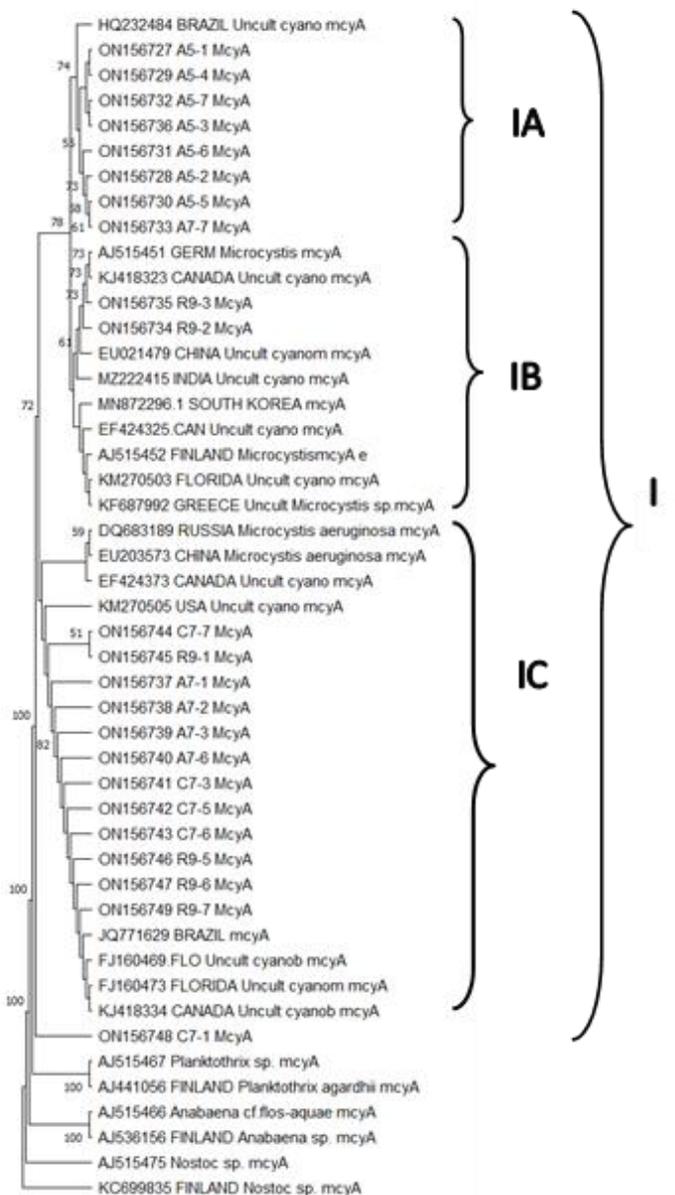


Figura 3.5 Reconstrucción filogenética basada en las relaciones filogenéticas inferidas por la secuencia *mcyA* de 23 secuencias aisladas de muestras de agua en este estudio. El análisis también incluye la secuencia *mcyA* de 24 secuencias de referencia seleccionadas disponibles en la base de datos GenBank. Solo se muestran los valores de arranque por encima del 50 %. Se utilizó como raíz el aislado del gen *mcyA* de *Nostoc mcyA* of (Accession number KC699835). Todos los números de accesoión de GenBank están incluidos en el nombre de cada secuencia.

3.4 DISCUSIÓN

Este estudio proporciona información para comprender cómo la calidad del agua contribuye a la proliferación de cianobacterias productoras de toxinas en áreas con diferentes de uso del suelo del acuífero kárstico de Yucatán. Los acuíferos kársticos presentes en la península de Yucatán tienen pH alcalino, debido en parte a la interacción del agua con el carbonato de calcio contenido en el karst (Smith *et al.*, 2020). En este estudio, los valores de pH más altos, de 8.5 y 9.1 se asociaron con las concentraciones más altas de MC (≥ 5 $\mu\text{g MC/L}$) observadas en el acuífero, independientemente de la ubicación del cuerpo de agua y el uso del suelo. Se ha reportado que la intensidad de la luz y el pH son los principales factores que pueden influir en la producción de toxinas sintetizadas por las cianobacterias, en este sentido, los resultados obtenidos aquí son similares a un estudio que reportó que la producción de MC aumentó dramáticamente bajo diferentes valores de pH en cultivo *in vitro* de algas verdeazuladas, asociadas con un valor de pH de 7.0 y un valor de pH de 9.2 con la producción de MC (Song, *et al.*, 1998) Además, se ha observado un crecimiento máximo de *Microcystis aeruginosa* productora de MC a pH 9, (Van der Westhuizen y Eloff, 1983). Por otro lado, un pH ácido puede reducir la tasa de crecimiento de las cianobacterias (Zepernick *et al.*, 2021; Radhakrishnan, *et al.*, 2009). Dado que el pH es una variable importante que puede causar una respuesta en la capacidad de crecimiento de *Microcystis* (Yang *et al.*, 2018), se puede sugerir que el pH alcalino en el acuífero de la península de Yucatán pueda proporcionar las condiciones ideales para el crecimiento de cianobacterias productoras de toxinas (Yang, *et al.*, 2018) y se deben realizar estudios más profundos implementados para monitorear la presencia y concentraciones de MC.

La entrada de nitrógeno y fósforo al medio acuático es una de las principales causas que favorecen el crecimiento de cianobacterias y la producción de MC en formaciones de floraciones de algas nocivas (Melaram y López-Dueñas, 2021; Foskuhl, 2019; Lu, *et al.*, 2019; Kramer *et al.*, 2018; Gobler, *et al.*, 2016; Paerl y Otten, 2013). La línea base para la concentración de N-NO_3^- en el acuífero kárstico de la península de Yucatán se reportó en áreas naturales a una concentración de 1 mg/L N-NO_3^- (Smith *et al.*, 2020) y para los sistemas lóticos de EE. UU. a ~ 1 mg/L (Dodds y Smith, 2016). Concentraciones superiores a 1 mg/L de N-NO_3^- indican actividad humana (Dubrovsky, *et al.*, 2010), y concentraciones de hasta 3 mg/L N-NO_3^- generalmente indican contaminación del cuerpo de agua (Madison

y Brunett, 1985). Se ha reportado que las especies de cianobacterias muestran un aumento máximo en el crecimiento a 3.5 mg/L de N-NO₃⁻ (Tan *et al.*, 2019; Yadav *et al.*, 2021) y se ha determinado el valor de 0.530 mg/L de N-NO₃⁻ como constantes de semisaturación (Ks) para *M. Aeruginosa*, cuyo crecimiento aumenta con concentraciones de hasta 10 mg/L N-NO₃⁻ (Kim y Kim, 2017; Baldía *et al.*, 2007). LA EPA determina los límites para la concentración (Maximum Contaminant Level, MCL) de 10 mg/L de N-NO₃⁻; así mismo, la NOM PROY-NOM-127-SSA1-2017 (SEGOB, 2017) describe el límite permisible de 11 mg/L de N-NO₃⁻. Ambas normativas permiten concentraciones de estos nutrientes las cuales no impiden el establecimiento de poblaciones de cianobacterias (Erisman, *et al.*, 2013) y la eventual aparición de FAN. Los sitios agrícolas y recreativos 71% (10) de este trabajo presentan ambientes donde el crecimiento de cianobacterias y la producción de MC fueron posibles con concentraciones de N-NO₃⁻ por debajo del máximo permitido por las normas nacionales e internacionales (11 mg/L) y dentro del rango de crecimiento (0.377-6.41 mg/L de N-NO₃⁻ de cianobacterias específicamente *Microcystis aeruginosa*.

En este estudio, los sitios urbanos contenían amonio como principal nutriente, lo que podría explicarse como resultado de la degradación anaeróbica de la materia orgánica y artificialmente como resultado de la disposición de desechos orgánicos (Robertson *et al.*, 2012; Böhlke *et al.*, 2006). También se observó la correlación negativa (Spearman) entre el principal compuesto nitrogenado, el amonio y el oxígeno disuelto en bajas concentraciones (N-NH₄⁺ y DO, Rh= 0.782 p= 0.001). Las cianobacterias tienen mecanismos para utilizar fuentes de nitrógeno como N₂, nitratos, nitritos, urea y amonio. Esta última es la fuente de N preferida utilizada por *Microcystis* (Flores y Herrero 2005). Aunque el nitrato se usa de manera más eficiente que el amonio, este último puede ser usado como una alternativa por las cianobacterias, especialmente *M. aeruginosa* (Kim y Kim, 2017). La causa probable de la presencia de N-NH₄⁺ detectado solo en sitios urbanos podría ser el resultado de la entrada de aguas residuales y la entrada de grandes cantidades de materia orgánica, cuyo consumo por bacterias agota el O₂ y no permite la nitrificación del amonio entrante (Chen *et al.*, 2017, Groenweg *et al.*, 1994). Sin embargo, los valores de N-NO₃⁻ de todos los sitios analizados en este estudio no tuvieron correlación con las concentraciones de MC.

La presencia de fertilizantes ha sido reportada en aguas subterráneas de áreas agrícolas en el acuífero kárstico de la península de Yucatán (Smith *et al.*, 2020). Los resultados de

este estudio mostraron que las concentraciones más altas de N-NO_3^- , N-NH_4^+ y P-PO_4^{3-} se detectaron en muestras de agua recolectadas en el área agrícola. Esto último puede explicarse como resultado del uso extensivo de fertilizantes (González-Herrera *et al.*, 2014; Leal-Bautista *et al.*, 2013; Cirerol, 2011). Además, la correlación entre N-NH_4^+ y K^+ (Rho 0.577 y $p = 0.031$), ha sido relacionada con el uso de fertilizantes con alto contenido de K^+ en sus formulaciones en el área agrícola (Smith *et al.*, 2020). En los sitios no urbanos, los agrícolas obtuvieron mayores concentraciones de fósforo y potasio que la zona recreativa.

En condiciones de limitación de fósforo en concentraciones inferiores a 0.01 mg/L de P-PO_4^{3-} , la fosfatasa alcalina puede promover una rápida entrada de este nutriente en las células de las microalgas, por lo tanto, a concentraciones inferiores al límite de detección de 0.05 mg P-PO_4^{3-} /L, las colonias de *Microcystis* pueden prosperar (Loewald *et al.*, 2020; Prentice *et al.*, 2019). En el sistema kárstico tiene lugar un proceso químico natural debido a la saturación de carbonatos en el agua, provocando la coprecipitación del fósforo con el calcio (Hernández-Terrones *et al.*, 2015; Cervantes-Martínez *et al.*, 2002; Schmitter-Soto *et al.*, 2002a; Alcocer *et al.*, 1998). En los sitios donde se detectaron concentraciones altas de MC ($\geq 5 \mu\text{g MC/L}$), el fósforo no superó el límite mínimo de detección de $0.05 \mu\text{g PO}_4^{3-}/\text{L}$, sin embargo, se confirmó la presencia de *Microcystis* con base en el análisis de secuencia de los fragmentos del gen *mcyA*.

En seis lagos centrales de Florida, las concentraciones de toxinas mostraron que las MC ($0.1\text{--}3.6 \mu\text{g/L}$ de MC) estaban presentes durante los 12 meses de 2004; se observaron múltiples eventos de floraciones algales por lago; las concentraciones de MC en las FAN oscilaron entre 5 y 7,500 $\mu\text{g/L}$ (Williams *et al.*, 2007). Uno de estos lagos, el lago Okeechobee, fue objeto de un intenso aumento de FAN en 2016, cuando se declaró un estado de emergencia debido a la toxicidad del agua (Foskuhl, 2019). Análisis moleculares posteriores asociaron al género *Microcystis* como el responsable de la toxicidad en el lago (Foskuhl, 2019). En Lake Manatee en Florida, utilizado principalmente para actividades recreativas, se detectaron MC en concentraciones de $0.35 \mu\text{g/L}$ (Melaram y Lopez-Dueñas, 2021). En el NE de las aguas subterráneas del PY, Cagle *et al.*, (2021) encontraron MC en todos los sitios donde tomaron muestras, en concentraciones $<0.18 \mu\text{g/L}$. En este estudio la concentración de MC de todos los sitios investigados tiene un promedio de $1.2 \mu\text{g/L}$, casi

siete veces más que las concentraciones reportadas previamente por Cagle *et al.*, (2021) en la misma región.

Con relación a la ausencia de la amplificación del fragmento *mcyA*, como corroboración de la presencia de MC en todos los sitios, podría deberse al uso de un solo juego de cebadores (elegidos por amplificar el fragmentos de *mcyA* en varios géneros), ya que la especificidad de los cebadores utilizados para amplificar el fragmento del gen *mcyA* de *Microcystis* reduce la posibilidad de comprobar la existencia de *mcyA* de otros géneros productores de MC (Li *et al.*, 2020; Foskuhl, 2018; Williams *et al.*, 2007). Los análisis moleculares de Cagle en 2021, para muestreos en la misma región revelaron la presencia de especies de los géneros *Synechococcales* y *Nostocales*, dos géneros que tienen especies que codifican genes para la síntesis de MC (Panou *et al.*, 208; Park *et al.*, 2018). La identificación por primera vez en la península de Yucatán de especies productoras de MC utilizando el gen *mcyA*, con un porcentaje de identidad superior al 97% con *Microcystis spp.* en el 74% de las clonas secuenciados presentes en los tres sitios con mayor concentración de MC (C7, A5 y A7), es similar a los resultados que mostraron la presencia de *Microcystis spp.* y altas concentraciones de MC en los lagos de Florida (Melaram y Lopez-Dueñas 2021; Foskuhl, 2019; Williams *et al.*, 2007). El 26% restante de las clonas mostró altos porcentajes de identidad con cianobacterias no identificadas y en el árbol filogenético se ubicaron cerca de clonas con alta identidad a *Microcystis spp.* Este resultado sugiere que el gen *mcyA* estaba presente en los clones secuenciados. Sin embargo, en el 71 % de los sitios muestreados, el fragmento esperado no se amplificó. Líneas arriba se discutió que este hecho podría deberse a la ausencia del objetivo de los cebadores en las muestras, la no especificidad de los genes objetivo, o por la diferencia fisiológica o por la diferencia filogenética de los grupos. *Microcystis* y otras especies que codificaron el gen *mcyA* presentan eventos de recombinación que ocurren dentro de las secuencias del dominio N-metiltransferasa (NMT) y reordenan el genoma, dando lugar a nuevas variantes del grupo *mcy* que impiden la detección por PCR (Tooming-Klunderud, *et al.*, 2008). Para el seguimiento posterior del área de estudio y ampliar el espectro de detección de variantes de *mcy* de diferentes organismos productores de MC, se debería requerir la implementación del uso de un conjunto de cebadores de los diferentes genes del grupo *Mcy* (Lee, *et al.*, 2020).

