

**Proyecto “DESARROLLO DE
METODOLOGÍAS Y SU APLICACIÓN
PARA LA DETERMINACIÓN DE
CIANOBACTERIAS Y DE COMPUESTOS
EMERGENTES EN CUERPOS DE AGUA
RESIDUAL Y AGUA POTABLE”**

**TC1322.1
Informe final**

COORDINACIÓN DE TRATAMIENTO Y CALIDAD DEL AGUA

SUBCOORDINACIÓN CALIDAD DEL AGUA

MANUEL SÁNCHEZ ZARZA
MARTHA ÁVILES FLORES
LUIS ALBERTO GONZÁLEZ ESQUIVEL
NORMA RAMÍREZ SALINAS
GABRIELA MOELLER CHAVEZ

1.ÍNDICE.....	i
2.RESUMEN EJECUTIVO.....	iv
3.OBJETIVOS.....	vi
4. ANTECEDENTES.....	1
5. METODOLOGÍA.....	2
5.1 Metodología de desarrollo e implementación para determinación de un grupo de Compuestos emergentes (8 fármacos).....	2
5.1.1 Metodología de la implementación para la determinación de fármacos en agua. .2	
5.1.2 Validación de la metodología de determinación de fármacos en agua.....	11
5.2 Metodología para el estudio de Caso de la realización y diagnóstico en la presa de Valle de Bravo en época de estiaje y lluvias de microcistina LR y Anatoxina.....	13
5.2.1 Zona de muestreo.....	14
5.2.2. Mediciones de campo y laboratorio.....	16
5.2.3 Validación del método de anatoxina-a.....	16
5.3 Metodología para desarrollar e implementar metodología por PCR punto final para PRESENCIA o AUSENCIA de cianobacterias.....	17
6. RESULTADOS.....	21
6.1 Resultados de desarrollo de implementación de metodología para un grupo de Compuestos emergentes (8 fármacos).....	21
6.2 Protocolo de desarrollo e implementación de metodología por PCR punto final para PRESENCIA o AUSENCIA de cianobacterias.....	22
6.3 Validación de Anatoxina-a.....	25
6.3.2 Resultados del muestreo y diagnóstico en la presa Valle de Bravo en época de estiaje y lluvias, de microcistina LR y Anatoxina.....	27
6.3.2.1 Resultados de mediciones de campo (pH, temperatura).....	28
6.3.2.2 Resultados de mediciones de laboratorio (color verdadero, color aparente, Nitratos, nitritos, nitrógeno total Kjeldahl, clorofila a.....	29
6.3.2.3 Resultados de microcistina LR en agua superficial.....	35
6.3.2.4 Resultados de microcistina LR con red de plancton.....	36
6.3.2.5 Discusión de resultados.....	38
7. CONCLUSIONES.....	40
8. BIBLIOGRAFÍA.....	42
9. ANEXOS.....	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cromatograma Modo Scan de ocho fármacos.....	3
Figura 2. Cromatograma Modo SIS de ocho fármacos.....	4
Figura 3. Método CG/MS.....	5
Figura 4. Relación Split.....	6
Figura 5. Rampeo de temperaturas.....	7
Figura 6. Método de espectrómetro de masas.....	8
Figura 7. Cromatograma de curva de calibración.....	9
Figura 8. Espectrograma de curva de calibración.....	10
Figura 9. Localización de sitios de muestreo en Valle de Bravo.....	15
Figura 10. Microscopía de UTEX 2576 Anabaena sp.....	18
Figura 11. Microscopía de las cianobacterias Nostoc sp UTEX 210.....	19
Figura 12. Microscopía de las cianobacterias microcystis aeruginosa UTEX LB 2385...20	
Figura 13. Reacción de amplificación del primer rpoC3.....	24
Figura 14 Linealidad de Anatoxina-a.....	25
Figura 15. Dispersión de datos precisión.....	27
Figura 16. Valores de color verdadero de las distintas estaciones	28
Figura 17. Valores de color aparente de los sitios monitoreados.....	29
Figura 18. Concentración de nitratos en la presa Valle de Bravo.....	30
Figura 19. Valores de nitritos en la presa de Valle de Bravo.....	31
Figura 20. Concentraciones de nitrógeno total Kjeldahl.....	32
Figura 21. Valores de Fosfatos totales.....	33
Figura 22. Concentraciones de Clorofila a de la Presa de Valle de Bravo.....	34
Figura 23. Valores de microcistina LR en agua superficial.....	35
Figura 23. Análisis de microcistina LR a 50 cm de profundidad.....	36

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones instrumentales de Cromatografo de líquidos de ultra alta resolución.....	14
Tabla 2. Coordenadas de Valle de Bravo.....	15
Tabla 3. Resultados de validación.....	21
Tabla 4. Precisión método de anatoxina-a	26
Tabla 5. Exactitud del método.....	27
Tabla 6. Valores promedio de nutrientes en la presa Valle de Bravo (1999-2013)...	38

2. RESUMEN EJECUTIVO

La actividad que diariamente desarrollamos como sociedad implica que generamos alteraciones sobre nuestro entorno y el medio ambiente. Así, actividades tan comunes como la higiene personal o el cuidado de la salud pueden generar serios problemas en el ecosistema, dado que incorporamos a éste una serie de sustancias de diferente origen y naturaleza química, de los cuales se sabe relativamente poco respecto de su impacto en los distintos compartimentos ambientales y en el ser humano, sustancias que los investigadores han dado en denominar contaminantes emergentes.

Dentro de estos contaminantes están los productos farmacéuticos (antibióticos, antidepresivos, hormonas, etc.) y sus subproductos (metabolitos), un tema interesante de estudiar considerando que, a nivel internacional, las investigaciones en este campo se vienen desarrollando hace ya 20 años; y si bien no se trata de compuestos persistentes, su constante utilización y vertimiento los hacen estar presentes en nuestro entorno. La principal fuente de ingreso al ecosistema de este tipo de compuestos son las descargas de aguas servidas no tratadas y los efluentes de las plantas de tratamiento de esta agua; y en lo que respecta a la presencia de productos y subproductos farmacéuticos en agua para consumo humano, existe ciertamente un riesgo menor para la población, que debe ser estudiado. Actualmente las plantas de tratamiento, ya sea de agua para consumo humano como las de aguas servidas, no están diseñadas para tratar y eliminar productos y subproductos farmacéuticos, por lo que conocer de su presencia en nuestro entorno es fundamental.

Por otra parte tenemos también los contaminantes naturales que también son emergentes y estamos hablando de la problemática derivada de los florecimientos algales los cuales por el tipo de alga pueden generar una toxicidad al agua, creando la necesidad de contar con métodos que identifiquen y cuantifiquen las toxinas generadas, de atención son la microcistinas.

Estas toxinas generan problemas en las plantas tratadoras de agua potable, ya que el agua suministrada puede contenerlas al ser el cuerpo de agua una fuente de abastecimiento para las plantas potabilizadoras.

Estas toxinas han resultado ser potentes promotores de tumores hepáticos y por tanto de la aparición de especies potencialmente productoras en nuestros ambientes acuáticos por lo cual es importante tener conocimiento de su presencia para aplicar un método de tratamiento para su eliminación.

En México existen pocos trabajos de investigación al respecto por lo que el Instituto Mexicano de Tecnología del Agua se ha dado a la tarea de investigaciones tanto de implementación de metodologías para la determinación de compuestos emergentes como la aplicación de estos métodos implementados en cuerpos de agua superficiales y plantas

de tratamiento de agua residual, como es el caso del presente trabajo de investigación el cual consiste, en la implementación de metodologías de: fármacos en agua por cromatografía gases espectrometría de masas, desarrollar e implementar metodología por PCR punto final para PRESENCIA o AUSENCIA de cianobacterias.

El proyecto de investigación presente tiene además la aplicación de la metodología de análisis de microcistinas que anteriormente se desarrollaron. Siendo importante el desarrollo de la aplicación específicamente en la Presa de Valle de Bravo la cual abastece de agua a la ciudad de México.

3. OBJETIVOS

1. Desarrollo e implementación de metodologías para la determinación de un grupo de compuestos emergentes.
2. Realizar muestreo y diagnóstico en la presa Valle de Bravo en época de estiaje y lluvias, de microcistina LR y Anatoxina.
3. Desarrollar e implementar metodología por PCR punto final para PRESENCIA o AUSENCIA de cianobacterias.

4. ANTECEDENTES

Las floraciones de cianobacterias se están convirtiendo en un problema primordial en la calidad del agua en muchos países del mundo, debido a la producción de cianotoxinas, con actividad hepatotóxica y neurotóxica, que las convierten en un riesgo para la salud pública. Entre ellas las microcistinas son las toxinas más frecuentemente detectadas en aguas superficiales.

Las microcistinas, heptapéptidos producidos por diversas especies de cianobacterias, se han convertido en las últimas décadas en una preocupación creciente para la salud humana; debido a su elevada toxicidad, por ello resulta necesario cuantificar las aguas crudas de captación y aguas potabilizadas, tanto a la salida de la planta como en las redes de distribución.

Las floraciones de cianobacterias se producen en aguas eutróficas, es decir que poseen un elevado nivel de nutrientes, debido a causas naturales o, más frecuentemente debido a factores antropogénicos tales como aguas cloacales tratadas insuficientemente, presencia de residuos agrícolas, abonos y otros desechos de industrias de ganado (Briand et al., 2003)

De acuerdo a Falconer (1999), las toxinas producidas por cianobacterias se dividen en neurotoxinas; dermatotoxinas y hepatotoxinas, conforme sus efectos tóxicos en mamíferos. Las especies ya identificadas como productoras de hepatotoxinas están incluidas en los géneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Oscillatoria*, *Nostoc* y *Cylindrospermopsis* (Carmichael, W. W. 1994). La especie *Microcystis aeruginosa* está considerada como de más amplia distribución en territorio nacional y la *Anabaena*, el género con mayor número de especies potencialmente tóxicas, conforme Carmichael, W.W (1994). El tipo más común de intoxicación involucrando cianobacterias se ocasiona por hepatotoxinas (Chrorus I., et. al., 1999), destacándose las microcistinas (LR, YR y RR) las cuales pueden causar severos daños al hígado, Nishiwaki, et al., (1992). En 1997, la Organización Mundial de la Salud (OMS), estableció como valor provisional de referencia, 1 ug L-1 como nivel máximo aceptable para el consumo oral diario de Microcistina-LR, en aguas de abastecimiento público.

En nuestro país un embalse afectado por la eutroficación es la presa de Valle de Bravo del Estado de México, que desde 1992 a 1993, se detectaron altas concentraciones de nitrógeno y fósforo, pH básico con valores de hasta 9.4 y temperatura del agua entre 20-25°C, condiciones que hacen posible la presencia de florecimientos cianobacterianos.

5. METODOLOGÍA

5.1 Metodología de desarrollo e implementación para la determinación de un grupo de compuestos emergentes (8 fármacos).

En el presente proyecto la metodología se divide en dos vertientes, que son la metodología a seguir el desarrollo e implementación para la determinación de un grupo de compuestos emergentes (8 fármacos) en agua y la metodología seguida para la realización y diagnóstico en la presa de Valle de Bravo en época de estiaje y lluvias de microcistina LR y Anatoxina.

5.1.1 Metodología de la implementación para la determinación de fármacos en agua. Para cumplir con este punto se siguieron los siguientes pasos.

a) Se realizó una búsqueda bibliográfica de metodologías para determinar un grupo de compuestos emergentes específicamente fármacos, los cuales se puedan determinar por cromatografía de gases o cromatografía de líquidos.

b) Revisión de material bibliográfico. Durante la revisión del material bibliográfico se encontró un artículo para la determinación de 60 compuestos farmacéuticos en agua, que comprenden: analgésicos, antiflogísticos, antirreumáticos, β -bloqueadores, broncolíticos, agentes para disminuir los lípidos, antiepilépticos, vasodilatadores, tranquilizantes, drogas antineoplásicas, medios de contraste iodados para rayos X, y antibióticos de diferentes clases principalmente sulfonamidas, macrolidas y penicilinas. Estos fármacos están agrupados de acuerdo con el método analítico usado para su determinación siendo seis grupos en total.

c) Selección de metodologías a implementar. De los seis grupos se seleccionó el primer grupo de fármacos los cuales incluyen analgésicos, antipiréticos, antiflogísticos o antirreumático, agentes que disminuyen los lípidos, antiepilépticos y antidepresivos, vasodilatadores y tranquilizantes. La metodología seleccionada para su implementación es la cromatografía de gases con espectroscopia de masas.

d) Identificación y selección de equipo, materiales y reactivos para la implementación de las metodologías. Para dar cumplimiento a este punto, se revisó con que cuenta el laboratorio, equipo de medición, sistema de extracción en fase sólida, tipo de cartuchos requeridos para la implementación, etc., que esté de acuerdo con la metodología analítica seleccionada en el punto anterior.

Una vez seleccionado el método de análisis se identificó y selecciono el equipo, materiales y reactivos para su implementación.

e) Adquisición de materiales y reactivos.

Se realizaron las requisiciones correspondientes para la adquisición de los cartuchos de extracción en fases sólida, estándares, reactivos (derivatizantes y disolventes) para llevar a cabo la implementación.

d) Desarrollo e implementación de las metodologías para fármacos en agua.

El desarrollo consistió en preparar soluciones estándar de cada fármaco de una concentración de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ para cada uno. Posteriormente se inyectaron en el Cromatografo de gases masas uno por uno. Cabe señalar que al Cromatografo previamente se le dieron las condiciones cromatográficas de la bibliografía referenciada con el objeto de confirmar los tiempos de retención de cada compuesto, así como determinar visualmente su respuesta en modo SCAN.

Una vez obtenido el cromatograma de cada compuesto, se prepara una mezcla de los fármacos de concentración de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ y se inyecta al cromatografo en modo SCAN con las condiciones de la referencia, si no se obtiene respuesta se modifican las condiciones para tener picos bien resueltos.

