



**COORDINACIÓN DE DESARROLLO
PROFESIONAL E INSTITUCIONAL**

SUBCOORDINACIÓN DE POSGRADO

T E S I S

**DETERMINACIÓN DEL EFECTO ALELOPÁTICO DEL EXTRACTO DE
Oryza sativa L. SOBRE EL CRECIMIENTO DE CIANOBACTERIAS
PRODUCTORAS DE TOXINAS**

que para obtener el grado de
**Maestro en
Ciencias y Tecnología del Agua**

presenta
René Solano Jiménez

Tutora: Dra. Ana María Sandoval Villasana

Con fundamento en los artículos 21 y 27 de la Ley Federal del Derecho de Autor y como titular de los derechos moral y patrimoniales de la obra titulada "DETERMINACIÓN DEL EFECTO ALELOPÁTICO DEL EXTRACTO DE *Oryza sativa* L. SOBRE EL CRECIMIENTO DE CIANOBACTERIAS PRODUCTORAS DE TOXINAS", otorgo de manera gratuita y permanente al Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, autorización para que fijen la obra en cualquier medio, incluido el electrónico, y la divulguen entre su personal, estudiantes o terceras personas, sin que pueda percibir por tal divulgación una contraprestación.

RENÉ SOLANO JIMÉNEZ

Jiutepec, Morelos a 16 de Agosto de 2018

DEDICATORIAS

**A MIS PADRES RAÚL SOLANO JIMÉNEZ Y AMPARO JIMÉNEZ
MIRANDA POR SU APOYO INCONDICIONAL QUE ME HAN
BRINDADO A LO LARGO DE MI VIDA**

**A MIS HERMANOS Y HERMANAS CON QUIENES HE
COMPARTIDO UN SIN NÚMERO DE VIVENCIAS, SIEMPRE
AYUDÁNDOME E IMPULSÁNDOME EN TODO LO QUE HE
DECIDIDO EMPRENDER**

**A ZURY POR SER UN ENORME APOYO EMOCIONAL CON SUS
PALABRAS DE ÁNIMO Y POR BRINDARME SU COMPAÑÍA EN
LOS BUENOS Y MALOS MOMENTOS**

A TODOS ELLOS, ¡MUCHAS GRACIAS!

AGRADECIMIENTOS

A LA DIRECCIÓN DE POSGRADO DEL INSTITUTO MEXICANO DE TECNOLOGÍA DEL AGUA.

AL CONACyT DE QUIEN FUI BECARIO DURANTE LOS AÑOS DE LA MAESTRÍA.

MUY ESPECIAL A LA DRA. ANA MARÍA SANDOVAL VILLASANA, QUIEN DESDE MI INVESTIGACIÓN DE LICENCIATURA Y AHORA CON MI TESIS DE MAESTRÍA ME HA DOTADO DE MÚLTIPLES CONOCIMIENTOS, ENCAMINÁNDOME SIEMPRE A LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y AUXILIÁNDOME INCONDICIONALMENTE EN EL DESARROLLO DE ESTA INVESTIGACIÓN.

A LOS MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL: DR. ROBERTO VILLAGÓMEZ IBARRA, M. en C. ALEJANDRO JESÚS RUÍZ LÓPEZ Y M. en C. ANA CECILIA TOMASINI ORTIZ, QUIENES ME GUIARON EN EL DESARROLLO DE MI INVESTIGACIÓN.

A LAS DRAS. ANDREA BEDOYA LÓPEZ, GLORIA SOLDEVILA Y ROXANA OLGUÍN ALOR DEL LABORATORIO NACIONAL DE CITOMETRÍA POR TODO EL APOYO BRINDADO.

CONTENIDO

RESUMEN	1
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	2
2. JUSTIFICACIÓN Y ALCANCES	4
3. OBJETIVOS.....	5
4. MARCO TEÓRICO	6
4.1 Cianobacterias	6
4.2.1 Eutrofización	8
4.2.2 Disponibilidad de luz	10
4.2.3 El calentamiento global.....	10
4.4 Ocurrencia y propiedades de las cianotoxinas.....	12
4.4.1 Hepatotoxinas	13
4.4.2 Neurotoxinas.....	15
4.4.3. Dermatotoxinas.....	17
4.5 Florecimientos de cianobacterias en México	18
4.6 Métodos para el manejo de floraciones de cianobacterias tóxicas	20
4.6.1 Control de las floraciones con métodos físicos.....	20
4.6.2 Control de los florecimientos con métodos químicos	22
4.6.3 Control de las floraciones con métodos biológicos	26
4.7 Arroz de Morelos variedad A-98.....	41
5. METODOLOGÍA	43
5.1 Obtención de los extractos crudos	43
5.1.1 Extracción por reflujo	43
5.1.2 Filtración y evaporación del disolvente.	44

5.1.4 Rendimiento de los extractos crudos	47
5.2 Cromatografía en placa.....	48
5.3 Análisis de los extractos crudos mediante RMN	50
5.4 Obtención de fracciones del extracto crudo mediante cromatografía en columna	53
5.4.1 Preparación de la columna cromatográfica.....	53
5.5 Cultivo de las cianobacterias.....	67
5.5.1 Preparación de los medios de cultivo	67
5.5.2 Cultivo de <i>Anabaena cylindrica</i> y <i>Anabaena sp.</i>	69
5.5.3 Aislamiento de <i>Microcystis aeruginosa</i> de una muestra ambiental.....	70
5.6 Prueba alguicida sobre en <i>Microcystis aeruginosa</i> mediante el conteo con el hemocitómetro Neubauer.....	71
5.6.1 Prueba alguicida 1	72
5.6.2 Conteo celular con la cámara de Neubauer.....	74
5.6.3 Determinación de la densidad celular y de la actividad alelopática	75
5.7 Prueba alguicida sobre <i>Anabaena cylindrica</i> , <i>Anabaena sp.</i> y <i>Microcystis aeruginosa</i> utilizando la técnica de citometría de flujo.....	76
5.7.1 Método de análisis e instrumentos utilizados.....	76
6. RESULTADOS	84
7. DISCUSIÓN.....	97
8. CONCLUSIONES	101
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura. 1 a) Embalse Dique San Roque, Argentina, b) Florecimiento de <i>Microcystis aeruginosa</i> en el Lago Erie, Estados Unidos-Canadá, c) Florecimiento de <i>Lyngbya sp.</i> en el Lago Atitlán, Guatemala, d) Lago Utah, Estados Unidos. e) Dominancia de <i>Microcystis aeruginosa</i> en el Lago de Chapultepec, México, f) Especies <i>Nodularia</i> , <i>Anabaena</i> y <i>Microcystis</i> en el Mar Báltico.....	7
Figura. 2. Relaciones temperatura-crecimiento entre cuatro grupos taxonómicos diferentes (cianobacterias, clorofitas, dinoflagelados y diatomeas). La línea punteada indica la temperatura óptima de crecimiento. Fuente: Paerl, 2014.....	11
Figura. 3. Efectos relativos de los nutrientes, de la temperatura y de su interacción en el biovolumen cianobacterial en lagos oligotróficos, mesotróficos, eutróficos e hiper-eutróficos. Fuente: Rigosi <i>et al.</i> , 2014.....	12
Figura. 4. a) Estructura química de la microcistina, b) nodularina,.....	18
Figura. 5. Requisitos para determinar la existencia de actividad alelopática de macrófitas sobre cianobacterias.....	30
Figura. 6. Esquema genealógico utilizado para la obtención del arroz	41
Figura. 7. Extracción por reflujo con metanol.	44
Figura. 8. Recuperación de los solventes utilizando el rotavapor.....	45
Figura. 9. Extracción por maceración con etanol.	46
Figura. 10. Extractos crudos obtenidos con metanol, etanol y acetato de etilo.	46
Figura. 11. Cromatografía en placa de los extractos crudos utilizando diferentes mezclas de solventes.	49
Figura. 12. Revelado de las cromatografías en placa. Arriba, revelado con yodo. Abajo, revelado con ácido sulfúrico.....	49
Figura. 13. Prueba de solubilidad en DMSO.	50
Figura. 14. Extracto suspendido en DMSO-d6.....	51
Figura. 15. Equipo de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	51
Figura. 16. Espectro de RMN del extracto etanólico a temperatura ambiente.	52
Figura. 17. Espectro de RMN del extracto obtenido por reflujo con AcOEt.	52
Figura. 18. Activación del solvente y colocado del extracto.	53

Figura. 19. Cromatografías en columna.	57
Figura. 20. Placa 2 revelada con luz UV y yodo.....	59
Figura. 21. Placa 3 revelada con luz UV y yodo.....	59
Figura. 22. Placa 4 revelada con luz UV y yodo.....	60
Figura. 23. Viales de las cromatografías en columna de Hex-AcOEt.....	61
Figura. 24. Placa 1 revelada con ácido sulfúrico.....	62
Figura. 25. Placa 2 revelada con luz UV y yodo.....	63
Figura. 26. Viales de las cromatografías en columna de AcOEt-MeOH.....	64
Figura. 27. Espectro de RMN (VIAL 1) de las fracciones 1-3 Hex hasta 4-6 8:2 Hex-AcOEt.	64
Figura. 28. Espectro de RMN (VIAL 4) de las fracciones 10-12 6:4 hasta 7-9 5:5 Hex-AcOEt.	65
Figura. 29. Espectro de RMN (VIAL 6) de las fracciones 10-12 5:5 hasta 1-6 1:9 Hex-AcOEt.	65
Figura. 30. Espectro de RMN (VIAL 7) de las fracciones 7-12 1:9 Hex-AcOEt hasta 1-4 AcOEt.....	66
Figura. 31. Espectro de RMN (VIAL 2) de las fracciones 10-12 9:1 hasta 10-12 8:2 AcOEt-MeOH.	66
Figura. 32. Espectro de RMN (VIAL 4) de las fracciones 7-9 7:3 hasta 7-9 5:5 AcOEt-MeOH.	67
Figura. 33. Crecimiento de <i>Anabaena cylindrica</i> y <i>Anabaena</i> sp.; a) a los 2 días, b) a los 5 días, c) a 7 los días y d) a 8 los días.	69
Figura. 34. a) Primero, b) Segundo y c) 3er aislamiento de <i>M. aeruginosa</i>	70
Figura. 35. <i>M. aeruginosa</i> después de 8 días de crecimiento.	70
Figura. 36. Obtención de las concentraciones a analizar.....	71
Figura. 37. Soluciones de 1000, 100, 10 y 1 mg/L.	72
Figura. 38. Esquema de la Prueba alguicida 1.....	73
Figura. 39. Prueba alguicida en cuarto a 250-290 luxes y 28 °C.	73
Figura. 40. Prueba alguicida en cámara de luz blanca a 4000 luxes y 30 °C.....	74
Figura. 41. Conteo de <i>Microcystis aeruginosa</i> con el hemocitómetro de Neubauer.	75

Figura. 42. Diagrama de fluorescencia, izquierda) % de células de cianobacterias, derecha) % de viabilidad.	82
Figura. 43. Viabilidad celular VivaFix. a) Célula viva con VivaFix unido a la superficie de la membrana celular, b) célula muerta con VivaFix unido de manera superficial e intracelular.	82
Figura. 44. Número total de cianobacterias vivas después de 10 días de exposición al extracto. Prueba alguicida 1.	88
Figura. 45. Número total de cianobacterias vivas después de 10 días de exposición al extracto. Prueba alguicida 2.	88
Figura. 46. Frecuencia de cianobacterias vivas (VivaFix -) y cianobacterias muertas (VivaFix+) en presencia del extracto crudo.	90
Figura. 47. Frecuencia de cianobacterias vivas (VivaFix -) y cianobacterias muertas (VivaFix+) en presencia del extracto puro.	91
Figura. 48. Número total de cianobacterias vivas (VivaFix -) y cianobacterias muertas (VivaFix+) en presencia del extracto crudo.	92
Figura. 49. Número total de cianobacterias vivas (VivaFix -) y cianobacterias muertas (VivaFix+) en presencia del extracto puro.	93
Figura. 50. Relación de la intensidad de fluorescencia de Clorofila/FSC-W en <i>Microcystis aeruginosa</i>	94
Figura. 51. Relación de la intensidad de fluorescencia de Clorofila/FSC-W en <i>Anabaena cylindrica</i>	94
Figura. 52. Relación de la intensidad de fluorescencia de Clorofila/FSC-W en <i>Anabaena sp.</i>	95

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Macrófitas sumergidas y su actividad inhibitoria sobre cianobacterias....	31
Tabla 2. Rendimiento en gramos de los extractos crudos.....	47
Tabla 3. Mezclas de solventes utilizadas en la cámara cromatográfica.	48
Tabla 4. Mezcla de solventes utilizados en la cromatografía en columna.	54
Tabla 5. Fracciones unidas debido a su coloración.....	58
Tabla 6. Fracciones analizadas mediante cromatografía en placa.....	58
Tabla 7. Fracciones analizadas mediante cromatografía en placa.....	61
Tabla 8. Fracciones analizadas mediante cromatografía en placa.....	62
Tabla 9. Reactivos utilizados para el medio de cultivo BG-11.....	68
Tabla 10. Solución de metales traza.	68
Tabla 11. Reactivos utilizados para el medio BG-11(-N).....	68
Tabla 12. Muestras de <i>Microcystis aeruginosa</i> , <i>Anabaena cylindrica</i> y <i>Anabaena sp.</i> , día 0.....	77
Tabla 13. Muestras de <i>Microcystis aeruginosa</i> , extracto crudo, día 10.....	77
Tabla 14. Muestras de <i>Microcystis aeruginosa</i> , extracto puro, día 10.....	78
Tabla 15. Muestras de <i>Anabaena cylindrica</i> , extracto crudo, día 10.....	78
Tabla 16. Muestras de <i>Anabaena cylindrica</i> , extracto puro, día 10.....	79
Tabla 17. Muestras de <i>Anabaena sp.</i> , extracto crudo, día 10.....	79
Tabla 18. Muestras de <i>Anabaena sp.</i> , extracto puro, día 10.....	80
Tabla 19. Prueba alguicida 1. Conteo celular, día 0.....	84
Tabla 20. Prueba alguicida 1. Conteo celular, día 2.....	84
Tabla 21. Prueba alguicida 1. Conteo celular, día 4.....	85
Tabla 22. Prueba alguicida 1. Conteo celular, día 6.....	85
Tabla 23. Prueba alguicida 1. Conteo celular, día 8.....	85
Tabla 24. Prueba alguicida 1. Conteo celular, día 10.....	86
Tabla 25. Prueba alguicida 2. Conteo celular, día 0.....	86
Tabla 26. Prueba alguicida 2. Conteo celular, día 2.....	86
Tabla 27. Prueba alguicida 2. Conteo celular, día 6.....	87
Tabla 28. Prueba alguicida 2. Conteo celular, día 8.....	87
Tabla 29. Prueba alguicida 2. Conteo celular, día 10.....	87

RESUMEN

Los compuestos alelopáticos liberados por algunas plantas acuáticas (macrófitas) son sugeridos cada vez más como una medida natural y efectiva para controlar las floraciones de cianobacterias en los cuerpos de agua. En este trabajo se probaron dos extractos de cascarilla de arroz (*Oryza sativa* L.) variedad A-98 mejorada genéticamente en el INIFAP del municipio de Zacatepec, Morelos. El primero fue un extracto crudo obtenido mediante maceración en etanol a temperatura ambiente, el segundo fue un extracto que contenía las fracciones 10-12 40:60; 1-3, 4-8 y 9-12 30:70; 1-6 y 7-12 20:80; y 1-6 10-90 Hex-AcOEt obtenidas mediante cromatografía en columna y analizadas en cromatografía en capa fina. Fueron analizados también mediante la técnica de Resonancia Magnética Nuclear de Protón (RMN ^1H) para comparar los espectros correspondientes a cada uno de ellos. Las cianobacterias utilizadas fueron *Anabaena cylindrica* (UTEX B 629), *Anabaena* sp. (UTEX 2576) y *Microcystis aeruginosa* (aislada de una muestra ambiental), las cuales se cultivaron en los medios de cultivo BG-11 para *A. cylindrica* y *M. aeruginosa* y BG-11 (-N) para *Anabaena* sp., a una temperatura promedio de 28 °C y 2900 luxes de luz blanca durante 7 días. Para evaluar el efecto alelopático de los extractos, se utilizaron concentraciones de 1, 10, 100 y 1000 mg/L durante un periodo de 10 días. Finalmente, mediante la técnica de citometría de flujo se determinó el número de células totales, número de células vivas, número de células muertas y la viabilidad en las cuatro concentraciones de cada una de las cianobacterias para ambos extractos. Los resultados obtenidos muestran que los dos extractos tuvieron un efecto alguicida a altas concentraciones sobre *A. cylindrica* y *A. sp.*; no obstante, en el caso de *M. aeruginosa* se observó un efecto alguistático también a altas concentraciones.

Palabras clave: *Oryza sativa* L., efecto alelopático, citometría de flujo, *Anabaena cylindrica*, *Anabaena* sp., *Microcystis aeruginosa*.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las floraciones nocivas de cianobacterias son un problema global de contaminación ambiental acuática. En las últimas décadas estos florecimientos han atraído la atención mundial no solo por su duración y frecuencia, sino también por los polipéptidos (cianotoxinas) altamente tóxicos y estables que producen. Estos polipéptidos son hepatotóxicos para humanos y animales domésticos y podrían inducir la muerte en animales salvajes (Xiao *et al.*, 2014). Algunas de las cianobacterias más habituales que producen toxinas incluyen los géneros fijadores de N₂ como *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Lyngbya*, *Nodularia*, *Oscillatoria* y *Trichodesmium*; y los no-fijadores de N₂ como *Microcystis* y *Planktothrix* (Corbel *et al.*, 2014; Sukenik *et al.*, 2015).

Las poblaciones de cianobacterias suelen estar influenciadas por factores ambientales y procesos como eutrofización, calentamiento global, y a otra escala por disponibilidad de luz y la alelopatía. El resultado de la óptima conjunción de estos factores, es el desarrollo masivo de especies de cianobacterias, los que en ocasiones suelen estar asociados a la presencia de cianotoxinas (Paerl y Otten, 2013).

En un contexto nacional, en México se han documentado varios casos de florecimientos de cianobacterias tóxicas en el Lago de Pátzcuaro, Michoacán (Berry *et al.*, 2011), en el Lago de Alchichica, Puebla (Oliva, 2009), en el Lago de Catemaco, Veracruz (Berry *et al.*, 2012). Así como en los estados de Jalisco, San Luis Potosí, Querétaro, Guanajuato, Oaxaca, Estado de México y en diferentes cuerpos de agua de la Ciudad de México, como el Lago de Chapultepec, los canales de Xochimilco y Cuemanco (Tomasini *et al.*, 2012).

El estado actual de este fenómeno global ha llevado a proponer una variedad de métodos físicos, químicos y biológicos para control de los florecimientos de cianobacterias en los cuerpos de agua dulce los cuales resultan eficaces a pequeña escala; sin embargo, no pueden aplicarse en la realidad debido a una serie de inconvenientes que presentan como el alto consumo en energía, tienden

a ser de baja eficiencia y pueden causar daños a organismos no perjudiciales. Un número cada vez mayor de estudios ha tenido como objetivo identificar especies de macrófitas alelopáticamente activas que pueden ser adecuadas como medida de control para cianobacterias en lagos hipertróficos o detectar aleloquímicos naturales con el potencial de desarrollar "alguicidas" biológicos efectivos contra las floraciones dañinas de cianobacterias (Shao *et. al.*, 2013).

El objetivo principal de este trabajo fue determinar el efecto alelopático de dos extractos de *Oryza sativa* L. variedad A-98 sobre el crecimiento de *Anabaena cylindrica* (UTEX B 629), *Anabaena sp.* (UTEX 2576) y *Microcystis aeruginosa* (aislada de una muestra ambiental) como un método biológico efectivo para el control de florecimientos de cianobacterias productoras de toxinas. Los extractos fueron obtenidos uno mediante maceración a temperatura ambiente y posteriormente analizado mediante cromatografía en capa fina, y otro purificado mediante una serie de cromatografías en columna utilizando mezclas de hexano, acetato de etilo y metanol. Finalmente, ambos fueron examinados mediante Resonancia Magnética Nuclear de Protón (RMN ^1H).

2. JUSTIFICACIÓN Y ALCANCES

Desde hace varias décadas los florecimientos masivos de cianobacterias han sido cada vez más frecuentes en todo el mundo, generando severas afectaciones en los cuerpos de agua donde se desarrollan. Muchos florecimientos producen metabolitos secundarios altamente tóxicos para la vida acuática y para los seres humanos.

Se han propuesto una serie de métodos físicos y químicos para el control de estos florecimientos. Los métodos físicos tienen muchas desventajas e incluso en algunos casos pueden llegar a ser contraproducentes; los métodos químicos utilizan compuestos altamente tóxicos que tienen una amplia gama de acción no solo contra las cianobacterias, sino que afectan a todos los organismos presentes en el cuerpo de agua.

Debido a esta situación resulta de vital importancia encontrar un método biológico que sea eficaz y amigable con el medio ambiente para el control de los florecimientos de cianobacterias tóxicas, utilizando extractos de plantas que presenten actividades alelopáticas específicas en contra de estas cianobacterias sin que afecten a otros organismos presentes en el mismo cuerpo de agua.

En esta investigación se analizaron los efectos de dos extractos de cascarilla de arroz variedad A-98 cultivado en el estado de Morelos a diferentes concentraciones (1, 10, 100 y 1000 mg/L) como un método de control biológico, aprovechando la actividad alelopática de este subproducto agrícola en contra del crecimiento de tres cianobacterias productoras de toxinas a escala de laboratorio.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Determinar el efecto inhibitorio de los aleloquímicos presentes en el extracto de la cascarilla de arroz en el crecimiento de cianobacterias productoras de toxinas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar con la ayuda de la técnica de RMN H¹ el extracto crudo que contenga una mayor cantidad de compuestos polifenólicos.
- Encontrar mediante cromatografía en columna una fracción del extracto crudo que presente una mayor concentración de compuestos polifenólicos.
- Obtener un cultivo unialgal de *Microcystis* de una muestra ambiental.
- Realizar un bioensayo alguicida utilizando el hemocitómetro de Neubauer para determinar el porcentaje de inhibición de los extractos.
- Analizar mediante citometría de flujo el porcentaje de inhibición de los extractos en cultivos puros de *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena cylindrica* y *Anabaena sp.*
- Demostrar por medio de un análisis estadístico (ANOVA de dos vías) si existe una diferencia significativa en el grado de inhibición de las cianobacterias por parte del extracto crudo y del purificado.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 Cianobacterias

Las cianobacterias son organismos fototróficos que se desarrollaron y proliferaron inicialmente en la Era Precámbrica hace unos 3.5 billones de años, trayendo consigo enormes alteraciones biogeoquímicas y climatológicas, incluyendo oscilaciones extremas en la irradiación y la temperatura, el aumento en los niveles de oxígeno (debido en gran parte a sus propias actividades fotosintéticas) y la alteración en la composición química de la atmosfera terrestre, generando las condiciones óptimas para el progreso de la vida vegetal y animal terrestre y acuática superior (Paerl, 2014). Una gran cantidad de géneros cianobacterianos tienen habilidades que les han permitido aprovechar ambientes tanto terrestres como acuáticos con características muy variadas en todo el mundo. Estas habilidades son principalmente la fijación de nitrógeno atmosférico (N_2), el almacenamiento de fósforo (P), el secuestro el hierro (Fe) y una variedad de metales traza, pero debido a las actuales modificaciones antropogénicas de los cuerpos de agua estos organismos están mostrando estrategias ecofisiológicas para adaptarse a estas nuevas condiciones; especialmente ante el sobre-enriquecimiento de nutrientes y alteraciones hidrológicas en los ecosistemas con ejemplos dramáticos que abarcan todo el mundo (Paerl y Otten, 2013).

“Hay alrededor de 2,000 especies de cianobacterias conocidas en el mundo. De acuerdo a su morfología se pueden dividir en *Chloococcales*, *Pleurocapsales*, *Oscillatoriales*, *Nostocales* y *Trichosanthales*, pueden reproducirse por fisión y a través de la formación de esporas” (Cheng *et al.*, 2017).

En un contexto ambiental, los efectos negativos de la presencia de florecimientos de cianobacterias dañinas comienzan con un decaimiento de la transparencia del agua, disminución del oxígeno disuelto, aumento del pH y la alteración de los ciclos biogeoquímicos, seguido de la interrupción del crecimiento de las macrófitas

acuáticas, afectando también a los invertebrados y peces (Paerl, 2014; Sukenik *et al.*, 2015). Un gran número florecimientos producen metabolitos secundarios tóxicos que pueden provocar una intoxicación severa en mamíferos (incluyendo humanos). Algunas de las cianobacterias más habituales que producen toxinas incluyen los géneros fijadores de N₂ como *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Lyngbya*, *Nodularia*, *Oscillatoria* y *Trichodesmium*; y los no-fijadores de N₂ como *Microcystis* y *Planktothrix* (Corbel *et. al.*, 2014; Sukenik *et. al.*, 2015).

Muchos metabolitos secundarios no representan una amenaza para la salud humana, pero pueden causar problemas estéticos como los compuestos de sabor y olor y afectar la percepción del público sobre la seguridad del agua potable. Los olores más frecuentes encontrados en el agua potable son los metabolitos asociados a cianobacterias, geosmina, 2-MIB, β-ciclocitral, β-ionona, heptanal, dimetil sulfuro y dimetil trisulfuro (Zhang *et al.*, 2013). En la Figura 1 se muestran florecimientos de cianobacterias dañinas alrededor del mundo.

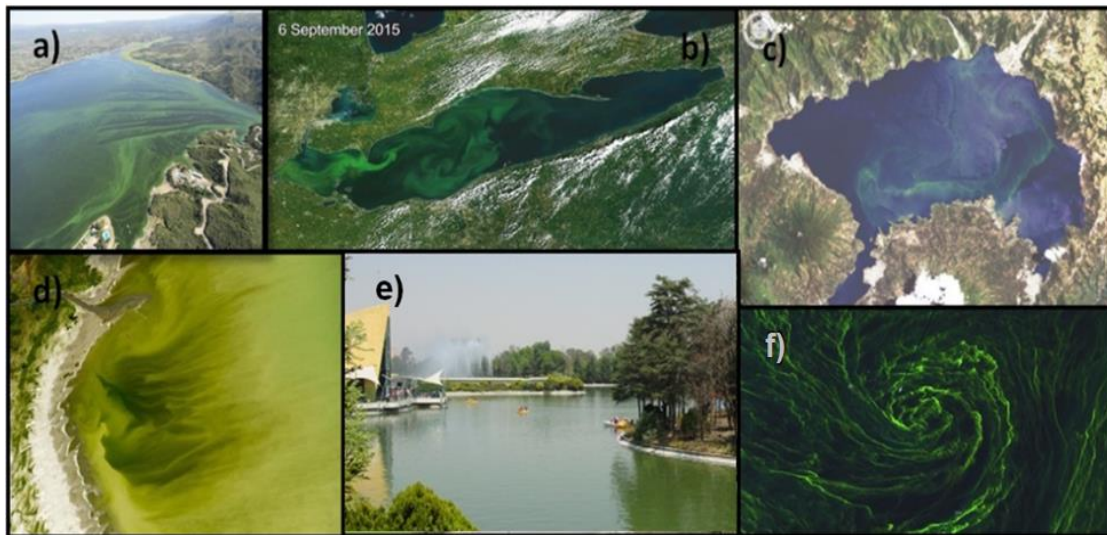


Figura. 1 a) Embalse Dique San Roque, Argentina, b) Florecimiento de *Microcystis aeruginosa* en el Lago Erie, Estados Unidos-Canadá, c) Florecimiento de *Lyngbya sp.* en el Lago Atitlán, Guatemala, d) Lago Utah, Estados Unidos. e) Dominancia de *Microcystis aeruginosa* en el Lago de Chapultepec, México, f) Especies *Nodularia*, *Anabaena* y *Microcystis* en el Mar Báltico.

4.2 Factores ambientales que influyen en las floraciones de cianobacterias

Las poblaciones de cianobacterias están influenciadas por factores físicos, químicos y biológicos del agua. El resultado de la óptima conjunción de estos factores, es el desarrollo masivo de especies de cianobacterias, que en ocasiones suelen estar asociados a la presencia de cianotoxinas.

4.2.1 Eutrofización

La eutrofización se refiere al proceso de enriquecimiento de nutrientes del agua principalmente a partir de efluentes y fuentes agrícolas de nitrógeno y fósforo. El estado trófico del agua se refiere al grado en que se enriquece con nutrientes. Un cuerpo de agua puede clasificarse como 'oligotrófico' (poco nutrido), 'mesotrófico' (medio nutrido), 'eutrófico' (bien nutrido) o 'hipertrófico' (muy bien nutrido). Las aguas eutróficas e hipertróficas sufren una amplia gama de impactos negativos que incluyen aumento de las floraciones de cianobacterias, condiciones turbias del agua, problemas de sabor y olor, agotamiento de oxígeno (anoxia), aumento de la mortalidad de peces, pérdida de biodiversidad y disminución del valor estético. Las cianobacterias crecen en aguas eutróficas y suponen un problema para el tratamiento del agua debido a las densas acumulaciones de células (Matthews y Bernard, 2015).

Se ha considerado que el fósforo (P) es el nutriente fundamental que limita la acumulación de biomasa algal en los ecosistemas de agua dulce. La enorme cantidad de P, principalmente en relación con la de nitrógeno (N), beneficia el desarrollo de estas floraciones, en especial a los géneros que fijan N_2 , porque pueden abastecer necesidades de N mediante la transformación enzimática del N atmosférico (N_2) en amoníaco biológicamente disponible (NH_3). Si los cuerpos de agua están enriquecidos en nutrientes, tienen largos tiempos de residencia, temperaturas que exceden habitualmente los 20 °C, las aguas superficiales son

tranquilas y hay estratificación vertical persistente resultan especialmente propensos a estos florecimientos (O'Neil *et al.*, 2012; Paerl y Otten, 2013). Estudios recientes donde se utilizan datos de monitoreo a largo plazo y simulaciones de modelado han sugerido que las temperaturas más cálidas, además de los nutrientes, son también un importante impulsor de las floraciones, incluso señalan que son más importantes para su formación; sin embargo, otros autores argumentan que el impacto de las temperaturas es mínimo debido a que la composición de fitoplancton es impulsada principalmente por la carga de nutrientes (Rigosi *et al.*, 2014).

Las fuentes de nutrientes agrícolas, urbanas e industriales se han intensificado de manera alarmante desde hace varias décadas. Esta situación se debe a un incremento en el suministro de fertilizantes nitrogenados, desechos humanos y agrícolas, escurrimiento de aguas pluviales, descarga de aguas subterráneas y deposición atmosférica. Los ecosistemas acuáticos ricos en fósforo en relación al nitrógeno pueden ser afectados por estos florecimientos, especialmente por los géneros fijadores de N_2 ya que pueden satisfacer sus propias necesidades de N mediante la conversión enzimática de N_2 atmosférico a amoníaco biológicamente disponible (NH_3), aunque otros géneros no fijadores como *Aphanocapsa*, *Raphidiopsis* y *Woronochinia*, tienen la capacidad de dispersarse rápidamente (Paerl, 2014).

Los sistemas eutróficos que ya presentan eventos de florecimientos de cianobacterias son propensos a una mayor expansión de estas floraciones debido a descargas adicionales de N, especialmente si ya contienen suficiente P. Algunos modelos predicen que, en los ecosistemas templados, las comunidades de fitoplancton de verano estarán potencialmente dominadas por las cianobacterias a concentraciones totales de fósforo (TP) de $\sim 100 - 1000 \text{ mg L}^{-1}$. Se ha observado que los sistemas eutróficos tienen la capacidad de absorber cantidades crecientes de N a medida que avanza su estado trófico. Además, la productividad de las algas en respuesta al enriquecimiento de nutrientes revela que la estimulación

más fuerte se observa en respuesta a las adiciones de N y P (O'Neil *et al.*, 2012; Paerl y Otten, 2013).

4.2.2 Disponibilidad de luz

La intensidad de la luz resulta un factor importante en la dinámica de *M. aeruginosa* debido a que, con un leve incremento de la intensidad de la luz, en 40 $\text{microeinstein}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$ la toxicidad de esta especie se incrementa, por lo tanto, la toxicidad decrece cuanto más profunda se encuentre la cianobacteria en la columna de agua. Cada especie, en particular requiere condiciones de luz óptimas para el crecimiento (Paerl, 2014).

4.2.3 El calentamiento global

Las temperaturas globales cada vez más elevadas y el drástico cambio de algunos patrones meteorológicos como los de precipitación favorecen a los géneros que crean florecimientos superficiales que presentan sus velocidades máximas de crecimiento a menudo por encima de los 25°C y hasta los 35°C que organismos clorofitas, dinoflagelados y diatomeas son incapaces de tolerar al tener una velocidad máxima de crecimiento de 20-25°C (Figura 2). Su capacidad de fijar el nitrógeno y la de producir células latentes (propágulos o estructuras de perennación) para sobrevivir a condiciones desfavorables proporcionan a las cianobacterias una ventaja competitiva sobre otras especies del fitoplancton, especialmente bajo condiciones climáticas futuras cada vez más impredecibles. (Rigosi *et al.*, 2014). En estas condiciones, las cianobacterias suelen superar a las algas eucariotas, particularmente, a medida que las velocidades de crecimiento de las especies eucariotas disminuyen en respuesta al calentamiento, las de las cianobacterias alcanzan un crecimiento óptimo. En consecuencia, los casos que

dan lugar a su dominancia extrema pueden iniciar con precipitaciones en primavera, seguida de períodos prolongados de sequía en verano donde la temperatura, la estratificación vertical y el tiempo de residencia del agua aumentan simultáneamente (Paerl, 2014).

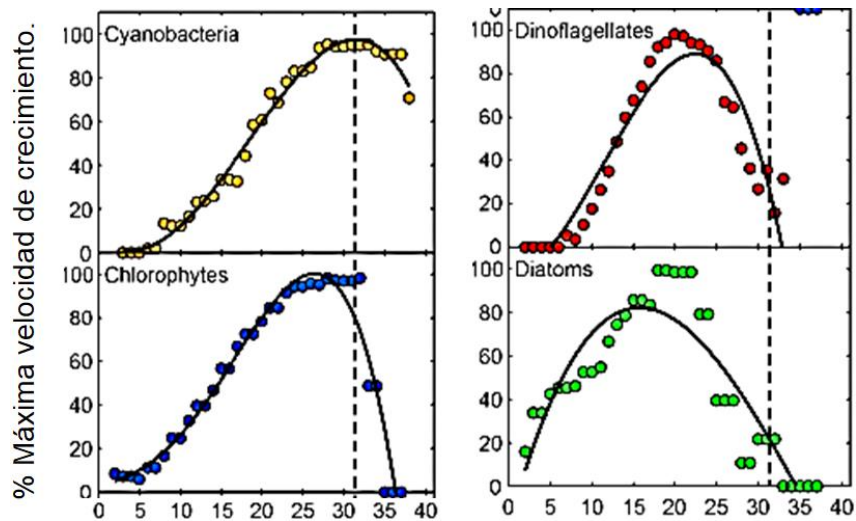


Figura. 2. Relaciones temperatura-crecimiento entre cuatro grupos taxonómicos diferentes (cianobacterias, clorofitas, dinoflagelados y diatomeas). La línea punteada indica la temperatura óptima de crecimiento. Fuente: Paerl, 2014.

Existe una preocupación creciente de que las interacciones entre el calentamiento global y la eutrofización están aumentando la frecuencia y magnitud de las floraciones de cianobacterias tóxicas y ampliando la distribución geográfica de algunas especies. Algunos géneros tienen adaptaciones ecofisiológicas como vesículas para aumentar su presencia dentro de la zona eufótica y cerca de la superficie (Rigosi *et. al.*, 2014). Esto les permite tener altas tasas de fotosíntesis a alta radiación ultravioleta, inclusive pueden incrementar de manera local la temperatura del agua superficial (al menos 1.5 °C por encima de la temperatura ambiental), debido a la absorción de luz por medio de pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores (clorofilas, carotenoides y ficobilinas). Estas cualidades les permiten optimizar sus velocidades de crecimiento y proporcionar un dominio competitivo creando sombra a los organismos subyacentes, no flotantes y a las macrófitas, suprimiendo su crecimiento (Paerl y Otten, 2013; Sukenik *et al.*, 2015).

Rigosi *et al.* (2014) concluyeron que, en los lagos oligotróficos, los nutrientes resultan ser más importantes que la temperatura, mientras que en los lagos mesotróficos la temperatura es más importante y en los lagos eutróficos e hiper-eutróficos, la interacción positiva entre temperatura y nutrientes explica la mayor parte de la variación del biovolumen cianobacterial. Sólo los lagos eutróficos e hiper-eutróficos mostraron interacciones sinérgicas significativas (Figura 3).

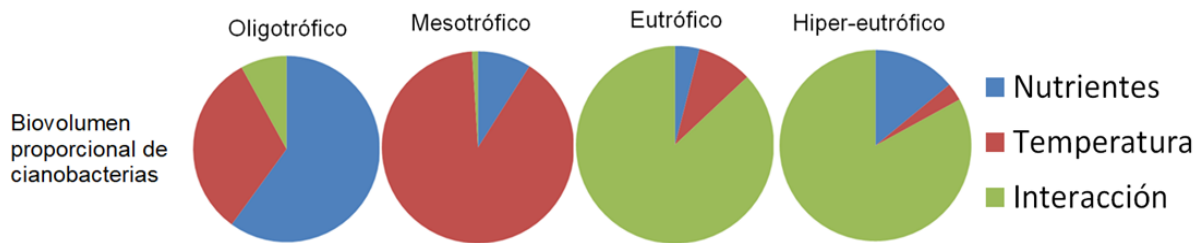


Figura. 3. Efectos relativos de los nutrientes, de la temperatura y de su interacción en el biovolumen cianobacterial en lagos oligotróficos, mesotróficos, eutróficos e hiper-eutróficos. Fuente: Rigosi *et al.*, 2014.

4.4 Ocurrencia y propiedades de las cianotoxinas

Las cianobacterias son conocidas por su capacidad para producir compuestos que causan sabores y olores desagradables en el agua potable. Estos microorganismos pueden biosintetizar una amplia gama de clases químicas de metabolitos secundarios tales como péptidos, macrólidos y glicósidos que poseen una serie de bioactividades: antivirales, antimicóticas, citotóxicas, inhibidoras de enzimas, antineoplásicas y alelopáticas. Algunos de estos metabolitos secundarios abarcan una diversidad de cianotoxinas de alcaloides y péptidos que plantean amenazas a la salud humana y ambiental en todo el mundo. Las cianotoxinas son más de un centenar de compuestos que pueden diferir fuertemente en su estructura química y propiedades toxicológicas. Generalmente se clasifican como: hepatotoxinas, neurotoxinas, citotoxinas y dermatotoxinas (Corbel *et al.*, 2014).

A pesar de ello, las floraciones de cianobacterias no están necesariamente asociadas con la aparición de toxinas ya que no todas las cepas son tóxicas. De hecho, las cianotoxinas son producidas solamente por las cepas que tienen los genes apropiados. Además, incluso las cepas tóxicas no producen automáticamente toxinas ya que varias de ellas tienen la capacidad de activar o desactivar ciertos genes dependiendo de las condiciones ambientales. La identificación de cepas que tienen los genes apropiados es el mejor método para determinar si una floración es o puede llegar a ser tóxica. Se han identificado progresivamente genes que tienen capacidades de producción de toxinas en ciertas cepas, lo que permite el desarrollo de métodos de Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR por sus siglas en inglés (*Polymerase Chain Reaction*) para la detección específica de cianobacterias potencialmente tóxicas en muestras ambientales, no obstante, la producción de toxinas a nivel de especie hace que las generalizaciones sean difíciles. Los factores ambientales incluyen, la intensidad y el tiempo de exposición a la luz, el movimiento y flujo del agua, las influencias alelopáticas y la competencia por los recursos, la herbivoría y el pastoreo, las concentraciones y proporciones de nutrientes, la temperatura, la salinidad del agua y la división y tasa de crecimiento celular. De hecho, la lista de factores ambientales e interacciones parece casi tan grande como la lista de cepas capaces de producir toxinas (Merel *et al.*, 2013).

4.4.1 Hepatotoxinas

Las hepatotoxinas son heptapéptidos cíclicos (como las microcistinas) y pentapéptidos cíclicos (nodularinas). Ocasionan el tipo más común de intoxicación relacionado con las cianobacterias y un envenenamiento letal agudo. De acción lenta, pueden causar la muerte en horas o pocos días. De las variantes químicas conocidas, las más importantes son: microcistinas, cilindrospermopsina y nodularina (Cantoral *et al.*, 2017). Se cree que la producción de hepatotoxinas está influenciada por una serie de parámetros físicos y ambientales diferentes,

incluyendo nitrógeno, fósforo, metales traza, temperatura de crecimiento, luz y pH. (Neilan *et al.*, 2012).