El estudio presenta una visión general de la presencia de *Microcystis spp.* con cepas productoras de MC en el ambiente kárstico de la península de Yucatán, los factores y variables que podrían influir en el crecimiento de cianobacterias y la producción de toxinas, así como la diversidad existente del gen *mcy*. También presenta la hipótesis del aumento de la actividad de las cianobacterias de agua dulce, principalmente *Microcystis* como género predominante y fortalece el conocimiento de los indicadores de calidad del agua con relación a la presencia de cianobacterias.

3.5 CONCLUSIÓN

En todos los sitios, en todos los estados tróficos y las concentraciones de nitrógeno y fósforo se comprobó la producción de MC y algunos presentaron concentraciones por encima de los límites mexicanos establecidos en la NOM para agua potable. En al menos un sitio de cada uso del suelo se identificaron secuencias del fragmento investigado del gen *mcyA* relacionadas con el género *Microcystis* y algunas otras secuencias presentes en el Gen Bank que no han sido taxonómicamente identificadas. La alcalinidad del acuífero es un factor que tiene correlación con las concentraciones de MC.

CAPÍTULO IV

4.1 DISCUSIÓN GENERAL

Todos los sitios muestreados en los tres usos del suelo constituyen un mosaico diverso de condiciones ambientales, con resultados en los que las particularidades por área recaen principalmente en los datos hidroquímicos y agrupan a los sitios por tipo de agua, resultado del origen mineral del karst por su ubicación geográfica (Cupul *et al.*, 2021; Bauer-Gottwein, 2011; Fleury *et al.*, 2007; Perry *et al.*, 2002; Velázquez *et al.*, 1995) y no por el uso del suelo. Las diferencias de los nutrientes definen la actividad y las diferencias por el uso del suelo, siendo los recreativos a diferencia de los urbanos y agrícolas los que presentaron menor concentración de nutrientes. La presencia de *Microcystis* en al menos un sitio en cada uso del suelo y la presencia de MC en todos los sitios no hizo diferencia entre las áreas y las peculiaridades metabólicas de *Microcystis* para aprovechar las diferentes fuentes de nitrógeno en compuestos como N₂, nitratos, nitritos, urea y amonio (Flores y Herrero 2005) no limita la colonización en cuerpos de agua eutrofizados. En condiciones de limitación de fósforo florecen las colonias de *Microcystis* gracias a la absorción rápida en las células a través de la fosfatasa alcalina (Prentice, 2019). La naturaleza alcalina es también un factor que facilita la presencia de MC (Song *et al.*, 1998) y el crecimiento de las poblaciones de *Microcystis aeruginosa* (Van der Westhuizen y Eloff, 1983). Los tres factores conforman un ambiente propicio para el crecimiento poblacional de *Microcystis* y la producción de MC en el acuífero de la Península de Yucatán.

4.2 CONCLUSIÓN

El estudio arrojó un procedimiento novedoso para la zona, con la detección de la presencia de *Microcystis* por medio del gen *mcyA* y también las limitaciones del uso de un solo par de primers para reconocer otros productores de MC. Se comprueba el riesgo para la salud de la vida silvestre, el ganado, la agricultura y el hombre de aquellos que hacen uso frecuente del aguadel acuífero. La alcalinidad juega un papel importante en la producción de MC y tanto el nitrógeno como el fósforo tienen concentraciones suficientes por mínimas que estas sean para permitir la formación de poblaciones de *Microcystis*.

4.3 PERSPECTIVAS

La detección del gen *mcyA* en el acuífero kárstico invita a adentrarse en el conocimiento básico de las cianobacterias productoras de MC y otras cianotoxinas, además despierta el interés en conocer las consecuencias actuales de la presencia de esta toxina en la salud pública y en la economía en la PY.

Con el conocimiento del cambio que tienen los cuerpos de agua para uso y consumo del hombre, por la presencia de las cianobacterias tóxicas en la Península de Yucatán y los efectos que tiene sobre la salud y la economía en otros países, el tema adquiere relevancia para las actividades recreativas de la península y el consumo no sólo del agua, sino de los alimentos locales que son producidos con el agua de los cenotes, es útil e importante en el corto plazo abundar más sobre las cianotoxinas en el agua, los animales domésticos comestibles, los productos agrícolas y la población que hace uso del agua de los cenotes.

La presencia de la MC en aguas de cenotes nos hace formular la hipótesis sobre la existencia de daño en las poblaciones consumidoras de agua subterránea por ingesta de bajas concentraciones de MC provocando daños a la salud en el largo plazo que son adjudicadas a otras causas y no se relacionan con la ingesta de MC. La sola posibilidad de la ingesta de MC con el agua subterránea de la península de Yucatán por las poblaciones humanas, silvestres, domésticas y riego se piensa en al menos realizar monitoreos en los consumidores de agua subterránea en sitios con MC como primeros intentos por verificar si la cianotoxina se dispersa en la zona de influencia en los diferentes consumos. Por otro lado, el inventario de microalgas productoras de MC de agua dulce en la zona debe ampliarse a través de estudios espacio-temporales que utilicen diferentes métodos de identificación taxonómica.

BIBLIOGRAFÍA

- Abed, R. M., Dobretsov, S., & Sudesh, K. (2009). Applications of cyanobacteria in biotechnology. *Journal of applied microbiology*, 106(1), 1-12.
- Aboal, M., & Puig, M. Á. (2005). Intracellular and dissolved microcystin in reservoirs of the river Segura basin, Murcia, SE Spain. *Toxicon*, 45(4), 509-518.
- Adams, D. G. (2002). Cyanobacteria in symbiosis with hornworts and liverworts. In *Cyanobacteria in symbiosis* (pp. 117-135). Springer, Dordrecht.
- Aguilar-Duarte, Y., Bautista, F., Mendoza, M. E., Frausto, O., Ihl, T., & Delgado, C. (2016). IVAKY: índice de la vulnerabilidad del acuífero kárstico yucateco a la contaminación. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 15(3), 913-933.
- Aguilera, A., Echenique, R. O., & Hansen, M. (2011). Consideraciones generales de Cyanobacteria: aspectos ecológicos y taxonómicos. Serie: Temas de Salud Ambiental, 5.
- Ahern, C. P., & Staff, I. A. (1994). Symbiosis in cycads: The origin and development of coralloid roots in *Macrozamia communis* (Cycadaceae). *American Journal of Botany*, 81(12), 1559-1570.
- Ahn, C. Y., Oh, H. M., & Park, Y. S. (2011). Evaluation of environmental factors on cyanobacterial bloom in eutrophic reservoir using artificial neural networks 1. *Journal of Phycology*, 47(3), 495-504.
- Ahmed, M., Umali, G. M., Chong, C. K., Rull, M. F., & Garcia, M. C. (2007). Valuing recreational and conservation benefits of coral reefs. The case of Bolinao, Philippines. *Ocean & Coastal Management*, 50(1-2), 103-118.
- Alcocer, J., Lugo, A., Marín, L. E., & Escobar, E. (1998). Hydrochemistry of waters from five cenotes and evaluation of their suitability for drinking-water supplies, northeastern Yucatan, Mexico. *Hydrogeology Journal*, 6(2), 293-301.
- Alcocer, J., Oseguera, L. A., Escobar, E., Peralta, L., & Lugo, A. (2004). Phytoplankton biomass and water chemistry in two high-mountain tropical lakes in Central Mexico. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, 36(3), 342-346.

- Al-Haj, L., Lui, Y. T., Abed, R. M., Gomaa, M. A., & Purton, S. (2016). Cyanobacteria as chassis for industrial biotechnology: progress and prospects. *Life*, 6(4), 42.
- Álvarez-Góngora, C. C., de los Angeles Liceaga-Correa, M., & Herrera-Silveira, J. A. (2012). Variaciones estacionales de la estructura comunitaria del fitoplancton en zonas de descarga de agua subterránea en la costa norte de la Península de Yucatán. *Revista de Biología Tropical*.
- Álvarez, X., Valero, E., Santos, R. M., Varandas, S. G. P., Fernandes, L. S., & Pacheco, F. A. L. (2017). Anthropogenic nutrients and eutrophication in multiple land use watersheds: Best management practices and policies for the protection of water resources. *Land Use Policy*, 69, 1-11.
- Anand, N., Thajuddin, N., & Dadheech, P. K. (2019). Cyanobacterial taxonomy: Morphometry to molecular studies. In *Cyanobacteria* (pp. 43-64). Academic Press.
- Appelo, C. A. J., & Postma, D. (2005). *Groundwater and pollution*. Rotterdam: Balkema.
- Arnison, P. G., Bibb, M. J., Bierbaum, G., Bowers, A. A., Bugni, T. S., Bulaj, G., ... & Van Der Donk, W. A. (2013). Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature. *Natural product reports*, 30(1), 108-160.
- Arzate-Cárdenas, M. A., Olvera-Ramirez, R., & Martinez-Jeronimo, F. (2010). *Microcystis* toxigenic strains in urban lakes: a case of study in Mexico City. *Ecotoxicology*, 19(6), 1157-1165.
- Azevedo, S. M., Carmichael, W. W., Jochimsen, E. M., Rinehart, K. L., Lau, S., Shaw, G. R., & Eaglesham, G. K. (2002). Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru—Brazil. *Toxicology*, 181, 441-446.
- Babica, P., Hilscherová, K., Bártová, K., Bláha, L., & Maršálek, B. (2007). Effects of dissolved microcystins on growth of planktonic photoautotrophs. *Phycologia*, 46(2), 137-142.
- Bácsi, I., Vasas, G., Surányi, G., M-Hamvas, M., Máthé, C., Tóth, E., ... & Borbely, G. (2006). Alteration of cylindrospermopsin production in sulfate-or phosphate-starved cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum*. *FEMS microbiology letters*, 259(2), 303-310.

- Badeenezhad, A., Tabatabaee, H. R., Nikbakht, H. A., Radfard, M., Abbasnia, A., Baghapour, M. A., & Alhamd, M. (2020). Estimation of the groundwater quality index and investigation of the affecting factors their changes in Shiraz drinking groundwater, Iran. *Groundwater for Sustainable Development*, 11, 100435.
- Bagchi S.N., Singh P. (2019) Importance of Cyanobacterial Taxonomy in Biotechnological Applications. In: Satyanarayana T., Johri B., Das S. (eds) *Microbial Diversity in Ecosystem Sustainability and Biotechnological Applications*. Springer, Singapore.
- Baldia, S.F.; Evangelista, A.D.; Aralar, E.V.; Santiago, A. E. (2007) Nitrogen and phosphorus utilization in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* isolated from Laguna de Bay, Philippines. *Journal of Applied Phycology*, 19(6), 607-613. <https://doi.org/10.1007/s10811-007-9209-0>
- Bartram, J., & Chorus, I. (1999). Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring, and management. CRC Press.
- Bauer-Gottwein, P., Gondwe, B. R., Charvet, G., Marín, L. E., Rebolledo-Vieyra, M., & Merediz-Alonso, G. (2011). the Yucatán Peninsula karst aquifer, Mexico. *Hydrogeology Journal*, 19(3), 507-524.
- Baxa, D. V., Kurobe, T., Ger, K. A., Lehman, P. W., & Teh, S. J. (2010). Estimating the abundance of toxic *Microcystis* in the San Francisco Estuary using quantitative real-time PCR. *Harmful algae*, 9(3), 342-349.
- Beattie, K. A., Ressler, J., Wiegand, C., Krause, E., Codd, G. A., Steinberg, C. E., & Pflugmacher, S. (2003). Comparative effects and metabolism of two microcystins and nodularin in the brine shrimp *Artemia salina*. *Aquatic toxicology*, 62(3), 219-226.
- Beaulieu, J. J., DelSontro, T., & Downing, J. A. (2019). Eutrophication will increase methane emissions from lakes and impoundments during the 21st century. *Nature communications*, 10(1), 1-5.
- Beddows, P. A., Smart, P. L., Whitaker, F. F., & Smith, S. L. (2007). Decoupled fresh–saline groundwater circulation of a coastal carbonate aquifer: spatial patterns of temperature and specific electrical conductivity. *Journal of Hydrology*, 346(1-2), 18-32.