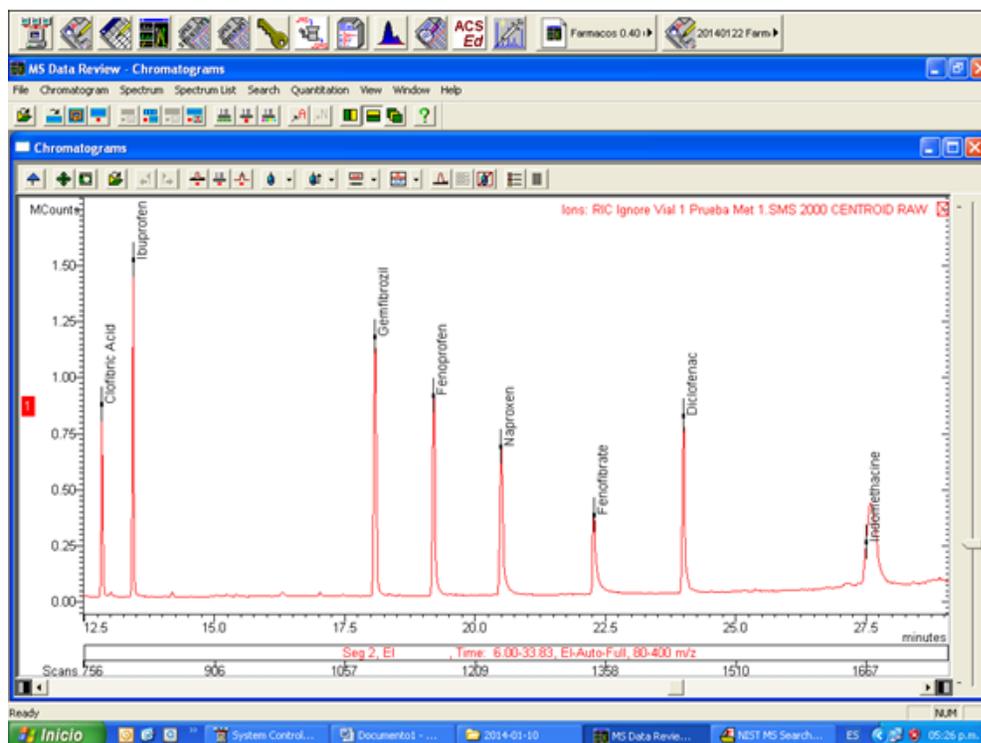


Figura 1. Cromatograma Modo Scan de ocho fármacos.

Una vez que se tienen las condiciones óptimas, se cambia al modo de monitoreo de ion selectivo para aumentar la sensibilidad y alcanzar límites de detección y cuantificación del orden de nanogramos generándose el cromatograma siguiente.

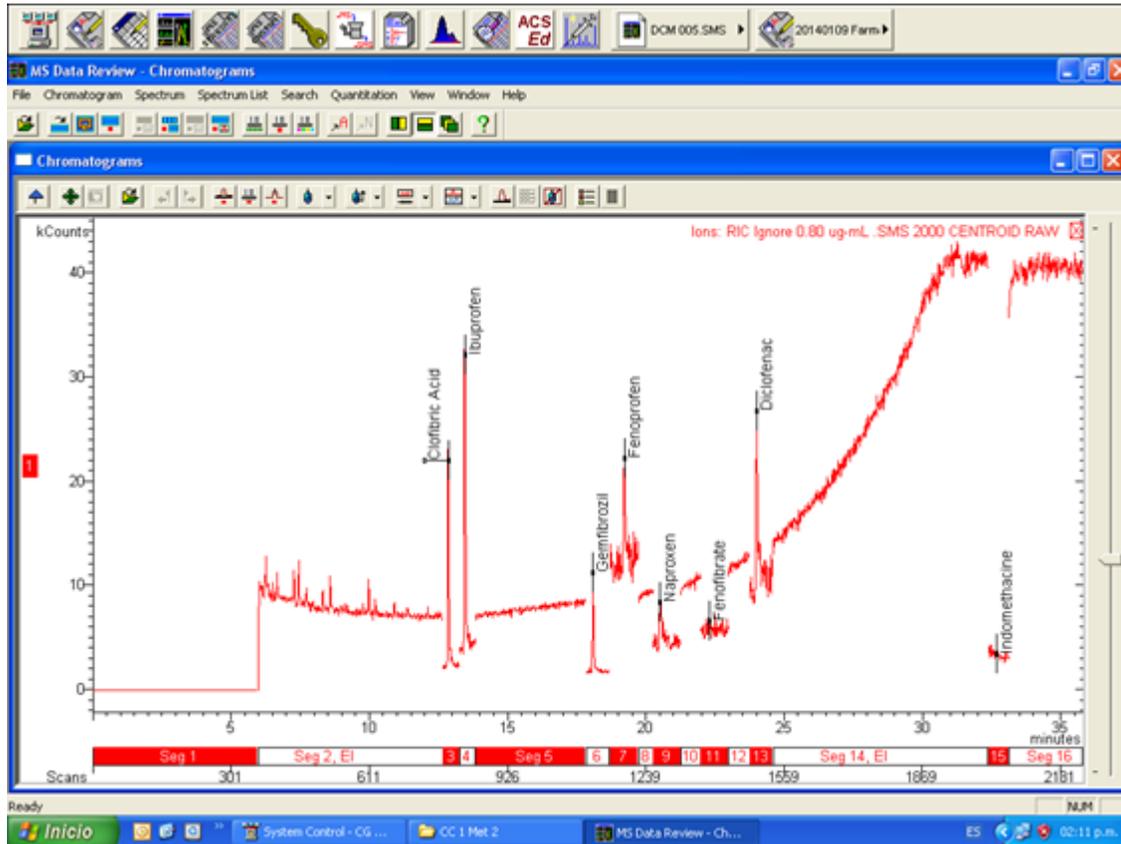


Figura 2. Cromatograma Método SIS

El método cromatográfico y de masas se presenta en la siguiente figura 3.

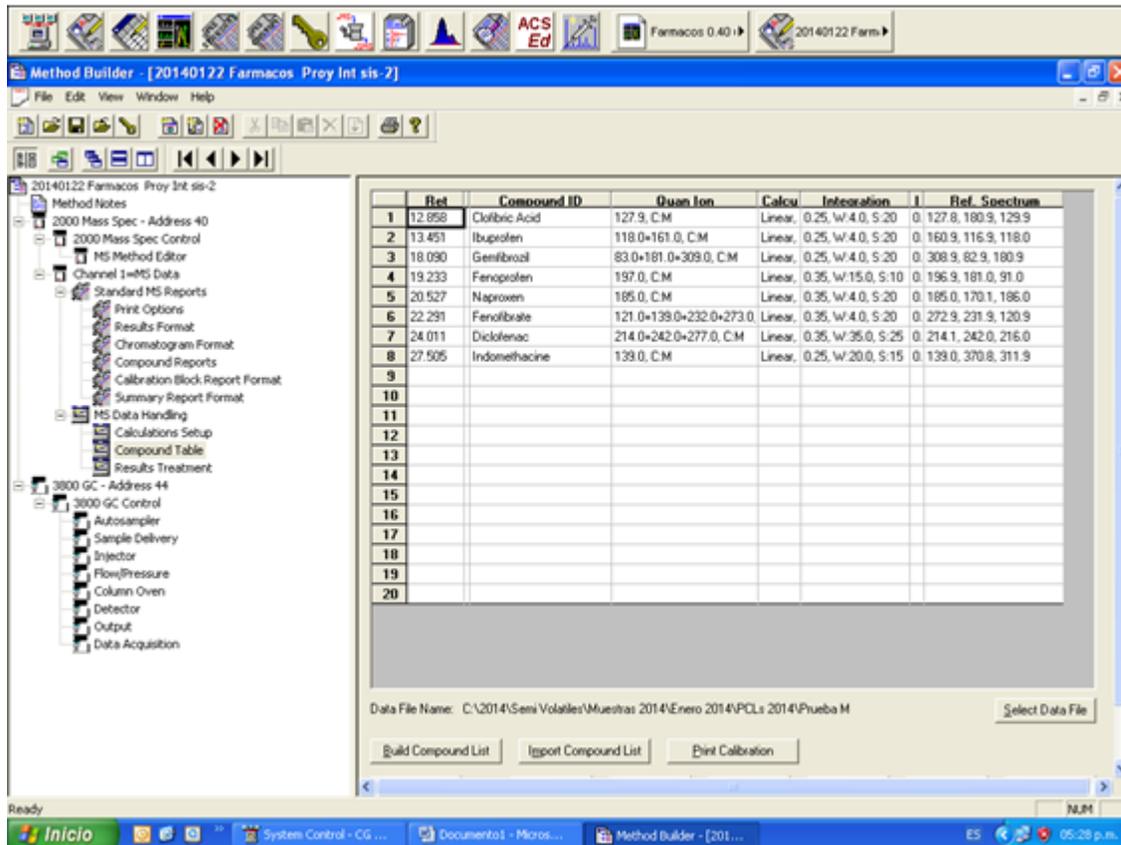


Figura 3. Método CG/MS

La relación de analito a inyectar se presenta a continuación.

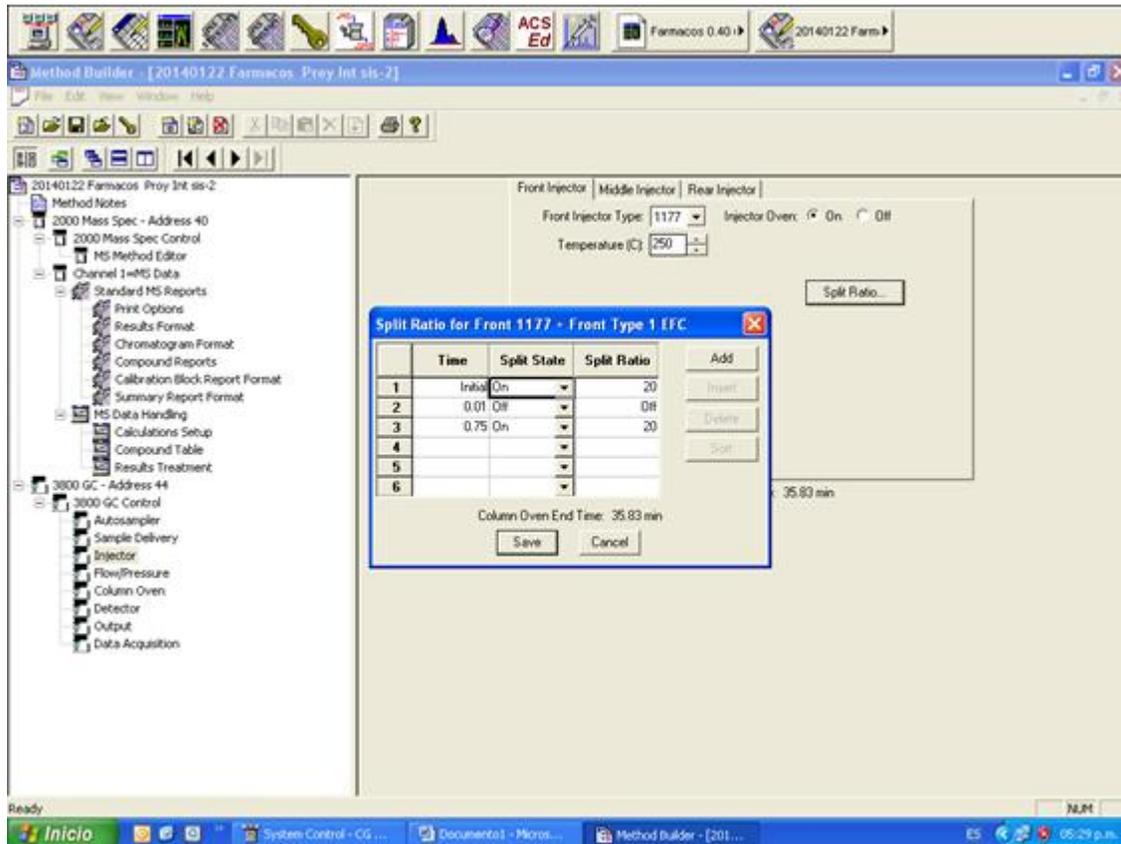


Figura 4. Relación Split

Las condiciones de temperaturas del horno del Cromatografo se establecen en la figura 5.