4.4.1.1 Microcistinas

Las microcistinas (MCs) son heptapéptidos cíclicos (Figura 4a), forman la principal familia de cianotoxinas, son moléculas hidrosolubles, estables y se consideran potenciales promotores de tumores. Las MCs fueron nombradas de acuerdo a *Microcystis*, pero también son producidas por *Oscillatoria* (*O. limnosa*), *Planktothrix* (*P. argardhii*, *P. rubescens*, *P. mougeotii*), *Nostoc* (*Nostoc sp.*), *Anabaena* (*A. flos-aquae*, *A. Circinalis*, *A. Lemmermannii*), *Anabaenopsis* y *Snowella* (*S. lacustris*) (Carvajal *et al.*, 2011; Sukenik *et al.*, 2015). La Organización Mundial de la Salud (OMS) presenta directrices recomendadas para la exposición de MC a través del agua potable, siendo de 0.001 mg L^{-1} , basado en una ingesta diaria de agua de 2 L por un adulto de 60 kg (Pearson *et al.*, 2016).

4.4.1.2 Nodularinas

Las nodularinas (NODs) son pentapeptidos cíclicos (Figura 4b) estructuralmente similares a MCs, incluyendo el ácido (2S, 3S, 8S, 9S)-3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienoico (Adda), pero sólo un aminoácido Z variable. Están asociadas únicamente con *Nodularia spumigena* y también se consideran como un carcinógeno que posee un promotor tumoral (Dittmann *et al.*, 2012; Sotton *et al.*, 2014). Las floraciones de *Nodularia spumigena* predominan a altas concentraciones de fósforo, bajas tasas de N:P y salinidades moderadas (Neilan *et al.*, 2012).

4.4.1.3 Cilindrospermopsinas.

Las cilindrospermopsinas (CYL) son alcaloides tricíclicos que encierran una entidad guanidina combinada con un resto hidroximetiluracilo (Figura 4c) potencialmente responsable de la toxicidad, fue nombrada de acuerdo con *Cylindrospermopsis raciborskii*, pero otras cianobacterias como *Aphanizomenon ovalisporum*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Chrysochloris ovalisporum*, *Raphidiopsis curvata*, *Umezakia natans*, *Lyngbya wollei*, *Anabaena bergii* y *Anabaena lapponica* también pueden sintetizar la toxina (Dittmann *et al.*, 2012; Sotton *et al.*, 2014; Díaz *et al.*, 2016). La CYL ha demostrado ser tóxico para muchas especies de bacterias, protozoos, plantas, invertebrados y vertebrados, incluidos los humanos. Esta toxina tiene efectos citotóxicos, hepatotóxicos, nefrotóxicos y es un carcinógeno potencial (De la Cruz *et al.*, 2013; Sotton *et al.*, 2014).

4.4.2 Neurotoxinas

Las neurotoxinas causan envenenamiento letal agudo, son producidas principalmente por especies y cepas de los géneros: *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Oscillatoria*, *Trichodesmium* y *Cylindrospermopsis*. Actúan en la transmisión del impulso nervioso y pueden provocar la muerte por parálisis muscular y un consecuente paro respiratorio. Existen diversas variantes químicas, las más importantes son: anatoxina-a, homoanatoxina-a, anatoxina-a (s), n-éster de fosfato de metilo hidroxiguanidina, afanotoxinas I y II (saxitoxina y neosaxitoxina) y la β -N-metilamino-L-alanina (BMAA) (Cantoral *et al.*, 2017).

4.4.2.1 Anatoxina-a

La anatoxina-a (ANTX-a) es un alcaloide (Figura 4d) y es considerado un potente agente de bloqueo neuromuscular con una variante llamada homoanatoxina-a que presente el mismo nivel de toxicidad que ANTX-a, se les consideran las más pequeñas de las cianotoxinas. Está asociada principalmente con *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Phormidium*, *Planktothrix* y *Oscillatoria* (Corbel *et al.*, 2014; He *et al.*, 2016).

4.4.2.2 Anatoxina-a(s)

La anatoxina-a(s) es un éster fosfato de una N-hidroxiguanina cíclica (Figura 4e) (Merel *et al.*, 2013). Esta toxina se ha asociado sólo con cepas de *Anabaena*. Una vez absorbido en el organismo produce salivación excesiva, calambres, temblores, diarrea, vómitos, inhibe la acetilcolinesterasa (AChE) en la sinapsis nerviosa e induce parálisis muscular con una muerte sumamente rápida por paro respiratorio (Carvajal, 2011; Freitas *et al.*, 2014).

4.4.2.3 Saxitoxinas

Las saxitoxinas (STXs) son compuestos tricíclicos que pueden ser o no sulfatados, mono sulfatados o doblemente sulfatados (Figura 4f). *Anabaena circinalis* y *Aphanizomenon flos-aquae* son las principales cianobacterias asociadas a las STXs, pero *Lyngbya wollei* y *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Raphidiopsis*, *Planktothrix* y *Scytonema* también las sintetizan (Carvajal, 2011). Son conocidas como venenos paralizantes de los mariscos, inducen disfunción nerviosa, parálisis y muerte por insuficiencia respiratoria (Sukenik *et al.*, 2015).

4.4.2.4 β -N-metilamino-L-alanina (BMAA)

La BMAA es un aminoácido no proteico (Figura 4g), puede ser producida por todos los grupos conocidos de cianobacterias, diatomeas y dinoflagelados. La BMAA actúa principalmente en las neuronas motoras mediante la fijación en los receptores de glutamato y puede estimular la apoptosis en neuronas humanas. Además, podría causar mal plegamiento de proteínas intraneuronales, la característica de la neurodegeneración. De hecho, existen supuestos de que podría estar asociada con diversas enfermedades neurodegenerativas tales como la esclerosis lateral amiotrófica, Parkinson y Alzheimer (Glover *et al.*, 2014; Jiao *et al.*, 2014).

4.4.2.5 Jamaicamidas

Las jamaicamidas son neurotoxinas lipopeptídicas que contienen características estructurales inusuales incluyendo halogenación. Al igual que ocurre con otras toxinas de cianobacterias, las jamaicamidas A, B y C (Figura 4h) también muestran actividad de bloqueo del canal de sodio y se ha demostrado que poseen potentes actividades neurotóxicas y citotóxicas (Neilan *et al.*, 2012).

4.4.3. Dermatotoxinas

Las dermatotoxinas son alcaloides que incluyen a las aplisiatoxinas (APT_X) y linfogatoxinas (LTX) producidas principalmente por *Lyngbya majuscula*, *Schizothrix* y *Oscillatoria*. La debromoaplesiatoxina y la lyngbyatoxina, son producidas por *L. majuscula* las cuales producen efectos irritantes (Axpucaca *et al.*, 2017). Después de la exposición humana, los síntomas característicos de la intoxicación incluyen dermatitis, así como la inflamación oral y gastrointestinal que

resulta en diarrea. Además, las APTXs y las LTXs son también potentes promotores tumorales (Carvajal, 2011; Cantoral *et al.*, 2017).

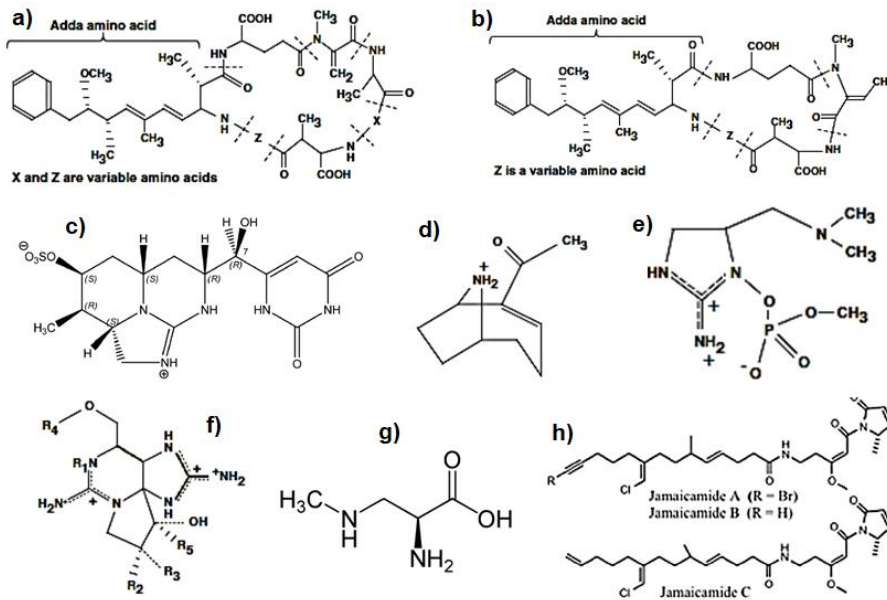


Figura. 4. a) Estructura química de la microcistina, b) nodularina, c) cilindrospermopsina, d) anatoxina-a, e) anatoxina-a(s), f) saxitoxina, g) β-N-metilamino-L-alanina y h) jamaicamidas A, B y C.

4.5 Florecimientos de cianobacterias en México

La mayoría de los cuerpos de agua dulce del centro de México se encuentran eutrofizados, algunos en estado extremo (hipertrofia), lo cual ha favorecido la formación de florecimientos de cianobacterias dañinas. Los principales géneros de especies nocivas formadoras de florecimientos registrados a nivel nacional son: *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Cylindrospermopsis*, *Lyngbya*, *Microcystis*, *Nodularia*, *Phormidium*, *Planktothrix* y *Pseudanabaena*. La permanencia y abundancia de los florecimientos de cianobacterias en cuerpos de agua del centro de México varía de una localidad a otra. Es determinada principalmente por el grado de eutrofización y, en menor medida, por las condiciones físicas predominantes del ambiente. Por ejemplo, en el lago del bosque de Chapultepec de la Ciudad de México (que presenta un estado hipertrófico), los florecimientos de cianobacterias como

Microcystis spp. son recurrentes durante todo el año con concentraciones superiores a 7.5×10^6 cél/mL, mientras que en sitios considerados mesotróficos como el lago del Parque Alameda de la Solidaridad en Cuernavaca, Morelos, se presenta *Leptolyngbya sp.*, regularmente durante la primavera con concentraciones superiores a 1×10^6 cél/mL (Pérez *et al.*, 2016).

El Lago de Pátzcuaro en Michoacán se caracteriza por florecimientos tóxicos dominados por *Aphanizomenon* y *Microcystis* con concentraciones máximas de MC-LR (microcistina con leucina-arginina) de 6520 µg/L en la región norte y 4038 µg/L en la región sur. Además, se han identificado varias variantes de microcistina, incluyendo MC-LA (microcistina con leucina-alanina) y MC-LY (microcistina con leucina-tirosina). Actualmente, las floraciones ocurren diariamente debido a condiciones meteorológicas tranquilas de las mañanas, y antes de la mezcla inducida por el viento en la tarde (Berry *et al.*, 2012; Tomasini *et al.*, 2012; Pérez *et al.*, 2016).

Los florecimientos de *Nodularia spumigena* en el lago hiposalino de Alchichica en Puebla, están asociados al inicio del período de estratificación (abril-junio), siendo la densidad media más alta de 1.36×10^{11} células m^{-2} registrada en el 2001. *N. spumigena* se encuentra regularmente durante un período de tres meses, pero las concentraciones máximas se alcanzan solo durante unas pocas semanas (Oliva, 2009).

El Lago de Catemaco en el estado de Veracruz, es dominado todo el año por una especie *Cylindrospermopsis* productora de cilindrospermopsina y toxinas paralizantes de mariscos o PST por sus siglas en inglés (*Paralytic Shellfish Toxins*) encontrándose concentraciones de ≤ 21 y 5 ngL^{-1} , respectivamente. Se encontró que el caracol endémico *Pomacea patula catemacensis* conocido localmente como *tegogolo* (así como herbívoros bentónicos) tiene la capacidad de bioacumular las toxinas casi 200 veces en relación con las concentraciones encontradas en la columna de agua.

Este hallazgo fue particularmente notable ya que *P. patula* es ampliamente consumido en las comunidades alrededor del lago (Berry *et. al.*, 2012).

4.6 Métodos para el manejo de floraciones de cianobacterias tóxicas

Los métodos físicos para el control de los florecimientos de cianobacterias incluyen la limpieza mecánica, la absorción de carbono, la perturbación ultrasónica y la radiación ultravioleta, etc., que generalmente requieren instrumentos caros, consumen mucho tiempo y solo están disponibles en cuerpos de agua de pequeña escala. Los alguicidas utilizados para el tratamiento químico generalmente incluyen compuestos de metales pesados, pro-oxidantes y aminos orgánicas, que son rentables, pero con toxicidad de amplio espectro para todos los organismos acuáticos. La manipulación biológica utiliza peces, zooplancton, epífitas, actinomicetos, bacterias, cianófagos, macrófitas, etc. para controlar directa o indirectamente la biomasa de algas (Hu y Hong, 2008).

4.6.1 Control de las floraciones con métodos físicos

Los métodos físicos incluyen la remoción y reducción de la entrada de nutrientes, taponamiento y remoción de sedimentos, retirada hipolimnética, aireación y oxigenación hipolimnéticas, limpieza mecánica, absorción por carbono, perturbación ultrasónica, dispositivos de presión para colapsar vesículas de gas y radiación ultravioleta (Drábková, 2007). La menor contaminación secundaria posterior es el mérito más evidente de los enfoques físicos, pero estos tratamientos son intensivos en energía y tienden a ser de baja eficiencia y los daños causados a los organismos no objetivos por muchos tratamientos intensivos en el agua también limitan la aplicación en campo de tales enfoques a gran escala (Shao *et al.*, 2013).

4.6.1.1 Remoción y reducción de la entrada de nutrientes

Uno de los objetivos más evidentes para la mitigación de floraciones tóxicas es la reducción de la entrada de nutrientes. Se ha observado que la reducción de la entrada de P es un medio eficaz para reducir la dominancia de las cianobacterias. Sin embargo, también se necesitan reducciones de la entrada de N, especialmente el caso de lagos, ríos, estuarios y aguas costeras eutróficas que son capaces de asimilar más N aumentando su estado trófico. Las relaciones de entrada ideales son aquellas que no favorecen taxones específicos de estas floraciones sobre otras no tóxicas, pero no parece haber una relación donde puedan ser controladas consistentemente y confiablemente. Generalmente las proporciones molares totales de N:P por encima de ~15 desalientan su dominancia, aunque si la carga de nutrientes y las concentraciones internas de N y/o P son extremadamente altas, no es probable que un enfoque de proporción sea efectivo para reducir su número (Paerl y Otten, 2013; Paerl, 2014). Varios autores han desafiado el argumento del control de N y P ya que afirman que la reducción de N no funcionará porque la fijación de N por las cianobacterias compensará en gran medida la escasez de N inducida (Molot *et al.*, 2014).

4.6.1.2 Radiación ultrasónica

Las ondas de sonido de una frecuencia igual o superior a 20 kHz se conocen como ultrasonido. La radiación ultrasónica en el agua causa una serie de ciclos de compresión y rarefacción que conducen a la generación de burbujas de cavitación (cavitación acústica). Millones de estas burbujas implosionan produciendo temperaturas localizadas de hasta 5000 °C, presiones de 100 MPa y radicales libres. La sonicación se ha utilizado para controlar las floraciones de cianobacterias en agua eutrófica, ya que se ha demostrado que el ultrasonido tiene un impacto negativo en el estado estructural y funcional de los organismos. Estudios han demostrado que la sonicación inhibe la tasa de crecimiento de

cianobacterias por ruptura o colapso de vesículas de gas debido a efectos de cavitación, disrupción de la membrana, daño a la actividad fotosintética e inhibición de la división celular y el ciclo celular; la extensión del daño y, por lo tanto, el control de floración depende de parámetros tales como la frecuencia ultrasónica y la intensidad de potencia, y la duración de la exposición. Aunque puede conducir a la liberación de toxinas debido a la lisis de células cianobacterianas, también se ha informado que la sonicación es efectiva para degradar las cianotoxinas (Rajasekhar *et al.*, 2013).

4.6.2 Control de los florecimientos con métodos químicos

Los alguicidas utilizados por los tratamientos químicos por lo general incluyen compuestos con metales pesados, pro-oxidantes y aminas orgánicas, que son rentables, pero los efectos inhibidores no se dirigen selectivamente a las cianobacterias dañinas; por lo tanto, las algas no dañinas o los organismos beneficiosos también pueden ser eliminados o afectados negativamente por la aplicación y la exposición química. La introducción de alguicidas químicos concentrados en cuerpos de agua a menudo conduce al colapso de los ecosistemas acuáticos (Shao *et al.*, 2013).

El sulfato de cobre (CuSO_4) se considera un alguicida efectivo y económico porque se considera generalmente seguro para la salud humana a las dosis comúnmente utilizadas, mientras que causa la agregación de fibrillas de ADN, la ruptura de los tilacoides y la muerte celular en algas. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es un fuerte agente oxidante que se considera un tratamiento eficaz y ambientalmente benigno para la inhibición del crecimiento de cianobacterias porque es un producto fotoquímico natural formado en aguas bajo la luz solar y puede degradarse rápidamente en oxígeno y agua (Qian *et al.*, 2010a).

Zhou *et al.*, en 2013, evaluaron los efectos del CuSO_4 , H_2O_2 , Diurón (3-[3, 4-diclorofenil]-1, 1-dimetilurea) y etil 2-metilacetoacetato (EMA) sobre la capacidad fotosintética, la integridad celular y la liberación de microcistina-LR en *M. aeruginosa*, demostrando que los cuatro alguicidas, inhiben la captura de energía y la transferencia de electrones de los sistemas fotosintéticos y, por lo tanto, dan como resultado la inactivación de las células de *M. aeruginosa*. Una dosis alta de alguicida provoca fácilmente la lisis celular y la liberación de microcistina-LR intracelular. El CuSO_4 es el más común pero su toxicidad puede restringir significativamente su aplicación, especialmente cuando el cobre se acumula en el depósito y los sedimentos. El H_2O_2 disminuyó la transcripción del gen de transporte de microcistina, que puede evitar el transporte de microcistina al sistema de agua, debido a que bloquea la fotosíntesis o destruye los pigmentos fotosintéticos (Qian *et al.*, 2010a). Además, no es persistente y decae gradualmente debido a la autodescomposición, de manera que, la inhibición inducida por el H_2O_2 es solo temporal. El diurón inhibe la fotosíntesis al bloquear la transferencia de electrones, y así conducir a la muerte de las células de *M. aeruginosa*; no obstante, su toxicidad, persistencia y sus productos de degradación pueden ser una preocupación durante su aplicación para otras especies acuáticas. El etil 2-metilacetoacetato es un alguicida eficaz y puede reducir en gran medida la capacidad fotosintética de las células de *M. aeruginosa*, mientras que todavía es demasiado costoso producirlo en alta calidad y pureza (Zhou *et al.* 2013).

4.6.2.1 Cloración

La mayoría de las veces la cloración, constituye una barrera esencial contra las cianotoxinas disueltas y unidas a células para prevenir la penetración de células y toxinas en el agua potable. Si se lleva a cabo la (pre, inter- y/o post-) cloración sobre agua que contiene concentraciones significativas de cianobacterias, conduce a varios problemas de calidad del agua, por ejemplo, el daño celular y la posterior liberación de significativa de metabolitos intracelulares que incluyen

toxinas, K^+ y clorofila-a (Ma *et al.*, 2012), aumento de la demanda de cloro, liberación de carbono orgánico disuelto (COD) y formación de subproductos desinfección (DBP) dado que la cloración puede transformar la microcistina en dihidroxi-microcistina, monocloro-microcistina, monocloro-hidroxi-microcistina, entre otras, que son menos tóxicas (Merel *et al.*, 2010). La cloración puede constituir una opción de tratamiento temporal viable si se demuestra que es eficaz para la eliminación de las toxinas unidas a las células y disueltas, sin afectar negativamente a otros parámetros de calidad del agua (Zamyadi *et al.*, 2013). Aunque el cloro puede degradar de manera efectiva las microcistinas, la eficacia de eliminación depende de la dosis de cloro, el tiempo de contacto, el pH y la presencia de sustancias que consuman cloro (Ma *et al.*, 2012).

Recientes monitoreos de cianobacterias dentro de plantas de tratamiento de agua potable han evidenciado la acumulación de células tóxicas lo que significa un grave riesgo para la salud de animales y personas ya que el proceso de pretratamiento con cloro podría conducir a la liberación de toxinas al medio debido a la lisis celular. Aunado a esto, la operación prudente del proceso de cloración en las plantas de tratamiento requiere el conocimiento de la demanda de cloro, esta información es esencial para asegurar que haya suficiente capacidad de cloro durante los eventos de concentración celular máxima (Zamyadi *et al.*, 2013).

4.6.2.2 Antibióticos

Hoy en día, los antibióticos se han detectado ampliamente en aguas subterráneas, aguas superficiales, afluentes y efluentes del tratamiento de aguas residuales, así como en agua potable, como sulfonamidas, macrólidos, tetraciclinas, quinolonas, trimetoprimas, etc., a concentraciones en el rango de $ng\ L^{-1}$ - $\mu g\ L^{-1}$ como resultado del metabolismo incompleto en humanos y ganado. Los antibióticos son efectivos contra los microorganismos ambientales como las cianobacterias al tener una estructura celular similar a las bacterias, de tal manera que son más sensibles a los contaminantes antibióticos en comparación con otras especies de algas (Liu *et*

al., 2012). Por ejemplo, la tetraciclina inhibe significativamente la tasa de crecimiento y la actividad fotosintética de *M. aeruginosa*, mientras que a 0.05 mg/L dio como resultado el efecto de hormesis (fenómeno caracterizado por una estimulación del crecimiento a dosis bajas y una inhibición a dosis altas) (Yang *et al.*, 2013); la espiramicina y la amoxicilina, podrían afectar el crecimiento y la producción y liberación de microcistinas en *M. aeruginosa* (Liu *et al.*, 2012); la minociclina inhibe crecimiento de cianobacterias después de 6 a 10 días de exposición (Stoichev *et al.*, 2011); la estreptomycin también inhibe el crecimiento de *M. aeruginosa*, disminuye el contenido de clorofila o ficocianina, destruye la membrana celular, disminuye los niveles de transcripción génica relacionada con la fotosíntesis, bloquea el transporte de electrones y la sobreproducción de ROS (Qian *et al.*, 2010b).

4.6.2.3 Herbicidas

Los pesticidas quirales, incluidos los insecticidas y herbicidas, se han convertido en una clase importante de contaminantes ambientales en las últimas décadas. Los plaguicidas quirales plantean efectos ecológicos enantioselectivos sobre los organismos no objetivo en el medio ambiente, e inevitablemente tendrán un impacto en las cianobacterias. Las células de cianobacterias dañadas junto con los residuos de pesticidas quirales en el sistema acuático pueden provocar la disminución de la calidad del agua y causar problemas ambientales adicionales. Se ha comprobado que el Diclofop (Metil (RS)-2-[4-(2,4-diclorofenoxi)fenoxi] propionato), un herbicida y cuatro de sus enantiómeros (metil diclofop, diclofop ácido, R-diclofop ácido, S-diclofop ácido) ejercen una actividad tóxica sobre *M. aeruginosa* dañina al observar cambios de ultraestructura en las células, incluyendo cambios en las paredes celulares, vacuolas de gas, tilacoides, glucógeno, gránulos de cianoficina, poli beta-hidroxibutirato, cuerpo poliédrico y lípidos (Ye *et al.*, 2013).

4.6.3 Control de las floraciones con métodos biológicos

La manipulación biológica utiliza peces, conchas, zooplancton, epífitos, actinomicetos, bacterias, ficófagos y macrófitos para controlar directa o indirectamente la biomasa de algas. Los microbios, con altos índices de mutación, no se consideran para ser utilizados por separado en el control de las floraciones algales (Hu y Hong, 2008). Los enfoques biológicos tienden a ser respetuosos con el medio ambiente y son los métodos más prometedores para el control de las cianobacterias tóxicas, por otro lado, la eficacia de la estrategia biológica está influenciada por muchos factores bióticos y abióticos en el medio ambiente. Las manipulaciones biológicas pueden efectivamente eliminar/controlar las floraciones nocivas de cianobacterias en un cuerpo de agua, pero no tienen ningún efecto en otro. Tal variación en la eficacia desalienta la aplicación de campo utilizando agentes biológicos (Shao *et al.*, 2013).

4.6.3.1 Consumidores primarios

Las comunidades de zooplancton capaces de pastar en cianobacterias abarcan cuatro grupos principales: rizópodos, ciliados, rotíferos y crustáceos. Durante varias décadas, los estudios han investigado las interacciones tróficas entre las cianobacterias y diversas comunidades de zooplancton, tales como amebas, rotíferos, ciliados, cladóceros y copépodos. Aunque está claramente establecido que los herbívoros influyen en la sucesión de fitoplancton y pueden ser responsables de más del 50% de la pérdida de fitoplancton en algunos casos, hay informes contradictorios sobre cómo el zooplancton puede contribuir a la disminución de las cianobacterias (Gerphagnon *et al.*, 2015). Generalmente, la morfología de las presas es el factor más importante que influye en el consumo del zooplancton. Las formas cianobacterianas coloniales o filamentosas pueden interferir mecánicamente con el aparato filtrante del zooplancton sellándolo, lo que implica que el zooplancton puede no ser capaz de controlar todas las floraciones de cianobacterias (Paerl y Otten, 2013).

4.6.3.2 Bacterias

La gran mayoría de las cianobacterias formadoras de florecimientos están a menudo estrechamente asociadas con otros microorganismos, por el contrario, algunas bacterias heterotróficas, lejos de estar implicadas en una relación mutualista, lisan las cianobacterias como un recurso alimenticio. La mayoría de las bacterias cianobacteriolíticas pertenecen a los géneros *Alcaligenes*, el grupo *Flavobacterium/Cytophaga* y *Pseudomonas*. La lisis bacteriana parece funcionar de tres maneras principales: penetración en la célula huésped, contacto célula a célula o más a menudo producción de compuestos extracelulares tales como péptidos, proteínas, aminoácidos o antibióticos que pueden o no ser específicos del huésped (Gerphagnon *et al.*, 2015).

Las cianobacterias pueden competir entre sí (en términos de producción de biomasa) por un crecimiento más rápido, tolerancias ambientales más amplias o por interacciones alelopáticas. Se ha observado que una amplia gama de aleloquímicos son producidos por cianobacterias como péptidos cíclicos y no cíclicos, policétidos, alcaloides, fenoles y compuestos aromáticos clorados. El principal resultado de su acción en organismos simpátricos (que viven en la misma área geográfica) incluye la inhibición del crecimiento, el fotosistema II (PSII), la fijación de N₂ o la inducción de estrés oxidativo. Se ha demostrado que *M. aeruginosa* tiene la capacidad de obtener una ventaja sobre *Anabaena* y *Chroococcus* inhibiendo su crecimiento al poseer vacuolas de gas que les permiten desplazarse hacia la superficie de la columna. Por otra parte, *M. aeruginosa* puede ser un organismo blanco de metabolitos como la cilindrospermopsina y compuestos producidos por *Cylindrospermopsis raciborskii* (Rzymiski *et al.*, 2014). Un caso similar ocurre con *Tychonema bourrellyi* que libera aleloquímicos que inhiben fuertemente el crecimiento de *M. aeruginosa* (Shao *et al.*, 2013). Otras observaciones demuestran que algunas cepas de *Planktothrix*

agardhii productoras de microcistina inhiben claramente el crecimiento de las que no producen microcistina (Marinho *et al.*, 2013).

4.6.3.3 Cianófagos

Los virus son las entidades biológicas más abundantes en ambientes acuáticos, con abundancias medias fluctuando entre 10^7 y 10^8 partículas virales mL⁻¹ en sistemas marinos y de agua dulce respectivamente. La mayoría son virus procarióticos, en los cuales los cianófagos (virus que atacan a las cianobacterias) son omnipresentes en los ecosistemas acuáticos. Hasta hace poco, todos los cianófagos conocidos que infectaban cianobacterias filamentosas o coloniales pertenecían a una de las tres familias de bacteriófagos: *Podoviridae*, *Siphoviridae* y *Myoviridae*. Además, se ha aislado un cianófago filamentoso, que es capaz de infectar las tres principales cianobacterias que forman floraciones en agua dulce: *Anabaena*, *Microcystis* y *Planktothrix* (Gerphagnon *et al.*, 2015).

4.6.3.4 Macrófitos acuáticos y terrestres

Un número cada vez mayor de estudios ha tenido como objetivo identificar especies de macrófitas alelopáticamente activas que pueden ser adecuadas como medida de control para cianobacterias en lagos hipertróficos o detectar aleloquímicos naturales con el potencial de desarrollar "alguicidas" biológicos efectivos contra las floraciones dañinas de cianobacterias (Chang *et al.*, 2012). La paja de cebada es el más exitoso de macrófitos en la aplicación práctica en el control de las floraciones cianobacterias, puesto que libera metabolitos secundarios inhibitorios como polifenoles (Iredale *et al.*, 2012). También la hojarasca tiene efectos inhibitorios sobre las algas, pero es menos eficaz que la paja de cebada. Varios informes revelan que la paja de arroz descompuesta tiene

efectos inhibitorios similares a la cascara de cebada en varios tipos de cianobacterias (Xiao *et al.*, 2014).

4.6.3.4.1 Alelopatía y aleloquímicos

El termino alelopatía se define como la "interacción entre plantas o microorganismos" y, por lo tanto, puede referirse tanto a efectos beneficiosos como perjudiciales. En la mayoría de los casos, se usa para indicar interacciones negativas, es decir, cuando un organismo obstaculiza el crecimiento y/o el desarrollo de otro organismo. Los efectos alelopáticos son desencadenados por ciertos metabolitos secundarios, llamados aleloquímicos, que se liberan al medio ambiente por un organismo donante. La alelopatía es un proceso bien entendido en los sistemas terrestres, pero la evidencia de sus efectos en los ambientes acuáticos a nivel del ecosistema es aún difícil de establecer. A todo esto, se cree que la alelopatía influye en la conformación de las comunidades microbianas acuáticas y probablemente es el método de control de floraciones tóxicas más favorable al medio ambiente (Xiao *et. al.*, 2014). Eigemann en 2013 establece que, se deben cumplir seis requisitos previos para demostrar la aparición de alelopatía de macrófitas acuáticas en el fitoplancton (Figura 5).

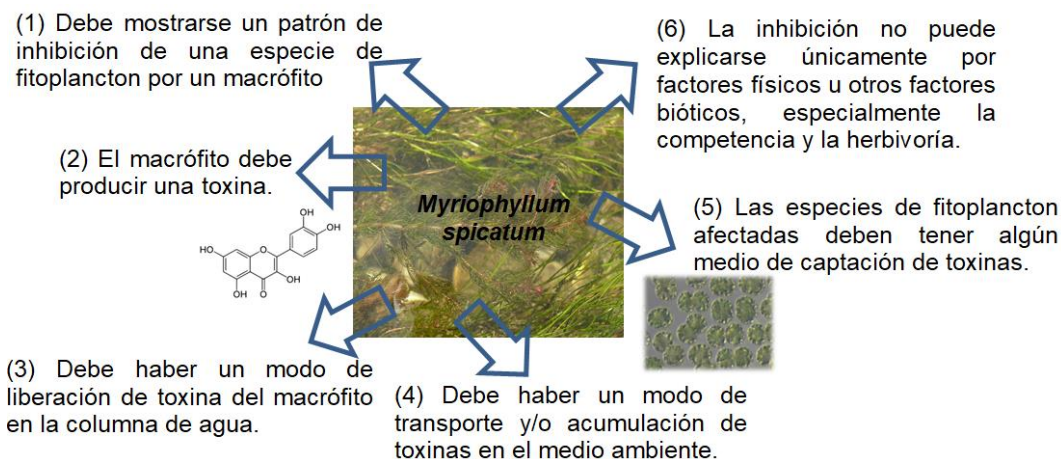


Figura. 5. Requisitos para determinar la existencia de actividad alelopática de macrófitas sobre cianobacterias.

Muchos estudios demuestran que la alelopatía de las plantas acuáticas es específica en las algas. Una planta acuática tiene un efecto diferente en diferentes especies de algas. Por ejemplo, *Ceratophyllum demersum* inhibe significativamente el crecimiento de *Anabaena*, mientras que facilita el crecimiento de *Chlorella* y *Scenedesmus*; *Myriophyllum spicatum* no tuvo efectos inhibitorios sobre *Anabaena*, mientras que inhibió a *Oscillatoria*, *Microcystis aeruginosa*, *Aphanizomenon flos-aquae*, entre otras. Los aleloquímicos de *Phragmites communis* también mostraron una notable selectividad dependiente de la especie. La fracción activa inhibió a *Microcystis aeruginosa*, mientras que casi no tuvo efecto sobre *Chlamydomonas reinhardtii* y siempre estimuló el crecimiento de *Chlorella vulgaris* (Hu y Hong, 2008).

4.6.3.4.2 Alelopatía de los macrófitos sobre las cianobacterias

Desde hace varios años se han reportado numerosas especies de macrófitas sumergidas que inhiben alelopáticamente diferentes especies de cianobacterias como *Microcystis*, *Anabaena* y *Oscillatoria* (Tabla 1). Existen inclusive algunas

especies como *Lemna trisulca* (L.) que además de inhibir el crecimiento de *Anabaena flos-aquae*, también degrada la anatoxina-a (Kaminski *et al.*, 2014; Kaminski *et al.*, 2015). Particularmente, la mayoría de los estudios se han llevado a cabo sobre los efectos de *Myriophyllum spicatum* y los ácidos fenólicos y polifenoles presentes en esta especie los cuales tienen un fuerte efecto inhibitorio en *M. aeruginosa* (Zhu *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011, Nakai *et al.*, 2012; Svanys *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2018).

Tabla 1. Macrófitas sumergidas y su actividad inhibitoria sobre cianobacterias.

Macrófitas sumergidas		
Especie	Cianobacteria inhibida	Referencia
<i>Cabomba caroliniana</i> , <i>Ceratophyllum demersum</i> , <i>Eleocharis acicularis</i> , <i>Limnophila sessiliflora</i>	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Chang <i>et al.</i> , 2012
<i>Vallisneria spiralis</i>	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2015
<i>Potamogeton pusillus</i>	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Takeda <i>et al.</i> , 2011
<i>Potamogeton malaianus</i> y <i>P.</i> <i>maackianus</i>	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Wang <i>et al.</i> , 2010
<i>Egeria densa</i> y <i>Potamogeton</i> <i>illinoensis</i>	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Vanderstukken <i>et al.</i> , 2011
<i>Stratiotes aloides</i>	<i>Anabaena variabilis</i>	Mohamed y Al Shehri, 2010
<i>Hydrilla verticillata</i>	<i>Anabaena flos-aquae</i> (FACHB-245)	Zhang <i>et al.</i> , 2012
<i>Hydrilla verticillata</i> y <i>Vallisneria spiralis</i>	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Gao <i>et al.</i> , 2011;
<i>Chara australis</i> y <i>Potamogeton crispus</i>	<i>Anabaena variabilis</i>	Pakdel <i>et al.</i> , 2013

Macrófitas sumergidas		
Especie	Cianobacteria inhibida	Referencia
<i>Elodea nuttallii</i>	<i>Oscillatoria</i> y <i>Microcystis</i>	Vanderstukken <i>et al.</i> , 2014
<i>Lemna trisulca</i>	<i>Anabaena flos-aquae</i>	Kaminski <i>et al.</i> , 2014; Kaminski <i>et al.</i> , 2015
<i>Myriophyllum spicatum</i>	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Zhu <i>et al.</i> , 2010; Wang <i>et al.</i> , 2011, Nakai <i>et al.</i> , 2012; Svanys <i>et al.</i> , 2013; Liu <i>et al.</i> , 2018

Wang y colaboradores (2012) reportaron que las macrófitas sumergidas *Colocasia esculenta*, *Lindernia rotundifolia*, *Hygrophila stricta*, *Cryptocoryne crispatula* y *Pistia stratiotes* (Wu *et al.*, 2013) disminuyen rápidamente la concentración de nutrientes como N y/o P, evitando el crecimiento de cianobacterias.

Por otra parte, se ha informado algunas macrófitas emergentes como *Phragmites communis*, *Thalia dealbata*, *Acorus calamus*, *Oenanthe javanica*, *Sagittaria sagittifolia*, *Typha angustifolia*, *Nelumbo nucifera*, *Nymphaea tetragona*, *Alternanthera philoxeroides*, *Typha latifolia* y *Arundo donax*, inhiben el crecimiento de algunas especies de cianobacterias como *Microcystis*, *Anabaena flos-aquae* y *Aphanizomenon flos-aquae*. En el caso de la macrófita flotante *Pistia stratiotes*, mostró una actividad altamente efectiva contra *M. aeruginosa* (Hong *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2013a; Wang *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015; Cheng *et al.*, 2017).

Los extractos de muchas plantas terrestres también muestran efectos inhibitorios contra las cianobacterias. Estas plantas se distribuyen principalmente entre las familias de *Papaveraceae*, *Rutaceae*, *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Iridaceae* y *Ephedraceae*, por ejemplo, los extractos *E. equisetina* e *Iris tectorum*, mostraron un buen potencial para controlar las cianobacterias (Shao *et al.*, 2013; Cheng *et*

al., 2017). Por otro lado, el extracto de *Salvia miltiorrhiza*, *Artemisia annua*, el filtrado de semillas de *Moringa oleifera*, los extractos de *Acorus tatarinowii*, *Polygonum cuspidatum*, *Phellodendron amurense* y *Crataegus pinnatifida*, mostraron actividades anticianobacteriales altamente efectivas contra *M. aeruginosa* (Lürling y Beekman, 2010; Ni *et al.*, 2012; Yi *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013)

Otra fuente de extractos antialgas son los derivados de subproductos agrícolas, por ejemplo, la paja de cebada inhibe el crecimiento de muchas algas. También, la madera podrida, la hojarasca de hoja caduca y la hojarasca de coníferas, la paja y la cascarilla de arroz, los extractos de cáscaras de cítricos y el lixiviado de salvado de trigo inhiben el crecimiento de cianobacterias (Shao *et al.*, 2013).

4.6.3.4.3 Químicos anti-cianobacterias identificados de plantas y microorganismos.

La identificación de químicos naturales antialgas de plantas y microorganismos ha sido el enfoque principal para explicar los efectos inhibitorios de esas sustancias biológicas contra las algas. De acuerdo con las unidades de estructura orgánica básica, los tipos potenciales de aleloquímicos se resumen en 14 tipos: ácidos orgánicos solubles en agua, alcoholes lineales, aldehídos alifáticos y alcanonas; lactonas insaturadas simples; ácidos grasos de cadena larga y polianinas; naftoquinonas, antraquinonas y quinonas compuestas; fenoles simples, ácidos benzoicos y derivados; ácidos cinámicos y derivados; cumarinas; flavonoides; taninos; ferpenoides y esteroides; aminoácidos y polipéptidos; alcaloides y cianhidrinas; sulfuros y glucosinolatos; purinas y nucleótidos. En el ecosistema terrestre, se han reportado estos aleloquímicos en la agricultura, la silvicultura y el control de las malas hierbas (Hu y Hong, 2008).

Los ácidos p-cumárico, ácido vanílico y p-hidroxibenzoico presentes en varias especies de macrófitas (Zhang *et.al.*, 2010); los polifenoles de *Myriophyllum spicatum*, el 2-metil acetoacetato de etilo (EMA) de *Phragmites communis* Trin, la gramina de *Arundo donax*, la α -asarona de *Acorus gramineus*, la artemisinina aislada de *Artemisia annua* (Ni *et. al.*, 2012), inhiben el crecimiento de *M. aeruginosa* (Hong *et. al.*, 2010).

Por ende, se debe considerar que los datos sobre concentraciones efectivas contra cianobacterias en la literatura no son comparables. Diferentes especies y cepas de cianobacterias a menudo exhiben respuestas dramáticamente diferentes a un compuesto. De manera que, dentro de un género, las respuestas de diferentes cepas a un compuesto también serán diferentes. Considerando que no hay criterios uniformes dentro de los bioensayos publicados de químicos naturales contra las cianobacterias, factores como el tiempo de incubación y las densidades iniciales de inoculación, también pueden influir significativamente en los resultados (Shao *et al.*, 2013).

4.6.3.4.4 Efectos alguistáticos y alguicidas

Los efectos inhibitorios de los aleloquímicos en algas pueden ser alguistáticos o alguicidas. Un efecto alguistático significa que las algas objetivo pueden recuperar su crecimiento después de la degradación de los aleloquímicos, mientras que un efecto alguicida significa que las algas objetivo mueren y no se observa ningún rebrote. Generalmente, los efectos alguistáticos o alguicidas dependen de la concentración expuesta. Además, diferentes algas pueden exhibir diferentes efectos alguistáticos o alguicidas hasta cierto nivel de estrés por parte de los aleloquímicos. Shao y colaboradores (2013) reportaron que algunas algas eucarióticas exhibieron efectos alguistáticos bajo el estrés de la bacillamida en la concentración de inhibición media (CI_{50}), mientras que las cianobacterias *Anabaena sp.* y *Aphanizomenon gracile* exhibieron efectos alguicidas. Estas

diferentes respuestas pueden afectar al conjunto de algas después de la degradación de los aleloquímicos. Por lo tanto, es importante determinar si los efectos alguistáticos o alguicidas, o ambos, son operativos para un aleloquímico particular antes de ser adoptado para el control de algas.

