

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
INGENIERÍA

**MECANISMOS FISICO-
QUIMICOS DE LA
DEGRADACIÓN DE LA
TOXINA MICROCISTINA-LR**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN INGENIERÍA
(A M B I E N T A L)
P R E S E N T A

Q. I. MARIA DOLORES MARTINEZ SALGADO

DIRIGIDA POR:
DRA. GABRIELA E. MOELLER CHÁVEZ

MÉXICO, D.F. ABRIL, 2006

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Instituto Mexicano de Tecnología del Agua por el apoyo brindado a la realización de esta tesis; así como a la Coordinación y Subcoordinación de Calidad del Agua.

En especial a los que colaboran en esta Subcoordinación por brindarme todo su apoyo:

M.C Juan García
Q. Manuel Sánchez
Biol. Javier Sánchez
Srita Clotilde Pérez
M.C Victor Ramírez
Biol. Martha Millán
I.Q Rosario Figueroa

Biol. Lorena Castillo
M.C Juana E. Cortés
Q. Filis Moreno
Q.Sixto Pérez
M.C. Luis Bravo
M.C Silvia Gelover
M.C Martha Aviles

A la FES Iztacala por toda su colaboración en los muestreos e identificación de los microorganismos, en especial al Dr. Pedro Ramírez y a la Biol. Dolores Hurtado.

A CONACYT por otorgarme la beca, para lograr realizar este trabajo.

En especial al M.C Evaristo Martínez Romero, por compartir sus conocimientos y experiencias, por todo su apoyo incondicional, su tiempo y su paciencia al dirigir este trabajo.

¡Muchas Gracias por ser un excelente ser humano, por su cariño y sobre todo por su amistad y la de su familia!

A la Dra. Gabriella Moeller Chavéz por su confianza y apoyo al asesorar este trabajo.

A mis revisores de tesis por todo su apoyo para la culminación de este trabajo, por su paciencia en la revisión y sus acertados comentarios a este trabajo.

M.C Catalina Maya Rendón.
M.C Isaura Yañez Noguez.
Dr. Erick R. Bandala González.
Dr. Victor Manuel Luna Pabello.

DEDICADA A:

A DIOS POR GUIARME Y ESTAR SIEMPRE A MI LADO.

A MI FAMILIA POR SU APOYO Y COMPRENSIÓN, EN ESPECIAL A MI EXCELENTE MAMÁ POR SER UN GRAN SER HUMANO Y ESTAR SIEMPRE CONMIGO.

A MI TIO FIDENCIO SALGADO POR COMPARTIR TRIUNFOS Y FRACASOS, POR TODO SU APOYO Y CARIÑO, GRACIAS POR HABER SIDO MÁS QUE UN PADRE.

A MI HIJO CARLOS RUBÉN POR LLENAR MI VIDA DE LUZ Y ENERGÍA Y AYUDARME A SER MEJOR CADA DIA.

INDICE

1.-RESUMEN.....	1
2.-INTRODUCCION.....	3
2.1.-VALLE DE BRAVO.....	3
2.2.-EUTROFICACION.....	5
2.2.1.-Efectos de eutroficación.....	6
2.2.2.-Normatividad para el control de la eutroficación.....	6
2.3.-NUTRIENTES.....	8
2.4.-CIANOBACTERIAS (algas verde-azules).....	9
a.-Características generales de las cianobacterias.....	10
b.- <i>Microcystis aeruginosa</i>	13
3.-PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	14
3.1.-PROBLEMATICA EN MÉXICO.....	14
4.-MARCO TEORICO.....	18
4.1.-CLASIFICACIÓN DE LAS TOXINAS.....	18
4.1.1.-Citotoxinas.....	18
4.1.2.-Biotoxinas.....	18
4.1.3.-Neurotoxinas.....	19
4.1.4.-Hepatotoxinas.....	19
4.1.4.1.-Microcistinas.....	20
a.-Principales características de la toxina Microcistina-LR....	21
b.-Toxicidad de las cianotoxinas.....	24
4.2.-DIFERENTES TIPOS DE TOXICIDAD.....	24
4.2.1.-Límites establecidos para Microcistinas.....	27
4.3.-FLORECIMIENTO (“BLOOM”).....	28
4.4.-CULTIVO, AISLAMIENTO Y METODOS PARA LA DEGRADACIÓN DE MICROCISTINA-LR.....	30
4.4.1.-Métodos conocidos de cultivo y concentración de Microcistinas.....	30
4.4.2.-Métodos para la degradación de Microcistinas.....	31
4.4.2.1.-Fenton.....	31
4.4.2.2.-Foto-Fenton.....	32
5.-HIPOTESIS.....	33
6.-OBJETIVO GENERAL.....	33
6.1.-OBJETIVOS PARTICULARES.....	33
7.-METODOLOGIA.....	34

7.1.-OBTENCIÓN DE LA TOXINA MICROCISTINA-LR.....	34
7.2.-CONCENTRACIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA TOXINA.....	34
7.3.-METODO ANALITICO (CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION).....	35
7.4.-DEGRADACION DE LA TOXINA MICROCISTINA-LR, MEDIANTE METODOS DE OXIDACION AVANZADOS DE RADIACION UV, FENTON Y FOTOFENTON.....	36
7.4.1.-Radiación con UV.....	36
7.4.2.-Reacción Fenton.....	37
7.4.3.-Reacción Foto-Fenton.....	38
8.-RESULTADOS, ANALISIS Y DISCUSION.....	39
8.1.-MUESTREO EN VALLE DE BRAVO.....	39
8.2.-ESTÁNDAR.....	41
8.3.-TECNOLOGÍAS AVANZADAS DE OXIDACIÓN.....	41
9.-CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	51
10.-ANEXOS.....	54
10.1.-ANEXO 1.....	54
10.2.-ANEXO 2.....	58
10.3.-ANEXO 3.....	64
11.-BIBLIOGRAFIA.....	66

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.-Mapa de la Presa de Valle de Bravo.....	3
Figura 2.-Aportación de contaminantes a los cuerpos de agua.....	8
Figura 3.-Estructura general de las hepatotoxinas.....	11
Figura 4.- <i>Microcystis aeruginosa</i> obtenida del cultivo con BG11, realizado en el laboratorio de Calidad del agua (IMTA).....	13
Figura 5.-Estructuras conocidas de Microcistinas.....	22
Figura 6.-Isómero especular de la Microcistina-LR.....	23
Figura 7.-Concentración de Microcistina-LR durante los meses del año 2001 en tres estaciones de Valle de Bravo.....	39
Figura 8.- Concentración de Microcistina-LR durante los meses del año 2002 en tres estaciones de Valle de Bravo.....	40
Figura 9.-Concentración de Microcistina-LR, presentada en la estación Cortina, durante los meses del período 2001-2002.....	40
Figura 10.-Curva de Calibración de MC-LR, preparada con un estándar adquirido comercialmente de concentración conocida (500 µg, liofilizado).....	41
Figura 11.-Microcistina-LR expuesta a radiación continua de UV $\lambda=365\text{nm}$, durante 150 minutos.....	42
Figura 12.-Tratamiento de MC-LR, utilizando el reactivo de Fenton (Fe_2SO_4 y H_2O_2).....	43
Figura 13.-Tratamiento de MC-LR con Foto-Fenton, a diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno.....	44
Figura 14.-Cromatograma del estándar de MC-LR adquirido de concentración conocida (10µg/ml) y la toxina purificada obtenida de Valle de Bravo.....	45
Figura 15.-Comparación de un estándar de 6 µg/ml de MC-LR adquirido comercialmente y la MC-LR degradada con Foto-Fenton (0.25 mM de Fe^{+2} y 0.15 mM de H_2O_2), después de ser irradiada en forma continua durante 15 minutos...	46
Figura 16.-Cromatograma de la desaparición de la señal de MC-LR, después de ser sometida a degradación por Foto-Fenton durante 20 minutos.....	46

Figura 17.- Cinética de degradación de MC-LR, tratada con Foto-Fenton (0.25 mM de Sulfato de Hierro y 0.15 mM de Peróxido de hidrógeno).....	47
Figura 18.-Cinética de degradación de MC-LR, tratada con Fotofenton (0.25 mM de Sulfato de Hierro y 0.25 mM de Peróxido de hidrógeno).....	48
Figura 19- Cinética de degradación de MC-LR, tratada con Foto-Fenton (0.25 mM de Sulfato de Hierro y 0.5 mM de Peróxido de hidrógeno).....	49
Figura 20.-Arrastre con red fitoplanctonica de 70µm.....	59
Figura 21.-Concentración de Cianobacterias.....	59
Figura 22.-Obtención de la muestra, los volúmenes de muestra variaron, para la concentración y purificación de la toxina fueron de 20 litros.....	59

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.-Clasificación de los lagos de acuerdo a su carga interna de nutrientes...	5
Tabla 2.-Límites máximos permisibles de la NOM-001-SEMARNAT-1996.....	7
Tabla 3.-Toxinas producidas por las diferentes cepas de cianobacterias.....	19
Tabla 4.-Pesos Moleculares de algunas Microcistinas.....	21
Tabla 5.-Toxicidad aguda de varias cianotoxinas.....	21
Tabla 6.-Lugares donde se han presentado florecimientos tóxicos.....	29
Tabla 7.-Tecnologías avanzadas de oxidación.....	31
Tabla 8.-Pruebas de Foto-Fenton con irradiación continua manteniendo una concentración constante de sulfato de hierro de 0.25 mM.....	43
Tabla 9.-Cinética de degradación de Microcistina-LR utilizando Foto-Fenton (0.15 mM de peróxido de hidrógeno con una concentración constante de sulfato de hierro de 0.25 mM).....	47
Tabla 10.-Cinética de degradación utilizando 0.25 mM de peróxido de hidrógeno con una concentración constante de sulfato de hierro de 0.25 mM.....	48
Tabla 11.-Cinética de degradación utilizando 0.5mM de peróxido de hidrógeno con una concentración constante de sulfato de hierro de 0.25mM.....	49
Tabla 12.-Muestras de Microcistina-LR, de valle de bravo durante el periodo de enero a diciembre de 2001.....	55
Tabla 13.-Muestras de Microcistina-LR, de valle de bravo durante el periodo de enero a diciembre de 2002.....	56
Tabla 14.- Concentración de MC-LR en la estación cortina durante los años 2001 y 2002.....	57
Tabla 15.-Diferentes Medios de cultivo utilizados en varios años, por diferentes autores.....	62
Tabla 16.-Degradación de MC-LR por exposición a luz ultravioleta a 365nm.....	65
Tabla 17.- Resultados de la prueba de Fenton con diferentes concentraciones...	65

1.-RESUMEN

Muchos cuerpos de agua experimentan actualmente la denominada eutrofización antrópica (como resultado de la actividad humana) por el aumento poblacional, la urbanización, la agricultura, la minería, el aporte de aguas residuales y desechos de la industria alimentaria entre otras. Uno de los principales efectos, es el florecimiento de diferentes microorganismos entre los que se encuentran las cianobacterias que forman grandes colonias, principalmente en cuerpos de agua con altos niveles tróficos. El florecimiento de las cianobacterias representa un problema para los cuerpos de agua de uso doméstico, industrial y de recreo, debido principalmente al incremento en la producción de metabolitos tóxicos, los cuales tienen un efecto letal sobre los diversos organismos habitantes de los cuerpos de agua. De las especies unicelulares, *Microcystis* causa la mayoría de los problemas de toxicidad y durante el verano domina la sucesión anual de cianobacterias.

Desde hace tiempo se tiene conocimiento de la presencia de toxinas cianobacterianas, pero estas sólo se habían asociado con la muerte de animales domésticos. Recientemente, en Brasil la muerte de 88 personas y el daño renal en 50 pacientes que requirieron hemodiálisis, se asoció con la presencia de la cianobacteria *Microcystis aeruginosa*, principal productora de la cianotoxina Microcistina-LR. La muerte por intoxicación debida a microcistinas se presenta como consecuencia de un shock hipovolémico secundario o hemorragia del hígado. Los estudios post-mortem muestran incremento en el peso del hígado y en la concentración de hemoglobina hepática y de hierro.

Reportes en Estados Unidos y Australia señalan la presencia de casos por intoxicación al ingerir agua proveniente del suministro municipal. Esto se produjo al pretender eliminar con sulfato de cobre las células durante un florecimiento, lo que suscitó la liberación de altos niveles de toxinas hacia el sistema de distribución, ocasionando la intoxicación de varios individuos.

La Presa Valle de Bravo y los diferentes cuerpos de agua que conforman el sistema Cutzamala proveen cerca del 30% del agua potable a los aproximadamente 6,000,000 de habitantes de la ciudad de México, tal cuerpo de agua ha presentado desde 1998 a la fecha florecimientos cianobacterianos. En dicho embalse, durante casi seis meses (de junio a noviembre) del año, se aprecia la presencia de cianobacterias, siendo junio el mes con el mayor valor de concentración de la toxina microcistina-LR (Ramírez, 2004).

La toxina una vez liberada al agua tiene una vida media relativamente alta de aproximadamente 1 año por lo que se presentan los procesos de intoxicación. Debido a esto es necesario desarrollar metodologías que permitan la eliminación de la toxicidad producida, por estos componentes.

Para la inactivación y degradación de la cianotoxina Microcistina-LR, el presente trabajo propone tres procesos de oxidación avanzada (radiación Ultravioleta, método de Fenton, y Foto-Fenton). La comparación se realizó utilizando un estándar comercial con concentración conocida de toxina como referencia, y su identificación mediante el uso de un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución para realizar la detección y cuantificación de dicha toxina, y así comparar la efectividad de cada uno de los tratamientos utilizados.

Se concentró y purificó la toxina Microcistina-LR, obteniéndola de la Presa de Valle de Bravo de la estación Cortina, se compararon tres procesos de oxidación avanzada para su inactivación y degradación:

- radiación UV,
- aplicación de reactivo de Fenton, y
- aplicación del proceso de Foto-Fenton,

La radiación UV en forma continua se realizó durante 150 minutos con una lámpara de 36 W (WHI-36W-PLL, Philips Lighting Company) de $\lambda=365$ nm, con la cual no hubo degradación, por lo cual es una técnica inapropiada para degradar microcistina-LR.

Al aplicar el reactivo de Fenton a concentraciones de 0.15 y 0.25 mM de peróxido de hidrógeno y manteniendo constante el sulfato de hierro a 0.25 mM, no se observa degradación alguna. Ocurrió una situación similar cuando se aplicó una concentración 10 veces mayor (2.5 mM de sulfato de hierro y 5 mM de peróxido de hidrógeno).

Los mejores resultados se observaron al utilizar el reactivo de fenton con radiación UV (Foto-Fenton) con el que se probaron concentraciones de 0.15, 0.25 y 0.5 mM de peróxido de hidrógeno y una concentración constante de sulfato de hierro de 0.25 mM, dando en los tres casos degradación del 80% a los 20 minutos, con una cinética de degradación que se ajusta a una ecuación de primer orden. La concentración de 0.15 mM es la que necesitó menor cantidad de peróxido de hidrógeno y con la que la ecuación de primer orden dio un $r^2=0.8864$ mayor a los obtenidos con las concentraciones de 0.25 y 0.5 mM de peróxido.

Utilizando el método de Foto-fenton con concentraciones de 0.15 mM de peróxido de hidrógeno y 0.25 mM de sulfato de hierro y utilizando un tiempo de reacción de 20 minutos se degradó el 80% de la toxina, por lo que resultó un método rápido y de menor costo que las otras a concentraciones probadas. Es necesario realizar más experimentos variando la concentración de sulfato de hierro, para probar si es posible disminuir la cantidad utilizada o si a mayor concentración disminuye el tiempo de reacción.

2.-INTRODUCCION

2.1 VALLE DE BRAVO.

El embalse de Valle de Bravo, está ubicado 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; esta cuenca esta constituida por importantes embalses de cuerpos de agua destinados a la generación de energía eléctrica. La cuenca aporta volúmenes muy importantes de agua que al potabilizarse se destinan al uso y consumo humano en el Distrito Federal, parte del Valle Cuautitlán -Texcoco, y de la ciudad de Toluca, siendo así parte del sistema Cutzamala. También se cuenta con arroyos de caudal intermitente durante la época de lluvias, así como manantiales, ojos de agua y un lago artificial conocido como La Presa de Valle de Bravo, que forma parte del sistema hidroeléctrico Miguel Alemán; perteneciente al sistema Cutzamala.

La Presa de Valle de Bravo se encuentra localizada en el estado de México, en el municipio del mismo nombre y tiene las siguientes coordenadas: 19°21'30'' latitud norte y 100°11'00'' longitud oeste a 1830 metros sobre el nivel del mar; tiene una área de 1730 hectáreas, y un volumen de 335 millones de m³; su longitud máxima es de 7.3 Km, con un ancho máximo de 6.3 Km y una profundidad máxima de 35 m (figura 1). Tiene una precipitación anual entre 800 y 1200 mm, una evaporación de 2000 mm y una temperatura media entre 18 y 22 °C (Salud Ambiental, 2000).



Figura 1- Mapa de la Presa de Valle de Bravo (Martínez, 1998).

El embalse Valle de Bravo se clasifica como cálido monomítico, con agua superficial denominada epilimnio, y de una profunda llamada hipolimnio, ambas con características físicas, químicas y biológicas diferentes y por lo tanto con calidades de agua distintas (Olvera *et al.*, 1993).

El comportamiento térmico del embalse indicó que durante la estratificación de éste, la temperatura en el epilimnio osciló en promedio entre 20.5 °C (marzo) y 25 °C (junio) y en el hipolimnio entre los 17.2 °C (marzo) y los 18.6 °C (agosto).

En septiembre se inicia la ruptura de la termoclina y el período de mezcla del embalse, para concluir ésta en el mes de diciembre homogeneizándose la columna de agua a 19 °C. En el mes de febrero se inicia la formación de la termoclina por efecto del calentamiento de la superficie del embalse.

En los meses de marzo, abril y mayo el pH se presenta alcalino con valores máximos de 9.4. El pH en el fondo tiende a la neutralidad conforme avanza el año debido a la formación de ácido sulfhídrico detectado por el olor de las muestras de agua profunda.

Durante el mes de agosto este parámetro presentó valores menores de 7.0 unidades. El oxígeno disuelto (OD) en el embalse del mes de abril de 1992 hasta noviembre de 1993 fue anóxico confiriéndole características reductoras. De diciembre a marzo el oxígeno promedio fue de 5 mg/L (Martínez, 1998).

Su carácter turístico hace que se incremente la población flotante y en consecuencia el volumen de descargas municipales sin tratar (Olvera *et al*, 1993). Lo que la hace sujeta a fuertes procesos de urbanización y eutroficación ya que todos los drenajes descargan ahí aguas residuales, a pesar de los trabajos para construir drenajes perimetrales en sus orillas.

En esta presa se practican deportes acuáticos utilizando lanchas de motor a gasolina con la consecuente contaminación y degradación del recurso. Sus tributarios aportan un total de 46.7 toneladas de fósforo al año de las cuales, las descargas representan el 40% y los ríos el 60% de aporte. El Mercado aporta 16.0 toneladas de fósforo al año (34.3%) y el río Amanalco 26.5 toneladas (56.7%), lo que significa en conjunto el 91% del total de este contaminante que entra al embalse (Olvera, 1992).

La presa Valle de Bravo, junto con otras presas, es utilizada para abastecer agua al sistema Cutzamala, esta agua es tratada en la planta potabilizadora de los Berros y enviada a la ciudad de México para su uso y consumo. El tratamiento consiste en percloración, coagulación/floculación, sedimentación por gravedad y filtración rápida en arena; esta planta trata por lo general 10.6 m³/s de agua de los cuales la presa Valle de Bravo aporta 7 m³/s.

Por los antecedentes antes mencionados la Presa Valle de Bravo se encuentra clasificada como un embalse donde es primordial hacer un control de malezas acuáticas. Además en esta presa se presentaron condiciones de eutroficación reportadas en 1998-1999, como: abundancia de nutrientes (fósforo y nitrógeno), pH básico con valores de hasta 9.4 y temperatura del agua entre 20-25 °C, condiciones adecuadas para el crecimiento de cianofitas

(Martínez, 2000).

Debido a los antecedentes de contaminación y floración que sufre, así como su importancia para el abastecimiento de agua de una parte de la Ciudad de México, la Presa de Valle de Bravo, se eligió para realizar diversos muestreos. En este lugar se presentan en verano diversos tipos de florecimientos lo que lo hace ideal para realizar este tipo de investigación.

2.2.-EUTROFICACIÓN

Todos los lagos evolucionan debido a la contaminación natural provocada por la muerte y putrefacción de los organismos animales y vegetales que se encuentran en ellos. Esta evolución inicia en el estado oligotrófico y termina en el eutrófico, pasando después a una eutrofia avanzada. En la tabla 1 se observa la clasificación que se les da a los lagos de acuerdo a la concentración de nitrógeno y fósforo que tienen. Este proceso se había venido dando en una forma lenta, pero en la actualidad se está presentando en forma acelerada debido al exceso de nutrientes y otros factores como viento lento, y temperatura cálida, lo cual provoca daño al medio ambiente (Pesson, 1979).

Tabla 1.-Clasificación de los lagos de acuerdo a su carga interna de nutrientes (Pesson, 1979).

TIPO DE LAGO	P Total mg/L	N Total mg/L
Oligotrófico	0.002-0.020	0.02-0.2
Mesotrófico	0.010-0.030	0.1-0.7
Eutrófico	0.010-0.090	0.5-1.3

Los lagos Oligotróficos son: profundos de aguas muy puras, claras, azules o azul-verdosas; pobres en nutrientes (fósforo y nitrógeno), pobres en plancton; permanentemente ricos en oxígeno disuelto (a grandes profundidades).

Los lagos Eutróficos son: poco profundos (menos de 50 metros), el color del agua varía de verde a pardo, la transparencia es escasa, tienen exceso de nutrientes, las plantas proliferan de manera excesiva, el fondo está cubierto de sedimento rico en materia orgánica fácilmente putrescible. El oxígeno disminuye o desaparece durante parte del año (verano y principios de otoño); por lo que se crea un ambiente reductor, con formación de CO₂, compuestos amoniacales y sulfuros dando un color negro al fango (sulfuro ferroso), algunos se tiñen durante parte del año de un color rojo-sangre, provocado por una floración de *Oscillatoria rubescens* (Pesson, 1979).