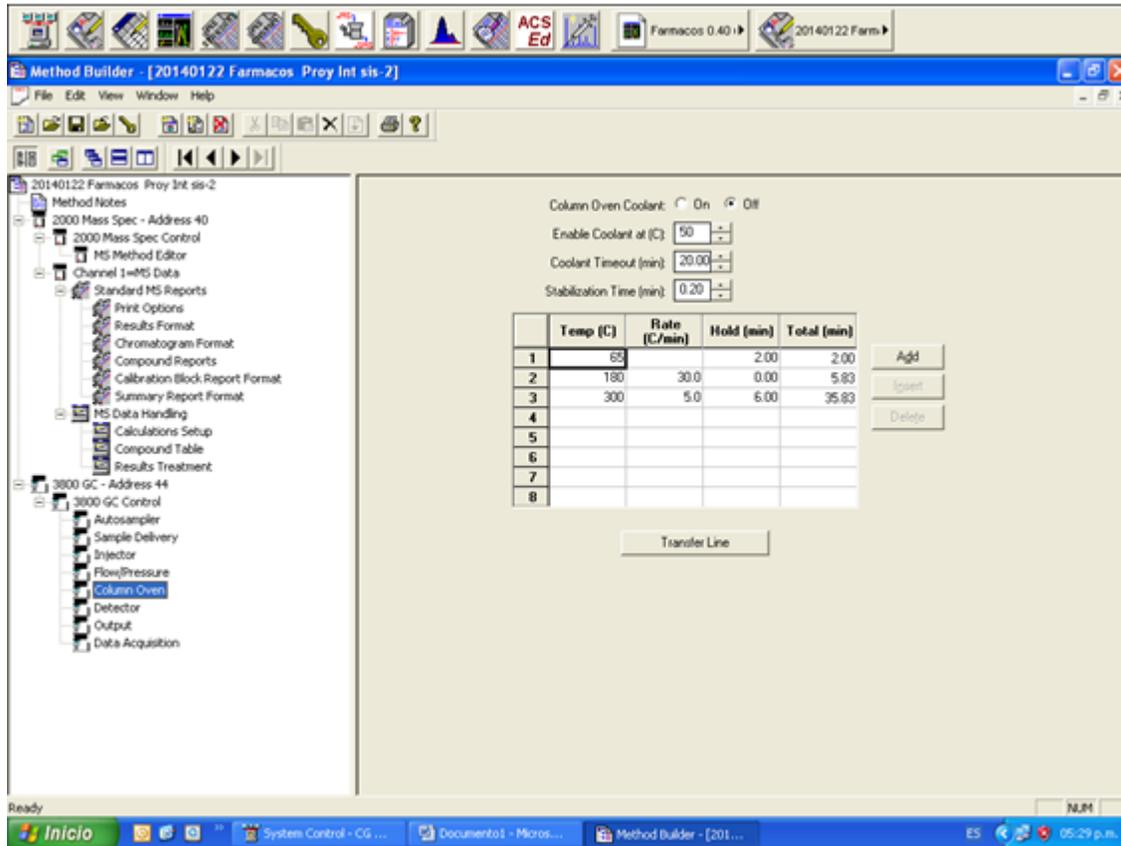


Figura 5. Rampeo de Temperatura

El método del espectrómetro de masas se presenta a continuación en la siguiente figura 6.

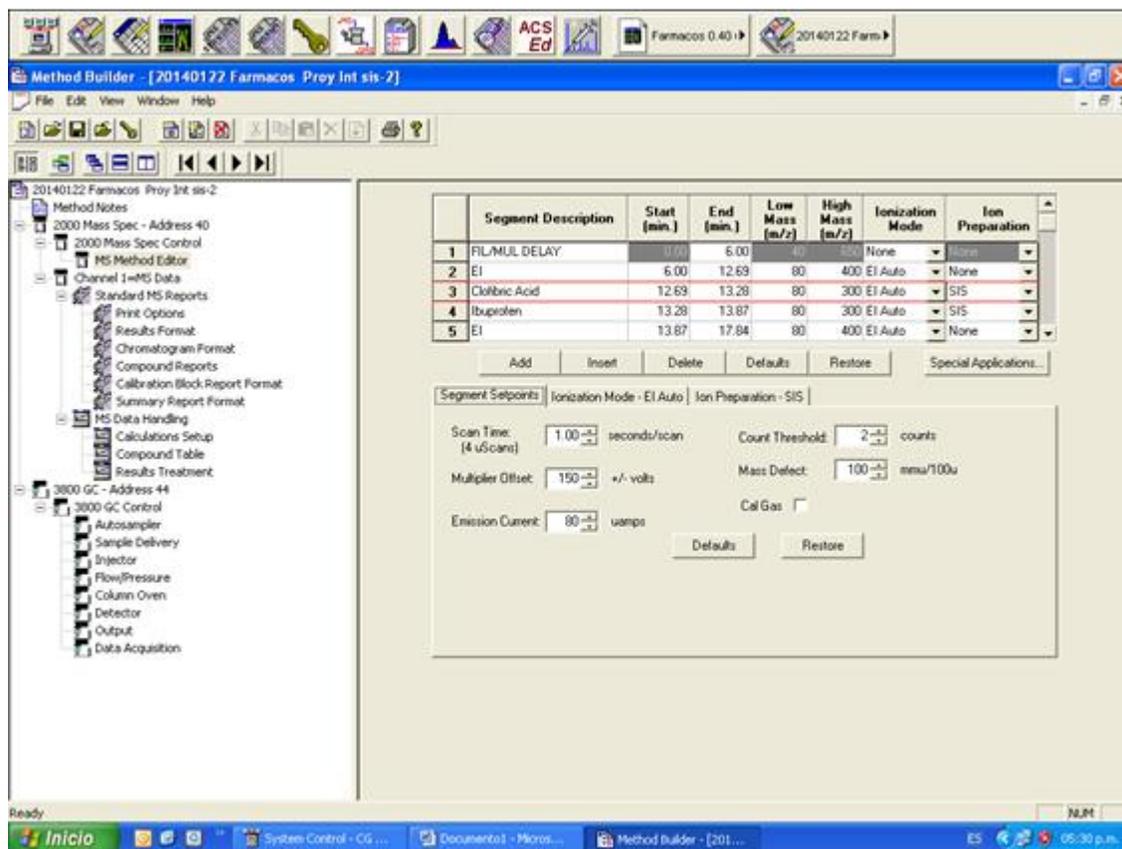


Figura 6. Método del espectrómetro de masas

Posteriormente se prepara una curva de calibración en el intervalo de 0.01 -0.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y se inyecta al cromatografo, se determinan los parámetros de la regresión lineal, los valores deben ser de pendiente cercana a la unidad, ordenada al origen cercana a cero y un coeficiente de correlación de 0.99 o mayor.

El gráfico cromatográfico se presenta en la figura 7.

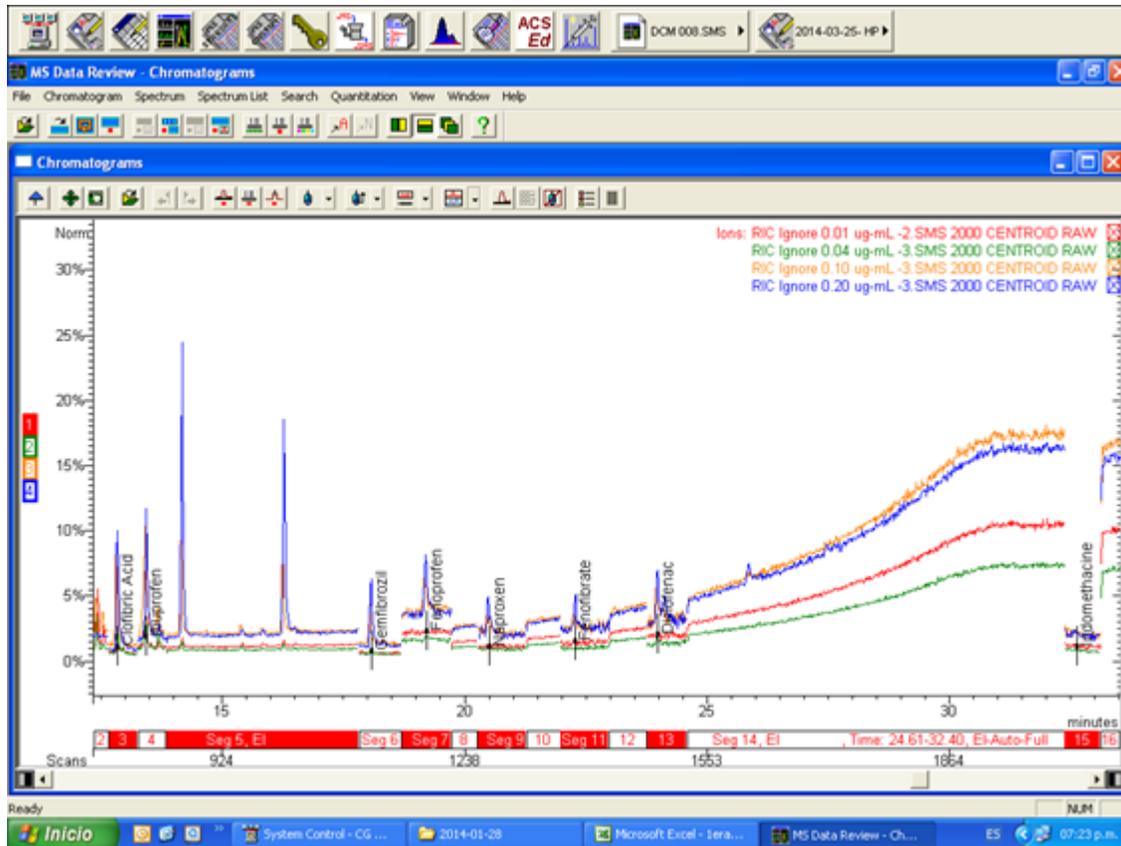


Figura 7. Cromatograma de curva de calibración

El espectrograma asociado a la curva de calibración se presenta en la figura 8.

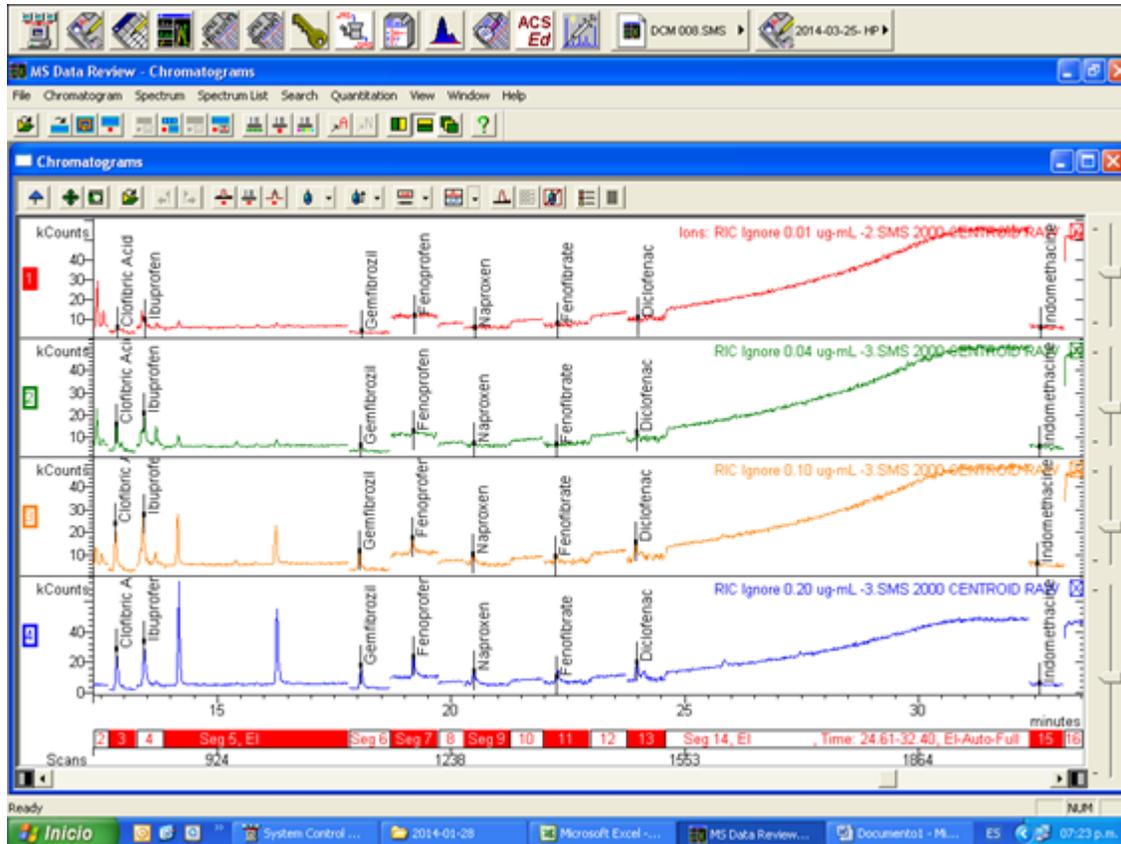


Figura 8. Espectrograma de la curva de calibración

Datos de la curva de calibración

Compuesto	µg-mL	µg-mL	µg-mL	µg-mL	µg-mL	µg-mL
Clofibric Acid	0.0105	0.0210	0.0420	0.0840	0.1050	0.2100
Ibuprofen	0.0105	0.0210	0.0419	0.0838	0.1048	0.2096
Gemfibrozil	0.0101	0.0201	0.0403	0.0806	0.1007	0.2014
Fenoprofen	0.0124	0.0247	0.0494	0.0988	0.1235	0.2470
Naproxen	0.0102	0.0203	0.0406	0.0813	0.1016	0.2032
Fenofibrate	0.0105	0.0209	0.0418	0.0836	0.1045	0.2090
Diclofenac	0.0133	0.0266	0.0532	0.1065	0.1331	0.2662
Indomethacine	0.0101	0.0202	0.0404	0.0807	0.1009	0.2018

Compound Name	Area	Area	Area	Area	Area	Area	b	M	r2
Clofibric Acid	4129	9518	17022	31524	39242	79007	901.24	370443.48	0.9994
Ibuprofen	9302	15267	23021	41180	46869	86495	6902.79	383200.32	0.9980
Gemfibrozil	4393	6990	10767	17470	21920	42807	2423.33	198183.82	0.9982
Fenoprofen	1834	3259	6158	10114	12630	24263	966.61	94392.02	0.9988
Naproxen	1187	1859	3357	5924	7552	13970	587.64	66323.67	0.9993
Fenofibrate	586	1114	1595	3330	3887	6967	399.48	32072.50	0.9948
Diclofenac	966	1883	3148	5510	7125	13517	452.82	49139.48	0.9992
Indomethacine	159	276	420	777	905	1678	108.42	7850.36	0.9985

Ya optimizado el método cromatográfico, se procede a implementar la metodología de extracción en fase sólida la cual consiste en:

Preparar una solución de concentración media a la de la curva de calibración y se hace pasar por el cartucho de extracción, el cual ha sido previamente activado y está listo para retener los compuestos de interés. Posteriormente se eluye, se concentra, derivatiza y se inyecta al Cromatografo de gases masas. Se determina el porcentaje de recuperación de la solución extraída y eluida. Si el porcentaje es superior al 80 % se acepta.

