



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
CARRERA DE BIOLOGÍA

**Laboratorio de Ingeniería Ambiental, grupo de Tratamiento y
Reúso del Instituto de Ingeniería de la UNAM**

**“ECOTOXICIDAD DEL TRICLOSÁN PRESENTE EN
EL AGUA DEL MANANTIAL DE CERRO
COLORADO Y SU ANÁLISIS ESPACIAL EN EL
ACUÍFERO DEL VALLE DE TULA, HIDALGO”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A :

ISAAC ALEJANDRO RAMOS RAMÍREZ

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Alma Concepción Chávez Mejía

Instituto de Ingeniería, UNAM

ASESOR INTERNO:

Biól. Raúl Arcos Ramos

Ciudad de México, 2017





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A mi padre biólogo

A mi madre bióloga

A mi hermana bióloga

Familia de biólogos

A tíos, primos y amigos

A la UNAM

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a las siguientes personas e instituciones por sus aportaciones hechas para la realización del presente trabajo.

- **A mi padre Alejandro Ramos, por haberme enseñado a aprender, por sus consejos, sus valores, por la motivación, pero más que nada por ser un gran guía.**
- **A mi madre Mercedes Ramírez, por siempre estar ahí para todos, por su comprensión y confianza.**
- **A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por mi formación profesional.**
- **A la F.E.S. Zaragoza, responsable de mi formación como biólogo.**
- **Al Laboratorio de Ingeniería Ambiental del Instituto de Ingeniería de la UNAM, por brindarme todas las herramientas y conocimientos necesarios para llevar a cabo la experimentación de la tesis.**
- **A la Dra. Alma Concepción Chávez Mejía por el apoyo y asesoría para la realización de esta tesis.**
- **A la M. en I.A. Astrid Yohanna Quintero Vargas por compartir el apoyo, las enseñanzas, la paciencia y la dedicación en el trabajo para hacer posible esta tesis**
- **Al Dr. José Elías Becerril Bravo por las enseñanzas y herramientas técnicas para concluir parte de la experimentación de la tesis.**
- **Al laboratorio de Contaminación Acuática y al Biól. Raúl Arcos Ramos que me encaminaron en la realización de la tesis.**
- **Al Dr. Daniel Garzón Cortés y al Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas por todo el apoyo brindado, sus enseñanzas y herramientas para concluir parte de la experimentación de la tesis.**
- **A la Dra. Julieth Marcela Díaz Masmela, del Laboratorio de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, por el apoyo, los conocimientos y las herramientas brindadas para realizar una parte de la experimentación de esta tesis.**
- **Al Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra, y a la Maestra María Manuela Nájera Martínez, del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la UNAM, por todo el apoyo brindado para culminar una parte de la experimentación de esta tesis.**

“Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental que cuenta con certificación de la calidad ISO 9001:2008 otorgada por el Instituto Mexicano de Normalización y Certificación, A.C. (IMNC) con registro RSGC 960 de fecha 11 de enero de 2016, vigente al 11 de enero de 2019”

Tabla de contenido

RESUMEN	8
1. INTRODUCCIÓN _____	9
2. MARCO TEORICO _____	13
2.1 Contaminantes emergentes, CE's	13
2.1.1 <i>Fármacos</i>	14
2.1.2 <i>Triclosán</i>	15
2.2 Disruptores endocrinos, DE	16
2.2.1 <i>Formas y efectos de exposición a DE</i>	17
2.2.2 <i>DE y fuentes de exposición</i>	18
2.2.3 <i>Disrupción endocrina en peces</i>	19
2.3 Ecotoxicología	20
2.3.1 <i>Bioluminiscencia</i>	20
2.3.2 <i>Inhibición de la luciferina/luciferasa</i>	21
2.3.3 <i>Biomarcador</i>	22
2.3.4 <i>Inducción de vitelogenina como biomarcador de toxicidad</i>	23
2.3.4 <i>Pez Cebra (Danio rerio)</i>	24
2.3.5 <i>Pruebas ELISA</i>	25
2.3.6 <i>Anticuerpos – Antígenos</i>	26
2.4 Normativa Mexicana en ensayos de toxicidad aguda (proy-nmx-aa-112- scfi-2013)	27
2.5 Normativa Internacional (Actividad estrogénica y androgénica y la inhibición de la aromatasa OECD/OCDE 230)	28
2.6 Sistemas de Información Geográfica (SIG)	30
2.6.1 <i>Análisis Espacial en los SIG</i>	30
2.6.2 <i>Tipos de análisis espacial</i>	31
2.6.3 <i>Tipos de interpolación: TIN, Spilines, Kriging e IDW</i>	32
3. ANTECEDENTES _____	35
3.1 Tratamiento de agua	35
3.2 Manantial Cerro Colorado	Error! Bookmark not defined.
4. JUSTIFICACIÓN _____	39
5. OBJETIVOS _____	43
Objetivo General	43

Objetivos Particulares	43
6. HIPOTESIS	43
7. METODOLOGÍA	44
7.1 Localidad	44
7.1.1 Muestreo de agua para pruebas de toxicidad.....	45
7.2 Diseño de experimentos	45
7.2.1 Microtox.....	45
7.2.2 <i>Vibrio Fischeri</i>	46
7.3 OECD/OCDE 230 Actividad estrogénica	46
7.3.1 Técnica de ELISA.....	50
7.3.2 Balance de masa.....	51
7.4 Análisis espacial del triclosán en SIG	52
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
8.1 Ecotoxicidad por Microtox	52
8.2 Balance de masa	55
8.3 Niveles de vitelogenina en <i>Danio rerio</i>	56
8.3.1 Disrupción endocrina en machos <i>Danio rerio</i>	60
8.3.2 Disrupción endocrina en hembras <i>Danio rerio</i>	62
8.4 Análisis Espacial del triclosán	65
9. CONCLUSIONES	68
10. RECOMENDACIONES	70
11. REFERENCIAS	71
ANEXO 1	84

Índice de Figuras

Figura 1. Manantial de Cerro Colorado.	36
Figura 2. Localización del valle de Tula.	37
Figura 3. Muestreo en Cerro Colorado.....	45
Figura 4. Montaje experimental.....	49
Figura 5. Disección y muestreo de tejido	50
Figura 6. Pruebas ELISA y lectura de placas	51
Figura 7. Niveles de VTG en machos <i>Danio rerio</i>	58
Figura 8. Niveles de VTG en hembras <i>Danio rerio</i>	59

Figura 9. Niveles de VTG en machos y hembras <i>Danio rerio</i>	60
Figura 10. Niveles de VTG en grupos control en ambos sexos.....	60
Figura 11. Celdas de Incubación.....	85
Figura 12. Equipo Microtox. Identificación de componentes.....	86
Figura 13. Distribución de peces por tratamiento.....	90
Figura 14. Proceso IDW.....	91

Índice de Mapas

Mapa 1. Distribución de la concentración de TCS en la época de lluvias del año 2007.....	68
Mapa 2. Distribución de la concentración de TCS en la época de estiaje del año 2008.....	69

Índice de Tablas

Tabla 1. Contaminantes emergentes entre 1997 y 2011.....	Error! Bookmark not defined.
Tabla 2. Concentraciones de los contaminantes emergentes en tres diferentes matrices.....	Error! Bookmark not defined.
Tabla 3. Tratamientos.....	47
Tabla 4. Resultados de toxicidad en <i>Vibrio fischeri</i> triclosán.....	52
Tabla 5. Unidades de toxicidad.....	53
Tabla 6. Resultados de toxicidad en <i>Vibrio fischeri</i> ACM.....	54
Tabla 7. Balance de masa y bioacumulación por tratamiento.....	56
Tabla 8. Composición de agua semidura reconstituida.....	86
Tabla 9. Curvas de tóxicos de referencia.....	87
Tabla 10. Base de datos TCS lluvia año 2007.....	88
Tabla 11. Base de datos de TCS estiaje año 2008.....	89
Tabla 12. Claves y tratamientos.....	91