Naumann (1923) y Pesson (1979), describe a la eutroficación como un aumento de la concentración de elementos fertilizantes especialmente en lo que concierne al nitrógeno y al fósforo.

En cambio Ohle (1963), lo describe como el enriquecimiento en nutrientes y el

consiguiente aumento en la producción vegetal.

La eutroficación produce un exceso de algas y macrofitas en cuerpos de agua, este proceso puede llevar a la total degradación de ríos, estuarios, estanques, etc.; ocasionando problemas en el suministro de agua potable por alteración de sus propiedades organolépticas (olor, sabor), corrosión del equipo hidroeléctrico y distintos trastornos en los procesos de tratamiento de agua por disminución del contenido de oxígeno, acumulación de amoníaco en la columna de agua y disolución de ciertos metales (Fe, Mn) en sedimentos bajo condiciones anóxicas (Salud Ambiental, 2000).

Concentraciones elevadas de fósforo se relacionan con el problema de eutroficación acelerada y la aparición de malezas acuáticas (Taylor, 1997 y Jansson, 1995). En aguas no contaminadas, la concentración de fósforo es de 0.005 a 0.02 mg/L. En México se tienen regiones que superan a 0.5 mg/L, las regiones con este tipo de problema son: Baja California Norte, Baja California Centro, Sonora Sur; los ríos Bravo, Conchos, Presidio, San Pedro, Lerma Santiago, Bajo Pánuco, Bajo Balsas, Coatzacoalcos, Grijalva Usumacinta; las presas Amistad y Falcón. El fósforo presente en los cuerpos de agua refleja la contaminación por detergentes (domésticos e industriales), al mismo tiempo que indica la posible captación de descargas no puntuales como el arrastre de fertilizantes en los lixiviados de la agricultura (INEGI, 1998).

2.2.1.-Efectos de eutroficación.

Contaminación de playas con macroalgas

Daño de componentes de un ecosistema

Daño en el hábitat.

Daño significativo en la vida salvaje y acuática; incluyendo la muerte de peces.

Deterioro de la calidad del agua.

Florecimientos de cianobacterias en ríos y estanques (los cuales pueden ser tóxicos o no-tóxicos).

La pérdida de recursos biológicos.

Los lagos y reservorios tienen características especiales debido a su naturaleza y dinámica que los hace vulnerables a la contaminación. Cuando están cargados de contaminantes provocan la degradación de la calidad del agua y menos diversidad de especies debido a la eutroficación entre otras causas. Los fertilizantes de la agricultura, aguas negras domésticas e industriales, entran constantemente en forma directa a ríos y arroyos.

2.2.2.-Normatividad para el control de la eutroficación

Las características de los lagos para el desarrollo de eutroficación son las siguientes:

Alta Turbiedad

Poca profundidad del agua.

Poca cantidad de fluido.

Ocurrencia de estratificación bajo condiciones normales.

Nivel de fósforo en el fondo

La Norma Oficial Mexicana (NOM-001-SEMARNAT-1996) establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales vertidas a aguas y bienes nacionales, con el objeto de proteger su calidad y posibilitar sus usos, (ver tabla 2).

Tabla 2.-Límites máximos permisibles de la NOM-001-SEMARNAT-1996; (promedio mensual) para (1), (2), (3).

Parámetros (mg/L)	Uso público en ríos (1)	Protección de vida acuática en ríos (2)	Uso público urbano en embalses (3)
Nitrógeno total	40	15	15
Fósforo total	20	5	5

La agencia de protección del medio ambiente de los Estados Unidos (EPA) todavía no ha desarrollado para los cuerpos de agua dulce, los criterios de calidad del agua del fósforo. Los criterios de la EPA para agua de mar y de estuario son de 0.0001 ppm ($\mu\text{g/ml}$) de fósforo elemental, para el control de la eutroficación (EPA, 1986), el fósforo total (PT) no debe exceder de 0.05 ppm en los flujos que entran a lagos y reservorios; 0.025 ppm dentro de lagos y reservorios; y una concentración de fósforo disuelto (PD) de 1 ppm como límite requerido a la salida.

Investigaciones de eutroficación en el Mar Báltico, indican altas descargas de nitrógeno y fósforo 50% y 25% respectivamente, siendo las descargas domésticas responsables del 40-50% de la eutroficación y de otros problemas ambientales. El ser humano produce en sus desechos 4 Kg de nitrógeno y 0.5 Kg de fósforo por año (diariamente 11 g y 1.4 g respectivamente) se utilizan polifosfatos en los detergentes para lograr que sean más eficientes, la utilización de estos por habitante y por año es de 9 Kg (Pesson, 1979).

Si se considera que a nivel mundial en 1995 habían 5,700 millones de habitantes (se estima que la población mundial aumenta cada año en 86 millones); y que México en particular tiene 91,159 mil habitantes (Fondo de Naciones Unidas para la población, 1995) (INEGI, 1998). Se puede concluir que los humanos afectamos el medio ambiente con nuestras actividades y nuestro estilo de vida, provocando daño a nuestra salud y al medio que nos rodea; por lo cual es necesaria una nueva clase de educación ambiental.

2.3.-NUTRIENTES

Una fuente importante de nutrientes son los abonos naturales y artificiales. Por ejemplo, el estiércol y la purina, abonos naturales que aportan al suelo 100 Kg de nitrógeno, 14.5 Kg de fósforo y 65 Kg de potasio por hectárea; perdiéndose por lixiviación del 10-50% del nitrógeno y del 1-5% de fósforo; esto es, de 10-50 Kg de nitrógeno y 0.15-0.75 Kg de fósforo por hectárea. Mientras que los abonos artificiales que se utilizan aportan aproximadamente: 37 Kg de nitrógeno, 13.1 Kg de fósforo / hectárea/ año, perdiéndose hasta 15 Kg y de 0.5 a 2.5 Kg/ hectárea/ año respectivamente (Pesson, 1979).

Las mayores aportaciones de nitrógeno y fósforo tienen su origen en los detergentes, fertilizantes y desechos orgánicos de animales en tierras rural y semirural, áreas residenciales, áreas industriales, jardines urbanos, parques, caminos, etc. (Carmichael y Falconer, 1993); los cuales son lavados por la lluvia y llevados a reservorios utilizados como abastecimientos de agua, ver figura 2.

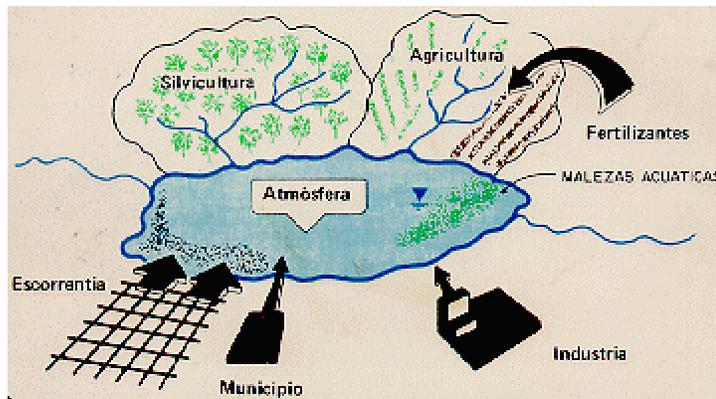


Figura 2.-Aportación de contaminantes a los cuerpos de agua. (CEPIS, 1990).

El nitrógeno puede estar en forma orgánica (oxidado, como proteínas, aminoácidos y vitaminas), y en forma mineral (nítrica, nitrosa y amoniacal); sus fuentes de enriquecimiento son la atmósfera (por precipitación) y la fijación por bacterias y cianofíceas (*Nostocáceas* y *Anabaena variabilis*). Se elimina del agua superficial por la desnitrificación y el consumo de los microorganismos (Pesson, 1979)

Siendo el fósforo el elemento esencial para la vida de las plantas y la producción de cosechas, generalmente es el factor que limita el crecimiento de las algas y de otras plantas acuáticas en las aguas superficiales, por lo tanto también es un factor limitante en la eutrofización (Briand *et al*, 2003).

La concentración crítica del fósforo (fósforo disuelto) que acelera el crecimiento de algas y otras plantas acuáticas es baja de 0.01 µg/ml (fósforo de ortofosfatos con un poco de fósforo orgánico disuelto) y de 0.02 µg/ml para el fósforo total (incluye todas las variedades de fósforo: minerales (fosfatos

disueltos, fosfatos distintos de los orto, y polifosfatos) y orgánicos (fosfato asociado al plancton) la concentración requerida para el crecimiento vegetal en suelo es generalmente de 0.2 a 0.3 µg/ml; la concentración que se genera de los campos agrícolas excede con frecuencia el valor crítico para el crecimiento de la planta acuática (Watanabe y Oishi, 1985). Los sedimentos con una alta concentración de fósforo que entran en un lago pueden contribuir con fósforo biodisponible para el crecimiento eutrófico dependiendo principalmente de las características de los lagos.

2.4.-CIANOBACTERIAS (algas verde-azules)

Las Cianobacterias son consideradas como “fósiles vivientes”, existen registros desde hace más de 3.5 billones de años, siendo uno de los grupos de bacterias más grandes e importantes de la tierra (Briand *et al.*, 2003). Muchos de los aceites depositados en el proteozoico son atribuidos a la actividad de las cianobacterias. Las cianobacterias han sido también importantes en el curso de la evolución y el cambio ecológico a través de la historia de la tierra. El oxígeno de la atmósfera fue generado por numerosas cianobacterias durante las eras Arcaica y Proteozoica, otra gran contribución es el origen de las plantas y de los eucariotes (Ville *et al.*, 1992).

Frecuentemente son llamadas, “algas verde-azules”, este nombre es apropiado por hablar acerca de organismos en el agua que hacen su propia comida, pero no refleja una relación entre las cianobacteria y las algas. A pesar de su nombre solo la mitad de las especies de estas algas presentan esta coloración. El color real de estos organismos es modificado por otros pigmentos fotosintéticos presentes en la célula que producen coloración, café, negra, púrpura, amarilla, verde, azul, hasta roja (el mar rojo debe su nombre a la presencia de estas cianobacterias rojas) (Ville *et al.*, 1992).

Las Cianobacterias pertenecen al reino monera; tienen algo en común con las plantas y bacterias; como algas son fotosintéticas, como bacterias carecen de membranas internas (Rymsza., 1998; Codd, 1993) y son formas de vida procarióticas. El ácido desoxirribonucleico (ADN) se duplica antes de la división celular (que es de tipo asexual) que ocurre por división simple evitando la complejidad de la mitosis. Son acuáticos y fotosintéticos, viven en el agua y pueden producir su propio alimento, usualmente unicelulares. Estructuralmente son muy parecidas a las bacterias pero contienen clorofila (pigmento verde u otros pigmentos) con el que captan la energía de la luz solar para realizar la fotosíntesis. Las cianobacterias carecen de membrana nuclear y de los demás organelos membranosos, como mitocondrias y cloroplastos, presentes en los eucariotes. La clorofila y otros pigmentos no están encerrados en la membrana nuclear, sino que están dispersos a lo largo de la periferia de la célula o apiladas en el citoplasma, donde además hay laminillas fotosintéticas membranosas que efectúan la fotosíntesis en forma similar a las membranas tilacoides de los cloroplastos en las plantas. Las vacuolas gaseosas ayudan a mantener a flote a estos organismos en las

capas de agua (Ville *et al.*, 1992).

Las cianobacterias representan un grupo de gran importancia para su estudio por: su morfología, como organismos procarióticos, su mecanismo de fotosíntesis, fijación de nitrógeno, además de ciertos aspectos de su estructura, por ejemplo vacuolas de gas y genéticos, estos producen una gran variedad de metabolitos secundarios (Hoyos *et al.*, 2003). Prosperan en medios áridos, en agua con abundante fósforo y nitrógeno, muchas veces provenientes de desagües de granjas, parques suburbanos, descargas con detergentes ordinarios de casas y la erosión de los ríos, etc.

A continuación se describen algunas de las características generales.

a) Características generales de las cianobacterias.

a.1.-Secretan una sustancia viscosa que forma una vaina alrededor de la pared celular, este material gelatinoso suele contener pigmentos, y en algunos casos también toxinas que impiden que los peces y otros organismos las utilicen como alimento.

a.2.-Las células de tipo procariótico no presentan membrana nuclear, organelos membranosos (mitocondrias, cloroplastos), núcleos, vacuolas centrales, cilios y flagelos bien definidos.

a.3.-Poseen membranas internas llamadas laminillas fotosintéticas, las cuales contienen clorofila y las enzimas necesarias para la fotosíntesis.

a.4.-La pared celular es muy resistente y no contiene celulosa, pero tiene otros polisacáridos unidos a polipéptidos.

a.5.-Se reproducen asexualmente por fisión binaria.

a.6.-No presentan cromatóforos por lo que los pigmentos fotosintéticos están disueltos en el citoplasma periférico, este al envejecer desarrolla un gran número de vacuolas llenas de gas, lo que hace que suban a la superficie y floten.

a.7.-Cuando mueren producen mal olor y abatimiento de oxígeno disuelto debido a su descomposición (características propias de los “blooms” o florecimiento algal).

a.8.-Florecimientos benéficos son producidos por millares de células libres cerca de la superficie del agua.

a.9.-Florecimientos putrefactos están formados por masas de algas en proceso de degradación.

a.10.-Los florecimientos son resultado de la eutroficación acelerada por

contaminación doméstica, agrícola e industrial.

a.11.-Algunas cianobacterias llevan a cabo fijación de nitrógeno, utilización de la luz como fuente de energía, y CO₂ como fuente de carbono, son productores de oxígeno y materia orgánica para otros organismos (Ville *et al.*, 1992).

a.12.-Algunas son capaces de tolerar ambientes extremos de salinidad, temperatura y pH que matan a las algas y otros organismos.

Dentro de los metabolitos secundarios se encuentran compuestos que actúan como hormonas, antibióticos, aleloquímicos y toxinas. Las toxinas tienen un efecto dañino en otros organismos, tejidos, células, etc.

No se conoce el por qué (o la finalidad) de que las cianobacterias produzcan toxinas, pero se puede asumir que funcionan como compuestos protectores (como un mecanismo de defensa), ya que muchos compuestos antiherbívoros se producen en plantas vasculares (Kotak., 1994).

En 1878 George Francis publicó el primer reporte de envenenamiento cianobacterial; sin embargo, es en los últimos 30 años cuando se ha publicado información de la función y estructura de los alcaloides neurotóxicos y péptidos hepatotóxicos de la cianobacteria. Las neurotoxinas son referidas a anatoxinas mientras las hepatotoxinas han sido llamadas microcistina, cyanoginosina, y cyanoviridin. Desde 1965, el término microcistina es frecuentemente usado cuando se describen las hepatotoxinas producidas por cepas o florecimientos de *Microcystis*.

Cyanoginosina-XY es el término que se utiliza para definir químicamente las hepatotoxinas (heptapéptido monocíclico) aislados de cepas de *Microcystis aeruginosa*, los sufijos XY designan los dos L-aminoácidos variables encontrados en todas las hepatotoxinas (figura 3).

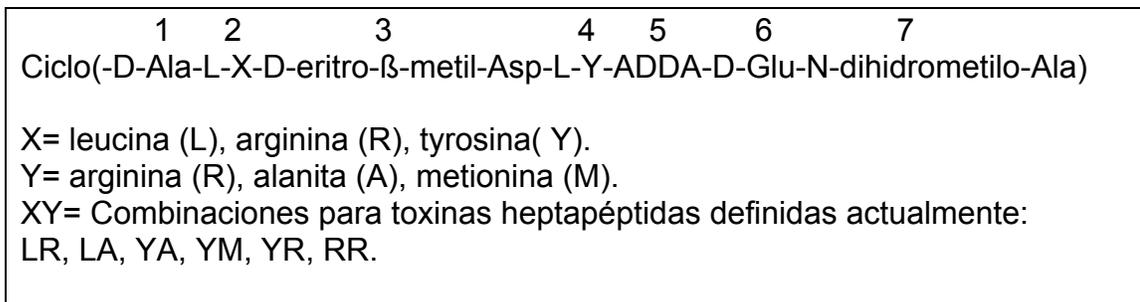


Figura 3.-Estructura general de las hepatotoxinas (Falconer *et al.*, 1988, Nishizawa, 1999., Mazur y Plinski, 2001).

Las Cianobacterias crecen muy bien en fuentes superficiales para consumo

humano y forman el verdín, especialmente cuando las condiciones son apropiadas.

La combinación de luz y temperatura altas en junio y julio hacen que estos períodos sean más susceptibles a la formación de florecimientos. Se requieren flujos bajos para producir florecimientos durante junio a agosto con condiciones de luz y temperatura arriba de lo normal (Bryant, 1986), de tal manera que las condiciones para el desarrollo de un florecimiento cianobacteriano son:

- a) Abundancia de nutrientes nitrogenados y fosforilados.
- b) pH neutro a básico (entre 6 y 9).
- c) Temperatura del agua entre 15 y 30 °C.
- d) Viento suave o en calma.

Las cianobacterias pueden deteriorar la calidad del agua por producir olores picantes y sabor que puede dar al agua de beber un carácter a tierra o a rancio. Sin embargo, las sustancias que imparten estos olores y sabores no poseen un riesgo a la salud humana. Por otro lado la producción de espuma a lo largo de la línea costera, por presencia de cianobacterias decrementan el valor recreativo de un lago (Barry., 1999).

El alcance del riesgo que las cianotoxinas poseen sobre la salud humana depende de la exposición humana a esas toxinas. Las principales rutas de exposición a las mismas incluyen la vía oral y la dérmica a través del consumo agua potable y del uso recreativo del agua, en cuyo caso existen tres rutas de exposición:

- Contacto directo con el agua.
- Ingestión accidental del agua.
- Inhalación del agua.

La inhalación del agua en forma de spray podría ser otra ruta importante pero la información disponible al respecto es aún limitada (CEPIS, 2005).

Brown (1999) ha propuesto una conexión diferente entre cianobacterias y Vibrio cholerae; donde el crecimiento de miembros de la familia Vibrionacea es estimulado por inducción de ciclos energéticos del sodio donde el crecimiento de la cianobacteria en el agua salobre es autocatalítica y el sodio estimula la alcalinidad del ciclo en cianobacterias y donde el resultado incrementa el crecimiento de la alcalinidad. La alcalinización y el incremento acompañado de componentes de disolventes orgánicos, resultado del florecimiento, puede inducir el ciclo de sodio en la Vibrionacea, incluyendo a la especie Vibrio cholerae. La diseminación de la enfermedad puede estar ocurriendo cuando el agua del florecimiento es usada o dispersada.

b.-Microcystis aeruginosa

Microcystis aeruginosa es la cianobacteria más común que puede producir toxinas naturales (llamadas Microcistinas), que son muy potentes. Las toxinas Microcistinas son producidas y contenidas en el interior de células de Microcystis aeruginosa y son relacionadas con el agua, cuando las células mueren y se desintegran, las toxinas son liberadas, algunas células al ser muy pequeñas, pueden ser ingeridas con el agua (figura 4). Los niveles de toxina en los cuerpos de agua tienden a ser altos en sitios cercanos a la orilla y a la superficie donde es más probable el contacto con animales y humanos (Ding y Han., 1998).

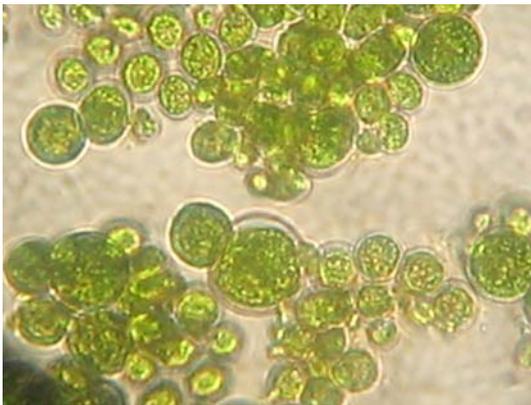


Figura 4.- Microcystis aeruginosa, obtenida del cultivo con BG11 realizado en el laboratorio de Calidad del agua (IMTA).

Las hepatotoxinas microcistina LR y YR se detectaron en extractos de algas congeladas, secas; y en tejidos del mejillón colectado de un arrecife adyacente al arroyo fuera del flujo del mar. Se prohibió inmediatamente la recolección de mariscos a la comunidad que normalmente depende de este recurso para sus ingresos y su alimentación (Harding., 1999).

3.-PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

3.1.-PROBLEMÁTICA EN MÉXICO.

El agua es un recurso esencial en términos económicos y sociales. Su uso racional y de conservación tiene cada vez mas importancia, al punto de ser ahora uno de los factores críticos mas importantes del desarrollo a nivel mundial. Por esto, la contaminación del agua en un futuro no muy lejano, constituirá el problema ambiental al que se enfrentaran millones de personas.

De acuerdo con las estadísticas de la Comisión Nacional del Agua (CNA) para 2003, la precipitación anual promedio en México es de 772 mm, la cual equivale a un volumen promedio de 1 528 Km³ de agua que, junto a los 49.8 Km³ que se reciben de Estados Unidos y Guatemala, totalizan 1577.8 Km³. De esta cantidad, la mayor parte (70%) regresa a la atmósfera por evapotranspiración y alrededor de 469 Km³ del líquido queda disponible (84% del mismo escurre superficialmente y el resto se incorpora a los acuíferos). La disponibilidad de agua es muy diferente entre las regiones hidrológicas del país, mientras que en la región de la Frontera Sur la disponibilidad natural promedio de agua es mayor a 155 Km³, en la región del Río Bravo no llega a los 15 Km³ y en Baja California es inferior a los 5 Km³ (CNA, 2003).

La disponibilidad natural del agua se expresa generalmente como el volumen de agua por habitante por año. En 2001, el volumen fue mayor a 469 km³, equivalente a 4 685 m³/hab/año (volumen que corresponde a una categoría de disponibilidad baja). Valores menores a 1 700 m³/hab/año se consideran como de estrés hídrico, lo que puede significar desabasto de agua, sobre todo en las temporadas secas. Las características topográficas y geográficas que tiene México, producen una condición hidrológica muy particular con fuertes contrastes en la disponibilidad de agua. El Valle de México, con menos de 200 m³/hab/año, tiene una disponibilidad extremadamente baja, mientras que la región de la Frontera Sur, con sus más de 25 000 m³/hab, cuenta con una disponibilidad muy alta del líquido. Considerando las regiones que tienen una disponibilidad natural base media inferior a los 1 700 m³/hab/año, existen más de 30 millones de personas en situación de estrés hídrico en México. Es importante resaltar que el agua disponible no debe interpretarse como "disponible para uso humano", ya que incluye al líquido necesario para el mantenimiento de los ecosistemas acuáticos, como ríos y lagos (CNA, 2003).