- Beiras, R. (2018). Marine pollution: sources, fate and effects of pollutants in coastal ecosystems. Elsevier.
- Beretta-Blanco, A., & Carrasco-Letelier, L. (2021). Relevant factors in the eutrophication of the Uruguay River and the Río Negro. *Science of The Total Environment*, 761, 143299.
- Berry, J. P., Gantar, M., Perez, M. H., Berry, G., & Noriega, F. G. (2008). Cyanobacterial toxins as allelochemicals with potential applications as algaecides, herbicides, and insecticides. *Marine drugs*, 6(2), 117-146.
- Berry, J. P., & Lind, O. (2010). First evidence of “paralytic shellfish toxins” and cylindrospermopsin in a Mexican freshwater system, Lago Catemaco, and apparent bioaccumulation of the toxins in “tegogolo” snails (*Pomacea patula catemacensis*). *Toxicon*, 55(5), 930-938.
- Beversdorf, L. J., Chaston, S. D., Miller, T. R., & McMahon, K. D. (2015). Microcystin *mcyA* and *mcyE* gene abundances are not appropriate indicators of microcystin concentrations in lakes. *PLoS one*, 10(5), e0125353.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7 1513-1523.
- Bogarín, C. L., & Artavia, D. C. (2010). Tratamiento de residual vacuno utilizando microalgas, la lenteja de agua *Lemna aequinoctiales* y un humedal subsuperficial en Costa Rica. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algar*, 1(2).
- Böhlke, J. K.; Smith, R. L.; Miller, D. N., (2006) Ammonium transport and reaction in contaminated groundwater: Application of isotope tracers and isotope fractionation studies. *Water resources research*, 2006, 42(5). <https://doi.org/10.1029/2005WR004349>
- Börner, T., & Dittmann, E. (2005). Molecular biology of cyanobacterial toxins. In *Harmful cyanobacteria* (pp. 25-40). Springer, Dordrecht.
- Botes, D.P. Kruger H. and Viljoen C.C. (1982). Isolation and characterization of four toxins from the blue-green algae *Microcystis aeruginosa*. *Toxicon* 20, p.945
- Bourelly, P. (1979). Les Cyanophycees, Algues Ou Bacteries. *Reveu de Algicidie*

- Bourke, A.T.C., Hawes, R.N. (1983) Outbreak of hepato-enteritis (the Palm Island mystery disease) possibly caused by algal intoxication. *Toxicon Supplement* 3, 45–48. B., Neilson, A., Stallman, N.D.,
- Bower CE, T. Holm-Hansen, (1980) Un método de salicilato-hipoclorito para determinar el amoníaco en el agua de mar. Poder. *J. Fish. Aquat. Sci.*, 37 (1980), págs. 794 – 798
- Boyer, G. L. (2008). Cyanobacterial toxins in New York and the lower Great Lakes ecosystems. In: Hudnell H.K. (eds), Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs, *Advances in Experimental Medicine, and Biology*, vol 619, pp 153-165.
- Braga Jr, B. P. (2000). The management of urban water conflicts in the metropolitan region of Sao Paulo. *Water International*, 25(2), 208-213.
- Bullerjahn, G. S., Mckay, R. M., Davis, T. W., Baker, D. B., Boyer, G. L., D'anglada, L. V., et al. (2016). Global solutions to regional problems: collecting global expertise to address the problem of harmful cyanobacterial blooms. A Lake Erie case study. *Harmful Algae* 54, 223–238. doi: 10.1016/j.hal.2016.01.003
- Buskey, E. J. (2008). How does eutrophication affect the role of grazers in harmful algal bloom dynamics? *Harmful Algae*, 8(1), 152-157.
- Cagle, S. E., Roelke, D. L., Hernández-Zepeda, C., Rosiles-González, G., Carrillo-Jovel, V. H., Ortega-Camacho, D., & Cejudo, E. (2021). Cyanobacteria and nitrates in karstic systems of Yucatan (Mexico) and Texas (USA). *Aquatic Sciences*, 83(4), 1-12.
- Cantoral Uriza, E. A., Asencio Martínez, A. D., & Aboal Sanjurjo, M. (2017). Cianotoxinas: efectos ambientales y sanitarios. Medidas de prevención. *Hidrobiológica*, 27(2), 241-251.
- Capitán, G. C., Silvestre, M. G. V., De los Santos Castillo, J. E., & Vel, L. H. (2020). Cultivo de *Pomacea patula catemacensis* como estrategia de producción piscícola para los productores acuícolas de Catemaco, Veracruz. *Revista Biológico Agropecuaria Tuxpan*, 8(2), 43-51.
- Capone, D. G., Burns, J. A., Montoya, J. P., Subramaniam, A., Mahaffey, C., Gunderson, T., ... & Carpenter, E. J. (2005). Nitrogen fixation by *Trichodesmium spp.*: An important source of

new nitrogen to the tropical and subtropical North Atlantic Ocean. *Global Biogeochemical Cycles*, 19(2).

Carbis, C. R., Rawlin, G. T., Mitchell, G. F., Anderson, J. W., & McCauley, I. (1996). The histopathology of carp, *Cyprinus carpio* L., exposed to microcystins by gavage, immersion, and intraperitoneal administration. *Journal of Fish Diseases*, 19(3), 199-207.

Cardemil L., Handford M., & Meisel L., (2007). La Célula Vegetal. En: F.A. Squeo & L. Cardemil, eds., Fisiología Vegetal, Ediciones Universidad de La Serena. Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile 1: 1-46

Carey, C. C., Ibelings, B. W., Hoffmann, E. P., Hamilton, D. P., & Brookes, J. D. (2012). Eco-physiological adaptations that favour freshwater cyanobacteria in a changing climate. *Water research*, 46(5), 1394-1407.

Carmichael, W. W. (1992). Cyanobacteria secondary metabolites—the cyanotoxins. *Journal of applied bacteriology*, 72(6), 445-459.

Carrillo V. H., (2019). Caracterización de la estructura de la comunidad de microorganismos en cuerpos de agua dulce del norte de la Península de Yucatán. Tesis Maestría, Centro de Investigación Científica de Yucatán., México. pp. 51-79.

Carrión-Mero, P., Montalván, F. J., Morante-Carballo, F., Loo-Flores de Valgas, C., Apolo-Masache, B., & Heredia, J. (2021). Flow and Transport Numerical Model of a Coastal Aquifer Based on the Hydraulic Importance of a Dyke and Its Impact on Water Quality: Manglaralto—Ecuador. *Water*, 13(4), 443.

Casamatta, D., Stanić, D., Gantar, M., & Richardson, L. L. (2012). Characterization of *Roseofilum reptotaenium* (Oscillatoriales, Cyanobacteria) gen. et sp. nov. isolated from Caribbean black band disease. *Phycologia*, 51(5), 489-499.

Castenholz, R., & Waterbury, J. B. (1989). Introduction to Cyanobacteria. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 3, 1710-1728.

- Castenholz, R. W., Wilmotte, A., Herdman, M., Rippka, R., Waterbury, J. B., Iteman, I., & Hoffmann, L. (2001). Phylum BX. Cyanobacteria. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*, 473–599.
- Cejudo E.E., Ortega D.C. (2018), Manual de metodologías para análisis de agua, Laboratorio de Físico-químicos y Bacteriología, Unidad de Ciencias del Agua.
- Cervantes-Martínez, A., Elías-Gutiérrez, M., & Suárez-Morales, E. (2002). Limnological and morphometrical data of eight karstic systems 'scenotes' of the Yucatan Peninsula, Mexico, during the dry season (February–May, 2001). *Hydrobiologia*, 482(1), 167-177.
- Chatziefthimiou, A. D., Metcalf, J. S., Glover, W. B., Banack, S. A., Dargham, S. R., & Richer, R. A. (2016). Cyanobacteria and cyanotoxins are present in drinking water impoundments and groundwater wells in desert environments. *Toxicon*, 114
- Chen, J., Xie, P., Guo, L., Zheng, L., & Ni, L. (2005). Tissue distributions and seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins-LR and-RR in a freshwater snail (*Bellamya aeruginosa*) from a large shallow, eutrophic lake of the subtropical China. *Environmental pollution*, 134(3), 423-430.
- Chen, J., Zhang, D., Xie, P., Wang, Q., & Ma, Z. (2009). Simultaneous determination of microcystin contaminations in various vertebrates (fish, turtle, duck and water bird) from a large eutrophic Chinese lake, Lake Taihu, with toxic *Microcystis* blooms. *Science of the Total Environment*, 407(10), 3317-3322.
- Chen, K., Allen, J., & Lu, J. (2017). Community structures of phytoplankton with emphasis on toxic cyanobacteria in Ohio inland lake during bloom season. *Journal of water resource and protection*, 9(11), 1.
- Chen, M., Xu, C., Wang, X., Wu, Y., & Li, L. (2021). Nonribosomal peptide synthetases and nonribosomal cyanopeptides synthesis in *Microcystis*: A comparative genomics study. *Algal Research*, 59, 102432.
- Cheung, M. Y., Liang, S., & Lee, J. (2013). Toxin-producing cyanobacteria in freshwater: a review of the problems, impact on drinking water safety, and efforts for protecting public health. *Journal of Microbiology*, 51(1), 1-10.

- Chorus, I., Falconer, I. R., Salas, H. J., & Bartram, J. (2000). Health risks caused by freshwater cyanobacteria in recreational waters. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews*, 3(4), 323-347.
- Chorus, I., & Welker, M. (2021). Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management (p. 858). Taylor & Francis.
- Cirerol, N. A. (2011). Water quality and sustainable development in Yucatán Peninsula. *Environmental Research Journal*, 5(6).
- Cirés, S., Wörmer, L., Timón, J., Wiedner, C., & Quesada, A. (2011). Cylindrospermopsin production and release by the potentially invasive cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum* under temperature and light gradients. *Harmful Algae*, 10(6), 668-675.
- Codd, G. A., Steffensen, D. A., Burch, M. D., & Baker, P. D. (1994). Toxic blooms of cyanobacteria in Lake Alexandrina, South Australia—learning from history. *Marine and Freshwater Research*, 45(5), 731-736.
- Codd, G. A., Bell, S. G., & Brooks, W. P. (1989). Cyanobacterial toxins in water. *Water Science and Technology*, 21(3), 1-13.
- Codd, G. A., Lindsay, J., Young, F. M., Morrison, L. F., & Metcalf, J. S. (2005 a). Harmful cyanobacteria. In *Harmful cyanobacteria* (pp. 1-23). Springer, Dordrecht.
- Codd, G. A., Morrison, L. F., & Metcalf, J. S. (2005 b). Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicology and applied pharmacology*, 203 (3), 264-272.
- COFEPRIS, (2017). PROYECTO de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-127-SSA1-2017, Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de la calidad del agua. *Diario Oficial de la Federación*, DOF: 06/12/2019.
URL: https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5581179&fecha=06/12/2019
- CONAGUA (2011). Estadísticas del agua en México, SEMARNAT, Gobierno federal.
<http://www.conagua.gob.mx/conagua07/publicaciones/publicaciones/sgp-1-11-eam2011.pdf>

CONAGUA (2017) - Comisión Nacional del Agua Estadísticas del Agua en México [PDF]. URL: <http://www.aguas.org.mx/sitio/index.php/blog/noticias/item/768-estadisticas-del-agua-en-mexico-2015>

CONAGUA, 2022, Resúmenes mensuales de temperatura y lluvia [On line] (Actualizado junio 2022) Disponible en. <https://smn.conagua.gob.mx/es/climatologia/temperaturas-y-lluvias/resumenes-mensuales-de-temperaturas-y-lluvias> (Acceso 15 junio).

Cruz Sánchez, M., Mora Mora, J., Giron Garcia, M. P., & Salcedo Luna, C. (2018). Caracterización hidroquímica de cenotes del Estado de Yucatán, México.

Cupul Caamal, F., Smith, D., Ortega Camacho, D., Cervantes Cocom, G., & Cejudo, E. (2021). Trends in the biogeochemistry of groundwater in the agro-industrial region in northeast yucatan. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 24(1).

D'Anglada, L. V., & Strong, J. (2015). Drinking water health advisory for the cyanobacterial microcystin toxins. US EPA, EPA-820R15100.

Davis, T.W., Berry, D.L., Boyer, G.L., and Gobler, 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.

Davis, A., & Goldman, M. J. (2019). Beyond payments for ecosystem services: considerations of trust, livelihoods and tenure security in community-based conservation projects. *Oryx*, 53(3), 491-496.

de Morais Calado, S. L., Vicentini, M., Santos, G. S., Pelanda, A., Santos, H., Coral, L. A., ... & de Assis, H. C. S. (2019). Sublethal effects of microcystin-LR in the exposure and depuration time in a neotropical fish: Multibiomarker approach. *Ecotoxicology and environmental safety*, 183, 109527.

Ding, W. X., Shen, H. M., & Ong, C. N. (2001). Critical role of reactive oxygen species formation in microcystin-induced cytoskeleton disruption in primary cultured hepatocytes. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 64(6), 507-519.