4.6.3.4.5 Sensibilidad de las algas a las macrófitas acuáticas

Muchos factores biológicos y no biológicos están implicados en las sensibilidades de las algas a la alelopatía de las macrófitas acuáticas. Los factores biológicos incluyen las especies, el estado de crecimiento, la etapa de crecimiento de las algas y las plantas acuáticas, la concentración de aleloquímicos liberados al medio etc. *Eleocharis microcarpa* podría producir compuestos que promueven el crecimiento de cianobacterias a bajas concentraciones, pero que las inhiben a altas concentraciones. Las acciones combinadas de los aleloquímicos de las plantas acuáticas incluyen tres formas: efectos aditivos, sinérgicos y antagonistas.

El estrés ambiental, el estrés nutricional y el estrés por temperatura, afecta la sensibilidad de las algas a la alelopatía de las plantas acuáticas. Se ha observado que sólo bajo condiciones de alto fósforo y bajo nitrógeno, *Ceratophyllum demersum* demuestra efectos alelopáticos. También se ha observado que cuando las plantas acuáticas y las algas fueron cultivadas en el medio con nitrógeno limitado, las plantas acuáticas mostraron efectos inhibitorios significativos sobre las algas, mientras que bajo fósforo normal y medio de cultivo limitado por fósforo, no se observó la alelopatía inhibidora. La capacidad de *Eichhornia crassipes* para inhibir el crecimiento de algas se produjo en un cierto rango de temperatura, que podría perderse cuando la temperatura es demasiado baja (Hu y Hong, 2008).

4.6.3.4.6 Modos de acción de los aleloquímicos de las macrófitas acuáticas en algas

Eigemann (2013), establece cinco aspectos de los posibles modos de acción de los aleloquímicos presentes en las macrófitas sobre el crecimiento de las cianobacterias tóxicas:

1. Destrucción de la estructura celular
2. Afectación de la actividad fotosintética
3. Afectación de la respiración celular
4. Afectación de la actividad enzimática
5. Daño en el ADN

1. Destrucción de la estructura celular

Los aleloquímicos de *Phragmites communis* como el 2-metilacetoacetato de etilo (EMA) y la salcolina B de *Hordeum vulgare* oxidan los principales ácidos grasos de la membrana celular de *Microcystis aeruginosa* causando directamente el aumento de la fluidez, la disminución de la selectividad de sustancias de la membrana celular, la disminución de la estabilidad celular y la fuga de los contenidos intracelulares (como K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+}) (Xiao *et al.*, 2014). También se observó que la estructura lamelar tilacoidal desapareció, el área del nucléolo se volvió irregular y el volumen de la vacuola aumentó. Los exudados de *Hydrilla verticillata* en *M. aeruginosa* mostraron que la membrana celular aparentemente separada de la pared celular, las láminas de tilacoides se volvieron sueltas y desordenadas, agravando los daños con el tiempo (Hu y Hong, 2008).

Los ácidos p-cumárico, ácido vanílico, p-hidroxibenzoico presentes en varias macrófitas dañan irreversiblemente la membrana y la pared celular de las cianobacterias, en consecuencia, se fugan y liberan electrolitos, ácidos nucleicos y proteínas dando como resultado la desintegración de las cianobacterias. La

entrada de los ácidos fenólicos a través de la membrana causa la despolarización de la membrana celular y cambia la afluencia y la retención de iones (Zhang *et al.*, 2010). El extracto de *Hydrilla verticillata* provoca un daño irreversible en la membrana celular de *Anabaena flos-aquae* FACHB-245 causando la liberación de nucleótidos y proteínas (Zhang *et al.*, 2011).

2. Afectación de la actividad fotosintética

La gramina presente en macrófitas terrestres como *Arundo donax*, la artemisinina extraída de *Artemisa annua* (Ni *et al.*, 2012) disminuye la actividad fotosintética *M. aeruginosa* al destruir los pigmentos fotosintéticos, siendo la ficoeritrina la que mostró mayor sensibilidad (Hong *et al.*, 2010). Los ácidos fenólicos y polifenoles presentes en el género *Myriophyllum* inhiben la actividad del fotosistema II (PS II) y reducen la tasa de crecimiento de *M. aeruginosa* basada en clorofila-a (Zhu *et al.*, 2010; Chang *et al.*, 2012; Eigemann *et al.*, 2013). *Stratiotes aloides* disminuyó significativamente la concentración de clorofila-a en *Anabaena variabilis* (Mohamed y Al Shehri, 2010).

La interrupción de la transferencia de electrones a través del fotosistema II (PS II) a menudo conduce al aumento de la desexcitación de la energía excitada a través de la vía no fotoquímica, lo que conduce al aumento de las especies de oxígeno reactivo (ROS) en las células. Se ha informado que el polifenol ácido pirogálico podría aumentar el contenido de malondialdehído (MDA) en la célula de *M. aeruginosa*, confirmando que indujo un daño oxidativo a la célula de *M. aeruginosa* siendo MDA el producto oxidativo de ácidos grasos insaturados. Aunque se ha confirmado que los polifenoles pueden inducir daño oxidativo a las cianobacterias, todavía no se sabe si este daño oxidativo es causado por radicales originados de polifenoles autooxidados (reacción con oxígeno molecular) o por las ROS originadas de la propia célula de cianobacterias debido a la interrupción de la cadena de transferencia de electrones del PS II, o por la cooperación de ambos mecanismos (Shao *et al.*, 2013).

Se ha demostrado que los mecanismos inhibidores del ácido pirogálico presente en *Myriophyllum verticillatum* hacia especies de *Microcystis* pueden implicar la síntesis de proteínas, la fosfatasa alcalina, la cadena de transferencia de electrones fotosintética el daño oxidativo y la expresión genética. Además, inhiben significativamente el crecimiento y cambian el sistema oxidativo y la expresión de siete genes (*psbA*, *grpE*, *fabZ*, *recA*, *cmpA* y *ftsZ*) en *Cylindrospermopsis raciborskii* F2. Estos hallazgos indican que el daño a los sistemas oxidativo y fotosintético puede ser dos mecanismos importantes para el efecto alelopático del ácido pirogálico en *C. raciborskii* F2. El tratamiento con ácido pirogálico regula positivamente la expresión del gen *cyrJ*, que es eficaz como sonda de toxina, esto implica que la liberación potencial de toxinas necesita ser monitoreada junto con el control de *Cylindrospermopsis* usando ácido pirogálico o macrófitas sumergidas que secretan altos niveles de ácido pirogálico (Wu *et al.*, 2013b).

4. Afectación de la actividad enzimática

La salcolina A de *Hordeum vulgare* inhibe la actividad esterasa intracelular *M. aeruginosa*, que se utiliza como un índice de la actividad metabólica intracelular (Xiao *et al.*, 2014).

Los polifenoles del género *Myriophyllum* y el extracto de *Stratiotes aloides* inhiben significativamente la actividad de la fosfatasa alcalina (APA) y la esterasa en algunas especies de cianobacterias (Mohamed y Al Shehri, 2010; Eigemann *et al.*, 2013; Svanys *et al.*, 2014).

5. Daño en el ADN

La sanguinarina un alcaloide fototóxico, que produce de H₂O₂ y el oxígeno molecular de singlete (forma energéticamente excitada del oxígeno molecular) puede implicar daño del ADN en *M. aeruginosa* NIES-843 (Shao *et al.*, 2013).

4.6.3.4.7 Metodologías para determinar los efectos alelopáticos de las macrófitas acuáticas en cianobacterias

La alelopatía de los macrófitos acuáticos en cianobacterias es combinatoria, altamente efectiva, y selectiva de especies con dosis funcionales bajas y rápido inicio de acción, y es fácilmente interferida por otros factores ambientales. Los métodos utilizados para estudiar la alelopatía de los macrófitos acuáticos en las algas se dividen en dos partes:

(1) El sistema de recolección de lixiviados con el cultivo de los macrófitos acuáticos vivos, que consta de dos métodos, el sistema de cultivo de macrófitos acuáticos únicos y el sistema de co-cultivo con macrófitos acuáticos y algas (He *et al.*, 2016; Cheng *et al.*, 2017);

(2) El sistema de preparación de extracto con los macrófitos acuáticos cosechados y secados, que también consta de dos métodos, el sistema de extracto de la planta con agua (Le Rouzic *et al.*, 2016) y el sistema de extracto de la planta con disolventes orgánicos, este último incluye el método de difusión en agar (método del círculo alguicida) (D'Abrosca *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2009 (a); Park *et al.*, 2009 (b)).

4.6.3.4.8 Métodos analíticos para la identificación de los aleloquímicos de las macrófitas

Actualmente, existen diferentes tipos de métodos de análisis para la identificación de los aleloquímicos, tales como la espectrometría de cromatografía de gases-masas (GC-MS), cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía de líquidos con espectrometría de masas (LC-MS), espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN), y la espectrometría infrarroja de la transformada de Fourier (FTIR), de los cuales el nivel de detección puede ser inferior a $\mu\text{g/L}$. La RMN parece ser el método más prometedor para la resolución de aleloquímicos,

ya que puede dar el desplazamiento químico, el acoplamiento espín-espín, y los modos de división, así como la integración de las áreas de señal para determinar con precisión la estructura molecular y la configuración de los módulos espaciales, por lo tanto, la RMN tiene una buena previsibilidad de la estructura física; considerando que, los resultados de RMN son muy complicados, los instrumentos de GC-MS y LC-MS siguen siendo las herramientas más eficaces para la caracterización de compuestos desconocidos, en particular mediante la GC-MS con bibliotecas de referencia profesionales de MS (Hu y Hong, 2008).

4.6.3.4.9 Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica de diagnóstico frecuentemente utilizada en ecología para evaluar el estado metabólico de las células, se obtienen datos de análisis multiparamétricos en un período corto de tiempo sobre la base de los parámetros fluorométricos y de dispersión de luz de poblaciones de células individuales. Las señales de fluorescencia pueden derivarse por autofluorescencia de las células o pueden estar mediadas por marcadores de fluorescencia. Esta técnica se introdujo a partir de la década de 2000, permite caracterizar el impacto inducido de productos químicos en microalgas, es adecuada para detectar la alteración de las características específicas de las algas celulares, es una herramienta de diagnóstico prometedora para estudiar la respuesta del fitoplancton a los aleloquímicos. La fluorescencia permite conocer procesos fisiológicos específicos de células de algas y, modos específicos de acción de sustancias químicas y factores de estrés sobre las algas (Eigemann, 2013). Estudios futuros establecerán marcadores de fluorescencia adicionales para otros procesos fisiológicos que podrían ser objetivos de aleloquímicos, para contribuir aún más a una mejor comprensión de la relevancia ecológica de la alelopatía en ambientes acuáticos (Eigemann *et. al.*, 2013).

4.7 Arroz de Morelos variedad A-98

La variedad de arroz Morelos A-98 se está cultivando aproximadamente en el 90% de la superficie destinada a este cultivo en el estado de Morelos ya que presenta una serie de ventajas con respecto a su antecesora Morelos A-92. La variedad Morelos A-98 fue desarrollada y liberada por el Programa de Mejoramiento Genético de Arroz del Campo Experimental de Zacatepec, se obtuvo del cruzamiento triple realizado en 1987 entre los progenitores IR62/LP4-86//LP34-86. Entre los años 1989-1992 se realizaron cinco ciclos de selección para formar la línea uniforme CAEZ 202-111-87; entre 1993-1995 fue evaluada para determinar su estabilidad en el rendimiento y calidad industrial; en los años 1996-1997 se validó en parcelas obteniéndose rendimientos superiores a 10 t/ha y en 1998 fue liberada como una nueva variedad (Figura 6) (Salcedo, 2006).

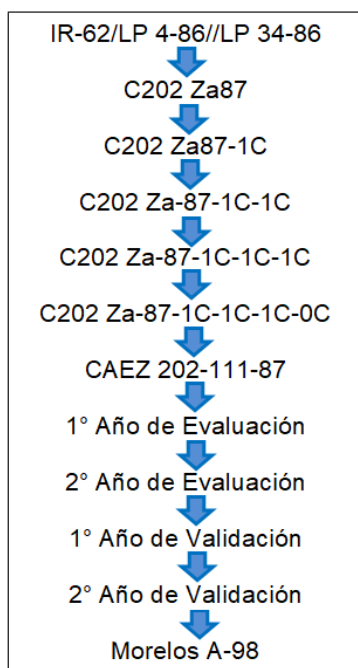


Figura. 6. Esquema genealógico utilizado para la obtención del arroz Morelos A-98.

En el Estado de Morelos, se realiza la producción de arroz en 22 municipios: Axochiapan, Coatlán del Río, Cuautla, Cuernavaca, Tepalcingo, Tlaltizapán,

Tlaquiltenango, Xochitepec, Emiliano Zapata, Jantetelco, Jiutepec, Jojutla, Mazatepec, Puente de Ixtla, Temixco, Zacatepec, Amacuzac, Ciudad Ayala, Jonacatepec, Miacatlán, Tetecala y Yautepec. En el ciclo agrícola Primavera-Verano 2016 se cosecharon 10 mil 550 toneladas. El 25 de enero de 2017 se publicó en el Diario Oficial de la Federación (DOF) la Norma Oficial Mexicana NOM-080-SCFI-2016 concede la Denominación de Origen al arroz del Estado de Morelos (http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5469806&fecha=25/01/2017).

5. METODOLOGÍA

La obtención de los extractos se llevó a cabo en el Laboratorio de Química Orgánica del Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH).

5.1 Obtención de los extractos crudos

Para la obtención de los aleloquímicos presentes en la cascarilla de arroz se utilizaron dos métodos de extracción: por reflujo y por maceración, con el objetivo de determinar cuál presentaba el mejor rendimiento y debido a que se buscan principalmente compuestos fenólicos se utilizaron tres disolventes orgánicos con una polaridad intermedia hasta una alta, estos fueron el acetato de etilo, etanol al 96% y metanol al 99.5%.

5.1.1 Extracción por reflujo

La cascarilla de arroz seca fue triturada hasta obtener un polvo fino, se pesaron 500 g y se colocaron en un matraz balón, se añadieron 5.5 L de metanol destilado, este matraz fue conectado al equipo de extracción que consta de un refrigerante colocado en la parte superior y una manta de calentamiento en la parte de abajo. Se procedió a calentar el metanol a una temperatura aproximada de 45 °C y una vez obtenida la primera gota del disolvente el reflujo se mantuvo durante 3 horas (Figura 7).



Figura. 7. Extracción por reflujo con metanol.

5.1.2 Filtración y evaporación del disolvente.

Después de las 3 horas de extracción se retiró el metanol del matraz filtrándolo a través de un papel filtro Whatman No. 42. El filtrado se colocó en el rotavapor (marca BUCHI, modelo R-100) a una temperatura de 40 °C con el propósito de evaporar el disolvente (Figura 8), el cual fue retirado con la ayuda de una pipeta Pasteur conectada a una jeringa para evitar que este se quedara pegado en la parte interior del matraz. Se colocó el extracto crudo en un recipiente de vidrio forrado de aluminio para impedir que estuviera en contacto directo con la luz.

El metanol recuperado en el proceso de evaporación fue utilizado para una segunda y una tercera extracción por reflujo cada una de 3 horas y realizando el mismo procedimiento que en la primera, esto con la intención de obtener la mayor cantidad de extracto posible.



Figura. 8. Recuperación del disolvente utilizando el rotavapor.

Después de la evaporación, el extracto crudo aún conserva una cantidad considerable de humedad debido al solvente, por lo que para eliminarla fue necesario secarlo con aire a presión durante 48 horas.

Este procedimiento de extracción por reflujo se realizó de la misma manera para el etanol y el acetato de etilo.

5.1.3 Extracción por maceración

Este extracto fue obtenido haciendo unas modificaciones al método realizado por Park *et al.* (2009a). Para este método se realizaron dos pruebas, una con la cascarilla entera y la otra con la cascarilla molida. Ambas fueron inmersas en etanol destilado durante 7 días, con la finalidad de determinar si existía alguna diferencia en la cantidad de extracto crudo que podía obtenerse (Figura 9).



Figura. 9. Extracción por maceración con etanol.

Transcurridos los 7 días, se siguió el mismo proceso de filtración, evaporación del disolvente y secado del extracto crudo explicado anteriormente.

De esta manera se obtuvieron cinco muestras de extracto crudo (Figura 10), las cuales se enumeran a continuación:

- 1) Extracción por reflujo en metanol, con cascarilla molida.
- 2) Extracción por reflujo en etanol, con cascarilla molida.
- 3) Macerado en etanol, con cascarilla molida.
- 4) Macerado en etanol, con cascarilla entera.
- 5) Extracción por reflujo en acetato de etilo, con cascarilla molida.

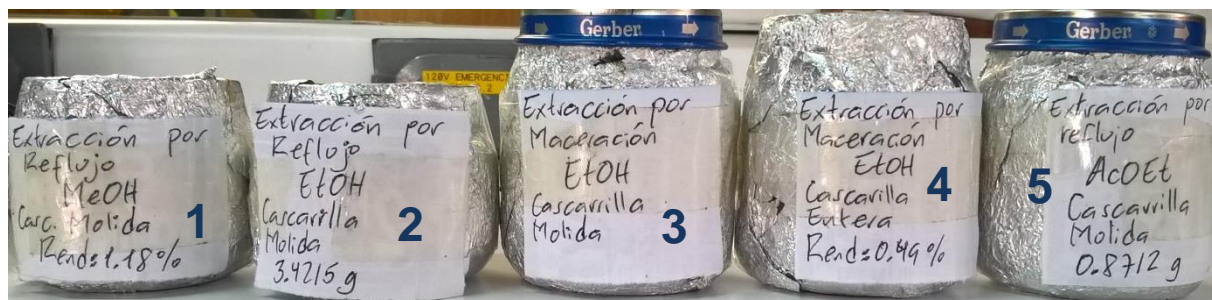


Figura. 10. Extractos crudos obtenidos con metanol, etanol y acetato de etilo.

5.1.4 Rendimiento de los extractos crudos

El cálculo del rendimiento se determinó para saber la cantidad en gramos de extracto crudo obtenida en cada proceso de extracción, para ello se pesó el extracto crudo completamente seco y sacando su porcentaje correspondiente con respecto al peso total de cascarilla utilizada (500 g) en cada una de las extracciones realizadas. En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos:

Tabla 2. Rendimiento en gramos de los extractos crudos.

Tipo de extracción	Cascarilla	Peso del extracto	Rendimiento (%)
Macerado en EtOH	Entera	2.4780 g	0.49%
Macerado en EtOH	Molida	4.6003 g	0.92%
Con reflujo en MeOH	Molida	5.9297 g	1.18%
Con reflujo en EtOH	Molida	3.4215 g	0.68%
Con reflujo en AcOEt	Molida	0.8712 g	0.17%

5.2 Cromatografía en placa

Los cinco extractos crudos se analizaron por cromatografía en placa para determinar cuáles eran los mejores para el análisis por RMN H¹ puesto que no resulta conveniente analizar todos debido al alto consumo de reactivos.

Se cortaron 6 placas cromatográficas del mismo tamaño, con un lápiz se marcó una distancia de 0.5 cm en ambos extremos de cada una de las placas y en la línea inferior se hicieron cinco separaciones de 0.5 cm cada una, que delimitaron cada una de las muestras. Para observar la separación de los compuestos presentes en los extractos se utilizaron diferentes mezclas de solventes aumentando su polaridad con base en lo observado en las cromatografías en placa, las cuales se muestran en la siguiente Tabla 3.

Tabla 3. Mezclas de disolventes utilizadas en la cámara cromatográfica.

Disolventes	%
Hexano – AcOEt	7:3
Hexano – AcOEt	1:1
AcOEt	1:0
AcOEt – MeOH	1:1
MeOH	1:0

Se redisolvió 0.5 mg de cada uno de los extractos crudos en 0.5 mL de metanol. Utilizando un capilar se tomó una muestra de cada extracto y se colocaron en la placa limpiando el capilar tres veces con etanol destilado antes de tomar el siguiente extracto. Una vez colocadas todas las muestras en la placa se procedió a colocarla en la cámara cromatográfica (Figura 11), donde en el primer caso, contenía una mezcla 1:1 de hexano–acetato de etilo previamente introducido. Se retiró la placa de la cámara cuando el disolvente se encuentra muy cerca de la línea hecha en la parte superior.

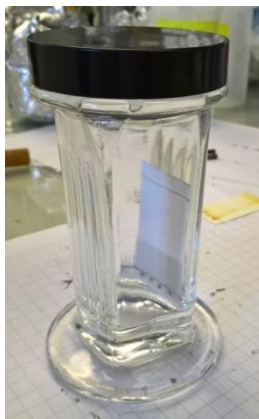


Figura. 11. Cromatografía en placa de los extractos crudos utilizando diferentes mezclas de solventes.

La observación de los compuestos se realizó colocando la placa en una cámara de luz UV, es posible que algunos compuestos presentes no absorban luz UV, por esta razón la visualización (o revelado) del cromatograma también se llevó a cabo usando un agente revelador, en este caso una cámara con yodo, y ácido sulfúrico (Figura 12), proporcionando manchas más coloreadas. Se realizó el mismo procedimiento con las demás placas cambiando la polaridad en la cámara cromatográfica.

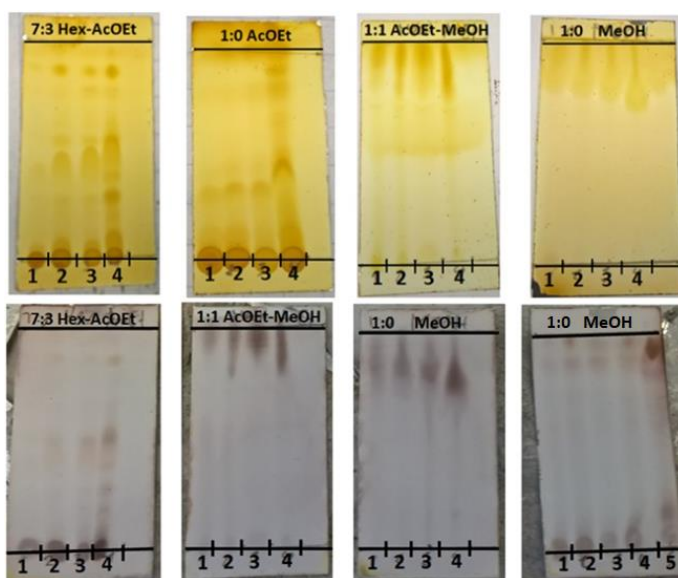


Figura. 12. Revelado de las cromatografías en placa. Arriba, revelado con yodo. Abajo, revelado con ácido sulfúrico.

5.3 Análisis de los extractos crudos mediante RMN

A partir de los resultados obtenidos por cromatografía en capa fina, se determinó que extractos analizar mediante la técnica de RMN ^1H . El extracto obtenido por maceración en etanol con la cascarilla molida es uno de los que obtuvo un mejor rendimiento. También, se analizó el extracto obtenido con reflujo en AcOEt con la cascarilla molida para confirmar si existe una diferencia entre ambos solventes.

Se tomaron aproximadamente 0.1 mg del extracto crudo y se colocaron en dos viales (0.05 mg en cada uno) para evaporar por completo los residuos del disolvente. Iniciando su calentamiento en una parrilla a 40 °C durante 15 minutos, después con aire a presión se siguió evaporando el disolvente otros 90 minutos. Después de evaporar completamente el disolvente se hizo la prueba de solubilidad con dimetilsulfoxido (DMSO) (Figura 13). En uno de los viales se agregó 1 mL de DMSO agitando de manera constante, el extracto se disolvió por completo lo que significa que este disolvente es apto para utilizarse en el equipo de RMN.



Figura. 13. Prueba de solubilidad en DMSO.

Una vez comprobada la solubilidad se procedió a resuspender la muestra del otro vial en 2 mL de DMSO deuterado (DMSO- d_6) y se colocó en el tubo para RMN (Figura 14).



Figura. 14. Extracto suspendido en DMSO-d6.

El análisis de los extractos se llevó a cabo en el Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear del Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH). Para realizar el análisis se utilizó el equipo de RMN Brucker a 400 MHz (Figura 15) se verificó con un medidor de volumen que la cantidad de muestra a analizar fuese la suficiente. Se colocó el tubo dentro del carrusel del equipo, se abrió el software MestReNova versión 6.0, dando clic en el botón “CREATE DATATEST” aparece una ventana donde pide los datos del tipo de experimento (PROTON) y el solvente que se utilizó (DMSO-d6). Finalmente, dar clic en el botón OK para iniciar con el análisis.



Figura. 15. Equipo de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

En las Figuras 16 y 17 se muestran los espectros de RMN de los extractos de cascarilla molida obtenidos por maceración a temperatura ambiente con etanol y mediante extracción por reflujo con acetato de etilo.

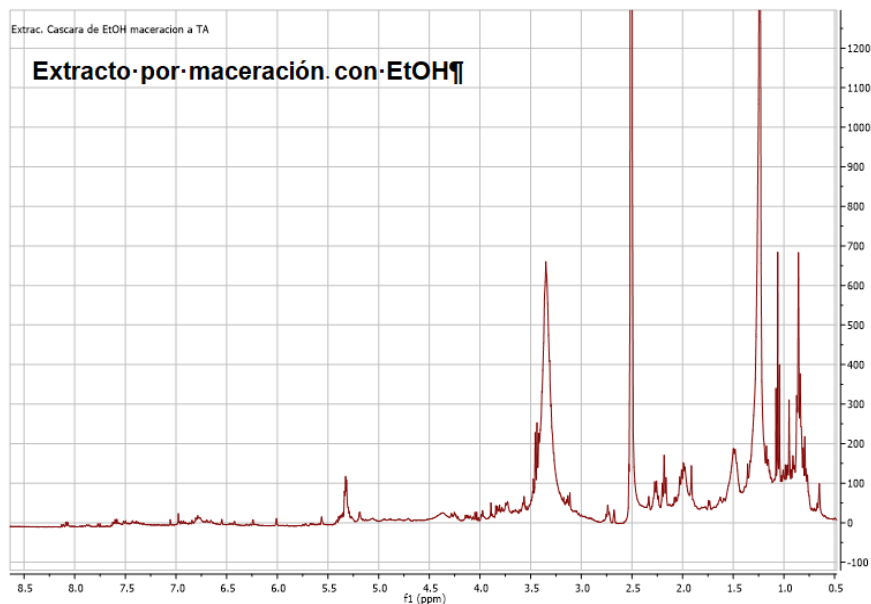


Figura. 16. Espectro de RMN del extracto etanólico a temperatura ambiente.

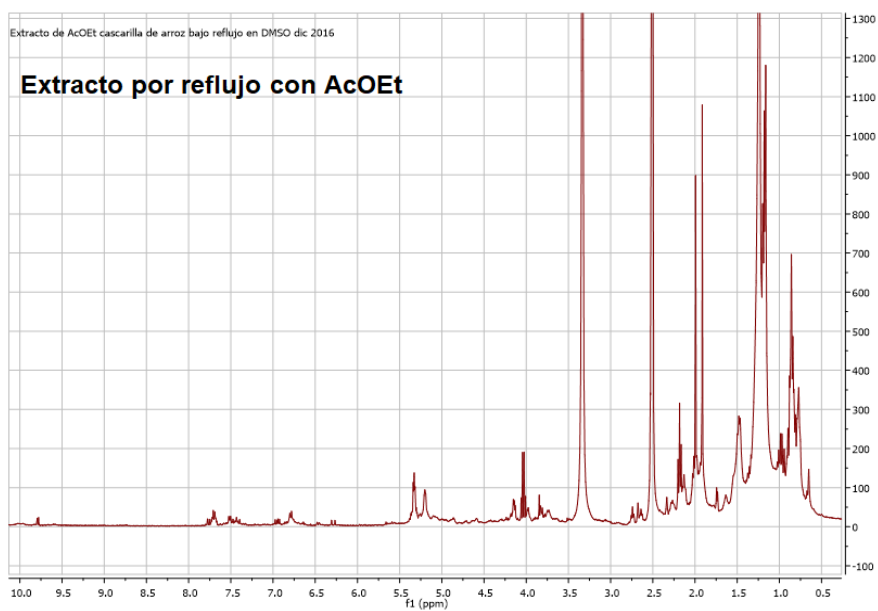


Figura. 17. Espectro de RMN del extracto obtenido por reflujo con AcOEt.

5.4 Obtención de fracciones del extracto crudo mediante cromatografía en columna

El proceso de purificación consiste en eliminar paulatinamente compuestos que no son de interés mediante una sucesión de cromatografías en columna utilizando diferentes solventes y mezclas entre estos mismos, las cuales arrastran diferentes tipos de compuestos basándose en su afinidad relativa.

5.4.1 Preparación de la columna cromatográfica

La columna cromatográfica fue colocada en un soporte vertical, con una varilla se colocó algodón en la parte del estrechamiento de la columna y con un embudo se vertieron 6 pulgadas de gel de sílica.

Para activar el gel de sílica se vertieron 300 mL de hexano destilado por la pared interna de la columna. Se abrió la llave y se recuperó el solvente hasta que quedó a 1 cm de altura con respecto a la sílica. A continuación, se mezcló el extracto con sílica hasta obtener un polvo fino y se vació en la columna (Figura 18).



Figura. 18. Activación del solvente y colocación del extracto.

Una vez colocado el extracto se procedió a realizar el proceso de separación de las fracciones utilizando tres disolventes: Hexano (Hex), acetato de etilo (AcOEt) y metanol (MeOH) y sus mezclas, tomando en cuenta la Tabla 4.

Tabla 4. Mezcla de solventes utilizados en la cromatografía en columna.

Corrida	Hex	AcOEt	Corrida	AcOEt	MeOH
1	100%		12	90%	10%
2	90%	10%	13	80%	20%
3	80%	20%	14	70%	30%
4	70%	30%	15	60%	40%
5	60%	40%	16	50%	50%
6	50%	50%	17	40%	60%
7	40%	60%	18	30%	70%
8	30%	70%	19	20%	80%
9	20%	80%	20	10%	90%
10	10%	90%	21		100%
11		100%			

La primera corrida se realizó utilizando 300 mL de hexano destilado al 100% donde se recuperaron 13 fracciones, esto significa que al ser 21 corridas con 13 fracciones cada una se obtuvieron 273 fracciones en total.

De la segunda a la décima corrida se realizaron las siguientes operaciones:

Segunda corrida (90% Hex – 10% AcOEt, 270 mL – 30 mL)

Se reutilizaron 270 mL de la primera corrida (100% Hex), ajustando siempre a un volumen total de 300 mL.

$$270 \text{ mL} \Rightarrow \begin{array}{l} 100\% \text{ Hex} - 270 \text{ mL} + 0 \text{ mL} = 270 \\ 0\% \text{ AcOEt} - 0 \text{ mL} + 30 \text{ mL} = 30 \end{array}$$

Esto significa que para obtener la mezcla 90–10 de Hex-AcOEt se añadieron 30 mL de AcOEt.

Tercera corrida (80% Hex – 20% AcOEt, 240 mL – 60 mL)

Se reutilizaron 260 mL de la segunda corrida (90% Hex – 10% AcOEt).

$$\begin{array}{r} 260 \text{ mL} \Rightarrow 90\% \text{ Hex} - 234 \text{ mL} + 6 \text{ mL} = 240 \\ 10\% \text{ AcOEt} - 26 \text{ mL} + 34 \text{ mL} = 60 \end{array}$$

Se añadieron 6 mL de Hex y 34 mL de AcOEt.

Cuarta corrida (70% Hex – 30% AcOEt, 210 mL – 90 mL):

$$\begin{array}{r} 260 \text{ mL} \Rightarrow 80\% \text{ Hex} - 208 \text{ mL} + 2 \text{ mL} = 210 \\ 20\% \text{ AcOEt} - 52 \text{ mL} + 38 \text{ mL} = 90 \end{array}$$

Se añadieron 2 mL de Hex y 38 mL de AcOEt.

Quinta corrida (60% Hex – 40% AcOEt, 180 mL – 120 mL):

$$\begin{array}{r} 250 \text{ mL} \Rightarrow 70\% \text{ Hex} - 175 \text{ mL} + 5 \text{ mL} = 180 \\ 30\% \text{ AcOEt} - 75 \text{ mL} + 45 \text{ mL} = 120 \end{array}$$

Se agregaron 5 mL de Hex y 45 mL de AcOEt

Sexta corrida (50% Hex – 50% AcOEt, 150 mL – 150 mL):

$$\begin{array}{r} 240 \text{ mL} \Rightarrow 60\% \text{ Hex} - 144 \text{ mL} + 6 \text{ mL} = 150 \\ 40\% \text{ AcOEt} - 96 \text{ mL} + 54 \text{ mL} = 150 \end{array}$$

Se adicionaron 6 mL de Hex y 54 mL de AcOEt.

Séptima corrida (40% Hex – 60% AcOEt, 120 mL – 180 mL):

$$\begin{array}{r} 230 \text{ mL} \Rightarrow 50\% \text{ Hex} - 115 \text{ mL} + 5 \text{ mL} = 120 \\ 50\% \text{ AcOEt} - 115 \text{ mL} + 65 \text{ mL} = 180 \end{array}$$

Se añadieron 5 mL de Hex y 65 mL de AcOEt.

Octava corrida (30% Hex – 70% AcOEt, 90 mL – 210 mL):

$$\begin{array}{rcl} 220 \text{ mL} \Rightarrow & 40\% \text{ Hex} - 88 \text{ mL} & + 2 \text{ mL} = 90 \\ & 60\% \text{ AcOEt} - 132 \text{ mL} & + 78 \text{ mL} = 210 \end{array}$$

Se agregaron 2 mL de Hex y 78 mL de AcOEt.

Novena corrida (20% Hex – 80% AcOEt, 60 mL – 240 mL):

$$\begin{array}{rcl} 190 \text{ mL} \Rightarrow & 30\% \text{ Hex} - 57 \text{ mL} & + 3 \text{ mL} = 60 \\ & 70\% \text{ AcOEt} - 133 \text{ mL} & + 107 \text{ mL} = 240 \end{array}$$

Se adicionaron 3 mL de Hex y 107 mL de AcOEt.

Décima corrida (10% Hex – 90% AcOEt, 30 mL – 270 mL):

$$\begin{array}{rcl} 150 \text{ mL} \Rightarrow & 20\% \text{ Hex} - 30 \text{ mL} & + 0 \text{ mL} = 30 \\ & 80\% \text{ AcOEt} - 120 \text{ mL} & + 150 \text{ mL} = 270 \end{array}$$

Se añadieron 150 mL de AcOEt.

Decimoprimerá corrida (100% AcOEt, 300 mL):

En esta corrida se utilizaron 300 mL de AcOEt destilado.

Para las mezclas correspondientes a AcOEt – MeOH se utilizaron las mismas operaciones realizadas en las mezclas Hex – AcOEt.

En la Figura 19, se muestran las cromatografías en columna correspondientes a los solventes Hex, AcOEt y MeOH y sus respectivas mezclas, donde se puede observar la distribución de las diferentes coloraciones.

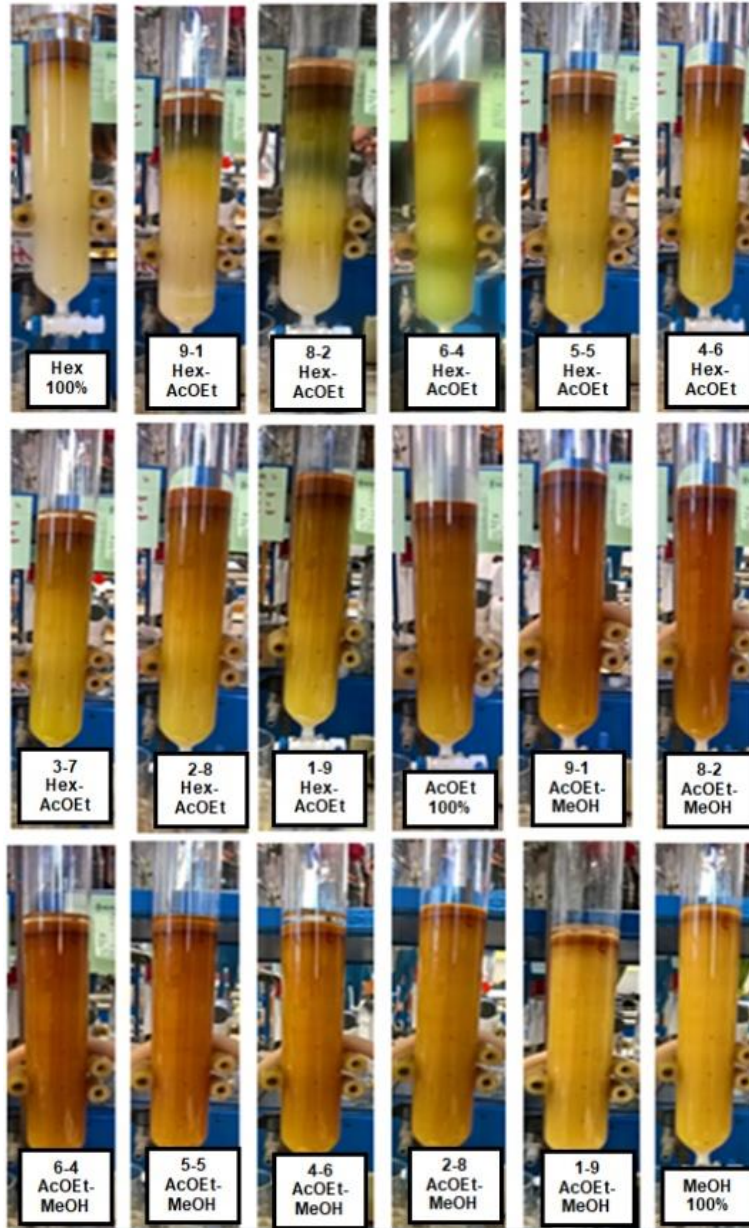


Figura. 19. Cromatografías en columna Hex–AcOEt y AcOEt–MeOH.

Con el propósito de agilizar el proceso y disminuir el número de cromatografías en placa, se procedió a unir las fracciones tomando en cuenta su coloración. Las fracciones obtenidas en las cromatografías en columna de Hex–AcOEt que se unieron se muestran en la Tabla 5. Por ejemplo, se unieron las fracciones 1, 2 y 3; después, las fracciones 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 y así sucesivamente.

Tabla 5. Fracciones unidas debido a su coloración.

No.	Fracciones	Mezcla Hex-AcOEt	No.	Fracciones	Mezcla Hex-AcOEt
1	1-3	100-0	18	4-6	50-50
2	4-12	100-0	19	7-9	50-50
3	1-9	90-10	20	10-12	50-50
4	10-11	90-10	21	1-3	40-60
5	12-13	90-10	22	4-6	40-60
6	1-3	80-20	23	7-9	40-60
7	4-6	80-20	24	10-12	40-60
8	7-12	80-20	25	1-3	30-70
9	1-3	70-30	26	4-8	30-70
10	4-6	70-30	27	9-12	30-70
11	7-8	70-30	28	1-6	20-80
12	9-12	70-30	29	7-12	20-80
13	1-3	60-40	30	1-6	10-90
14	4-6	60-40	31	7-12	10-90
15	7-9	60-40	32	1-4	0-100
16	10-12	60-40	33	5-8	0-100
17	1-3	50-50	34	9-12	0-100

Al unir estas fracciones el número su número disminuyó de 143 a 34, aun así, no todas se analizaron mediante cromatografía en placa debido a que representaría un alto consumo de material por lo que se optó por seleccionar de manera intercalada las fracciones que se analizarían (Tabla 6).

Tabla 6. Fracciones analizadas mediante cromatografía en placa.

Fracciones	Mezcla Hex-AcOEt	Fracciones	Mezcla Hex-AcOEt
1-3	100-0	10-12	50-50
10-11	90-10	4-6	40-60
1-3	80-20	10-12	40-60
7-12	80-20	4-8	30-70
4-6	70-30	1-6	20-80
9-12	70-30	1-6	10-90
4-6	60-40	1-4	0-100
10-12	60-40	9-12	0-100
4-6	50-50		

Placa 1: En esta placa se analizaron las fracciones 1-3 (100-0), 10-11 (90-10), 1-3 (80-20), 7-12 (80-20) y 4-6 (70-30), utilizando en la cámara cromatográfica Hex-100% y una mezcla 80-20 de Hex-AcOEt, en este caso no se observó la presencia de componentes en estas fracciones.

Placa 2: En esta placa se analizaron las fracciones 4-6 (70-30), 9-12 (70-30), 4-6 (60-40), 10-12 (60-40) y 4-6 (50-50), utilizando Hex-100% y una mezcla 80-20 de Hex-AcOEt (Figura 20).

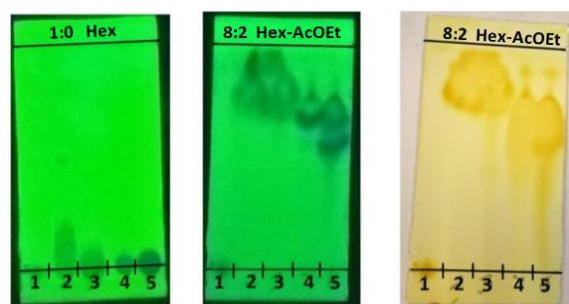


Figura. 20. Placa 2 revelada con luz UV y yodo

Placa 3: En esta placa se analizaron las fracciones 10-12 (50-50), 4-6 (40-60), 10-12 (40-60), 4-8 (30-70) y 1-6 (20-80), utilizando mezclas 80-20, 70-30 y 60-40 de Hex-AcOEt (Figura 21).