Índice de Gráficas

Grafica 1. CE ₅₀ de las concentraciones matriz de triclosán en agua sintética.....	53
Grafica 2. Curva estándar de ZnSO ₄	54
Grafica 3. Curva estándar de Fenol.....	54
Grafica 4. Curva estándar de VTG.....	57

RESUMEN

Ante la problemática de escasez de agua, el reúso “seguro” de agua representa una alternativa viable planteando con ello el uso de fuentes no convencionales de abastecimiento, por ejemplo el agua del acuífero del Valle de Tula, formado mediante la recarga artificial indirecta y no planeada con el agua residual que envía la Ciudad de México ha dado origen a manantiales donde se ha reportado la presencia de contaminantes emergentes (CE’s) entre ellos triclosán (TCS) un antibacterial de uso extendido. Es necesaria la evaluación ecotoxicológica que permite identificar el efecto que puede generar la presencia de uno varios contaminantes en organismos vivos y los ecosistemas. En tal sentido, en el presente estudio se analizó agua cruda de manantial (ACM) proveniente de Cerro Colorado, Hidalgo y de distintas concentraciones de TCS con el objetivo de conocer los efectos tóxicos agudos en la bacteria luminiscente Vibrio fischeri y disrupción endocrina en peces Danio rerio, usando la disminución de la bioluminiscencia y los niveles de vitelogenina (VTG) en hembras y machos adultos como biomarcadores, además conocer la distribución espacial de su concentración mediante un análisis de interpolación IDW usando bases de datos de concentraciones de triclosán en agua residual, del acuífero superficial, pozos y manantiales del Valle de Tula, Hgo correspondientes a la temporada de lluvias del año 2007 y estiaje del año 2008. Bajo las concentraciones de estudio el TCS genera un daño en el metabolismo de las bacterias de la especie Vibrio fischeri presentando efectos muy tóxicos en V. fischeri a una concentración de 0.38 mg/L. Existió una disminución en la producción de VTG en machos y hembras de peces de la especie D. rerio bajo el tratamiento ACM y los tratamientos de agua sintética de triclosán, sugiriendo un comportamiento de DE anti-estrogénico. Las dos épocas siguen patrones de distribución similares, sin embargo, las concentraciones de la época de estiaje disminuyen con respecto a la de lluvias debido a la disminución del caudal proveniente de la Ciudad de México.

1. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, existen diversos factores entre los que se destacan la reducción de la disponibilidad de agua, el incremento de población, la necesidad de utilizar más agua para incrementar la productividad agrícola para satisfacer la demanda alimentaria de la población actual y creciente así como los cambios en los patrones climáticos que aumentarán el estrés hídrico en diversas regiones (CONAGUA, 2013). En particular, México por su ubicación geográfica en la zona intertropical del hemisferio norte presenta vulnerabilidad natural ante los cambios climáticos puesto que espacialmente dos terceras partes del país se encuentran en zonas áridas o semiáridas experimentado importantes sequías en los últimos años que impacta en la economía nacional en contraparte un tercio sufre de inundaciones causadas por la exposición a ciclones tropicales en las márgenes costeras, además de la diferencia en las elevaciones del terreno y por la distribución y escurrimiento de la precipitación pluvial en todo el país durante el curso del año (Herron, 2013).

La Cuenca de México ha exportado agua residual sin tratar a la Cuenca de Tula desde la inauguración del Túnel de Huehuetoca, en 1607. A lo largo de estos cuatro siglos, los volúmenes exportados han aumentado dramáticamente, debido al crecimiento poblacional, a los aumentos sustanciales en la explotación de los acuíferos y la pavimentación de las zonas de recarga, que se ve reflejado en un aumento de agua con destino final el drenaje (Burns, 2009).

A pesar de éstas limitantes, seis de cada 100 pobladores de la cuenca de México no sufren de escasez del recurso. De los seis, dos viven en zonas residenciales y consumen un promedio de 567 litros/hab/día, y los cuatro restantes, de nivel económico medio alto consumen 399 L/hab/día. El 77% de la población de la Ciudad de México, usa menos de 150 litros por habitante por día. Para muchos de ellos, el agua es un recurso escaso y racionado, y en muchos casos, sumamente caro, ya que sólo es posible obtenerla mediante su transporte en pipas (Burns, 2009).

En la actualidad existe una sobreexplotación de acuíferos, en efecto, de acuerdo con la CONAGUA (Comisión Nacional del Agua) de los 653 acuíferos existente 142 se encuentran en proceso de estudio, 349 están disponibles y 162 no cuentan con disponibilidad, refiriéndose a 104 como grado de sobreexplotación y 58 tienen descargas naturales de agua superficial o comprometida con el medio ambiente (CONAGUA, 2011).

Ante ello y con el propósito de reducir los niveles de sobreexplotación de los acuíferos de la Cuenca de México, se construyeron dos enormes proyectos para importar agua de las cuencas de Lerma (1951) y Cutzamala (1952) (Contreras, 2009).

El Sistema Lerma, construido para llevar 15 m³/s a la Cuenca de México, tuvo que reducir su caudal a 5 m³/s, debido a severos hundimientos derivados del sobrebombeo infligido a los acuíferos de Lerma Conagua, (2007) en su informe “Programa de Saneamiento y Recuperación de Acuíferos del Valle de México” señala que es probable que los volúmenes importados de Lerma tendrán que reducirse aún más en el futuro, por el mismo motivo.

Por su parte, del Sistema Cutzamala, se trae agua desde los estados de México y Michoacán y éste ha disminuido su capacidad inicial de 20 m³/s a 15 m³/s. Actualmente, se está gestionando una nueva inversión de 3.5 mil millones para recuperar 3 m³/s de la capacidad perdida (Contreras, 2009).

Ante la problemática de escasez de agua, el reúso “seguro” de agua representa una alternativa viable al empleo de agua de primer uso en actividades cotidianas (Jimenez y Chavez, 2003.), planteando con ello el uso de fuentes alternas (fuentes no convencionales) para el abastecimiento.

Una fuente no convencional perceptible es el agua del acuífero del Valle de Tula, formado mediante la recarga artificial indirecta y no planeada con el agua residual que envía la Ciudad de México desde el año 1912, y que se emplean en riego para después incorporarse al acuífero de la zona y cuya recarga se ha estimado

en 25 m³/s, equivalente a 13,3 veces la recarga natural (Jiménez y Chávez, 2003). La sobresaturación de dicho acuífero ha dado lugar a la formación de nuevos manantiales, (Jiménez, 2013). En 1938 se comenzó a notar el cambio de calidad del agua de consumo de la población y más que tratarse de un problema de contaminación del acuífero local como se pensaba, lo que sucedió fue la sustitución del agua original por la residual infiltrada, ya que la primera fue agotada y su lugar ocupado por el agua de recarga artificial. En otras palabras, la población local consume hoy en día el agua que proviene de la infiltración de las aguas negras de la Ciudad de México, y ello lo ha realizado al menos por 40 años (Jiménez, 2005).