- Dodds, W. K., & Smith, V. H. (2016). Nitrogen, phosphorus, and eutrophication in streams. *Inland Waters*, 6(2), 155-164.
- Dodds, W. K., Jones, J. R., & Welch, E. B. (1998). Suggested classification of stream trophic state: distributions of temperate stream types by chlorophyll, total nitrogen, and phosphorus. *Water research*, 32(5), 1455-1462.
- Dorador C, Vila I, Imhoff JF, Witzel K-P. (2008). Cyanobacterial diversity in Salar de Huasco, a high-altitude saline wetland in northern Chile: An example of geographical dispersion? *FEMS Microbiol. Ecol.* 64(3): 419-432
- Drobac, D., Tokodi, N., Lujić, J., Marinović, Z., Subakov-Simić, G., Dulić, T., ... & Svirčev, Z. (2016). Cyanobacteria and cyanotoxins in fishponds and their effects on fish tissue. *Harmful Algae*, 55, 66-76.
- Du, L., Cheng, Y. Q., Ingenhorst, G., Tang, G. L., HuangBen, Y., & Shen, B. (2003). Hybrid peptide-polyketide natural products: biosynthesis and prospects towards engineering novel molecules. *Genetic engineering*, 227-267.
- Dubrovsky, N.M., Burow, K.R., Clark, G.M., Gronberg, J.M., Hamilton P.A., Hitt, K.J., Mueller, D.K., Munn, M.D., Nolan, B.T. Puckett, L.J., Rupert, M.G., Short, T.M., Spahr, N.E., Sprague, L.A., and Wilber, W.G. The quality of our Nation's waters—Nutrients in the Nation's streams and groundwater, 1992–2004: U.S. Geological Survey Circular, 2010, 1350. <http://water.usgs.gov/nawqa/nutrients/pubs/circ1350>
- DWAF (1996) South African Water Quality Guideline. 7: Aquatic Ecosystems (1st edn.) Department of Water Affairs & Forestry Pretoria.
- Dzul, D. J., & Moncada, P. (2011). Boletín Turístico de Cancún. Universidad del Caribe, Turismo Sustentable y Gestión Hotelera. Cancún: Universidad del Caribe
- Dzul, D. J., & Moncada, P. (2011). Boletín Turístico de Cancún. Universidad del Caribe, Turismo Sustentable y Gestión Hotelera. Cancún: Universidad del Caribe
- EPA US (2014) Cyanobacteria and Cyanotoxins: Information for Drinking Water Systems. https://www.epa.gov/sites/default/files/201408/documents/cyanobacteria_factsheet.pdf

- EPA US, (1978), Method 365.3: Phosphorous, All Forms (Colorimetric, Ascorbic Acid, Two Reagent). United States Environmental Protection Agency. www.epa.gov
- EPA (2014) Cyanobacteria and Cyanotoxins: Information for Drinking Water Systems, EPA810F11001. https://www.epa.gov/sites/default/files/201408/documents/cyanobacteria_factsheet.pdf
- Erisman, J. W., Galloway, J. N., Seitzinger, S., Bleeker, A., Dise, N. B., Petrescu, A. R., ... & de Vries, W. (2013). Consequences of human modification of the global nitrogen cycle. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368(1621), 20130116.
- Estrada, H., María, R., & Menjívar, R. F. (2013). Rol ecológico de las cianobacterias y su presencia en los ríos Torola, Titihuapa y Jiboa de El Salvador. *Carlos Estrada Faggioli*, 5.
- Famiglietti, J. S. (2014). The global groundwater crisis. *Nature Climate Change*, 4(11), 945-948.
- Fabbro, L., Baker, M., Duivenvoorden, L., Pegg, G., & Shiel, R. (2001). The effects of the ciliate *Paramecium cf. caudatum* Ehrenberg on toxin producing *Cylindrospermopsis* isolated from the Fitzroy River, Australia. *Environmental toxicology*, 16(6), 489-497.
- Falconer, I. R., Runnegar, M. T., & Beresford, A. M. (1983). Evidence of liver damage by toxin from a bloom of the blue-green alga, *Microcystis aeruginosa*. *Medical Journal of Australia*, 1(11), 511-514.
- Falconer, I.R. (2005) Cyanobacterial poisoning of livestock and people. In *Cyanobacterial Toxins of Drinking Water Supplies. Cylindrospermopsins and Microcystins*. pp. 77–90. Boca Raton, USA: CRC Press.
- Falconer, I.R. and Humpage, A.R. (2006) Cyanobacterial (Blue-Green Algal) Toxins in Water Supplies: Cylindrospermopsins. *Environmental Toxicology* 21: 299-304.
- Fay, P., 1983. The blue greens (Cyanophyta-Cyanobacteria). First published in Great Britain, pp. 1–88.

- Feist, S. M., & Lance, R. F. (2021). Genetic detection of freshwater harmful algal blooms: A review focused on the use of environmental DNA (eDNA) in *Microcystis aeruginosa* and *Prymnesium parvum*. *Harmful Algae*, 110, 102124.
- Fewer, D. P., Halinen, K., Sipari, H., Bernardová, K., Mänttari, M., Eronen, E., & Sivonen, K. (2011). Non-autonomous transposable elements associated with inactivation of microcystin gene clusters in strains of the genus *Anabaena* isolated from the Baltic Sea. *Environmental microbiology reports*, 3(2), 189-194.
- Figueredo, C. C., Giani, A., & Bird, D. F. (2007). Does allelopathy contribute to *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) bloom occurrence and geographic expansion? 1. *Journal of Phycology*, 43(2), 256-265.
- Fleury, P., Bakalowicz, M., and de Marsily, G. (2007). Submarine springs and coastal karst aquifers: a review. *Journal of Hydrology*, 339(1-2), 79-92.
- Flores, E., & Herrero, A. (2005). Nitrogen assimilation and nitrogen control in cyanobacteria. *Biochem Soc Trans* (2005) 33 (1): 164–167.
- Fogg, G. E., Stewart, W. D. P., Fay, P., & Walsby, A. E. (1973). *The blue-green algae* Academic Press. London and New York, 459.
- Foley, J. A., DeFries, R., Asner, G. P., Barford, C., Bonan, G., Carpenter, S. R., ... & Snyder, P. K. (2005). Global consequences of land use. *science*, 309(5734), 570-574.
- Foskuhl, B. J. (2019). Implication of inorganic nitrogen and phosphorous species as a cause of a harmful algal bloom event in Caesar Creek Lake, Ohio and its tributaries. Wright State University
- Francis G. Poisonous Australian Lake. *Nature*. 1878; 18:11–12.
- Freeze RA, JA Cherry (1979). *Agua subterránea*. Prentice-Hall, Nueva Jersey
- Gaget, V., Lau, M., Sendall, B., Froscio, S., & Humpage, A. R. (2017). Cyanotoxins: which detection technique for an optimum risk assessment. *Water research*, 118, 227-238.

- Gasca, V. M. C., R. B. Medina, y C. C. Novelo (2011). Los plaguicidas y su impacto sobre la fauna silvestre de la Península de Yucatán. Volumen, *Bioagrociencias*, 4(2), 1- 6.
- Glibert, P. M. (2020). From hogs to HABs: impacts of industrial farming in the US on nitrogen and phosphorus and greenhouse gas pollution. *Biogeochemistry*, 150(2), 139-180.
- Gilbert, B., MacDougall, A. S., Kadoya, T., Akasaka, M., Bennett, J. R., Lind, E. M., ... & Fay, P. A. (2020). Climate and local environment structure asynchrony and the stability of primary production in grasslands. *Global Ecology and Biogeography*, 29(7), 1177-1188.
- Gobler CJ, Burkholder JM, Davis TW, Harke MJ, Johengen T, Stow CA, Van de Waal DB. (2016). The dual role of nitrogen supply in controlling the growth and toxicity of cyanobacterial blooms. *Harmful Algae* 54:8797
- Golubic, S. (1979). Cyanobacteria (blue-green algae) under the bacteriological code? An ecological objection. *Taxon*, 387-389.
- González-Herrera, R., Martínez-Santibañez, E., Pacheco-Avila, J., & Cabrera-Sansores, A. (2014). Leaching and dilution of fertilizers in the Yucatan karstic aquifer. *Environmental earth sciences*, 72(8), 2879-2886.
- González-Herrera, R., & Rodríguez Castillo, R. (2006). Contaminación del acuífero yucateco por lixiviado de residuos municipales. IAHS-AISH publication, 635-640.
- González-Herrera, R., Sánchez-y-Pinto, I., & Gamboa-Vargas, J. (2002). Groundwater-flow modeling in the Yucatan karstic aquifer, Mexico. *Hydrogeology Journal*, 10(5), 539-552.
- Griffiths, D. J., & Saker, M. L. (2003). The Palm Island mystery disease 20 years on: a review of research on the cyanotoxin cylindrospermopsin. *Environmental Toxicology: An International Journal*, 18(2), 78-93.
- Griffith, A. W., & Gobler, C. J. (2020). Harmful algal blooms: a climate change co-stressor in marine and freshwater ecosystems. *Harmful Algae*, 91, 101590.

- Groeneweg, J., Sellner, B., & Tappe, W. (1994). Ammonia oxidation in *Nitrosomonas* at NH_3 concentrations near K_m : effects of pH and temperature. *Water Research*, 28(12), 2561-2566.
- Güler, C., Thyne, G. D., McCray, J. E., & Turner, K. A. (2002). Evaluation of graphical and multivariate statistical methods for classification of water chemistry data. *Hydrogeology journal*, 10(4), 455-474.
- Hammer M J (1975) *Water and Waste-Water Technology*. John Wiley & Sons, Inc. New York.
- Harke, M. J., & Gobler, C. J. (2015). Daily transcriptome changes reveal the role of nitrogen in controlling microcystin synthesis and nutrient transport in the toxic cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*. *BMC genomics*, 16(1), 1-18.
- Harke MJ, Steffen MM, Gobler CJ, Otten TG, Wilhelm SW, Wood SA, Paerl HW (2016) A review of the global ecology, genomics, and biogeography of the toxic cyanobacterium, *Microcystis* spp. *Harmful Algae* 54:4–20
- Havens, K. E., Ji, G., Beaver, J. R., Fulton, R. S., & Teacher, C. E. (2019). Dynamics of cyanobacteria blooms are linked to the hydrology of shallow Florida lakes and provide insight into possible impacts of climate change. *Hydrobiologia*, 829(1), 43-59.
- Haynes, D., Brodie, J., Waterhouse, J., Bainbridge, Z., Bass, D., & Hart, B. (2007). Assessment of the water quality and ecosystem health of the Great Barrier Reef (Australia): conceptual models. *Environmental Management*, 40(6), 993-1003.
- Helmer EA, M. Meybeck, (1996) *Monitoreo de la calidad del agua: una guía práctica para el diseño e implementación de estudios y programas de monitoreo de la calidad del agua dulce*. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente.
- Hem, J. D. (1985). *Study and interpretation of the chemical characteristics of natural water* (Vol. 2254). Department of the Interior, US Geological Survey.
- Hernández-Terrones, L.M.; Null, K. A.; Ortega-Camacho, D.; Paytan, A. (2015). Water quality assessment in the Mexican Caribbean: impacts on the coastal ecosystem. *Continental Shelf Research*, 2015, 102, 62-72. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2015.04.015>

- Herrera-Silveira JA, Comín FA, López S, Sánchez I (1997) Limnological characterization of aquatic ecosystems in Yucatan Peninsula (SE Mexico). *Verh Int Verein Limnol* 26 (in press).
- Herrera, G R., & Castillo, R. R. (2006). Contaminación del acuífero yucateco por lixiviado de residuos municipales. IAHS-AISH publication, 635-640.
- Hinde, R., Pironet, F., & Borowitzka, M. A. (1994). Isolation of *Oscillatoria spongelliae*, the filamentous cyanobacterial symbiont of the marine sponge *Dysidea herbacea*. *Marine Biology*, 119(1), 99-104.
- Hisbergues, M., Christiansen, G., Rouhiainen, L., Sivonen, K., & Börner, T. (2003). PCR-based identification of microcystin-producing genotypes of different cyanobacterial genera. *Archives of microbiology*, 180(6), 402-410.
- Ho, J. C., Michalak, A. M., & Pahlevan, N. (2019). Widespread global increase in intense lake phytoplankton blooms since the 1980s. *Nature*, 574(7780), 667-670.
- Holland, A., & Kinnear, S. (2013). Interpreting the possible ecological role (s) of cyanotoxins: compounds for competitive advantage and/or physiological aide? *Marine drugs*, 11(7), 2239-2258.
- Honegger, R. (1993). Developmental biology of lichens. *New Phytologist*, 125(4), 659-677.
- Hoz-Zavala, M., Esther, E., & Torres-Rivero, L. A. (2018). Impacto ambiental que se ejerce en los cuerpos de agua naturales de Quintana Roo y Tamaulipas, México Environmental impact exerted on the natural water bodies of Quintana Roo and Tamaulipas, Mexico. *Revista de Investigación y Desarrollo*, 4(13), 14-28.
- Hu, Z. D., & Zhou, Y. Q. (2004). Review of Toxins from Water-blooming Cyanobacteria [J]. *Yunnan Environmental Science*, 3.
- Huang, I. S., & Zimba, P. V. (2019). Cyanobacterial bioactive metabolites—A review of their chemistry and biology. *Harmful algae*, 86, 139-209.
- INEGI., 2016 a, Conociendo Quintana Roo, Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 6ta edición.

- INEGI, 2017 Anuario estadístico y geográfico de Quintana Roo 2015 [Anuario estadístico y geográfico de Quintana Roo 2017].
- INEGI, 2016 b, Estudio de información integrada del acuífero cárstico Península de Yucatán, Instituto Nacional de Estadística y Geografía (México).
- INEGI, (2018), Anuario estadístico y geográfico por entidad federativa, inegi. Tablas 3.1, 3.2, 3.5, 9.2, 9.3, 9.5.
- Ivanikova, N. V., McKay, R. M. L., Bullerjahn, G. S., & Sterner, R. W. (2007). Nitrate utilization by phytoplankton in Lake Superior is impaired by low nutrient (p, fe) availability and seasonal light limitation—a cyanobacterial bioreporter study 1. *Journal of Phycology*, 43(3), 475-484.
- Jähnichen, S., Ihle, T., Petzoldt, T., & Benndorf, J. (2007). Impact of inorganic carbon availability on microcystin production by *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Applied and environmental microbiology*, 73(21), 6994-7002.
- Jaiswal, P., Singh, P. K., & Prasanna, R. (2008). Cyanobacterial bioactive molecules—an overview of their toxic properties. *Canadian Journal of Microbiology*, 54(9), 701-717.
- Jang, M. H., Ha, K., & Joo, G. J. (2003). Toxin-mediated interaction between cyanobacteria and native fishes in the eutrophic Hoedong Reservoir, South Korea. *Journal of Freshwater Ecology*, 18(4), 639-646.
- Jang, M. H., Ha, K., Lucas, M. C., Joo, G. J., & Takamura, N. (2004). Changes in microcystin production by *Microcystis aeruginosa* exposed to phytoplanktivorous and omnivorous fish. *Aquatic Toxicology*, 68(1), 51-59.
- Jang, M. H., Ha, K., & Takamura, N. (2007). Reciprocal allelopathic responses between toxic cyanobacteria (*Microcystis aeruginosa*) and duckweed (*Lemna japonica*). *Toxicon*, 49(5), 727-733.
- Jiang, Y., & Yan, J. (2010). Effects of land use on hydrochemistry and contamination of Karst groundwater from Nandong underground river system, China. *Water, Air, & Soil Pollution*, 210(1), 123-141.