5.1.2 Validación de las metodologías.

Para cumplir con este punto, se preparan dos curvas más y se determina la linealidad.

Curvas de calibración de ocho compuestos emergentes

Compuesto	µg-mL	µg-mL	µg-mL	µg-mL	µg-mL	µg-mL
Clofibric Acid	0.0105	0.0210	0.0420	0.0840	0.1050	0.2100
Ibuprofen	0.0105	0.0210	0.0419	0.0838	0.1048	0.2096
Gemfibrozil	0.0101	0.0201	0.0403	0.0806	0.1007	0.2014
Fenoprofen	0.0124	0.0247	0.0494	0.0988	0.1235	0.2470
Naproxen	0.0102	0.0203	0.0406	0.0813	0.1016	0.2032
Fenofibrate	0.0105	0.0209	0.0418	0.0836	0.1045	0.2090
Diclofenac	0.0133	0.0266	0.0532	0.1065	0.1331	0.2662
Indomethacine	0.0101	0.0202	0.0404	0.0807	0.1009	0.2018

Compound Name	Area	Area	Area	Area	Area	Area	b	M	r2
Clofibric Acid	4146	9128	17068	31104	39390	79774	577.09	374915.25	0.9993
Ibuprofen	8654	15206	22967	40200	46756	87818	6192.70	391104.36	0.9987
Gemfibrozil	4162	6982	10679	17537	22055	42739	2349.52	198735.32	0.9985
Fenoprofen	1836	3239	6100	10391	12618	24325	972.58	9477+-	0.9991
Naproxen	1189	1829	3272	5908	7574	13926	564.09	66302.39	0.9991
Fenofibrate	553	1083	1607	3215	3869	6975	359.67	32204.15	0.9967
Diclofenac	941	1852	3174	5553	7130	13535	443.64	49291.56	0.9992
Indomethacine	150	280	420	781	918	1716	100.21	8069.00	0.9986

	µg-mL	µg-mL	µg-mL	µg-mL	µg-mL	µg-mL
Clofibric Acid	0.0105	0.0210	0.0420	0.0840	0.1050	0.2100
Ibuprofen	0.0105	0.0210	0.0419	0.0838	0.1048	0.2096
Gemfibrozil	0.0101	0.0201	0.0403	0.0806	0.1007	0.2014
Fenoprofen	0.0124	0.0247	0.0494	0.0988	0.1235	0.2470
Naproxen	0.0102	0.0203	0.0406	0.0813	0.1016	0.2032
Fenofibrate	0.0105	0.0209	0.0418	0.0836	0.1045	0.2090
Diclofenac	0.0133	0.0266	0.0532	0.1065	0.1331	0.2662
Indomethacine	0.0101	0.0202	0.0404	0.0807	0.1009	0.2018

Compound Name	Area	Area	Area	Area	Area	Area	b	m	r2
Clofibric Acid	3991	9161	17070	32989	39600	79814	828.48	375987.49	0.9995
Ibuprofen	7652	15166	22772	41613	46048	89309	5595.27	400738.68	0.9967
Gemfibrozil	4237	6520	10463	16432	22212	42137	2138.42	196779.11	0.9969
Fenoprofen	1826	3187	6042	9805	12550	24301	845.91	94710.83	0.9986
Naproxen	999	1754	3242	5558	7527	13870	416.39	66604.63	0.9980
Fenofibrate	529	1041	1650	3078	3909	7066	312.24	32747.57	0.9980
Diclofenac	967	1817	3194	5682	7124	13517	469.70	49224.17	0.9995

Indomethacine 145 288 443 751 882 1740 94.42 8110.24 0.9980

Se determina también los parámetros de Límite de cuantificación, límite de detección, precisión y exactitud, para lo cual se preparan seis blancos y siete soluciones de la concentración más baja y se inyectan al cromatografo. Se analizan los resultados de estas pruebas y se determinan los límites.

Se genera la información y se elabora el procedimiento.

5.2 Metodología para el estudio de Caso de la realización y diagnóstico en la presa de Valle de Bravo en época de estiaje y lluvias de microcistina LR y Anatoxina

La metodología seguida para llevar a cabo este estudio consistió: primeramente en revisar estudios anteriores realizados en la Presa de Valle de Bravo y con base en ellos y en los vientos que corren en dicho cuerpo de agua, determinar los puntos de muestreo en la Presa y en caso necesario aumentar o disminuir el número de puntos de muestreo.

Para el desarrollo de este estudio se colectaron muestras de la Presa de Valle de Bravo durante los meses de julio a diciembre 2013 para determinar la presencia de Microcistina LR y Anatoxina-a, nutrientes y características fisicoquímicas del agua; las muestras se colectaron de dos vertientes: agua superficial de la Presa y mediante arrastre de una red de plancton de 70 μm durante 5 minutos a 50 cm de profundidad, a una velocidad aproximada de 5 Km h^{-1} .

La determinación de Microcistina LR y Anatoxina-a, se realizó con estándares de pureza 98% marca Sigma y Abraxis, Solventes (Metanol, Acetonitrilo) y Agua grado HPLC, Cartuchos C18 ec 3 mL/500 mg, Fase móvil: Acetonitrilo -Acido trifluoroacético (TFA) y Agua HPLC +TFA.

La determinación de la cianobacterias se desarrolló en un Cromatógrafo de Líquidos de alta resolución Shimadzu marca Nexera con detector arreglo de fotodiodos (PDA), mediante extracción en fase sólida con un método validado. Las condiciones cromatográficas se detallan en la tabla 1.

Tabla 1 Condiciones instrumentales

Parámetros Instrumentales	Condiciones Cianotoxinas	
	Microcistina LR	Anatoxina-a
Detector	Arreglo fotodiodos (PDA)	Fluorescencia
Elución	Isocrática	Isocrática
Flujo	1.0 ml min ⁻¹	0.5 ml min ⁻¹
Volumen inyección	15 µl	20 µl
Longitud de onda	238 nm	470 excitación 530 emisión
Columna Phenomenex	Luna C18, 5 µm	Luna C18, 5 µm
Temperatura columna	40°C	35°C

5.2.1 Zona de muestreo

La presa Valle de Bravo se encuentra en el municipio del mismo nombre, en el Estado de México, al oeste de la ciudad de Toluca a los 19°21'30" de latitud norte y 100°11'00" de longitud oeste, a una altitud de 1,830 msnm. El municipio tiene una extensión de 447.313 km² cuya cabecera municipal es la ciudad de Valle de Bravo, asentada a la orilla de la presa.

La presa inunda una superficie de 1,855 Ha, en la que la longitud máxima es de 7.3 km y su anchura máxima de 6.3 km, la profundidad máxima alcanza los 38.6 m y tiene una capacidad de almacenamiento de 335 x 10⁶ m³ por ello destaca como una de las Presas más importantes del Estado de México y del Sistema Cutzamala.

El embalse recibe a cinco tributarios: los ríos Amanalco y Molino, y los arroyos Santa Mónica, González y El Carrizal, abarcando una cuenca de captación de 546.9 km². A su vez, esta cuenca forma parte de la cuenca general de la Región Hidrológica del Río Balsas, que abarca una superficie total de 5,217.980 km².

La Presa de Valle de Bravo se ubica dentro de la región hidrológica del Río Balsas, cubre la porción sur del Estado de México y constituye la cuenca más grande que drena la entidad. La cuenca aporta volúmenes muy importantes de agua que al potabilizarse se destina al uso y consumo humano que abastece a la población del Distrito Federal.

Se realizaron seis muestreos en 16 sitios diferentes de la Presa de Valle de Bravo (Figura 9), las coordenadas de cada estación se presentan en la tabla 2.



Figura 9 Localización de los sitios de muestreo en Valle de Bravo

Tabla 2 Coordenadas Valle de Bravo

Embalse	Coordenadas	
	Latitud	Longitud
Velo de novia	14Q0379700	2120356
Izar	14Q0378183	2120536
Cerrito	14Q0377535	2121513
Obra de toma 1	14Q0376949	2122632
Obra de toma 2	14Q0376158	2124060
San Gaspar	14Q0377420	2124743
Santuario	14Q0378189	2124881
El Arco	14Q0380538	2125227
Tizates	14Q0380000	2123950
La Peña	14Q0379316	2123392
Coporito	14Q0381699	2121049
Sotabento	14Q0381916	2120895
Avandaro 1	14Q0381440	2120342
Avandaro 2	14Q0381117	2120459
Centro	14Q0379855	2121638
Los Pericos	14Q0380968	2122065

5.3 Determinaciones de campo y de laboratorio.

Considerando que el agua de la presa estudiada tiene un uso principal como fuente de abastecimiento de agua potable, y además existe pesca, se compararon los valores obtenidos con los establecidos en los criterios ecológicos de calidad del agua (CECA). Se realizaron las determinaciones de campo

- pH
- Temperatura

Determinación de análisis fisicoquímico:

- Nitrógeno orgánico
- Nitritos
- Nitratos
- Fosfatos
- Clorofila
- Color aparente y verdadero

5.4 Validación del método para Anatoxina-a

La validación es el proceso que establece, mediante pruebas de laboratorio, las características de desempeño de un método y satisfacen los requisitos para su aplicación analítica.

Se desarrolló un método para la detección y cuantificación de Anatoxina-a, con elución isocrática por cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia a 470 excitación y 530 emisión, mediante extracción en fase sólida (SPE) con cartuchos de extracción C18; la fase móvil fue una mezcla de acetonitrilo con . El método se validó en el rango de concentraciones de 1, 2, 4, 10 y 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ se evaluaron los parámetros de linealidad del sistema, exactitud y precisión expresada en sus formas de repetibilidad y precisión intermedia.

Linealidad del método es la relación entre la respuesta del instrumento y las concentraciones conocidas del analito. La curva de calibración se construyó con la relación de áreas de Anatoxina-a contra las concentraciones de analito. Se realizó el análisis de regresión lineal para determinar la linealidad del método así como para generar la ecuación (1).

$$y = mx + b \quad (1)$$

Donde y es la relación de área, x la concentración, m la pendiente y b el intercepto.

Exactitud. Se prepararon seis muestras por triplicado a la concentración baja, media y alta; se determinaron: el porcentaje de recuperación, la desviación estándar y coeficiente de variación.

Precisión. La precisión del método analítico describe la cercanía (grado de dispersión) entre una serie de medidas obtenidas de múltiples repeticiones de una muestra bajo las condiciones establecidas de análisis. Se realizó a través del modelo de repetibilidad de diez réplicas; se determinaron los valores medios, la desviación estándar y el coeficiente de variación. Este parámetro se determinó mediante los ensayos de repetibilidad y reproducibilidad.

Para el ensayo de la precisión intermedia se utilizaron 3 valores de concentración que correspondieron a valores bajos, medios y altos.

La determinación de los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) fue realizada en base a la desviación estándar de la respuesta del blanco y a la pendiente de la curva de linealidad.

Recuperación. La eficiencia del método de extracción se determinó como porcentaje de recuperación.

5.3 Metodología para desarrollar e implementar la metodología por PCR punto final para PRESENCIA o AUSENCIA de cianobacterias, consistió en:

a) Adquisición de cianobacterias

Se adquirieron tres cepas de cianobacterias de la Colección de la Universidad de Texas en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional: UTEX 2576 *Anabaena sp.*, UTEX 210 *Nostoc sp* y UTEX LB 2385 *Microcystis aeruginosa*. Fueron seleccionadas debido a su producción de toxinas como Anatoxina(s) y microcistinas.

b) Cultivo y morfología de las cianobacterias

Las cepas UTEX 2576 *Anabaena sp.* y UTEX 210 *Nostoc sp* fueron cultivadas en el medio BG-11 (-N) (<http://web.biosci.utexas.edu/utex/algaeDetail.aspx?algaeID=5058>). De los cultivos obtenidos, se revisó la estructura morfológica de *Anabaena sp.* (Fig. 10), *Nostoc sp* (Fig. 11) con microscopio óptico.



Fig. 10 Microscopía de UTEX 2576 *Anabaena sp.*

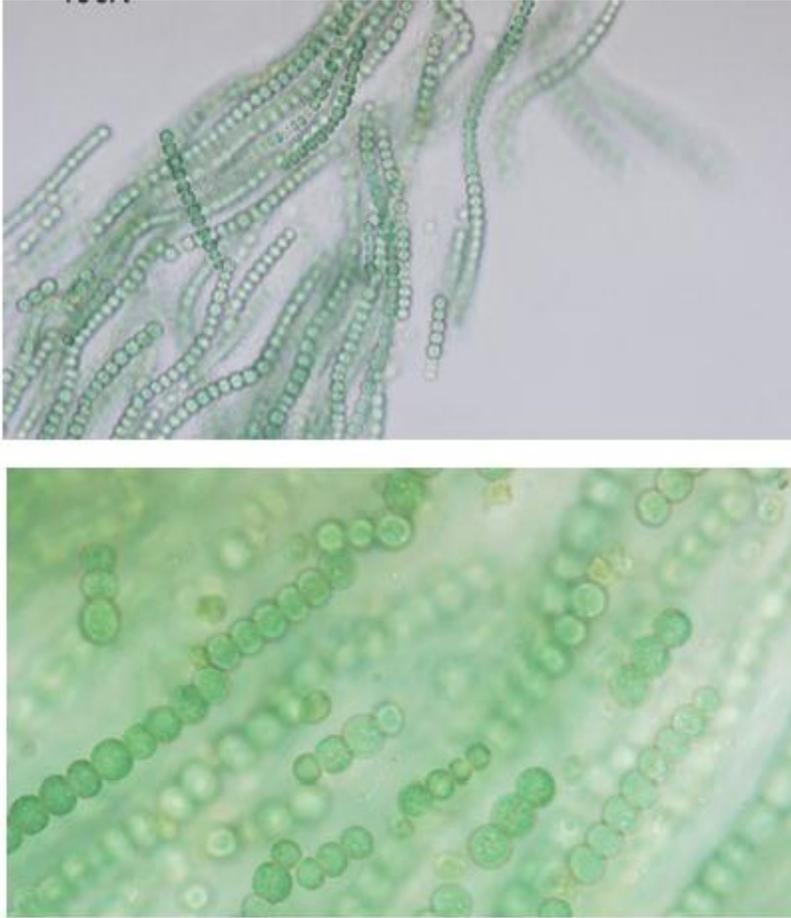


Fig.11 Microscopía de la cianobacterias *Nostoc sp* UTEX 210

La cepa UTEX LB 2385 *Microcystis aeruginosa*, fue cultivada en el medio BG-11 (-N). Una vez obtenida la masa algal se reviso su morfología mediante microscopía (Fig. 12).