Aunado a esto, las condiciones orográficas y las características propias de las latitudes en las que se ubica México hacen que la distribución de la lluvia sea irregular, por lo que existen zonas áridas (31% del territorio), semiáridas (30%) y húmedas o subhúmedas (33%). De tal manera que un habitante de Baja California dispone de unos 100 m³ de agua por año mientras que en Chiapas le corresponden 17, 000 m³ (CNA, 2003).

En México, hay más de 650 acuíferos. A nivel nacional se extrae aproximadamente el 36% del volumen estimado de la recarga anual, sin

embargo, a nivel regional la situación es diferente. En las regiones administrativas de la Península de Baja California, Cuencas Centrales del Norte y el Valle de México, la extracción es mayor a la recarga (déficit del 9, 26 y 7% respectivamente), mientras que en la Península de Yucatán y la Frontera Sur, la extracción no supera el 6% del volumen de recarga. El problema de la sobreexplotación de acuíferos es importante. En el año 2001, 97 acuíferos (15% del total) estaban sobreexplotados, 17 presentaban problemas de intrusión salina (13 contaban con ambos problemas). El uso racional del agua subterránea es indispensable, ya que en el futuro cada vez más regiones dependerán de la reserva en el subsuelo como su principal fuente de agua. En la actualidad el 70% del agua que se suministra a las ciudades proviene de los acuíferos

En el año 2001, el principal uso consuntivo del agua en México fue el agropecuario (78% del total extraído), seguido por el público urbano y doméstico (13%) y el industrial y autoabastecida (9%). Las hidroeléctricas emplearon para su funcionamiento un volumen promedio de 145 km³ anuales, pero no la consumieron. La proporción de agua que se utiliza en las diferentes actividades muestra diferencias importantes. Mientras que en la región del Pacífico Norte se destinó más del 93% del agua a la agricultura, en la del Golfo Centro el volumen no alcanzó el 50%. El agua que se destina al uso agrícola e industrial proviene principalmente de fuentes superficiales, en contraste con la que se destina al uso público que proviene en su mayoría de fuentes subterráneas (CNA, 2003).

La calidad del agua dulce se puede establecer con base en sus niveles o concentración de sustancias químicas u organismos. En México se utiliza el Índice de Calidad del Agua (ICA), el cual agrupa varios parámetros capaces de indicar un deterioro en la calidad del agua. Para que el agua sea destinada a uso y consumo humano este índice debe tener un valor entre 80 y 90 (INEGI, 1997).

Debido a que la Red Nacional de Monitoreo de la CNA se encuentra permanentemente evaluando la calidad del agua de los ríos, arroyos, lagunas y embalses, se puede conocer su grado de contaminación de forma continua.

En 1994, el 68% de las muestras analizadas de agua superficial presentaron serios problemas de contaminación, el 59.1% resultó contaminada mientras que el 8.8% estuvo fuertemente contaminada. El 18 % de las muestras excesivamente contaminadas tenían un índice de 0-40; y solo el 7.1% calificaron aceptablemente con un índice promedio de 83.9 (Martínez, 1998).

Las descargas de aguas municipales se utilizan para riego de cultivos (ejemplo, forraje y maíz) la que no es utilizada para este fin se vierte sin tratar a ríos, lagos, embalses, lagunas y aguas costeras.

El agua residual que retorna a las corrientes es de 30.6 Km³ la cual tiene cierto grado de contaminación; el sector agrícola genera el 69.4% de este volumen, sus contaminantes son residuos agroquímicos y restos de suelos desprendidos de la erosión. La industria genera el 6.7% conteniendo una amplia gama de contaminantes. Un 23.9% se vierte a través de descargas municipales conteniendo materia orgánica y bacterias, algunos compuestos tóxicos provienen de descargas industriales que están conectadas al sistema de alcantarillado (Martínez, 1998).

Como resultado de este tipo de descargas a los cuerpos de agua, se produce la eutroficación, con ello un exceso de algas y macrofitas, proceso que puede llevar a la total degradación de estuarios, estanques etc; ocasionando problemas en el suministro de agua potable por alteración de sus propiedades organolépticas (olor, sabor), corrosión del equipo hidroeléctrico y distintos transtornos en los procesos de tratamiento de agua por disminución del contenido de oxígeno, acumulación de amoníaco en la columna de agua y disolución de ciertos metales (Fe, Mn) en sedimentos bajo condiciones anóxicas (Salud ambiental, 2000).

Si bien, los lagos presentan de manera natural eutroficación, después de varios años; debido al incremento de nutrientes (nitrógeno y fósforo), provenientes principalmente del uso de fertilizantes, lixiviación de suelos y detergentes: ésta se ha visto acelerada en los últimos 30 años. La eutroficación provoca el crecimiento excesivo de malezas como macrofitas y algas, lo cual limita el aprovechamiento de agua para uso y consumo humano, así como para las actividades humanas tales como la industria, la pesca, y la construcción (Pesson, 1979; . Watanabe y Oishi., 1985).

Una de las consecuencias es la proliferación de cianobacterias, como el género *Microcystis*, productoras de hepatotoxinas que son toxinas endógenas, las cuales son liberadas cuando las células mueren. Los niveles de toxina en los cuerpos de agua tienden a ser altos en sitios cercanos a la orilla y a la superficie del agua donde es más probable el contacto con animales (Kotak, 1994).

La mayor parte de los eventos de intoxicación en el mundo han sido provocados por hepatotoxinas. La intoxicación aguda produce disgregación de los hepatocitos, necrosis de los capilares sanguíneos y la muerte por hemorragia intrahepática; la ingesta continua de dosis sub-letales tiene efectos crónicos graves comprobados tales como la producción y estimulación de tumores hepáticos (Lawton y Codd, 1991; Carmichael y Falconer, 1993). Se sospecha que la elevada tasa de cáncer de hígado en ciertas partes de China se debe a la exposición prolongada a pequeñas dosis de microcistinas.

El desarrollo de un florecimiento cianobacteriano ocasiona problemas de calidad del agua que incluyen mal olor, sabor, problemas en los sistemas de tratamiento del agua y toxicidad. Cuando sucede un florecimiento de este tipo,

generalmente se aíslan cepas toxígenicas como fue el caso en Finlandia (40% en 1990), Canadá (90% en 1993) y Wisconsin (34% en 1990). La aparición de estos florecimientos por lo general son asociados a daños inmediatos en la salud de animales silvestres, domésticos y hasta el hombre. Además el consumo de toxinas cianobacterianas a largo plazo, se ha relacionado a una gran cantidad de casos de tumores y cáncer de hígado (Carmichael, 1994; Martínez, 1998).

En México existen importantes problemas de eutroficación debido a la alta concentración de fósforo, producto de la contaminación por detergentes (domésticos e industriales) y el arrastre de fertilizantes en los lixiviados de la agricultura. Por lo que se ha comenzado a tener conciencia de la importancia que representa esta contaminación en sus cuerpos de agua, debido a esto se ha comenzado junto con otros países a buscar medidas de prevención y control por dicha contaminación.

Un problema adicional se presenta durante la cloración de aguas tomadas de un embalse con densas poblaciones de microalgas, ya que aumenta la concentración de trihalometanos (THM'S) (Tsuji *et al.*, 1997) y ácidos haloacéticos (HAA), por reacción del cloro con las sustancias orgánicas disueltas excretadas por las algas. Las cianobacterias liberan proporcionalmente grandes cantidades de sustancias orgánicas disueltas (Fogg *et al.*, 1973). Los THM'S y HAA son compuestos que se ha demostrado que son altamente cancerígenos.

Con la finalidad de analizar las metodologías para la evaluación de la eutroficación y su control, las estrategias para que sean incluidas en el proceso de planificación de los gobiernos se han reunido, desde diciembre de 1981, el Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente (CEPIS), el Centro Especializado de la División de Salud Ambiental (HEP), la Organización Panamericana de la Salud/ Organización Mundial de la Salud (OPS/ OMS) (Salas, Martino, 1990) en el que participan además, México y 15 países más incluyendo a Brasil, Puerto Rico, y Venezuela.

En la primera etapa finalizada en 1990 se creó una herramienta que permite la planificación de embalses futuros y estima las medidas correctivas para enmendar los problemas de eutroficación a través del control de macronutrientes. En la segunda etapa se pretende realizar la evaluación del impacto de control de nutrientes (Salas, Martino, 1990).

4.-MARCO TEORICO

4.1 CLASIFICACIÓN DE LAS TOXINAS.

4.1.1.-Citotoxinas

No existen reportes de que las cianobacterias sean responsables de casos de envenenamiento de animales muertos en el campo. Por lo que no se puede asegurar que sean letales a animales, pero presentan un amplio espectro de bioactividad en contra de líneas de algas, bacterias, hongos y células mamíferas (Environmental Health, 1999).

Patterson realizando sus investigaciones (1991), encontró enzimas, antibióticos, y agentes anticáncer (Environmental Projection, 1992) en las cianobacterias.

Las cianobacterias tienen un buen potencial para generar sustancias farmacológicas útiles como son los siguientes antibióticos citotóxicos:

Indocarbazoles
Isonitrilos
Paraciclofanos
Tantazoles

Estos antibióticos se aislaron de cianobacterias que en su mayoría procedían de agua dulce y fuentes terrestres (Carmichael, 1992).

4.1.2.-Biotoxinas

Desde el siglo XIX, existe registro de envenenamiento implicando enfermedades y muerte por shock de hígado en animales domésticos y salvajes, seguido de la ingestión de agua conteniendo células de cianobacterias tóxicas o las toxinas liberadas por las células viejas (Nehring, 1993., Bell & Codd., 1994, Harding *et al.*, 1995, Mez *et al.*, 1997., Plinski & Codd., 1997., Pouria *et al.*, 1998., Codd *et al.*, 1999, Morris *et al.*, 2000).

Las biotoxinas detectadas en suministros superficiales de agua dulce, producidas por los géneros Anabaena, Aphanizomenon, Microcystis, Nodularia, Nostoc y Oscillatoria. Las biotoxinas Coelosphaerium, Cylindrospermopsis, Fischerella, Gloeotrichia, Gomphosphaeria, Hapalosiphon, Microcoleus, Schizothrix, Scytonema, Spirulina, Symploca, Tolypothri y Trichodesmium han demostrado ser tóxicas pero todavía no han sido aisladas ni caracterizadas.

Estas toxinas son probadas con animales pequeños (ratones o invertebrados acuáticos (Pesson, 1979). Y son clasificadas de acuerdo a su modo de acción en neurotoxinas y hepatotoxinas.

4.1.3-Neurotoxinas

Son producidas por cepas de Anabaena, Aphanizomenon, Oscillatoria, y Trichodesmium. La tabla 3 muestra las toxinas producidas por diferentes cepas de cianobacterias.

Tabla 3.-Toxinas producidas por las diferentes cepas de cianobacterias.

CEPA	TOXINA	LD ₅₀ INTRAPERITONIAL EN RATÓN
<i>Anabaena flos-aquae</i>	Anatoxina-a	200 µg/kg
	Anatoxina-(a)s	50 µg/kg
<i>Aphanizomenon flos--aquae</i>	Aphatoxina	10 µg/kg
<i>Nitzchia pungens</i>	Acido domoico	-
<i>Microcystis aeruginosa</i>	Microcistina-LR	50 µg/kg
<i>Nodularia</i>	Nodularia	50 µg/kg

Tomado de Rinehart *et al.*, 1994.

Anatoxina-a fue la primera toxina de agua dulce químicamente y funcionalmente definida, es una amina secundaria 2-acetil-9-azobicyclo (4,2,1) non-2 (Carmichael., 1992). Se han detectado signos de toxicosis en casos de animales domésticos y salvajes incluyendo tambaleo, fasciculación muscular, gritos y convulsiones.

Signos clínicos de toxicosis en ratón, ratas y vacas, por dosis aplicadas en el laboratorio dan como resultado los siguientes síntomas: un proceso de fasciculación muscular, decremento de movimiento, colapso, exagerada respiración abdominal, cianosis, convulsiones y muerte.

La ingestión de neurotoxinas puede conducir a la muerte de animales pequeños en 5 minutos. La muerte es resultado de la parálisis de los músculos involucrados en la respiración y detección respiratoria debido a bloqueo neuromuscular Anatoxina-a y/o inhibición de la colinesterasa Anatoxina-a (s), dependiendo de la toxina en particular de que se trate. Evidencia circunstancial ha relacionado las muertes de ganado y otros animales salvajes a Anatoxina-a en Alberta, Canada (Kotak, 1994; Carmichael, 1992).

4.1.4.-Hepatotoxinas

Son toxinas que afectan al hígado y conforman una familia de al menos 60 péptidos cíclicos anulares (Morris *et al.*, 2000), emparentados entre sí. Los que están constituidos por siete aminoácidos reciben el nombre de microcistinas; los formados por cinco aminoácidos, nodularias. Estos nombres reflejan su origen ya que las toxinas se aislaron primero de miembros de los géneros Microcystis y Nodularia.

Estas toxinas son producidas por cepas de los géneros Microcystis, Anabaena, Nodularia, Oscillatoria y Nostoc. Signos de hepatotoxicosis han sido

observados en envenenamientos en campo implicando ganado vacuno, ovejas, caballos, cerdos, patos y otros animales domésticos y salvajes; los signos de envenenamiento implican debilitamiento, anorexia, palidez de membranas mucosas, vómito, frío de extremidades y diarrea, la muerte ocurre en pocas horas o pocos días después de la exposición inicial y puede ser precedida por coma, temblores musculares, respiración forzada; la muerte es más como resultado de hemorragia intrahepática y choque hipovolémico.

El resultado de muerte por hemorragia intrahepática se basa en el incremento en el peso del hígado (arriba del 100% en animales pequeños de laboratorio), existe pérdida de sangre suficiente para inducir un shock irreversible (Carmichael, 1987 y Rao, 1994).

El mecanismo de acción de estas hepatotoxinas está siendo investigado a nivel laboratorio. Se piensa que la toxina puede ser absorbida dentro de la sangre desde el intestino, donde puede reflejar la actividad de abundante ácido biliar llevado, cuando dirige las toxinas péptidas, de un lado al otro de la mucosa. Existe evidencia de que la toxina es preferencialmente transportada al interior de los hepatocitos, el mecanismo de entrada se cree que es vía la sal del ácido biliar; mecanismo de transporte que aún no ha sido comprobado. Los cambios inducidos por la acción de las hepatotoxinas, en el citoesqueleto celular, conducen a una densa agregación de los microfilamentos próximos al centro de la célula. Esto da como resultado pérdida de soporte celular. Por lo que las células se vuelven redondas y se provoca una destrucción de las células del endotelio sinusoidal. Con destrucción de las células del parénquima y sinusoidales del hígado, ocurre hemorragia intraperitoneal letal (dentro de horas) y la insuficiencia hepática (dentro de días). Ciertos químicos han sido usados experimentalmente para prevenir hepatotoxicidad en animales de laboratorio. Estos incluyeron cyclosporina-A, rifampin, y silymarin. Con un mayor éxito cuando son suministrados antes o coadministrados con la toxina (Carmichael, 1992).

4.1.4.1-MICROCISTINAS

El primer reporte de estas hepatotoxinas fue hecho por Bishop (1959) quién las aisló de cepas de *Mycrocystis aeruginosa*. Esta fue llamada después microcistina por Konst (1965). Krishnamurthy (1986-1989) quién encontró la toxina Microcistina-LR (leucina-arginina) en Norwegian (al Sur de Africa) en un florecimiento de *Microcystis aeruginosa* y en *Anabaena flos-aquae*. La primera y definitiva estructura de Microcistina-LR fue definida por Rinehart (1988) (Carmichael, 1992).

Las colonias de microcistina flotan libremente, son irregularmente esféricas, pueden ser microscópicas o macroscópicas; con una matriz gelatinosa transparente y cuando son preservadas se rompen fácilmente. Son conocidas por ser dañinas para el hígado a concentraciones altas y promotoras de tumores cancerígenos a bajas dosis, usualmente por causar daño al ADN

(Nishiwaki *et al.*, 1992 y Humpage *et al.*, 2000).

Existen seis géneros involucrados en la muerte de peces, caballos, perros, pollos, vacas, ardillas y otros animales: Microcystis sp., Nodularia sp., Coelospharium sp., Gloeotrichia sp., Anabaena sp. y Aphanizomenon sp. Acumulando estas algas en las orillas y en las partes menos profundas de los embalses.

a).-Principales características de la toxina Microcistina LR.

Hasta ahora hay 24 ciclos heptapeptídicos (en la figura 5 se presentan algunas estructuras existentes de las microcistinas) (Briand *et al.*, 2003, conocidos como epímeros no tóxicos de Microcistina-LR y Microcistina-RR. Estas microcistinas difieren en sus combinaciones L-aminoácido, siendo MCYST-LR la más común con o sin grupos metilo o aminoácidos 3, 5 y 7. Las toxicidades de estas microcistinas no son muy diferentes, solo varían en sus pesos moleculares, como se observa en la tabla 4 (Carmichael, 1992).

Tabla 4.- Pesos moleculares de algunas Microcistinas.

PESOS MOLECULARES DE MICROCISTINAS	
CIANOTOXINA	PESO MOLECULAR
Microcystin-LA	909
Microcystin-LR	994
Microcystin-YR	1044
Microcystin-YM	1035
Microcystin-RR	1037

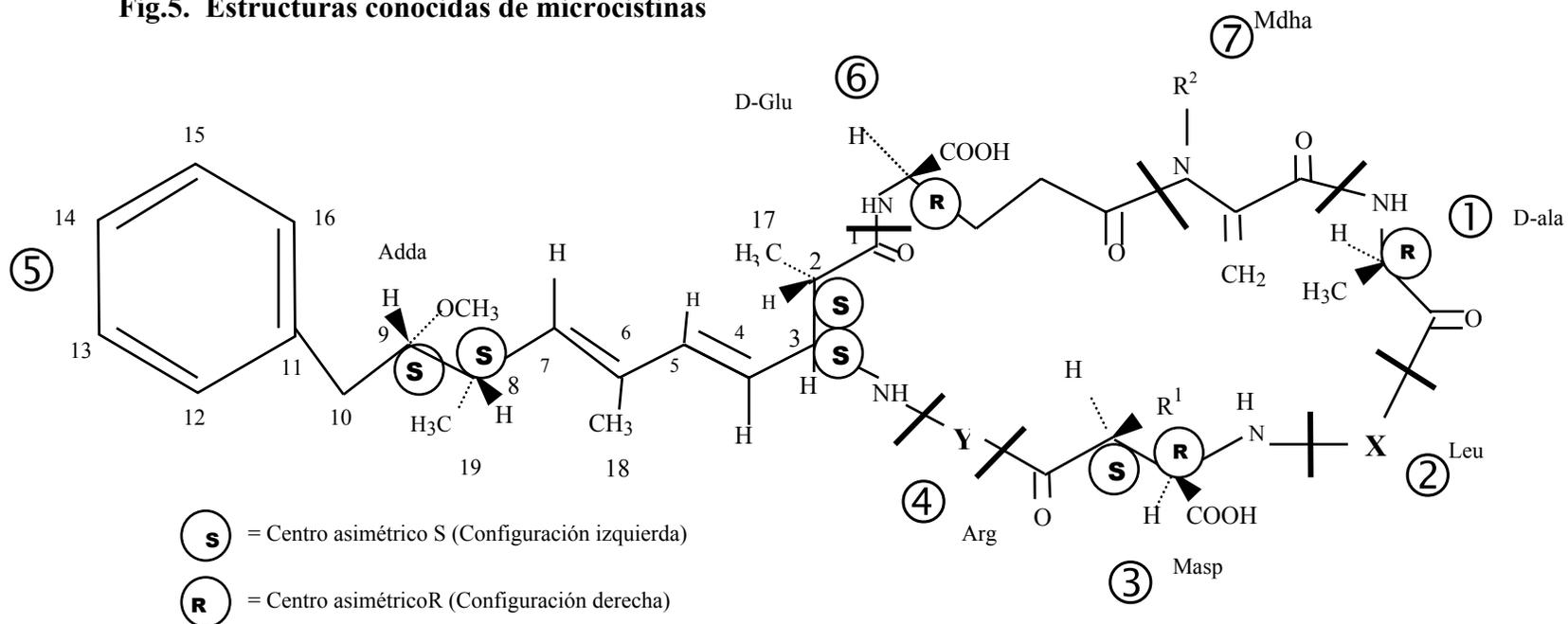
El grupo ácido 3-amino-9-metoxi- 2, 6, 8-trimetil-10-decafenil- 4, 6-dienoico (ADDA), es el componente estructural principal para la actividad biológica. Durante la purificación de microcistina por HPLC con frecuencia es eluido un pico pequeño cercano al pico principal de la toxina. Cuando se analizó este pico pequeño se encontró que era isómero geométrico de la toxina. En la figura 6 se observa la isomerización localizada en el C-8, posición de ADDA. Las toxinas asociadas con estos picos secundarios son Microcistina-LR (leucina, arginina) y Microcistina-RR (arginina, arginina). Los isómeros mostrados en la figura 6, demostraron no ser tóxicos arriba de 1 mg/kg vía inyección intraperitoneal en bioensayo en ratón como se observa en la tabla 5.