- Kaebnick, M., Neilan, B. A., Börner, T., & Dittmann, E. (2000). Light and the transcriptional response of the microcystin biosynthesis gene cluster. *Applied and environmental microbiology*, 66(8), 3387-3392.
- Kaebnick, M., & Neilan, B. A. (2001). Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS microbiology ecology*, 35(1), 1-9.
- Kardinaal, W. E. A., & Visser, P. M. (2005). Dynamics of cyanobacterial toxins. Harmful Cyanobacteria. *Aquatic ecology series*, 41-63.
- Kauffer E.F.M y C.L.A. Villanueva (2011). Retos de la gestión de una cuenca construida: la península de Yucatán en México. *Aqua-LAC*, 3(52), 81–91.
- Kearns, K. D., & Hunter, M. D. (2001). Toxin-producing *Anabaena flos-aquae* induces settling of *Chlamydomonas reinhardtii*, a competing motile alga. *Microbial ecology*, 42(1), 80-86.
- Kehr, J. C., Zilliges, Y., Springer, A., Disney, M. D., Ratner, D. D., Bouchier, C., ... & Dittmann, E. (2006). A mannan binding lectin is involved in cell–cell attachment in a toxic strain of *Microcystis aeruginosa*. *Molecular microbiology*, 59(3), 893-906.
- Kim, H.; Jo, B. Y.; Kim, H. S. Effect of different concentrations and ratios of ammonium, nitrate, and phosphate on growth of the blue-green alga (cyanobacterium) *Microcystis aeruginosa* isolated from the Nakdong River, Korea. *Algae*, 2017, 32(4), 275-284. DOI: <https://doi.org/10.4490/algae.2017.32.10.23>
- Kim, S. G., Joung, S. H., Ahn, C. Y., Ko, S. R., Boo, S. M., & Oh, H. M. (2010). Annual variation of *Microcystis* genotypes and their potential toxicity in water and sediment from a eutrophic reservoir. *FEMS microbiology ecology*, 74(1), 93-102.
- Kimambo, O. N., Gumbo, J. R., & Chikoore, H. (2019). The occurrence of cyanobacteria blooms in freshwater ecosystems and their link with hydro-meteorological and environmental variations in Tanzania. *Heliyon*, 5(3), e01312.
- Kinley-Baird, C., Calomeni, A., Berthold, D. E., Lefler, F. W., Barbosa, M., Rodgers, J. H., & Laughinghouse IV, H. D. (2021). Laboratory-scale evaluation of algaecide effectiveness for

control of microcystin-producing cyanobacteria from Lake Okeechobee, Florida (USA). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 207, 111233.

Knoll, A. H. (2008). Cyanobacteria and earth history. The cyanobacteria: molecular biology, genomics, and evolution, 484.

Kolman, M. A., & Salerno, G. L. (2017) Métodos moleculares para la detección de cianobacterias formadoras de floraciones y su potencial toxigénico. como determinantes ambientales de la salud.

Komárek J, Anagnostidis K, 1999, Cyanoprokaryota. En: Chroococcales. Süßwasserflora von Mitteleuropa (Ettl H, "Gardner G, Heynig H, Mollenheuer D, eds.). Gustav Fischer, Jena. 225–236.

Komárek, J. (2003). Problem of the taxonomic category "species" in cyanobacteria. *Archiv für hydrobiologie-supplement*, 148, 281-297.

Komárek, J. (2005). The modern classification of cyanoprokaryotes [Cyanobacteria], 34(Suppl. 3).

Komárek, J. (2014). Modern classification of cyanobacteria. Cyanobacteria: An economic perspective, 21-39.

Komárek, M., Vaněk, A., & Ettler, V. (2013). Chemical stabilization of metals and arsenic in contaminated soils using oxides—a review. *Environmental Pollution*, 172, 9-22.

Komárek J., Kaštovský J., Mares J. & Johansen J.R. (2014) Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera), using a polyphasic approach *Preslia* 86: 295–335, 2014

Komárek, J., & Johansen, J. R. (2015). Coccoid cyanobacteria. In *Freshwater Algae of North America* (pp. 75-133). Academic Press.

Komárek, J. (2016). Review of the cyanobacterial genera implying planktic species after recent taxonomic revisions according to polyphasic methods: state as of 2014. *Hydrobiologia*, 764(1), 259-270.

- Komárek, J. (2018). Several problems of the polyphasic approach in the modern cyanobacterial system. *Hydrobiologia*, 811(1), 7-17.
- Komárek, J. (2020). Quo vadis, taxonomy of cyanobacteria (2019). *Fottea*, 20(1), 104-110.
- Komatsu, M., Furukawa, T., Ikeda, R., Takumi, S., Nong, Q., Aoyama, K., ... & Takeuchi, T. (2007). Involvement of mitogen-activated protein kinase signaling pathways in microcystin-LR–induced apoptosis after its selective uptake mediated by OATP1B1 and OATP1B3. *Toxicological sciences*, 97(2), 407-416.
- Koreivienė J, Anne O, Kasperovičienė J, Burškytė V. (2014). Cyanotoxin management and human health risk mitigation in recreational waters. *Environ Monit Assess*. 2014; 186(7):4443-4459.
- Kramer, B. J., Davis, T. W., Meyer, K. A., Rosen, B. H., Goleski, J. A., Dick, G. J., ... & Gobler, C. J. (2018). Nitrogen limitation, toxin synthesis potential, and toxicity of cyanobacterial populations in Lake Okeechobee and the St. Lucie River Estuary, Florida, during the 2016 state of emergency event. *PLoS One*, 13(5), e0196278
- Krausfeldt, L. E., Farmer, A. T., Castro Gonzalez, H., Zepernick, B. N., Campagna, S. R., and Wilhelm, S. W. (2019). Urea is both a carbon and nitrogen source for *Microcystis aeruginosa*: tracking 13C incorporation at bloom pH conditions. *Front. Microbiol.* 10:1064. doi: 10.3389/fmicb.2019.01064
- Kruk, C., Piccini, C., Segura, A., Nogueira, L., Carballo, C., de la Escalera Siri, G. M. & Alcántara, I. (2015). Herramientas para el monitoreo y sistema de alerta de floraciones de cianobacterias nocivas: Río Uruguay y Río de la Plata. *Innotec*, (10 ene-dic), 23-39.
- Kurmayer, R Christiansen, G Coro, I. (2003). La abundancia de genotipos productores de microcistina se correlaciona positivamente con el tamaño de la colonia en *Microcystis* sp. y determina su producción neta de microcistina en el lago Wannsee. *Appl. Reinar. Microb.* 2003, 69, 787–795
- Kurmayer, R., & Christiansen, G. (2009). The genetic basis of toxin production in cyanobacteria. *Freshwater reviews*, 2(1), 31-50.

- Kubickova, B., Babica, P., Hilscherová, K., & Šindlerová, L. (2019). Effects of cyanobacterial toxins on the human gastrointestinal tract and the mucosal innate immune system. *Environmental Sciences Europe*, 31(1), 1-27.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), 1870-1874.
- Kurmayer, R., Christiansen, G., Gumpenberger, M., & Fastner, J. (2005). Genetic identification of microcystin ecotypes in toxic cyanobacteria of the genus *Planktothrix*. *Microbiology*, 151(5), 1525-1533.
- Lavoie, A., & De la Noüe, J. (1985). Hyperconcentrated cultures of *Scenedesmus obliquus*: a new approach for wastewater biological tertiary treatment? *Water research*, 19(11), 1437-1442.
- Leal-Bautista RM, M. Lenczewski, C. Morgan, A. Gabala, JE McLain, (2013). Evaluación de la contaminación fecal en aguas subterráneas de la región de Tulum, Quintana Roo, México. *J Environ. Prot. Ecol.* 4 (2013), pp. 1,272 mil - 1,279 mil.
- Leao, P. N., Engene, N., Antunes, A., Gerwick, W. H., & Vasconcelos, V. (2012). The chemical ecology of cyanobacteria. *Natural product reports*, 29(3), 372-391.
- Lee, D. Y., & Rhee, G. Y. (1999). Kinetics of growth and death in *Anabaena FLOS-aquae* (cyanobacteria) under light limitation and supersaturation. *Journal of Phycology*, 35(4), 700-709.
- Lee, J., Choi, J., Fatka, M., Swanner, E., Ikuma, K., Liang, X., ... & Howe, A. (2020). Improved detection of *mcyA* genes and their phylogenetic origins in harmful algal blooms. *Water research*, 176, 115730.
- León-Tejera, H., Cabrera-Becerril, E., García-García, A. M. E., & Ramírez-Padilla, A. B. (2017). Morphological characterization of cyanoprokaryotes from Santa Clara hypersaline coastal pond, Yucatán, México. *Phycologia*, 56(4), 114.
- Lehman, P. W., Kurobe, T., Lesmeister, S., Baxa, D., Tung, A., & Teh, S. J. (2017). Impacts of the 2014 severe drought on the *Microcystis* bloom in San Francisco Estuary. *Harmful Algae*, 63, 94-108.

- Lerner, D. N., & Harris, B. (2009). The relationship between land use and groundwater resources and quality. *Land use policy*, 26, S265-S273.
- Li, H., Barber, M., Lu, J., & Goel, R. (2020). Microbial community successions and their dynamic functions during harmful cyanobacterial blooms in a freshwater lake. *Water research*, 185, 116292.
- Li, L., Jia, R., Liu, Y., & Zhang, H. (2011). Detection of microcystin-producing cyanobacteria in a reservoir by whole cell quantitative PCR. *Procedia Environmental Sciences*, 10, 2272-2279.
- Li D, Gu AZ, He M (2014) Quantification and genetic diversity of total and microcystin-producing *Microcystis* during blooming season in Tai and Yang-cheng lakes, China. *J Appl Microbiol* 116(6):1482–1494
- Li, L., Jia, R., Liu, Y., & Zhang, H. (2011). Detection of microcystin-producing cyanobacteria in a reservoir by whole cell quantitative PCR. *Procedia Environmental Sciences*, 10, 2272-2279.
- Lillehoj, E. B. (1982). Evolutionary basis and ecological role of toxic microbial secondary metabolites. *Journal of Theoretical Biology*, 97(2), 325-332.
- Lindsay, J., Metcalf, J. S., & Codd, G. A. (2006). Protection against the toxicity of microcystin-LR and cylindrospermopsin in *Artemia salina* and *Daphnia* spp. by pre-treatment with cyanobacterial lipopolysaccharide (LPS). *Toxicon*, 48(8), 995-1001.
- Loewald, A., Ryan, P., Hall, M. B., & Kim, J. A. (2020). Review of Phosphorous and Nitrogen in Groundwater and Lakes. Vermont Geological Survey Technical Report VGTR2020-2, 36 p
- Lorenzen C.J. 1967. Determination of Chlorophyll and Pheo-Pigments: Spectrophotometric equations. *Limnol. Oceanog.* 12 (2): 343-346
- Lorenzi, A. S., Chia, M. A., Piccin-Santos, V., & Bittencourt-Oliveira, M. D. C. (2015). Microcystins and cylindrospermopsins molecular markers for the detection of toxic cyanobacteria: a case study of northeastern Brazilian reservoirs. *Limnetica*, 34(2), 269-282.
- Lu, J.; Zhu, B.; Struewing, I.; Xu, N.; Duan, S., (2019) Nitrogen–phosphorus-associated metabolic activities during the development of a cyanobacterial bloom revealed by

metatranscriptomics. *Scientific reports*, 9(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38481-2>

- Lyck, S., Gjørme, N., & Utkilen, H. (1996). Iron starvation increases toxicity of *Microcystis aeruginosa* CYA 228/1 (Chroococcales, Cyanophyceae). *Phycologia*, 35(sup6), 120-124.
- Mancuso, J. L., Weinke, A. D., Stone, I. P., Hamsher, S. E., Woller-Skar, M. M., Snyder, E. B., & Biddanda, B. A. (2021). Bloom and bust: Historical trends of harmful algal blooms in Muskegon Lake, Michigan, a Great Lakes estuary. *Freshwater Science*, 40(3), 463-477.
- Marín, L.E., and E.C. Perry, (1994). The hydrogeology and contamination potential of Northwestern Yucatan, Mexico, *Geofísica Internacional*, v. 33, 619-623.
- Marín, L.; Steinich, B.; Pacheco, J.; Escolero, O. (2000) Hidrogeología de un acuífero kárstico de fuente única contaminada, Mérida, Yucatán, México. *Geofís.* En t. 2000, 39, 359–365.
- Maršálek, B., & Bláha, L. (2004). Comparison of 17 biotests for detection of cyanobacterial toxicity. *Environmental Toxicology: An International Journal*, 19(4), 310-317.
- Mbedi, S., Welker, M., Fastner, J., & Wiedner, C. (2005). Variability of the microcystin synthetase gene cluster in the genus *Planktothrix* (Oscillatoriales, Cyanobacteria). *FEMS microbiology letters*, 245(2), 299-306.
- McLellan, NL y Manderville, RA (2017). Mecanismos tóxicos de microcistinas en mamíferos. *Toxicology research*, 6 (4), 391–405
- Melaram, R., & Lopez-Dueñas, B. (2021). Detection of Microcystins in Lake Manatee and Lake Washington—Two Florida Drinking Water Systems. *Preprints.org 2021*, 2021040124
- Metcalf, C. D. Beddows, P.A., Bouchot, G.G., Metcalf, TL, Li H. & Van Lavieren, H. (2011). Contaminants in the coastal karst aquifer system along the Caribbean coast of the Yucatan Peninsula, México. *Environmental pollution*, 159(4), 991-997.
- Metcalf, J. S., Richer, R., Cox, P. A., & Codd, G. A. (2012). Cyanotoxins in desert environments may present a risk to human health. *Science of the Total Environment*, 421, 118-123.