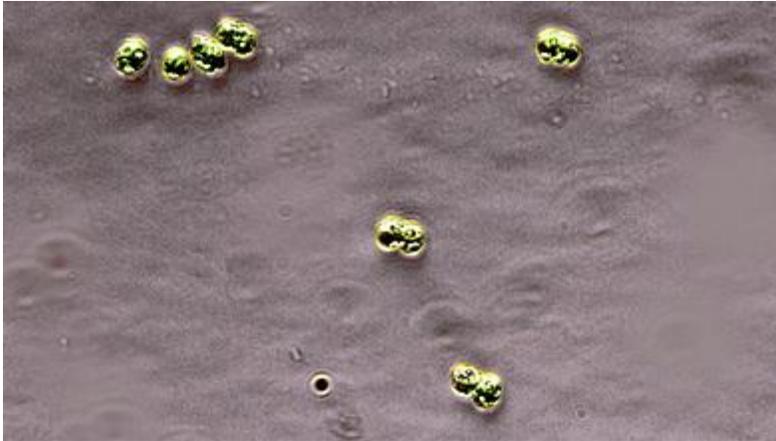


Fig. 12 Microscopía de la cianobacteria *Microcystis aeruginosa* UTEX LB 2385

c) Síntesis de primers

Una revisión bibliográfica (Wilson et al., 2000; Głowacka et al., 2011) permitió llevar a cabo la selección de los siguientes primers:

Nombre	Secuencia	Gen que amplifica	Referencia	Tipo primers	Tamaño del amplicón
<i>rpoC3</i>	CCCGCNAARGAYTGGAATG	Subunidad gamma de la RNA polimerasa	Acta Biochim Pol. 2011;58(3):3 21-333	Generales para cianobacterias	729 pb
<i>rpoC4</i>	GCTTCYTGCARCATCCGYTTYTC				

d) Protocolo para evaluar la sensibilidad de la prueba de detección de cianobacterias utilizando los oligonucleótidos *rpoC3* y *rpoC4*.

6. RESULTADOS

6.1. Desarrollo e implementación de metodologías para la determinación de un grupo de compuestos emergentes.

Para el caso de la implementación de la metodología de los ocho fármacos ácidos, se tienen los resultados obtenidos de la validación para cada uno de ellos y que se presentan en la siguiente tabla.

Resultado del desarrollo de la metodología para un grupo de Farmacos Acidos							
Compuesto	LDM	LCM	Exactitud	CV	m=	b=	r=
Acido Clofibrico	0.0006	0.0122	100.73	1.57	1.0084	-0.0003	0.9997
Diclofenaco	0.0027	0.0211	103.54	5.29	1.0008	0.0001	0.9996
Fenofibrato	0.0012	0.0141	105.72	2.8	1.0009	0.0002	0.9982
Fenoprofeno	0.002	0.0182	104.53	4.09	1.0013	-0.0003	0.9994
Gemfibrozil	0.0014	0.0136	99.11	3.66	0.9968	-0.0005	0.9989
Ibuprofeno	0.0025	0.0169	97.13	6.59	1.0002	0.0002	0.9987
Indometacina	0.001	0.0125	97.68	2.65	0.9912	0.0002	0.9990
Naproxeno	0.0024	0.0165	99.57	6.34	1.0007	-0.0006	0.9993

Tabla 3. Resultados de la validación de la metodología de ocho fármacos ácidos.

Donde:

LDM = LIMITE DE DETECCIÓN DEL MÉTODO

LCM = LIMITE DE CUANTIFICACIÓN DEL MÉTODO

EXACTITUD

COEFICIENTE DE VARIACIÓN

LINEALIDAD DEL SISTEMA:

m = pendiente

b = ordenada al origen

r = Coeficiente de correlación

Como resultado del análisis de la linealidad del método para cada uno de los fármacos, los ocho compuestos cumplen con los criterios de aceptación establecidos en el procedimiento CAGC7-06 con una pendiente de 0.99-1.00, una ordenada al origen de -0.0028 y un coeficiente de correlación de 0.997 lo que nos indica una muy buena relación lineal entre las concentraciones de sustancias activas al azul de metileno y las absorbancias obtenidas para cada nivel de concentración.

Por otra parte encontró un porcentaje de recobró en un intervalo de 91.5-107.6 con una exactitud del 97.13 – 105.72 % y un coeficiente de variación de 1.57 – 6.34% cumpliendo ampliamente con los criterios establecidos.

Como conclusión el método analítico desarrollado es altamente lineal, exacto, preciso en agua potable, residual con límites de detección y cuantificación aceptables de 0.6 – 2.5 ngL⁻¹ y 12.5 – 21.1 ngL⁻¹ para el conjunto de los ocho fármacos.

6.2 Protocolo para evaluar la sensibilidad de la prueba de detección de cianobacterias utilizando los oligonucleótidos *rpoC3* y *rpoC4*.

1. Se ajusta un cultivo de Cianobacterias a una densidad óptica de 0.100 a 600 nm, se asume que esta suspensión bacteriana tendrá una concentración de 1×10^8 ufc mL⁻¹.
2. Se prepara ocho diluciones decimales, cada una de 100 µL, usando como diluyente agua destilada estéril en tubos de 1.5 o 0.6 mL.
3. Se prepara una mezcla de reacción en un tubo de 0.6 mL, con los siguientes componentes:

Reactivo	Concentración del stock	Concentración en el tubo de reacción	Volumen para 1 reacción	Volumen para 10 reacciones
Master mix	2x	1x	5.0 µL	50 µL
Oligonucleótido <i>rpoC3</i>	5 µM	0.3 µM	0.6 µL	6 µL
Oligonucleótido <i>rpoC4</i>	5 µM	0.3 µM	0.6 µL	6 µL
ROX	50x	1x	0.2 µL	2 µL
Agua libre de nucleasas			1.6 µL	16 µL
Volumen final			8.0 µL	80 µL

4. Se seleccionan nueve posiciones de una placa de reacción, señalando en la tabla siguiente en qué posición se coloca cada muestra.

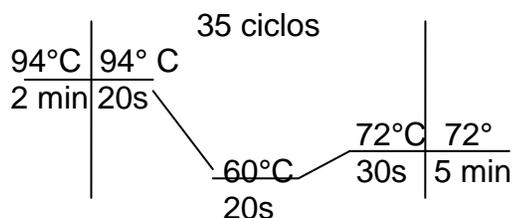
Posición	Muestra
A1	Sin diluir

B1	10^{-3}
C1	10^{-4}
D1	10^{-5}
E1	10^{-6}
F1	10^{-7}
G1	10^{-8}
H1	10^{-9}
A2	10^{-10}

5. En cada posición seleccionada, se colocan 2 μL de la muestra correspondiente. En la siguiente tabla se indica el número de bacterias que se asume que se tendrán en los 2 μL colocados:

Muestra	Cantidad aprox. de cianobacterias contenidas en 2 μL
Sin diluir	200,000
10^{-3}	200
10^{-4}	20
10^{-5}	2
10^{-6}	0.2
10^{-7}	0.02
10^{-8}	0.002
10^{-9}	0.0002
10^{-10}	0.00002

6. A cada posición se le adicionan 8 μL de la mezcla de reacción preparada en el punto 5. De esta manera, cada posición contendrá 10 μL .
7. Se corre la reacción utilizando el siguiente programa de PCR:



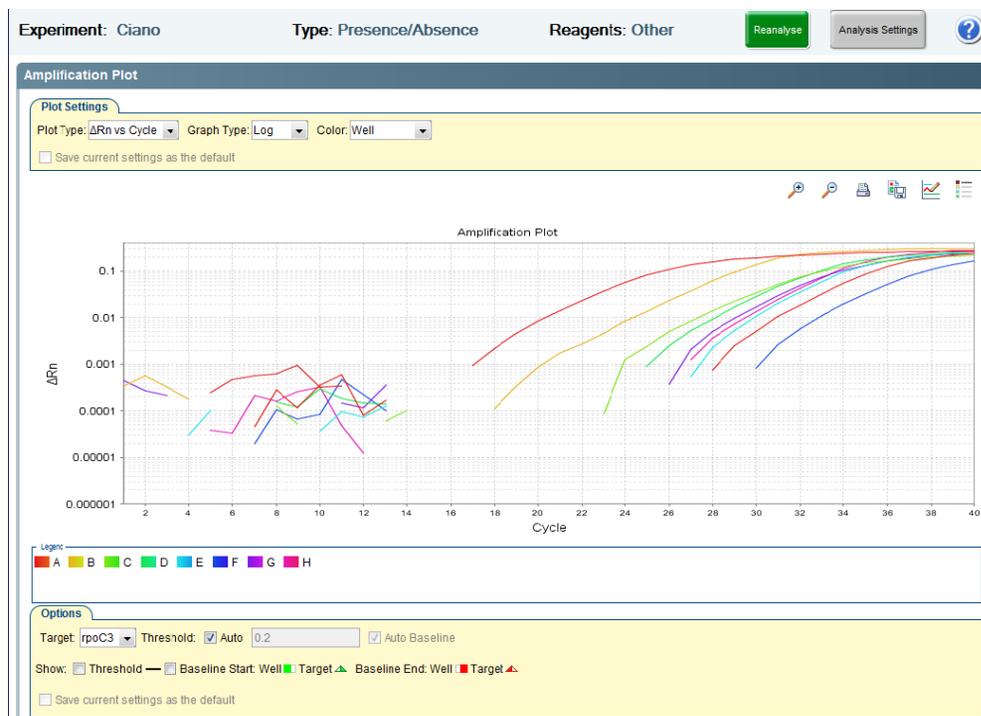


Fig. 13. Reacción de amplificación del primer *rpoC3*

8. Una vez realizada la reacción, en la Fig. 13 se muestra la reacción de amplificación del gen *rpoC3* de Anabaena, de esta reacción se corren las muestras en un gel de agarosa al 2% cargando 10 uL de cada una (8 μ L de la muestra y mezclados con 2 μ L de buffer de carga 6X), a 80 V, usando TAE 0.5X, tanto para preparar el gel como para correrlo. Se carga el marcador de peso molecular en el carril 1 (3 μ L). El gel se corre hasta que el frente de colorante llegue al final del gel.
9. Se tiñe el gel por 15 minutos con una solución de bromuro de etidio.
10. Se destiñe el gel por 15 minutos en agua de la llave (el bromuro inicial se recupera para reutilizarlo).
11. Se observa y se captura la imagen, buscando el amplicón de 729pb.
12. Se registra la cantidad mínima detectada de cianobacterias.

6.3 Validación de Anatoxina-a

Para calcular la linealidad se analizaron seis diluciones del estándar por triplicado, se demostró respuesta lineal en el rango de 1 a 20 μ g mL⁻¹ para Anatoxina-a; la curva de calibración se muestra en las figura 14. Como resultado del método analítico se obtuvieron valores de coeficiente de correlación (r) mayores a 0.99; la relación de área versus concentración, tiene una fuerte relación entre la respuesta del instrumento y las concentraciones de Anatoxina-a. El coeficiente de variación menor del 5% indica que el instrumento es preciso bajo las condiciones de análisis establecidas.

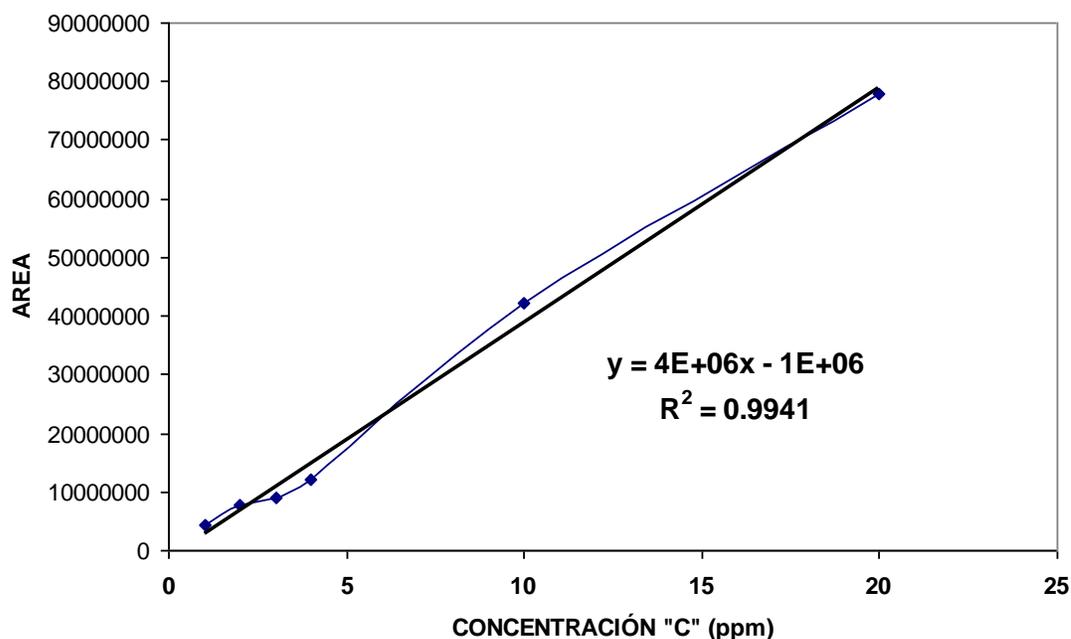


Figura 14 Linealidad de Anatoxina-a

Precisión. El estudio se realizó a través de repetibilidad del método preparando diez réplicas de concentración de 1, 4 y 10 $\mu\text{g L}^{-1}$; en la tabla 4 y figura 15 se presentan coeficientes de variación menores al $< 2\%$ que indica una buena precisión del método de acuerdo al límite de los métodos cromatográficos (United States Pharmacopoeial Convention, USP 23-NF 17).