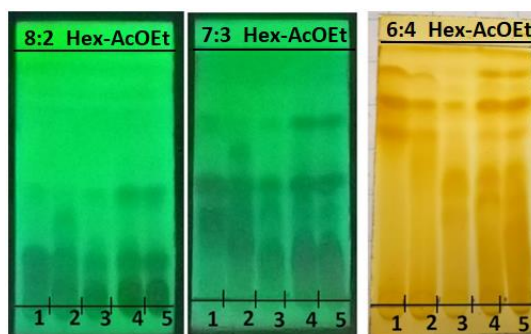


Figura. 21. Placa 3 revelada con luz UV y yodo

Placa 4: En esta placa se analizaron las fracciones 1-6 (20-80), 1-6 (10-90), 1-4 (0-100) y 9-12 (0-100), utilizando mezclas 60-40, 40-60, 30-70, 20-80 Hex-AcOEt y AcOEt al 100% (Figura 22).

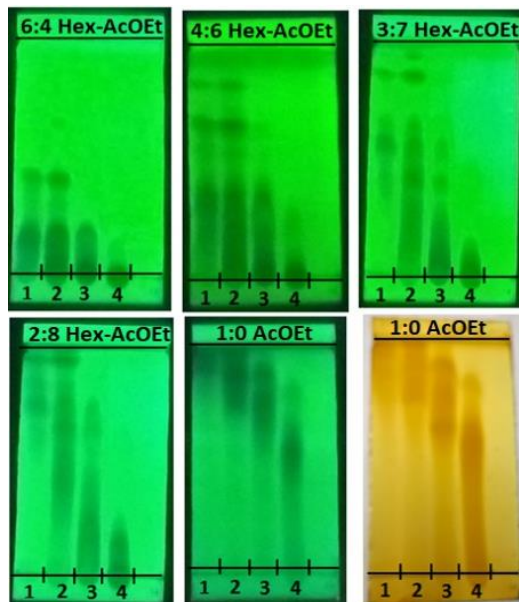


Figura. 22. Placa 4 revelada con luz UV y yodo.

Con base en los resultados anteriores se unieron las fracciones que mostraban una separación de componentes similar (Figura 23). En el caso de la Placa 1, se mezclaron las fracciones 1-12 (100-0), 1-13 (90-10) y 1-6 (80-20) (VIAL 1).

VIAL 2: Fracciones 7-12 (80-20) y 1-3 (70-30).

VIAL 3: Fracciones 4-12 (70-30) y 1-9 (60-40).

VIAL 4: Fracciones 10-12 (60-40) y 1-9 (50-50).

VIAL 5: Fracciones 10-12 (50-50) y 1-9 (40-60).

VIAL 6: Fracciones 10-12 (40-60), 1-12 (30-70), 1-12 (20-80) y 1-6 (10-90).

VIAL 7: Fracciones 7-12 (10-90) y 1-4 (0-100).

VIAL 8: Fracciones 5-12 (0-100).

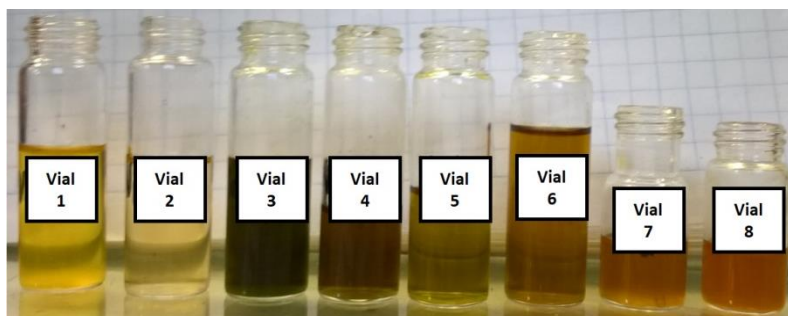


Figura. 23. Viales de las cromatografías en columna de Hex-AcOEt.

Para la cromatografía en columna de AcOEt – MeOH las diferentes fracciones que debido a su coloración se unieron en una sola se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Fracciones analizadas mediante cromatografía en placa.

No.	Fracciones	Mezcla AcOEt-MeOH	No.	Fracciones	Mezcla AcOEt-MeOH
1	1-7	90-10	18	7-9	50-50
2	8-9	90-10	19	10-12	50-50
3	10-12	90-10	20	1-3	40-60
4	1-3	80-20	21	4-6	40-60
5	4-6	80-20	22	7-9	40-60
6	7-9	80-20	23	10-12	40-60
7	10-12	80-20	24	1-3	30-70
8	1-3	70-30	25	4-6	30-70
9	4-6	70-30	26	7-9	30-70
10	7-9	70-30	27	10-12	30-70
11	10-12	70-30	28	1-6	20-80
12	1-3	60-40	29	7-12	20-80
13	4-6	60-40	30	1-6	10-90
14	7-9	60-40	31	7-12	10-90
15	10-12	60-40	32	1-6	0-100
16	1-3	50-50	33	7-12	0-100
17	4-6	50-50			

Al unir estas fracciones el número su número disminuyó de 130 a 33. De manera similar a la cromatografía Hex-AcOEt, las fracciones unidas analizadas mediante cromatografía en placa se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Fracciones analizadas mediante cromatografía en placa.

Fracciones	Mezcla AcOEt-MeOH	Fracciones	Mezcla AcOEt-MeOH
1-7	90-10	10-12	50-50
10-12	90-10	4-6	40-60
4-6	80-20	10-12	40-60
10-12	80-20	4-6	30-70
4-6	70-30	10-12	30-70
7-9	70-30	1-6	20-80
1-3	60-40	1-6	10-90
7-9	60-40	1-6	0-100
1-3	50-50	7-12	0-100
7-9	50-50		

Placa 1: En esta placa se analizaron las fracciones 1-7 (90-10), 10-12 (90-10), 4-6 (80-20), 10-12 (80-20) y 4-6 (70-30), utilizando en la cámara cromatográfica AcOEt-100% y una mezcla 90-10 de AcOEt-MeOH (Figura 24).

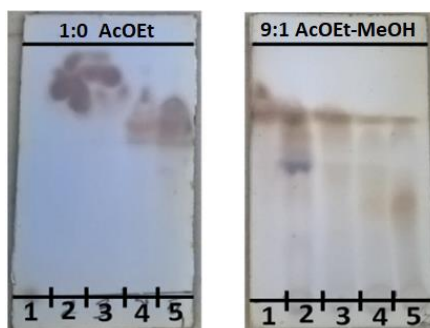


Figura. 24. Placa 1 revelada con ácido sulfúrico.

Placa 2: En esta placa se analizaron las fracciones 7-9 (70-30), 1-3 y 7-9 (60-40), 1-3 (50-50) y 7-9 (50-50), utilizando AcOEt-100%, 90-10 y 80-20 AcOEt-MeOH (Figura 25).

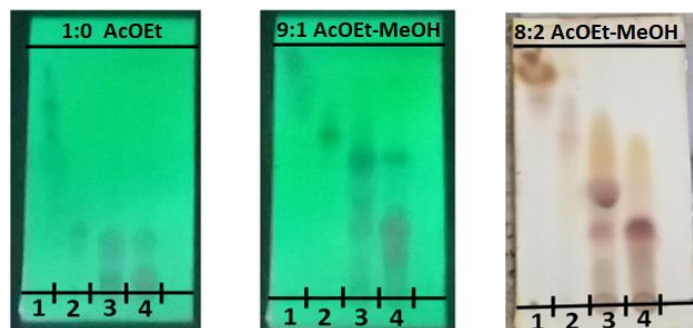


Figura. 25. Placa 2 revelada con luz UV y yodo.

Placa 3: En esta placa se analizaron las fracciones 10-12 (50-50), 4-6 y 10-12 (40-60), 4-6 y 10-12 (30-70), utilizando en la cámara cromatográfica AcOEt-100%, 90-10 y 80-20 AcOEt-MeOH.

Placa 4: En esta se analizaron las fracciones 1-6 (20-80), 1-6 (10-90), 1-6 y 7-12 (0-100), utilizando en la cámara cromatográfica AcOEt-100%, 90-10 y 80-20 AcOEt-MeOH.

Con base en los resultados obtenidos en las cromatografías en placa se unieron las fracciones que mostraban una separación de componentes similar (Figura 26). En el caso de la Placa 1, se mezclaron las fracciones 1-9 (90-10) (VIAL 1).

VIAL 2: Fracciones 10-12 (90-10); 1-12 (80-20).

VIAL 3: Fracciones 1-6 (70-30).

VIAL 4: Fracciones 7-12 (70-30); 1-12 (60-40); 1-9 (50-50).

VIAL 5: Fracciones 10-12 (50-50); 1-12 (40-60); 1-12 (30-70).

VIAL 6: Fracciones 1-12 (20-80); 1-12 (10-90)

VIAL 7: Fracciones 1-6 y 7-12 (0-100).

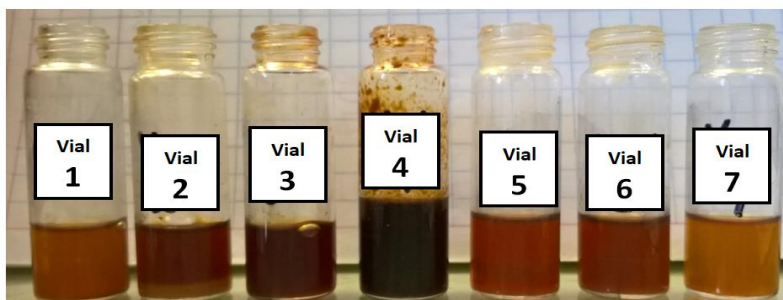


Figura. 26. Viales de las cromatografías en columna de AcOEt-MeOH.

El análisis mediante RMN ^1H de los viales obtenidos en las cromatografías en columna de Hex-AcOEt y AcOEt-MeOH se realizó tomando en cuenta sus cromatografías en placa, al presentarse manchas similares podría indicar que se trata del mismo compuesto, o bien, de la misma familia. Por lo tanto, para las cromatografías en columna de Hex-AcOEt se analizaron los viales 1, 4, 6 y 7; y para AcOEt-MeOH se analizaron los viales 2 y 4. En las Figuras 27, 28, 29, 30, 31 y 32 se muestran los espectros correspondientes a cada vial.

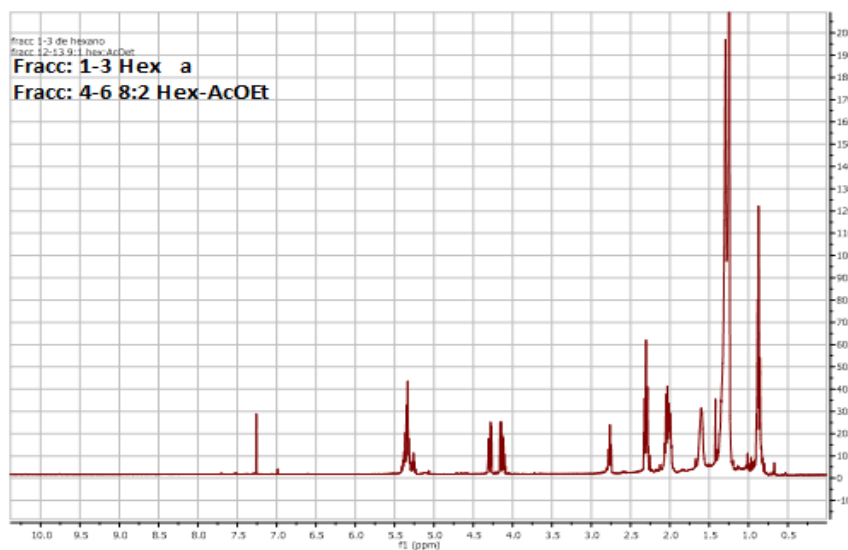


Figura. 27. Espectro de RMN (VIAL 1) de las fracciones 1-3 Hex hasta 4-6 8:2 Hex-AcOEt.

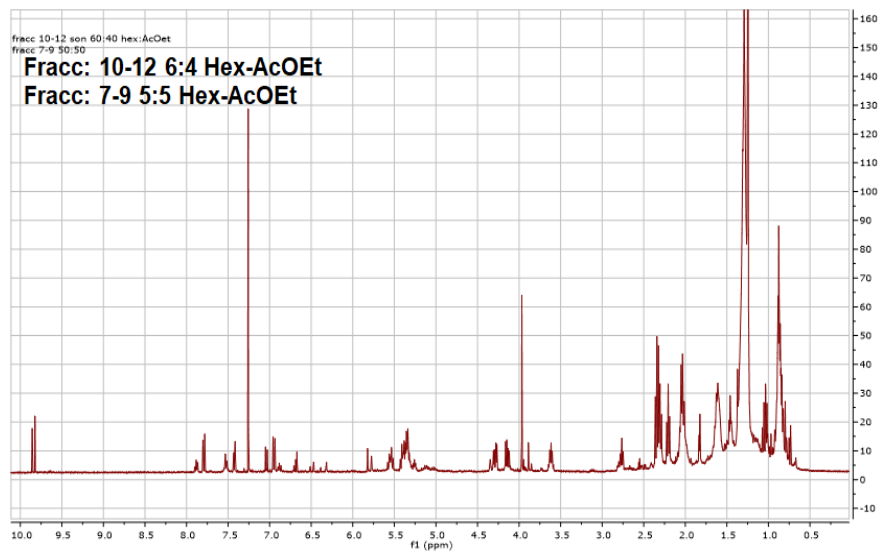


Figura. 28. Espectro de RMN (VIAL 4) de las fracciones 10-12 6:4 hasta 7-9 5:5 Hex-AcOEt.

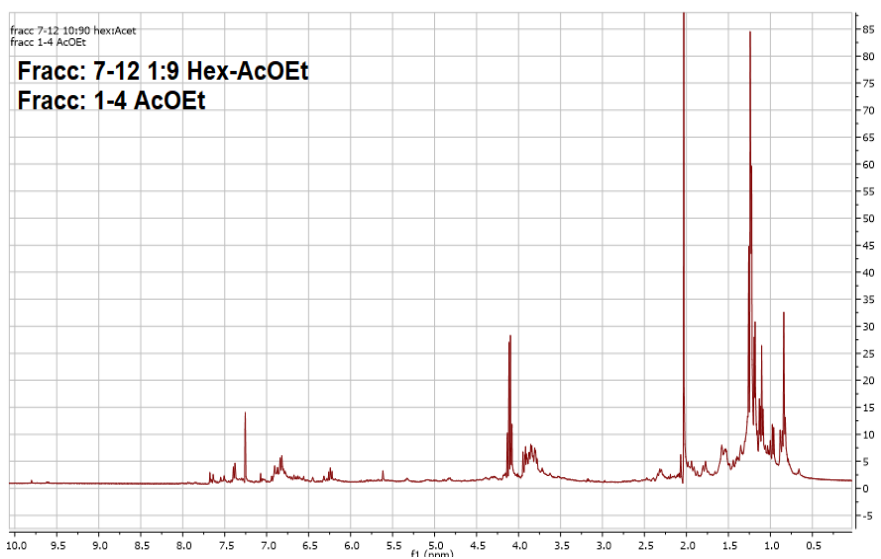


Figura. 29. Espectro de RMN (VIAL 6) de las fracciones 10-12 5:5 hasta 1-6 1:9 Hex-AcOEt.

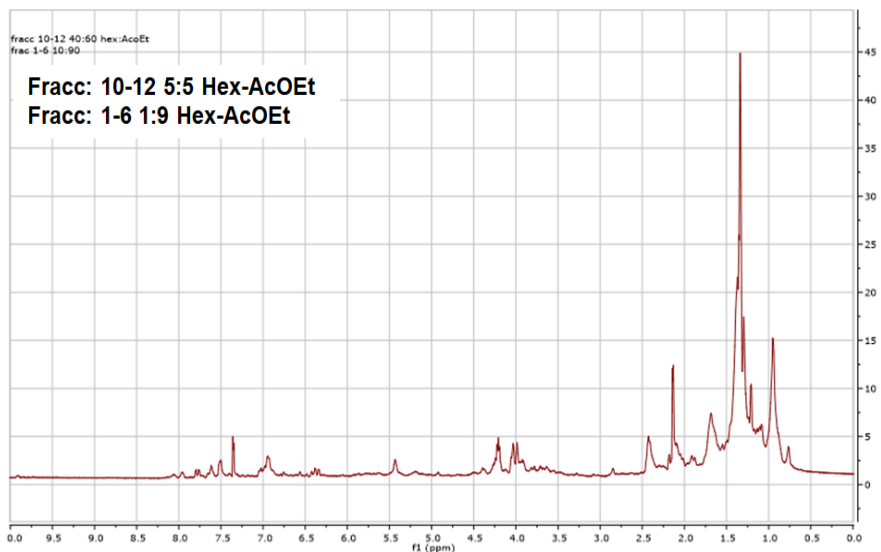


Figura. 30. Espectro de RMN (VIAL 7) de las fracciones 7-12 1:9 Hex-AcOEt hasta 1-4 AcOEt.

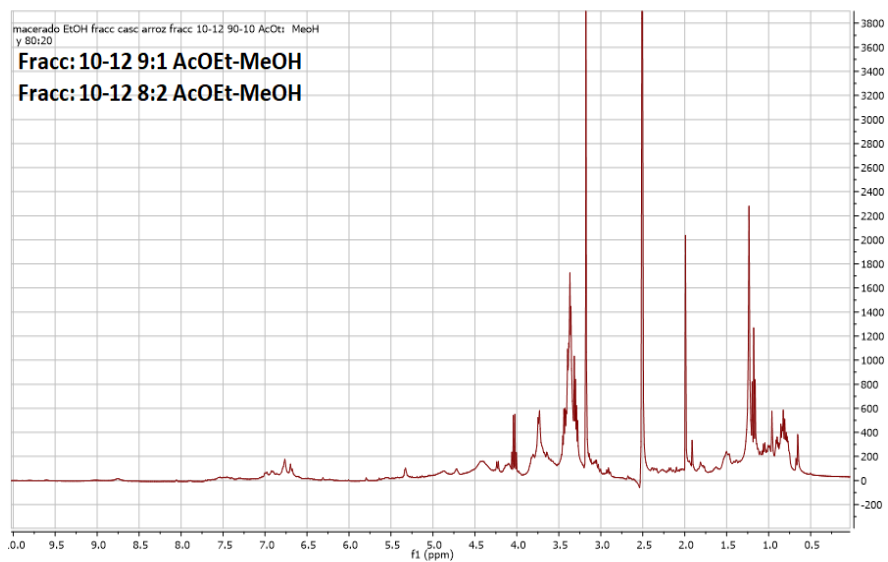


Figura. 31. Espectro de RMN (VIAL 2) de las fracciones 10-12 9:1 hasta 10-12 8:2 AcOEt-MeOH.

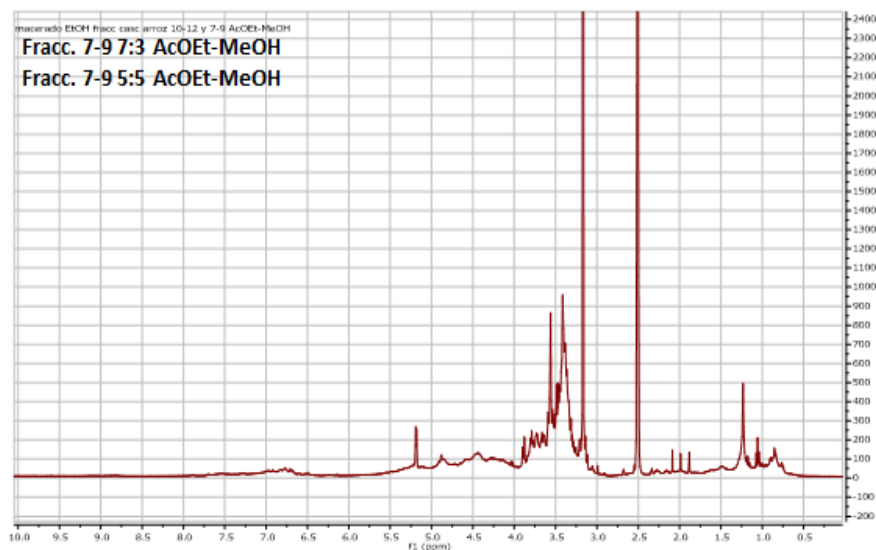


Figura. 32. Espectro de RMN (VIAL 4) de las fracciones 7-9 7:3 hasta 7-9 5:5 AcOEt-MeOH.

5.5 Cultivo de las cianobacterias

La obtención de los cultivos y la realización de los bioensayos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biología molecular del Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA).

Las cianobacterias utilizadas en este estudio fueron *Microcystis aeruginosa* (aislada de una muestra ambiental), *Anabaena cylindrica* (UTEX B 629) y *Anabaena sp.* (UTEX 2576) de la Colección de Cultivos de Algas de la Universidad de Austin Texas (UTEX).

5.5.1 Preparación de los medios de cultivo

Los requerimientos nutricionales para el crecimiento de cada una de las cianobacterias son diferentes. Para el cultivo de *Anabaena cylindrica* se utilizó el medio de cultivo BG-11 (Tabla 9 y 10). A 900 mL de agua destilada (dH₂O), se le añadieron los 9 componentes en el orden especificado. Se llevó el volumen total a

1 L y se esterilizó en autoclave. El medio se almacenó en refrigeración hasta su uso.

Tabla 9. Reactivos utilizados para el medio de cultivo BG-11.

No.	Componente	Cantidad	Stock
1	NaNO ₃	10 mL	30 g/200 mL
2	K ₂ HPO ₄	10 mL	0.8 g/200 mL
3	MgSO ₄ ·7H ₂ O	10 mL	1.5 g/200 mL
4	CaCl ₂ ·2H ₂ O	10 mL	0.72 g/200 mL
5	Ácido cítrico	10 mL	0.12 g/200 mL
6	Citrato de amonio férrico	10 mL	0.12 g/200 mL
7	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	10 mL	0.02 g/200 mL
8	Na ₂ CO ₃	10 mL	0.4 g/200 mL
9	Solución de metales traza	1 mL	

Tabla 10. Solución de metales traza.

No.	Componente	Stock
1	H ₃ BO ₃	2.86 g/L
2	MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.81 g/L
3	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.22 g/L
4	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.39 g/L
5	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.079 g/L
6	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0.049 g/L

Para el cultivo de *Anabaena sp.*, se utilizó el medio BG-11(-N) cuyos nutrientes se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Reactivos utilizados para el medio BG-11(-N).

No.	Componente	Cantidad	Stock
1	K ₂ HPO ₄	10 mL	0.8 g/200 mL
2	MgSO ₄ ·7H ₂ O	10 mL	1.5 g/200 mL
3	CaCl ₂ ·2H ₂ O	10 mL	0.72 g/200 mL
4	Ácido cítrico	10 mL	0.12 g/200 mL
5	Citrato de amonio férrico	10 mL	0.12 g/200 mL
6	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	10 mL	0.02 g/200 mL
7	Na ₂ CO ₃	10 mL	0.4 g/200 mL
8	Solución de metales traza	1 mL	

*Se utilizó la misma solución de metales traza para ambas especies de *Anabaena*.

5.5.2 Cultivo de *Anabaena cylindrica* y *Anabaena sp.*

Con un asa bacteriológica se tomó una colonia de las cianobacterias y se inocularon en los medios de cultivo correspondientes, a una temperatura promedio de 28°C, una iluminación de 3000 luxes y agitación manual dos veces al día durante 8 días (Figura 33). Transcurrido este tiempo los cultivos se guardaron a temperatura de refrigeración ya que se usaron al siguiente día.

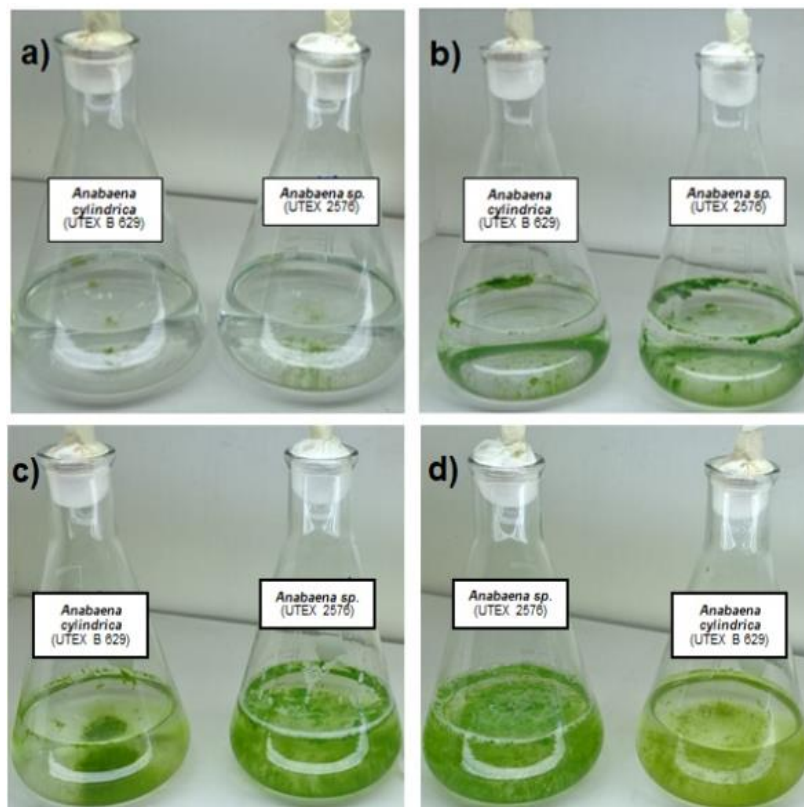


Figura. 33. Crecimiento de *Anabaena cylindrica* y *Anabaena sp.*; a) a los 2 días, b) a los 5 días, c) a 7 los días y d) a 8 los días.

5.5.3 Aislamiento de *Microcystis aeruginosa* de una muestra ambiental.

Con el propósito de obtener un monocultivo de *Microcystis* se realizaron tres aislamientos sucesivos (Figura 34a, b y c) de una muestra ambiental de agua a la cual se le agregó la solución de cultivo BG-11, manteniéndose a una temperatura promedio de 30°C, 3500 luxes de intensidad luminosa y con agitación manual dos veces al día. Se tomaron las colonias cuya morfología coincidiera con la presentada por *M. aeruginosa* según Nguyen *et al.* (2012) y se colocaron en placas Petri con medio de cultivo BG-11 nuevo hasta conseguir el monocultivo.

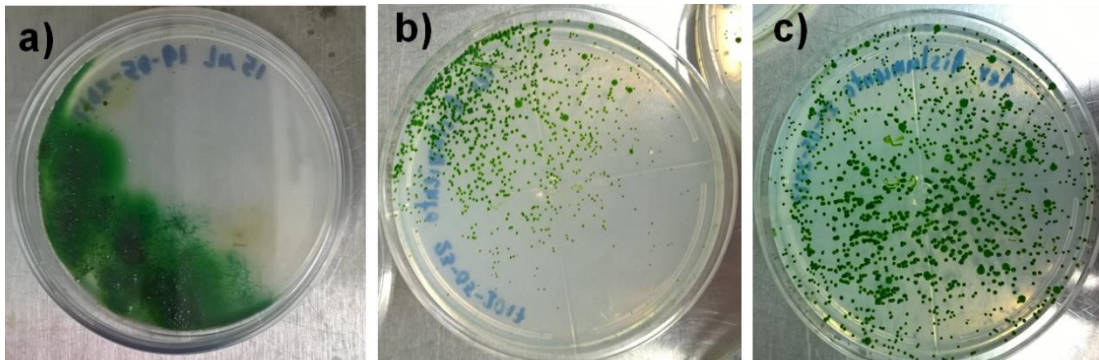


Figura. 34. a) Primero, b) Segundo y c) 3er aislamiento de *M. aeruginosa*.

Finalmente, *Microcystis aeruginosa* se hizo crecer en medio de cultivo BG-11 líquido durante 8 días (Figura 35) y se guardó en refrigeración hasta su análisis.



Figura. 35. *M. aeruginosa* después de 8 días de crecimiento.

5.6 Prueba alguicida sobre en *Microcystis aeruginosa* mediante el conteo con el hemocitómetro Neubauer.

Para la prueba alguicida en *M. aeruginosa* se utilizó el extracto de la cascarilla de arroz molida obtenido mediante maceración en etanol destilado. Se pesaron 100 mg del extracto y se resuspendieron en 0.3 mL de dimetilsulfoxido (DMSO) con un homogenizador Thermolyne modelo Maxi Mix II, ya que según lo reportado por Yi *et al.* (2012), una concentración del 0.3% v/v no muestra ninguna actividad alguicida. A continuación, se vertió el extracto en agua destilada esterilizada hasta tener 100 mL, para obtener una concentración de 1000 mg/L.

En este experimento se analizó el efecto alelopático del extracto de cascarilla de arroz utilizando cuatro concentraciones diferentes, se llevaron a cabo una serie de diluciones a partir de la concentración de 1000 mg/L (Figura 36) para obtener las concentraciones de 100 mg/L, 10 mg/L y 1 mg/L. Esta prueba alguicida solo se realizó en *M. aeruginosa* debido a que, por su morfología esférica es posible llevar a cabo su conteo, no obstante, el conteo de *Anabaena cylindrica* y *Anabaena sp.*, resulta muy difícil porque tienden a formar conglomerados y en muchas ocasiones no es posible determinar donde inicia una y donde inicia otra.

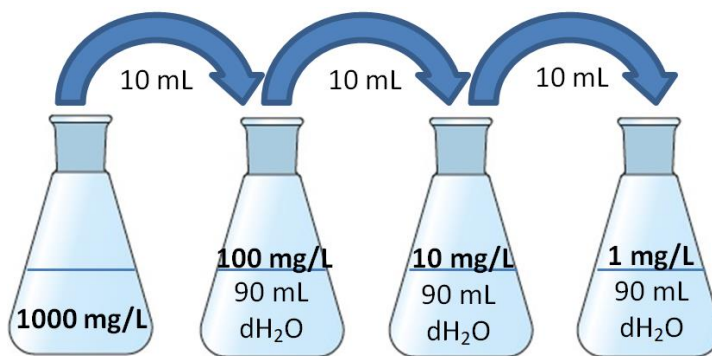


Figura. 36. Obtención de las concentraciones a analizar.

En la Figura 37 se muestran las cuatro soluciones a analizar, donde se puede observar que la concentración de 1000 mg/L muestra un color amarillo visible.

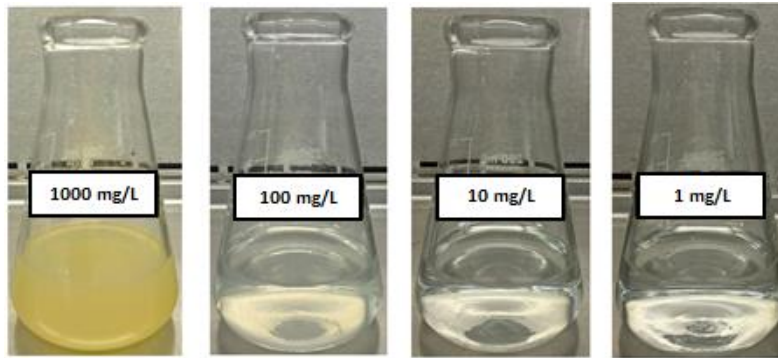


Figura. 37. Soluciones de 1000, 100, 10 y 1 mg/L.

Una vez realizadas las diluciones correspondientes, los matraces se cubrieron con papel aluminio y se guardaron en refrigeración hasta su uso.

Preparación de la solución de agua buffer

Para preparar el agua buffer se pesaron 0.15 g de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) y se suspendieron en 10 mL de agua destilada. A continuación, se preparó una dilución 1/1000, es decir, se tomó 1 mL de la solución y se llevó a un matraz volumétrico de 1 L que contenía 900 mL de agua destilada, mezclando bien y ajustando el volumen a 1 L con agua destilada.

5.6.1 Prueba alguicida 1

Esta prueba se realizó haciendo unos cambios a lo planteado por Castillo *et al.*, (2004), siguiendo el esquema presentado en la Figura 38. Los viales se cubrieron con film transparente y se colocaron de manera equidistante en un cuarto con iluminación constante de 250-290 luxes durante 10 días a una temperatura promedio de 28°C (Figura 39).

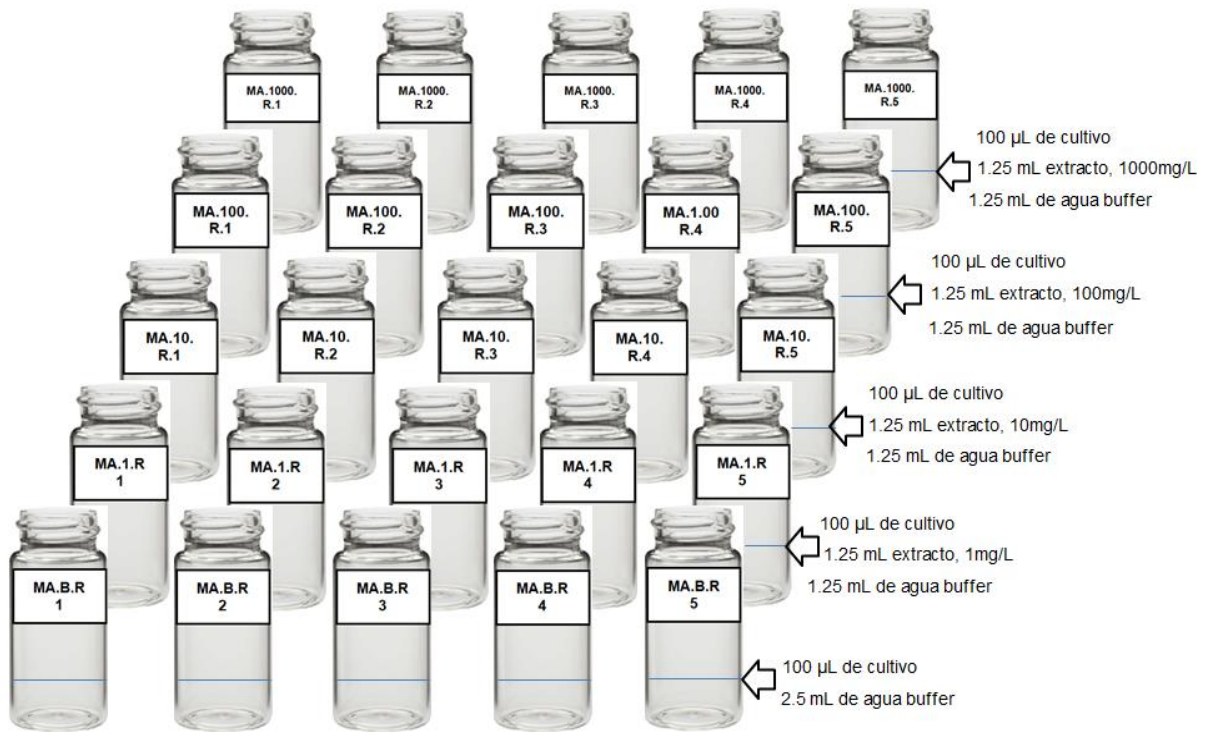


Figura. 38. Esquema de la Prueba alguicida 1.

Siendo MA= *Microcystis aeruginosa*, B= Blanco; 1, 10, 100 y 1000 mg/L= Concentración del extracto, R= "Room" (Cuarto) y 1, 2, 3, 4 y 5= Número de muestra.



Figura. 39. Prueba alguicida en cuarto a 250-290 luxes y 28 °C.

Prueba alguicida 2

Para determinar si existía una diferencia en la respuesta de *M. aeruginosa*, se realizó el mismo procedimiento anterior pero en este caso se colocaron los viales en una cámara de luz blanca con una intensidad de 4000 luxes y 30°C (Figura 40).



Figura. 40. Prueba alguicida en cámara de luz blanca a 4000 luxes y 30 °C

5.6.2 Conteo celular con la cámara de Neubauer

El conteo celular se realizó desde el día 0 al 10 con el hemocitómetro de Neubauer, siguiendo el procedimiento presentado por Castillo (2004):

Se limpió con papel de arroz (marca Kimwipes) la cámara de Neubauer y se colocó el cubreobjetos sobre los canales. Con una micropipeta se tomaron 10 μ L del cultivo de *M. aeruginosa*, dejando que la solución ingresara a la cámara por capilaridad. La cámara se colocó en el microscopio y con el objetivo 10x se localizó la cuadrícula central, se hizo un cambio de lente a 40x y se realizó el conteo. Se contó la cuadrícula completa de arriba abajo para tener conteos más exactos (Figura 41).

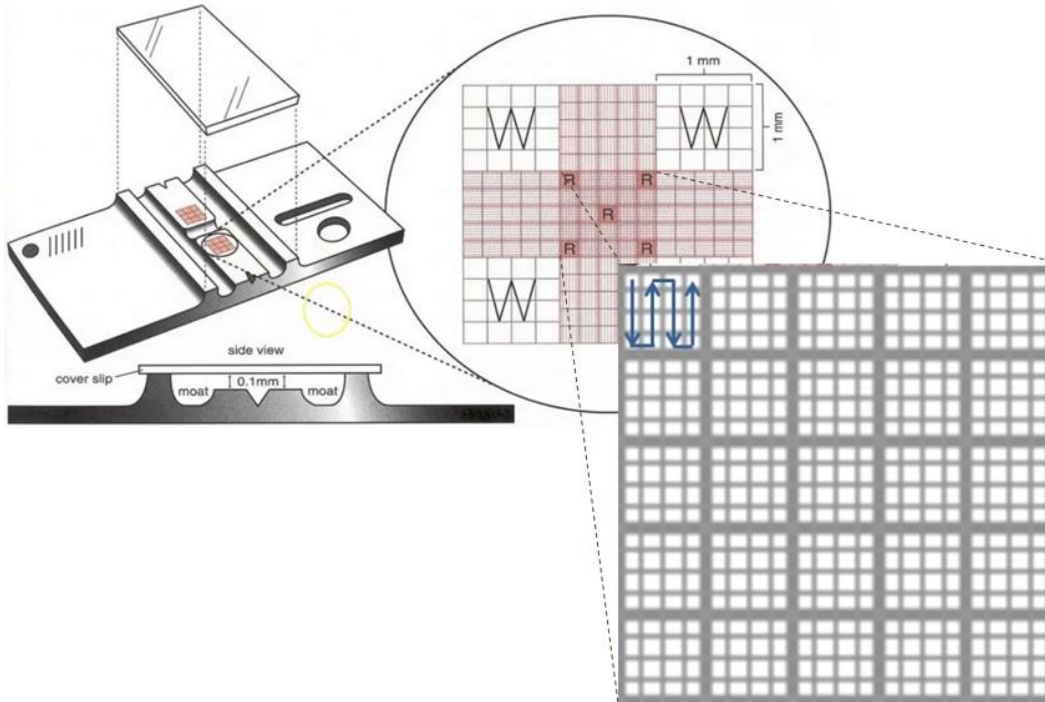


Figura. 41. Conteo de *Microcystis aeruginosa* con el hemocitómetro de Neubauer.

5.6.3 Determinación de la densidad celular y de la actividad alelopática

En este estudio se empleó el cuadrante completo (1 mm²). Por lo tanto:

$$\text{No. de células en } 0.1 \text{ mm}^3 = \frac{\text{No. total de células contadas}}{\text{No. de cuadrados de } 1 \text{ mm}^2 \text{ contados}} \times 10,000$$

La actividad alelopática se calculó utilizando la ecuación presentada por Park *et al.* (2009b):

$$\text{Actividad alelopática (\%)} = \frac{\text{Control} - \text{Tratamiento}}{\text{Control}} \times 100$$

5.7 Prueba alguicida sobre *Anabaena cylindrica*, *Anabaena sp.* y *Microcystis aeruginosa* utilizando la técnica de citometría de flujo.

Se montó en mismo experimento realizado en las primeras pruebas alguicidas; no obstante, las muestras de cada concentración del extracto crudo y del purificado (VIAL 6 de la cromatografía en columna Hex–AcOEt), Blanco, 1, 10, 100 y 1000 mg/L, se hicieron por triplicado para *M. aeruginosa*, *Anabaena cylindrica*, *Anabaena sp.*, dando un total de 90 muestras.

Antes de iniciar la prueba, los cultivos de *Anabaena cylindrica*, *Anabaena sp.* se hicieron pasar por una malla de organza de 140 µm para separar los cúmulos que generan estas cianobacterias y poder tener un cultivo homogéneo.

Se realizaron otras tres muestras de cada cianobacteria y se fijaron con paraformaldehído al 0.4% para obtener su conteo en el Día 0. Transcurridos los 10 días de exposición las 90 muestras se fijaron con paraformaldehído para poder realizar el conteo del Día 10.

5.7.1 Metodología

Las muestras fueron llevadas al Laboratorio Nacional de Citometría (LabNalCit) del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM para realizar el análisis utilizando la técnica de citometría de flujo, con el objetivo de determinar la viabilidad y número de cianobacterias después del tratamiento con los extractos de cascarilla de arroz. Se analizaron todas las muestras el mismo día de su ingreso al laboratorio.

En la Tabla 12, se presentan las muestras por triplicado de cada cianobacteria para su conteo en el día 0, siendo *Microcystis aeruginosa* (MA), *Anabaena sp.* (ASP) y *Anabaena cylindrica* (AC), así como el código asignado por el Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo (LabNalCit).

Tabla 12. Muestras de *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena cylindrica* y *Anabaena sp.*, día 0.