Tabla 5.- Toxicidad aguda de varias cianotoxinas

CIANOTOXINA	ORGANISMO	VÍA	LD50
Microcystin-LR	ratón	i.p.	50 µg/Kg
Microcystin-LR	ratón	oral	3-4 mg/Kg
Microcystin-LR	rata	i.p.	70-120µg/Kg
Aphantoxina	ratón	i.p.	10 µg/Kg

i.p.= inyección intraperitoneal

Fig.5. Estructuras conocidas de microcistinas



MCYST-LA:	X=Leu;	R ¹ = CH ₃ ;	Y= Ala ;	R ² =CH ₃	909
MCYST-M(O(R:	X=Met(O);	R ¹ = CH ₃ ;	Y= Arg ;	R ² =CH ₃	1028 Metionina-sulfoxido-arginina
MCYST-YA:	X=Tyr;	R ¹ = CH ₃ ;	Y= Ala ;	R ² =CH ₃	959
MCYST-LR:	X=Leu;	R ¹ = CH ₃ ;	Y= Arg ;	R ² =CH ₃	994
MCYST-FR:	X=Phe;	R ¹ = CH ₃ ;	Y= Arg ;	R ² =CH ₃	1028 Fenilalanina-arginina
MCYST-AR:	X=Ala;	R ¹ = CH ₃ ;	Y= Arg ;	R ² =CH ₃	952
MCYST-YM:	X=Tyr;	R ¹ = CH ₃ ;	Y= Met ;	R ² =CH ₃	1018
MCYST-RR:	X=Arg;	R ¹ = CH ₃ ;	Y= Arg ;	R ² =CH ₃	1037
MCYST-RR:	X=Arg;	R ¹ = H ;	Y= Arg ;	R ² =CH ₃	1023
MCYST-RR:	X=Arg;	R ¹ = H ;	Y= Arg ;	R ² =H	1009
MCYST-YR:	X=Tyr;	R ¹ = CH ₃ ;	Y= Arg ;	R ² =CH ₃	1044
MCYST-HtyrR:	X= Htyr ;	R ¹ = CH ₃ ;	Y= Arg ;	R ² =CH ₃	1055
MCYST-HtyrR:	X= Htyr ;	R ¹ = H ;	Y= Arg ;	R ² =CH ₃	1044
MCYST-WR:	X= Trp ;	R ¹ = CH ₃ ;	Y= Arg ;	R ² =CH ₃	1067 Triptofan-arginina

El aminoácido "ADDA" ha sido una herramienta útil en la investigación de microcistina, proporciona a la molécula características de absorbancia con longitud de onda de 238 nm, se piensa que se atribuye al grupo dieno conjugado en la cadena larga de carbono de este aminoácido poco común.

La mitad de ADDA es también necesaria para la toxicidad y es importante en el enlace de la toxina a la proteína fosfatasa. La estereoquímica aproximada de los dienos del grupo ADDA ha presentado también influencia en la toxicidad, al igual que los niveles de metilación de varias estructuras en el péptido cíclico. Se ha visto que ocurre una marcada reducción en la toxicidad cuando sufren alteraciones los dobles enlaces del grupo ADDA, este grupo también es responsable de la actividad biológica de las toxinas (Mazur y Plinski, 2001). Ocurren muchas reducciones pequeñas en la toxicidad con la saturación de N-dehidrometilalanina (Mdha) (Harada, 1990). La absorbancia de ADDA da un análisis significativo de microcistinas, separándolas por HPLC.

b).-Toxicidad de las cianotoxinas.

Las microcistinas son conocidas por ser un potente inhibidor de ciertas enzimas (proteína fosfatasa); estas funcionan en conjunto con otras enzimas-proteína quinasa para regular el número del grupo fosfato de las proteínas. Las quinasas añaden grupos fosfato y las fosfatasas los eliminan; se sabe que los péptidos inducen la contracción de los hepatocitos (células funcionales del hígado) y éstas de ordinario muy empaquetadas, se separan. Lo mismo sucede con los capilares sinusoidales del hígado. Las microcistinas y nodularias son químicamente estables (Mazur y Plinski., 2001)

Las hepatotoxinas péptidas o microcistinas, acumuladas predominantemente en el hígado, producen sus efectos tóxicos a través de la inhibición específica de los tipos de proteína fosfatasa 1 (PP1) y 2A (PP2A) (Latí., 1997). Aunque estas moléculas son químicamente distintas, actúan exactamente de la misma forma que la toxina de mariscos, el ácido okadaico.

La alta frecuencia de cáncer de hígado en algunas regiones de China ha sido directamente relacionada a las repetidas exposiciones de personas a microcistinas a través de consumo de agua (Vinagre *et al.*, 2003).

Estas toxinas causaron los envenenamientos agudos y la muerte de muchos animales; repetidamente en Alberta, Canada y quizás muchos más en todo el mundo. No son extraños los reportes de animales salvajes y domésticos (ganado vacuno, rebaños, cerdos, ciervos, ardillas, gansos, y patos (Kotak, 1994), moribundos (en 10 minutos) o muertos, a lo largo de la orilla de cuerpos de agua con florecimientos cianobacterianos.

El potencial de envenenamiento depende de:

1.- La concentración de la toxina producida por la Cianobacteria.

- 2.- La densidad del florecimiento en el agua.
- 3.- La cantidad de agua ingerida.
- 4.- La cantidad de células ingeridas por el animal.
- 5.- El tamaño del animal.
- 6.- La cantidad de alimento en el estómago.
- 7.- Condición fisiológica del animal.

En Canadá se realizó un estudio, inyectando animales de laboratorio con Microcistina-LR, resultando signos clínicos de envenenamiento, piloerección, entorpecimiento, pérdida de coordinación, palidez de las extremidades y trabajo respiratorio lento. La muerte puede ocurrir en poco tiempo, en 40 minutos aproximadamente.

Los seres humanos generalmente no nadan o no están en contacto con lugares que están infestados con algas, pero si un florecimiento es altamente tóxico (ejemplo. si la cianobacteria está produciendo una gran cantidad de toxina por unidad de biomasa) la ingestión accidental de un volumen mínimo de agua puede ser suficiente para causar problemas de salud. Se tienen reportados en la literatura incidentes de envenenamiento en humanos (ejemplo: nadadores que accidentalmente tragan agua, o bien cuando beben agua contaminada con cianobacteria tóxica). Es raro el tener exposición de humanos a gran cantidad de toxina en un período de tiempo relativamente corto; en cambio exposición de humanos a bajos niveles de las toxinas en un período de tiempo largo puede ser altamente probable (Kotak, 1994).

El primer efecto tóxico de microcistinas en el hígado a muy altas dosis, es la muerte de células hepáticas y destrucción de los vasos sanguíneos que pueden resultar en serias lesiones y posiblemente en la muerte del organismo afectado.

No se han establecido límites máximos para microcistina total en agua de consumo humano; por lo cual Estados Unidos, Canadá, Australia, Gran Bretaña y la Organización Mundial de la Salud (OMS) han sugerido como referencia 1 µg/L o 1 ppb; sin embargo, generalmente es excedido (Briand *et al.*, 2003).

Las cepas PCC 7820 (una cepa que produce la hepatotoxina microcistina-LR (MC-LR) y CYA 43 (una cepa que produce pequeñas cantidades de MC-LR) cultivadas de *M.aeuroginosa* producen dos ácidos grasos con potentes efectos inhibitorios de la enzima p-nitrofenol fosfatasa (pNPPase) dependiente de K⁺. La liberación de estos productos después del lisado del florecimiento cianobacterial, puede ayudar a explicar la muerte de peces a través de un disturbio en el funcionamiento de las braquias (Codd, 1997).

En la cuarta Conferencia Internacional de Cianobacteria Tóxica; en la Universidad de Duke en el Laboratorio de Marina en Beaufort, al norte de Carolina del 27 de septiembre al 1 de octubre de 1998, se trataron algunos

puntos relacionados con las cianotoxinas, con la finalidad de comprender por que algunas toxinas son potentes; y otras prometen salud y beneficios terapéuticos, así como temas relacionados a la toxicidad en laboratorio, pruebas desarrolladas en animales, detección de la toxina, regulación y estudios ecológicos. De acuerdo a Carmichael en un gran número de laboratorios en todo el mundo se esta estudiando a la cianobacteria. Carmichael (investigador de las cianobacterias y profesor de biología acuática y toxicología de la Universidad de Dayton, Ohio), siendo Microcistina el tema común en muchas presentaciones, ya que es producida en las células de algunas cianobacterias. En 1996 en Caruaru, Brasil, se relacionó la presencia de microcistinas en agua con el fallo al hígado y subsecuente muerte de 55 pacientes de diálisis en una clínica. En menos de seis meses; el 84% de los pacientes sufrieron de náusea, vómito, dolor de cabeza e interrupción visual, incluyendo ceguera. Los envenenamientos ocurrieron a pesar de métodos de tratamiento de agua previos a su utilización en la diálisis (Pouria *et al.*, 1998). También microcistina ha sido sospechosa de muertes por uso de agua contaminada durante la diálisis, en una clínica de Portugal. Finalmente Carmichael no descarta que Estados Unidos pueda tener problemas de toxicidad por agua durante el proceso de diálisis en sus clínicas.

Aunque desde hace más de un siglo las cianobacterias han sido implicadas en la muerte de ganado y otros animales que beben agua contaminada, los efectos en seres humanos apenas se empiezan a presentar sobre todo en la población marginada que se ve forzada a bañarse y usar agua de estos florecimientos cianobacterianos. Los efectos son envenenamientos agudos, irritación por contacto, ingestión accidental y exposición a bajas dosis (que puede resultar en cáncer de hígado).

Otro aspecto de riesgo es el consumo de algas verde-azules las cuales se promueven como benéficas a la salud. En Estados Unidos y Canadá más de 1 millón de habitantes las consumen en cápsulas o tabletas (Barry., 1999).

4.2.- DIFERENTES TIPOS DE TOXICIDAD

Existen diferentes tipos de toxicidad, su clasificación se realiza de acuerdo a la exposición que se tiene con los seres vivos son:

a) La que conduce a una manifestación aguda y se deriva de exposiciones repentinas de corta duración. Dependiendo de la dosis recibida y del tipo de sustancia, pueden ocurrir alteraciones en diversos órganos y sistemas con diferente grado de severidad y reversibilidad, que incluso puede producir la muerte.

En estudios de laboratorio realizados con ratones se administraba diariamente por vía oral Microcistina-LR en cantidades de 40, 200 y 1000 µg/kg de peso del cuerpo durante 13 semanas. A partir de 200 µg/kg comenzaron a verse cambios en el hígado, mientras que con la dosis más alta todos los animales

presentaban inflamaciones crónicas, degeneración focal de los hepatocitos. En los machos las transaminasas se elevaron significativamente, mientras que la transferasa gamma glutamil se vio reducida.

En otro estudio con cerdos, se administraron extractos de *Microcystis aeruginosa* en el agua durante un período de 44 días, en dosis equivalentes a microcistinas de 280, 800 y 1310 µg/kg de peso del cuerpo. No se observaron efectos para la dosis más baja, mientras que en las dos dosis más altas se observaron lesiones en el hígado.

b) La crónica, resultante de la exposición continua. Las manifestaciones patológicas tardan en hacerse aparentes, pueden producir la muerte si no se interrumpe la exposición.

Una dosis diaria oral de extracto de *Microcystis aeruginosa* (en dosis equivalentes a microcistinas desde 750-12,000 µg de Microcistina-YM por Kg. de peso del cuerpo) durante un año, fue aplicada en ratones obteniendo resultados para las concentraciones más altas de toxina. Se observó que en los ratones donde se aplicaban las dosis más altas, se incrementaba la mortalidad, se observaban lesiones crónicas en el hígado y había evidencia de formaciones tumorales, a pesar de que no se detectó cáncer. Éste y otros estudios han establecido que el consumo oral de agua con extractos de *Microcystis* actúa como promotor en la formación de tumores.

De acuerdo con el tipo de alteración que producen se clasifica a las sustancias como neurotóxicas (si afectan al sistema nervioso), nefrotóxicas (si dañan los riñones), hepatotóxicas (si producen efectos en el hígado), teratogénicas (si producen malformaciones congénitas) y mutagénicas o genotóxicas (si inducen cambios genéticos).

Cuando el daño ocurre en un sitio distante del lugar de ingreso de la sustancia al organismo, se dice que se trata de toxicidad sistémica, para diferenciarla de la tóxica que ocurre en el sitio de contacto (Goodman, 1979).

4.2.1.-Límites establecidos para Microcistinas.

Los límites que se establecen a continuación son por el total de microcistinas y son expresadas por equivalentes de Microcistina-LR.

La OMS (Organización Mundial de la Salud, 2004) ha realizado evaluaciones con respecto al impacto de las microcistinas sobre la salud humana. Se ha concluido en que no hay suficiente información para realizar normas que establezcan límites aceptables para microcistinas que no sean Microcistina-LR. El límite establecido por la OMS para agua potable es de 1µg/l de Microcistina-LR. Este valor es provisional, debido a la poca información disponible.

Tanto el Codex Alimentarius como el Código Alimentario Argentino no hacen

mención alguna sobre las microcistinas y sus valores admisibles en agua potable.

Los límites australianos, país que se dedica intensivamente al estudio de problemas con cianobacterias en especial *Microcystis*, determinan un máximo admitido de 1,3 µg/l. Esta diferencia con el valor establecido por la OMS se debe a diferentes valores establecidos para el peso corporal Standard (70kg contra 60Kg).

$$1.3 \mu\text{g/L} = (40 \mu\text{g/kg de peso corporal} * 70 \text{ Kg.} * 0.9) / (2 \text{ L/día} * 1000)$$

Donde:

40 µg/Kg de peso corporal por día es el nivel máximo en donde no se observan efectos (NOAEL) sobre un estudio de ingestión en ratones durante 13 semanas de Microcistina-LR tomando como efectos los daños hepatológicos.

70 Kg. es el peso estándar de un adulto.

0.9 es la proporción afectada del total de agua bebida.

2 L/día es el consumo medio de agua en un adulto.

1000 el factor de seguridad a partir de la extrapolación de animales a humanos.

Esto fue establecido en el trabajo monográfico de Biología II de la carrera de Ingeniería en Alimentos, por la profesora María Andel (UADE), en Australia. (Braga., 1998).

4.3.- FLORECIMIENTO ("BLOOM ")

Florecimientos de cianobacterias frecuentemente ocurren en lagos y ríos de recreación usados para realizar deportes (natación, canotaje, etc.) durante la temporada de verano.

En verano en los meses de agosto, septiembre y octubre (Hoffman, 1996) suele ocurrir un rápido incremento en la población de microorganismos acuáticos fotosintéticos (cianobacteria o fitoplancton) que hacen que el agua se decolore y los microorganismos produzcan toxinas, lo cual la hace inadecuada para beber; si hay un florecimiento de cianobacterias puede matar todos o casi todos los peces de un lago o estanque.

Florecimientos extensivos de cianobacterias verde-azul dominado por *Microcystis aeruginosa* han ocurrido en forma constante en los últimos veranos a lo largo del río Nause (E.U.A) con períodos de bajo flujo (Bryan, 1986). Estos son fenómenos naturales que ocurren en cuerpos de agua con altos niveles de nutrientes, cuando las condiciones son favorables: períodos largos de luz solar

que proveen temperaturas altas, la temperatura óptima medida en el laboratorio de 27.5 °C (Bryant, 1986), energía necesaria para la fotosíntesis, y condiciones de vientos escasos o nulos. La temperatura afecta la relación de crecimiento e intensidad de luz para estos organismos; por lo que las poblaciones de cianobacterias pueden dominar el medio ambiente acuático local. Generalmente estas están presentes en embalses, pero pueden encontrarse en ríos durante la época de sequía o cuando su flujo es reducido por irrigación y uso casero.

Estos fenómenos tienen gran importancia ecológica y sanitaria, debido especialmente a síntesis de toxinas como metabolitos secundarios.

Cuando billones de células cianobacterianas agotan el oxígeno que necesitan para vivir provocan su descomposición y la liberación de toxinas que afectan la salud humana y animal provocando la muerte de muchos organismos acuáticos.

Se han observado nadadores jugando en la espuma verde y tomando sus fotografías con líneas de espuma verde sobre sus cuerpos. Un grupo de reclutas del ejército Británico como parte de su entrenamiento fue un día completo a nadar y remar en canoas, en el lago con florecimiento tóxico de *Microcystis* (variedad de cianobacteria) los soldados desarrollaron ampollas en su boca, sufrieron de vómito y diarrea, úlceras y en dos casos neumonía aguda. Los florecimientos cianobacterianos de *Microcystis* que ocurren en todo Australia, han sido causa de muchos casos de envenenamiento de ganado en el sur de Nuevo Gales y Victoria. En muestras cianobacterianas de agua de río se ha encontrado que contienen el mismo veneno paralizante que está presente en el envenenamiento por mariscos. Es importante el potencial de algunas de las toxinas cianobacterianas para estimular el crecimiento de cáncer, esto ha sido demostrado en experimentos con animales. Existe evidencia de cáncer en humanos asociado con agua de beber contaminada.

En Estados Unidos se han reportado datos que prueban que el 40% de todos los florecimientos cianobacterianos fueron tóxicos durante el verano de 1987; reportes de Scandinavia y otras áreas de Europa encontraron un porcentaje similar (Carmichael, 1992). En la tabla 6 se muestran los sitios de diferentes países en los cuales han ocurrido florecimientos.

Tabla 6.-Lugares donde se han presentado florecimientos tóxicos.

LUGAR	REFERENCIA
Lago Alberta Edmonton Canadá 1993.	
Florida de mayo de 1994 a mayo de 1997. E.U.A	Steidinger, 1997
Lago Klamath, Oregon agosto-octubre 1995-1996 E.U.A	The toxins, 1997
Caruaru, Brazil 1998	Pouria <i>et al.</i> , 1998

Lago Erie; Ohio E.U.A 1996-1997	Taylor, 1997
Ten Mile; Oregón, E.U.A. 1997.	
Lago Rodo en 1998. Uruguay.	
Lago Sammamish 5-Septiembre –1998.	
Río de la Plata febrero 1999	León, 1999

En general, se han presentado florecimientos cianobacterianos en casi todo el mundo; los países mencionados por la literatura son: Argentina, Japón, Canadá, Nueva Zelanda, E.U.A, Portugal, Francia, Suecia, Italia, URSS (International Environmental Technology, 1997; Carmichael, 1988; Kotak, 1991).

4.4.-CULTIVO, AISLAMIENTO Y METODOS PARA LA DEGRADACION DE MICROCISTINA-LR.

4.4.1-Métodos de cultivo y concentración de Microcistinas.

Watanabe (1983), elaboró un método sencillo para aislar Cianobacterias, que consiste con ayuda de un paño de tela, en lavar varias veces las colonias colectadas con solución fisiológica salina. Este método logra retirar microorganismos que no son de interés para este estudio. Las células son removidas del paño con la ayuda de una pipeta Pasteur, son resuspendidas en una solución salina, posteriormente se observan al microscopio y finalmente una gota de estas células se coloca en un tubo de ensaye con tapón de rosca con medio de cultivo adecuado. Se cultivan a 25° C, con condiciones de luz de 20-30 $\mu\text{E}/\text{m}^2$. El crecimiento de las células cianobacterianas es de aproximadamente un mes, el cambio en el color es un indicativo de crecimiento.

El medio de cultivo BG11 se utilizó para el cultivo de *Microcystis aeruginosa* (Kruger y Elfo, 1981; Codd y Poon, 1988), este medio contiene una gran cantidad de nitrato de sodio, correspondiente a 247mg de nitrógeno por litro. Carmichael en 1988 utilizó este medio para el cultivo de *Ondularia spumigena* aislada de agua salada, después se adicionan 10g de cloruro de sodio (NaCl) por litro. Anteriormente se había probado un medio de cultivo elaborado con los mismos componentes que contiene el medio BG11, pero no contenía nitrato de sodio, con lo cual la cantidad de nitrógeno disponible era menor. Se determinó que para que *Microcystis* se desarrolle favorablemente debe haber una fuente rica en nitrógeno. No se produjo toxina Microcistina- LR del cultivo de *Microcystis*, debido a que al eliminar los depredadores naturales y tener una cepa pura, *Microcystis* no tiene necesidad de generarla por que no se ve atacada.

4.4.2.- Métodos para la degradación de Microcistinas

Las aguas contaminadas por la actividad humana pueden, en general, ser procesadas eficientemente por plantas de tratamiento biológico, por adsorción con carbón activado u otros adsorbentes, o por tratamientos químicos convencionales (oxidación térmica, cloración, ozonización, permanganato de potasio). En la tabla 7 se muestran algunas de las tecnologías avanzadas de oxidación. En algunos casos estos procedimientos resultan inadecuados, por lo que se está recurriendo en los países industrializados al uso de las llamadas Tecnologías o Procesos Avanzados de Oxidación (TAOs, PAOs) (Legrini, 1993; Bolton, 1994). Estos procesos se basan en procesos fisicoquímicos capaces de producir cambios profundos en la estructura química de los contaminantes.

El Concepto fue inicialmente establecido por Glaze y colaboradores (Huang, 1993; Doménech et al., 2002), quienes definieron los PAOs como procesos que involucran la generación y uso de especies transitorias poderosas, principalmente el radical hidroxilo (HO·) el cual puede ser generado por medios fotoquímicos (incluida la luz solar) o por otras formas de energía, y posee alta efectividad para la oxidación de materia orgánica.

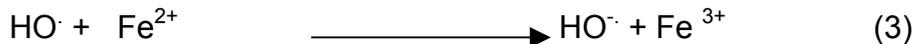
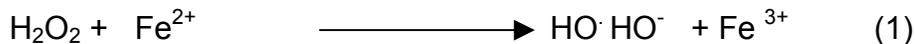
Tabla 7.-Tecnologías avanzadas de oxidación

PROCESOS NO FOTOQUÍMICOS	PROCESOS FOTOQUÍMICOS
Ozonización en medio alcalino(O ₃ /OH)	Oxidación en agua sub/ y supercrítica
Ozonización con peróxido de hidrógeno (O ₃ /H ₂ O ₂) y relacionados	Procesos fotoquímicos
Procesos Fenton (Fe ²⁺ /H ₂ O ₂) y relacionados	Fotólisis del agua en el ultravioleta de vacío (U VV)
Oxidación electroquímica	UV/peróxido de hidrógeno
Radiólisis y tratamiento con haces de electrones	UV/O ₃
Plasma no térmico	Foto-Fenton y relacionadas
Descarga electrohidráulica-Ultrasonido	Fotocatálisis heterogénea

4.4.2.1.- Fenton

El proceso Fenton ha resultado efectivo para degradar compuestos alifáticos y aromáticos clorados, PCB's, nitroaromáticos, colorantes azo, clorobenceno, PCP, fenoles, fenoles clorados, octacloro-p-dioxina y formaldehído. Los compuestos que no pueden ser atacados por este reactivo son pocos, entre ellos la acetona, el ácido acético, el ácido oxálico, las parafinas y los compuestos organoclorados (Bigda, 1995). Es un buen oxidante de herbicidas y otros contaminantes de suelos tales como hexadecano o Dieldrin. Las ventajas del método son varias: el Fe (II) es abundante y no tóxico, el peróxido de hidrógeno es fácil de manejar y ambientalmente benigno. No se forman compuestos clorados como en otras técnicas oxidantes.