Tabla 4 Precisión método Anatoxina-a

Número Muestras	Concentración recuperada $\mu\text{g mL}^{-1}$		
1	1.09	3.47	19.28
2	1.09	3.47	19.22
3	1.09	3.46	19.21
.4	1.09	3.46	19.20
5	1.08	3.48	19.20
6	1.08	3.47	19.18
7	1.08	3.47	19.17
8	1.09	3.47	19.16
9	1.08	3.48	19.15
10	1.08	3.47	19.13
Promedio	1.09	3.47	19.19

Desv Estándar	0.00	0.01	0.04
CV %	0.28	0.16	0.23
Conc. teórica	1	4	20

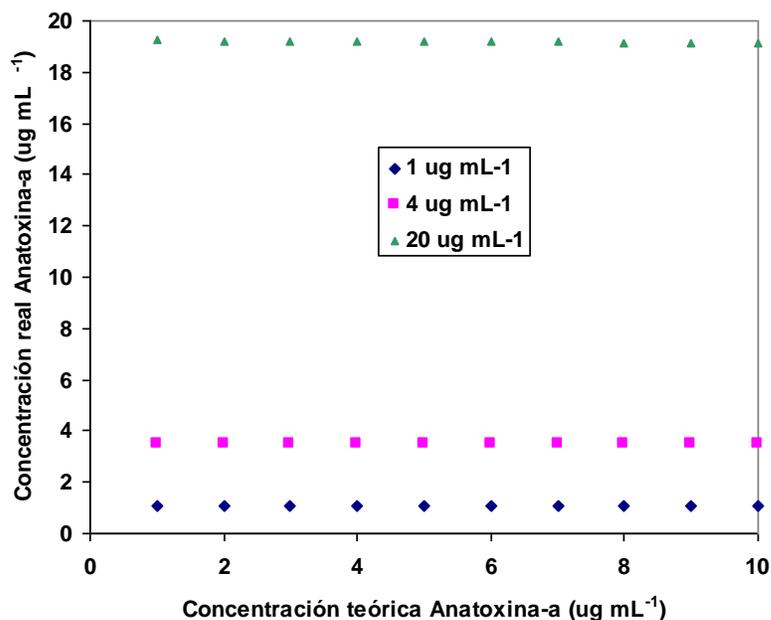


Figura 15. Dispersión datos precisión.

Exactitud. En el rango seleccionado en este estudio de exactitud se evaluó la eficiencia del método de extracción realizada con cartuchos C18. Se prepararon muestras con diferentes concentraciones de Anatoxina-a, los valores de porcentajes de recobro (tabla 5) estuvieron dentro de los límites 98-109% y los coeficientes de variación para cada uno de los niveles de concentración estudiados resultaron ser menor que el 2%.

Tabla 5. Exactitud del método

Concentración	Porcentaje de Recobro (%)					
1	108	107	105	105	109	109
4	98.6	100.2	101.6	99.6	99.4	100.6
20	99.2	98.1	100.5	100.1	98	97.9

La determinación del límite de detección y cuantificación se realizó en base a la desviación estándar de la respuesta del blanco y a la pendiente de la curva de linealidad, obteniéndose valores de $0.007 \mu\text{gL}^{-1}$ para el límite de detección y $1.10 \mu\text{gL}^{-1}$ para el límite de cuantificación.

6.3.2 Resultados del muestreo y diagnóstico en la presa Valle de Bravo en época de estiaje y lluvias, de microcistina LR y Anatoxina.

Con el fin de validar las metodologías de Microcistina LR y Anatoxina-a, previamente validadas, se analizaron los parámetros de campo (pH, temperatura), análisis fisicoquímicos (nitratos, nitritos, nitrógeno total Kjeldahl, fosfatos total, color aparente y color verdadero) en el diagnóstico de la Presa de Valle de Bravo.

6.3.2.1 Resultados de campo

Potencial de Hidrógeno (pH)

El pH tiende a presentar valores alcalinos alrededor de 9, debido a la fijación del dióxido de carbono atmosférico necesario para realizar la fotosíntesis, acidificándose conforme se incrementa la profundidad debido a los procesos reductivos que se llevan a cabo para la degradación de la materia orgánica.

Los criterios ecológicos de calidad del agua estipulan valores de pH entre 7 y 9 para considerarlas aptas para fuente de abastecimiento de agua potable, mientras que para que el agua sea adecuada para la protección de la vida acuática, estos mismos criterios señalan que no podrá haber variaciones mayores a 0.2 unidades tomando como base el valor natural.

El valor promedio de pH en la Presa se encuentra en el intervalo de 8.2 a 8.7 unidades. No rebasa el valor establecido como máximo por los criterios ecológicos de calidad del agua para fuentes de abastecimiento (5-9 unidades) aunque los valores de pH son ligeramente alcalinos.

Temperatura

Las temperaturas del agua en los distintos sitios de la Presa Valle de Bravo se mantuvieron prácticamente constantes en el rango de 20 a 22°C.

Olor

El olor es producido por compuestos orgánicos volátiles así como fitoplancton y plantas acuáticas, o bien, por materia orgánica en descomposición. Los residuos humanos e industriales también pueden provocar olores como resultado de la actividad biológica. Los compuestos orgánicos, químicos inorgánicos, aceites y grasas pueden impartir olor al agua, aunque el olor no es un indicador directo de la presencia de sustancias dañinas, usualmente la presencia de un olor sugiere una actividad biológica mayor a la normal. Durante el estudio en los muestreos se percibió olor en las muestras monitoreadas.

6.3.2.2 Resultados de mediciones de laboratorio

Color verdadero

Los valores de color verdadero de septiembre a noviembre se encontraron en el intervalo de 1 a 8 UPTCo a excepción de la estación Obra de Toma del mes de diciembre cuyo valor se incremento hasta 40 UPTCo. Este parámetro no tiene criterio ecológico.

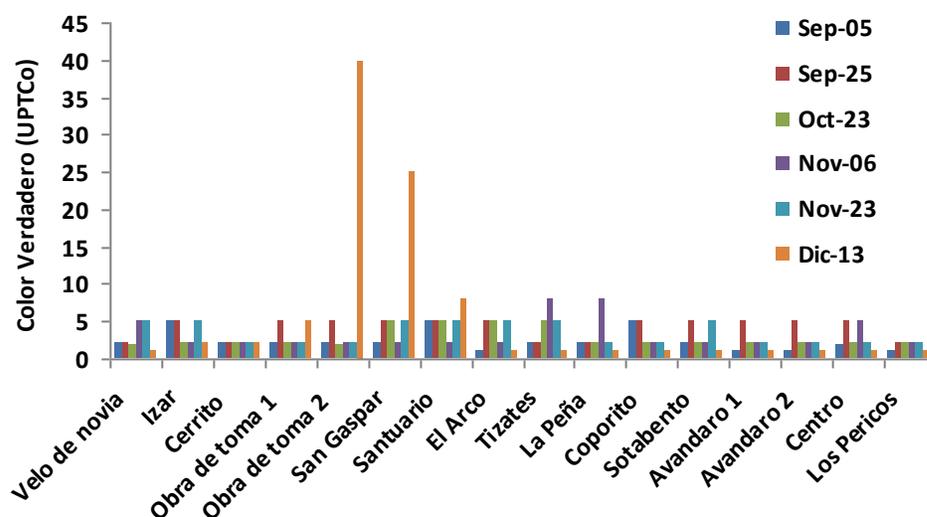


Figura 16. Valores de color verdadero de las distintas estaciones

Color aparente

El color aparente de los distintos puntos de monitoreo se determinaron en el rango de 2 a 8 UPtCo, con excepción de los sitios Izar, Santuario y Tizates con 10 UPtCo. No hay criterio ecológico para este parámetro.

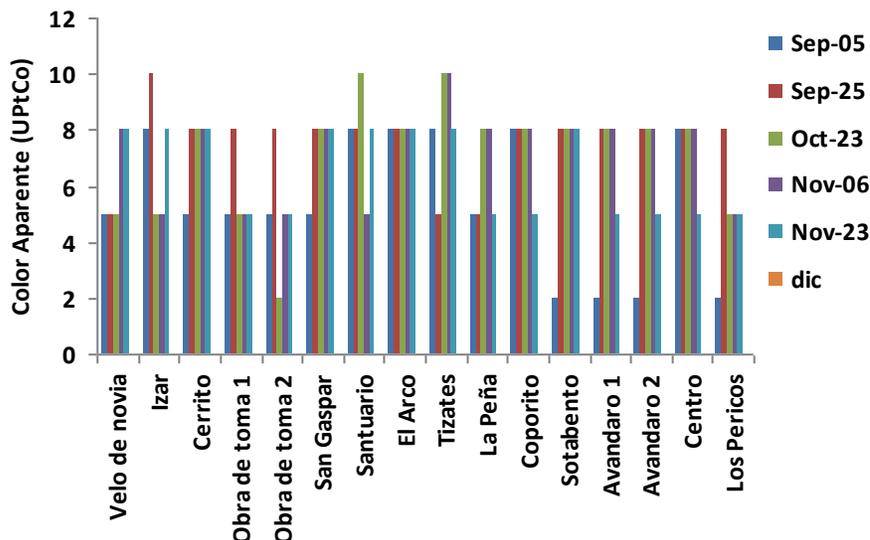


Figura 17. Valores de color aparente de los sitios monitoreados

Nitratos (NO_3^-)

Los nitratos son un elemento esencial para los organismos autótrofos fotosintéticos y se les considera con frecuencia como un nutriente limitante del crecimiento. Así como en el caso del fósforo, el exceso de nitrógeno en el agua lleva al rápido crecimiento de las plantas.

Debido a los suelos agrícolas su concentración puede llegar a centenares de miligramos por litro. Los criterios ecológicos de calidad del agua establecen una concentración máxima de 5 mgL^{-1} como adecuada para fuentes de abastecimiento de agua potable.

La concentración media los distintos muestreos, se registraron en el intervalo de 0.12 hasta 0.41 mg L^{-1} (Figura 18) se presentaron valores menores a los 5 mgL^{-1} , límite establecido por los Criterios Ecológicos de Calidad del Agua.

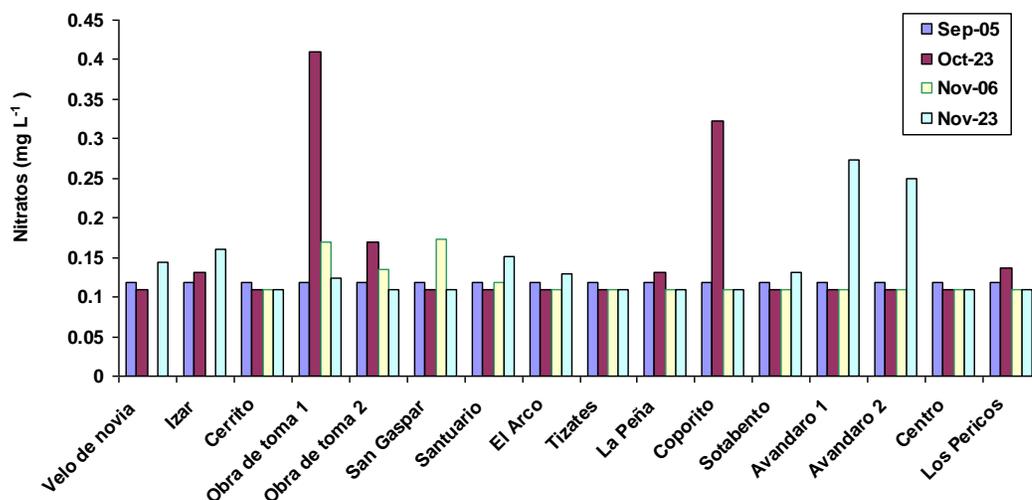


Figura 18. Concentraciones de nitratos en presa Valle de Bravo.

Nitritos (NO₂⁻)

El NO₂⁻ es un compuesto intermediario en la oxidación del nitrógeno amoniacal a nitratos, mientras que estos últimos son el producto final de la oxidación del amoniaco y del nitrógeno orgánico

Los niveles de nitritos expresados como NO₂ determinados en los diferentes puntos de muestreo son bajos 0.019 mg L⁻¹ Figura 19, los criterios ecológicos de calidad del agua establecen una concentración máxima permisible de 0.05 mg L⁻¹ para considerar a los cuerpos de agua como aptos para el abastecimiento de agua potable.

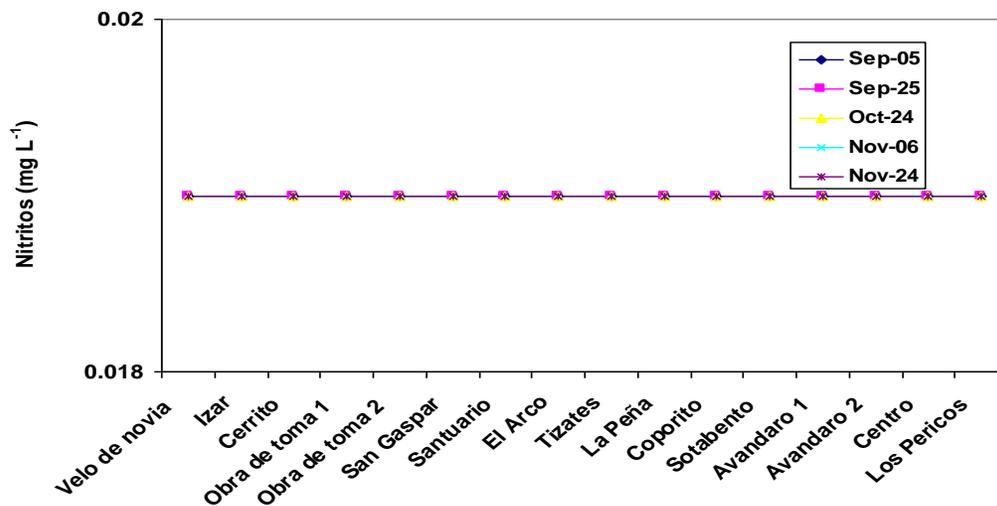


Figura 19. Valores de nitritos en la presa Valle de Bravo.