Aunque el suelo de valle de Tula (aproximadamente 90,000 ha) actúa como medio depurador removiendo gran cantidad de los contaminantes que originalmente se encuentran presentes en el agua residual de la Ciudad de México con eficiencias mayores al 90% (Jiménez, 2007 en (Jiménez, 2013), este porcentaje solo es representativo para los contaminantes prioritarios convencionales (siendo los más evaluados en especial el agua) que son sólo una parte de la larga lista de contaminantes que afectan hoy en día al ambiente, por lo que es de especial atención poner énfasis en el estudio de aquellos que no se encuentran regulados como son los productos de cuidado e higiene personal, los fármacos y algunos compuestos que pueden o ya se encuentren clasificados como disruptores endócrinos (EPA, 2003). A este respecto estudios recientes realizados en el Instituto de Ingeniería (Chávez *et al.*, 2011) reportan la presencia de compuestos orgánicos considerados como Contaminantes Emergentes (CE's), en particular, destaca la presencia del triclosán tanto del agua que ingresa a la cuenca de Tula como en algunas fuentes de abastecimiento (acuífero) de la zona, por lo que es imperativo ser eliminado del agua de suministro por su posible potencial efecto adverso en la salud de la población (aunque éste no haya sido aún evaluado en la zona). Sin embargo, aun en su baja concentración (ng/L) y por su persistencia en el ambiente, su eliminación por métodos convencionales resulta en ocasiones poco efectiva (Jiménez, 2013). Por ejemplo, varios estudios han demostrado que a través de los tratamientos convencionales de aguas residuales (tratamientos

terciarios), no se logra una eficiente remoción de estos CE's. Aún en las plantas potabilizadoras se ha comprobado que la eliminación de estos contaminantes es incompleta (Petrovic, 2003) y como ya se mencionó, la exposición de estos CE's contenidos en el agua para los seres humanos puede representar un riesgo para la salud, puesto que su comportamiento, destino y disposición de todos los fármacos y metabolitos presentes no es altamente conocida. Su distribución en ambientes acuáticos, debido a propiedades fisicoquímicas como la volatilidad, solubilidad, ionización etc. y el específico diseño que los diferentes fármacos contemplan para blancos específicos que actúan por complejas vías metabólicas, propicia que cuando se encuentran en su forma libre, con cierto grado de ionización y características propias de solubilidad, los mecanismos farmacodinámicos y farmacocinéticos actúen de manera similar en el organismo de vertebrados e invertebrados inferiores como lo hacen en el ser humano y pueda haber manifestación de efectos secundarios y efectos adversos a dosis relativamente bajas.

Dentro de la zona de estudio, el manantial más importante de Valle de Tula es el denominado "Cerro Colorado" considerado como una fuente alternativa de agua (fuente no convencional). Debido a que este acuífero está siendo recargado artificialmente por agua residual sin tratamiento y se utiliza como fuente de abastecimiento, se hace imperativo realizar estudios ecotoxicológicos con la finalidad de demostrar su inocuidad o daños a la salud respectivamente (Jiménez, 2003), ante ello, en este estudio se analizan los posibles daños en seres vivos por los CE's presentes en el manantial y en especial el TCS buscando generar conocimiento sobre sus posibles efectos tóxicos agudos y crónicos (al sistema endocrino). Además, analizar la distribución espacial de la concentración de TCS de pozos, manantiales y suelo aledaño a estos en el Valle de Tula con el objetivo de conocer como la recarga e infiltración del acuífero ha expandido la presencia de este antibacterial en la zona.

2. MARCO TEORICO

2.1 Contaminantes emergentes, CE's

Los CE's son trazas de compuestos químicos orgánicos originarios de productos industriales y domésticos y actividades del ser humano (por ejemplo, plaguicidas, productos de cuidado personal, conservantes, tenso-activos, agentes ignífugos, compuestos perfluorados), que son excretados por el humano (por ejemplo, residuos de fármacos, hormonas esteroideas), o transformados durante los procesos de tratamiento las agua residual y de agua potable (National Research Council, 2012)

La gran mayoría de estos compuestos se encuentran en cantidades muy bajas por litro, sin embargo, las herramientas analíticas actuales poseen una gran sensibilidad y son capaces de detectar nano-gramos por litro o concentraciones aún más bajas (pg/L) de contaminantes orgánicos en el agua. A dichos compuestos es común llamarles CE's (Prado, 2009). En efecto, con la tecnología analítica moderna casi cualquier compuesto químico es posible ser detectado en agua residual, agua renovada y agua potable, pero la relevancia está en la determinación de los mismos para la salud humana y del medio ambiente. Poco se conoce sobre el destino de los CE's en el ambiente por lo cual se considera un riesgo para la salud humana (Prado, 2009).

La Environmental Protection Agency (*EPA* por sus siglas en inglés) define a los CE's como contaminantes no incluidos en los programas de monitoreo de rutina, pero pueden ser futuros candidatos a regulación con base en la ecotoxicología, efectos potenciales de salud, percepción pública y frecuencia media de presencia en el ambiente. Es importante mencionar que estos compuestos han estado presente en los cuerpos de agua durante largos periodos de tiempo, pero, debido al desarrollo analítico para su cuantificación y a los datos de salud se le han dado mayor importancia en la actualidad (National Research Council, 2012).

La información referente a los CE's no es del todo entendida, los métodos usados para la determinación en el medio ambiente requieren aún varias etapas de

investigación y desarrollo, lo que actualmente hace difícil la interpretación de los datos para realizar una adecuada toma de decisiones, puesto que estos compuestos no necesitan persistir en el medio para provocar efectos adversos, si no que su elevada velocidad de transformación/remoción se ve equilibrada con la facilidad de regresar al medio ambiente y mantener concentraciones relativamente constantes (Chávez, 2013).

2.1.1 Fármacos

La presencia de productos químicos farmacéuticos en el medio acuático ha sido reconocida como una preocupación. Las vías principales de productos farmacéuticos en el medio ambiente son a través de la excreción humana y por el uso agrícola (Gil, 2012), una vez que los fármacos son ingeridos ya sea por animales o el ser humano, estos sufren una serie de transformaciones y conjugaciones en su paso por el cuerpo, hasta finalmente ser excretados en la orina y heces fecales cuyo grado de transformación dependerá del tipo de compuesto del que se trate (Hewitt, 2001) de los procesos de adsorción, distribución y metabolismo del compuesto en el organismo, así como la salud del paciente (Petrovic, 2003).

Estos residuos farmacéuticos son transportados al ciclo del agua por diferentes rutas siendo las plantas de tratamiento de agua residual las que actúan como la principal puerta de entrada de estos productos a los cuerpos de agua, porque muchos de estos compuestos no son completamente retenidos en las etapas del proceso y, además, porque muchos residuos farmacéuticos y veterinarios son descargados directamente al ecosistema (Gil, 2012).

No obstante, lo que ha despertado una mayor preocupación con respecto a estos fármacos ha sido el hallazgo de algunos de ellos entre los que destaca el ibuprofeno, el diclofenaco, la carbamazepina o el ácido clofibrico en agua potable (Delgado, 2011).

Según las propiedades físico-químicas de los fármacos, sus metabolitos, productos de degradación, y las características de los suelos, estas sustancias

pueden llegar a alcanzar el agua subterránea y contaminar los acuíferos o bien quedar retenidas en el suelo y acumularse pudiendo afectar al ecosistema y a los humanos a través de la cadena trófica (Barceló & López, 2008).

Aunque los fármacos han sido detectados desde 1970's no se les dio tanta importancia hasta que en el 2002 se detectaron su presencia de al menos 82 trazas de compuestos orgánicos, incluidos triclosán (antimicrobiano de este estudio) y los nonilfenoles (compuestos de detergentes) (National Research Council, 2012).

2.1.2 Triclosán

El triclosán (5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)fenol, TCS) es un agente antibacterial de amplio espectro que es muy usado en productos de cuidado personal como jabones, cremas dentales, cosméticos, cremas para la piel y desodorantes, así como en textiles como ropa deportiva, zapatos y alfombras. De acuerdo a sus propiedades físico-químicas, el TCS es hidrolíticamente estable, relativamente no volátil e hidrofóbico. Estudios recientes sugieren que el TCS posee potencial androgénico y antiestrogénico (Oliveira *et al.*, 2009). Los distintos usos del triclosán han sido evaluados y aprobados por las autoridades reguladoras responsables de la seguridad en productos de higiene personal, materiales en contacto con comidas y químicos en el Reino Unido, Canadá, la Comunidad Europea, USA y otros países.