La reacción de Fenton es conocida como un método alternativo de generación de especies muy reactivas (Walling, 1975). Sales de metales de transición, tales como Hierro pueden activar H_2O_2 en las reacciones subsecuentes:



El radical hidróxilo $HO\cdot$ y el radical superóxido $HO_2\cdot$ convierten el sustrato a la forma del radical, el cual subsecuentemente es oxidado y dimerizado. Los procesos de activación empleados de H_2O_2 por sales de hierro tienen un uso efectivo al tratar aguas contaminadas con varios compuestos orgánicos, incluyendo contaminantes nitroaromáticos (Li, 1997).

4.4.2.2-Foto-Fenton

La reacción de Fenton aumenta su eficiencia por iluminación debido a varios factores:

La fotólisis de hidroxicomplejos de Fe^{3+} es una fuente adicional de $HO\cdot$



El $Fe(II)$ foto generado de esta manera produce grupos $HO\cdot$ a través de la ecuación, y continúa el ciclo.

Permite el uso de longitudes de onda desde 300 nm hasta el campo visible.

Las concentraciones de $Fe(II)$ a emplearse pueden ser de órdenes de magnitud menores, que en la reacción de Fenton convencional.

Si se usan radiaciones menores que 360nm, se puede aprovechar la producción de $HO\cdot$ generada por fotólisis del H_2O_2 .

El método es eficiente pero tiene la desventaja de que debe agregarse H_2O_2 continuamente y mantener condiciones ácidas. Trata con éxito compuestos nitroaromáticos, fenoles policlorados, herbicidas (2,4D y 2,4,5-T) y plaguicidas.

5.-HIPOTESIS:

Los métodos de oxidación avanzados: radiación Ultravioleta, Fenton y Foto-Fenton son capaces de degradar la acción de la toxina Microcistina-LR.

6.-OBJETIVO GENERAL

Degradar la toxina Microcistina-LR, utilizando métodos avanzados de oxidación.

6.1.-OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Probar el efecto de la aplicación de la radiación de luz Ultravioleta sobre la toxina Microcistina-LR.
- ❖ Probar el efecto de oxidación al utilizar el método de reactivo de Fenton sobre la toxina Microcistina-LR.
- ❖ Probar el efecto de oxidación aplicando el método de Foto-Fenton sobre la toxina Microcistina-LR.

7.- METODOLOGÍA

Con la finalidad de obtener la Microcistina-LR a partir del ambiente, se monitoreo la presencia (florecimientos) de Microcystis aeruginosa en la presa “Valle de Bravo” particularmente en las estaciones “Amanalco”, “Centro” y “Cortina” durante los años 2001 y 2002. Tales monitoreos anteceden la presencia de florecimientos abundantes (los datos de la concentración reportada se muestran en el anexo 1) de Microcystis aeruginosa en el mes de julio.

Pero fue hasta el año 2004 cuando en la estación de “Cortina” de la presa “Valle de Bravo” se presentó un florecimiento abundante de la cianobacteria, razón por la cual se decidió obtener la toxina de este embalse.

7.1.-OBTENCIÓN DE LA TOXINA MICROCISTINA-LR.

Se recolectó muestra de la cianobacteria Microcystis aeruginosa en la estación “Cortina” de la presa “Valle de Bravo”, con la cual se realizó el cultivo “in Vitro”, teniendo como propósito la obtención de la toxina Microcistina-LR, en el laboratorio. El cultivo se logró realizar, pero no generó la toxina, debido a que se utilizó una cepa pura, la cual al no tener depredadores naturales que la atacaran, no necesitó producirla. Para ver detalles del procedimiento de cultivo ver anexo 2.

Como se mencionó anteriormente y debido a que no se logró obtener la toxina Microcistina-LR en el laboratorio, se recurrió a traer el agua de la presa de Valle de Bravo. En el año 2004 en la estación Cortina se presentaron grandes manchas de acumulación de células lo que dio indicio de una acumulación de cianofitas, por lo que se tomaron 20 litros de agua y se transportaron en baño de hielo al laboratorio de Calidad del Agua del IMTA (Instituto Mexicano de Tecnología del Agua). Una vez en el laboratorio los 20 litros de agua fueron distribuidos en reservorios de plásticos de 1 litro y congelados a -20° C para su posterior concentración y purificación.

7.2.-CONCENTRACION Y PURIFICACIÓN DE LA TOXINA

Para la concentración de la muestra, se procedió a colocarlas en baño de ultrasonido durante 3 periodos de 30 minutos cada uno, esto con la finalidad de descongelarlas y ayudar al rompimiento de las células para liberar la toxina que hay en su interior; para eliminar las partículas de gran tamaño se filtró a través de un filtro Whatman # 40 y después por una membrana de nylon de 0.2 mm de poro. Una vez filtrada, la muestra se llevó a cabo la extracción de la toxina mediante la técnica de extracción en fase sólida (Solid Phase Extraction) por sus siglas en inglés SPE utilizando un cartucho C18 conforme a la siguiente metodología:

- 1.-Acondicionar pasando a través del cartucho C18 y con ayuda de vacío, 4 ml de metanol.
- 2.-Agregar al cartucho C18, 10 ml de una solución A (95% de Fase de Acetato de amonio 10mM pH=7 \pm 0.2 y 5% de metanol).
- 3.-Pasar a través del cartucho acondicionado 500 ml de muestra, evitando que se seque.
- 4.-Adicionar 10 ml de la solución A (95% de Fase de Acetato de amonio 10mM pH=7 \pm 0.2 y 5% de metanol), con la finalidad de limpiar el cartucho de compuestos que no son de interés.
- 5.-Agregar 4 ml de la solución B (76.5% de Fase de Acetato de amonio 10mM pH=7 \pm 0.2, 18.5% de Acetonitrilo, y 5% de metanol) para retirar compuestos ajenos a Microcistina-LR.
- 6.-Eluir la Microcistina-LR con 2 porciones de 4 ml de la solución C (60% de Fase de Acetato de amonio 10mM pH=7 \pm 0.2, 35% de Acetonitrilo y 5% de metanol), cada porción se recolecta por separado; siendo la primera en la que se tiene la mayor concentración.
- 7.-La extracción obtenida se liofilizó con la finalidad de eliminar la solución C.

Después de la extracción, se procedió a la cuantificación de la Microcistina-LR mediante la técnica de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC). Para determinar la concentración de la toxina se preparó una curva de calibración utilizando un estándar de Microcistina-LR (marca Sigma, lote 110k1672, clave M-2912, con una pureza de 95%, en una presentación liofilizada de 500 μ g, los cuales se resuspendieron en 10 ml de metanol, obteniendo una concentración de 50 μ g/ml) en las concentraciones de 1, 2, 4, 6, 8 y 10 μ g/ml ($r^2=0.995$).

7.3 MÉTODO ANALITICO (CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN).

Para poder detectar, analizar y monitorear la existencia de la toxina Microcistina-LR, se generó un método analítico, basado en la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución (conocido como CLAR ó HPLC).

El cual consiste en utilizar un estándar de Microcistina-LR de marca Sigma (lote 110k1672, clave M-2912, con una pureza de 95%, de 500 μ g, los cuales se resuspendieron en 10 ml de metanol, obteniendo una concentración de 50 μ g/ml).

El cromatógrafo empleado para el análisis de Microcistina-LR, fue un equipo Hewlett Packard modelo 1050, con bomba cuaternaria, inyector automático y

detector de luz ultravioleta y una columna marca Supelco, Supelcosil LC-18 de fase reversa (de 25 cm, 4.6 mm, 5 μ m 58298) col:16922-02. (Martínez, 2000).

Tiempo de corrida: 30 minutos.

Longitud de onda: 238 nm.

Volumen de inyección: 25 μ l

Flujo: 1.0 ml/min.

Contenido de los reservorios:

A: Agua desionizada.

B: Acetato de amonio 10 Mm pH 7

C: MeOH.

D: Acetonitrilo.

Gradiente utilizado:

Time	% B	% C	% D
0.00	95.0	5.0	0.0
15.0	93.0	5.0	2.0
20.0	60.0	5.0	35.0
24.0	60.0	5.0	35.0
25.0	93.0	5.0	2.0

Nota: El tiempo de corrida para realizar los experimentos de Fenton se redujo a 15 minutos, utilizando el mismo gradiente.

7.4.-DEGRADACIÓN DE LA TOXINA MICROCISTINA-LR MEDIANTE MÉTODOS DE OXIDACIÓN AVANZADOS DE RADIACIÓN UV, FENTON Y FOTO-FENTON.

Las muestras y la degradación de la toxina Microcistina-LR (análisis cualitativo y cuantitativo) así como Ultravioleta, Fenton y Foto-Fenton, fueron analizados por el método analítico de HPLC.

La toxina purificada y cuantificada se disolvió en agua desionizada para realizar las pruebas de degradación con los diferentes métodos de oxidación. Para radiación UV se utilizaron 7 μ g/ml, para Fenton y Foto-Fenton 4 μ g/ml.

7.4.1.-Radiación con UV.

La toxina purificada que se utilizó fue cuantificada con la curva de 1-10 μ g/ml, la concentración obtenida al ser superior a 10 μ g/ml, y salir del rango de la curva, dio una concentración errónea; por lo que al colocar la cantidad de toxina requerida para obtener una concentración de 4 μ g/ml, y tomar el vial inicial y cuantificar la cantidad de toxina inicial la concentración obtenida fue

de 7 $\mu\text{g/ml}$, en un volumen de 11ml con agua grado Milli-Q (con una conductividad < 1 micromho/cm).

El agua milliQ que contenía una concentración de de 7 $\mu\text{g/ml}$ de toxina, se colocó en 11 viales de vidrio transparente de 1.8 ml de capacidad, 1 ml de esta mezcla se distribuyó a cada uno de los viales; después se irradiaron a diferentes tiempos de exposición (15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135, 150 minutos) con una lámpara de UV de 36 W (WHI-36W-PLL, Philips Lighting Company) de $\lambda=365\text{nm}$. Para monitorear la degradación de la toxina se analizaron los viales en los diferentes tiempos de exposición mediante HPLC, con dicho análisis se determinó la disminución en la concentración de la toxina en relación al tiempo transcurrido. Se realizaron tres repeticiones de este experimento, utilizando la misma concentración de 7 $\mu\text{g/ml}$, con la finalidad de corroborar los resultados.

7.4.2-Reacción Fenton

Todas las soluciones fueron preparadas en un vial cónico de 11 ml en el cual se colocó la cantidad de toxina y las cantidades de los reactivos necesarios. Los reactivos utilizados son: peróxido de hidrógeno (marca Aldrich, estabilizado al 30%), sulfato ferroso heptahidratado (marca Baker, grado reactivo). necesarios para realizar cada proceso, se aforo a 11 ml con agua grado Milli-Q (conductividad < 1 micromho/cm), después se agitaron para lograr un mezclado homogéneo y se colocó 1 ml de muestra en viales transparentes de 1.8 ml de capacidad, los cuales posteriormente fueron analizados en HPLC.

Nota: Para todos los experimentos de Fenton, el pH fue ajustado a < 5 unidades con ácido sulfúrico 1.0M, antes de adicionar los reactivos de fenton.

EXPERIMENTO 1.-Todas las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente, en un vial cónico de 11ml se colocó una concentración inicial de 4 $\mu\text{g/ml}$ de Microcistina-LR en un vial cónico, se adicionaron las siguientes concentraciones: 0.25mM de Peróxido de hidrógeno y 0.25 mM de Sulfato de fierro, los reactivos fueron mezclados de manera manual, agitándolos, 1 ml de la muestra se distribuyo en cada uno de los 11 viales de 1.8 ml de capacidad, se colocaron en el automuestreador de HPLC y se inyectaron 25 μl de muestra cada 15 minutos, en este caso se monitoreó hasta 600 minutos.

EXPERIMENTO 2.- Se adicionó una concentración de 0.5 mM de Peróxido de hidrógeno y 0.25 mM de Sulfato de fierro, y una concentración de 4 $\mu\text{g/ml}$ de Microcistina-LR en un vial cónico de 11 ml, después de ser agitados para que la reacción se llevara a cabo, la mezcla se distribuyo colocando 1 ml de la solución en viales de 1.8 ml de capacidad, se inyectaron 25 μl en el HPLC, cada 15 minutos, para monitorear la toxina microcistina-LR, en este caso se monitoreo hasta 450 minutos

EXPERIMENTO 3.-Se utilizó una concentración de reactivos 10 veces mayor que la del experimento 2, usando concentraciones de 5 mM de Peróxido de hidrógeno y 2.5 mM de Sulfato de fierro, y una concentración de 4 µg/ml de Microcistina-LR, al igual que en los otros experimentos esto se llevó a cabo en un vial cónico de 11 ml, se agitó y distribuyo 1 ml de la solución en cada vial de 1.8 ml de capacidad, inyectando 25 µl en el HPLC cada 15 minutos, para monitorear la toxina microcistina-LR. Con base en las experiencias de los experimentos anteriores, se monitoreo hasta 200 minutos.

7.4.3-Reacción Foto-Fenton

Para los experimentos de Foto-Fenton se utilizó la lámpara de UV de 36 W (WHI-36W-PLL, Philips Lighting Company) de $\lambda=365\text{nm}$. La reacción se llevo a cabo en un vial cónico de vidrio a 11 ml, en el cual se mezclaron la toxina Microcistina-LR, y los reactivos de Fenton (Sulfato de Fierro y peróxido de hidrógeno), se coloco 1ml de muestra en viales de 1.8 ml de capacidad, después fueron expuestos a radiación UV hasta alcanzar el tiempo de radiación deseado, la reacción se detuvo adicionando 0.025 ml de la solución de catalasa 0.1g/L (marca Sigma 2200 UA/mg).

EXPERIMENTO 1.- Se utilizó una concentración de 0.15mM de Peróxido de hidrógeno y 0.25mM de Sulfato de fierro , y la concentración inicial de microcistina-LR de 4 µg/ml, en forma inicial se colocaron todos viales dentro de la cámara de UV, y se retiraron de uno en uno cada 5 minutos, adicionando la cantidad de catalasa requerida para detener la reacción; se inyectaron 25 µl en el HPLC, se monitoreo la reacción durante 50 minutos.

EXPERIMENTO 2.- La concentración utilizada de reactivos en este experimento fue de 0.25mM de Peróxido de hidrógeno y 0.25mM de Sulfato de fierro, y 4 µg/ml microcistina-LR de concentración inicial, todos los viales se colocaron dentro de la cámara de UV, cada 5 minutos se van retirando de uno en uno, se adicionó un excedente de catalasa para asegurar que la reacción no continuara, se inyectaron 25 µl en el HPLC, el tiempo de monitoreo fue de 50 minutos.

EXPERIMENTO 3.- Para este experimento se adiciono el doble de la concentración de Peróxido de hidrógeno utilizada en el experimento 2, utilizando 0.5mM de este reactivo, y 0.25mM de Sulfato de fierro, así como 4 µg/ml de Microcistina-LR de concentración inicial, los 11 viales fueron colocados dentro de la cámara de UV, cada 5 minutos se retiraba uno de los viales. Para asegurar el alto total de la reacción, se adicionó el doble de la cantidad calculada de catalasa que requería. Se inyectaron 25 µl de cada uno de los viales en el HPLC monitoreando este experimento durante 50 minutos.

8.-RESULTADOS, ANALISIS Y DISCUSIÓN

8.1.-MUESTREO EN VALLE DE BRAVO

Durante los años 2001-2002, se llevó a cabo muestreos en los tres sitios (Amanalco, Centro y Cortina) de la Presa Valle de Bravo, tomando una muestra de aproximadamente 500 ml por cada punto (ver tablas 12,13 y 14 del anexo 1).

En el año 2001 se tomó muestra de agua de los sitios antes mencionados, llevadas al laboratorio, congeladas y descongeladas, y después filtradas, para ser analizadas en forma directa, tomando una alícuota, sin purificación, e inyectando al HPLC, por lo que tenía el pico cromatográfico de la toxina, además de otros picos de compuestos no identificados, obteniéndose los datos mostrados en la figura 7, para mayor información consultar el anexo 1

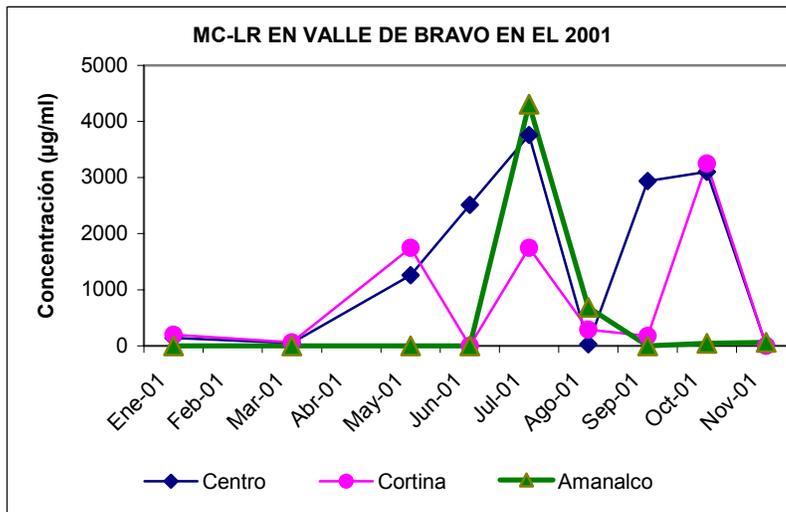


Figura 7.- Concentración de MC-LR durante los meses del año 2001, en tres estaciones de Valle de Bravo.

En el año 2002, los muestreos a estos sitios continuaron, dándonos mayor información, sobre los meses en que hay mayor concentración de Microcistina-LR en la presa Valle de Bravo, observando que durante los meses de marzo y julio, la estación Centro, alcanza altas concentraciones, y que para los sitios Cortina y Amanalco se detecta una concentración alta de 480-1200 µg/ml, durante los meses de abril y julio (figura 8).

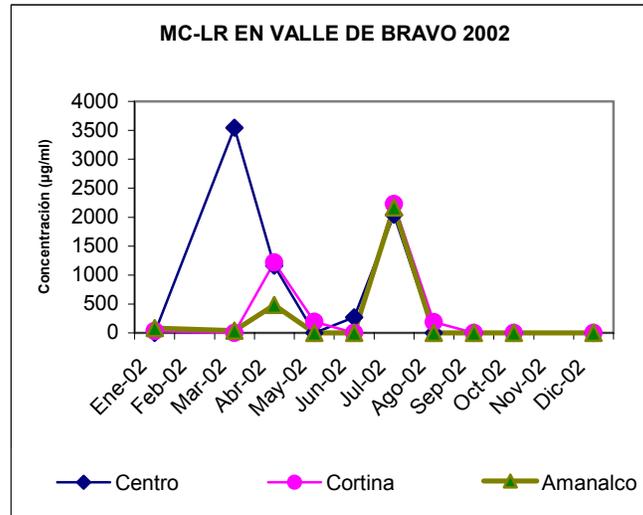


Figura 8.- Microcistina-LR durante el año 2002, en tres estaciones de Valle de Bravo.

Comparando los resultados de los 2 años, 2001 y 2002 se observa una concentración alta en la estación Cortina en el mes de julio, así como para las estaciones centro y Amanalco, para la estación centro la máxima concentración se alcanza en el mes de marzo con 3542 µg/ml. Estos datos nos sirvieron de antecedente para saber que en este embalse la proliferación de cianobacterias era de *Microcystis aeruginosa*, principal productora de microcistina-LR, y que durante el mes de julio (figura 9), es cuando hay mayor concentración en al menos tres sitios de la Presa Valle de Bravo. Al no obtener toxina Microcistina- LR del cultivo in vitro, se optó por utilizar muestra traída de la Presa de Valle de Bravo, siendo el mes de julio donde se detecta una gran concentración de conglomerados de cianofitas en la estación cortina, por lo que se tomó muestra superficial de este sitio, y se llevó al laboratorio para concentrar y purificar la tóxina microcistina-LR.

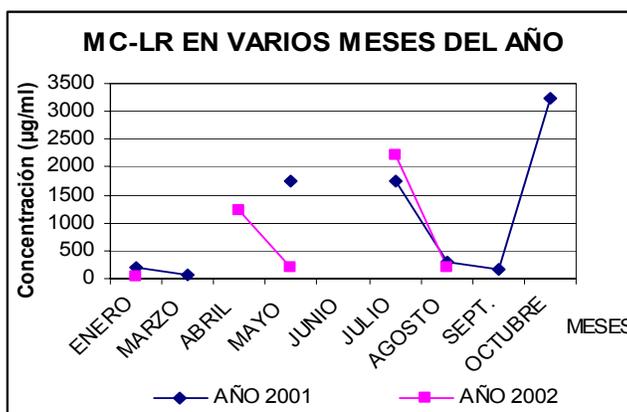


Figura 9.- Concentración de MC-LR, presentada en la Estación Cortina durante los meses del período 2001-2002.

8.2.-ESTANDAR

Con la finalidad de cuantificar la cantidad de toxina que se obtuvo al romper la células de *Microcystis aeruginosa* y concentrar la toxina, se realizó una curva de calibración en la cual se obtuvo un $r^2=0.995$, se utilizó un estándar de Microcistina LR de marca Sigma, lote 110k1672, clave M-2912 con una pureza de 95%, se disolvieron 500 μg en 10 ml de metanol grado HPLC lote TEC-488-RP19, Marca Tecsiquim. Y se obtuvo una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, a partir de esta concentración se elaboraron los estándares de 1, 2, 4, 6, 8 y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, se inyectaron en el HPLC, y se obtuvo la curva (ver figura 10). Se utilizó dicha curva para determinar la concentración de la toxina (100-500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) obtenida del embalse Valle de Bravo, esta curva también se utilizó para monitorear y cuantificar la concentración de Microcistina -LR y dar seguimiento a la degradación con los métodos propuestos anteriormente.