Nitrógeno total Kjeldahl (NTK)

El nitrógeno total Kjeldahl es la suma del nitrógeno amoniacal y nitrógeno orgánico. El nitrógeno orgánico se encuentra en las proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, urea y varios compuestos orgánicos. Está presente en desechos domésticos y agrícolas.

En la figura 20 se presenta el comportamiento de los distintos muestreos; en el segundo muestreo del mes de septiembre se determinaron valores altos en los sitios de muestreo de Tizates 14.3, La Peña 30.8 y Coporito 75.7 mg L⁻¹; durante los seis muestreos la concentración de nitrógeno total Kjeldahl en la zona de Santuario se registro en el rango de 1.34 a 5.46. En el muestreo del mes de diciembre el nitrógeno total Kjeldahl incremento su concentración en los sitios de Compuerta 2, San Gaspar y Santuario sus valores son, 38.4, 33.2 y 12.7 mg L⁻¹ respectivamente; en la figura 20 se muestra el comportamiento de los diferentes muestreos. Los criterios ecológicos de calidad del agua no establecen límites para este componente. Sin embargo, Castro, 1988 y Clesceri, et al., 1989, consideran que el contenido de NTK en aguas naturales no contaminadas es de 0.1 mg/l; mientras que Mason (1991), Vollenweider y Kerekes (1981) y Wood (1975), proponen concentraciones límites de 0.5, 0.66 y 0.1 mgL⁻¹, para considerar un agua de buena calidad.

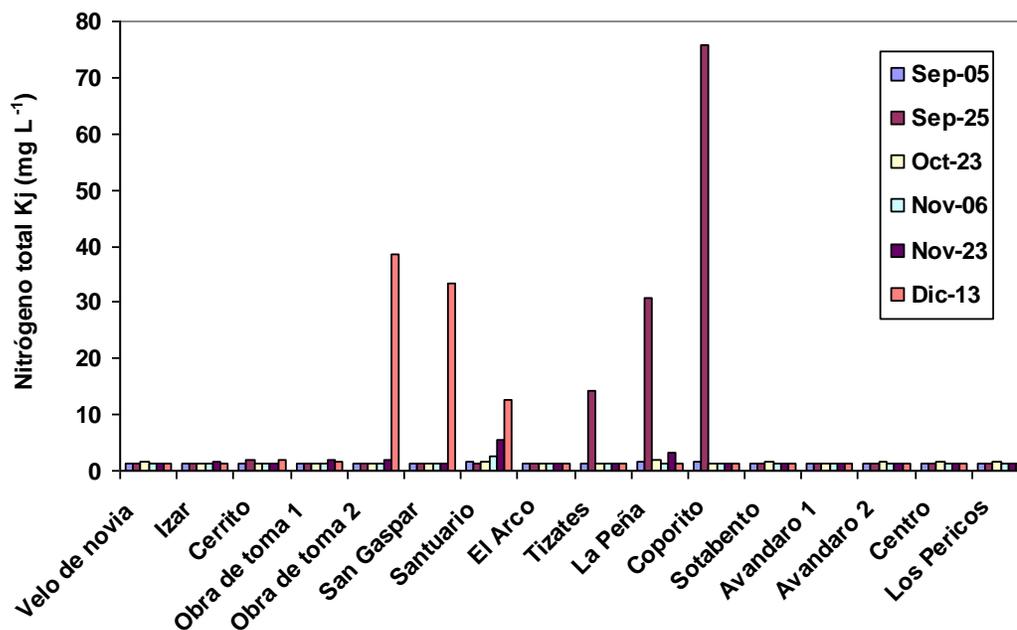


Figura 20. Concentraciones de Nitrógeno Total Kjeldahl

Fosfatos totales

El interés ecológico en el fósforo radica en el papel tan importante que juega en el metabolismo biológico. En comparación con la gran cantidad natural de los otros

componentes principales nutricionales y estructurales de la biota (carbono, hidrógeno, nitrógeno, oxígeno, azufre), el fósforo es el menos abundante, y generalmente limita la productividad biológica.

En este embalse se detectaron valores de fosfatos totales en la superficie de 0.9 mg L^{-1} , a excepción del muestreo del 6 de noviembre con valores de 0.36 mg L^{-1} y en diciembre los valores se incrementaron en los sitios Compuerta 2, San Gaspar y Santuario de 14.87 , 10.74 y 2.72 mg L^{-1} (Figura 21). Los criterios ecológicos de la calidad de agua establecen una concentración límite de 0.05 mg L^{-1} de fosfatos para considerarla apta como fuente de abastecimiento de agua potable.

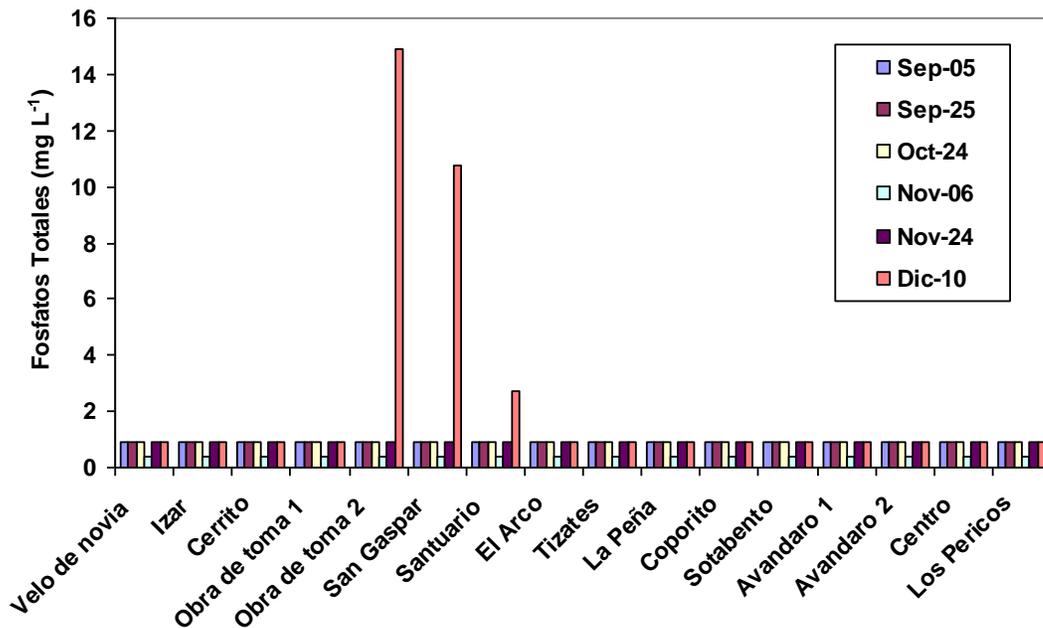


Figura 21. Valores de Fosfatos Totales

Clorofila a

La mayor concentración se registró en la estación Avandaro 1 en el mes de octubre con un valor de 26 mg m^{-3} , por lo que se considera eutrófico ya que se encuentra en el intervalo de 8 a 25 mg m^{-3} . El valor promedio de clorofila para los diferentes muestreos se registró en el intervalo de 2 a 7.9 mg m^{-3} , considerándose Mesotrófico.

En el muestreo de diciembre los valores de clorofila aumentaron considerablemente, considerándose este embalse como hipertrófico, se cuantificaron concentraciones superiores de 216 , 278 y 296 mg m^{-3} de San Gaspar, Obra de toma 2 y Santuario. El comportamiento de clorofila-a se muestra en la figura 22.

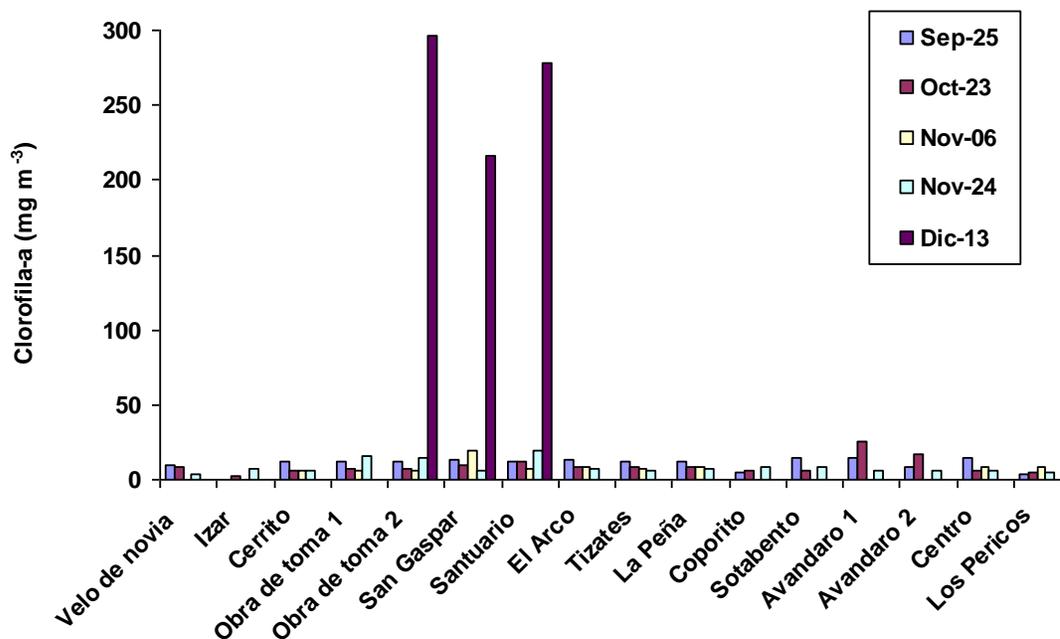


Figura 22. Concentraciones de Clorofila-a de la Presa Valle Bravo

6.3.2.3 Resultados de Microcistina LR en agua superficial

Durante los seis muestreos realizados de septiembre a diciembre se detecta la presencia de Microcistina LR por debajo del límite de cuantificación. En el primer muestreo se identifica la cianotoxina en la mayoría de los sitios monitoreados (Figura 23), a excepción de Avandaro cuyo valor fue de cero. Los valores promedio fueron 0.29 a 0.52 $\mu\text{g mL}^{-1}$; para el segundo muestreo de septiembre, se identifica la cianotoxina en los sitios de Cerrito, Obra de Toma, San Gaspar y Santuario en concentraciones de 0.37 a 0.46 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

En los meses de octubre y noviembre (3^o y 4^o monitoreo) no se detecta la presencia de la Microcistina LR; para el quinto monitoreo solo se identifica la cianotoxina en San Gaspar, El Arco, Avandaro, Obra de toma y Centro con valores de 0.36 a 0.73 $\mu\text{g mL}^{-1}$, como puede observarse la concentración va incrementando ligeramente con respecto a los muestreos anteriores. En el sexto monitoreo se aprecia un considerable incremento en los valores de Microcistina LR desde 0.8 hasta 1.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en las estaciones de Izar, Cerrito, Obra de toma, San Gaspar y Santuario. Se observa que las floraciones de cianobacterias se incrementan en comparación con los muestreos anteriores, los valores detectados en el sexto muestreo rebasan el valor de 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ establecido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como nivel máximo aceptable en aguas de abastecimiento público.

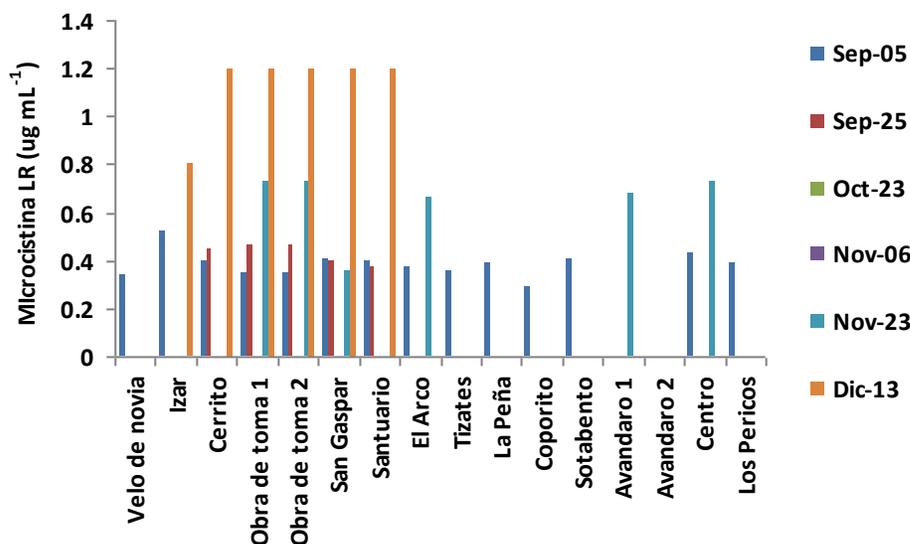


Figura 23 Valores de Microcistina LR en agua superficial

6.3.2.4 Resultados de Microcistina LR con red plancton

Con relación a las muestras colectadas en la red de plancton de 70 μm a 50 cm de profundidad en el primer monitoreo solo se detecta la presencia Microcistina LR por debajo del límite de cuantificación en el segundo muestreo en las estaciones de Cerrito, San Gaspar, El Arco, Avandaro, Tizates, Coporito, Obra de Toma y la Peña con valores desde 0.31 a 0.56 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para el tercer monitoreo se detecta la cianotoxina en los distintas estaciones a excepción de Centro y los Pericos los valores fluctuaron desde 0.13 hasta 1.18 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

En el cuarto muestreo se detectaron concentraciones Microcistina LR de 0.11 a 0.64 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en los diversos sitios monitoreos, a excepción de Izar, La Peña, Sotabento, Avandaro, Centro y los Pericos cuyo valor es cero.