El éxito del triclosán en su uso diario se atribuye directamente a su actividad antimicrobial inmediata, persistente y de amplio espectro, combinada con un perfil incomparable de seguridad en cuanto a irritación cutánea se refiere. El triclosán es un polvo no-iónico, grisáceo, inodoro y sin sabor. Originalmente fue desarrollado por la compañía Ciba-Geigy en Basel, Suiza a principio de los 60's. Actualmente es distribuido como Irgasan DP300 para aplicaciones cutáneas e Irgacare MP para productos de cuidado oral (Carrillo, 2009).

Este compuesto está regulado por la Food and Drug Administration (FDA por su siglas en inglés) y por la Unión Europea (UE). La FDA lo clasifica como droga de la fase III, mientras que la EPA lo clasifica como pesticida, considerándolo como de alto riesgo para la salud humana y el ambiente, debido a que la formulación química y la estructura molecular de este compuesto son similares con algunos de los productos químicos más tóxicos como dioxinas y PCB's (Carrillo, 2009). En un principio la información generada del triclosán, tenía el propósito de describir el efecto bacteriostático y fungicida característico, posteriormente comenzaron a reportarse casos sobre resistencia del *S. aureus* hacia el triclosán y finalmente a fechas relativamente recientes la información generada en diversos artículos que tratan del triclosán (Kumar et. al. 2008; Gatidou, 2006), lo hacen con la temática de la disrupción endocrina. Recientemente (Septiembre 2016) la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) de Estados Unidos prohibió varios químicos utilizados en los jabones antibacteriales ante los riesgos que implican para la salud, al tiempo que afirmó que no son más efectivos que el jabón tradicional, por lo que prohibió 19 ingredientes, incluyendo dos de los más comunes, triclosán y triclocarban, compuestos ampliamente utilizados todavía en jabones antibacteriales líquidos y en barra, pese a que dañan el sistema inmunológico (Martínez, 2016).

2.2 Disruptores endocrinos, DE

Existe un conjunto de compuestos de diferente naturaleza química y origen presentes en el ambiente, capaces de interferir con el sistema endocrino. Estos compuestos reciben el nombre de disruptores endocrinos (DE). El término DE define, por tanto, a un compuesto o conjunto de compuestos químicos exógenos (naturales o sintéticos) que alteran el normal funcionamiento del sistema endocrino a través de alteraciones en el equilibrio hormonal, causando efectos en los organismos expuestos e inclusive sobre su progenie (IPCS, 2002; Argemini, 2005; Pombo *et al.*, 2005).

Naturalmente el ser humano contiene hormonas, que se producen en células específicas de los testículos, la corteza adrenal, ovarios y placenta. Los testículos

serían los encargados de secretar, principalmente, testosterona (andrógenos), la corteza adrenal produce la aldosterona, cortisol y la DHEA (dehidroepiandrosterona), los ovarios producen los estrógenos que engloban el estradiol, 4-androsteno-3, 17-diona y la progesterona, y por último estaría la placenta que también secreta estradiol y progesterona, pero además produce otra sustancia, el estriol (Gil, 2012).

Los DE se encuentran en el agua residual, entre los 82 compuestos encontrados en el 2002 en lagunas formadas de efluentes de PTAR's se incluyen a los estrógenos sintéticos originarios del control natal, el cual ha sido implicado como agente causal de la feminización de peces (Purdom, 1994) y estudios de laboratorio confirman que el etinilestradiol es capaz de afectar la fisiología de peces en concentraciones de sub-nano gramos por litro, con una concentración sin efectos predicho de 0.35 ng/L (Caldwell, 2008)

Tanto los estrógenos como los andrógenos se introducen al medio ambiente a través de los efluentes de las plantas de tratamiento, donde por su composición química, no son eliminados completamente, y actúan como disruptores endocrinos. Los mecanismos de acción de los DE estudiados hasta la fecha incluyen: 1) mimetizar la acción de las hormonas ocupando su lugar, 2) antagonizar la acción de las hormonas, 3) alterar el patrón de síntesis y metabolismo hormonal, y 4) modular el número de receptores correspondientes (Escudero, 2010).

2.2.1 Formas y efectos de exposición a DE

La exposición de los organismos a los DE es masiva y universal ya que la velocidad de introducción al ambiente es mayor a la velocidad de reducción o remoción. Los DE no persistentes pueden actuar durante cortos períodos de tiempo, en momentos críticos del desarrollo desapareciendo del organismo con facilidad. Los DE persistentes se acumulan en el organismo y pueden actuar a pesar de que la exposición no haya tenido lugar en el momento crítico; a lo anterior contribuye su baja biodegradabilidad, el transporte a otros lugares por el

aire y el agua, así como la bioacumulación en la cadena trófica (Hutchinson, 2006).

En hábitats acuáticos, los DE están fácilmente biodisponibles para los peces a través de una variedad de rutas, incluyendo la respiración, la osmoregulación, y la transferencia materna de contaminantes al embrión vía lípidos del vitelo. El contacto dérmico con sedimentos contaminados o la ingestión de alimentos contaminados también son rutas probables de exposición (Mills y Chichester, 2005).

Aunque los efectos de los DE varían de una especie a otra y son específicos de cada sustancia química, pueden formularse cuatro de importancia de acuerdo con Mills y Chichester, (2005): a) los efectos de los contaminantes pueden ser distintos sobre el embrión, el feto, el organismo perinatal o el adulto, b) los efectos se manifiestan con mayor frecuencia en la progenie que en el progenitor expuesto, c) el momento en que se expone el organismo en desarrollo es decisivo para determinar el carácter, la gravedad y la evolución del efecto; y por último y d) aunque la exposición crítica tenga lugar durante el desarrollo embrionario, las manifestaciones pueden no ser evidentes hasta la madurez del individuo.

2.2.2 DE y fuentes de exposición

En la actualidad y gracias al desarrollo de técnicas para cuantificarlas, se conoce un gran número de sustancias químicas artificiales, que vertidas al medio ambiente tienen el potencial para perturbar el sistema endocrino de los organismos. Entre ellas se encuentran sustancias persistentes, bioacumulativas y órgano halógenas como algunos plaguicidas (fungicidas, herbicidas e insecticidas), sustancias químicas industriales, productos sintéticos y metales pesados (Bridges y Bridges, 2004; Mastandrea *et al.*, 2005). Entre los DE encontrados en el medio acuático están los esteroides estrogénicos como: 17 β -estradiol, estrona, estriol, los cuales están presentes en efluentes de alcantarillados en concentraciones bajas ($\mu\text{g/L}$ y ng/L) (Hyndman *et al.*, 2010). Los xenoestrógenos al ser su estructura muy similar a los estrógenos endógenos se unen a los receptores estrogénicos α o β y así ejercerse su efecto aún a

concentraciones bajas (Larsson y Adolffsson, 2002). Productos de la biodegradación de los detergentes alquil-poliethoxilatos como el nonilfenol y octilfenol, se encuentran en efluentes de alcantarillados y agua de desecho de sistemas sépticos. Algunos alquilfenoles han mostrado su unión a receptores estrogénicos y estimulan una respuesta biológica similar a 17β -estradiol, aunque se requieren investigaciones adicionales para determinar los niveles en el ambiente acuático que pueden tener efecto estrogénico. (White *et al.*, 1994).