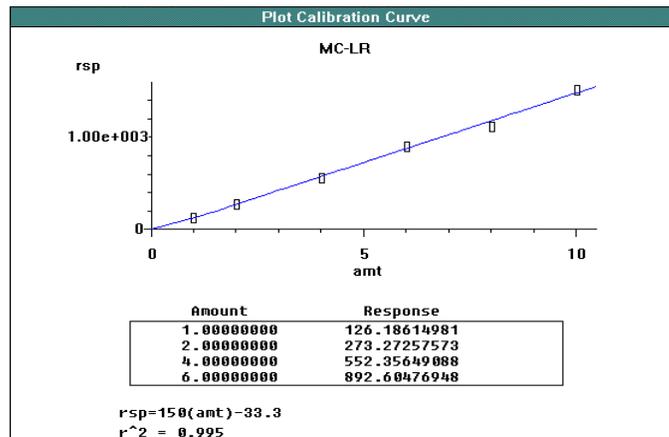


Figura 10.- Curva de Calibración de MC-LR, preparada a partir de un estándar adquirido comercialmente de concentración conocida (500 μg , liofilizado)

8.3.-TECNOLOGIAS AVANZADAS DE OXIDACION.

Tratamiento 1 RADIACION CON UV.

Se realizó el tratamiento de MC-LR, utilizando luz ultravioleta a una longitud de 365nm, para lo cual se partió de una concentración de Microcistina-LR de 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$, los viales se irradiaron durante 150 minutos en forma continua, tomando un vial cada 15 minutos (figura 11). No hubo degradación utilizando la luz ultravioleta, la exposición no se prolongó más debido a que el tiempo de exposición del agua, de más de 150 minutos a la luz UV, no es práctico y su costo es alto.

La microcistina-LR es un compuesto muy estable, resistente a temperaturas

altas, por lo que si se graficara, se tendría una línea recta en la concentración inicial de cada experimento. Las variaciones de concentración entre 6 y 8 µg/ml, se pueden deber a la formación de compuestos muy inestables, que absorben a la misma longitud de onda de 365nm.

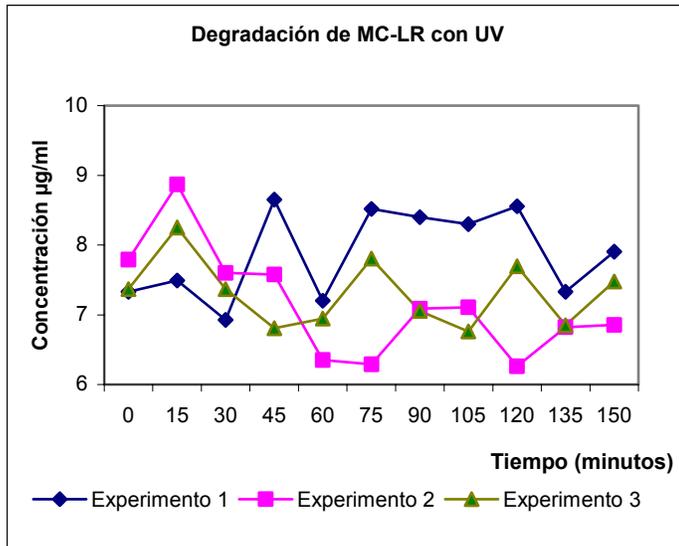


Figura 11.- MC-LR expuesta a radiación continua de UV $\lambda=365\text{nm}$, durante 150 minutos

Tratamiento 2 FENTON

Al realizar los experimentos utilizando el reactivo de Fenton (sulfato de hierro y peróxido de hidrógeno) se utilizaron concentraciones de MC-LR con valores aproximados a 4 µg/ml, se tomó el primer vial para cuantificar la Microcistina-LR y tomar la concentración inicial.

Se utilizaron en dos experimentos concentraciones de sulfato de hierro de 0.25 mM y se variaron las concentraciones de peróxido a 0.25mM y 0.5mM; en estos experimentos, no se observó una degradación de la toxina, al cabo de 10 h, hay un incremento de 0.3 µg/ml, esto es porque probablemente se generen compuestos que absorban a la misma longitud de onda que Microcistina-LR, debido a esto se optó por realizar un experimento 10 veces más concentrado, con concentraciones de 5 mM de peróxido de hidrógeno y 2.5 mM de sulfato de hierro, en la que al cabo de 10h, hay una degradación muy lenta, al igual que en los experimentos anteriores. Las concentraciones varían debido a la probable generación de otros compuestos, esto solo se puede verificar utilizando un Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC), acoplado a un detector de masas, para conocer los compuestos que se están generando, (Figura 12).

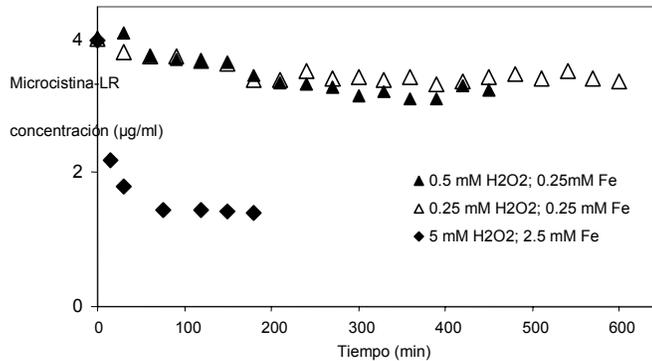


Figura 12.- Tratamiento de MC-LR utilizando el reactivo de Fenton (Fe_2SO_4 y H_2O_2).

Tratamiento 3 FOTO-FENTON

Al probarse el reactivo de Fenton combinado con la exposición de luz ultravioleta continua, utilizando concentraciones más bajas, ya que los valores de concentración están fuera de curva Microcistina-LR, son poco confiables y no se puede diluir a concentraciones más bajas ($10 \mu\text{g/ml}$), se cuantificó el vial inicial y se tomó como la concentración inicial. Se realizaron experimentos utilizando la concentración de Sulfato de hierro constante a 0.25 mM y variando la concentración de peróxido (este es más barato que el sulfato de hierro) probando 0.15 mM , 0.25 mM y 0.5 mM ver tabla 8.

Tabla 8.-Pruebas de Foto-Fenton con irradiación continua manteniendo una concentración constante de sulfato de hierro de 0.25 mM

<i>Tiempo de exposición</i> <i>(min)</i>	<i>H₂O₂ 0.15mM</i> <i>Concentración</i> <i>(µg/ml)</i>	<i>H₂O₂ 0.25mM</i> <i>Concentración</i> <i>(µg/ml)</i>	<i>H₂O₂ 0.5mM</i> <i>Concentración</i> <i>(µg/ml)</i>
0	5.451	7.64	6.003
5	2.56	4.195	2.528
10	1.337	2.797	1.836
15	1.535	1.88	1.276
20	1.457	1.533	1.551
25	1.034	0.596	0.21
30	1.028	1.209	1.072
35	0.779	0.662	0.056
40	0.247	0.121	0.241
50	0.115	ND	0.185
Promedio	1.4161	2.2926	1.3682
Desviación estándar	1.5259	2.3623	1.7475
ND= No Detectado			

Como se observa en la figura 13, la degradación fue más rápida, en comparación con los experimentos realizados con radiación UV, donde no se observa degradación y con Fenton en la que la degradación es muy lenta. La degradación con Foto-Fenton a los 20 minutos en las tres concentraciones 0.15, 0.25 y 0.5mM se juntan en el mismo punto, siendo la degradación más pronunciada a los 20 minutos.

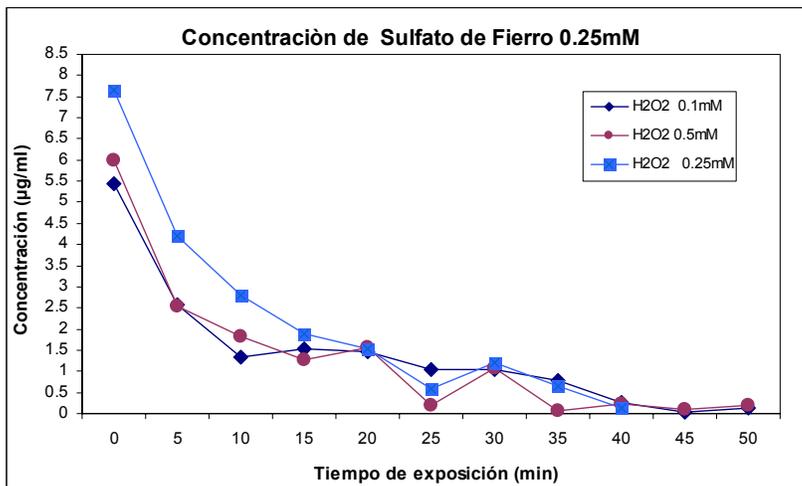


Figura 13.- Tratamiento de MC-LR con Foto-fenton, a diferentes concentraciones de peróxido.

En el cromatograma siguiente se observa que la toxina obtenida, concentrada y purificada, de la presa de Valle de Bravo, está en el mismo tiempo de retención que la toxina Microcistina-LR adquirida de marca Sigma, lote 110K1672, lo cual nos dio la seguridad de que el compuesto que estábamos obteniendo de manera pura, era la toxina microcistina-LR y que la concentración obtenida es de 10 a 50 veces más que el estándar de 10 µg/ml preparado de esta toxina de marca Sigma, figura 14.

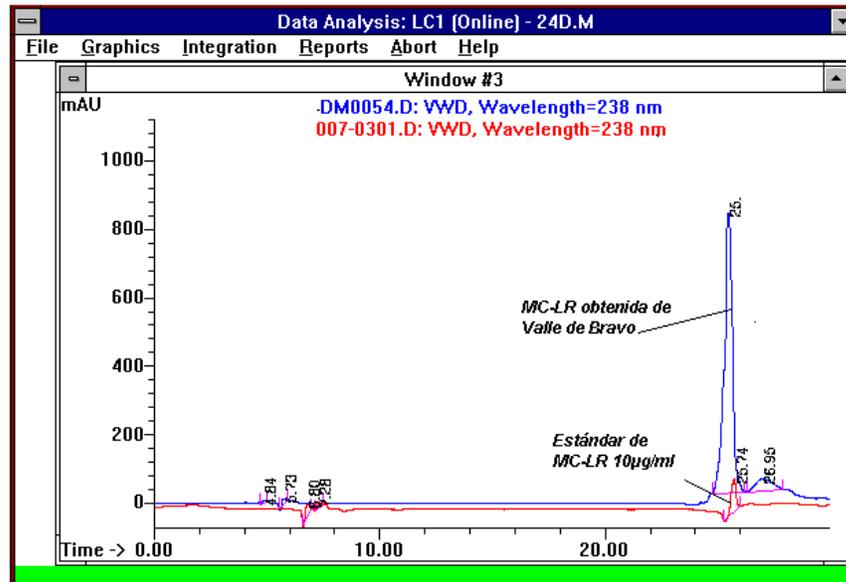


Figura 14.- Cromatograma del estándar de MC-LR adquirido de concentración conocida (10 µg/ml) y la toxina purificada obtenida de Valle de Bravo.

Teniendo la toxina purificada, se calculó la concentración obtenida, la cual fue variable de 100 a 500 µg/ml de Microcistina-LR, esta cantidad, sirvió para poder determinar que cantidad de toxina se debía colocar para cada experimento, los valores para cada experimento varían debido a que estas concentraciones se salen de la curva, y no son tan confiables como cuando están a una concentración media de la curva; debido a esto se tomó el primer vial y se cuantificó, para tener el valor real de inicio para cada experimento.

El monitoreo de la degradación realizada mediante el tratamiento del agua con el método de Foto-Fenton, se llevó a cabo, cuantificando el pico detectado al mismo tiempo de retención de MC-LR ($t_r = 23$ min) de marca, así como cuantificando con la curva de este estándar, ver figura 15, a los 15 minutos de llevarse a cabo la reacción con Foto-Fenton, se ve un pico bien definido, en cambio en la figura 16 en la que han pasado 20 minutos de la reacción este pico ha desaparecido. La señal se confunde con el ruido a concentraciones menores de 1 µg/ml, por lo que a estas concentraciones, es menos confiable la cuantificación.

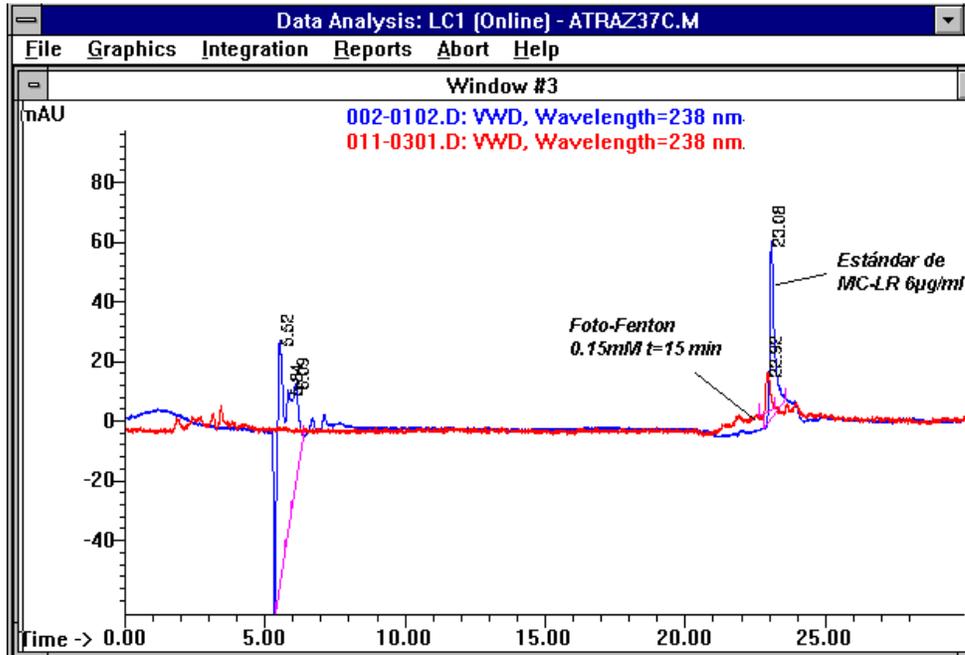


Figura 15.- Comparación de un estándar de 6 µg/ml de MC-LR adquirido comercialmente y la MC-LR degradada con Foto-Fenton (0.25 mM de Fe⁺² y 0.15 mM de H₂O₂), después de ser irradiada en forma continua durante 15 minutos.

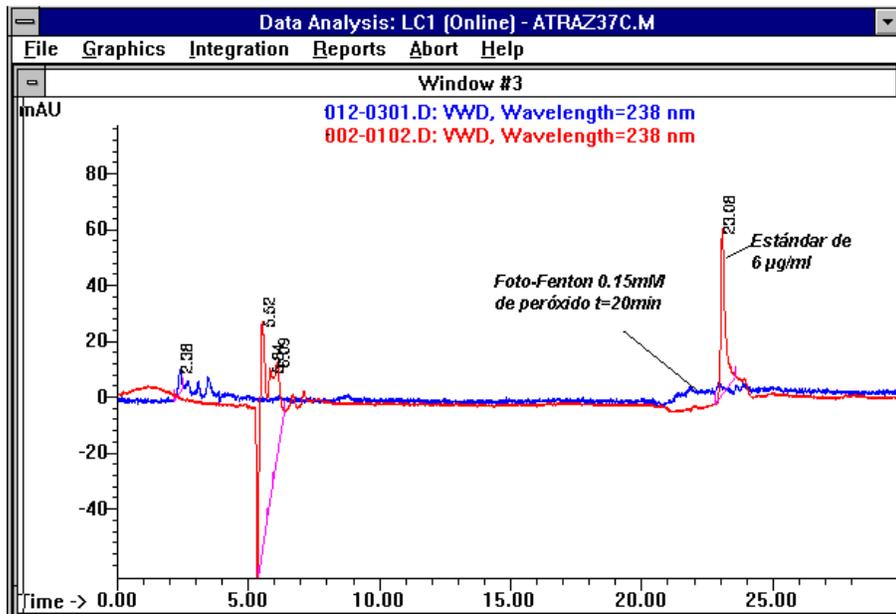


Figura 16.- Cromatograma de la desaparición de la señal de MC-LR, después de ser sometida a degradación por Foto-Fenton durante 20 minutos

La cinética de degradación de Microcistina-LR utilizando el tratamiento con Foto-Fenton, se ajusta a una cinética de primer orden, en la concentración de 0.15 mM de peróxido de hidrógeno y 0.25 mM de sulfato de fierro da un $r^2=0.8864$, este valor se debe al error experimental que se tiene, ver tabla 9 y figura 17.

Tabla 9.-Cinética de degradación de Microcistina-LR utilizando Foto-Fenton (0.15 mM de peróxido de hidrogeno con concentración constante de sulfato de fierro de 0.25 mM).

Tiempo de exposición (min)	Concentración de Microcistina-LR ($\mu\text{g/ml}$)	Cinética de degradación Microcistina-LR		
		C/Co	ln C/Co	ln negativo
0	5.451	1	0.0000	0.0000
5	2.56	0.470	-0.7558	0.7558
10	1.337	0.245	-1.4054	1.4054
15	1.535	0.282	-1.2673	1.2673
20	1.457	0.267	-1.3194	1.3194
25	1.034	0.190	-1.6624	1.6624
30	1.028	0.189	-1.6682	1.6682
35	0.779	0.143	-1.9455	1.9455
40	0.247	0.045	-3.0942	3.0942
50	0.115	0.021	-3.8586	3.8586

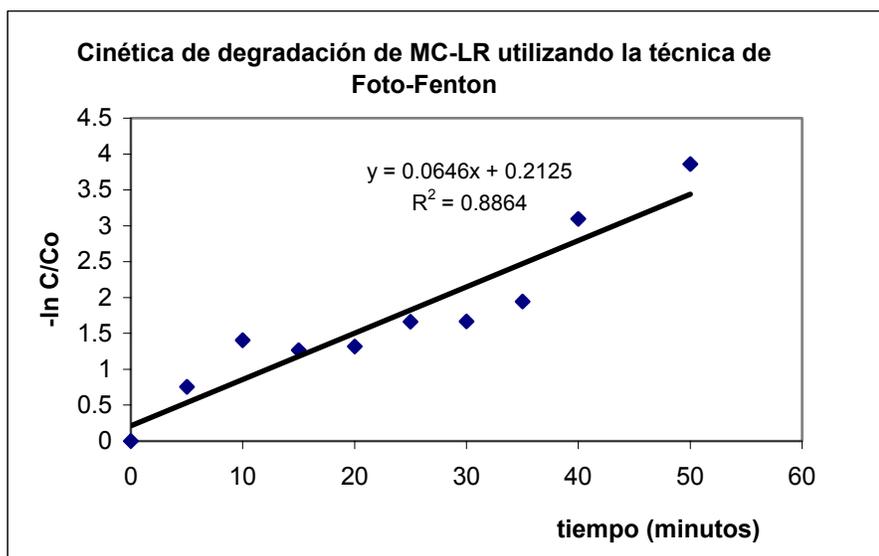


Figura 17- Cinética de degradación de MC-LR, tratada con Foto-Fenton (0.25 mM de Sulfato de fierro y 0.15 mM de peróxido de hidrogeno).

La cinética de reacción utilizando la concentración 0.25 mM de peróxido de

hidrógeno y 0.25 mM de sulfato de fierro, del experimento de Foto-Fenton da un $r^2 = 0.8678$, disminuyendo en comparación con el de 0.15 mM, ver tabla 10 y figura 18.

Tabla 10.-Cinética de degradación utilizando 0.25 mM de peroxido de hidrogeno con concentración constante de sulfato de fierro de 0.25 mM.

Tiempo de exposición (min)	Concentración de Microcistina-LR ($\mu\text{g/ml}$)	Cinética de degradación de Microcistina-LR		
		C/Co	$\ln C/Co$	\ln negativo
0	7.64	1	0	0
5	4.195	0.549	-0.600	0.600
10	2.797	0.366	-1.005	1.005
15	1.88	0.246	-1.402	1.402
20	1.533	0.201	-1.606	1.606
25	0.596	0.078	-2.551	2.551
30	1.209	0.158	-1.844	1.844
35	0.662	0.087	-2.446	2.446
40	0.121	0.016	-4.145	4.145

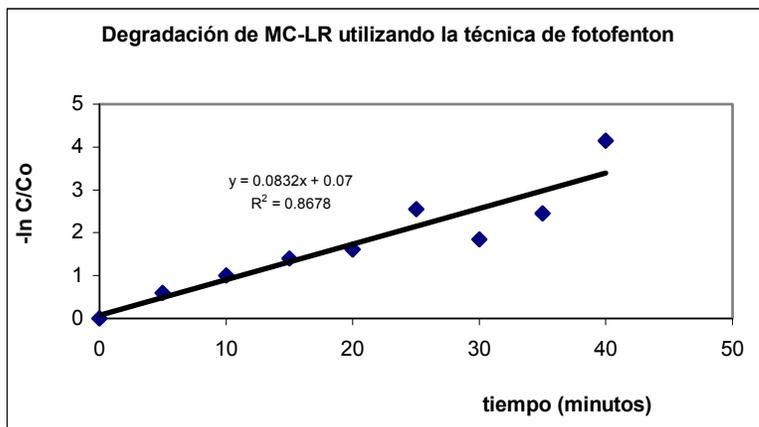


Figura 18- Cinética de degradación de MC-LR, tratada con Foto-Fenton (0.25 mM de Sulfato de fierro y 0.25 mM de peróxido de hidrógeno).

La cinética de primer orden del experimento de Foto-Fenton de concentración 0.5 mM da un $r^2 = 0.7278$, dando más bajo que las concentraciones de 0.15 mM y 0.25 mM, por lo que al aumentar la concentración de peróxido la r^2 disminuye, ver tabla 11 y figura 19.

Tabla 11.-Cinética de degradación utilizando 0.5 mM de peroxido de hidrogeno con concentración constante de sulfato de fierro de 0.25 mM.