- Middelburg, J. J. (2019). Primary Production: From Inorganic to Organic Carbon. In Marine Carbon Biogeochemistry (pp. 9-35). Springerbrief. in Earth System Sciences. Springer, Cham.
- Mitrovic, S. M., Hardwick, L., & Dorani, F. (2011). Use of flow management to mitigate cyanobacterial blooms in the Lower Darling River, Australia. *Journal of Plankton Research*, 33(2), 229-241.
- Moestrup, Ø. (2001). Algal taxonomy: historical overview. e LS.
- Mohamed, Z. A., Alamri, S., & Hashem, M. (2022). The link between microcystin levels in groundwater and surface Nile water and assessing their potential risk to human health. *Journal of Contaminant Hydrology*, 244, 103921.
- Moreno, J. R., Medina, C. D., & Albarracín, V. H. (2012). Aspectos ecológicos y metodológicos del muestreo, identificación y cuantificación de cianobacterias y microalgas eucariotas. *REDUCA (Biología)*, 5(5).
- Mootz, H. D., Schwarzer, D., & Marahiel, M. A. (2002). Ways of Assembling Complex Natural Products on Modular Nonribosomal Peptide Synthetases A list of abbreviations can be found at the end of the text. *ChemBioChem*, 3(6), 490.
- Muciño-Márquez, R. E., Figueroa-Torres, M. G., & Aguirre-León, A. (2015). Cianofitas de los sistemas fluvio-lagunares Pom-Atasta y Palizada del Este, adyacentes a la Laguna de Términos, Campeche, México. *Polibotánica*, (39), 49-78.
- Mur, R., Skulberg, O. M., & Utkilen, H. (1999). CYANOBACTERIA IN THE ENVIRONMENT. Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring, and management. Ed. Ingrid Chorus and Jamie Bartram.
- Murray, S. A., Mihali, T. K., & Neilan, B. A. (2011). Extraordinary conservation, gene loss, and positive selection in the evolution of an ancient neurotoxin. *Molecular biology and evolution*, 28(3), 1173-1182.
- Nabout, J. C., da Silva Rocha, B., Carneiro, F. M., & Sant'Anna, C. L. (2013). How many species of Cyanobacteria are there? Using a discovery curve to predict the species number. *Biodiversity and conservation*, 22(12), 2907-2918.

- Namikoshi, M., & Rinehart, K. L. (1996). Bioactive compounds produced by cyanobacteria. *Journal of Industrial Microbiology*, 17(5-6), 373-384.
- Nandini, S., Sánchez-Zamora, C., & Sarma, S. S. S. (2019). Toxicity of cyanobacterial blooms from the reservoir Valle de Bravo (Mexico): A case study on the rotifer *Brachionus calyciflorus*. *Science of the Total Environment*, 688, 1348-1358.
- Newton, W.E., (2007). Physiology, biochemistry, and molecular biology of nitrogen fixation. In: Bothe, H., Ferguson, S.J., Newton, W.E. (Eds.), *Biology of the Nitrogen Cycle* pp 109-129.
- Nikolenko, O., Jurado, A., Borges, A. V., Knöller, K., & Brouyère, S. (2018). Isotopic composition of nitrogen species in groundwater under agricultural areas: a review. *Science of the Total Environment*, 621, 1415-1432.
- Nishiwaki - Matsushima, R., Nishiwaki, S., Ohta, T., Yoshizawa, S., Suganuma, M., Harada, KI, ... y Fujiki, H. (1991). Relaciones estructura-función de microcistinas, promotores de tumores hepáticos, en interacción con la proteína fosfatasa. *Revista japonesa de investigación del cáncer*, 82 (9), 993-996.
- Nishizawa, T., Asayama, M., Fujii, K., Harada, K. I., & Shirai, M. (1999). Genetic analysis of the peptide synthetase genes for a cyclic heptapeptide microcystin in *Microcystis spp.* *The journal of biochemistry*, 126(3), 520-529.
- Nixon, S. W. (1995). Coastal marine eutrophication: a definition, social causes, and future concerns. *Ophelia*, 41(1), 199-219.
- Novelo B.J.A. (2017) Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-127-SSA1-2017, Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de la calidad del agua. Diario Oficial de la Federación DOF 06/12/2019
- Oh, H.-M.; Lee, S.J.; Jang, M.-H.; Yoon, B.-D. (2000). Microcystin production by *Microcystis aeruginosa* in a Phosphorus-Limited *Chemostat*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 176–179.
- Ohtani, I., Moore, R. E., & Runnegar, M. T. (1992). Cylindrospermopsin: a potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Journal of the American Chemical Society*, 114(20), 7941-7942.

- Olán-Jiménez, K., Rosales-Quintero, A., Novelo, E., Álvarez-Gutiérrez, P. E., Castañón-González, J. H., & Enciso-Saénz, S. (2018). Microalgae of the Bosque Azul Lake, first report of *Limnothrix planctonica* in Montebello, Chiapas, México. *AGROProductividad*, 11(12).
- Omidi, A., Esterhuizen-Londt, M., & Pflugmacher, S. (2018). Still challenging: the ecological function of the cyanobacterial toxin microcystin—What we know so far. *Toxin reviews*, 37(2), 87-105.
- O'Neill, K., Musgrave, I. F., & Humpage, A. (2016). Low dose extended exposure to saxitoxin and its potential neurodevelopmental effects: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 48, 7–16. doi: 10.1016/j.etap.2016.09.020
- Oren, A. (2011). Naming Cyanophyta/Cyanobacteria—a bacteriologist's view. *Fottea*, 11(1), 9-16.
- Oren, A., & Ventura, S. (2017). The status of cyanobacterial nomenclature under the “prokaryotic” and the “botanical” code. *Antonie van Leeuwenhoek*, 110(10), 1257-1269.
- Oswald, W. J. (1988). Large-scale algal culture systems (engineering aspects). *Micro-algal biotechnology.*, 357-394. Cambridge University Press.
- Ouellette, A. J., & Wilhelm, S. W. (2003). Toxic cyanobacteria: the evolving molecular toolbox. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 1(7), 359-366.
- Pacheco, J., & Cabrera, A. (1996). Efecto del uso de fertilizantes en la calidad del agua subterránea en el estado de Yucatán. *Tecnología y ciencias del agua*, 11(1), 53-60.
- Pacheco, J., & Cabrera, A. (1997). Groundwater contamination by nitrates in the Yucatan Peninsula, Mexico. *Hydrogeology Journal*, 5(2), 47-53.
- Pacheco, J., Cabrera, A., & Marín, L. E. (2000). Bacteriological contamination in the karstic aquifer of Yucatán, Mexico. *Geofísica Internacional*, 39(3), 285-291.
- Pacheco, J., Cabrera, A., & Marín, L. E. (2012). Bacteriological contamination in the karstic aquifer of Yucatán, Mexico. *Geofísica Internacional*, 39(3).
- Pacheco, A. B. F., Guedes, I. A., & Azevedo, S. M. (2016). Is qPCR a reliable indicator of cyanotoxin risk in freshwater? *Toxins*, 8(6), 172.

- Paerl, H. W., & Millie, D. F. (1996). Physiological ecology of toxic aquatic cyanobacteria. *Phycologia*, 35(sup6), 160-167.
- Paerl, H. W. & Otten, T. G. (2013) Harmful cyanobacterial blooms: causes, consequences, and controls. *Microb. Ecol.* 65, 995–1010.
- Paerl, H. W. (2018). Mitigating toxic planktonic cyanobacterial blooms in aquatic ecosystems facing increasing anthropogenic and climatic pressures. *Toxins*, 10(2), 76.
- Palacios Mazón, D. M. (2019). Identificación de bacterias aisladas de ecosistemas glaciares, andinos y antárticos (Bachelor's thesis, Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Carrera de Ingeniería Bioquímica).
- Palinska, K. A., & Surosz, W. (2014). Taxonomy of cyanobacteria: a contribution to consensus approach. *Hydrobiologia*, 740(1), 1-11.
- Panrace, C., Gugger, M., & Calteau, A. (2017). Genomics of NRPS/PKS biosynthetic gene clusters in cyanobacteria.
- Panou, M., Zervou, S. K.; Kaloudis, T.; Hiskia, A.; Gkelis, S. A Greek (2018), *Cylindrospermopsis raciborskii* strain: Missing link in tropic invader's phylogeography tale. *Harmful Algae*, , 80, 96-106. <https://doi.org/10.1016/j.hal.10.002>
- Pappas, D., Gkelis, S., & Panteris, E. (2020). The effects of microcystin-LR in *Oryza sativa* root cells: F-actin as a new target of cyanobacterial toxicity. *Plant Biology*, 22(5), 839-849.
- Park, G. S., & Marshall, H. G. (2000). Estuarine relationships between zooplankton community structure and trophic gradients. *Journal of Plankton Research*, 22(1), 121-136.
- Park, H., Kim, G., Seo, Y., Yoon, Y., Min, J., Park, C., & Lee, T. (2021). Improving Biosensors using Different Nanomaterials: Case Study with Microcystins as Target Analytes. *Biosensors*, 11(12), 525.
- Park, H.K.; Kwon, M.A.; Lee, H.J.; Oh, J.; Lee, S.H.; Kim, I.S. (2018) Molecular verification of bloom-forming *Aphanizomenon flos-aquae* and their secondary metabolites in the Nakdong River.

International journal of environmental research and public health, 15(8), 1739.
<https://doi.org/10.3390/ijerph15081739>

Paerl, H. W.; Otten, T. G. (2013). Harmful cyanobacterial blooms: causes, consequences, and controls. *Microb. Ecol.*, 65, 995–1010. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0159-y>

Pérez, L., Bugja, R., Lorenschat, J., Brenner, M., Curtis, J., Hoelzmann, P., ... & Schwalb, A. (2011). Aquatic ecosystems of the Yucatan peninsula (Mexico), Belize, and Guatemala. *Hydrobiologia*, 661(1), 407-433.

Pérez-Ceballos, R., Canul-Macario, C., Pacheco-Castro, R., Pacheco-Ávila, J., Euán-Ávila, J., & Merino-Ibarra, M. (2021). Groundwater Quality Evolution Model in the Ring of Cenotes, Yucatan, Mexico.

Perry, E., Velazquez-Oliman, G., & Marin, L. (2002). The hydrogeochemistry of the karst aquifer system of the northern Yucatan Peninsula, Mexico. *International Geology Review*, 44(3), 191-221.

Pham TL, Dao TS, Shimizu K, Lan-Chi DH, Utsumi M (2015) Isolation and characterization of microcystin-producing cyanobacteria from Dau Tieng Reservoir, Vietnam. *Nova Hedwigia* 101(1–2):3–20

Pham, T. L., & Utsumi, M. (2018). An overview of the accumulation of microcystins in aquatic ecosystems. *Journal of environmental management*, 213, 520-529.

Pham, T. L., Tran, T. H. Y., Shimizu, K., Li, Q., & Utsumi, M. (2021). Toxic cyanobacteria and microcystin dynamics in a tropical reservoir: assessing the influence of environmental variables. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(45), 63544-63557.

Pinho, G. L. L., Da Rosa, C. M., Maciel, F. E., Bianchini, A., Yunes, J. S., Proença, L. A. D. O., & Monserrat, J. M. (2005). Antioxidant responses and oxidative stress after microcystin exposure in the hepatopancreas of an estuarine crab species. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 61(3), 353-360.

- Polanco Rodríguez, A. G., Magaña Castro, T. V., Cetz Luit, J., & Quintal López, R. (2019). Uso de agroquímicos cancerígenos en la región agrícola de Yucatán, México. *Centro Agrícola*, 46(2), 72-83.
- Pouria, S., de Andrade, A., Barbosa, J., Cavalcanti, R. L., Barreto, V. T. S., Ward, C. J., ... & Codd, G. A. (1998). Fatal microcystin intoxication in hemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *The Lancet*, 352(9121), 21-26.
- Prentice, M. J., Hamilton, D. P., Willis, A., O'Brien, K. R., & Burford, M. A. (2019). Quantifying the role of organic phosphorus mineralisation on phytoplankton communities in a warm-monomictic lake. *Inland Waters*, 9(1), 10-24.
- Puddick, J., Thomson-Laing, G., & Wood, S. A. (2019). Microcystins in New Zealand: a review of occurrence, congener diversity and cell quotas. *New Zealand Journal of Botany*, 57(2), 93-111.
- Qin, B., Paerl, H. W., Brookes, J. D., Liu, J., Jeppesen, E., Zhu, G., ... & Deng, J. (2019). Why Lake Taihu continues to be plagued with cyanobacterial blooms through 10 years (2007–2017) efforts. *Science Bulletin*, 64(6).
- Qian, W., Peng, Y., Li, X., Zhang, Q., & Ma, B. (2017). The inhibitory effects of free ammonia on ammonia oxidizing bacteria and nitrite oxidizing bacteria under anaerobic condition. *Bioresource technology*, 243, 1247-1250.
- Qiaoxiang, D., Junda, L., Xu, S., Jin, L., & Changjiang, H. (2008). Water, organic matter, nitrogen and phosphorus contents in sediment of a large-scale mariculture area in the Zhelin Bay of eastern Guangdong Province, China. *Acta Oceanologica Sinica*, (2), 133-148.
- Rabalais, N. N., Turner, R. E., Díaz, R. J., & Justić, D. (2009). Global change and eutrophication of coastal waters. *ICES Journal of Marine Science*, 66(7), 1528-1537.
- Radhakrishnan, B. (2006). Potential of cyanotoxin as an antifungal agent (Doctoral dissertation, IARI, Division of Microbiology, New Delhi).