2.2.3 Disrupción endocrina en peces

En peces expuestos a efluentes provenientes de PTAR's se ha observado inducción de intersexo y un incremento de las concentraciones de vitelogenina (VTG), proteína precursora de la yema de los huevos, necesaria para su reproducción. Otros efectos ocasionados por la exposición a disruptores endocrinos incluyen la alteración de radios de sexos, anomalías tiroideas y cambios en el comportamiento sexual (Chacón *et al.*, 2007).

Estos efectos ponen en riesgo la supervivencia de las poblaciones afectadas. Entre los compuestos disruptores endocrinos (EDC) que afectan la capacidad reproductora de los peces se encuentran xenoestrógenos como los surfactantes fenólicos (nonilfenol, octilfenol y propilfenol), plastificantes (bisfenol-A y ftalatos) y mezclas de sustancias (estrógenos naturales/ sintéticos y estrógenos naturales/ alquilfenoles/ bisfenol A); inhibidores de aromatasa como el TBT y plaguicidas antiandrógenos como vinclozolin, prochloraz y fenarimol. Recientemente también se ha relacionado la exposición a filtros UV (3-bencilideno y 2-benzofenona) con alteraciones endocrinas en peces (Tierney *et al.*, 2013).

Entre los EDC capaces de alterar el crecimiento y desarrollo de peces se incluyen alteradores de la hormona del crecimiento como los PCBs y alteradores tiroideos, como perclorato, PCB's, pesticidas y PFO's (perfluorooctanesulfonato) (Vecitis *et al.*, 2009).

2.3 Ecotoxicología

La ecotoxicología, disciplina científica relativamente joven, desarrollada a partir de la toxicología y la química medio ambiental y definida por Cairns y Mount, (1990) como “el estudio del destino y efecto de agentes tóxicos en los ecosistemas”, incluye el estudio de los efectos tóxicos a nivel celular, individual, poblacional y comunitario. Integra varias disciplinas, incluyendo la biogeoquímica ambiental, toxicología y ecología, tratando los mecanismos, procesos y respuestas, versando sobre las interacciones entre los organismos, los agentes tóxicos y el medio ambiente (Adriano, 2001, citado en (Marín, 2005)).

Actualmente está creciendo la presión pública para minimizar la utilización de vertebrados en ensayos de ecotoxicidad (Repetto, y otros, 2001) y el interés científico en promocionar el estudio de los efectos de las sustancias químicas sobre organismos terrestres (incluyendo vegetales) y ambientes acuáticos. Las alternativas más prometedoras en ecotoxicología abarcan la utilización de unos pocos organismos con sensibilidad limitada y/o que no están protegidos por la legislación (Repetto *et al.*, 2001).

El objetivo principal de la ecotoxicología es entender y predecir los posibles efectos adversos de los productos químicos antropogénicos sobre el hombre y la vida silvestre. Los enfoques actuales suelen combinar la determinación de las variables químicas con análisis biológico-puntuales individuales (es decir, biomarcadores) donde se requiere un conocimiento *a priori* acerca de las respuestas esperadas. La toxicidad generalmente implica una cascada de, tanto conocidos y potencialmente desconocidos cambios moleculares e interacciones. Por lo tanto, se obtiene un enfoque imparcial en general del avance biológico en el proceso de identificar los cambios específicos, y además, elucidar la gama de mecanismos por los cuales los productos químicos pueden actuar en el ambiente (Kai-Erik *et al.*, 2010).

2.3.1 Bioluminiscencia

Este fenómeno se refiere a la luz producida por organismos vivos, entre ellos, los más abundantes son bacterias de origen marino. Las bacterias luminiscentes

marinas más estudiadas son las especies de *Vibrio harveyi* y *Vibrio fischeri*, que se encuentran asociadas a otros organismos marinos (peces, calamares, etc.) o de forma libre (Wegrzyn y Czyz, 2002). El mecanismo de luminiscencia por parte de estos microorganismos, está dado por una reacción bioquímica en la que participan la luciferina, el oxígeno, la enzima luciferasa y el ATP, para dar como resultado la formación de luz y agua. Este proceso está regulado por varios genes que su vez son expresados con base a el fenómeno de *quorum sensing*, que se refiere a la comunicación entre bacterias (Gonzalez y Keshavan, 2006), dado que la emisión de luz solo aparece cuando existe una alta densidad celular. El mecanismo de producción de luz por bacterias marinas luminiscentes, permite su aplicación posterior en diferentes sistemas biológicos, aprovechando el mecanismo bioquímico de producción de luz, como un indicador de actividades específicas. El uso del sistema luciferina/luciferasa como marcadores bioquímicos, han permitido el desarrollo de sistemas de monitoreo en aplicaciones ambientales, sanitarias, clínicas y genéticas, como herramienta para el desarrollo de sistemas de monitoreo biológico, basados en la producción de luz y/o la cuantificación indirecta del ATP (Marta y Moorillón, 2010).

2.3.2 Inhibición de la luciferina/luciferasa

La luciferasa es una enzima que consume/oxida el pigmento luciferina con un gasto de ATP, que en la célula suele proceder de la transformación del pirofosfato por el enzima sulfurilasa. La reacción de oxidación libera luz, de color diferente según la composición de la luciferina y luciferasa, lo que explica la producción de varios colores, en distintas especies de organismo (Ando *et al*, 2008). Con la ayuda de los sistemas luciferina-luciferasa se puede probar la ausencia de ATP de manera rápida. Esto se utiliza principalmente en los estudios de toxicidad aguda y crónica usando a la especie *Vibrio fischeri* para detectar contaminaciones potenciales, ya que el ATP sólo está presente en organismos vivos que pueden ser monitoreados por su bioluminiscencia en dichos estudios la pérdida de bioluminiscencia indicaría un potencial tóxico importante (Marta y Moorillón, 2010).

2.3.3 Biomarcador

En estudios de ecotoxicidad, tanto en peces como en otros organismos, es importante utilizar biomarcadores que permitan constatar el potencial tóxico o disruptor. Por lo tanto, en peces y otros vertebrados ovíparos con frecuencia se utiliza como biomarcador la inducción de VTG (Aranzazu *et al.*, 2009; Aranzazu *et al.*, 2011).

Se conocen como biomarcadores a los componentes celulares, bioquímicos o sobre procesos, estructuras o funciones en un organismo vivo, que son cuantificables en un sistema biológico o muestra. En sentido amplio, se define como la presencia de un xenobiótico en un fluido biológico y/o las alteraciones inducidas por el mismo (ENTOX/TIWET, 1996). La palabra biomarcador hace referencia a la respuesta biológica del organismo frente a la agresión de un xenobiótico (Walker *et al.*, 1996) y no a la presencia de éste o algún metabolito de él en el organismo, aunque es indudable que la medida del xenobiótico en un sistema biológico o muestra es un indicador biológico de exposición, y por tanto, debería ser considerado bajo este concepto (ENTOX/TIWET, 1996).

La definición de biomarcador ideal de acuerdo con Grandjean y colaboradores, (1994) implica que éste debe cumplir los siguientes requisitos: a) recolección de la muestra y análisis fácil; b) específico; c) que refleje únicamente un cambio subclínico y reversible; d) que permita adoptar medidas preventivas; e) y ser éticamente aceptable.

Al considerar esta definición son muy pocos los que se ajustan a ella. Los biomarcadores se mueven en un intervalo muy amplio de especificidad desde los que presentan una alta especificidad (la inhibición de la acetilcolinesterasa -AChE- por los insecticidas organofosforados y carbámicos o la inhibición de la ALA-D por el plomo) hasta los muy inespecíficos (los aductos de ADN o los marcadores de respuesta inmune) (Walker *et al.*, 1996), de ahí que un aspecto importante a valorar sea la complementariedad entre ellos, lo que permite indudablemente aumentar el grado de especificidad.