Cianobacteria	Tratamiento	Concentración	Código LabNalCit
MA	-	Basal	LNC-17 ASV129
MA	-	Basal	LNC-17 ASV130
MA	-	Basal	LNC-17 ASV131
AC	-	Basal	LNC-17 ASV135
AC	-	Basal	LNC-17 ASV136
AC	-	Basal	LNC-17 ASV137
ASP	-	Basal	LNC-17 ASV132
ASP	-	Basal	LNC-17 ASV133
ASP	-	Basal	LNC-17 ASV134

En las Tablas 13 a la 18, se presentan las muestras por triplicado de cada concentración de cada cianobacteria tanto del extracto crudo como del purificado para su conteo en el día 10.

Tabla 13. Muestras de *Microcystis aeruginosa*, extracto crudo, día 10.

Cianobacteria	Tratamiento	Concentración	Código LabNalCit
MA	Extracto crudo	0	LNC-17AMS138
MA	Extracto crudo	0	LNC-17AMS139
MA	Extracto crudo	0	LNC-17AMS140
MA	Extracto crudo	1	LNC-17AMS141
MA	Extracto crudo	1	LNC-17AMS142
MA	Extracto crudo	1	LNC-17AMS143
MA	Extracto crudo	10	LNC-17AMS144
MA	Extracto crudo	10	LNC-17AMS145
MA	Extracto crudo	10	LNC-17AMS146
MA	Extracto crudo	100	LNC-17AMS147
MA	Extracto crudo	100	LNC-17AMS148
MA	Extracto crudo	100	LNC-17AMS149
MA	Extracto crudo	1000	LNC-17AMS150
MA	Extracto crudo	1000	LNC-17AMS151
MA	Extracto crudo	1000	LNC-17AMS152

Tabla 14. Muestras de *Microcystis aeruginosa*, extracto puro, día 10.

Cianobacteria	Tratamiento	Concentración	Código LabNalCit
MA	Extracto puro	0	LNC-17AMS153
MA	Extracto puro	0	LNC-17AMS154
MA	Extracto puro	0	LNC-17AMS155
MA	Extracto puro	1	LNC-17AMS156
MA	Extracto puro	1	LNC-17AMS157
MA	Extracto puro	1	LNC-17AMS158
MA	Extracto puro	10	LNC-17AMS159
MA	Extracto puro	10	LNC-17AMS160
MA	Extracto puro	10	LNC-17AMS161
MA	Extracto puro	100	LNC-17AMS162
MA	Extracto puro	100	LNC-17AMS163
MA	Extracto puro	100	LNC-17AMS164
MA	Extracto puro	1000	LNC-17AMS165
MA	Extracto puro	1000	LNC-17AMS166
MA	Extracto puro	1000	LNC-17AMS167

Tabla 15. Muestras de *Anabaena cylindrica*, extracto crudo, día 10.

Cianobacteria	Tratamiento	Concentración	Código LabNalCit
AC	Extracto crudo	0	LNC-17AMS168
AC	Extracto crudo	0	LNC-17AMS169
AC	Extracto crudo	0	LNC-17AMS170
AC	Extracto crudo	1	LNC-17AMS171
AC	Extracto crudo	1	LNC-17AMS172
AC	Extracto crudo	1	LNC-17AMS173
AC	Extracto crudo	10	LNC-17AMS174
AC	Extracto crudo	10	LNC-17AMS175
AC	Extracto crudo	10	LNC-17AMS176
AC	Extracto crudo	100	LNC-17AMS177
AC	Extracto crudo	100	LNC-17AMS178
AC	Extracto crudo	100	LNC-17AMS179
AC	Extracto crudo	1000	LNC-17AMS180
AC	Extracto crudo	1000	LNC-17AMS181
AC	Extracto crudo	1000	LNC-17AMS182

Tabla 16. Muestras de *Anabaena cylindrica*, extracto puro, día 10.

Cianobacteria	Tratamiento	Concentración	Código LabNalCit
AC	Extracto puro	0	LNC-17AMS183
AC	Extracto puro	0	LNC-17AMS184
AC	Extracto puro	0	LNC-17AMS185
AC	Extracto puro	1	LNC-17AMS186
AC	Extracto puro	1	LNC-17AMS187
AC	Extracto puro	1	LNC-17AMS188
AC	Extracto puro	10	LNC-17AMS189
AC	Extracto puro	10	LNC-17AMS190
AC	Extracto puro	10	LNC-17AMS191
AC	Extracto puro	100	LNC-17AMS192
AC	Extracto puro	100	LNC-17AMS193
AC	Extracto puro	100	LNC-17AMS194
AC	Extracto puro	1000	LNC-17AMS195
AC	Extracto puro	1000	LNC-17AMS196
AC	Extracto puro	1000	LNC-17AMS197

Tabla 17. Muestras de *Anabaena sp.*, extracto crudo, día 10.

Cianobacteria	Tratamiento	Concentración	Código LabNalCit
ASP	Extracto crudo	0	LNC-17AMS198
ASP	Extracto crudo	0	LNC-17AMS199
ASP	Extracto crudo	0	LNC-17AMS200
ASP	Extracto crudo	1	LNC-17AMS201
ASP	Extracto crudo	1	LNC-17AMS202
ASP	Extracto crudo	1	LNC-17AMS203
ASP	Extracto crudo	10	LNC-17AMS204
ASP	Extracto crudo	10	LNC-17AMS205
ASP	Extracto crudo	10	LNC-17AMS206
ASP	Extracto crudo	100	LNC-17AMS207
ASP	Extracto crudo	100	LNC-17AMS208
ASP	Extracto crudo	100	LNC-17AMS209
ASP	Extracto crudo	1000	LNC-17AMS210
ASP	Extracto crudo	1000	LNC-17AMS211
ASP	Extracto crudo	1000	LNC-17AMS212

Tabla 18. Muestras de *Anabaena sp.*, extracto puro, día 10.

Cianobacteria	Tratamiento	Concentración	Código LabNaCit
ASP	Extracto puro	0	LNC-17AMS213
ASP	Extracto puro	0	LNC-17AMS214
ASP	Extracto puro	0	LNC-17AMS215
ASP	Extracto puro	1	LNC-17AMS216
ASP	Extracto puro	1	LNC-17AMS217
ASP	Extracto puro	1	LNC-17AMS218
ASP	Extracto puro	10	LNC-17AMS219
ASP	Extracto puro	10	LNC-17AMS220
ASP	Extracto puro	10	LNC-17AMS221
ASP	Extracto puro	100	LNC-17AMS222
ASP	Extracto puro	100	LNC-17AMS223
ASP	Extracto puro	100	LNC-17AMS224
ASP	Extracto puro	1000	LNC-17AMS225
ASP	Extracto puro	1000	LNC-17AMS226
ASP	Extracto puro	1000	LNC-17AMS227

5.7.1.1 Preparación de las muestras

La metodología empleada para el análisis de las muestras se conoce como Tinción de viabilidad con VivaFix (Bio Rad), se utilizó el citómetro de flujo modelo Attune Azul/Violeta de Applied Biosystems.

1. Se colocó 200 μ L de las muestras en un tubo Eppendorf de 1.5 mL.
2. Se centrifugaron las muestras en una Centrifuga Eppendorf™ modelo 5427 R a 7000 rpm durante 5 minutos, descartándose el sobrenadante.
3. A cada tubo se le añadió 200 μ L de una dilución de Viva Fix 1:1000 en buffer de fosfatos (PBS). Se mezclaron en vórtex y se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente, protegidos de la luz.
4. Se centrifugaron las muestras a 7000 rpm durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante.

5. Se añadió 200 μ L de paraformaldehído al 0.1% en PBS para fijar.
6. Se realizó la adquisición de los resultados de las muestras.

5.7.1.2 Materiales de referencia y controles

De cada cianobacteria, se dejó un tubo sin tinción para realizar los ajustes iniciales en el citómetro de flujo.

Se evaluó la calibración del citómetro Attune Azul/Violeta utilizando las perlas “Attune performance tracking beads” teniendo como resultado la aceptación de la prueba de calibración.

5.7.1.3 Interpretación de los gráficos generados por el citómetro de flujo

En la Figura 42, se muestran los gráficos de fluorescencia (pseudo-color) obtenidos con el citómetro de flujo, la imagen izquierda corresponde al porcentaje de cianobacterias con respecto al total de la muestra que como se muestra hay un 46.3% de cianobacterias tanto vivas como muertas, para llegar a este resultado se seleccionó una región o *gate* con base en la fluorescencia por parte de la clorofila, por lo que toda la región por debajo de un valor de 0 fue descartada. Al seleccionar esta región se crea un nuevo grafico (imagen derecha) donde únicamente se muestran las cianobacterias, en el eje X aparece el reactivo de viabilidad VivaFix mediante las colorantes que genera permiten distinguir fácilmente las células vivas y muertas, debido a que aumenta la permeabilidad de las células muertas permitiendo el paso de dichos colorantes (Figura 43).

La línea roja delimita, en el caso de la viabilidad, el porcentaje de células vivas con respecto a las muertas. Los colores rojo, amarillo, verde y azul indican una información de densidad e intensidad de fluorescencia, siendo la zona roja donde

se concentra el mayor número de eventos disminuyendo conforme se sale de dicha zona hasta llegar a la azul donde se concentra el menor número de eventos.

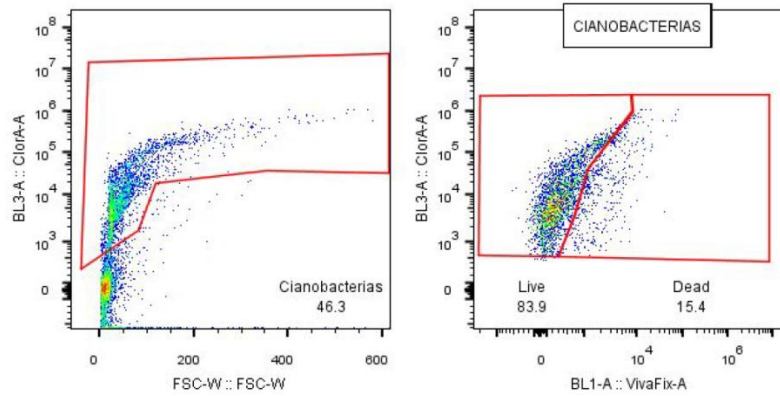


Figura. 42. Diagrama de fluorescencia, izquierda) % de células de cianobacterias, derecha) % de viabilidad.

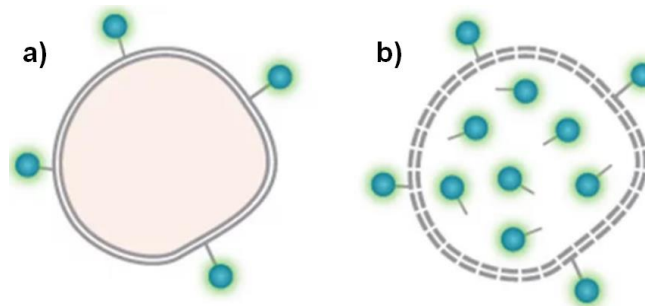


Figura. 43. Viabilidad celular VivaFix. a) Célula viva con VivaFix unido a la superficie de la membrana celular, b) célula muerta con VivaFix unido de manera superficial e intracelular.

5.7.1.4 Clorofila

Las clorofilas son una familia de pigmentos fotosintéticos de color verde que se encuentran presentes en las cianobacterias, su cuantificación resulta importante ya que es uno de los principales parámetros que se analizan al momento de determinar los efectos alelopáticos de las macrófitas en el crecimiento de las

cianobacterias medido como clorofila-a, además, varios estudios señalan que la disminución de la concentración de clorofila-a en las cianobacterias debido a la presencia de compuestos alelopáticos indica un daño su actividad fotosintética, que es uno de los modos que tienen estos metabolitos.

Los gráficos generados de cada una de las muestras por el método de citometría de flujo se muestran en el Anexo 1.

5.8 Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando un ANOVA de dos vías con respecto al cultivo sin extracto (0 mg/L) para comparar los resultados de las cuatro concentraciones analizadas en relación al control, así como encontrar diferencias significativas y determinar en qué casos existe un efecto alguicida o alguistático, para ello se utilizó el software de estadística GraphPad Prism versión 7.0.

6. RESULTADOS

6.1 Análisis de los resultados obtenidos con el hemocitómetro de Neubauer

En las Tablas 19, 20, 21, 22, 23 y 24, se muestran los resultados de los conteos celulares de los días 0, 2, 4, 6, 8 y 10 de la Prueba algucida 1 sobre *M. aeruginosa*. De las cinco mediciones realizadas para cada concentración se tomaron en cuenta los tres valores que mostraron la desviación estándar más pequeña (representados en color gris) y se obtuvo su promedio.

Tabla 19. Prueba algucida 1. Conteo celular, día 0.

<i>Microcystis aeruginosa</i>					
Conteo	Blanco	1 mg/L	10 mg/L	100 mg/L	1000 mg/L
1	48	56	123	106	88
2	68	77	166	111	94
3	110	80	101	130	93
4	133	81	96	128	110
5	126	97	145	154	67
Promedio	123	79.3	106.7	123	91.7

Tabla 20. Prueba algucida 1. Conteo celular, día 2.

<i>Microcystis aeruginosa</i>					
Conteo	Blanco	1 mg/L	10 mg/L	100 mg/L	1000 mg/L
1	167	122	177	135	148
2	189	131	153	147	172
3	190	193	149	156	135
4	236	171	142	138	172
5	147	101	125	139	143
Promedio	182	118	148	137.3	142

Tabla 21. Prueba alguicida 1. Conteo celular, día 4.

<i>Microcystis aeruginosa</i>					
Conteo	Blanco	1 mg/L	10 mg/L	100 mg/L	1000 mg/L
1	140	222	216	150	143
2	162	194	253	127	165
3	169	199	126	221	150
4	208	175	176	247	180
5	185	184	222	180	145
Promedio	172	192.3	230.3	152.3	146

Tabla 22. Prueba alguicida 1. Conteo celular, día 6.

<i>Microcystis aeruginosa</i>					
Conteo	Blanco	1 mg/L	10 mg/L	100 mg/L	1000 mg/L
1	212	193	242	313	189
2	246	258	281	328	201
3	128	200	186	160	206
4	133	206	271	170	286
5	198	230	266	157	203
Promedio	218.7	199.7	272.7	162.3	203.3

Tabla 23. Prueba alguicida 1. Conteo celular, día 8.

<i>Microcystis aeruginosa</i>					
Conteo	Blanco	1 mg/L	10 mg/L	100 mg/L	1000 mg/L
1	310	287	236	175	179
2	320	241	370	135	253
3	226	196	259	184	221
4	320	292	210	185	219
5	219	218	334	177	140
Promedio	316.7	218.3	235	182	231

Tabla 24. Prueba alguicida 1. Conteo celular, día 10.

<i>Microcystis aeruginosa</i>					
Conteo	Blanco	1 mg/L	10 mg/L	100 mg/L	1000 mg/L
1	369	279	218	195	195
2	386	194	335	145	296
3	333	295	231	171	161
4	266	179	253	211	143
5	304	196	299	189	143
Promedio	362.7	187.5	234	185	149

En las tablas 25, 26, 27, 28 y 29 se muestran los resultados de los conteos celulares de los días 0, 2, 6, 8 y 10 de la Prueba alguicida 2 sobre *M. aeruginosa*.

Tabla 25. Prueba alguicida 2. Conteo celular, día 0.

<i>Microcystis aeruginosa</i>					
Conteo	Blanco	1 mg/L	10 mg/L	100 mg/L	1000 mg/L
1	80	90	80	84	90
2	101	107	73	84	88
3	62	115	62	62	70
4	103	111	67	67	82
5	87	97	53	77	86
Promedio	97.0	98.0	73.3	81.7	88.0

Tabla 26. Prueba alguicida 2. Conteo celular, día 2.

<i>Microcystis aeruginosa</i>					
Conteo	Blanco	1 mg/L	10 mg/L	100 mg/L	1000 mg/L
1	146	132	150	134	123
2	142	152	150	171	158
3	159	116	172	130	193
4	145	79	145	117	162
5	194	125	90	131	145
Promedio	144.3	124.3	148.3	131.7	155.0

Tabla 27. Prueba alguicida 2. Conteo celular, día 6.

<i>Microcystis aeruginosa</i>					
Conteo	Blanco	1 mg/L	10 mg/L	100 mg/L	1000 mg/L
1	124	162	139	160	105
2	96	172	191	167	138
3	126	123	143	108	103
4	128	163	188	143	149
5	234	175	135	106	89
Promedio	126.0	165.7	139.0	156.7	99.0

Tabla 28. Prueba alguicida 2. Conteo celular, día 8.

<i>Microcystis aeruginosa</i>					
Conteo	Blanco	1 mg/L	10 mg/L	100 mg/L	1000 mg/L
1	323	195	119	218	90
2	323	156	142	108	100
3	234	124	160	159	165
4	212	201	166	289	123
5	264	246	117	215	83
Promedio	236.7	184.0	156.0	197.3	91.0

Tabla 29. Prueba alguicida 2. Conteo celular, día 10.

<i>Microcystis aeruginosa</i>					
Conteo	Blanco	1 mg/L	10 mg/L	100 mg/L	1000 mg/L
1	285	175	220	189	53
2	309	177	270	261	69
3	228	136	208	145	74
4	261	161	251	110	135
5	261	360	229	167	65
Promedio	269.0	171.0	219	167	69

En las Figuras 44 y 45 se muestran las gráficas de la inhibición de *M. aeruginosa* a diferentes concentraciones del extracto para la prueba algucida 1 y 2, respectivamente.

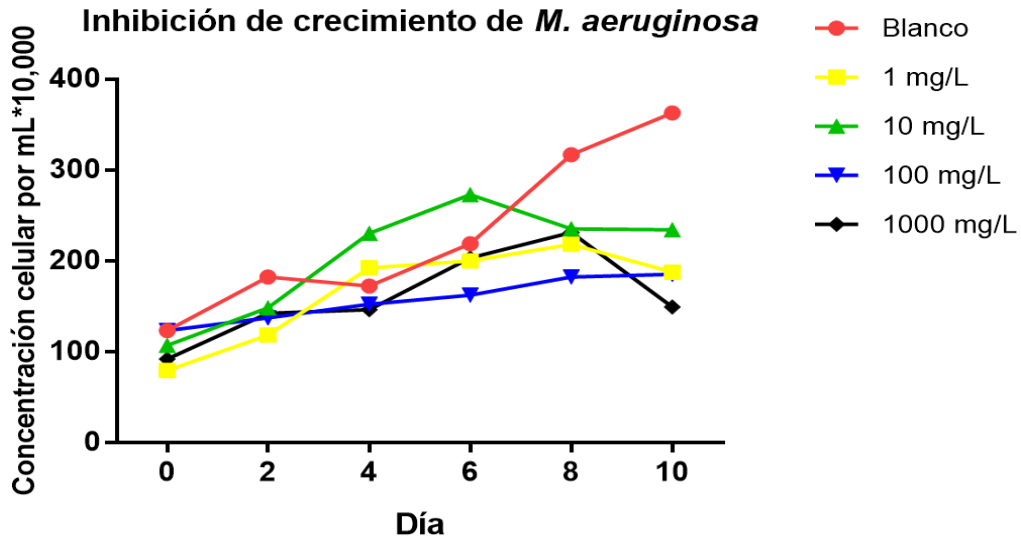


Figura. 44. Número total de cianobacterias vivas después de 10 días de exposición al extracto. Prueba algucida 1.

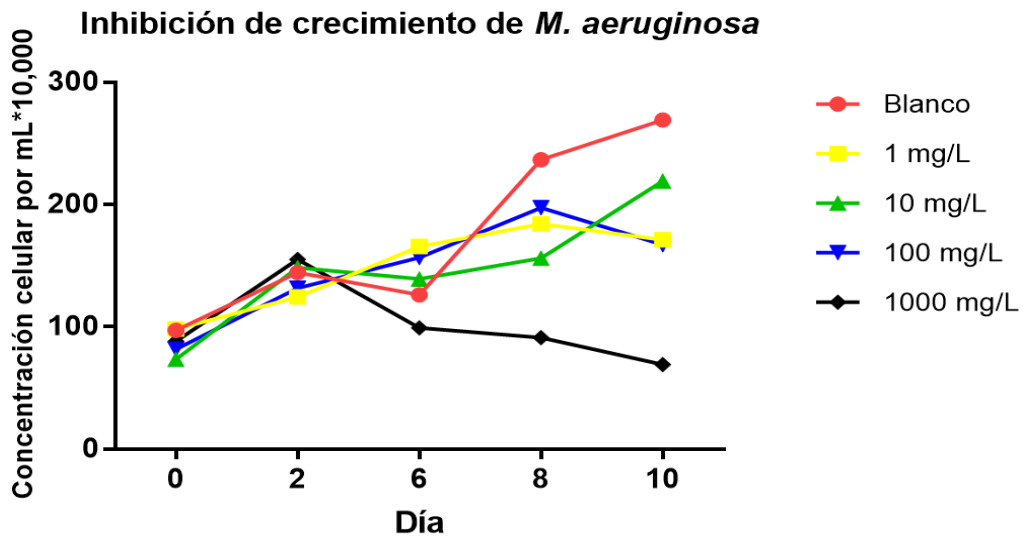


Figura. 45. Número total de cianobacterias vivas después de 10 días de exposición al extracto. Prueba algucida 2.

Actividad alelopática. Prueba alguicida 1

$$\text{Actividad alelopática (\%)} = \frac{\text{Control} - \text{Tratamiento}}{\text{Control}} \times 100$$

Actividad alelopática a 1 mg/L a 10 días de exposición:

$$\text{Actividad alelopática (\%)} = \frac{362.7 - 187.5}{362.7} \times 100 = 48.3\%$$

Los porcentajes de inhibición a 1, 10, 100 y 1000 mg/L fueron 48.3%, 35.48%, 48.99% y 58.91%, respectivamente. Estos resultados indican un efecto alelopático del extracto en *Microcystis aeruginosa*.

Actividad alelopática. Prueba alguicida 2

Actividad alelopática a 1 mg/L a 10 días de exposición:

$$\text{Actividad alelopática (\%)} = \frac{269 - 171}{269} \times 100 = 36.43\%$$

Los porcentajes de inhibición a 1, 10, 100 y 1000 mg/L fueron 36.43%, 18.58%, 37.91% y 74.34%, respectivamente. De manera similar a la Prueba alguicida 1, estos resultados indican un efecto alelopático en *Microcystis aeruginosa*, no obstante, con este método no es posible determinar si se trata de un efecto alguistático o alguicida.

6.2 Análisis de los resultados obtenidos mediante la técnica de citometría de flujo.

Los resultados obtenidos con el citómetro de flujo Attune Azul/Violeta se muestran en el Anexo 2, como el porcentaje de viabilidad, el número total de células y número total de células vivas y muertas, así como tamaño de la célula (Relación Clorofila/FSC-W), siendo FSC la dispersión frontal de la luz de laser a entrar en contacto con la célula el cual es directamente proporcional al tamaño de la misma y W el ancho de la curva generada por la célula.

En la Figura 46 se observa comparativamente la viabilidad de las células de las tres especies de cianobacterias a 10 días de exposición al extracto crudo respecto a las células en el blanco.

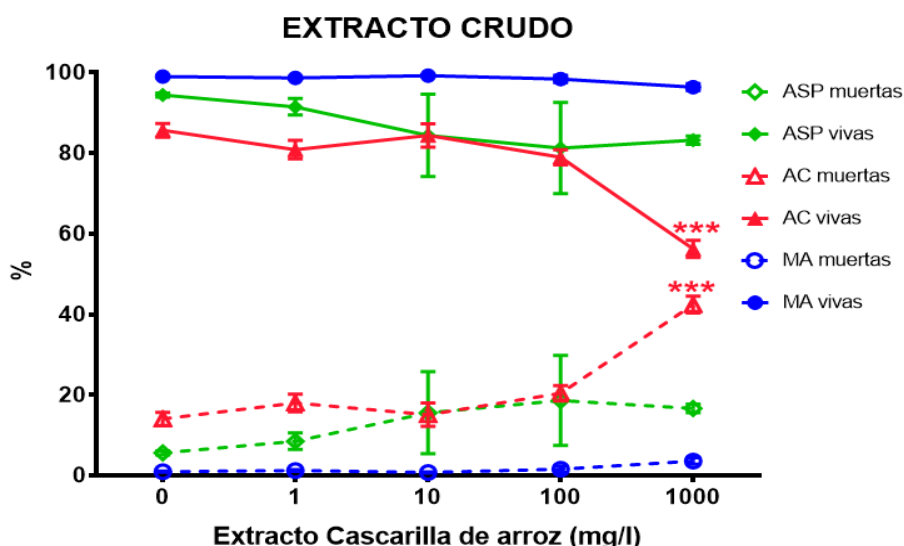


Figura. 46. Frecuencia de cianobacterias vivas (VivaFix -) y cianobacterias muertas (VivaFix+) en presencia del extracto crudo.

En el caso de *Microcystis aeruginosa* (MA) se puede observar que la viabilidad no fue afectada de manera significativa en ninguna de las cuatro concentraciones estudiadas, al permanecer en un rango del 91-97% indicando un efecto alquístico, algo similar se presentó en *Anabaena sp.* (ASP); no obstante, *Anabaena cylindrica* (AC) mostró una viabilidad del 62.93% a 1000 mg/L del extracto crudo, lo que indicaría un efecto alquicida sobre esta cianobacteria.

En la Figura 47 se compara la viabilidad de las células de las tres especies de cianobacterias a 10 días de exposición al extracto puro con respecto a las células en el blanco.

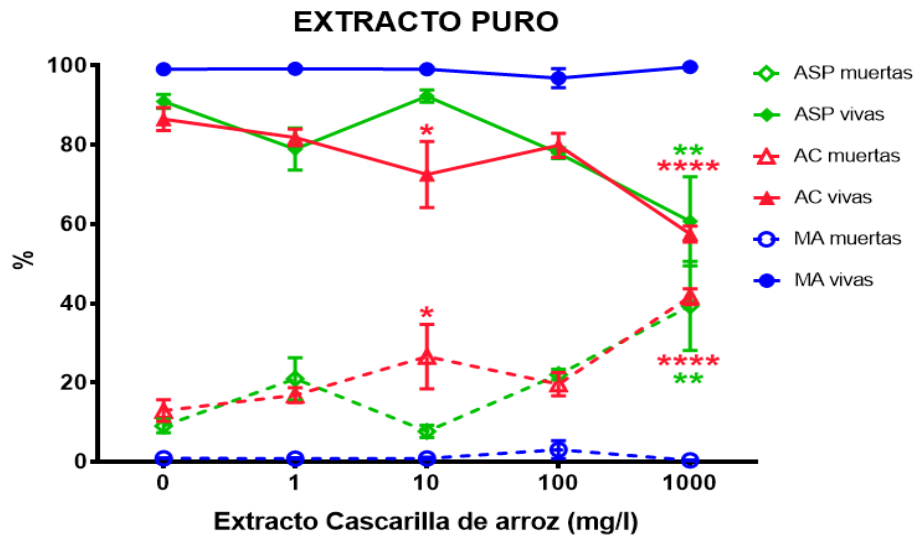


Figura. 47. Frecuencia de cianobacterias vivas (VivaFix -) y cianobacterias muertas (VivaFix+) en presencia del extracto puro.

De manera similar al extracto crudo, *Microcystis aeruginosa* resultó ser la menos afectada, esto significa que ni el extracto crudo ni el purificado disminuyen de manera significativa la viabilidad de esta cianobacteria en ninguna concentración, lo que indicaría un efecto alguistático para ambos extractos. *Anabaena cylindrica* y *Anabaena sp.* mostraron una viabilidad del 41.36% y 42.2% a 1000 mg/L respectivamente, indicando un efecto alguicida.

En las Figuras 48 y 49 se muestran las comparaciones del número total de cianobacterias vivas y muertas a 10 días de exposición al extracto crudo y al extracto purificado con respecto al blanco.

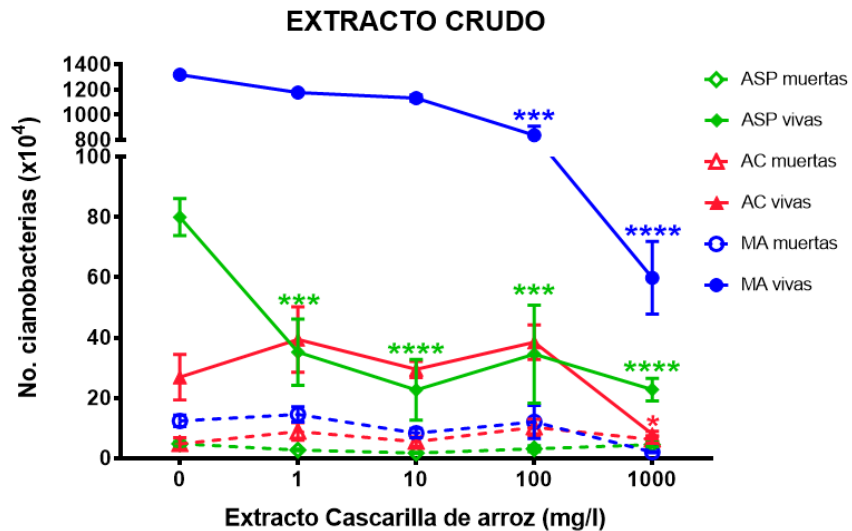


Figura. 48. Número total de cianobacterias vivas (VivaFix -) y cianobacterias muertas (VivaFix+) en presencia del extracto crudo.

Con el extracto crudo *Microcystis aeruginosa* presentó una disminución del 11.44%, 14.28%, 37.09% y 95.59% de células vivas a 1, 10, 100 y 1000 mg/L, respectivamente, esto confirma que el extracto crudo ejerce un efecto alguistático sobre esta especie, es decir, disminuye drásticamente el proceso de generación de nuevas células sin afectar de manera significativa las ya existentes. *Anabaena cylindrica* y *Anabaena sp.*, mostraron una disminución del 65.81% y 74.61% a 1000 mg/L respectivamente, esto indica que *Anabaena sp.*, resultó más afectada en cuanto a la disminución del número total de células vivas.

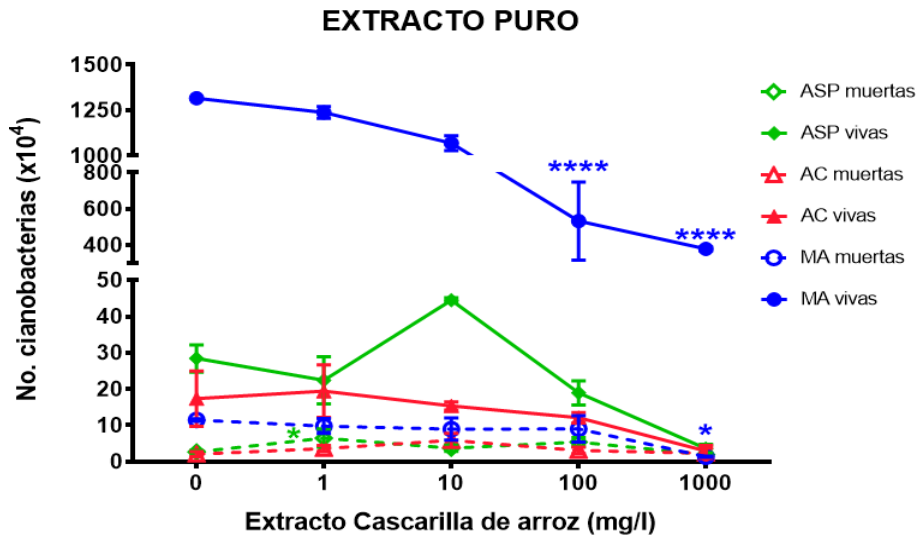


Figura. 49. Número total de cianobacterias vivas (VivaFix -) y cianobacterias muertas (VivaFix+) en presencia del extracto puro.

En cuanto al extracto puro, *Microcystis aeruginosa* presentó una disminución del 5.96%, 18.62%, 59.86% y 70.83% de células vivas a 1, 10, 100 y 1000 mg/L, respectivamente, por lo que se concluye que el extracto crudo tiene un efecto alguistático más fuerte que el purificado, posiblemente debido a que en el extracto crudo existe la presencia de mayor cantidad de compuestos, de manera que actuaron sinérgicamente en contra de esta cianobacteria. *Anabaena cylindrica* y *Anabaena sp.*, mostraron una disminución del 81.05% y 86.94% a 1000 mg/L, concluyéndose que el extracto puro tiene un mayor efecto alguicida que el extracto crudo.

Con el citómetro de flujo también se realizó la cuantificación de la clorofila con relación a la dispersión frontal de la luz del láser o *Forward Scatter* (FSC-W), por sus siglas en inglés, permitiendo determinar la tasa de crecimiento de las cianobacterias. En las Figuras 50, 51 y 52 se muestran las comparaciones del tamaño (Relación clorofila/FSC-W) a 10 días de exposición al extracto crudo y al extracto purificado en las tres cianobacterias estudiadas.

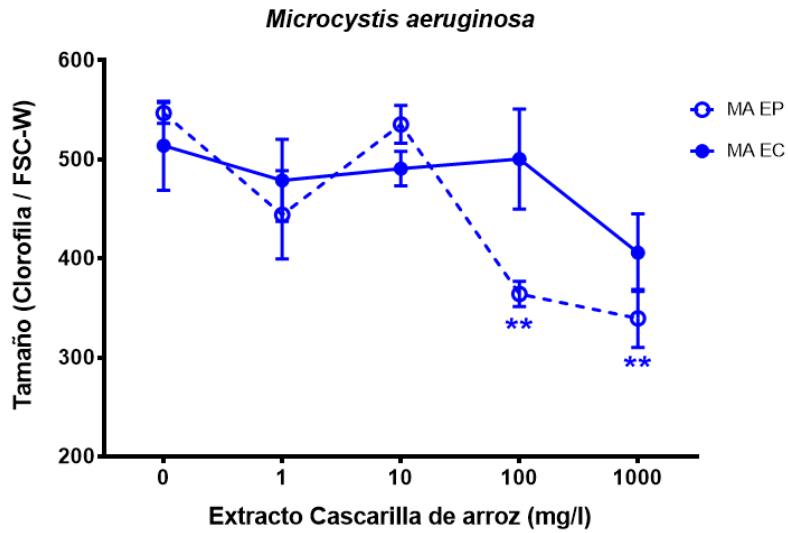


Figura. 50. Relación de la intensidad de fluorescencia de Clorofila/FSC-W en *Microcystis aeruginosa*.

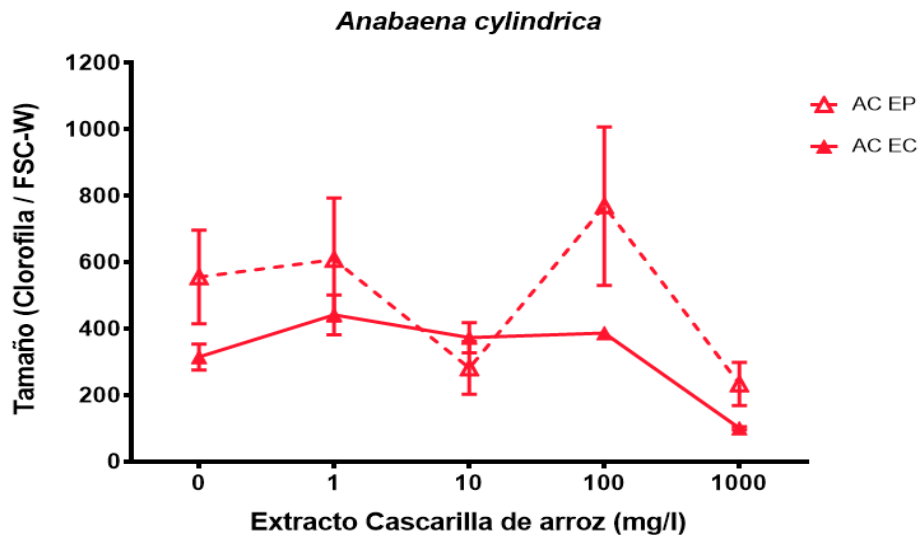


Figura. 51. Relación de la intensidad de fluorescencia de Clorofila/FSC-W en *Anabaena cylindrica*.

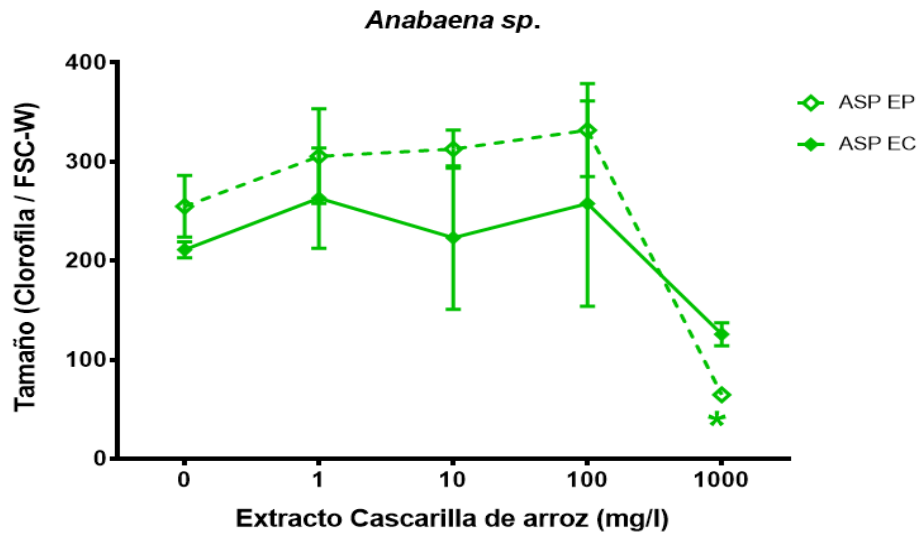


Figura. 52. Relación de la intensidad de fluorescencia de Clorofila/FSC-W en *Anabaena sp.*

En *Microcystis aeruginosa* el extracto purificado presentó una mayor disminución del tamaño de las células a 100 y 1000 mg/L, respectivamente. Para *Anabaena cylindrica*, los resultados fueron similares a 1000 mg/L; no obstante, el extracto crudo fue el que mostró un mayor efecto. En relación a *Anabaena sp.*, el extracto purificado a 1000 mg/L fue el que presentó el mayor efecto en la disminución del tamaño.

Comparando los resultados obtenidos se puede concluir que con respecto a la viabilidad celular al utilizar el extracto crudo y el purificado a una concentración de 1000 mg/L el orden del grado de inhibición fue: *M. aeruginosa* < *A. sp.* < *A. cylindrica*, siendo el extracto purificado que el mostró un efecto inhibitorio muy similar en *A. cylindrica* y *Anabaena sp.*

Acerca del Número total de cianobacterias vivas en presencia del extracto crudo, el orden del grado de inhibición fue: *A. sp.* < *A. cylindrica* < *M. aeruginosa*. Siendo en *M. aeruginosa* la más afectada por el extracto crudo con un 95.59% de inhibición. Para el extracto purificado el orden fue: *M. aeruginosa* < *Anabaena cylindrica* < *Anabaena sp.*

Finalmente, en lo que respecta al tamaño celular en presencia del extracto crudo y del purificado el orden del grado de inhibición fue: *A. sp.* < *M. aeruginosa* < *A. cylindrica*. Siendo el extracto puro el que mostro tener mayor afecto sobre las tres cianobacterias. Estos resultados son relevantes ya que podrían indicar una disminución en la actividad fotosintética, que es uno de los modos de acción de los aleloquímicos en las cianobacterias.

Los resultados anteriores muestran una mayor sensibilidad de *M. aeruginosa* hacia el extracto crudo que *A. cylindrica* y *A. sp.* Por el contrario, el extracto puro mostró una mayor acción alelopática contra *Anabaena cylindrica* y *Anabaena sp.* que contra *M. aeruginosa*.

7. DISCUSIÓN

Desde hace varios años se ha venido reportando un aumento en el número de florecimientos de cianobacterias dañinas en México, que viene a representar uno de los mayores problemas medioambientales y de salud de los últimos tiempos, principalmente porque están directamente relacionados con la producción de cianotoxinas, las cuales tienen graves efectos en la salud de personas y animales que entran en contacto con estas.

En nuestro país, las investigaciones sobre el control de los florecimientos de cianobacterias dañinas hasta donde se tiene conocimiento son prácticamente inexistentes, esto resulta alarmante al reportarse estos fenómenos desde hace varios años en muchos cuerpos de agua del territorio nacional, sobre todo en la zona centro donde la mayoría se encuentran en estado de eutrofización e hiper-eutrofización. Espinosa y colaboradores (2016) analizaron el efecto de la macrófita sumergida *Egeria densa* recolectada de la presa Benito Juárez (Estado de México) sobre algunas especies de fitoplancton como *Scenedesmus acutus*, *Chlorella vulgaris*, *Monoraphidium sp.* y *Nitzschia palea* a nivel laboratorio, no obstante, su estudio no incluyó ninguna especie de cianobacteria.

En la presente investigación se analizaron los efectos inhibidores de dos extractos de la cascarilla de arroz mediante dos técnicas analíticas, la determinación de la actividad alelopática utilizando el hemocitómetro de Neubauer (citometría clásica) y con la técnica de citometría de flujo (citometría automatizada).