- Radhakrishnan, B., Prasanna, R., Jaiswal, P., Nayak, S., & Dureja, P. (2009). Modulation of biocidal activity of *Calothrix* sp. and *Anabaena* sp. by environmental factors. *Biologia*, 64(5), 881-889
- Rajmohan, N., & Elango, L. (2005). Nutrient chemistry of groundwater in an intensively irrigated region of southern India. *Environmental Geology*, 47(6), 820-830.
- Ramachandra, T. V., & Solanki, M. (2007). Ecological assessment of lentic water bodies of Bangalore. The Ministry of Science and Technology, 25, 96
- Rantala, A., Fewer, D. P., Hisbergues, M., Rouhiainen, L., Vaitomaa, J., Börner, T., & Sivonen, K. (2004). Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(2), 568-573.
- Rantala, A. (2007). Evolution and detection of cyanobacterial hepatotoxin synthetase genes. *Dissertationes bioscientiarum molecularium Universitatis Helsingiensis in Viikki*.
- Rapala, J., & Sivonen, K. (1998). Assessment of environmental conditions that favor hepatotoxic and neurotoxic *Anabaena* spp. strains cultured under light limitation at different temperatures. *Microbial Ecology*, 36(2), 181-192.
- Rasmussen, B., Fletcher, I., Brocks, J. y col. (2008). Reevaluar la primera aparición de eucariotas y cianobacterias. *Nature* 455, 1101–1104 <https://doi.org/10.1038/nature07381>
- Ravell, J. M. A., Barrientos-Medina, R. C., & López-Adrián, Y. S. J. (2019) La vida verde-azul del agua dulce. ¿Qué sabemos sobre la diversidad de estas algas en la península de Yucatán? *CICY Desde el Herbario CICY*. 11: 58-62.
- Raven, J. A. (2010). Cyanotoxins: A poison that frees phosphate. *Current Biology*, 20(19), R850-R852.
- Rawat, I., Kumar, R. R., Mutanda, T., & Bux, F. (2011). Dual role of microalgae: phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied energy*, 88(10), 3411-3424.

- Redfield, A. C. 1958. The biological control of chemical factors in the environment. *American Scientist* 46: 205–222.
- Reynolds, C. S., Jaworski, G. H. M., Cmiech, H. A., & Leedale, G. F. (1981). On the annual cycle of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* Kütz. emend. Elenkin. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 293(1068), 419-477.
- Richardson, K., & Jørgensen, B. B. (1996). Eutrophication: definition, history, and effects. *Eutrophication in coastal marine ecosystems*, 52, 1-19.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M., & Stanier, R. Y. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Microbiology*, 111(1), 1-61.
- Rippka, R., & Cohen-Bazire, G. (1983, July). The cyanobacteriales: a legitimate order based on the type of strain *Cyanobacterium stanieri*? *In Annales de l'Institut Pasteur/Microbiologie* (Vol. 134, No. 1, pp. 21-36). Elsevier Masson.
- Robertson, W.D., Moore, T.A., Spoelstra, J., Li, L., Elgood, R.J., Clark, I.D.; Neufeld, J.D. (2012) Natural attenuation of septic system nitrogen by anammox. *Groundwater*, 50(4), 541-553. <https://doi.org/10.1111/j.1745-6584.2011.00857.x>
- Royo, C., Ortega-Mayagoitia, E., Rodrigo, M. A., & Alvarez-Cobelas, M. (2000). Phytoplankton structure and dynamics in a semiarid wetland, the National Park. *Archiv für Hydrobiologie*, 148 (3), p. 397 - 419.
- Rosiles-González, G., Ávila-Torres, G., Moreno-Valenzuela, O. A., Acosta-González, G., Leal-Bautista, R. M., Grimaldo-Hernández, C. D., ... & Hernández-Zepeda, C. (2017). Occurrence of pepper mild mottle virus (PMMoV) in groundwater from a karst aquifer system in the Yucatan Peninsula, Mexico. *Food and Environmental Virology*, 9(4), 487-497.
- Rosiles-González, G., Ávila-Torres, G., Moreno-Valenzuela, O. A., Cháidez-Quiroz, C., Hernández-Flores, C. I., Acosta-González, G., ... & Hernández-Zepeda, C. (2019). Norovirus and human adenovirus occurrence and diversity in recreational water in a karst aquifer in the Yucatan Peninsula, Mexico. *Journal of applied microbiology*, 127(4), 1255-1269.

- Rosso, L., & Giannuzzi, L. (2011). Factores ambientales y antropogénicos que afectan la formación de floraciones de cianobacterias y cianotoxinas.
- Rott, E., Pentecost, A., & Mareš, J. (2018). Introduction: Recent developments in cyanobacterial research with special reference to aquatic habitats, molecular ecology and phylogenetic taxonomy. *Hydrobiologia*, 811(1), 1-6.
- Runnegar, M. T. C., & Falconer, I. R. (1986). Effect of toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on ultrastructural morphology and actin polymerization in isolated hepatocytes. *Toxicon*, 24(2), 109-115.
- Rutkowska, M., Płotka-Wasyłka, J., Majchrzak, T., Wojnowski, W., Mazur-Marzec, H., & Namieśnik, J. (2019). Recent trends in determination of neurotoxins in aquatic environmental samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*.
- Saari, G. N., Wang, Z., & Brooks, B. W. (2017). Revisiting inland hypoxia: diverse exceedances of dissolved oxygen thresholds for freshwater aquatic life. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(4), 3139–3150.
- Saint-Loup, R., Felix, T., Maqueda, A., Schiller, A., & Renard, P. (2018). A survey of groundwater quality in Tulum region, Yucatan Peninsula, Mexico. *Environmental Earth Sciences*, 77(18), 1-20.
- Sambrook J., and Russell D.W., 2001. *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*, 3 Rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sánchez-Sánchez, J. A., Álvarez-Legorreta, T., Pacheco-Ávila, J. G., González-Herrera, R. A., & Carrillo-Briebzca, L. (2015). Caracterización hidrogeoquímica de las aguas subterráneas del sur del Estado de Quintana Roo, México. *Revista mexicana de ciencias geológicas*, 32(1), 62-76.
- Sandrini, G., Tann, R. P., Schuurmans, J. M., Van Beusekom, S. A., Matthijs, H. C., and Huisman, J. (2016). Diel variation in gene expression of the CO₂-concentrating mechanism during a harmful cyanobacterial bloom. *Front. Microbiol.* 7:551. doi: 10.3389/fmicb.2016.00551

- Sanseverino, I., António, D. C., Loos, R., & Lettieri, T. (2017). Cyanotoxins: methods and approaches for their analysis and detection. Centre, JR, Ed.
- Saraf, S. R., Frenkel, A., Harke, M. J., Jankowiak, J. G., Gobler, C. J., & McElroy, A. E. (2018). Effects of *Microcystis* on development of early life stage Japanese medaka (*Oryzias latipes*): Comparative toxicity of natural blooms, cultured *Microcystis* and microcystin-LR. *Aquatic toxicology*, 194, 18-26.
- Scanlon, B. R., Reedy, R. C., Stonestrom, D. A., Prudic, D. E., & Dennehy, K. F. (2005). Impact of land use and land cover change on groundwater recharge and quality in the southwestern US. *Global Change Biology*, 11(10), 1577-1593.
- Schaefer, A. M., Yrastorza, L., Stockley, N., Harvey, K., Harris, N., Grady, R., ... & Reif, J. S. (2020). Exposure to microcystin among coastal residents during a cyanobacteria bloom in Florida. *Harmful algae*, 92, 101769.
- Schatz, D., Keren, Y., Vardi, A., Sukenik, A., Carmeli, S., Börner, T., ... & Kaplan, A. (2007). Towards clarification of the biological role of microcystins, a family of cyanobacterial toxins. *Environmental microbiology*, 9(4), 965-970.
- Schindler, D. W. (1977). Evolution of phosphorus limitation in lakes: natural mechanisms compensate for deficiencies of nitrogen and carbon in eutrophied lakes. *Science*, 195(4275), 260-262.
- Schopf, J. W. (1968). Microflora of the Bitter Springs formation, late Precambrian, central Australia. *Journal of Paleontology*, 651-688.
- Schopf, J. W. (2000). The fossil record: tracing the roots of the cyanobacterial lineage. In *The ecology of cyanobacteria* (pp. 13-35). Springer, Dordrecht.
- Schmitter-Soto, J. J., Comín, F. A., Escobar-Briones, E., Herrera-Silveira, J., Alcocer, J., Suárez-Morales, E. & Steinich, B. (2002a). Hydrogeochemical and biological characteristics of cenotes in the Yucatan Peninsula (SE Mexico). *Hydrobiologia*, 467(1-3), 215-228.
- Schmitter-Soto, J. J., Escobar-Briones, E., Alcocer, J., Suárez-Morales, E., Elías-Gutiérrez, M., & Marín, L. E. (2002b). Los cenotes de la Península de Yucatán. De la Lanza-Espino, G. y JL

García-Calderón (Comps.). Lagos y Presas de México. AGT. México, 337-381. AGT. México.

Secretaria de Economía, (2001), NMX-AA-036-SCFI-2001. Análisis de agua -determinación de acidez y Alcalinidad en aguas naturales, residuales y Residuales tratadas - método de prueba.

<https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/166776/NMX-AA-036-SCFI-2001.pdf>

SEDUE, (1989). Criterios ecológicos de calidad del agua. CE-CCA-001/89. Diario Oficial de la Federación 13 diciembre 1989

SEGOB, 2017, PROYECTO de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-127-SSA1-2017, Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de la calidad del agua. https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5581179&fecha=06/12/2019

SEMARNAT, (2012). Informe de la Situación del Medio Ambiente en México Compendio de Estadísticas Ambientales, Indicadores Clave y de Desempeño Ambiental.

Sevilla, E., Martin-Luna, B., Vela, L., Bes, M. T., Fillat, M. F., & Peleato, M. L. (2008). Iron availability affects *mcyD* expression and microcystin-LR synthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Environmental microbiology*, 10(10), 2476-2483.

Shapiro, J. (1990). Current beliefs regarding dominance by blue greens: the case for the importance of CO₂ and pH. *Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie Verhandlungen* 24, 38–54. doi: 10.1080/03680770.1989.11898689

Shishido, T. K., Jokela, J., Humisto, A., Suurnäkki, S., Wahlsten, M., Alvarenga, D. O., ... & Fewer, D. P. (2019). The biosynthesis of rare homo-amino acid containing variants of microcystin by a benthic cyanobacterium. *Marine drugs*, 17(5), 271.

Shruthi, M., and Rajashekhar, M. (2014). Effect of salinity and pH on the growth and biomass production in the four species of estuarine cyanobacteria. *J. Algal Biomass Utln.* 5, 29–36.

Sidelev, S. I. (2019). A Novel Multiplex PCR-based Technique for Detection of Toxigenic Cyanobacteria. *Microbiology*, 88(3), 375-377.

- Singh, D. P., Kumar, A., & Tyagi, M. (2001). Cyanobacterial Toxins: Toxicity and Ecological Effects- A Study.
- Singh, Y., Khattar, J. I. S., Singh, D. P., Rahi, P., & Gulati, A. (2014). Limnology and cyanobacterial diversity of high-altitude lakes of Lahaul-Spiti in Himachal Pradesh, India. *Journal of biosciences*, 39(4), 643-657.
- Sings, H. L., & Rinehart, K. L. (1996). Compounds produced from potential tunicate-blue-green algal symbiosis: a review. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 17(5-6), 385-396.
- Singh, P., Singh, S.S., Aboal, M., Mishra, A.K., (2015). Decoding cyanobacterial phylogeny and molecular evolution using an evonumeric approach. *Protoclasma* 252, 519–535.
- Sinha, R., Pearson, L.A., Davis, T.W., Burford, M.A., Orr, P.T., and Neilan, B.A. (2012) Increased incidence of *Cylindrospermopsis raciborskii* in temperate zones – is climate change responsible? *Water Res* 46: 1408–1419.
- Sivarajah, B., Simmatis, B., Favot, E. J., Palmer, M. J., & Smol, J. P. (2021). Eutrophication and climatic changes lead to unprecedented cyanobacterial blooms in a Canadian sub-Arctic landscape. *Harmful Algae*, 105, 102036
- Sivarajah, B., Simmatis, B., Favot, E. J., Palmer, M. J., & Smol, J. P. (2021). Eutrophication and climatic changes lead to unprecedented cyanobacterial blooms in a Canadian sub-Arctic landscape. *Harmful Algae*, 105, 102036
- Sivonen, K. (1996). Cyanobacterial toxins and toxin production. *Phycologia*, 35(sup6), 12-24.
- Sivonen, K., & Jones, G. (1999). Cyanobacterial toxins. Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management, 1, 43-112
- Sivonen K., (2009) en La Enciclopedia de Microbiología, ed Schaechter M (Académica, Oxford), 3ª edición, páginas 290 – 307
- Skowron, P., Skowrońska, M., Bronowicka-Mielniczuk, U., Filipek, T., Igras, J., Kowalczyk-Juśko, A., & Krzepińko, A. (2018). Anthropogenic sources of potassium in surface water: The case

study of the Bystrzyca river catchment, Poland. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 265, 454-460.

Smith, J. L., Boyer, G. L., & Zimba, P. V. (2008). A review of cyanobacterial odorous and bioactive metabolites: impacts and management alternatives in aquaculture. *Aquaculture*, 280(1-4), 5-20.

Smith, D. N., Ortega-Camacho, D., Acosta-González, G., Leal-Bautista, R. M., Fox III, W. E., & Cejudo, E. (2020). A multi-approach assessment of land use effects on groundwater quality in a karstic aquifer. *Heliyon*, 6(5), e03970.

Smith, V. H., & Schindler, D. W. (2009). Eutrophication science: where do we go from here *Trends in ecology & evolution*, 24(4), 201-207.