Se distinguen en general tres tipos de biomarcadores: biomarcadores de exposición, biomarcadores de susceptibilidad y biomarcadores de respuesta. El primero puede ser un compuesto exógeno dentro del organismo que refleja la exposición de éste a un xenobiótico. El análisis se realiza en fluidos corporales (Repetto, 1997; Van Cauteren *et al.*, 1996) y en caso de tratarse de tóxicos acumulativos, la dosis interna puede también reflejar la cifra de agente tóxico almacenado en uno o varios compartimentos corporales (órganos). A su vez estos biomarcadores de exposición se dividen en selectivos y no selectivos, basándose en la especificidad de las pruebas de detección. Los biomarcadores de exposición selectivos se basan en la medida directa del tóxico o sus metabolitos en fluidos biológicos (p. ej. plomo en sangre) y los no selectivos constituyen un grupo de indicadores inespecíficos de exposición (Gil, 2000) (p.ej. vitelogenina como biomarcador de disrupción endocrina de un agente xenobiótico).

Los biomarcadores de susceptibilidad sirven como indicadores de sensibilidad individual al efecto de un xenobiótico o grupo de compuestos tóxicos generalmente a factores genéticos, reconocibles por estudios de ADN y sus fragmentos de restricción (RFLPs), clonado de genes e investigación de polimorfismos de actividades enzimáticas (Repetto, 1997).

Biomarcadores de respuesta (o efecto). El biomarcador de respuesta o efecto es indicativo de cambios bioquímicos en un organismo como resultado de la exposición a xenobióticos. Incluyen modificaciones en la composición celular sanguínea, alteraciones en actividades enzimáticas, aparición de aductos del ADN, incrementos localizados de ARN-m, aumento de determinadas proteínas, e incluso aparición de anticuerpos específicos (autoanticuerpos) contra un xenobiótico (Gil, 2000).

2.3.4 Inducción de vitelogenina como biomarcador de toxicidad

En peces, los principales componentes del huevo, como la yema (VTG), son sintetizados en el hígado de hembras bajo regulación endocrina y transportados a la sangre para la toma posterior por el oocito. Tanto machos y hembras tienen receptores hepáticos para estrógenos, pero solo los hígados de peces hembras

están expuestos normalmente a los estrógenos. Por lo tanto, la producción de estas proteínas en peces macho o peces inmaduros proporciona un indicador útil para detectar la presencia de DE con actividad estrogénica (Arukwe *et al.*, 1997; Arukwe *et al.*, 2003).

La característica útil de la inducción de VTG como biomarcador es su especificidad para los estrógenos, la sensibilidad y la magnitud de la respuesta posible de tal manera que la concentración de VTG puede incrementarse hasta un millón de veces en plasma (Davis *et al.*, 2009; Kashiwada *et al.*, 2002). Las pruebas para VTG se han desarrollado para un amplio intervalo de especies de peces y en el momento se encuentran disponibles en el mercado algunas de estas (Fossi *et al.*, 2002; Inui *et al.*, 2003; Solé *et al.*, 2002).

2.3.4 Pez Cebra (*Danio rerio*)

El “Pez Cebra”, de nombre científico *Danio rerio*, es un pez tropical de agua dulce, proveniente del sudeste asiático y muy común en acuarios de todo el mundo. Pertenece a las familias de los ciprínidos. Su fisonomía se caracteriza principalmente por ser transparente, tener rayas horizontales que cruzan su cuerpo hasta la cabeza y no medir más de 5 centímetros. Este pez ha sido objeto de múltiples estudios por la comunidad científica en los últimos 20 años, incluso más, debido a sus múltiples propiedades y su parecido genético con el hombre (Moreno, 2014) por lo que se ha tomado a esta especie como modelo en estudios ecotoxicológicos.

El desarrollo del pez cebra es muy similar a la embriogénesis de vertebrados mayores, incluyendo los seres humanos, pero, a diferencia de los mamíferos, el pez cebra se desarrolla a partir de un óvulo fecundado en un adulto fuera de la hembra en un huevo transparente. Por otra parte, los propios embriones son transparentes durante los primeros días de su vida (Wixon, 2000 citado en Bopp *et al.*, 2005).

El desarrollo embrionario del pez cebra es muy rápido: en las primeras 24 horas después de la fertilización, todos los órganos se desarrollan y en tres días la larva del pez comienza a buscar comida. Después de tres o cuatro meses, el pez cebra es sexualmente maduro y puede generar nuevas crías.

2.3.5 Pruebas ELISA

Dependiendo de los tejidos u órgano blanco a evaluar, se ha desarrollado una amplia variedad de pruebas para medir la expresión de proteínas oogénicas en peces. Estas incluyen radioinmunoensayo (RIA), ELISA e IHQ utilizando anticuerpos monoclonales y policlonales (Nilsen *et al.*, 2004).

El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) utiliza como sus siglas lo indican una enzima como marcador para mediar la formación de complejos antígeno-anticuerpo. Existen diversas variaciones al método de ELISA para detectar y cuantificar ligandos por su peso molecular, el marcador enzimático que se emplea en estos análisis se conjuga con un ligando, que puede ser un antígeno, un anticuerpo específico para el antígeno de interés o un anticuerpo para el anticuerpo primario (Raichle y Paranto, 1994). Casi todas las pruebas ELISA son ensayos en fase sólida en los cuales se adsorbe un antígeno o un anticuerpo sobre un soporte sólido que suelen ser microplacas con múltiples pocillos que se utilizan como pequeños tubos de ensayo donde se llevan a cabo los enlaces (Farkas, 1992).

El ensayo ELISA puede ser directo o no competitivo e indirecto o competitivo, se diferencia del caso anterior en que se añaden los anticuerpos, previamente incubados con la muestra, los anticuerpos que no se han unido a los antígenos de la muestra lo harán a los antígenos de los pocillos utilizando enzimas como la peroxidasa. Existe también la ELISA tipo sándwich que es un ensayo de captura de antígeno y detección mediante inmunocomplejos. Se trata de un ensayo muy empleado en el que se recubre el pocillo con un primer anticuerpo anti-antígeno. Después de lavar el exceso de anticuerpo se aplica la muestra problema en la que se encuentra el antígeno, que será retenido en el pocillo al ser reconocido por el

primer anticuerpo. Después de un segundo lavado que elimina el material no retenido se aplica una solución con un segundo anticuerpo anti-antígeno marcado. Así pues cada molécula de antígeno estará unido a un anticuerpo en la base que lo retiene y un segundo anticuerpo como mínimo que lo marca, es un ensayo que tiene una gran especificidad y sensibilidad debido a que el segundo anticuerpo genera la amplificación de la señal (Nilsen *et al.*, 2004).

2.3.6 Anticuerpos – Antígenos

El principio básico de cualquier técnica inmunoquímica es el de que un anticuerpo específico se unirá con un antígeno específico para dar un complejo anticuerpo-antígeno exclusivo.

Un anticuerpo se define como una inmunoglobulina (*Ig*) capaz de una combinación específica con el antígeno que ha causado su producción en un animal susceptible y son producidos en respuesta a la invasión de moléculas foráneas en el cuerpo. Un antígeno es cualquier sustancia foránea que trasporta información o elicitaba una respuesta inmune cuando es introducida dentro de tejidos de animales susceptibles y que son capaces de combinar con los anticuerpos específicos formados (Roitt y Delves, 2003). Los antígenos son generalmente de alto peso molecular y comúnmente son proteínas o polisacáridos. Polipéptidos, lípidos, ácidos nucleicos y otras moléculas pueden también funcionar como antígenos. La respuesta inmune puede también ser generada contra sustancias pequeñas, llamadas haptenos, si estos están acoplados a una proteína acarreadora, como la albúmina de suero bovino (BSA) u otras matrices sintéticas. Una variedad de moléculas como drogas, azúcares simples, aminoácidos, pequeños péptidos, fosfolípidos o triglicéridos pueden funcionar como haptenos. Así, dándole suficiente tiempo, cualquier sustancia foránea será identificada por el sistema inmune y evocará la producción de un anticuerpo específico. Sin embargo, esta respuesta inmune específica es altamente variable y depende mucho en parte del tamaño, estructura y composición de los antígenos. Los antígenos que elicitaban una

fuerte respuesta inmune se dice que son altamente inmunogénicos (Roitt y Delves, 2003).