Tiempo de exposición (min)	Concentración de Microcistina-LR (µg/ml)	Cinética de degradación de Microcistina-LR		
		C/Co	ln C/Co	ln negativo
0	6.003	1	0	0
5	2.528	0.421	-0.865	0.865
10	1.836	0.306	-1.185	1.185
15	1.276	0.213	-1.549	1.549
20	1.551	0.258	-1.353	1.353
25	0.21	0.035	-3.353	3.353
30	1.072	0.179	-1.723	1.723
35	0.056	0.009	-4.675	4.675
40	0.241	0.040	-3.215	3.215
50	0.185	0.031	-3.480	3.480

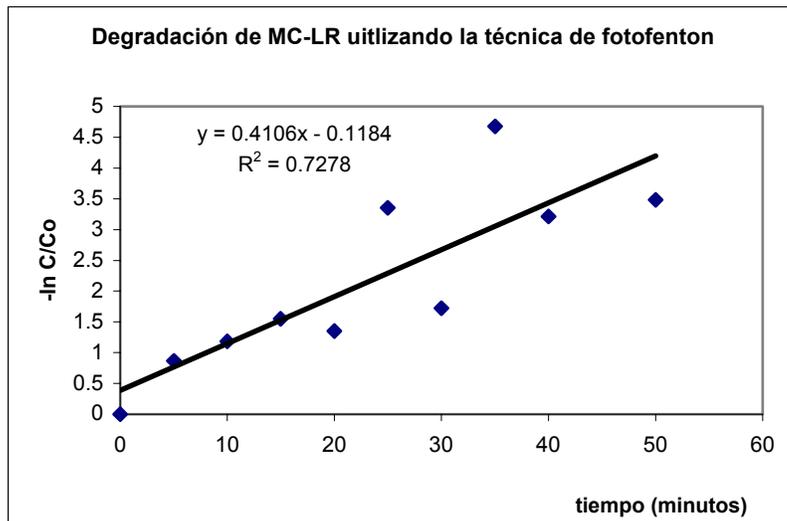


Figura 19-Cinética de degradación de MC-LR, tratada con Foto-Fenton (0.25 mM de Sulfato de Fierro y 0.5 mM de peróxido de hidrógeno).

- En el año 1999 (Martínez, 2000), se implementó el análisis de la cianotoxina Microcistina-LR, a partir de este año se ha estado monitoreando en la Presa Valle de Bravo, en especial en los años 2001, 2002 y 2004 se identificó la presencia de esta toxina en las tres estaciones Amanalco, Centro y Cortina, principalmente en el mes de julio.

- Radiación UV.-Para realizar el análisis de MC-LR por radiación UV a 365 nm, se tomó una concentración inicial de $7 \pm 0.8 \mu\text{g/ml}$, y se expuso durante 150 minutos en forma continua, tomando muestras a intervalos de 15 minutos. Los datos generados de estas pruebas no muestran disminución en las señales cromatograficas, al cuantificar con la curva elaborada a partir del estándar; existe variación en los datos, presentando en algunos casos una pequeña disminución o aumento de a concentración de $\pm 0.6 \mu\text{g/ml}$, debido a posibles compuestos secundarios que se forman y absorben a la misma longitud de onda que Microcistina-LR a 238nm. Esto se puede corroborar con la utilización de un Cromatógrafo de líquidos de alta resolución acoplado a un detector de masas, el cual nos proporcionaría mayor información a cerca de los compuestos que se estén formando.
- FENTON.-En las pruebas realizadas mediante el tratamiento de la muestra de Microcistina-LR con el reactivo de Fenton no se da una disminución en la concentración, e incluso hay un pequeño incremento de $\pm 0.3 \mu\text{g/ml}$, el tiempo de reacción al que se monitorea es muy alto, 630 minutos; por lo que se considera que es un método inapropiado de degradación.
- FOTO-FENTON.-En cambio con esta técnica la reacción es más rápida, como se observa en la figura 16 a los 20 minutos ya no hay señal cromatografica (pico) y la cuantificación de MC-LR es de $1.5 \pm 0.15 \mu\text{g/ml}$, ya que a concentraciones cercanas a $1 \mu\text{g/ml}$, la señal se confunde con el ruido, dando datos no confiables.
- La concentración de 0.15 mM de Sulfato de fierro y 0.25 mM de peróxido de hidrógeno es con la que se obtienen los mejores resultados, ya que en 20 minutos ya no se detecta la señal de la toxina, y su cinética de degradación se ajusta bien a una reacción de primer orden con un $r^2=0.8864$, dando un mejor resultado, si se compara con el tratamiento utilizado de 0.5 mM de peróxido de hidrógeno dando un $r^2=0.7278$ y el valor obtenido con la concentración de 0.25 mM de peróxido de hidrógeno en el que se obtuvo un $r^2=0.8678$ en los tres casos la degradación a un valor cercano de $1 \mu\text{g/ml}$ es de 20 minutos, se utiliza menos cantidad de peróxido de hidrógeno con la concentración de 0.15 mM que con concentraciones de 0.25 y 0.5mM, el cual tiene un costo menor que el sulfato de fierro.
- Las cinéticas de degradación de los experimentos realizados con Foto-fenton, se ajustan a las ecuaciones de primer orden.

9.-CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

- De acuerdo con los resultados de los monitoreos realizados en los años 2001-2002, y a los reportados desde 1999, se observa un establecimiento cíclico de los florecimientos de cepas tóxicas de Microcystis.
- En México, no existía una técnica analítica que concentrara y purificara la toxina Microcistina-LR, este trabajo permitió el desarrollar la metodología para el aislamiento y purificación de la toxina a partir de extractos naturales de cianobacterias, la cual ayudara a detectar y cuantificar la cantidad de toxina presente en un cuerpo de agua, así como poder realizar experimentos en ratón, para poder determinar su LD 50, para cepas de Microcystis aeruginosa en nuestro país. Es necesario continuar con la implementación de técnicas que nos permitan disminuir los límites de detección de esta toxina, ya que la OMS establece como límite 1 µ/l, y casi siempre este valor es sobrepasado.
- Se deben tratar de eliminar la estratificación, reduciendo la cantidad de nutrientes que entran al cuerpo de agua.
- No se deben de utilizar alguicidas (CuSO₄), ya que estos provocan la muerte de las células las cuales liberan las tóxicas.
- Una alta proporción de Microcistinas están dentro de las células cianobacterianas las cuales pueden ser removidas por la filtración o coagulación en una planta de tratamiento de agua convencional. Se recomiendan cualquiera de estos métodos para para la remoción de cianobacterias, filtración subterránea, coagulación con coagulantes apropiados-floculación-filtración, filtración lenta en lecho de arena. Las Microcistinas también son absorbidas por carbón activado.
- El hervir el agua no es efectivo para eliminar las cianotoxinas, ya que soportan condiciones extremas de temperatura (arriba de 300°C).
- RADIACIÓN CON UV.-El método de oxidación con radiación UV resultó inadecuado para inactivar la toxina Microcistina-LR, ya que las señales cromatográficas identificadas con un estándar comercial de concentración conocida y la concentración calculada son cantidades que varían poco de ±0.6µg/ml, debido a posibles compuestos secundarios que se forman y absorben a la misma longitud de onda que Microcistina-LR a 238nm, por lo que no hay una variación considerable al inicio y final de la exposición a la irradiación. Esto implica que a condiciones naturales de temperatura ambiente, la toxina

tendrá una vida media larga una vez liberada al agua.

- FENTON.-El método de Fenton no tiene efecto sobre la toxina MC-LR durante el tiempo que se monitorea, ya que durante 10 hrs. no hubo disminución e incluso hay un pequeño incremento en la concentración de ± 0.3 , $\mu\text{g/ml}$, lo que indica que se pueden estar formando compuestos secundarios como ocurre en el tratamiento con radiación con UV, por esto se considera un método inapropiado de degradación.
- La degradación de la toxina con el reactivo Fenton y UV, si se lleva a cabo es muy lenta; mayor a 10hrs, por lo que si aplicamos estos métodos por separado, los hace inapropiados para degradar este tipo de toxinas; en cambio si los unimos en el método de Foto-Fenton (reactivo de Fenton, con exposición a radiación UV) la degradación es rápida y efectiva, se deben de realizar experimentos utilizando menor concentración de 0.25 mM de sulfato de fierro, para disminuir el costo de este reactivo.
- FOTO-FENTON.-La reacción de Foto-Fenton es un método efectivo para la degradación de la MC-LR, ya que a los 20 minutos se ha logrado la desaparición total de la señal cromatográfica característica de la toxina, y la concentración obtenida es de 1.5 ± 0.15 $\mu\text{g/ml}$; se partió de una concentración de 5.45 $\mu\text{g/ml}$ y a los 30 minutos había 1.028 $\mu\text{g/ml}$ de toxina Microcistina-LR (el 81% ha sido removido) la cinética de la degradación se ajusta a una de primer orden, la concentración del reactivo de Fenton con mejores resultados es la de 0.25 mM de sulfato de fierro y 0.15 mM de peróxido de hidrógeno, así el tiempo de exposición a luz UV a 365nm (la más comercial) es corto a los 10 minutos ya se ha degradado a 1.337 $\mu\text{g/ml}$ (72.8 %) de la tóxina.
- Se recomienda utilizar técnicas analíticas alternas como cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de masas, para estudiar los productos de degradación de la toxina obtenidos después del tratamiento con Foto Fenton.
- La aparición de florecimientos tóxicos cíclicos implica la aportación constante de Microcistina-LR al agua del embalse, con el consecuente riesgo potencial de intoxicación de los usuarios del embalse tanto a nivel recreativo, como de uso y consumo humano. Por lo que se debe de seguir monitoreando la presa Valle de Bravo, ya que ha sido declarada un lugar donde se practican deportes acuáticos, la población se encuentra expuesta a sufrir toxicación e incluso la muerte al ingerir una concentración alta de cianotoxinas o bien de bioacumularlas, y tener por consecuencia la generación de cáncer, así como es necesario monitorear la presencia de Microcistina-LR a nivel domiciliario ya que la población de la ciudad de México que la recibe de

la red de distribución, esta en constante contacto con este tipo de toxina, y a un futuro muy cercano presentar síntomas de enfermedades del hígado o de cáncer.

- Es necesario seguir realizando estudios con microorganismos capaces de degradar este tipo de cianotoxinas, en Japón Takenaka & Watanabe (1997) se probó que existen *Pseudomonas aeruginosa* y *Sphingomonas* que son capaces de degradar la toxina Microcistina-LR, a través de la actividad de proteasa alcalina y pueden abrir el anillo de la molécula, generando un compuesto lineal 200 veces menos tóxico.

ANEXO

1

TABLAS DE RESULTADOS DE CONCENTRACION DE MICROCISTINAS EN VALLE DE BRAVO EN 2001 Y 2002

Tabla 12.- MUESTRAS DE MICROCISTINA-LR, DE VALLE DE BRAVO DURANTE EL PERIODO DE ENERO A DICIEMBRE DE 2001					
MUESTRA	FECHA	LIOFILIZADO Gramos	CONCENTRACION OBTENIDA µg/ml	VOLUMEN ml	CONCENTRACION CALCULADA (ppm)
Centro					
	22/01/01	0.0402	1.122	5	139.6
	14/03/01	0.0636	0.615	5	48.3
	24/05/01	0.1056	26.831	5	1260
	21/06/01	0.1415	71.008	5	2509.1
	06/07/01	0.1632	122.768	5	3761
	30/08/01	0.0375	0.222	5	29.6
	01/09/01	0.01999	11.745	5	2937.7
	30/10/01	0.0147	9.121	5	3102.4
	28/11/01	0.0943	0.22	5	11.8
Cortina					
	22/01/01	0.051	2	5	196.1
	14/03/01	0.1353	1.708	5	63.1
	24/05/01	0.1484	30.116	5	1745.2
	21/06/01	ND	ND	ND	ND
	06/07/01	0.1364	47.61	5	1745.2
	30/08/01	0.0141	0.818	5	290.1
	01/09/01	0.0239	0.83	5	173.6
	30/10/01	0.0161	10.464	5	3249.7
	28/11/01	ND	0	ND	ND
Amanalco					
	22/01/01	ND	0.56	ND	ND
	22/01/01	NE	NE	NE	NE
	14/03/01	NE	NE	NE	NE
	24/05/01	NE	NE	NE	NE
	21/06/01	NE	NE	NE	NE
	06/07/01	0.1452	125.164	5	4310.1
	30/08/01	0.0164	2.25	5	686
	01/09/01	NE	NE	NE	NE
	30/10/01	0.0018	0.17	5	47.2
	28/11/01	0.0392	0.045	5	63.1
ND= No Detectado					
NE= No Evaluado					

Tabla 13.-MUESTRAS DE MICROCISTINA-LR, DE VALLE DE BRAVO DURANTE EL PERIODO DE ENERO A DICIEMBRE DE 2002

MUESTRA	FECHA	LIOFILIZADO Gramos	CONCENTRACION OBTENIDA µg/ml	VOLUMEN ml	CONCENTRACION CALCULADA µg/ml
CENTRO					
	30/01/02	0.364	0.054	15	0.054
	27/03/02	0.0207	4.888	15	3542
	26/04/02	0.0068	0.527	15	1162.5
	24/05/02	ND	ND	15	ND
	28/06/02	0.0237	0.422	15	267.1
	26/07/02	0.0089	3.631	5	2039.89
	30/08/02	0.0116	ND	5	0
	27/09/02	0.0105	ND	5	0
	29/10/02	0.0089	ND	5	0
	03/12/02	0.0023	ND	5	0
CORTINA					
	30/01/02	0.0286	0.174	5	30.4
	27/03/02	NE	NE	NE	NE
	26/04/02	0.0338	2.744	15	1217.8
	24/05/02	0.029	0.369	15	190.9
	28/06/02	0.0296	ND	15	0
	26/07/02	0.0386	17.194	5	2227.2
	30/08/02	0.0373	1.401	5	187.8
	27/09/02	0.0066	ND	5	0
	29/10/02	0.012	ND	5	0
	03/12/02	0.0106	ND	5	0
AMANALCO					
	30/01/02	0.0655	0.353	15	80.8
	27/03/02	1.1214	2.768	15	37
	26/04/02	0.0562	5.444	5	484.3
	24/05/02	0.0168	ND	15	ND
	28/06/02	0.0387	ND	15	ND
	26/07/02	0.0206	8.9321	5	2168.0
	30/08/02	0.0148	ND	5	ND
	27/09/02	0.0145	ND	5	ND
	29/10/02	0.0141	ND	5	ND
	03/12/02	0.0116	ND	5	ND
ND=No Detectado					
NE= No Examinado					

Tabla 14.-CONCENTRACION DE MC-LR EN LA ESTACIÓN CORTINA DURANTE LOS AÑOS 2001 Y 2002		
MESES DEL AÑO	Concentración ($\mu\text{g/ml}$) año 2001	Concentración ($\mu\text{g/ml}$) año 2002
ENERO	196.1	30.4
MARZO	63.1	NE
ABRIL	NE	1217.8
MAYO	1745.2	190.9
JUNIO	NE	ND
JULIO	1745.2	2227.2
AGOSTO	290.1	187.8
SEPTIEMBRE	173.6	ND
OCTUBRE	3249.7	ND
ND=No Detectado		
NE= No Examinado		

ANEXO

2

1.- COLECTA DE LA MUESTRA.

Se colectaron muestras de Valle de Bravo con una red fitoplanctonica realizando una concentración de fitoplancton mediante el arrastre de una red de 70 micras durante seis minutos a una velocidad aproximada de 5 Km/h. Se dejó drenar la mayor cantidad de agua posible, haciendo lavados internos de la red con agua destilada. El volumen obtenido se transfirió a un contenedor de 125 ml y se transportó en baño de hielo, hasta el laboratorio.

Microcystina-LR fue aislada de muestras simples de florecimientos de Valle de Bravo, México, usando un método descrito por Harada (1990).

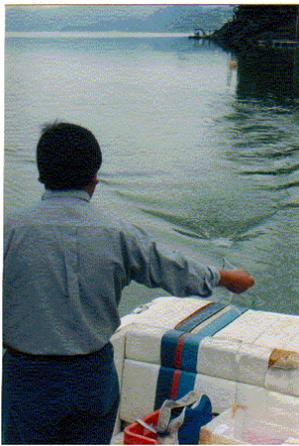


Figura 20.-Arrastre con red fitoplanctonica de 70 μm



Figura 21.- Concentración de Cianobacterias



Figura 22.-Obtención de la muestra, los volúmenes de muestra variaron, para la concentración y purificación de la toxina fueron de 20 litros.

2.- AISLAMIENTO DE *Microcystis aeruginosa*.

La muestra se tamizó en un juego de 3 mallas (200, 100 y 50 micras). El material retenido en la malla de 50 micras se centrifugo a 5,000 rpm, durante 5 minutos a una temperatura de 10°C posteriormente se eliminó el sobrenadante y el sedimento se colocó en tubos de ensaye de 20 x 150 mm. Este material liofilizado para las pruebas de aislamiento y crecimiento, se resuspendió en dos medios diferentes: medio de cultivo preparado en el laboratorio y medio de cultivo comercial (Cianobacteria BG-11 Freshwater solution 50X, marca Sigma, lote 73K2403).

De la muestra liofilizada se pesaron 0.0023 gramos y se suspendieron en un matraz con 250 ml de medio de cultivo para el crecimiento selectivo de cianobacterias, preparado en el laboratorio y en el medio BG11 de marca.

La muestra se incubo a una temperatura de 32 °C con iluminación constante utilizando una lampara con las siguientes características:

Marca: OSRAM
Modelo: AD22
Clave: 84036 FP 0.5
Voltios: 127 ± 10%
Hz 60
Consumo: 24 W
Foco: 1x22 circular

Se realizó un seguimiento visual durante 30 días para determinación del crecimiento de colonias verde-azules, característico de cianobacterias. En este momento se determinaron microscópicamente estructuras semejantes a conglomerados característicos de *Microcystis aeruginosa*.

Se aisló un conjunto de estas células y se resembró en 250 ml de medio comercial especial para cianobacteria BG11. El crecimiento de *Microcystis aeruginosa* es muy lento, de aproximadamente 3 meses.

3.-CULTIVO DE *Microcystis aeruginosa* .

a) MEDIO DE CULTIVO BG11 (1 litro) SIN NITROGENO

Concentrado BG11 (x100)	10 ml
K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O (1M)	0.2ml
H ₂ O destilada	hasta 1 litro

CONCENTRADO BG11 (X100)

MgSO ₄ 7H ₂ O	7.5g
CaCl 2H ₂ O	3.6g
Acido Cítrico	0.6g
Citrato férrico-amónico	0.6g
EDTA-Na ₂	0.093g
NA ₂ CO ₃	2g
H ₃ BO ₃	286mg
MnCl ₂ 4H ₂ O	181mg
ZnSO ₄ 7H ₂ O	28.8mg
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	39mg
CuSO ₄ 5H ₂ O	7.9mg
CoCl ₂ 6H ₂ O	4.94mg
H ₂ O destilada	aforar a 1 litro

Autoclavar y guardar a 4°C

b).-COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO BG11 DE MARCA (Cianobacteria BG-11 Freshwater solution 50X, marca Sigma, lote 73K2403).

NA ₂ CO ₃	0.2m molar
MgSO ₄	0.3 m molar
CaCl ₂	0.24m molar
K ₂ HPO ₄	0.2m molar
Ácido cítrico	28.5 micro molar
Citrato férrico-amónico(17% Fe)	6 mg l ⁻¹
Na ₂ -EDTA	2.4 micro molar
H ₃ BO ₃	46 micro molar
MnCl ₂	9.1 micro molar
Na ₂ MoO ₄	1.6 micro molar
ZnSO ₄	0.8 micro molar
CuSO ₄	0.3 micro molar
CoCl ₂	0.2 micro molar
NaNO ₃	17.6 m molar

El medio se prepara a partir de un concentrado 100x que carece del K₂HPO₄ y de la fuente de nitrógeno, los cuales se añaden antes de esterilizar en el autoclave.

A continuación en la tabla 12, se muestran los diferentes medios de cultivo de cianobacterias que se han propuesto a lo largo del tiempo:

Tabla 15.- Diferentes Medios de cultivo utilizados en varios años, por diferentes autores.

Constituyentes	Cianobacterias Medio BG11 Bittencourt- Oliveira, 2000	Medio BG11 Líquido Rippka, 1991	Microalgas clorofitas u otras Medio MC/2 pH7.4 Guillard & Lorenze, 1972 (modificaciones Bittencourt-Oliveira, 1996)		Cianobacterias Medio MLA PH7.8-8.0 Bolch & Blackburna, 1996 con modificaciones		Cianobacterias Medio ASM-1 pH 7.4 Gorham <i>et.al</i> , 1964 , modificado Reynolds & Jaworski, 1978	
	Concentración g/L		Concentración (mg/L)	Vol (ml/L)	Concentración (g/ml)	Vol (ml/L)	Concentración g/100ml	Vol (ml/L)
NaNO ₃	1.5	17.6mM	85.01	0.5	6.8	25	0.850	20
KH ₂ PO ₄ . 3H ₂ O	0.04	0.2mM	8.71 (no hidratado)	0.5	1.392	25	0.870	2
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.075	0.3mM	36.97	1	1.96	25	0.245	20
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0.036	0.24mM	36.76	1	29.4	1	0.145	20
Ac. cítrico	0.006	28.5 μM	-	-	1.58	1	-	-
Fe Cl ₃ . 6 H ₂ O	0.006	-	3.15	-	-	-	1.080	0.1
EDTA*	0.001	Na ₂ EDTA 2.4μM	Na ₂ EDTA 4.36	-	Na ₂ EDTA 4.56	1	Na ₂ EDTA 1.860	04
Na ₂ CO ₃	0.02	0.2mM	-	-	-	-	-	-
Micronutrientes	(X1000)(g/L)							
H ₃ BO ₃	2.86	46μM	1	-	0.096	25	2.480	0.1
MnCl ₂ 4H ₂ O	1.81	9.1 μM	0.18	-	0.36	1	1.390	0.1
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.222	0.8μM	0.022	-	0.022	1	-	-
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0.39	1.6μM	0.0006	-	0.006	1	-	-
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.079	0.3 μM	0.01	-	0.01	1	-	-
Co(NO ₃) ₂ . 6H ₂ O	0.0494	-	-	-	-	-	-	-
CoCl ₂	-	0.2μM	0.01	-	(6H ₂ O) 0.01	1	(2H ₂ O) 0.0019	
NaHCO ₃	-	-	12.6	1	1.2	1	-	-
Na ₂ SO ₃	-	-	-	-	12.6	1	-	-
MgCl ₂ 6H ₂ O	-	-	-	-	-	-	0.205	20
NaHPO ₄ 12 H ₂ O	-	-	-	-	-	-	1.780	2
ZnCl ₂	-	-	-	-	-	-	0.335	0.1
CuCl ₂ 2H ₂ O	-	-	-	-	-	-	0.0014	0.1
Vitaminas				1				
B ₁₂	-	-	0.05 g/L	-	500 μg/L	1	-	-
Biotina	-	-	0.05g/L	-	500μg/L	1	-	-
Tiamina	-	-	0.1	-	(HCl) 100μg/L	1	-	-

4.- CULTIVO DE LA CEPA DE Microcystis aeruginosa

El medio de cultivo de marca Cianobacteria BG-11 Freshwater solution 50X, marca Sigma, lote 73K2403, se preparó adicionando 20 ml de medio por un litro de agua estéril, se pesó 0.0016g del liofilizado obtenido de Valle de Bravo antes mencionado y se suspendió en el medio, posteriormente se colocó en una incubadora a 32 °C, con iluminación constante.