De las cuatro concentraciones analizadas: 1, 10 100 y 1000 mg/L tanto del extracto crudo como del purificado de la cascarilla de *Oryza sativa* L. variedad A-98 del estado de Morelos, el extracto crudo a 1000 mg/L mostró un 95.6% de inhibición en el crecimiento en *M. aeruginosa*. El resultado de esta investigación se correlaciona con el obtenido por Park y colaboradores (2009a) donde se analizaron dos cepas de *M. aeruginosa* (NIES 298 y UTEX 2388), reportaron inhibiciones del 95-99% a 0.001, 0.01, 0.1 y 1 mg/L utilizando una cascarilla de

Oryza sativa var. *japonica*, estos resultados indican que la variedad *japonica* presentó un porcentaje similar de inhibición al de la variedad mexicana a concentraciones mucho más bajas, una posible respuesta a esta diferencia sería que ninguna de las dos cepas de *M. aeruginosa* (NIES 298 y UTEX 2388), que se estudiaron son formadoras de colonias, lo que facilitó en gran medida el contacto entre los aleloquímicos y las células de esta cianobacteria, cabe recalcar que la formación de colonias es una estrategia de defensa común contra el estrés ambiental causado por factores bióticos y abióticos como la presencia de compuestos con actividad alelopática. Anterior al estudio de Park y colaboradores, en 2009, el mismo autor había reportado en (2006) ya habían comprobado que la paja de *Oryza sativa* L. tiene un efecto alelopático del 96 y 97% en *M. aeruginosa* (UTEX 2388) a 0.01 y 0.1 mg/L, respectivamente.

A una concentración de 10 mg/L del extracto crudo y del purificado de *Oryza sativa* L. var. A-98 se mostraron unos porcentajes de inhibición de 14.28% y 14.62% en *M. aeruginosa*, respectivamente, estos resultados muestran similitud a los reportados por Park y colaboradores (2009b) cuando analizaron el extracto crudo de una variedad coreana de *Oryza sativa* L. sobre una cepa de *M. aeruginosa* colonial aislada de un lago eutrófico, reportando un porcentaje de inhibición del 20% a 10 mg/L., utilizaron también una cepa de *M. aeruginosa* unicelular (NIER 10010) cuyo efecto inhibitorio del extracto crudo fue de 64% a 1 mg/L. Estos datos respaldan la idea de que las cepas de *M. aeruginosa* formadoras de colonias resultan ser mucho más resistentes a los compuestos con actividad alelopática.

Respecto a la concentración de 100 mg/L del extracto crudo y del purificado de *Oryza sativa* L. var. A-98, se obtuvieron unos porcentajes de inhibición de 37.09% y 40.13%, respectivamente. Estos resultados mostraron ser inferiores a los presentados por Ahmad y colaboradores (2013), quienes reportaron un porcentaje de inhibición del 92.6% del oleoil- β -D-arabinósido a 100 mg/L en *Microcystis aeruginosa* (UTEX 2388), aislado de la paja de *Oryza sativa* L. de la misma variedad a la estudiada por Park y colaboradores (2009b). Esta diferencia entre los

porcentajes de inhibición podría deberse a que algunos compuestos puros presentan un inhibición superior a los extractos crudos.

Las concentraciones de 1, 10 y 100 mg/L tanto del extracto crudo como del purificado de *Oryza sativa* L. var. A-98, presentaron porcentajes de inhibición por debajo del 50%, no obstante, la concentración de 1000 mg/L el extracto crudo presentó una inhibición >95% en *Microcystis aeruginosa*, estos resultados coinciden con los reportados por Jia y colaboradores (2014), este grupo analizó los efectos de una mezcla de cascarilla y paja de *Oryza sativa* var. *japonica* en *Microcystis aeruginosa* (FACHB-915) y *Microcystis flos-aquae* (FACHB-1028), donde observaron que a concentraciones de 10 y 100 mg/L el porcentaje de inhibición fue menor al 50%, de manera similar obtuvieron que a 1000 mg/L se observó una inhibición >95% en ambas cepas.

El extracto crudo de *Oryza sativa* L. var. A-98 obtenido en este estudio, presentó un efecto alguistático sobre *M. aeruginosa* a altas concentraciones de manera similar a lo reportado por Wen y colaboradores (2014), que analizaron la paja de una variedad china de *Oryza sativa* L. en una cepa de *M. aeruginosa* unicelular (FACHB 915), donde concluyeron que a concentraciones de 2-10 g/L se presentaba un efecto alguistático sobre esta cianobacteria.

Los resultados anteriores demuestran que tanto la cascarilla como la paja de *Oryza sativa* L. tienen efectos alelopáticos sobre varias cepas de *M. aeruginosa*, no obstante, Matthijs y colaboradores (2016) realizando una revisión bibliográfica concluyeron que la paja de arroz parece ser más efectiva y selectiva hacia las cianobacterias que la cascarilla.

La dosificación adecuada de los extractos alguicidas resulta crítica para la eficiencia en la eliminación de las cianobacterias. En concentraciones bajas la inhibición podría invertirse y convertirse en estimulación del crecimiento como lo han reportado Hu y Hong en el 2008 y Yang *et al.*, 2013. En esta investigación la dosis óptima para *M. aeruginosa* fue de 1000 mg/L del extracto crudo, siendo mucho más alta que la de la cebada (2.57×10^{-3} g/L, Newman y Barrett, 1993), pero

menor que la de la paja de cebada tibetana sin cascarilla (2-8 g/L, Xiao *et al.*, 2010) y que la de la paja de cebada (7.2 g/L, Ferrier *et al.*, 2005) (Jia *et al.*, 2014).

Con base en los resultados obtenidos mediante la técnica de citometría de flujo se observó una disminución en la concentración de clorofila en las tres especies de cianobacterias analizadas, esto hizo suponer que, uno de los modos de acción de los aleloquímicos presentes en la cascarilla de *Oryza sativa* L. var. A-98 podría ser el causante del daño en la membrana celular y en la actividad fotosintética; esto coincidiría con los aleloquímicos de *Phragmites communis*, *Hordeum vulgare* e *Hydrilla verticillata* que dañan la membrana celular de *M. aeruginosa* y *Anabaena flos-aquae* causando la liberación del contenido intracelular (Zhang *et al.*, 2012; Xiao *et al.*, 2014).

La afectación de la actividad fotosintética podría ser otro modo de acción de los aleloquímicos presentes en *Oryza sativa* var. A-98 sobre *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena cylindrica* UTEX B 629 y *Anabaena sp.* UTEX 2576, esto coincidiría con varias investigaciones donde se ha reportado, por ejemplo, que macrófitas terrestres como *Arundo donax*, *Artemisa annua* y *Stratiotes aloides* disminuyen seriamente la actividad fotosintética *Microcystis* y *Anabaena* al destruir los pigmentos fotosintéticos (Mohamed y Al Shehri, 2010; Ni *et al.*, 2012).

Varias especies de plantas sumergidas como *Stratiotes aloides*, *Hydrilla verticillata*, *Chara australis* y *Potamogeton crispus* y *Lemna trisulca* presentan efectos inhibitorios sobre algunas especies del género *Anabaena* como *Anabaena variabilis*, *A. flos-aquae* *A. variabilis* y *A. flos-aquae* (Mohamed y Al Shehri, 2010; Zhang *et al.*, 2012; Pakdel *et al.*, 2013; Kaminski *et al.*, 2014; Kaminski *et al.*, 2015), sin embargo, esta es la primera investigación donde se comprueba el efecto alguicida de la cascarilla de *Oryza sativa* L. var. A-98 sobre cianobacterias como *Anabaena cylindrica* y *Anabaena sp.*, encontrándose que el extracto crudo afecta la viabilidad de *A. cylindrica*, mientras que el purificado afecta la viabilidad tanto de *Anabaena cylindrica* como de *Anabaena sp.*, a altas concentraciones.

8. CONCLUSIONES

- El análisis mediante RMN ^1H en los extractos etanólico y metanólico mostró la presencia de compuestos polifenólicos similares.
- En el extracto purificado, la cromatografía en columna, la cromatografía en capa fina y el análisis de RMN ^1H son técnicas confiables para la obtención de fracciones de los extractos crudos.
- El uso del hemocitómetro de Neubauer permitió realizar un análisis preliminar del grado de inhibición de los extractos sobre las cianobacterias, no obstante, presenta un porcentaje de error considerable debido a que algunos conteos presentaron una diferencia elevada entre sus réplicas.
- La técnica de citometría de flujo permitió demostrar que el extracto crudo a 1000 mg/L afecta la viabilidad de *Anabaena cylindrica*, mientras que el extracto puro a la misma concentración afecta la viabilidad tanto de *Anabaena cylindrica* como de *Anabaena sp.*
- El extracto crudo y el purificado mostraron un efecto alguistático sobre *Microcystis aeruginosa* a 100 y 1000 mg/L al disminuir drásticamente la tasa de crecimiento de esta cianobacteria.
- La alta sensibilidad de la técnica de citometría de flujo, permitió evaluar el efecto alelopático de los extractos de *Oryza sativa* L. var. A-98 sobre el crecimiento de cianobacterias en general, e inclusive sobre cianobacterias filamentosas como *Anabaena cylindrica* y *Anabaena sp.*

9. PERSPECTIVAS

- Los resultados obtenidos en esta investigación abren un amplio panorama de investigación sobre el control biológico de los florecimientos de cianobacterias tóxicas en nuestro país, no solo mediante el uso de subproductos agrícolas como la cascarilla de arroz, sino también de una gran variedad de macrófitas acuáticas y terrestres que podrían ser potenciales candidatos para el manejo de estas floraciones al producir una gran cantidad de compuestos que aún se desconocen.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ahmad, A., Kim, S. H., Ali, M., Park, I., Kim, J. S., Kim, E. H., Lim, J. J., Kim, S. K y Chung, I. M. 2013. *New chemical constituents from Oryza sativa straw and their algicidal activities against blue-green algae*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Volume 61, Issue 34, Pages 8039–8048; DOI: 10.1021/jf402145u.
2. Axpucaca, A. E., Estrada, P. E., Valladares, B. J., Oliva, H. B., Hernández, H. E. y Pérez, S. F. 2017. *Metabolitos secundarios y cianotoxinas producidos por cianobacterias del lago de Atitlán*. Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas, Universidad de San Carlos de Guatemala.
3. Berry, J. P., Jaja, C. A., Dávalos, L. L., y Lind, O. 2012. *Apparent bioaccumulation of cylindrospermopsin and paralytic shellfish toxins by finfish in Lake Catemaco (Veracruz, Mexico)*. Food Additives and Contaminants: Part A, Volume 29, Issue 2, Pages 314–321; DOI: 10.1080/19440049.2011.597785.
4. Berry, J. P., Lee, E., Walton, K., Wilson, A. y Bernal-Brooks F. 2011. *Microcystin production by a persistent cyanobacterial bloom in Lago de Patzcuaro (Michoacan, Mexico), and apparent bioaccumulation of the toxin in small commercial catches of fish*. Environmental Toxicology Chemistry, Volume 30, Issue 7, Pages 1621-1628; DOI: 10.1002/etc.548.
5. Cantoral, U., Asencio, M. y Aboal, S. M. 2017. *Cianotoxinas: efectos ambientales y sanitarios. Medidas de prevención*. Hidrobiológica, Volumen 27, No. 2, páginas 241-251; ISSN: 0188-8897.
6. Carvajal, G. Giannuzzi, L. y Andrinolo, D. 2011. *Occurrencia de floraciones de cianobacterias toxicas en cuerpos de agua dulce, Argentina. Estudio de*

campo y análisis de datos. Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Exactas.

7. Castillo, M. G. 2004. *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*. Capítulo 4. Páginas 90-92.
8. Chang, X., Eigemann, F. y Hilt, S. 2012. *Do macrophytes support harmful cyanobacteria? Interactions with a green alga reverse the inhibiting effects of macrophyte allelochemicals on Microcystis aeruginosa*. Elsevier; Harmful Algae, Volume 19, Pages 76–84; DOI: 10.1016/j.hal.2012.06.002.
9. Cheng, L., Cao, X., Yu, X. 2017. *Mechanism of growth inhibition effect of aquatic plants on water cyanobacteria*. Insight: Biology, Volume 1, Pages 1–9.
10. Corbel, S., Mougin, C. y Bouaïcha, N. 2014. *Cyanobacterial toxins: Modes of actions, fate in aquatic and soil ecosystems, phytotoxicity and bioaccumulation in agricultural crops*. Elsevier; Chemosphere, Volume 96, Pages 1–15.
11. D'Abrosca, B., Dellagrecia, M., Fiorentino A., Isidori, M., Monaco, P. y Pacifico S. 2006. *Chemical constituents of the aquatic plant Schoenoplectus lacustris: Evaluation of phytotoxic effects on the green alga Selenastrum capricornutum*. Journal of Chemical Ecology, Vol. 32, No. 1; DOI: 10.1007/s10886-006-9354-y.
12. De la Cruz, A. A., Hiskia, A., Kaloudis, T., Chernoff, N., Hill, D., Antoniou, M. G., He, X., Loftin, K., O'Shea, K., Zhao, C., Pelaez, M., Han, C., Lynch, T. J. y Dionysiou, D. D. 2013. *A review on cylindrospermopsin: the global occurrence, detection, toxicity and degradation of a potent cyanotoxin*.

Environmental Science: Processes and Impacts, Issue 15, Pages 1979-2003; DOI: 10.1039/c3em00353a.

13. Díaz, B., Gutiérrez, D. y Guzmán, R. 2016. *Neurotoxicidad por exposición a microcistinas y cilindrospermopsina*. Universidad de Sevilla, Facultad de Farmacia, Área de Toxicología.
14. Dittmann, E., Fewer, D. P. y Neilan, B. A. 2012. *Cyanobacterial toxins: biosynthetic routes and evolutionary roots*. Microbiology, Volume 37, Issue 1, Pages 23–43; DOI: 10.1111/1574-6976.12000.
15. Drábková, M. 2007. *Methods for control of the cyanobacterial blooms development in lakes*. Masaryk University, Faculty of Science, Research Centre for Environmental Chemistry and Ecotoxicology.
16. Eigemann, F. 2013. *Allelopathic effects of submerged macrophytes on phytoplankton: Determining the factors of phytoplankton sensitivity and detection of new modes of action*. Departamento de Biología, Química y Farmacia de la Universidad Libre de Berlín.
17. Eigemann, F., Hilt, S. (nee Körner) y Schmitt, M. J. 2013. *Flow cytometry as a diagnostic tool for the effects of polyphenolic allelochemicals on phytoplankton*. Elsevier, Aquatic Botany, Volume 104, Pages 5-14; DOI: 10.1016/j.aquabot.2012.10.005.
18. Espinosa, R. C. A., Valencia, G., SARMA, S.S.S. y NANDINI, S. 2016. *Allelopathic activity and chemical analysis of crude extracts from the macrophyte Egeria densa on selected phytoplankton species*. Allelopathy Journal, Volume 37, Issue 1, Pages 147-160.
19. Ferrier, M. D., Butler, B. R., Terlizzi, D. E., Lacouture, R. 2005. *The effects of barley straw (Hordeum vulgare) on the growth of freshwater algae*.

Bioresource Technology, Volume 96, Issue 16, Pages 1788-1795; DOI: 10.1016/j.biortech.2005.01.021.

20. Freitas, E. C., Pinheiro, C., Rocha, O., Loureiro, S. 2014. *Can mixtures of cyanotoxins represent a risk to the zooplankton? The case study of Daphnia magna Straus exposed to hepatotoxic and neurotoxic cyanobacterial extracts*. Elsevier, Harmful Algae, Volume 31, Pages 143-152; DOI: 10.1016/j.hal.2013.11.004.
21. Gao, Y. N., Liu, B. Y., Xu, D., Zhou, Q. H., Hu, C. Y., Ge, F. J., Zhang, L. P., Wu, Z. B. 2011. *Phenolic compounds exuded from two submerged freshwater macrophytes and their allelopathic effects on Microcystis aeruginosa*. Polish Journal of Environmental Studies, Volume 20, No. 5, Pages 1153-1159.
22. Gerphagnon, M., Macarthur, D. J., Latour, D., Gachon, C. M., Ogtrop, F. V., Gleason, F. H. y Ngando, T. S. 2015. *Microbial players involved in the decline of filamentous and colonial cyanobacterial blooms with a focus on fungal parasitism*. Environmental Microbiology, Volume 17, Issue 8, Pages 2573–2587; DOI: 10.1111/1462-2920.12860.
23. Glover, W. B., Mash, D. C. y Murch, S. J. 2014. The natural non-protein amino acid N-β-methylamino-l-alanine (BMAA) is incorporated into protein during synthesis. Amino Acids, Volume 46, Issue 11, pages 2553–2559; DOI: 10.1007/s00726-014-1812-1.
24. He, X., Liu, Y., Conklin, A., Westrick, J., Weavers, L. K., Dionysiou, D. D., Lenhart J. J., Mouser, P. J., Szlag, D. y Walker, H. W. 2016. *Toxic cyanobacteria and drinking water: Impacts, detection, and treatment*. Elsevier, Harmful Algae, Volume 54, pages 174–193; DOI: 10.1016/j.hal.2016.01.001.

25. He, Y., Hong, Z. Q., Yun, L. B., Cheng, L., Yun T. L., Yuan, Z. Y. y Bin, W. Z. 2016. *Programmed cell death in the cyanobacterium Microcystis aeruginosa induced by allelopathic effect of submerged macrophyte Myriophyllum spicatum in co-culture system*. Journal of Applied Phycology, Volume 28, Issue 5, Pages 2805–2814; DOI: 10.1007/s10811-016-0814-7.
26. Hong, Y., Hu H. Y., Sakoda, A. y Sagehashi, M. 2011. *Straw preservation effects of Arundo donax L. on its allelopathic activity to toxic and bloom-forming Microcystis aeruginosa*. Water Science and Technology, Volume 63, Issue 8, Pages 1566-1573; DOI: 10.2166/wst.2011.209.
27. Hong, Y., Hu, H. Y., Sakoda, A., y Sagehashi, M. 2010. *Effects of allelochemical gramine on photosynthetic pigments of cyanobacterium Microcystis aeruginosa*. International Journal of Environmental, Chemical, Ecological, Geological and Geophysical Engineering, Volume, 4, No. 11.
28. Hu, H. y Hong, Y. 2008. *Algal-bloom control by allelopathy of aquatic macrophytes —A review*. Frontiers of Environmental Science and Engineering in China, Volume 2 Issue 4, Pages 421–438; DOI: 10.1007/s11783-008-0070-4.
29. Iredale, R. S., McDonald, T. A. y Adams, G. D. 2012. *A series of experiments aimed at clarifying the mode of action of barley straw in cyanobacterial growth control*. Elsevier; Water Research Volume 46, Issue 18, Pages 6095–6103; DOI: 10.1016/j.watres.2012.08.040.
30. Jia, Y., Yang, Z., Sua, W., Johnson, D. y Kong, F. 2014. *Controlling of cyanobacteria bloom during bottleneck stages of algal cycling in shallow Lake Taihu (China)*. Journal of Freshwater Ecology, Volume 29, Issue 1, Pages 129–140; DOI: 10.1080/02705060.2013.844206.

31. Jiao, Y., Chen, Q., Chen, X., Wang, X., Liao, X., Jiang, L., Wu, J., Yang, L. 2014. *Occurrence and transfer of a cyanobacterial neurotoxin β -methylamino-L-alanine within the aquatic food webs of Gonghu Bay (Lake Taihu, China) to evaluate the potential human health risk*. Science of the Total Environment, Volumes 468–469, Pages 457–463; DOI: 10.1016/j.scitotenv.2013.08.064
32. Kaminski A., Chrapusta, E., Bober, B., Adamski, M., Latkowska, E., Bialczyk, J. 2015. *Aquatic macrophyte Lemna trisulca (L.) as a natural factor for reducing anatoxin-a concentration in the aquatic environment and biomass of cyanobacterium Anabaena flos-aquae (Lyngb.) de Bréb.* Elsevier, Algal Research, Volume 9, Pages 212–217; DOI: 10.1016/j.algal.2015.03.014.
33. Kaminski, A., Bober, B., Chrapusta, E., Bialczyk, J. 2014. *Phytoremediation of anatoxin-a by aquatic macrophyte Lemna trisulca L.* Elsevier, Chemosphere, Volume, Pages 112 305–310; DOI: 10.1016/j.chemosphere.2014.04.064.
34. Le Rouzic, B., Thiébaud, G. y Brient, L. 2016. *Selective growth inhibition of cyanobacteria species (Planktothrix agardhii) by a riparian tree leaf extract.* Elsevier; Ecological Engineering, Volume 97, Pages 74–78; DOI: 10.1016/j.ecoleng.2016.07.021.
35. Liu, Q., Suna, B., Huo, Y., Liu, M., Shi, J., Jiang, T., Zhang, Q., Tang, C., Bi, H., He, P. 2018. *Nutrient bioextraction and microalgae growth inhibition using submerged macrophyte Myriophyllum spicatum in a low salinity area of East China Sea.* Elsevier, Marine Pollution Bulletin, Volume 127, Pages 67–72; DOI: 10.1016/j.marpolbul.2017.11.031.

36. Liu, Y., Guan, Y., Gao, B., Yue, Q. 2012. *Antioxidant responses and degradation of two antibiotic contaminants in Microcystis aeruginosa*. Elsevier; Ecotoxicology and Environmental Safety, Volume 86, Pages 23–30; DOI: 10.1016/j.ecoenv.2012.09.004.
37. Lürling, M. y Beekman, W. 2010. *Anti-cyanobacterial activity of Moringa oleifera seeds*. Journal of Applied Phycology, Volume 22, Issue 4, Pages 503-510; DOI: 10.1007/s10811-009-9485-y.
38. Ma, M., Liua, R., Liua, H., Qu, J. 2012. *Chlorination of Microcystis aeruginosa suspension: Cell lysis, toxin release and degradation*. Elsevier; Journal of Hazardous Materials, Volumes 217–218, Pages 279–285; DOI:10.1016/j.jhazmat.2012.03.030.
39. Marinho, M. M., Gonçalves, S. M. B. y Lürling, M. 2013. *Light and Phosphate Competition Between Cyndrospermopsis raciborskii and Microcystis aeruginosa is Strain Dependent*. Microbial Ecology, Volume 66, Issue 3, Pages 479–488; DOI: 10.1007/s00248-013-0232-1.
40. Matthijs, H. C. P., Jancula, D., Visser, P. M., Marsálek, B. 2016. *Existing and emerging cyanocidal compounds: new perspectives for cyanobacterial bloom mitigation*. Aquatic Ecology, Volume 50, Issue 3, Pages 443–460; DOI: 10.1007/s10452-016-9577-0.
41. Matthews, M. W. y Bernard, S. 2015. *Eutrophication and cyanobacteria in South Africa's standing water bodies: A view from space*. South African Journal of Science, Volume 111; DOI: 10.17159/sajs.2015/20140193.
42. Merel, S., Clément, M., Thomas, O. 2010. *State of the art on cyanotoxins in water and their behavior towards chlorine*. Toxicon, Volume 55, Issue 4, Pages 677-691; DOI: 10.1016/j.toxicon.2009.10.028.

43. Merel, S., Walker, D., Chicana, R., Snyder, S., Baurès, E. y Thomas, O. 2013. *State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins*. Elsevier; Environmental International, Volume 59, Pages 303–327; DOI: 10.1016/j.envint.2013.06.013.
44. Mohamed, Z. A. y Al Shehri A. M. *Differential responses of epiphytic and planktonic toxic cyanobacteria to allelopathic substances of the submerged macrophyte *Stratiotes aloides**. 2010. International Review of Hydrobiology, Volume 95, Issue 3, Pages 224-234; DOI: 10.1002/iroh.200911219.
45. Molot, L. A., Watson, S. B., Creed, I. F., Trick, C. G., McCabe S. K., Verschoor, M. J., Sorichetti, R. J., Powe, C., Venkiteswaran, J. J. y Schiff, S. L. 2014. *A novel model for cyanobacteria bloom formation: the critical role of anoxia and ferrous iron*. Freshwater Biology, Volume 59, Issue 6, Pages 1323–1340; DOI: 10.1111/fwb.12334.
46. Nakai, S., Zou, G., Okuda, T., Nishijima, W., Hosomi, M. y Okada, M. 2012. *Polyphenols and fatty acids responsible for anticyanobacterial allelopathic effects of submerged macrophyte *Myriophyllum spicatum**. Water Science & Technology, Volume 66, Issue 5, Pages 993-999; DOI: 10.2166/wst.2012.272.
47. Neilan, B. A., Pearson, L. A., Muenchhoff, J., Moffitt, M. C. y Dittmann, E. 2012. *Environmental conditions that influence toxin biosynthesis in cyanobacteria*. Environmental Microbiology, Volume 15, Issue 5, Pages 1239–1253; DOI: 10.1111/j.1462-2920.2012.02729.x.
48. Newman J. y Barrett, P. R. 1993. *Control of *Microcystis aeruginosa* by decomposing barley straw*. Journal of Aquatic Plant Management, Volume 31, Pages 203–206.

49. Nguyen, V. L. A., Tanabe, Y., Matsuura, H., Kaya, K. y Watanabe, M M. 2012. *Morphological, biochemical and phylogenetic assessments of water-bloom-forming tropical morphospecies of Microcystis (Chroococcales, Cyanobacteria)*. Phycological Research, DOI: 10.1111/j.1440-1835.2012.00650.x.
50. Ni, L., Acharya, K., Hao, X., Li, S. 2012. *Isolation and identification of an anti-algal compound from Artemisia annua and mechanisms of inhibitory effect on algae*. Elsevier; Chemosphere, Volume 88, Issue 9, Pages 1051–1057; DOI: 10.1016/j.chemosphere.2012.05.009.
51. Ni, L., Acharya, K., Hao, X., Li, S., Li, Y., Li Y. 2012. *Effects of Artemisinin on Photosystem II performance of Microcystis aeruginosa by in vivo chlorophyll fluorescence*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, Volume 89, Issue 6, Pages 1165–1169; DOI: 10.1007/s00128-012-0843-0.
52. O'Neil, J. M., Davis, T. W., Burford, M. A. y Gobler, C.J. 2012. *The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change*. Elsevier, Harmful Algae 14, Pages 313–334; DOI: 10.1016/j.hal.2011.10.027.
53. Oliva, M. G., Lugo, A., Alcocer J., Peralta L. y Oseguera, L. A. 2009. *Planktonic Bloom-Forming Nodularia in the Saline Lake Alchichica, Mexico*. Natural Resources and Environmental, Volume 15, Article 22.
54. Paerl, H. W. 2014. *Mitigating Harmful Cyanobacterial Blooms in a Human- and Climatically-Impacted World*. Life, Volume 4, Pages 988–1012; DOI: 10.3390/life4040988; ISSN 2075-1729.

55. Paerl, H. W. y Otten T. G. 2013. *Harmful Cyanobacterial Blooms: Causes, Consequences, and Controls*. Microbial Ecology, Volume 65, Issue 4, Pages 995–1010; DOI: 10.1007/s00248-012-0159-y.
56. Pakdel, F. M., Sim, L., Beardall, J., Davis, J. 2013. *Allelopathic inhibition of microalgae by the freshwater stonewort, Chara australis, and a submerged angiosperm, Potamogeton crispus*. Elsevier; Aquatic Botany, Volume 110, Pages 24– 30; DOI: 10.1016/j.aquabot.2013.04.005.
57. Park, M. H., Han, M. S., Ahn, C. Y., Kim, H. S., Yoon, B. D. y Oh, H. M. 2006. *Growth inhibition of bloom-forming Cyanobacterium Microcystis aeruginosa by rice straw extract*. Letters Applied Microbiology, Volume 43, Issue 3, Pages 307-312; DOI: 10.1111/j.1472-765X.2006.01951.x.
58. Park, M. H., Chung I. M., Ahmad, A., Kim, B. H., Hwang S. J. *Growth inhibition of unicellular and colonial Microcystis strains (Cyanophyceae) by compounds isolated from rice (Oryza sativa) hulls*. 2009a. Aquatic Botany, Volume 90, Issue 4, Pages 309-314; DOI: 10.1016/j.aquabot.2008.11.007.
59. Park, M. H., Kim, B. H., Chung, I. M., Hwang, S. J. *Selective Bactericidal Potential of Rice (Oryza sativa L. var. japonica) Hull Extract on Microcystis Strains in Comparison with Green Algae and Zooplankton*. 2009b. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, Volume 83, Issue 1, Pages 97–101; DOI: 10.1007/s00128-009-9732-6.
60. Pearson, L. A., Dittmann, E., Mazmouz, R., Ongley, S. E., D'Agostino, P. M. y Neilan, B. A. 2016. *The genetics, biosynthesis and regulation of toxic specialized metabolites of cyanobacteria*. Elsevier, Harmful Algae, Volume 54, Pages 98-111; DOI: 10.1016/j.hal.2015.11.002.
61. Pérez, M. A., Olivos, O. A., Quijano, S. S. I., Espinosa, R. C. A. y Jiménez, S. M. A. 2016. *Estado actual del estudio de cianobacterias dulceacuícolas*

formadoras de florecimientos en el centro de México. Florecimientos Algales Nocivos en México, Edición 1a, paginas 408-421. Ensenada, México. CICESE.

62. Qian, H., Yu, S., Sun, Z., Xie, X., Liu, W., Fu, Z. 2010a. *Effects of copper sulfate, hydrogen peroxide and N-phenyl-2-naphthylamine on oxidative stress and the expression of genes involved photosynthesis and microcystin disposition in Microcystis aeruginosa*. Elsevier; Aquatic Toxicology, Volume 99, Issue 3, Pages 405–412; DOI: 10.1016/j.aquatox.2010.05.018.
63. Qian, H., Li, J., Pan, X., Sun, Z., Ye, C., Jin, G. y Fu, Z. 2010b. *Effects of Streptomycin on Growth of Algae Chlorella vulgaris and Microcystis aeruginosa*. Environmental Toxicology, Volume 27, Issue 4, Pages 229–237; DOI: 10.1002/tox.20636.
64. Rajasekhar, P., Fan, L., Nguyen, T., Roddick, A. F. 2013. *Impact of sonication at 20 kHz on Microcystis aeruginosa, Anabaena circinalis and Chlorella sp.* Elsevier, Water Research, Volume 46, Issue 5, Pages 1473–1481; DOI: 10.1016/j.watres.2011.11.017.
65. Rigosi, A., Carey, C. C., Ibelings, B. W. y Brookes, J. D. 2014. *The interaction between climate warming and eutrophication to promote cyanobacteria is dependent on trophic state and varies among taxa*. Limnology and Oceanography, Volume 59, Issue 1, Pages 99–114; DOI: 10.4319/lo.2014.59.01.0099.
66. Rzymiski, P., Poniedziałek, B., Kokocinski, M., Jurczak, T., Lipski, D., Wiktorowicz K. 2014. *Interspecific allelopathy in cyanobacteria: Cylindrospermopsin and Cylindrospermopsis raciborskii effect on the growth and metabolism of Microcystis aeruginosa*. Elsevier; Harmful Algae, Volume 35, Pages 1–8; DOI: 10.1016/j.hal.2014.03.002.

67. Salcedo, A. J. 2006. *Morelos A-98 Variedad de arroz para Morelos y otros estados de la República*. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Folleto técnico No. 21.
68. Shao, J., Li, R., Lepo, J. E., Gu, J. D. 2013. *Potential for control of harmful cyanobacterial blooms using biologically derived substances: Problems and prospects*. Elsevier; Journal of Environmental Management, Volume 125, Pages 149–155; DOI: 10.1016/j.jenvman.2013.04.001.
69. Shao, J., Peng, L., Luo, S., Yu, G., Gu, J., Lin, S., Li, R. 2013. *First report on the allelopathic effect of Tychonema bourrellyi (Cyanobacteria) against Microcystis aeruginosa (Cyanobacteria)*. Journal of Applied Phycology, Volume 25, Issue 5; DOI: 10.1007/s10811-012-9969-z.
70. Sotton, B., Domaizon, I., Anneville, O., Cattaneo, F. y Guillard, J. 2014. *Nodularin and cylindrospermopsin a review of their effects on fish*. Reviews in Fish Biology and Fisheries, Volume 25, Issue 1, Pages 1–19; DOI: 10.1007/s11160-014-9366-6.
71. Stoichev, T., Baptista, M. S., Basto, M. C. P., Vasconcelos, V. M., Vasconcelos, M. T. S. D. 2011. *Effects of minocycline and its degradation products on the growth of Microcystis aeruginosa*. Elsevier; Ecotoxicology and Environmental Safety, Volume 74, Pages 219–224; DOI: 10.1016/j.ecoenv.2010.10.015.
72. Sukenik, A., Quesada, A. y Salmaso, N. 2015. *Global expansion of toxic and non-toxic cyanobacteria: effect on ecosystem functioning*. Biodiversity and Conservation, Volume 24, Issue 4, Pages 889–908; DOI: 10.1007/s10531-015-0905-9; ISSN 1572-9710.

73. Svanys, A., Paskauskas, R., Hilt, S. 2014. *Effects of the allelopathically active macrophyte Myriophyllum spicatum on a natural phytoplankton community: a mesocosm study*. Hydrobiologia, Volume 737, Issue 1, Pages 57–66; DOI: 10.1007/s10750-013-1782-4.
74. Takeda, F., Nakano, K., Nishimura, O., Shimada, Y., Fukuro, S., Tanaka, H., Hayashi, N. y Inamori Y. 2011. *Allelopathic potential of Potamogeton pusillus community against Microcystis aeruginosa*. Journal of Water and Environment Technology, Volume 9, Issue 1, Pages 21-28; DOI: 10.2965/jwet.2011.21.
75. Tomasini, O. A. C., Moeller, C. G., Sánchez, C. J. J. y Bravo, I. L. A. 2012. *Cianobacterias y Cianotoxinas en el Lago de Pátzcuaro, Michoacán, México*. Revista AIDIS de Ingeniería y Ciencias Ambientales: Investigación, desarrollo y práctica, Vol. 5, No. 2, Páginas 93–101; ISSN 0718-378X.
76. Vanderstukken, M., Declerck, S., Decaestecker, E. y Muylaert, K. 2014. *Long-term allelopathic control of phytoplankton by the submerged macrophyte Elodea nuttallii*. Freshwater Biology, Volume 59, Issue 5, Pages 930–941; DOI:10.1111/fwb.12316.
77. Vanderstukken, M., Mazzeo, N., van Colen, W., Declerck, S. J. y Muylaert, K. 2011. *Biological control of phytoplankton by the subtropical submerged macrophytes Egeria densa and Potamogeton illinoensis: a mesocosm study*. Freshwater Biology, Volume 56, Pages 1837–1849; DOI: 10.1111/j.1365-2427.2011.02624.x.
78. Wang, H. Q., Cheng, S. P., Zhang, S. H., He, F., Liang, W., Zhang, L. P., Hu, C. Y., Ge, F. J., Wu, Z. B. 2010. *Chemical composition in aqueous extracts of Potamogeton malaianus and Potamogeton maackianus and their*

allelopathic effects on Microcystis aeruginosa. Polish Journal of Environmental Studies, Volume 19, No. 1, Pages 213-218.

79. Wang, H., Liang, F., Qiao, N., Dong, J., Zhang, L., Guo, Y. 2014. *Chemical composition of volatile oil from two emergent plants and their algae inhibition activity*. Polish Journal of Environmental Studies, Volume 23, No. 6, Pages 2371-2374.
80. Wang, H., Zhong, G., Yan, H., Liu, H., Wang, Y. y Zhang, C. 2012. *Growth control of cyanobacteria by three submerged macrophytes*. Environmental Engineering Science, Volume 29, Number 6, Pages 420-425; DOI: 10.1089/ees.2010.0286.
81. Wang, J., Zhu, J., Liu, S., Liu, B., Gao, Y. y Wu, Z. 2011. *Generation of reactive oxygen species in cyanobacteria and green algae induced by allelochemicals of submerged macrophytes*. Elsevier; Chemosphere, Volume 85, Issue 6, pages 977–982; DOI: 10.1016/j.chemosphere.2011.06.076.
82. Wen, S., Hagström, J. A., Jia, Y., Lu, Y., Kong, F. 2014. *Effects of rice straw on the cell viability, photosynthesis, and growth of Microcystis aeruginosa*. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, Volume 32, Issue 1, Pages 120–129; DOI: 10.1007/s00343-014-3063-0.
83. Wu, X., Wu, H., Chen, J. y Ye, J. 2013a. *Effects of allelochemical extracted from water lettuce (Pistia stratiotes Linn.) on the growth, microcystin production and release of Microcystis aeruginosa*. Environmental Science and Pollution Research, Volume 20, Issue 11, Pages 8192–8201; DOI: 10.1007/s11356-013-1783-x.
84. Wu, Z., Shi, J. y Yang, S. 2013b. *The effect of pyrogalllic acid on growth, oxidative stress, and gene expression in Cylandropermopsis raciborskii*

- (*Cyanobacteria*). *Ecotoxicology*, Volume 22, Issue 2, Pages 271–278; DOI: 10.1007/s10646-012-1023-z.
85. Xiao, X., Chen, Y., Liang, X., Lou, L., Tang, X. 2010. *Effects of Tibetan hullless barley on bloom-forming cyanobacterium (Microcystis aeruginosa) measured by different physiological and morphologic parameters*. *Chemosphere*, Volume 81, Issue 9, Pages 1118–1123; DOI: 10.1016/j.chemosphere.2010.09.001.
86. Xiao, X., Huang, H., Ge, Zhiwei., Rounge, B. T., Shi, J., Xu, X., Li, R. y Chen, Y. 2014. *A pair of chiral flavonolignans as novel anti-cyanobacterial allelochemicals derived from barley straw (Hordeum vulgare): characterization and comparison of their anti-cyanobacterial activities*. *Environmental Microbiology*, Volume 16, Issue 5, Pages 1238–1251; DOI:10.1111/1462-2920.12226.
87. Yang, W., Tang, Z., Zhou, F., Zhang, W., Song, L. 2013. *Toxicity studies of tetracycline on Microcystis aeruginosa and Selenastrum capricornutum*. Elsevier; *Environmental Toxicology and Pharmacology*, Volume 35, Issue 2, Pages 320–324; DOI: 10.1016/j.etap.2013.01.006.
88. Ye, J., Wang, L., Zhang, Z. y Liu, W. 2013. *Enantioselective Physiological Effects of the Herbicide Diclofop on Cyanobacterium Microcystis aeruginosa*. *Environmental Science and Technology*, Volume 47, Issue 8, Pages 3893–3901; DOI: 10.1021/es304593c.
89. Yi, Y., Lei, Y., Yin, Y., Zhang, H. y Wang, G. 2012. *The antialgal activity of 40 medicinal plants against Microcystis aeruginosa*. *Journal of Applied Phycology*, Volume 24, Issue 4, Pages 847–856; DOI: 10.1007/s10811-011-9703-2.

90. Zamyadi, A., Fan, Y., Daly, R. I., Prévost, M. 2013. *Chlorination of Microcystis aeruginosa: Toxin release and oxidation, cellular chlorine demand and disinfection by-products formation*. Elsevier; Water Research, Volume 47, Issue 3, Pages 1080–1090; DOI: 10.1016/j.watres.2012.11.031.
91. Zhang, C., Yi, Y., Hao, K., Liu, G. y Wang, G. 2013. *Algicidal activity of Salvia miltiorrhiza Bung on Microcystis aeruginosa—Towards identification of algicidal substance and determination of inhibition mechanism*. Elsevier; Chemosphere, Volume 93, Issue 6, Pages 997–1004; DOI: 10.1016/j.chemosphere.2013.05.068.
92. Zhang, K., Fuh L. T., Zhang, T., Li, C. y Gao, N. 2013. *Characterization of typical taste and odor compounds formed by Microcystis aeruginosa*. Journal of Environmental Sciences, Volume 25, Issue 8, Pages 1539–1548; DOI: 10.1016/S1001-0742(12)60232-0.
93. Zhang, S., Guo, L., Cao, J. y Chang, J. 2015. *Allelopathic activities of three emergent macrophytes on several monospecific cyanobacterial species and natural phytoplankton assemblages*. Polish Journal of Environmental Studies, Volume 24, Issue 1, Pages 397- 402; DOI: 10.15244/pjoes/26972.
94. Zhang, T. T., He, M., Wu, A. P., Nie, L. W. 2012. *Inhibitory Effects and Mechanisms of Hydrilla verticillata (Linn.f.) Royle Extracts on Freshwater Algae*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, Volume 88, Issue 3, Pages 477–481; DOI 10.1007/s00128-011-0500-z.
95. Zhang, T. T., Wang, L. L., He, Z. X., Zhang, D. 2011. *Growth inhibition and biochemical changes of cyanobacteria induced by emergent macrophyte Thalia dealbata roots*. Elsevier, Biochemical Systematics and Ecology, Volume 39, Issue 2, Pages 88–94; DOI: 10.1016/j.bse.2011.01.004.