La asociación se da cuando antígenos y anticuerpos interactúan por complementariedad espacial y no por uniones covalentes. La asociación específica del antígeno y el anticuerpo es dependiente de los puentes de hidrogeno, las interacciones hidrofóbicas, fuerzas electrostáticas y las fuerzas de van der Waals; por lo general sólo son efectivas en distancias cortas reconociéndose y uniéndose si existe afinidad (Price, 2001), es decir mediante el empleo de enzimas, bien unidas al antígeno, o bien unidas al anticuerpo donde se identifican los complejos o específicamente para el ensayo ELISA tipo sándwich mediante la captura de antígeno y la posterior detección usando inmunocomplejos.

2.4 Normativa Mexicana en ensayos de toxicidad aguda (proy-nmx-aa-112-scfi-2013)

Los ensayos de toxicidad aguda utilizando bacterias han adquirido esta gran importancia en los últimos años no sólo por ofrecer características como análisis rápidos usando matrices ambientales reales, sino también debido a la correlación existente entre los resultados obtenidos a través de estos ensayos y los bioensayos convencionales de amplia utilización. Así, para muchos compuestos y muestras, los datos de toxicidad obtenidos con el ensayo se corresponden bien con las toxicidades agudas obtenidas con los ensayos de toxicidad estándar.

Vibrio fischeri (antes *Photobacterium phosphoreum*). Es una bacteria marina, bioluminiscente, no patógena con forma bacilar, Gram-negativa, anaerobia facultativa, halofílica, posee un flagelo en uno de sus extremos. Bacteria liofilizada *Vibrio fischeri* (NRRL B-11177) almacenada a una temperatura de -18 °C a -20°C. La determinación de la toxicidad con la Bacteria *Vibrio fischeri*, puede realizarse utilizando cultivo fresco, deshidratado o liofilizado. Para el caso de la tesis, se utilizará la bacteria liofilizada. La prueba se basa en la medición de la reducción de la luminiscencia emitida por la Bacteria *V. fischeri* posterior a su exposición a una muestra problema durante un periodo de 5 a 30 minutos, en comparación con la

luminiscencia observada en bacterias que permanecen en las condiciones óptimas del sistema control.

Ante la presencia de sustancias tóxicas, la luminiscencia disminuye de forma proporcional a la carga tóxica en la muestra problema. Este decaimiento sucede como resultado del daño ocasionado a los procesos metabólicos asociados con la respiración bacteriana. La reacción de bioluminiscencia bacteriana está ligada al sistema de transporte de electrones en la respiración celular y es indicativa del estado metabólico de la célula, de modo que una disminución de la bioluminiscencia indica la disminución de la respiración celular. Los contaminantes físicos, químicos y biológicos afectan a la respiración celular alterando el porcentaje de síntesis de proteínas y lípidos y modificando por tanto el nivel de emisión de luminiscencia (García, 2004).

Las sustancias tóxicas se pueden considerar desde el punto de vista de "sustancia química individual" (esto es, sustancias químicas específicas, tales como plomo, clordano o lindano) o desde el punto de vista de la "toxicidad total del efluente". Para el último caso, el efluente se considera como una mezcla compleja de sustancias químicas que no pueden ser aisladas en compuestos específicos con algún grado de consistencia. La toxicidad total del efluente se convierte en la variable relevante sustituta para propósitos de control y se basa en pruebas toxicológicas, a partir de los cuales se determinan parámetros como CL₅₀, CE₅₀, CI₅₀, NOEC y LOEC, que permiten estimar las unidades de toxicidad en cuerpos de agua y vertimientos (García *et al.*, 2007).

2.5 Normativa Internacional (Actividad estrogénica y androgénica y la inhibición de la aromatasa OECD/OCDE 230)

Este ensayo describe un estudio *in vivo* de una proyección donde un macho sexualmente maduro y una hembra en desove se mantienen juntos y expuestos a una sustancia química en una parte limitada de su ciclo de vida (21 días). A la terminación del período de exposición de 21 días, dependiendo de la especie utilizada, se miden en machos y hembras un biomarcador, como indicadores estrogénicos, inhibidor de la aromatasa o la actividad androgénica de la sustancia

problema; este criterio de valoración es la vitelogenina. La vitelogenina se mide en carpita cabezona, medaka japonés y pez cebra.

Se han hecho contados estudios referentes a esta normativa y al TCS como agente de exposición, Ishibashi *et al* en 2004 midieron los efectos de este antibacteriano en Medaka (*Oryzias latipes*) en sus primeros estadios de vida y como inductor de vitelogenina hepática encontrando que en larvas de 24 h de edad la DL₅₀ fue de 602 µg/L ; el porcentaje de nacimientos expuestos a 313 µg /L TCS durante 14 días se redujo significativamente y el momento de la eclosión de los huevos fertilizados se retrasó; las concentraciones de vitelogenina hepática aumentaron de manera significativa en los machos tratados con TCS en concentraciones de 20 y 100 µg /L después de 21 días de exposición, mostrando un efecto estrogénico. Por su parte Foran, Bennett y Benson en el año 2000 encontraron una proporción de sexos que sugiere que el TCS es potencialmente un androgénico débil y no apoya la teoría de que es un potente estrogénico, al observar dicha proporción dos meses después de la exposición a concentraciones de 100, 10, 1 µg /L durante 14 días y donde el sexo fenotípico de cada adulto se evaluó visualmente.

El uso de la vitelogenina como biomarcador e indicador estrogénico es crucial en ensayos que pretenden validarse de acuerdo a esta norma internacional, se han usado otros vertebrados para su experimentación, por ejemplo el uso de quelonios de la especie *Cheloniamydas agassizii* donde se utilizó una cuantificación parcial de la vitelogenina extraída del plasma sanguíneo del organismo para medir su potencial como biomarcador xenoestrogénico (Romero, 2004). Los teleósteos como *Cyprinus carpio* en Rivas, 2008 también son utilizados buscando validar ensayos ecotoxicológicos de disrupción endocrina a nivel reproductivo. Generalmente estos estudios se llevan a cabo en matrices controladas, donde la concentración de la sustancia química estudiada se conoce, mas no se sabe cómo influye la combinación de diversas sustancias a distintas concentraciones en el ambiente natural en el resultado de los ensayos, de ahí la importancia de comparar matrices en la experimentación ya que ofrece la posibilidad de discutir el

comportamiento de los contaminantes aislados y en conjunto, determinando, solo tal vez, la influencia que dicha sustancia con respecto a las otras presentes en la matriz ambiental estudiada.

2.6 Sistemas de Información Geográfica (SIG)

Se trata de sistemas de gestión de bases de datos que permite mapear, integrar y analizar información relacionándola con su medio físico (territorio) a fin de resolver problemas en investigación, planificación, ordenamiento y gestión geográfica (Zepeda, 2004). La principal característica de este sistema es que está diseñado para trabajar con datos georreferenciados ya sean coordenadas espaciales o geográficas y esto permite conocer su relación con respecto a otros elementos ya que los datos espaciales asociados a una localización específica muestran características únicas del sitio y permite analizar situaciones que sean de utilidad para la toma de decisiones ambientales y sociales (Bocco, 2000).