La detección de la ciantoxina en algas en el quinto monitoreo, se va incrementando gradualmente, los valores se identifican en el intervalo de 0.25 a 0.87 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a excepción de las estaciones El Arco, Avandaro y los Pericos de concentraciones cero.

En el sexto muestreo se identificó aumento en florecimientos algales de los distintos sitios de la Presa, lo cual se corrobora con los valores de microcistina LR de 0.8 a 1.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ que corresponden a los sitios de Velo de Novia, Izar, Cerrito, Obra de Toma, San Gaspar y Santuario, no se completo el muestreo, debido a que llovió incrementando el nivel de la Presa así como la intensidad de la marea, el agua se revolvió y las muestras ya no fueron representativas. Los valores detectados en el último muestreo superan el valor establecido por la Organización Mundial de la Salud de 1 $\mu\text{g L}^{-1}$. Las concentraciones de los seis muestreos se presentan en la figura 24.

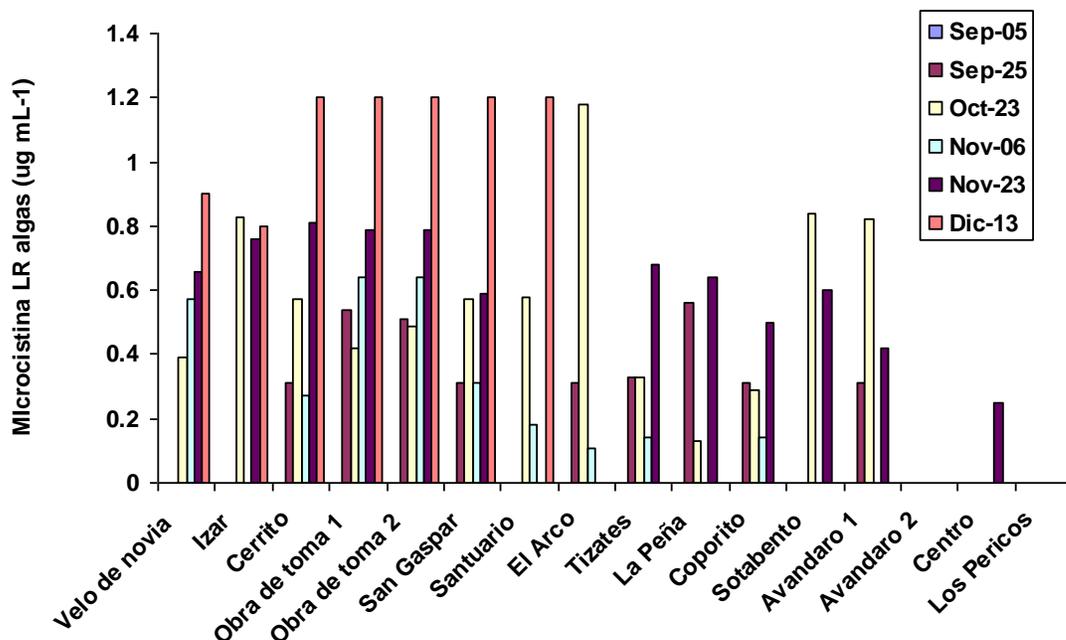


Figura 24. Análisis de Microcistina LR a 50 cm de profundidad

Anatoxina-a

La presencia de esta cianotoxina, no se detectó durante los monitoreos realizados en la Presa.

6.3.2.5 Discusión de resultados de la Presa de Valle de Bravo

Comparando los resultados de nutrientes y pH obtenidos en 2013 con estudios realizados desde 1999, 2000, 2001 y 2002 se realiza la siguiente discusión:

El valor promedio de pH (8.45) de las muestras de agua correspondientes al monitoreo 2013 de los diferentes sitios de la Presa Valle de Bravo, presentan ligeras variaciones con respecto a los estudios mencionados anteriormente, sin embargo se mantienen dentro de los límites de 5 -9 de acuerdo a los Criterios Ecológicos de fuentes de abastecimiento (Tabla 6).

El color del agua en los embalses está asociado a las grandes cantidades de plancton, debido a la pigmentación de las algas y bacterias. El color de las muestras de agua fue verde azulado y amarillo verdoso.

Las concentraciones de los nutrientes de la Presa nitritos 0.019 y nitratos 0.19 mgL⁻¹ no presentan variación significativa con respecto a los valores obtenidos en estudios anteriores (Tabla 6), éstos se encuentran por debajo de los valores estipulados en los

Criterios Ecológicos de fuentes de abastecimiento y no observa influencia por la actividad agrícola.

El valor determinado de fosfatos en 2013 en la presa Valle de Bravo fue 0.88 mg L^{-1} , la concentración determinada en 1999 fue 0.145 mg L^{-1} y en 2002 0.182 mg L^{-1} como se aprecia en la tabla 6, se incrementó el valor promedio de fosfatos totales en el embalse, rebasando la concentración límite de 0.1 mg L^{-1} establecida en Criterios Ecológicos de fuentes de abastecimiento.

Los niveles elevados de fósforo probablemente son resultado de descargas puntuales como los efluentes domésticos e industriales, y de fuentes no puntuales donde la carga de fósforo es generada por el drenaje superficial y subterráneo. Las fuentes no puntuales incluyen: la precipitación atmosférica, los escurrimientos urbanos y el drenaje del suelo agrícola, en particular de suelos fertilizados.

El valor promedio de nitrógeno total Kjeldahl (NTK) fue de $1.38 \mu\text{g mL}^{-1}$ valor ligeramente mayor que la analizada en otros estudios de $0.66 \mu\text{g mL}^{-1}$ (tabla 6) Los criterios ecológicos de calidad del agua, no establecen límites para este parámetro en cuanto a su uso o aprovechamiento.

Tabla 6. Valores promedio de nutrientes Presa Valle de Bravo (1999-2013)

Parámetro	Criterios Ecológicos fuentes abastecimiento	Valor promedio (CNA/IDE CA, 1999)	Valor promedio (CNA/IDE CA, 2000)	Valor promedio (CNA/IMTA 2001) nivel superficial	Valor promedio (CNA/ACUA GRANJAS, 2002)	Valor promedio IMTA, 2013
pH	5 - 9	6.8	7.1	8.7	7.12	8.45
NTK (mg L^{-1})	-	0.74	0.68	No Detectado	0.57	1.38
Nitritos (mg L^{-1})	0.05	0.006	0.003	0.028	0.02	0.019
Nitratos (mg L^{-1})	5	0.106	0.116	0.232	0.106	0.19
Fosfatos totales (mgL^{-1})	0.1	0.145	0.066	No Detectado	0.182	0.88

La presencia de Microcistina LR se detectó en las muestras de agua superficial, en concentraciones promedio desde 0.29 hasta $1.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ principalmente en los sitios Obra de toma (entrada a planta potabilizadora Cutzamala), San Gaspar, Santuario y Cerrito. Los valores detectados en algunos de los sitios muestreados superan el valor establecido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) de $1 \mu\text{g L}^{-1}$. Como se aprecia se detecta la

presencia de esta cianotoxina la cual tiene un olor desagradable y ocasiona severos daños en el hígado del ser humano. Es de suma importancia monitorear la Presa Valle de Bravo mensualmente durante un año para diagnosticar la época de mayor florecimiento.

Por lo que respecta a la cuantificación de Microcistina LR en muestras de agua colectadas a 50 cm de profundidad presentaron valores promedio de 0.11 hasta 1.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en las estaciones: Obra de toma, Tizates, San Gaspar, Coporito y Centro, sobrepasan el valor de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ establecido por la OMS.

Durante los diferentes monitoreos no se detectó la presencia de Anatoxina-a.

7. Conclusiones y recomendaciones

Se cumplió el primer objetivo del proyecto, se implementó y validó la metodología de un grupo de fármacos por cromatografía de gases espectrometría de masas a niveles de nanogramos por litro en agua potable y residual.

Se cumplió segundo objetivo:

Realizar muestreo y diagnóstico en la presa Valle de Bravo en época de estiaje y lluvias, de microcistina LR y Anatoxina.

En base a los resultados de los seis muestreos realizados en la Presa de Valle de Bravo se presentan las siguientes conclusiones:

- En este estudio se determinó la presencia de Microcistina LR en agua superficial y agua colectada a 50 cm de profundidad en concentraciones desde 0.29 hasta 0.87 $\mu\text{g L}^{-1}$; con excepción del monitoreo del mes de diciembre los valores de Microcistina LR de los sitios Obra de toma, San Gaspar y Santuario, las condiciones fisicoquímicas y nutrientes favorecieron el florecimiento de la cianotoxina incrementando drásticamente a 1.2 $\mu\text{g L}^{-1}$; valor que rebasa el establecido en la Organización Mundial de la Salud 1 $\mu\text{g L}^{-1}$.
- No se determinó la presencia de Anatoxina-a en la Presa Valle de Bravo.
- Los valores promedio de nutrientes (nitratos y nitritos) del agua del embalse cumple parcialmente con los criterios ecológicos para el abastecimiento de agua potable a excepción de fosfatos totales cuyo valor determinado fue de 0.88 $\mu\text{g L}^{-1}$.
- El valor promedio de clorofila para los diferentes muestreos se registró en el intervalo de 2 a 7.9 mg m^{-3} .
- Se debe realizar un monitoreo completo un período prolongado y tener un control de la presencia de cianobacterias y sus toxinas, principalmente en la obra de toma que abastecen a las planta potabilizadora como es el caso de la Presa de Valle de Bravo

Recomendaciones

Continuar con los muestreos de calidad del agua al menos una vez al mes durante un año, abarcando época de lluvias y de estiaje, para poder evaluar la época de mayor florecimiento y cuantificar la Microcistina LR y Anatoxina-a así como la influencia de nutrientes y clorofila.

Se cumplió con el tercer objetivo al desarrollar e implementar metodología por PCR punto final para PRESENCIA o AUSENCIA de cianobacterias, elaborándose el protocolo: Protocolo para evaluar la sensibilidad de la prueba de detección de cianobacterias utilizando los oligonucleótidos rpoC3 y rpoC4.

8. BIBLIOGRAFÍA

Barceló, D.; Petrovic, M. Emerging Contaminants from Industrial and Municipal Waste. Occurrence, Analysis and Effects. The Handbook of Environmental Chemistry. Vol.5.S1, 2006.

Campos, F., Rellán, S., Durán, R., Gago, A., Faro, L.F., Alfonso, M. 2008. Evaluation on in vivo and in vitro recovery rate of anatoxin-a through the microdialysis probe. *Toxicol* 52: 817-823.

Chorus, I. and Bartram, J. 1999. TOXIC CYANOBACTERIA IN WATER. A guide to their public health consequences, monitoring and management. Published on Behalf of World Health Organization. First edition.

CNA / Acuagranjas, Consultores en Acuacultura, S.A. de C.V., 2002. Muestreos Biológicos en las Presas Valle de Bravo, Villa Victoria y El Bosque del Sistema Cutzamala. 151pp.

CNA / Acuagranjas, Consultores en Acuacultura, S.A. de C.V., 2003. Monitoreo Biológico de las Presas Valle de Bravo, Villa Victoria y El Bosque del Sistema Cutzamala, 2003. 226 pp.

CNA / Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, 2001^a. Monitoreo de la Calidad del Agua en las Cuencas de Valle de Bravo y Villa Victoria, Estado de México. Clave RD-0102. México.

CNA / Investigación y Desarrollo de Estudios de Calidad del Agua. 1999. Estudio Limnológico de la Presa Valle de Bravo. Informe Final. Contrato GT-306-GAVM-98.

Głowacka J, Szeffel-Markowska M., Waleron M., Łojkowska E. Waleron K. (2011). Detection and identification of potentially toxic cyanobacteria in Polish water bodies. *Biochimica Polonica* 58(3):321-333.

James, K.J., Furey, A., Sherlock, I.R., Stack, A., Twohig, M., Caudwell, F.B., Skulberg, O.M. 1998. Sensitive determination of anatoxin-a, homoanatoxin-a and their degradation products by chromatography with fluorimetric detection. *Journal of Chromatography A*, 798: 147-157.

Martínez, R.E., Martínez, S.M.D., Millan, C.M., Ramírez, G.P. 2002. Determinación de toxinas biológicas en una fuente de abastecimiento de agua dulce. XVIII Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Cancún México. 27-31 de octubre.

OECD, 1982. Eutrophication of Waters: Monitoring, Assessment and Control. Paris. 154 pp.

Sacher, F., Lange, F.T., Brauch, H.J., Blankenhorn, I. 2001. Pharmaceuticals in groundwater. Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg Germany. *Journal of Chromatography A*, 938: 199-210.

Vollenweider, R. A. y Kerekes, J. 1982. Eutrophication of waters, monitoring, assesment and control. En: Contreras, F., Castañeda, O., García, A. 1994. La clorofila a como base para un índice trófico en lagunas costeras mexicanas. Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología.

Vollenweider, R. A., 1983, Notas en el segundo encuentro del proyecto de eutroficación en lagos cálidos, Brasilia, Brasil. OPS/CEPIS.

VOLLENWEIDER, R.A. 1976. Advances in defining critical loading levels for phosphorus in lake eutrophication. Mem. Inst. Ital. Idrobiol. 33: 53-83.

Wilson M. K, Schembria A. M., Baker D. P., SAINT P. C. (2000). Molecular Characterization of the Toxic Cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* and Design of a Species-Specific PCR. Applied and Environmental MicvrobiolgyB Vol. 66 Núm. 1, p. 332–338