A los 60 días de incubación se observó la formación de conglomerados de color verde-azules adheridos a las paredes del matraz, característico de cianobacterias;

Se observó al microscopio, en el cual se detectaron estructuras en forma redondas, independientes y conglomeradas por un mucílago.

El crecimiento en este medio fue más rápido y abundante que en el medio preparado en el laboratorio; se procedió a concentrar la mayor cantidad de células, se llevó a cabo el rompimiento de las mismas y la concentración de la toxina, para posteriormente realizar el análisis en HPLC. No se detectó la toxina Microcistina-LR en HPLC, debido posiblemente a las condiciones a las que fueron sometidas (libre de depredadores).

Debido a esta situación se decidió tomar muestra directa del cuerpo de agua (Presa Valle de Bravo), la mayor concentración de Microcistina-LR detectada por HPLC en años anteriores (2001) fue en la estación Cortina, por lo que se tomó una cantidad de 5 litros de agua y se filtraron a través de una red fitopláctónica de 70 micras, fueron llevadas al laboratorio, almacenadas en envases de 1 litro y congeladas a -20°C. Después se realizó la concentración de la toxina.

ANEXO

3

Tabla 16.-DEGRADACION DE MC-LR POR EXPOSICION A LUZ ULTRAVIOLETA A 365nm			
TIEMPO (minutos)	Experimento 1 µg/ml	Experimento 2 µg/ml	Experimento 3 µg/ml
0	7.329	7.79	7.367
15	7.494	8.87	8.25
30	6.926	7.601	7.368
45	8.652	7.577	6.808
60	7.204	6.353	6.946
75	8.517	6.289	7.805
90	8.401	7.087	7.053
105	8.297	7.107	6.758
120	8.556	6.26	7.697
135	7.332	6.82	6.85
150	7.905	6.853	7.476

Tabla 17.- RESULTADOS DE LA PRUEBA DE FENTON CON DIFERENTES CONCENTRACIONES			
Tiempo (min)	0.5mM Pèroxido 0.25mM Fe MC-LR (µg/ml)	0.5mM Pèroxido 0.5mM Fe MC-LR (µg/ml)	5mM Pèroxido 2.5mM Fe MC-LR (µg/ml)
0	4.937	5.061	1.986
15	5.434	NE	NE
30	4.662	3.685	NE
45	5.518	NE	NE
60	5.553	3.853	1.411
75	5.346	NE	NE
90	4.578	4.065	NE
120	5.303	4.412	1.915
150	5.161	5.608	NE
180	5.237	5.565	1.564
210	5.32	5.479	NE
240	4.578	5.734	1.592
270	5.32	5.768	NE
300	5.411	5.742	1.65
330	5.335	5.718	NE
360	5.367	5.778	2.228
390	5.396	5.451	NE
420	5.153	5.416	1.101
450	4.65	5.395	NE
480	5.698	5.574	NE
510	5.8	5.649	NE
540	5.971	5.495	NE
570	5.302	5.32	NE
600	5.255	5.309	NE
630	NE	5.325	NE

NE= No Examinado

11.-BIBLIOGRAFIA

1.-Bandala E. Martínez D. (2004). Degradation of microcystin-LR toxin by Fenton and Photo-Fenton processes. *Toxicon* **43**; 829-832.

2.- Barry T.W., Toxic & Nontoxic Algae [en línea] [sin edición], OSC, Inc. . [citado 25 de sept. de 2004], (actualizado 1999), Disponible en World Wide Web .

<http://users.rcn.com/algae/algae71.html>

3.-Bell S. G , Codo G.A., (1994). Cyanobacterial toxins and human health., Rev. Med. Microbiol., **5**(4), 256-264

4.-Bolton y S.R.Cater. (1994). "Aquatic and Surface Photochemistry" G.R.Helz,R.G.Zepp y D.G. Crosby Editores. *Lewis, Boca Raton, FL, EEUU.* 467-490.

5-Botes D. P., Kruger H. Runnegar M.T.C, .Santikarn.S., Smith R .J.,. Barna J. C. and Williams D.H., (1985). Structural studies on cyanogisins-LR, YR,YA and -YM,peptide toxins from *Microcystis aeruginosa*. *J. Chem Soc.Perkin Froms.*, 2747

6.-Brown I., Cholera Connected to Blue Green Blooms? [en línea] [sin edición] Ukraine [sin editorial] 15 de junio de 1999, [citado el 23 de agosto de 2000]. Disponible en World Wide Web

<http://www-cyanosite.bio.purdue.edu/cyanonews/cn121/cn12news.html>

7.-Braga N.M . Toxicos de origen cianobacteriano –microcistinas [en línea][sin edición]Ed. Zoe tecno-campo. 1998.[citado el 11 de junio de 2001]Disponible en World Wide Web

<http://www.zoetecnocampo.com/Documentos/ciano/cianobacterias.htm>

8.-Briand J.F. et al., (2003). Health hazard for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. *Sciences* **34**. 361-377.

9.-Bryant J.,(1986). The relationship between river flow and *Microcystis aeruginosa* blooms in the Neuse river, North Carolina. *The water Resources Research Institute.* 223.

10.-Carmichael W.W., (1986). Toxic peptides from freshwater cyanobacteria (Blue-green Algae). Isolation, purification and characterization of peptides from *Microcystis aeruginosa* and *anabaena flos-aquae*. *Toxicon.* **24**. (9). 865-873. Great Britain

- 11.-Carmichael W.W., (1987). Ultrastructural changes in the mouse liver induced by Hepatotoxin from the freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* strain 7820. *Toxicon*. **25**. (3). 285-292. Great Britain.
- 12.-Carmichael W.W., (1988). Blood Pressure and hepato cellular effects of the cyclic heptapeptido toxin produced by the freshwater cyanobacterium (Blue-green alga) *Microcystis aeruginosa* strain PCC7820. *Toxicon*. **26**. (7). 603-613. Great Britain. .
- 13.-Carmichael W.W., (1992). Cyanobacteria secondary metabolites-the cyanotoxins. *Journal Applied Bacteriology*. Ohio. **72**. .445-459. USA.
- 14.-Carmichael W.W., Falconer I.R. (1993). Diseases related to fresh water blue-green algal toxins, and control measures in falconer I.R Algal toxins in seafood and drining water. Academic. Press 187-209
- 15.-Codd G. A, (1993). Hazardous freshwater cyanobacteria (blue-green algae). *The Lancet*. **341**. 1519-1520.
- 16.-Codd G. A., (1997). Fatty acids from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* with potent inhibitory effects on fish gill Na⁺/K⁺ - ATPase activity. *The Journal of Biology*. 201.
- 17.-Cood G.A., Bell S.G. Kaya K., Ward C.J., Bealtie K.A., Metcalf J.S., (1999). Cyanobacterial toxins, exposure routes and human health, Eur. J. Phycol. **34**. 405-415.
- 18.-Delaney, (1995). Toxicity of Microcystin-LR, isolated from *Microcystis aeruginosa*, against various insect species. *Toxicon* **32**. (6) 771-778.
- 19.-Delmolt, (1995). Detection of cianobacteria toxins (*Microcystis*) in waters of northeastern Winsconsin by a new inmunoassay Technique. *Toxicon*. **33** (11). U.S.A. 433-1442
- 20.-Ding Wen-Xing. Han-Ming Shen. (1998) Microcystic Cianobacteria Causes Mitochondrial membrane potential Alteration and Reactive Oxygen Species Formation in Primary Cultured Rat Hepatocytes. *Environmental Health Perspectives*. 106.
- 21.-Domenech Xavier, Jardim Wilson, Litter Marta. Procesos Avanzados para la eliminación de contaminantes. [en linea][sin edición] citado el 15 de abril de 2002 Disponible en word wide web

<http://www.ingenieroambiental.com/newinformes/eliminacionresiduosfoto.pdf>

22.-Environmental Technology, Centre Education for responsible environmental behaviour.International. [en línea][sin edición] citado el 27 de abril de 2001 Disponible en word wide web.

http://www.skolverket.se/baltic_sea/newsletter/siv.html

23.-Environmental Health perspectives, (1999). The air and water grow heavier with the debris of our spectacular civilization. 107.

24.-Falconer I.R., Smith J.V., Jackson A.R.B., Jones A. Runeegar M.T.C., (1988). Oral toxicity of a bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* administrated to mice over periods up to one year., *J. Toxicol. Environ. Health.* **24**; 291-305

25.-Falconer I.R., (1993). Algal toxins in seafood and drinking water. Academic Press. Limited Press. Inc.San Diego, C.A. U.S.A

26.-Goodman, (1979). Bases Farmacologicas de la terapeutica. Ed. Interamericana. 5° edición. México

27.-Harada.K.I., (1990). Isolation and Characterization of the Minor components associated with Microcystins LR y RR in the cyanobacterium (Blue-green algae).*Toxicon* .**28** (1) 55-64. Great Britain.

28.-Harada K.I., (1995). Chemistry and detection of microcystis, Toxic Microcystis, CRC Press, Toxicon, 103-143.

29.-Harding W.R., Rowe N., Wessels J.C, Beattie K.A., Cood G.A. Death of a dos attributed to the cyanobacterial (blue-green algal) hepatotoxin nodularin in South Africa, Tydskr. S. Afr. Vet Ver. **66** (4) 256-259.

30.-Harding. Dramatic Intervention Saves Community from Microcystin Bloom.[en línea] Cyano News issue homepage. Vol.**14** No.1. 1998 [citado el 14 de marzo de 2000]. Disponible en word wide web.

<http://chemweb.urich.edu/~biology/cyanonews/cn14-1/bloom.htm>

31.-Hoffman J.R.H., Letter to the editor of vegetarian times. Illinois. U.S.A.[en línea] [sin edición] revisado 1996 [citado el 11 de junio de 2001] Disponible en word wide web.

<http://www.dnai.com/~algae/algae29.html>

32.-Homoage A.R. *et al* (2000). Microcystins (Cyanobacterial toxins)in drinking water enhance the growth of aberrant crypt foci in the mouse colon. *J. Toxicol Envirom. Health.* **61** , 155-165.

- 33.-INEGI. (1998). Estadísticas del Medio Ambiente, México.
- 34.-James, Investigations into the use of straw to control blue-green growth. March.[en línea] 1992[citado el 21 de mayo de 2001]. Disponible en word wide web.
- <http://www.fwr.org/waterq/fr0285.htm>
- 35.-Jansson, (1995). Competitive PCR to Qualitate Cyanobacteria.. Department of Biochemistry. Stockolm University.
- 36.-Jiménez Cisneros Blanca, (2001). La Contaminación Ambiental en México. Ed. Limusa 1ª Edición. México.
- 37.-Kotak G. B., (1991). Managing Alberta's lakes for the 21st century. Occurrence and health significance of algal toxins in Alberta Surface waters.Department of Zoology. Edmont, Alberta. Canadá.
- 38.-Kotak G. B., (1993). Sehrudeys. L.Kenefick.Toxicity of Cianobacterial blooms in Alberta Lakes. University of Alberta, Edmonton, Environmental health program.
- 39.-Kotak. G. B., (1994). Toxic Algae in Productive A Cause For Concern. Department of Biological Sciences University of Alberta. Edmonton, Alberta.
- 40.-Kotak G. B., Angeline. K. Y.Lan, (1995). Variability of the hepatotoxin microcystin-LR in hypereutrophic drinking water lakes. *J. Phycol* **31**. Canada. 248-263.
- 41.- Kotak G. B.: (1996). Hepatic and Renal pathology of intraperitoneally administered Microcystin-LR in Rainbow Trout (*oncorhynchus Mykiss*). *Toxicon*. **34** (5).517-525.
- 42.-Lahti. Cyanobacterial hepatotoxins and drinking water supplies-aspects of monitoring and potential health risks.[en línea] ,[sin edición],1997 Finland Disponible en word wide web.
- <http://www.vyh.fi/fei/publicat/ber/monogr/berm4.htm>
- 43.-Lawton L.A y Cood. G.A. (1991). Cyanobacterial (Blue-green algae) toxin and their significance in UK and European waters. *Journal of the Institution of Water and Environmental Management*. **5**. 460-465.
- 44.-León,. Floraciones de *Microcystis aeruginosa* (cianobacteria) en el Río de la plata, análisis de toxicidad.[en línea] 1999 [sin edición] [citado el 26 de agosto de 2000] Disponible en word wide web.

<http://limno.fcien.edu.uy/seminario.lizet.html>

45.-Martínez R. E., (1998). Determinación de ficotoxinas en la Presa de Valle de Bravo. Coordinación de Tratamiento y Calidad del agua. Instituto Nacional de Tecnología del agua. Morelos; México.

46.-Martínez S .D. (2000). Determinación de Microcistina-LR en agua de embalse. Tesis F.C.Q e I. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. 41.

47.-Morris R.J. *et al* (2000).The adsorption of microcystin-LR by natural clay particles. *Toxicon* **38**, 303-308

48.-Mazur H. , Plinski M., (2001). Stability of cyanotoxins microcystin-LR, microcystin-RR and nodularin in seawater and BG11 medium of different salinity *Oceanologia* **43**(3) 329-339.

49.-Mez K. Belrie K.A, Cood G.A, Hanselman K., Hauser B., Naegeli H. Preisig H.A., (1997). Identification of microcystin in benthic cyanobacteria linked to cattle death on alpine pastures in Switzerland, *Eur.J.Phycol.*, **32** ,111-117.

50.-Naumann E. (1923). Spezielle Untersuchungen uber die Ernährungsbiologie des Tierischen Limnoplanktons II.Uber den Nahrungserwerb und die natürliche Nahrung der Copepoden und der rotiferen des Limnoplanktons. *Acta Univ. Lund NF.Avd II*,**19**,(6),17.

51.-New Cyanobacteria toxin Study. Algae tested in Lake Sammamish. [en línea] [sin edición] Canada [sin editorial] 4 de febrero de 2002 [citado el 13 de marzo de 2003] Disponible en word wide web.

<http://splash.metrokc.gou/dnradmin/press/algae/ksam.htm>

52.-Nehring S. (1993). Mortality of dogs associated with a mass development of *ondularia spumigena* (cyanophyceae)in a brackish lake at the German North Sea COSAT., *J. Plankton Res.*, **15**(7), 867-872.

53.-Nishizawa, (1999). Genetic Analysis of the Peptide Synthetase genes for a cyclic Heptapeptide Microcystin in *Microcystis* spp. *J. Biochem.* 126. 520-529.

54.-Nishizawa M. R. et al, (1992).Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-lr. *J. Cancer Res. Clin. Oncol* **118** 420-424.

55.-Norma Oficial Mexicana, (1997). Publicada en el Diario Oficial el 6 de enero.

56.-Ohle W. (1963). Phosphor als Initialfaktor der Gewassereutrophierung. *Vom Vasser*, **20**,11-23.

57.-Olvera V. V. (1992). Estudio de eutroficación de la presa Valle de Bravo, México., Vol. VII.núms. 2/3.II Época. 148-161.

58.-Olvera V. V., Bravo I .L. A y Sánchez CH. J. J. (1993). Limnología, monitoreo de Vibrio Cholerae y manejo de la cuenca de la presa Valle de Bravo, México.

59.-Otare Ankió, Shirai Makoto, (1989). Toxicity de Microcystis Species Isolated from Natural blooms and Purification of the toxin. *Appl. Environmental Microbiology*. **5** . 3202-3205.

60.-Partland,. (1998). Why Blue Green Algae Makes Me Tired. Washington. U.S.A.[en línea] 1998 [sin edición] [citado el 24 de agosto de 2000]a Disponible en word wide web

<http://tldp.com/issue/167/algae.html> .

61.-Pesson P., (1979). Contaminación de las aguas continentales. Ed. Mundi-Prensa. Madrid..

62.-Plinski M., Cood G.A., 1997. Cyanobacteria- a factor of animal intoxication a review,. *Medycyna Wet.*, **53**(1), 8-10

63.--Pouria S. A. Andrade, J. Barbosa, R. Cavalcanti, V .Barreto, C. Ward, W. Preiser, G. Codd, (1998). Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil, *Lancet* **352**:21-26

64.-Ramírez P., (2004). Microbiología ambiental. Secretaria de medio ambiente y recursos naturales. México 1991

65.-Rao. R. B., Gupta S.D., (1994). Isolation, Culture, and Toxicity of the Cyanobacterium (Blue-green Algae) *Microcystis aeruginosa* from a freshwater source in India. *Bull. Environ. contam. Toxicol.* **52**. 878-885. New York.

66.-Rinehart K.I., et al (1994). Structure and biosynthesis of toxins from blue green algae (cyanobacteria). *J. Appl. Phycol* **6** 159-176

67.-Rippka, Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis. Medios de Cultivo.[en línea] [sin edición] CSG Servicio de cultivos.[sin fecha de edición] modificado el 15-mayo de 2000.[citado el 28 de marzo de 2001] Disponible en word wide web.

<http://www.ibvf.cartuja.csic.es/Cultivos/introduccion.prov.htm>

68.-Robertson, (1997). The destruction of cyanobacterial toxins by semiconductor photocatalysis. *Chemical Communications*, issue 4.

69.-Rymsza Karen Culver, 1998. How dangerous are the toxins created by blue green algae?. Grad student oceanography. Disponible en word wide web.

<http://madsci.wustl.edu/posts/archives/mar98/889296208.mi.r.html>

70.-Salas, H & Martino, P. (1990), Metodologías simplificadas para la evaluación de eutrofización en lagos cálidos tropicales. Programa Regional CEPIS/HEP/OPS 1981-1990. Lima, CEPIS. Segunda edición 1996.

71.- Salas, H & Martino, P. (1991). A simplified phosphorus trophic state model for warm-water tropical lakes. *Water Resources*. **25** (3): 341-350.

72.- Salud Ambiental, Servicios de información de la biblioteca virtual. Eutrofización en Lagos tropicales cálidos tropicales [en línea] [sin edición] Ed. CEPIS. Brasil. Revisado Diciembre 2000 [citado el 20 de marzo de 2004]. Disponible en word wide web.

<http://www.cepis.org.pe/eswww/gestcont/eutrofic.html>

73.-Sargunar H., Sargunar A., (1990). Proceedings of the 4th International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. Abstrac **610**, Lausanne, Switzer land.

74.-Secretaria de Política Ambiental. Gobierno de la provincia de Buenos Aires. Estrategia de manejo- Niveles de seguridad. [en línea] [sin edición] Argentina, Ed. Novedades [modificado el 29 julio de 2005] [citado el 18 de noviembre de 2005] Disponible en word wide web.

<http://www.spa.gba.gov.ar/novedades/informatword/4-estratega%20%manejo.doc>

75.-Steidinger Karen A.,1997. Poblaciones densas y de alga ecología de Plankton. Microalga de la Bahía de la florida. Florida Marine Research [en línea] 1997 [sin edición] Institute. Florida U.S.A.[citado el 25 de mayo de 2000] Disponible en word wide web.

<http://flseagrant.org/PP39.htm>

76.-Subsecretaria de Planeación Dirección General de usos del agua. Prevención de la contaminación, (1982). Manual de Limnología. 1°Edición Guadalajara.

77.-Takenaka S., Watanbe M.F., 1997. Microcystin-LR degradation by *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease. *Chemosphere*. **34** (4) 749-757.

78.-Taylor R., Bloom of blue-green algae Returns to lake Erie. Okland. California [en línea]1996 [sin edición] U.S.A. [citado el 28 de enero de 2001] Disponible en word wide web.

<http://mdsq.umd.edu/seagrantmediacenter/news/algae.html>

79.-Taylor R. , That bloomin' Microcystis [en línea] 1997 [sin edición]. [citado el 22 de mayo de 2000]. Disponible en word wide web.

<http://www.sg.ohio-state.edu/publications/nuisances/algae/tl-0897microcystis.html>

80.-Technical Report of Fisheries and Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences. (1992). Alberta Environment, *Environmental Projection. Scientific Excellence*;

81.-Thread Index .Control of microcystin LR expression by Microcystis aeruginosa.[en línea] [sin edición] 23 de enero de 1996 [sin editorial] [citado el 30 de septiembre de 2001]. Disponible en word wide web.

<http://www.maritimes.dfo.ca/science/mesd/he/list/phyco toxins-o/msg00188.html>

82.-Tsuji K., Watanuki T., Kondo F., Watanabe M.F. Suizuki S. Nakazaewa H., Suzuki M., Uchida H., Harad K.I., (1995). Stability of microcystins from cyanobacteria-II.Effect of UV light on the descompton and isomerization., *Toxicon* **33** (12) ,1619-1631.

83.- Ville C.A., Solomon P.E., Martín W.C.,Berg R. L., Davis W., (1992). *Biología*. 2° Edición. Ed. Interamericana Mc. Graw Hill.

84.-Vinagre T.M. et al (2003) Effect of microcystin on ion regulation and antioxidant system in gill of the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda graspsidae). *Comparative Biochemistry and Physiolog.* **135** 67-75

85.-Watanabe M. F. (1983). A higly toxic strain of bluye alga Microcystis aeruginosa isolated from Lake Suwa, Bull. *Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 49. 1759.

86.-Watanabe M.F. and Oishi. S., (1985). Effects of Environmental Factors on toxicity of a Cyanobacterium (Microcystis aeruginosa) under culture conditions. *Applied and Environmental Microbiology.* **49**. 1342-1344.