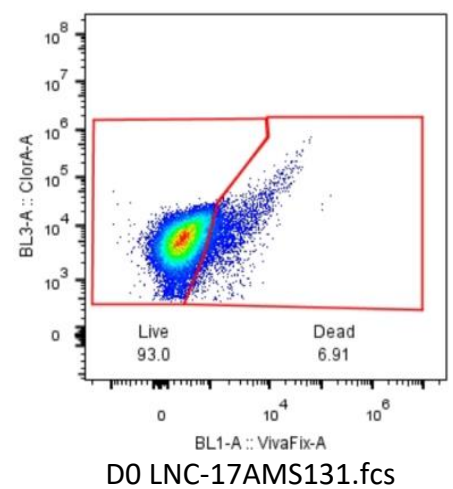
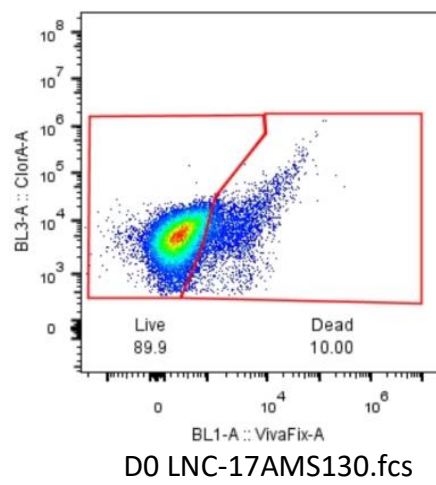
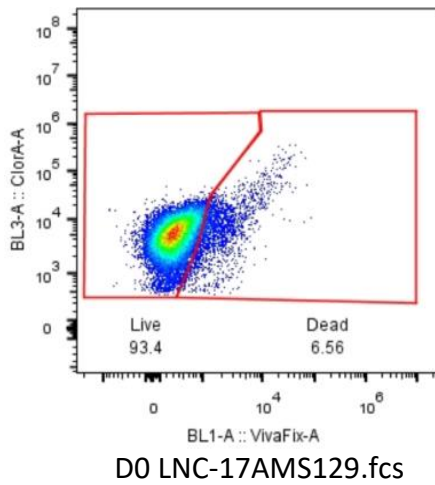
96. Zhang, T. T., Zheng, C. Y., Hu, W., Xu, W. W., Wang, H. F. 2010. *The allelopathy and allelopathic mechanism of phenolic acids on toxic Microcystis aeruginosa*. Journal of Applied Phycology, Volume 22, Issue 1, Pages 71–77; DOI: 10.1007/s10811-009-9429-6.
97. Zhang, T., Hu, W. y Zhang, D. 2011. *Allelopathic effect of Typha angustifolia L. on phytoplankton*. Advanced Materials Research, Volumes 383-390, Pages 3724-3728; doi:10.4028/www.scientific.net/AMR.383-390.3724.
98. Zhou, S., Shao, Y., Gao, N., Deng, Y., Qiao, J., Ou, H., Deng, J. 2013. *Effects of different algaecides on the photosynthetic capacity, cell integrity and microcystin-LR release of Microcystis aeruginosa*. Elsevier; Science of the Total Environment, Volumes 463–464, Pages 111–119; DOI: 10.1016/j.scitotenv.2013.05.064.
99. Zhu, J. Liu, B., Wang, J., Gao, Y., Wu, Z. 2010. *Study on the mechanism of allelopathic influence on cyanobacteria and chlorophytes by submerged macrophyte (Myriophyllum spicatum) and its secretion*. Aquatic Toxicology, Volume 98, Issue 2, Pages 196-203; DOI: 10.1016/j.aquatox.2010.02.011.

ANEXOS

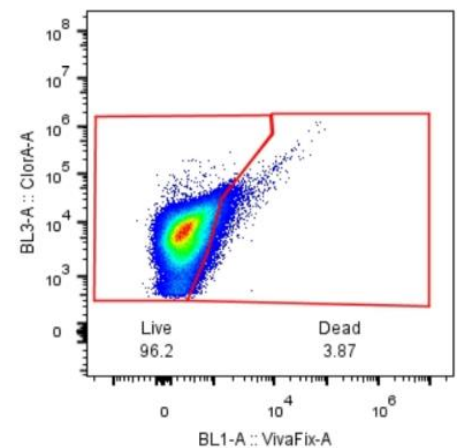
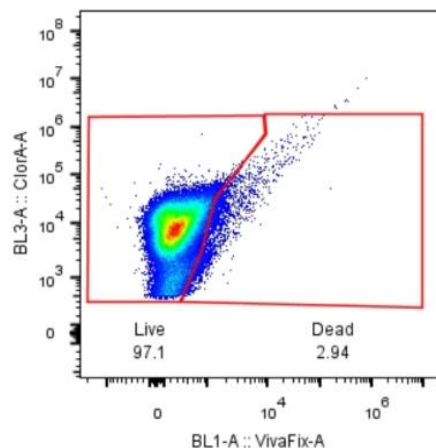
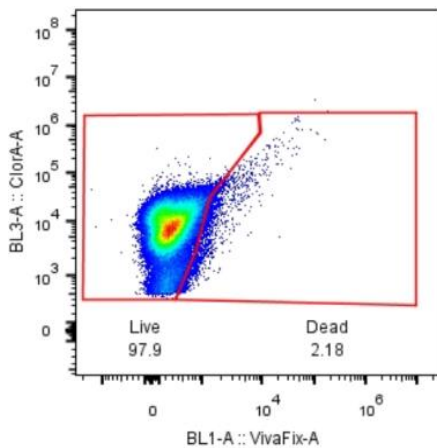
Anexo 1. Gráficos de fluorescencia obtenidos con el citómetro de flujo Attune Azul/Violeta de *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena cylindrica* y *Anabaena sp.*

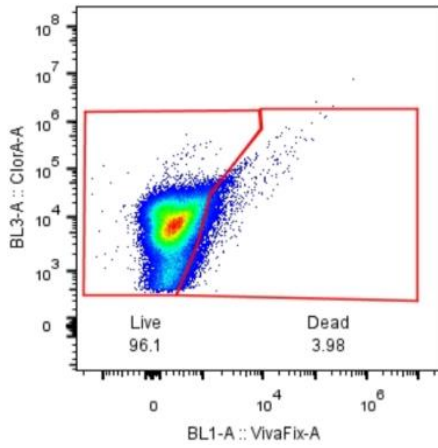
Gráficos de fluorescencia de las muestras de *Microcystis aeruginosa*.

Muestras Día 0. *Microcystis aeruginosa*.

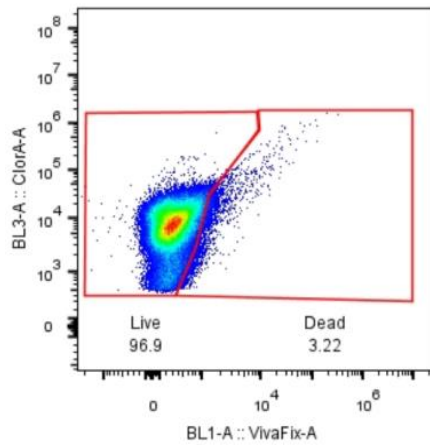


Muestras Día 10. *Microcystis aeruginosa*. Extracto crudo.

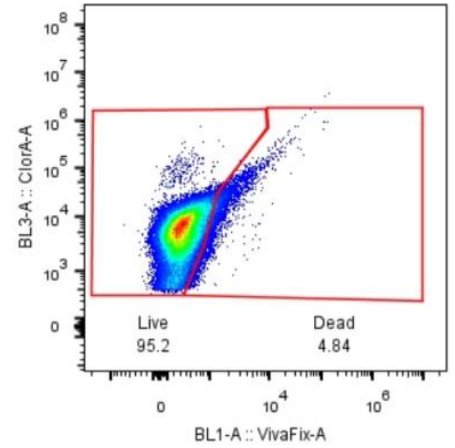




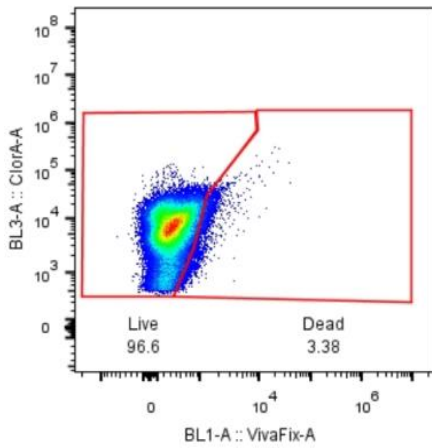
D10 MA EC LNC-17AMS141.fcs



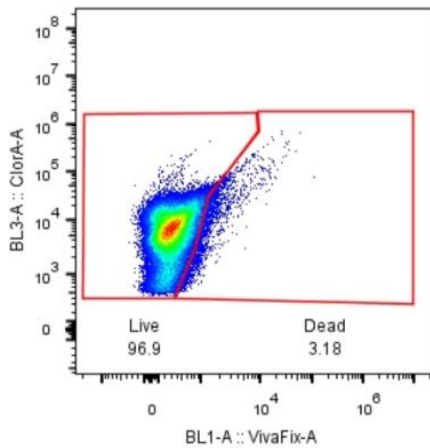
D10 MA EC LNC-17AMS142.fcs



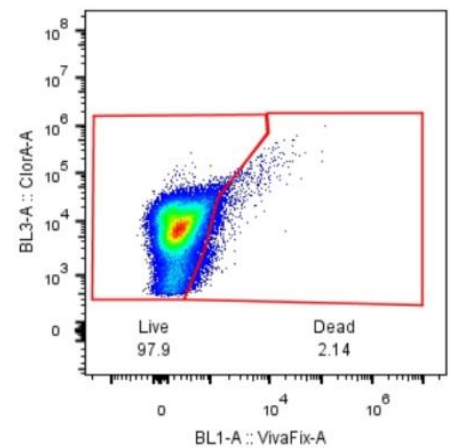
D10 MA EC LNC-17AMS143.fcs



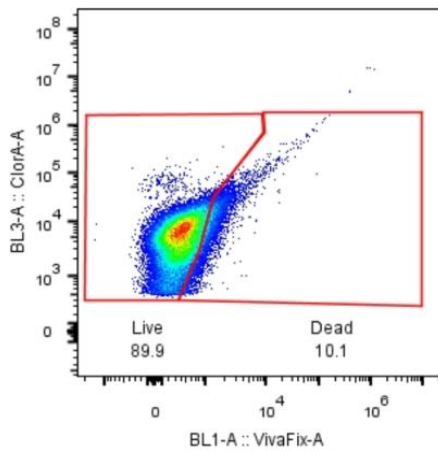
D10 MA EC LNC-17AMS144.fcs



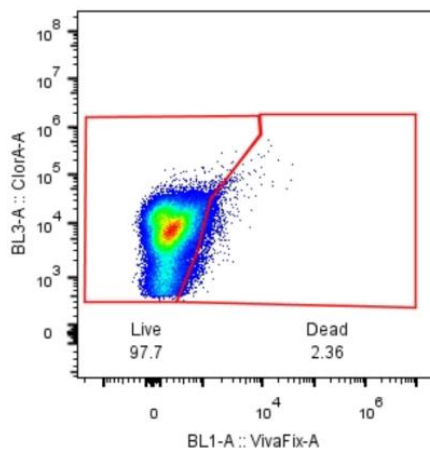
D10 MA EC LNC-17AMS145.fcs



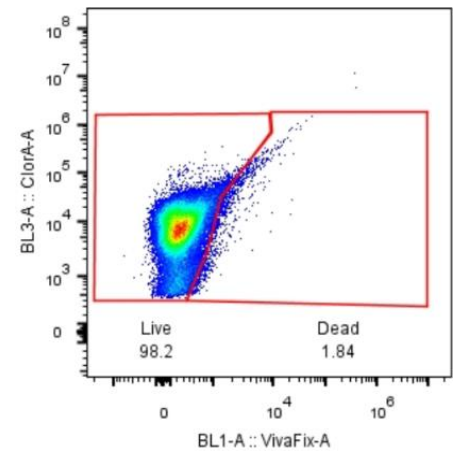
D10 MA EC LNC-17AMS146.fcs



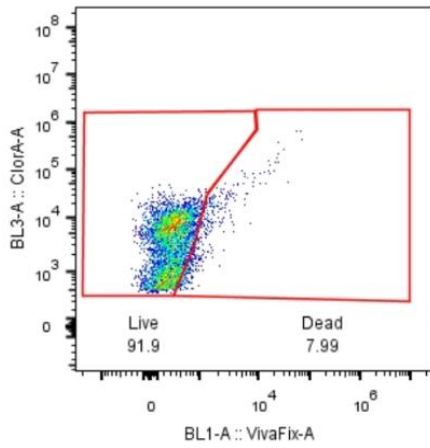
D10 MA EC LNC-17AMS147.fcs



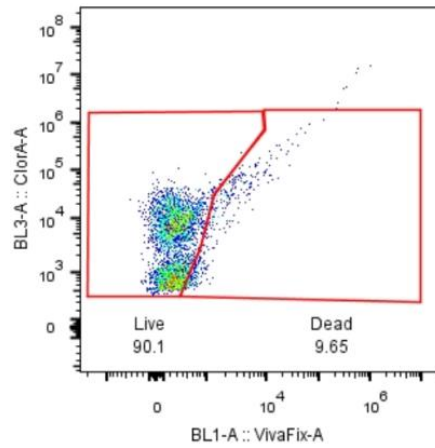
D10 MA EC LNC-17AMS148.fcs



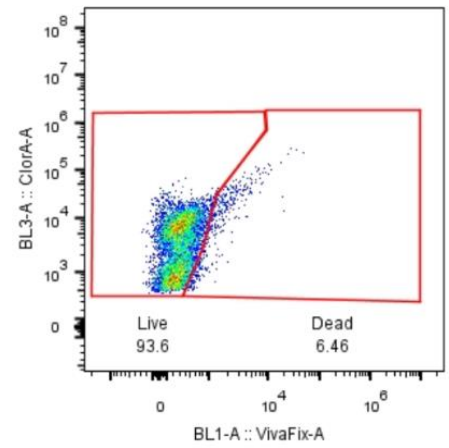
D10 MA EC LNC-17AMS149.fcs



D10 MA EC LNC-17AMS150.fcs

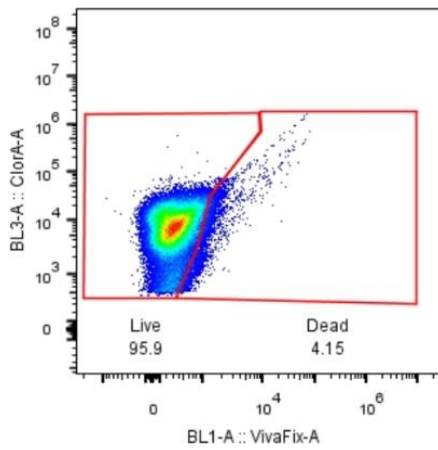


D10 MA EC LNC-17AMS151.fcs

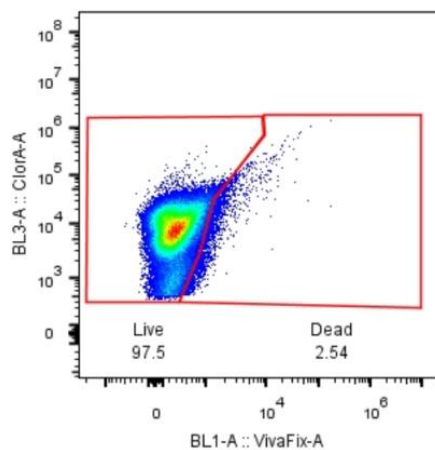


D10 MA EC LNC-17AMS152.fcs

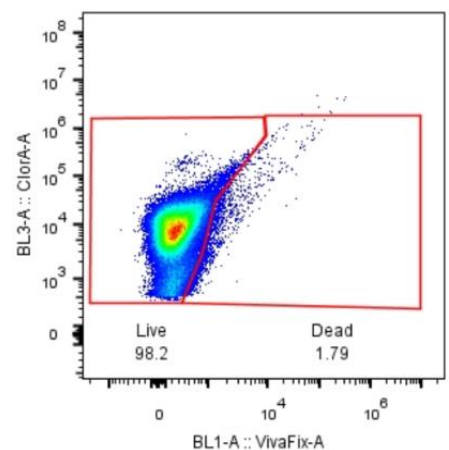
Muestras Día 10. *Microcystis aeruginosa*. Extracto puro.



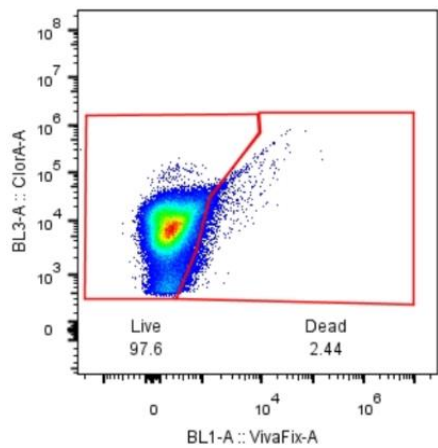
D10 MA EC LNC-17AMS153.fcs



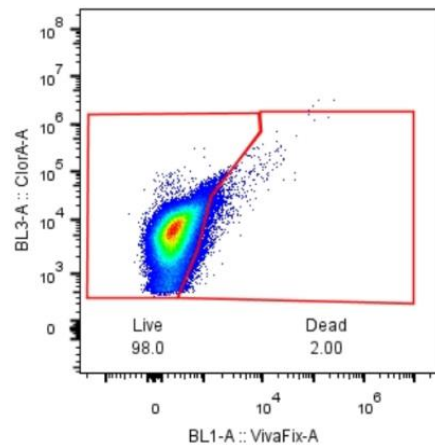
D10 MA EC LNC-17AMS154.fcs



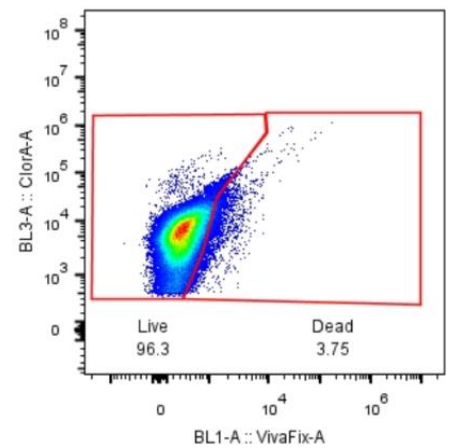
D10 MA EC LNC-17AMS155.fcs



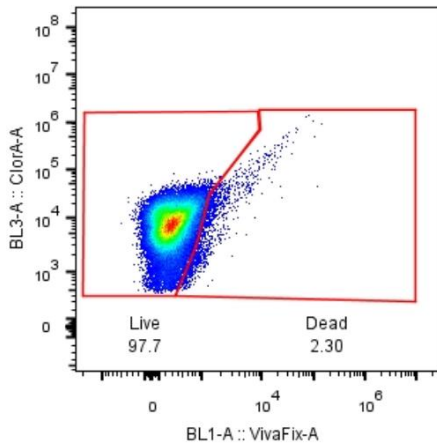
D10 MA EC LNC-17AMS156.fcs



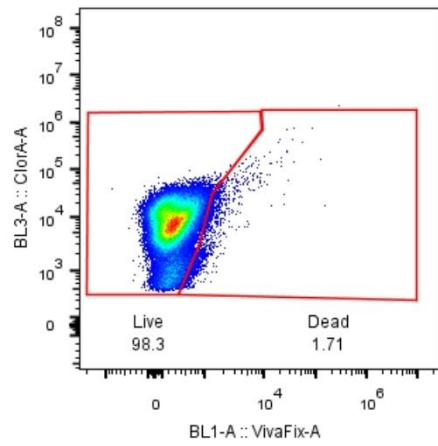
D10 MA EC LNC-17AMS157.fcs



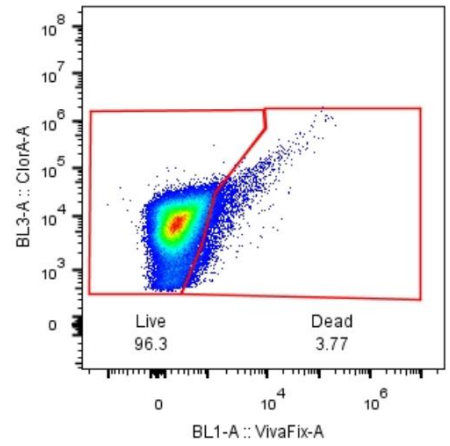
D10 MA EC LNC-17AMS158.fcs



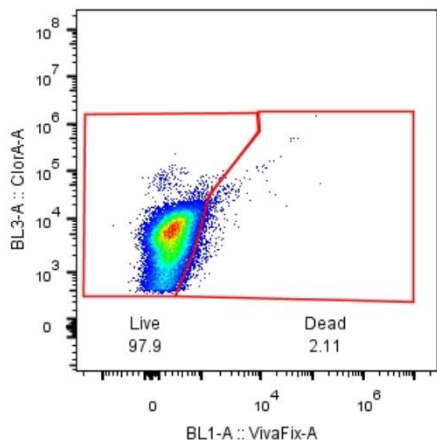
D10 MA EC LNC-17AMS159.fcs



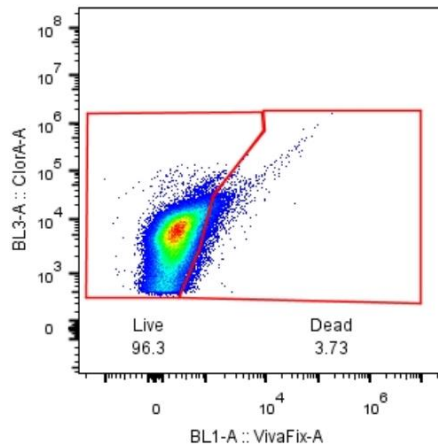
D10 MA EC LNC-17AMS160.fcs



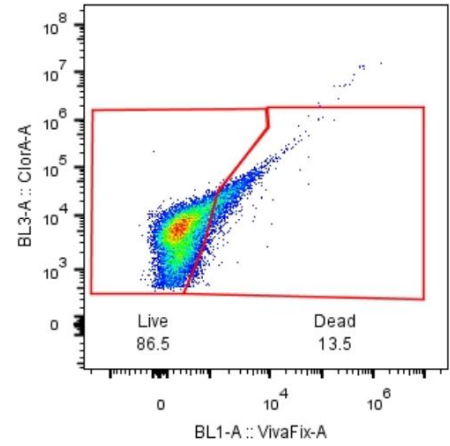
D10 MA EC LNC-17AMS161.fcs



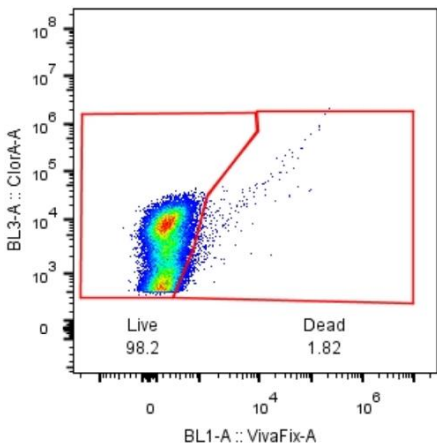
D10 MA EC LNC-17AMS162.fcs



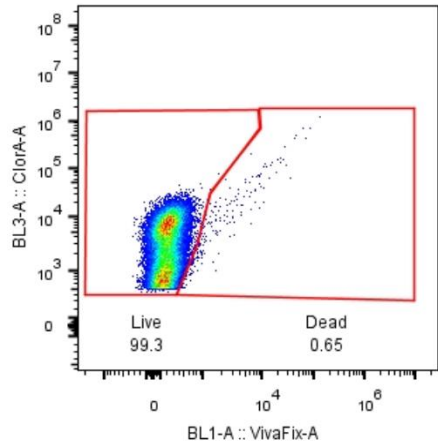
D10 MA EC LNC-17AMS163.fcs



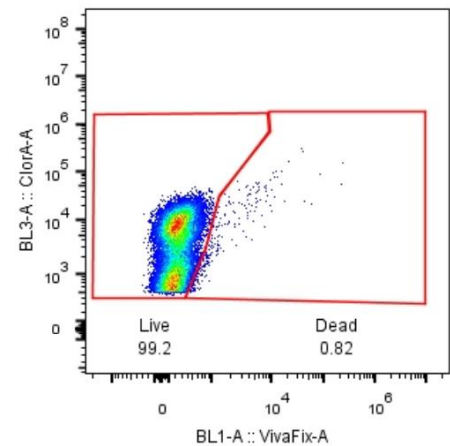
D10 MA EC LNC-17AMS164.fcs



D10 MA EC LNC-17AMS165.fcs



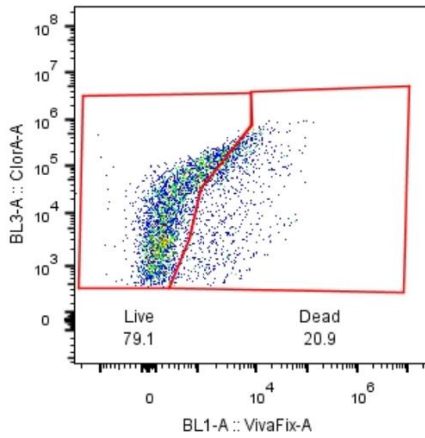
D10 MA EC LNC-17AMS166.fcs



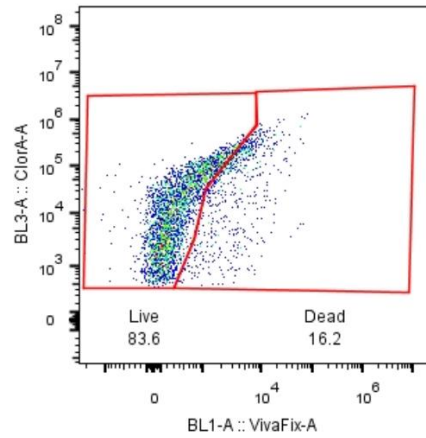
D10 MA EC LNC-17AMS167.fcs

Gráficos de fluorescencia de las muestras de *Anabaena cylindrica*.

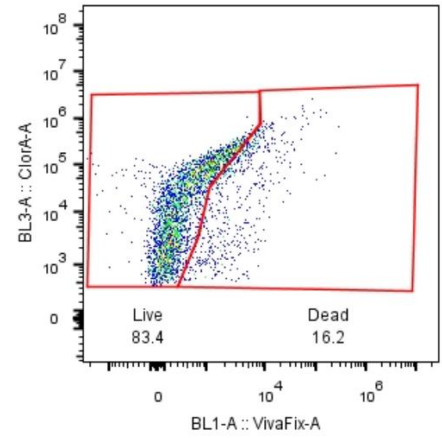
Muestras Día 0. *Anabaena cylindrica*.



D0 LNC-17AMS135.fcs

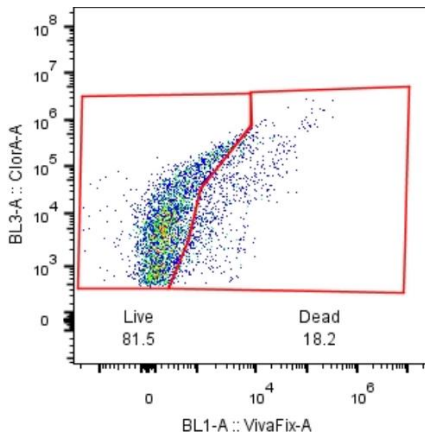


D0 LNC-17AMS136.fcs

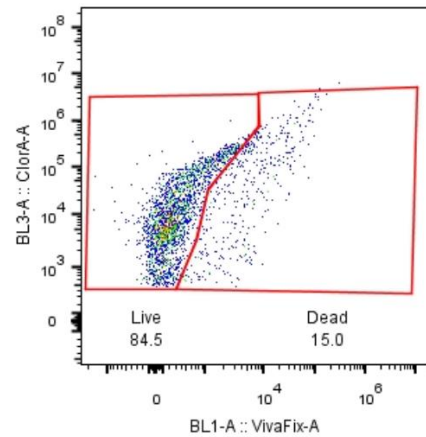


D0 LNC-17AMS137.fcs

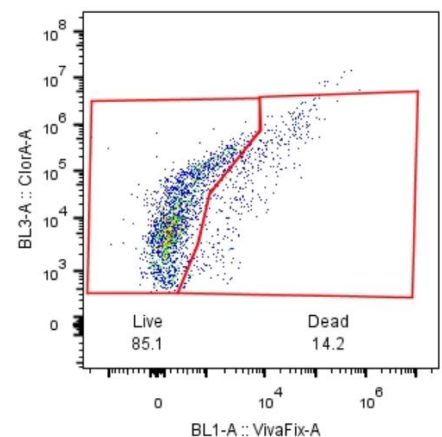
Muestras Día 10. *Anabaena cylindrica*. Extracto crudo.



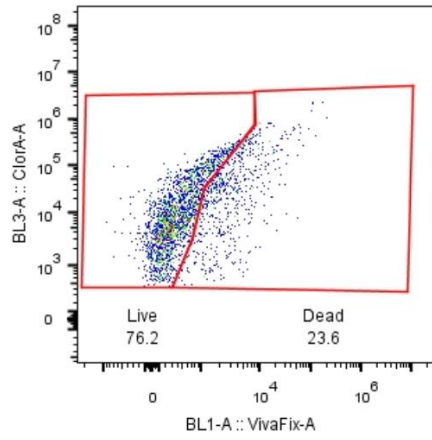
D10 AC EC LNC-17AMS168.fcs



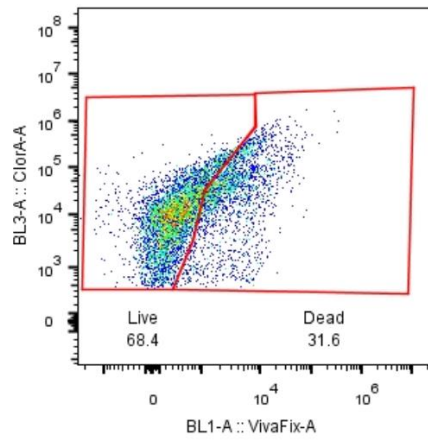
D10 AC EC LNC-17AMS169.fcs



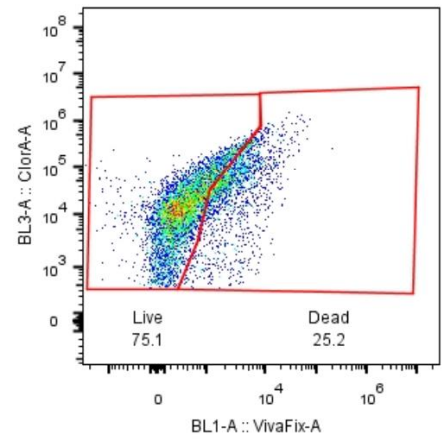
D10 AC EC LNC-17AMS170.fcs



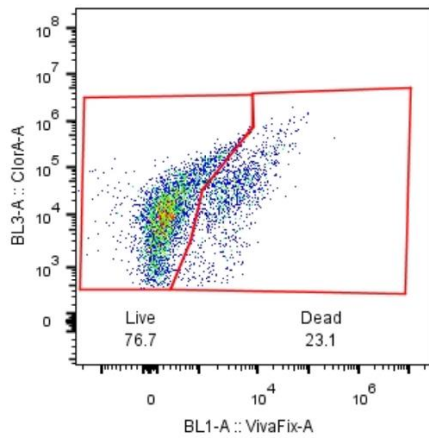
D10 AC EC LNC-17AMS171.fcs



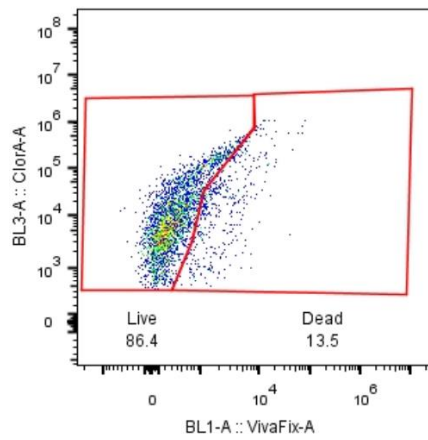
D10 AC EC LNC-17AMS172.fcs



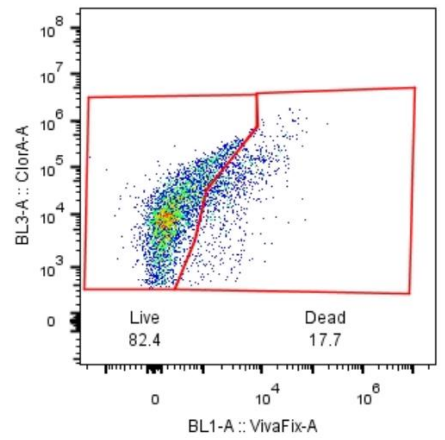
D10 AC EC LNC-17AMS173.fcs



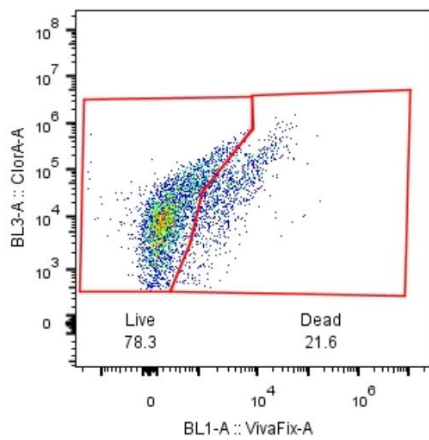
D10 AC EC LNC-17AMS174.fcs



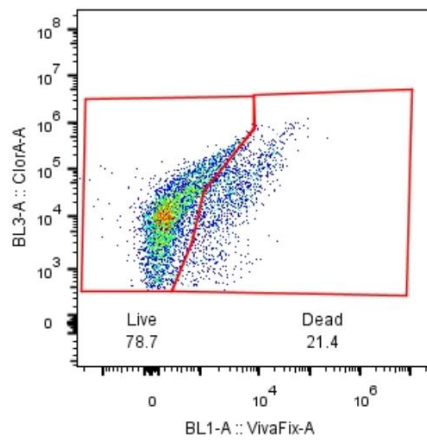
D10 AC EC LNC-17AMS175.fcs



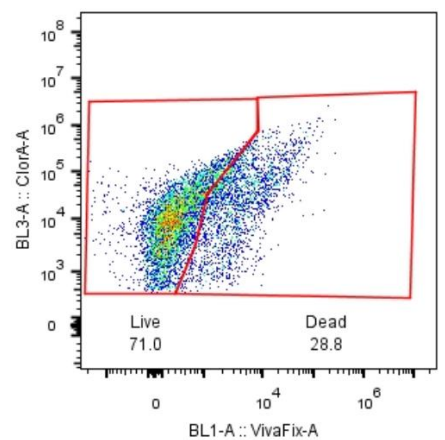
D10 AC EC LNC-17AMS176.fcs



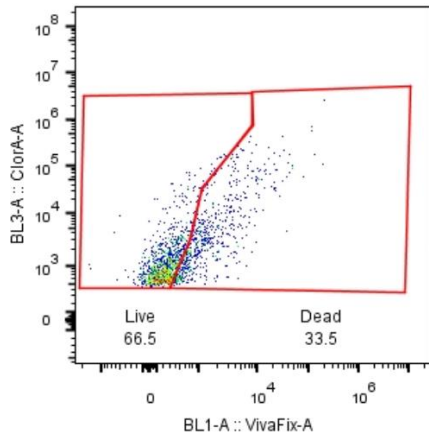
D10 AC EC LNC-17AMS177.fcs



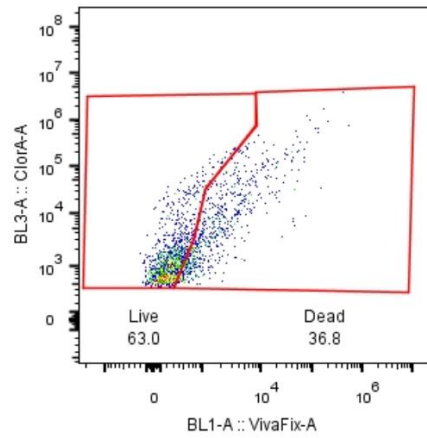
D10 AC EC LNC-17AMS178.fcs



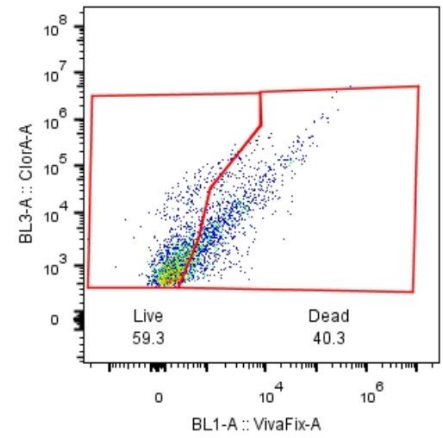
D10 AC EC LNC-17AMS179.fcs



D10 AC EC LNC-17AMS180.fcs

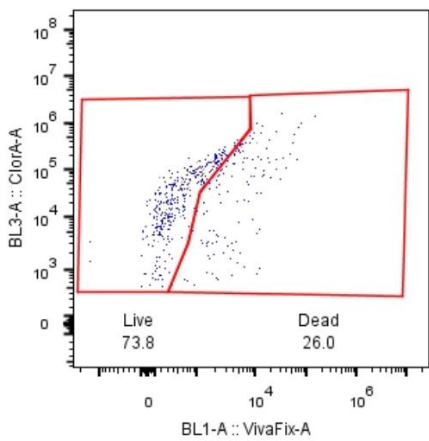


D10 AC EC LNC-17AMS181.fcs

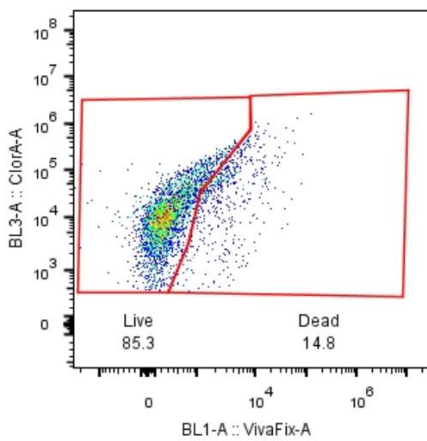


D10 AC EC LNC-17AMS182.fcs

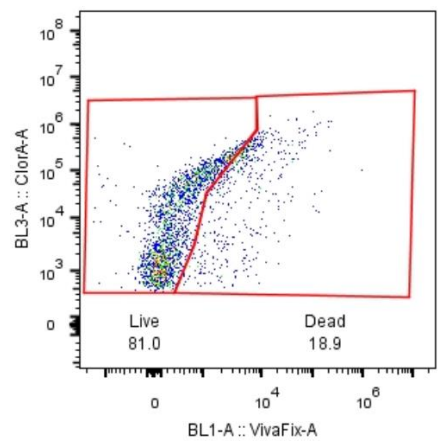
Muestras Día 10. *Anabaena cylindrica*. Extracto puro.