Smith, S. V., Swaney, D. P., Talaue-Mcmanus, L., Bartley, J. D., Sandhei, P. T., McLAUGHLIN, C. J., ... & Wulff, F. (2003). Humans, hydrology, and the distribution of inorganic nutrient loading to the ocean. *Bioscience*, 53(3), 235-245.

Song, L., Sano, T., Li, R., Watanabe, M. M., Liu, Y., & Kaya, K. (1998). Microcystin production of *Microcystis viridis* (cyanobacteria) under different culture conditions. *Phycological research*, 46, 19-23.

Stanier, R. Y., & Cohen-Bazire, G. (1977). Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Annual review of microbiology*, 31(1), 225-274.

Stanier, R. Y., Siström, W. R., Hansen, T. A., Whitton, B. A., Castenholz, R. W., Pfennig, N., ... & Trüper, H. G. (1978). Proposal to place the nomenclature of the cyanobacteria (blue-green algae) under the rules of the International Code of Nomenclature of Bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 28(2), 335-336.

Staunton, J., & Weissman, K. J. (2001). Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Natural product reports*, 18(4), 380-416.

Stewart I., Seawright A.A., Shaw G.R. (2008) Cyanobacterial poisoning in livestock, wild mammals and birds – an overview. In: Hudnell H.K. (eds) Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State

of the Science and Research Needs. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 619. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-0-387-75865-7_28

Stockner, J. G., & Porter, K. G. (1988). Microbial food webs in freshwater planktonic ecosystems. In *Complex interactions in lake communities* (pp. 69-83). Springer, New York, NY.

Strickland JD, TR Parsons (1972). Determinación de nitrito reactivo. Un manual práctico de análisis de agua de mar. *Toro. Pez. Res. Tablero Can.*, 167, págs. 71 – 75

Sukenik, A., Quesada, A., & Salmaso, N. (2015). Global expansion of toxic and non-toxic cyanobacteria: effect on ecosystem functioning. *Biodiversity and Conservation*, 24(4), 889-908.

Tan, X.; Gu, H.; Ruan, Y.; Zhong, J.; Parajuli, K.; Hu, J., (2019), Effects of nitrogen on interspecific competition between two cell-size cyanobacteria: *Microcystis aeruginosa* and *Synechococcus* sp. *Harmful Algae*, 89, 101661. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.101661>.

Taylor, E. Windle (1958). *The Examination of Waters and Water Supplies* (Thresh, Beale and Suckling). London: J. & A. Churchill, p. 557.

Teichberg, M., Fox, S. E., Olsen, Y. S., Valiela, I., Martinetto, P., Iribarne, O., ... & Tagliapietra, D. (2010). Eutrophication and macroalgal blooms in temperate and tropical coastal waters: nutrient enrichment experiments with *Ulva* spp. *Global Change Biology*, 16(9), 2624-2637.

Texeira, M. D. G. L. C., Costa, M. D. C. N., Carvalho, V. L. P. D., Pereira, M. D. S., & Hage, E. (1993). Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica Dam, Bahia, Brazil. *Bulletin of the Pan American Health Organization* (PAHO); 27 (3), 1993.

Tillett, D., Dittmann, E., Erhard, M., von Döhren, H., Börner, T., and Neilan, B.A. (2000) Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. *Chem Biol* 7: 753–764

Tomasini Ortiz, C., Moeller Chávez, G., Sánchez Chávez, J., & Bravo Inclán, L. (2012). Cianobacterias y cianotoxinas en el lago de Pátzcuaro, Michoacán, México. repositorio.imta.mx

- Tooming-Klunderud, A., Mikalsen, B., Kristensen, T., & Jakobsen, K. S. (2008). The mosaic structure of the *mcyABC* operon in *Microcystis*. *Microbiology*, 154(7), 1886-1899.
- Turner, P. C., Gammie, A. J., Hollinrake, K., & Codd, G. A. (1990). Pneumonia associated with contact with cyanobacteria. *BMJ: British Medical Journal*, 300(6737), 1440.
- Tanabe, Y., Kaya, K., & Watanabe, M. M. (2004). Evidence for Recombination in the Microcystin Synthetase (*mcy*) Genes of Toxic Cyanobacteria *Microcystis spp.* *Journal of molecular evolution*, 58(6), 633-641.
- Utkilen, H., & Gjølme, N. I. N. A. (1995). Iron-stimulated toxin production in *Microcystis aeruginosa*. *Applied and environmental microbiology*, 61(2), 797-800.
- Valadez, F., Rosiles-González, G., Almazán-Becerril, A., & Merino-Ibarra, M. (2013). Las cianobacterias planctónicas del lago tropical carstico Lagartos de la Península de Yucatán, México. *Revista de Biología Tropical*, 61(2), 971-980.
- Valhondo, C., & Carrera, J. (2019). Water as a finite resource: From historical accomplishments to emerging challenges and artificial recharge. In *Sustainable Water and Wastewater Processing* (pp. 1-17). Elsevier.
- Van de Waal, D. B., Verspagen, J. M., Lüring, M., Van Donk, E., Visser, P. M., & Huisman, J. (2009). The ecological stoichiometry of toxins produced by harmful cyanobacteria: an experimental test of the carbon-nutrient balance hypothesis. *Ecology letters*, 12(12), 1326-1335.
- Van der Westhuizen, A. J., & Eloff, J. N. (1983). Effect of culture age and pH of culture medium on the growth and toxicity of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 110(2), 157-163.
- 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.
- Vasanthavigar, M., Srinivasamoorthy, K., Vijayaragavan, K., Rajiv Ganthi, R., Chidambaram, S., Anandhan, P., ... & Vasudevan, S. (2010). Application of water quality index for groundwater quality assessment: Thirumanimuttar sub-basin, Tamilnadu, India. *Environmental monitoring and assessment*, 171(1), 595-609.

- Velázquez, G., 1995, Estudio geoquímico del anillo de cenotes, M.S. Thesis, Instituto de Geofísica, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Verspagen, J. M., Van De Waal, D. B., Finke, J. F., Visser, P. M., Van Donk, E., and Huisman, J. (2014). Rising CO₂ levels will intensify phytoplankton blooms in eutrophic and hypertrophic lakes. *PLoS One* 9: e104325. doi: 10.1371/journal.pone.0104325
- Vining, L., 1990, C Funciones de metabolitos secundarios. *Annu Rev. Microbiol.*, 44, 395–427.
- Vining, L. C. (1992). Role of secondary metabolites from microbes. In Symposium on Secondary Metabolites: Their Function and Evolution (pp. 184-198).
- Vidal, F., Sedan, D., D'Agostino, D., Cavalieri, M. L., Mullen, E., Parot Varela, M. M., Flore C., Caixach J., & Andrinolo, D. (2017). Recreational exposure during algal bloom in Carrasco Beach, Uruguay: A liver failure case report. *Toxins*, 9(9), 267.
- Voloshynovych, V. M., Kasala, R. O., Stambulska, U. Y., & Voloshynovych, M. S. (2019). Determination the presence of amplification products of 16s rRNA *Microcystis aeruginosa* as a biomarker of drowning. *Romanian Journal of Legal Medicine*, 27(1), 16-21.
- Walls, J. T., Wyatt, K. H., Doll, J. C., Rubenstein, E. M., & Rober, A. R. (2018). Hot and toxic: Temperature regulates microcystin release from cyanobacteria. *Science of the Total Environment*, 610, 786-795.
- Wang, L. K., Vielkind, D., & Wang, M. H. (1978). Mathematical models of dissolved oxygen concentration in fresh water. *Ecological Modelling*, 5(2), 115-123.
- Wang, Z., Song, G., Li, Y., Yu, G., Hou, X., Gan, Z., & Li, R. (2019). The diversity, origin, and evolutionary analysis of geosmin synthase gene in cyanobacteria. *Science of The Total Environment*, 689, 789-796.
- Wei, N.; Hu, L.; Song, L.; Gan, N. (2016). Patrones de proteínas unidas a microcistina en diferentes cultivos de *Microcystis aeruginosa* y muestras de campo. *Toxins* 2016, 8, 293.
- Welker, M., & Von Döhren, H. (2006). Cyanobacterial peptides—natures own combinatorial biosynthesis. *FEMS microbiology reviews*, 30(4), 530-563.

- Whitton, B.A., Potts, M., (2000). *The Ecology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Whitton, B. A., & Potts, M. (2012). Introduction to the cyanobacteria. In *Ecology of Cyanobacteria II* (pp. 1-13). Springer, Dordrecht.
- Williams, C.D.; Aubel, M.T.; Chapman, A.D.; D'Aiuto, P.E (2007). Identification of cyanobacterial toxins in Florida's freshwater systems. *Lake and Reservoir Management*, 2007, 23(2), 144-152. <https://doi.org/10.1080/07438140709353917>
- Wilmotte, A. (1994). Molecular evolution and taxonomy of the cyanobacteria. In *The molecular biology of cyanobacteria* (pp. 1-25). Springer, Dordrecht.
- Wilson, A., Kinney, J. N., Zwart, P. H., Punginelli, C., D'haene, S., Perreau, F., *et al.*, (2010). Structural determinants underlying photoprotection in the photoactive orange carotenoid protein of cyanobacteria. *J. Biol. Chem.* 285, 18364–18375. doi: 10.1074/jbc.m110.115709
- World Health Organization. (2003). *Guidelines for safe recreational water environments: Coastal and fresh waters* (Vol. 1). World Health Organization.
- Wurtsbaugh, W. A., Paerl, H. W., & Dodds, W. K. (2019). Nutrients, eutrophication, and harmful algal blooms along the freshwater to marine continuum. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Water*, 6(5), e1373.
- Xue, Q., Rediske, R. R., Gong, Z., Su, X., Xu, H., Cai, Y., ... & Xie, L. (2018). Spatio-temporal variation of microcystins and its relationship to biotic and abiotic factors in Hongze Lake, China. *Journal of Great Lakes Research*, 44(2), 253-262.
- Yadav, S.; Anam, G.B.; Ahn, Y.H. Influence of Abiotic Factors on the Growth of Cyanobacteria Isolated from Nakdong River, South Korea¹. *Journal of Phycology*, 2021, 57(3), 874-885. <https://doi.org/10.1111/jpy.13143>
- Yan, H., Wu, D., Huang, Y., Wang, G., Shang, M., Xu, J., ... & Zhao, Y. (2017). Water eutrophication assessment based on rough set and multidimensional cloud model. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 164, 103-112.

- Yang, X. E., Wu, X., Hao, H. L., & He, Z. L. (2008). Mechanisms and assessment of water eutrophication. *Journal of zhejiang university Science B*, 9(3), 197-209.
- Yang, J., Tang, H., Zhang, X., Zhu, X., Huang, Y., & Yang, Z. (2018). High temperature and pH favor *Microcystis aeruginosa* to outcompete *Scenedesmus obliquus*. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(5), 4794-4802.
- Yan, D., Xu, H., Yang, M., Lan, J., Hou, W., Wang, F., ... Goldsmith, Y. (2019). Responses of cyanobacteria to climate and human activities at Lake Chenghai over the past 100 years. *Ecological Indicators*.
- 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.
- Žegura, B., Lah, T. T., & Filipič, M. (2006). Alteration of intracellular GSH levels and its role in microcystin-LR-induced DNA damage in human hepatoma HepG2 cells. *Mutation research/genetic toxicology and environmental mutagenesis*, 611(1-2), 25-33.
- Zepernick, B. N., Gann, E. R., Martin, R. M., Pound, H. L., Krausfeldt, L. E., Chaffin, J. D., & Wilhelm, S. W. (2021). Elevated pH Conditions Associated with *Microcystis spp.* Blooms Decrease Viability of the Cultured Diatom *Fragilaria crotonensis* and Natural Diatoms in Lake Erie. *Frontiers in microbiology*, 12, 188.
- Zhang, J., Gilbert, D., Gooday, A. J., Levin, L., Naqvi, S. W. A., Middelburg, J. J., ... & Van der Plas, A. K. (2010). Natural and human-induced hypoxia and consequences for coastal areas: synthesis and future development. *Biogeosciences*, 7(5), 1443-1467.
- Zhao, C. S., Shao, N. F., Yang, S. T., Ren, H., Ge, Y. R., Feng, P., ... & Zhao, Y. (2019). Predicting cyanobacteria bloom occurrence in lakes and reservoirs before blooms occur. *Science of the total environment*, 670, 837-848.
- Zilberg, B. (1966). Gastroenteritis in Salisbury European children-a five-year study. *Central African journal of medicine*, 12(9), 164-168.
- Zilliges, Y., Kehr, J. C., Meissner, S., Ishida, K., Mikkat, S., Hagemann, M., ... & Dittmann, E. (2011). The cyanobacterial hepatotoxin microcystin binds to proteins and increases the fitness of *Microcystis* under oxidative stress conditions. *PloS one*, 6(3), e17615.

- Zimba, P. V., & Grimm, C. C. (2003). A synoptic survey of musty/muddy odor metabolites and microcystin toxin occurrence and concentration in southeastern USA channel catfish (*Ictalurus punctatus* Ralfinesque) production ponds. *Aquaculture*, 218(1-4), 81-87.
- Zou, W., Zhu, G., Cai, Y., Xu, H., Zhu, M., Gong, Z., ... & Qin, B. (2020). Quantifying the dependence of cyanobacterial growth to nutrient for the eutrophication management of temperate-subtropical shallow lakes. *Water research*, 177, 115806.
- Zepernick, B. N., Gann, E. R., Martin, R. M., Pound, H. L., Krausfeldt, L. E., Chaffin, J. D., & Wilhelm, S. W. (2021). Elevated pH Conditions Associated with *Microcystis spp.* Blooms Decrease Viability of the Cultured Diatom *Fragilaria crotonensis* and Natural Diatoms in Lake Erie. *Frontiers in microbiology*, 12, 188.