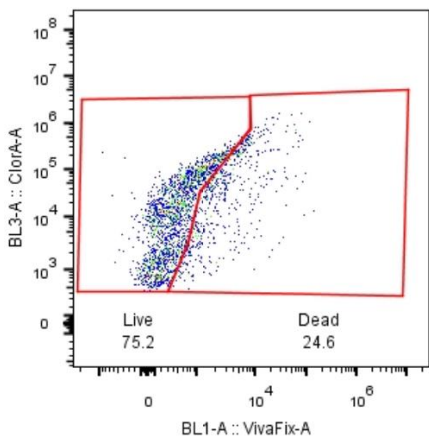
D10 AC EC LNC-17AMS183.fcs



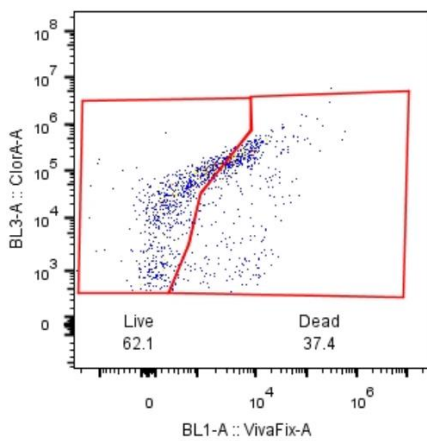
D10 AC EC LNC-17AMS184.fcs



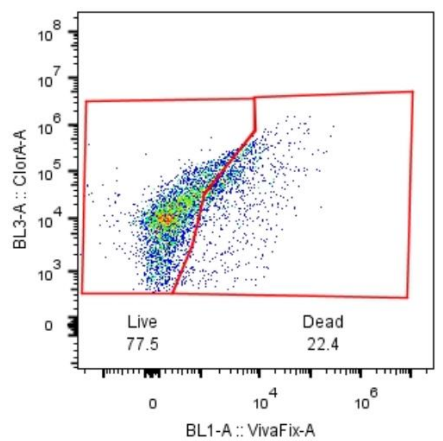
D10 AC EC LNC-17AMS185.fcs



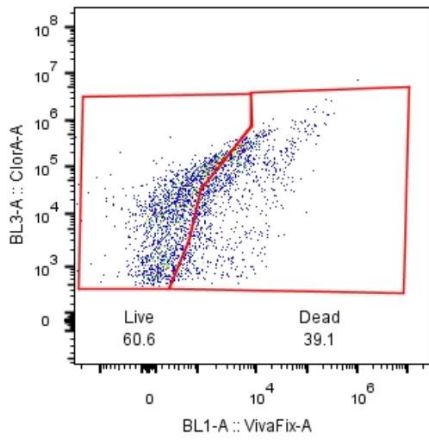
D10 AC EC LNC-17AMS186.fcs



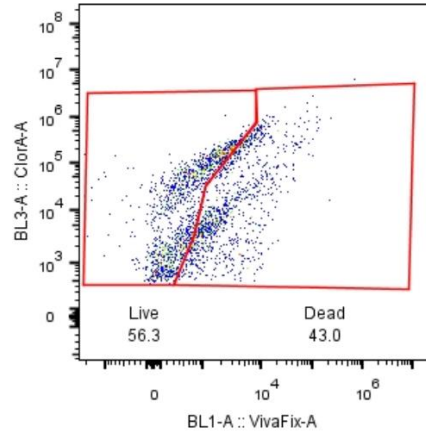
D10 AC EC LNC-17AMS187.fcs



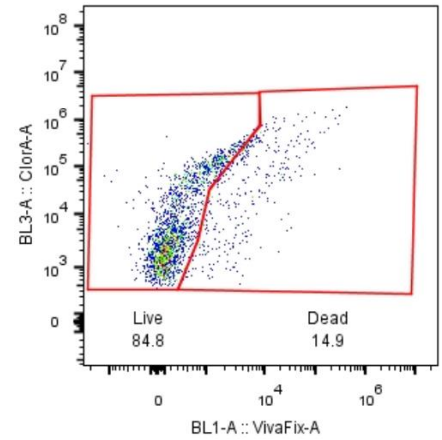
D10 AC EC LNC-17AMS188.fcs



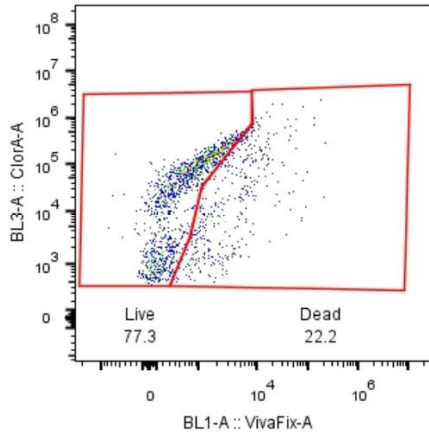
D10 AC EC LNC-17AMS189.fcs



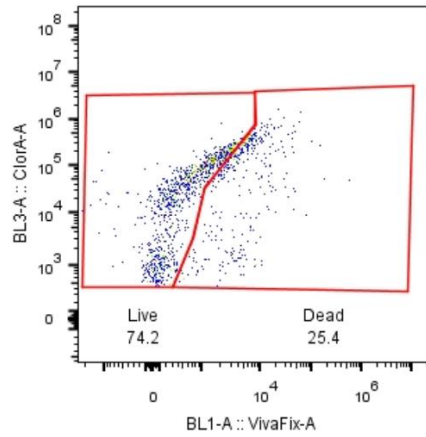
D10 AC EC LNC-17AMS190.fcs



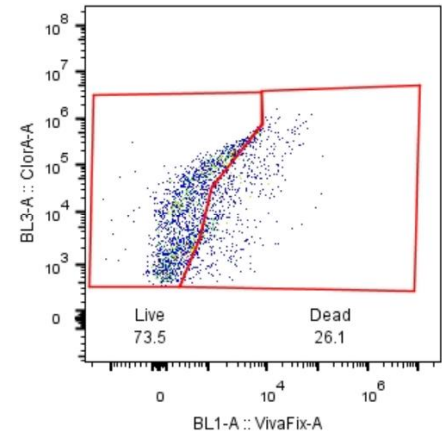
D10 AC EC LNC-17AMS191.fcs



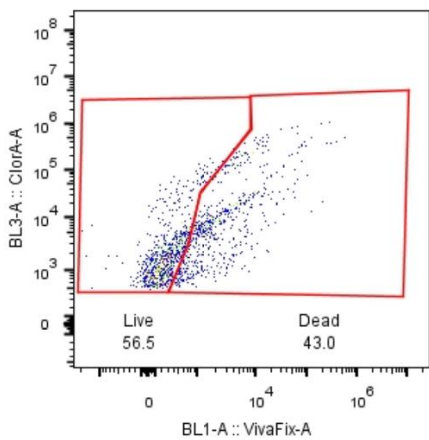
D10 AC EC LNC-17AMS192.fcs



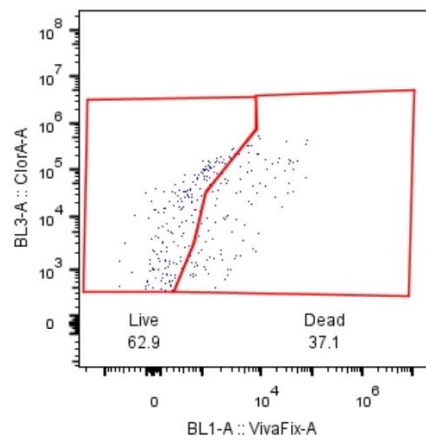
D10 AC EC LNC-17AMS193.fcs



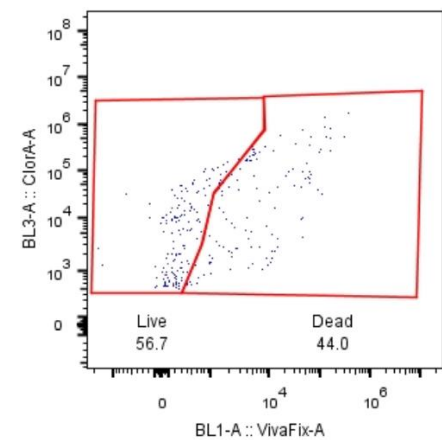
D10 AC EC LNC-17AMS194.fcs



D10 AC EC LNC-17AMS195.fcs



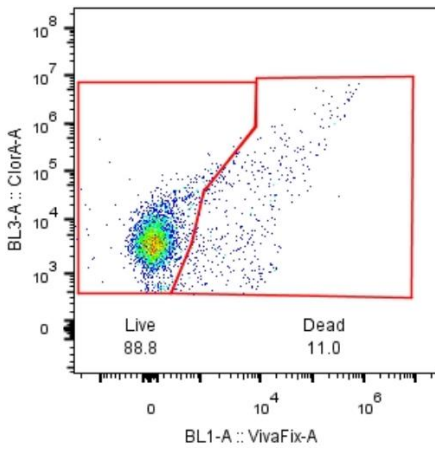
D10 AC EC LNC-17AMS196.fcs



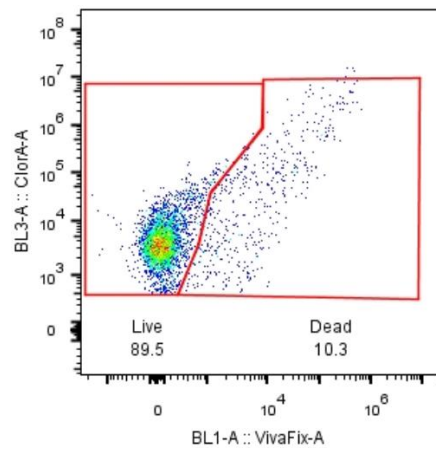
D10 AC EC LNC-17AMS197.fcs

Gráficos de fluorescencia de las muestras de *Anabaena* sp.

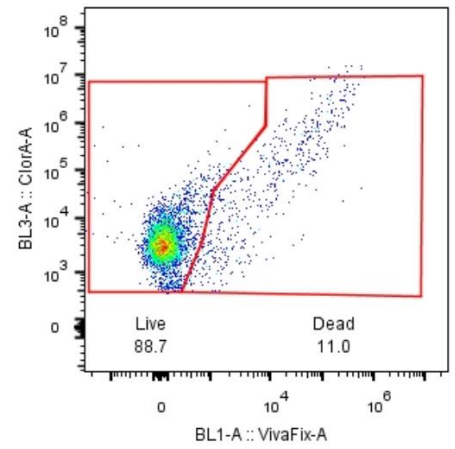
Muestras Día 0. *Anabaena* sp.



D0 LNC-17AMS132.fcs

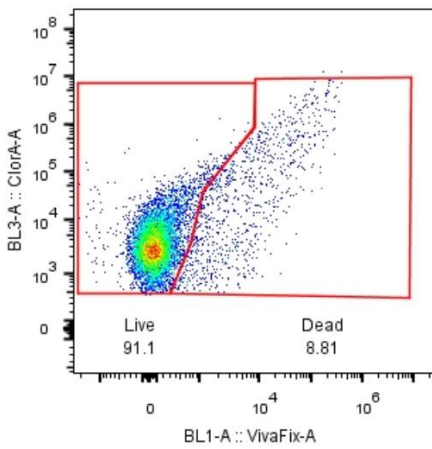


D0 LNC-17AMS133.fcs

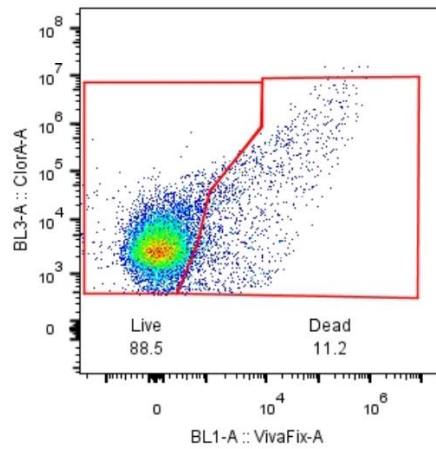


D10 LNC-17AMS134.fcs

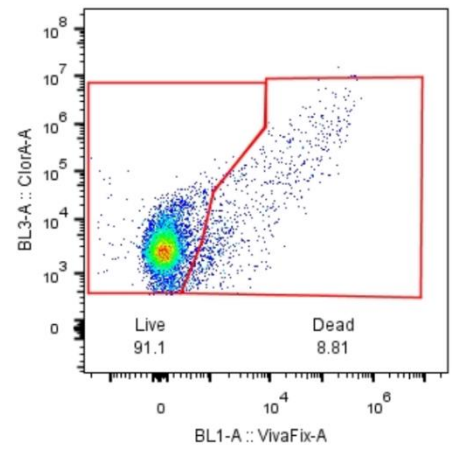
Muestras Día 10. *Anabaena* sp. Extracto crudo.



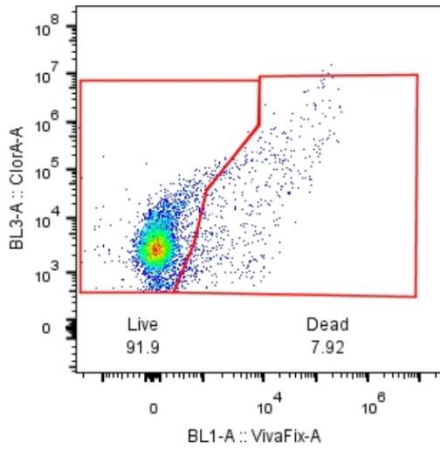
D10 ASP EC LNC-17AMS198.fcs



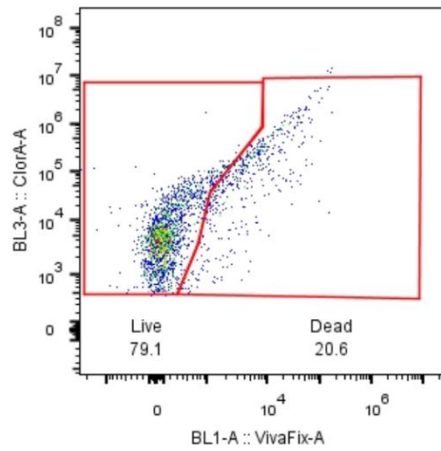
D10 ASP EC LNC-17AMS199.fcs



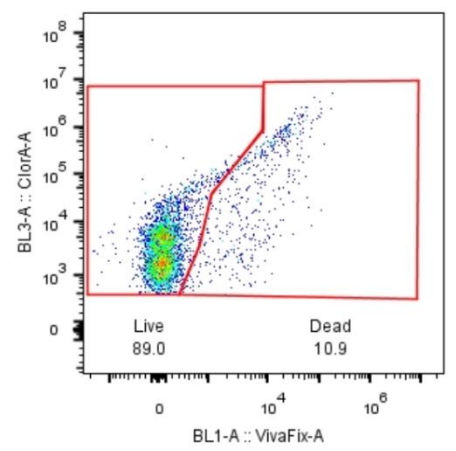
D10 ASP EC LNC-17AMS200.fcs



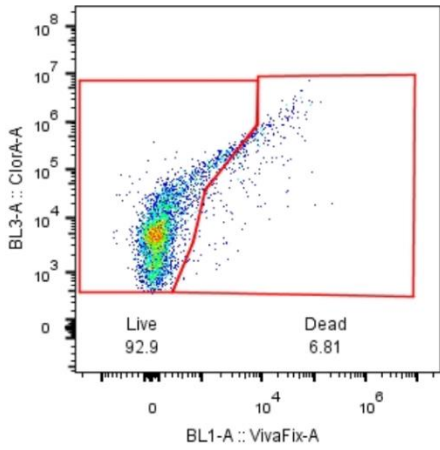
D10 ASP EC LNC-17AMS201.fcs



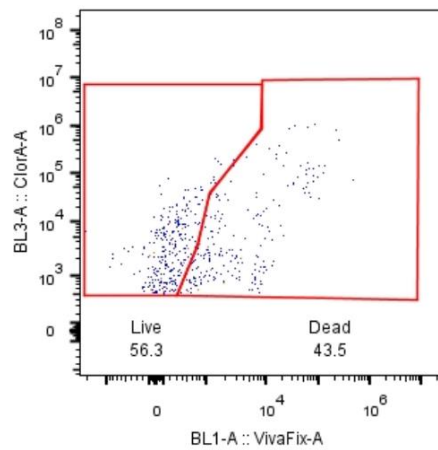
D10 ASP EC LNC-17AMS202.fcs



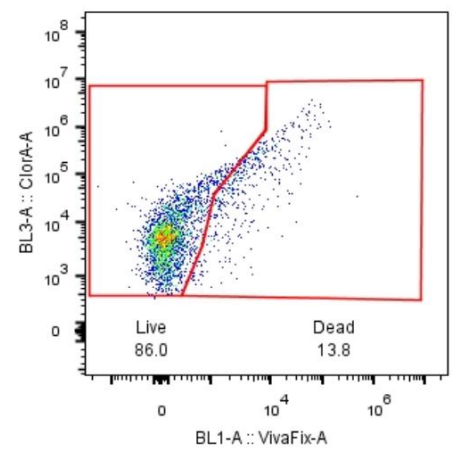
D10 ASP EC LNC-17AMS203.fcs



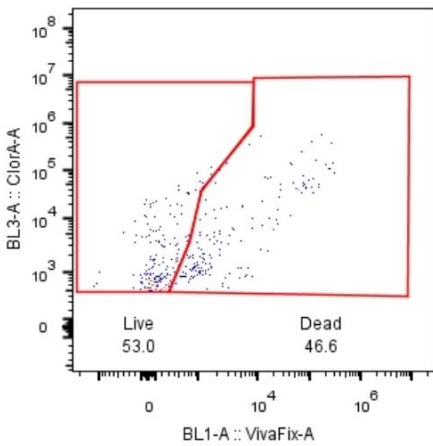
D10 ASP EC LNC-17AMS204.fcs



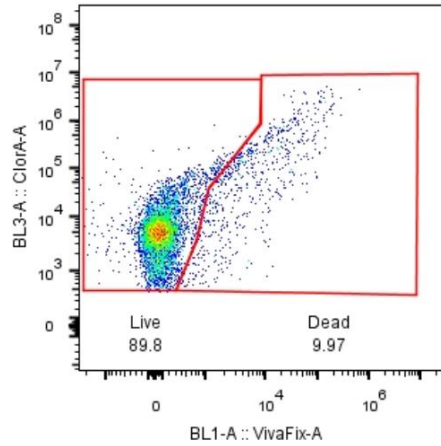
D10 ASP EC LNC-17AMS205.fcs



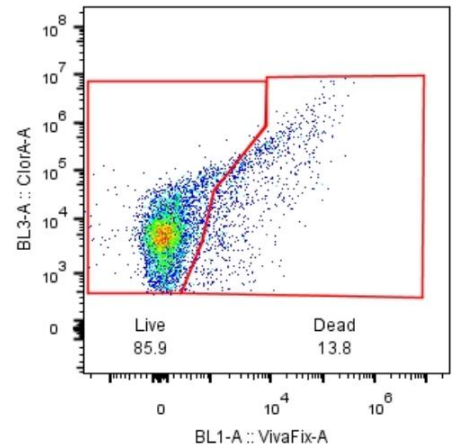
D10 ASP EC LNC-17AMS206.fcs



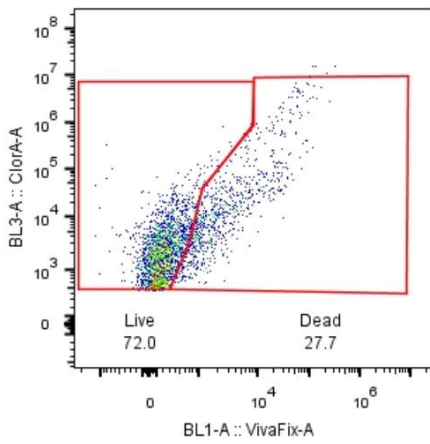
D10 ASP EC LNC-17AMS207.fcs



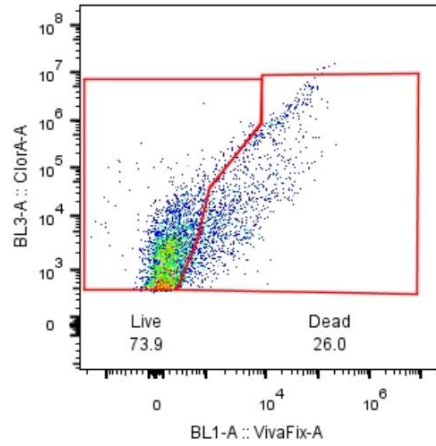
D10 ASP EC LNC-17AMS208.fcs



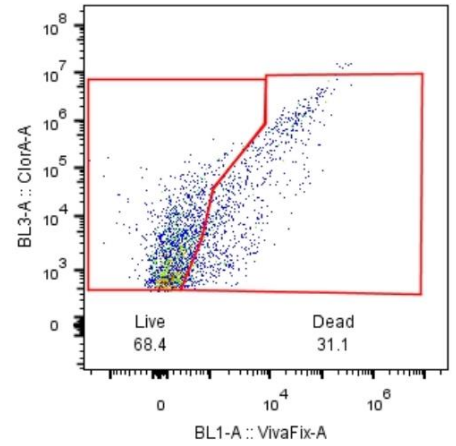
D10 ASP EC LNC-17AMS209.fcs



D10 ASP EC LNC-17AMS210.fcs

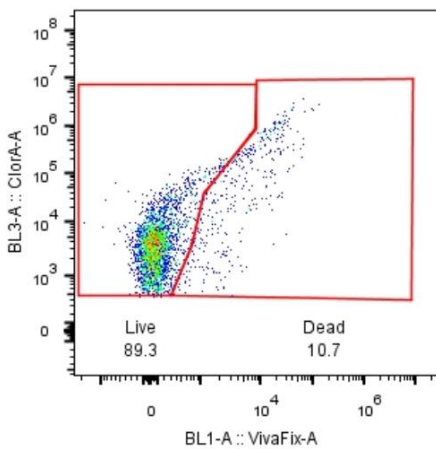


D10 ASP EC LNC-17AMS211.fcs

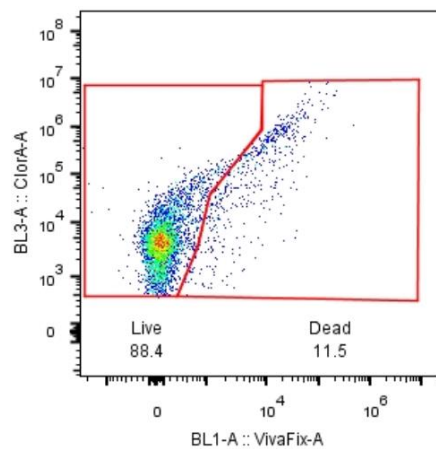


D10 ASP EC LNC-17AMS212.fcs

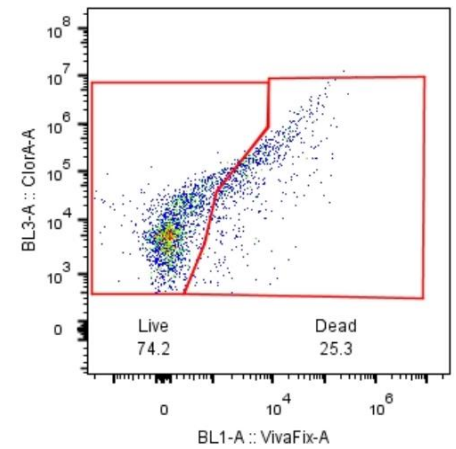
Muestras Día 10. *Anabaena* sp. Extracto puro.



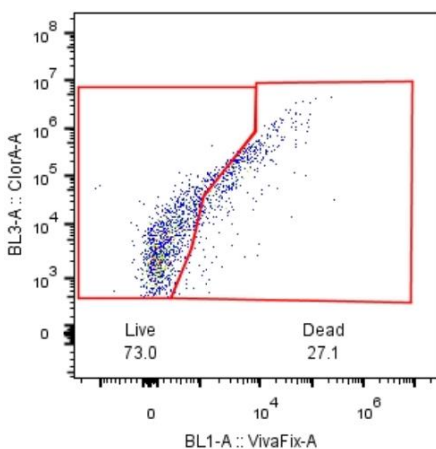
D10 ASP EC LNC-17AMS213.fcs



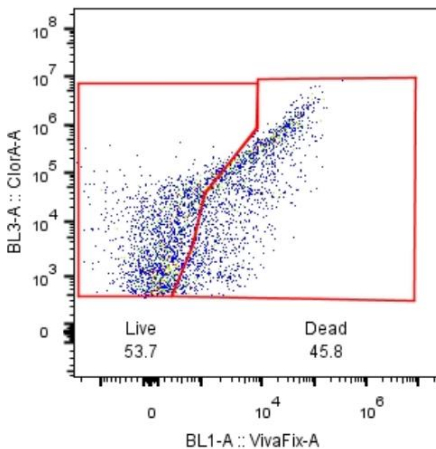
D10 ASP EC LNC-17AMS214.fcs



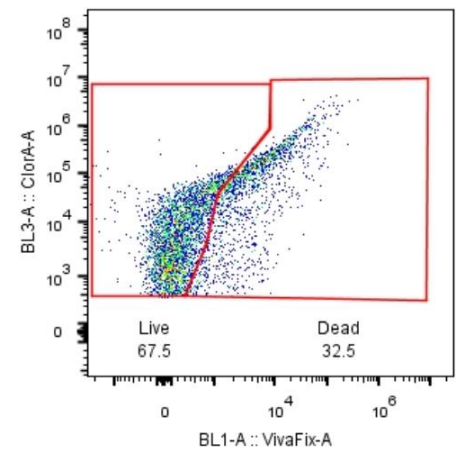
D10 ASP EC LNC-17AMS215.fcs



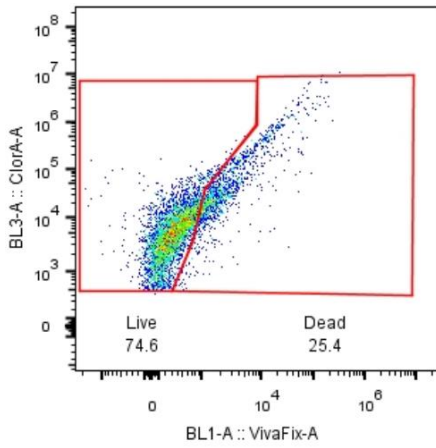
D10 ASP EC LNC-17AMS216.fcs



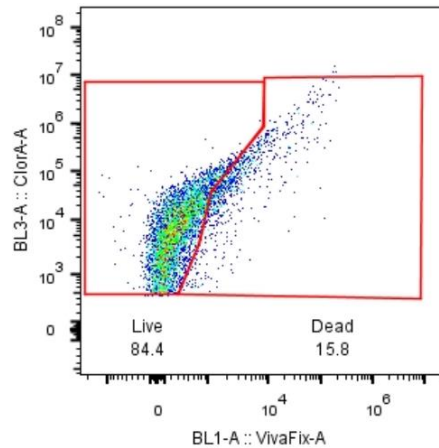
D10 ASP EC LNC-17AMS217.fcs



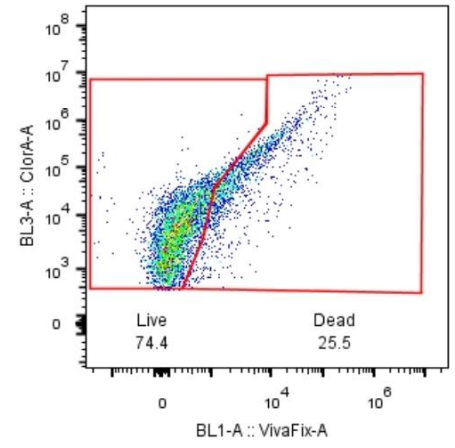
D10 ASP EC LNC-17AMS218.fcs



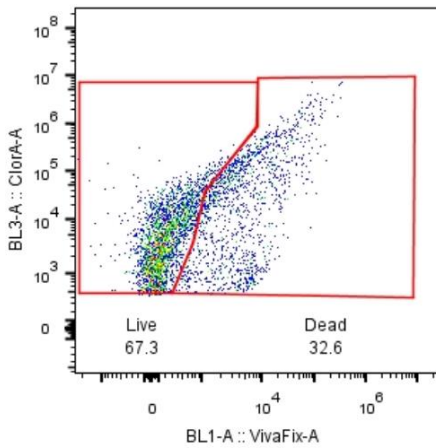
D10 ASP EC LNC-17AMS219.fcs



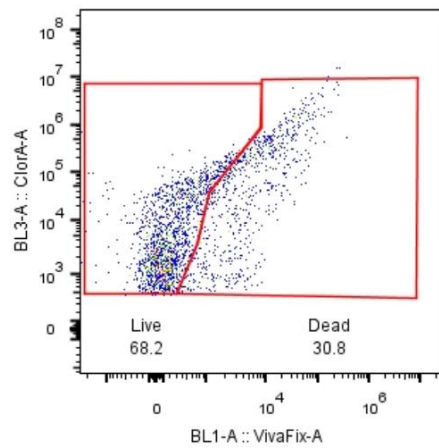
D10 ASP EC LNC-17AMS220.fcs



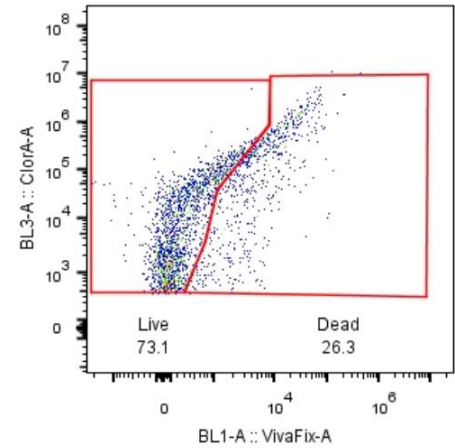
D10 ASP EC LNC-17AMS221.fcs



D10 ASP EC LNC-17AMS222.fcs



D10 ASP EC LNC-17AMS223.fcs

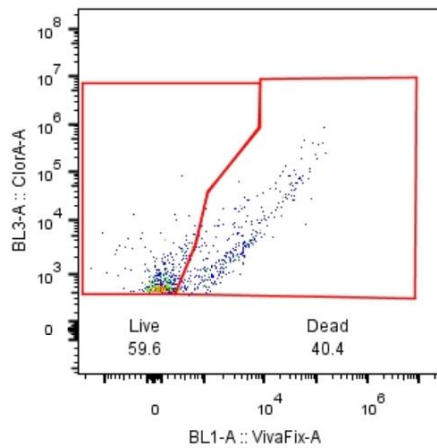


D10 ASP EC LNC-17AMS224.fcs

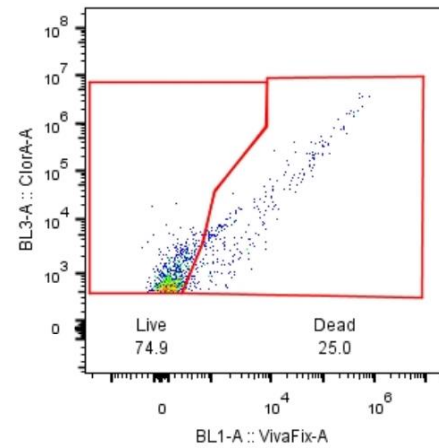
D10 ASP EP LNC-17AMS222.fcs

D10 ASP EP LNC-17AMS223.fcs

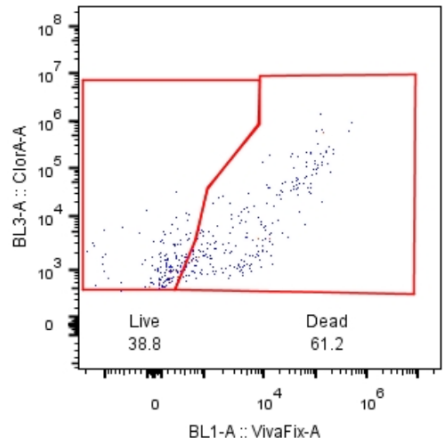
D10 ASP EP LNC-17AMS224.fcs



D10 ASP EC LNC-17AMS225.fcs



D10 ASP EC LNC-17AMS226.fcs



D10 ASP EC LNC-17AMS227.fcs

ANEXO 2. Tablas de resultados *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena cylindrica* y *Anabaena sp.*, a 0 y 10 días de exposición al extracto crudo y al purificado.

En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos con el citómetro de flujo Attune Azul/Violeta de *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena cylindrica* y *Anabaena sp.*, en el día 0. Se presentan el % de células vivas, % de células muertas, tamaño celular, número total de cianobacterias, número de células vivas y número de células muertas.

Tabla 1. *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena cylindrica* y *Anabaena sp.*, día 0.

Código LabNaCit	Conc.	% Vivas	% Muertas	Tamaño (Chl/FSC-W)	# x10 ⁴ Total-Ciano (2.5 mL)	# x10 ⁴ Vivas (2.5 mL)	# x10 ⁴ Muertas (2.5 mL)
LNC-17 ASV129	Basal	93.4	6.56	385	188.03	175.6200	12.3347
LNC-17 ASV130	Basal	89.9	10	373	181.965	163.5865	18.1965
LNC-17 ASV131	Basal	93	6.91	400	214.27	199.2711	14.8060
LNC-17 ASV135	Basal	79.1	13.9	646	10.087	7.9792	1.4022
LNC-17 ASV136	Basal	83.6	16.2	698	9.992	8.3537	1.6188
LNC-17 ASV137	Basal	83.4	16.2	716	9.02	7.5227	1.4612
LNC-17 ASV132	Basal	88.8	11	278	19.71	17.5025	2.1681
LNC-17 ASV133	Basal	89.5	10.3	270	22.685	20.3031	2.3366
LNC-17 ASV134	Basal	88.7	11	247	24.295	21.5497	2.6725

En la Tabla 2 y Tabla 3 se presentan los resultados correspondientes a *Microcystis aeruginosa* a 10 días de exposición a las cuatro concentraciones del extracto crudo y del extracto puro, respectivamente.

Tabla 2. *Microcystis aeruginosa* a 10 días de exposición al extracto crudo.

Código LabNaCit	Conc.	% Vivas	% Muertas	Tamaño (Relación Chl/FSC-W)	# x10 ⁴ Total-Ciano (2.5 mL)	# x10 ⁴ Vivas (2.5 mL)	# x10 ⁴ Muertas (2.5 mL)
LNC-17AMS138	0	97.9	2.18	555	1320.7	1,292.9653	28.7912
LNC-17AMS139	0	97.1	2.94	562	1352.775	1,313.5445	39.7715
LNC-17AMS140	0	96.2	3.87	424	1326.213	1,275.8164	51.3244
LNC-17AMS141	1	96.1	3.98	507	1212.5	1,165.2125	48.2575
LNC-17AMS142	1	96.9	3.22	532	1189.263	1,152.3953	38.2942
LNC-17AMS143	1	95.2	4.84	397	1177.013	1,120.5159	56.9674
LNC-17AMS144	10	96.6	3.38	486	1166.863	1,127.1891	39.4399
LNC-17AMS145	10	96.9	3.18	463	1165.763	1,129.6238	37.0712
LNC-17AMS146	10	97.9	2.14	523	1093.875	1,070.9036	23.4089
LNC-17AMS147	100	89.9	10.1	401	728.187	654.6405	73.5469
LNC-17AMS148	100	97.7	2.36	535	956.487	934.4882	22.5731
LNC-17AMS149	100	98.2	1.84	565	868.625	852.9897	15.9827
LNC-17AMS150	1000	91.9	7.99	383	64.0125	58.8274	5.1145
LNC-17AMS151	1000	90.1	9.65	482	39.987	36.0287	3.8587
LNC-17AMS152	1000	93.6	6.46	352	81.725	76.4946	5.2794

Tabla 3. *Microcystis aeruginosa* a 10 días de exposición al extracto puro.

Código LabNaICit	Conc.	% Vivas	% Muertas	Tamaño (Relación Chl/FSC-W)	# x10 ⁴ Total-Ciano (2.5 mL)	# x10 ⁴ Vivas (2.5 mL)	# x10 ⁴ Muertas (2.5 mL)
LNC-17AMS153	0	95.9	4.15	526	1279.913	1,227.4360	53.1163
LNC-17AMS154	0	97.5	2.54	554	1318.725	1,285.7568	33.4956
LNC-17AMS155	0	98.2	1.79	560	1388.9	1,363.8998	24.8613
LNC-17AMS156	1	97.6	2.44	533	1192.288	1,163.6726	29.0918
LNC-17AMS157	1	98	2	398	1303.188	1,277.1237	26.0637
LNC-17AMS158	1	96.3	3.75	401	1251.175	1,204.8815	46.9190
LNC-17AMS159	10	97.7	2.3	553	1034.263	1,010.4744	23.7880
LNC-17AMS160	10	98.3	1.71	556	1157.525	1,137.8470	19.7936
LNC-17AMS161	10	96.3	3.77	497	1045.15	1,006.4794	39.4021
LNC-17AMS162	100	97.9	2.11	359	497.425	486.9790	10.4956
LNC-17AMS163	100	96.3	3.73	345	933.8	899.2494	34.8307
LNC-17AMS164	100	86.5	13.5	388	196.512	169.9833	26.5291
LNC-17AMS165	1000	98.2	1.82	374	358.5	352.047	6.5247
LNC-17AMS166	1000	99.3	0.65	281	392.875	390.1248	2.5536
LNC-17AMS167	1000	99.2	0.82	363	392.062	388.926	3.2149

En la Tabla 4 y Tabla 5 se presentan los resultados correspondientes a *Anabaena cylindrica* a 10 días de exposición a las cuatro concentraciones del extracto crudo y del extracto puro, respectivamente.

Tabla 4. *Anabaena cylindrica* a 10 días de exposición al extracto crudo.

Código LabNaCit	Conc.	% Vivas	% Muertas	Tamaño (Relación Chl/FSC-W)	# x10 ⁴ Total-Ciano (2.5 mL)	# x10 ⁴ Vivas (2.5 mL)	# x10 ⁴ Muertas (2.5 mL)
LNC-17AMS168	0	81.5	18.2	236	51.075	41.6261	9.2957
LNC-17AMS169	0	84.5	15	357	22.775	19.2449	3.4163
LNC-17AMS170	0	85.1	14.2	352	21.575	18.3603	3.0637
LNC-17AMS171	1	76.2	23.6	327	21.85	16.6497	5.1566
LNC-17AMS172	1	68.4	31.6	469	62.533	42.7728	19.7605
LNC-17AMS173	1	75.1	25.2	530	62.333	46.8123	15.7080
LNC-17AMS174	10	76.7	23.1	432	39.65	30.4116	9.1592
LNC-17AMS175	10	86.4	13.5	284	27.25	23.5440	3.6788
LNC-17AMS176	10	82.4	17.7	404	38.558	31.7721	6.8248
LNC-17AMS177	100	78.3	21.6	371	35.208	27.5681	7.6050
LNC-17AMS178	100	78.7	21.4	414	47.9	37.6973	10.2506
LNC-17AMS179	100	71	28.8	376	63.983	45.4282	18.4272
LNC-17AMS180	1000	66.5	33.5	91.3	11.691	7.7750	3.9167
LNC-17AMS181	1000	63	36.8	104	12.983	8.1795	4.7779
LNC-17AMS182	1000	59.3	40.3	107	18.766	11.1286	7.5630

Tabla 5. *Anabaena cylindrica* a 10 días de exposición al extracto puro.

Código LabNaICit	Conc.	% Vivas	% Muertas	Tamaño (Relación Chl/FSC-W)	# x10 ⁴ Total-Ciano (2.5 mL)	# x10 ⁴ Vivas (2.5 mL)	# x10 ⁴ Muertas (2.5 mL)
LNC-17AMS183	0	73.8	26	837	4.241	3.1304	1.1028
LNC-17AMS184	0	85.3	14.8	425	32.608	27.8149	4.8260
LNC-17AMS185	0	81	18.9	405	21.791	17.6513	4.1186
LNC-17AMS186	1	75.2	24.6	394	20.591	15.4849	5.0656
LNC-17AMS187	1	62.1	37.4	977	10.875	6.7534	4.0673
LNC-17AMS188	1	77.5	22.4	454	38.641	29.9473	8.6557
LNC-17AMS189	10	60.6	39.1	435	23.55	14.2713	9.2081
LNC-17AMS190	10	56.3	43	243	22.008	12.3907	9.4636
LNC-17AMS191	10	84.8	14.9	168	18.883	16.0131	2.8136
LNC-17AMS192	100	77.3	22.2	904	15.058	11.6401	3.3430
LNC-17AMS193	100	74.2	25.4	1098	11.441	8.4897	2.9062
LNC-17AMS194	100	73.5	26.1	306	19.541	14.3631	5.1004
LNC-17AMS195	1000	56.5	43	112	11.391	6.4363	4.8984
LNC-17AMS196	1000	62.9	37.1	334	2.425	1.5253	0.8997
LNC-17AMS197	1000	56.7	44	256	2.208	1.2521	0.9717

En la Tabla 6 y Tabla 7 se presentan los resultados correspondientes a *Anabaena sp.*, a 10 días de exposición a las cuatro concentraciones del extracto crudo y del extracto puro, respectivamente.

Tabla 6. *Anabaena sp.* a 10 días de exposición al extracto crudo.

Código LabNalCit	Conc.	% Vivas	% Muertas	Tamaño (Relación Chl/FSC-W)	# x10 ⁴ Total-Ciano (2.5 mL)	# x10 ⁴ Vivas (2.5 mL)	# x10 ⁴ Muertas (2.5 mL)
LNC-17AMS198	0	91.1	8.81	218	88.325	80.4641	7.7814
LNC-17AMS199	0	88.5	11.2	220	94.525	83.6546	10.5868
LNC-17AMS200	0	91.1	8.81	195	71.516	65.1517	6.3006
LNC-17AMS201	1	91.9	7.92	207	57.325	52.6817	4.5401
LNC-17AMS202	1	79.1	20.6	364	18.65	14.7522	3.8419
LNC-17AMS203	1	89	10.9	218	37.941	33.7681	4.1356
LNC-17AMS204	10	92.9	6.81	341	37.316	34.6672	25.4127
LNC-17AMS205	10	56.3	43.5	91.3	4.566	2.5710	1.9865
LNC-17AMS206	10	86	13.8	237	31.441	27.0398	4.3390
LNC-17AMS207	100	53	46.6	50.7	3.425	1.8153	1.5961
LNC-17AMS208	100	89.8	9.97	371	54.791	49.2029	5.4627
LNC-17AMS209	100	85.9	13.8	351	54.958	47.2092	7.5843
LNC-17AMS210	1000	72	27.7	106	25.408	18.2940	7.0381
LNC-17AMS211	1000	73.9	26	146	35.758	26.4254	9.2972
LNC-17AMS212	1000	68.4	31.1	125	20.85	13.5108	6.4844

Tabla 7. *Anabaena sp.* a 10 días de exposición al extracto puro.

Código LabNaCit	Conc.	% Vivas	% Muertas	Tamaño (Relación Chl/FSC-W)	# x10 ⁴ Total-Ciano (2.5 mL)	# x10 ⁴ Vivas (2.5 mL)	# x10 ⁴ Muertas (2.5 mL)
LNC-17AMS213	0	89.3	10.7	215	28.616	25.5547	3.0620
LNC-17AMS214	0	88.4	11.5	316	38.525	34.0561	4.4304
LNC-17AMS215	0	74.2	25.3	233	26.483	19.6506	6.7003
LNC-17AMS216	1	73	27.1	299	13.233	9.6603	3.5862
LNC-17AMS217	1	53.7	45.8	226	31.433	16.8797	14.3965
LNC-17AMS218	1	67.5	32.5	391	42.45	28.6538	13.7963
LNC-17AMS219	10	74.6	25.4	286	47.133	35.1615	11.9719
LNC-17AMS220	10	84.4	15.8	350	46.583	39.3163	7.3602
LNC-17AMS221	10	74.4	25.5	302	51.116	38.0308	13.0348
LNC-17AMS222	100	67.3	32.6	264	33.5	22.5455	10.9210
LNC-17AMS223	100	68.2	30.8	309	19.975	13.6230	6.1523
LNC-17AMS224	100	73.1	26.3	422	19.9	14.5469	5.2337
LNC-17AMS225	1000	59.6	40.4	72.1	5.616	3.3475	2.2691
LNC-17AMS226	1000	74.9	25	68.9	7.266	5.4427	1.8167
LNC-17AMS227	1000	38.8	61.2	52.9	4.041	1.5682	2.4735