2.6.1 Análisis Espacial en los SIG

El análisis espacial es una rama de la investigación cuyo desarrollo es relativamente reciente. Se apoya en los métodos estadísticos y los modelos matemáticos, aunque también utiliza los mapas y la simulación, integrando también los resultados de encuestas sobre los comportamientos en el espacio y sus representaciones. Es empleado por muchas otras disciplinas además de la geografía: economía espacial (o ciencia regional), historia, agronomía, arqueología, ciencias del medio ambiente, etc. Puede ser la más sofisticada y conveniente de las aplicaciones de los SIG, pero no es en modo alguno la más significativa comercialmente (Longely et al., 2001).

Este tipo de análisis comprende un conjunto de procedimientos utilizados para abordar el estudio de la estructura y las relaciones territoriales a partir del conocimiento de la posición y las características de las entidades geográficas de las variables involucradas. En efecto, las aplicaciones más usuales tienden a responder a necesidades más sencillas de búsqueda y de inventarios (Goodchild y Haining, 2005).

2.6.2 Tipos de análisis espacial

El análisis espacial es uno de los aspectos más interesantes y destacables de los SIG. El objetivo que persigue es derivar nueva información de los datos existentes para permitir una mejor toma de decisiones y aunque asignar símbolos a los datos y visualizarlos en un mapa ya es en sí una forma de análisis, y que los mapas inherentemente invitan a la interpretación de los patrones y las relaciones que muestran, el análisis espacial va un paso más allá y aplica operaciones geográficas, estadísticas y matemáticas a los datos representados en el mapa (Chrisman, 2002).

De acuerdo con Olaya, (2012) existen familias principales de tipos de análisis: **Consulta espacial**, es la consulta directa, es el análisis más básico cuando se trabaja con cartografía clásica, en la que la propiedad fundamental es la posición de cada elemento. Da respuestas a preguntas de las capas espaciales y también cuestiona las bases de datos donde se tiene asociada información no espacial. **Análisis Topológico**, los datos espaciales pueden tener relación con otros elementos dentro de la misma capa. Medición, al existir referencia espacial se puede cuantificar otra serie de parámetros espaciales como la distancia, el área, el perímetro, la longitud de un recorrido no lineal y factores de forma. **Combinación**, se trata de la combinación de varias capas de información. Es idónea para integrar toda la información disponible acerca de una región en concreto y sus capas se pueden combinar de manera muy sencilla. **Transformaciones**, una amplia gama de procesos que modifican los elementos de entrada, como por ejemplo áreas de influencia, (simplificación) de líneas, o conversiones de tipo cartográfico, (conversión entre distintos sistemas de coordenadas). Un tipo de transformación es relativa al modelo de datos o bien vectorial o bien ráster, ya que cada modelo es apto para una cosa diferente. También tenemos transformaciones basadas en valores de variables estudiadas, por ejemplo reclasificaciones de mapas, que en el caso de los datos categóricos transforman la identificación de cada elemento en una clase dada. **Análisis de superficies**, este es uno de los más potentes, van desde el análisis de orientación y pendiente, que son los más simples hasta análisis hidrológicos. Se puede usar para todo tipo de superficies, no sólo

terrestre. **Estadística descriptiva**, elementos de estadística clásica tienen equivalentes en la estadística espacial. Tenemos descriptores de centralidad y dispersión, dependencia espacial, y longitud. Pueden usarse para el contraste de hipótesis que contenga una cierta componente espacial. **Inferencia**, podemos inferir comportamientos de las distintas variables y estudiar su evolución a lo largo del tiempo. **Toma de decisiones y optimización**, la realización de actividades en el espacio físico conlleva una serie de consecuencias. Los SIG ayudan a minimizar o maximizar el impacto de estas actividades. Se pueden estudiar aquellos factores que influyan en nuestra actividad diaria. **Modelización**, estos tipos de análisis no son independientes entre sí y la verdadera potencia está en la elaboración de metodologías que combinen estos tipos de análisis.

Los procesos de interpolación por su parte se basan, en mayor o menor medida, en el uso de técnicas estadísticas suele utilizarse para obtener capas ráster que representan la variable a interpolar. Lo más habitual es partir de medidas puntuales (variables climáticas, variables del suelo) o de isolíneas (curvas de nivel). Aunque los métodos que se utilizan en uno u otro caso son bastante diferentes, todos los métodos de interpolación se basan en la presunción lógica de que cuanto más cercanos estén dos puntos sobre la superficie terrestre, los valores de cualquier variable cuantitativa que midamos en ellos serán más parecidos, para expresarlo más técnicamente, las variables espaciales muestran autocorrelación espacial (Moreano Viteri, 2008).

2.6.3 Tipos de interpolación: TIN, Spilines, Kriging e IDW

La interpolación TIN es otra herramienta popular en los SIG. Un algoritmo TIN común es llamado Triangulación de Delaunay. Este intenta crear una superficie formada por triángulos de puntos vecinos más cercanos. La desventaja principal de la interpolación TIN es que las superficies no son lisas y pueden dar una apariencia irregular. Esto es causado por pendientes discontinuas entre los límites de los triángulos y los puntos de datos de muestra. Además, la triangulación generalmente no es adecuada para la extrapolación más allá de la zona que contiene los puntos de datos de muestra recolectados (Mitchell, 1999).

El método de los splines ajusta funciones polinómicas en las que las variables independientes son X e Y. Es similar a una interpolación global mediante regresión, pero ahora esta interpolación se lleva a cabo localmente. En general producen resultados muy buenos con la ventaja de poder modificar una serie de parámetros en función del tipo de distribución espacial de la variable (Mitchel, 2005).

La interpolación Kriging, está basada en modelos estadísticos que incluyen la autocorrelación, es decir, las relaciones estadísticas entre los puntos medidos. Gracias a esto, las técnicas de estadística geográfica no solo tienen la capacidad de producir una superficie de predicción sino que también proporcionan alguna medida de certeza o precisión de las predicciones. Kriging presupone que la distancia o la dirección entre los puntos de muestra reflejan una correlación espacial que puede utilizarse para explicar la variación en la superficie. La herramienta Kriging ajusta una función matemática a una cantidad especificada de puntos o a todos los puntos dentro de un radio específico para determinar el valor de salida para cada ubicación. Sin embargo es recomendado para grandes áreas o extensiones y requiere un mínimo de 50 estaciones de muestreo de la variable Z para que el análisis pueda ser plausible (Mitchel, 2005). En Kriging, el coeficiente de correlación se introduce precisamente para obtener un estadístico que dependa sólo de la relación entre las variables. Sus valores oscilan entre 1 y -1. Un valor próximo a 1 indica que las dos variables crecen al unísono, un valor próximo a -1 que cuando la primera crece la segunda decrece y viceversa, finalmente un valor próximo a 0 indica ausencia de relación. El caso del espacio es similar al del tiempo pero algo más complejo (Brooker & Michael, 2000). El espacio es bidimensional y no hay una dirección preferente. Esto implica que los valores de autocorrelación no tienen por qué ser los mismos en todas las direcciones. Además mientras que en una serie temporal disponemos de todos, o casi todos, los datos medidos como valores agregados (diarios, mensuales, etc.); en un estudio espacial sólo disponemos de los valores medidos en algunos puntos de muestreo en un espacio infinito, por tanto la estimación de medias, desviaciones típicas y covarianzas no es muy fiable. Por ello se prefiere utilizar otro estadístico

alternativo al coeficiente de correlación y que no se basa en estos parámetros, es el semivariograma. El semivariograma nos da una visión de cuál es la estructura de variabilidad espacial de una variable medida en un conjunto de puntos. Este gráfico nos proporciona información de gran utilidad para interpolar nuevas capas de información espacial a partir de datos puntuales (Mitchell, 1999). Nos da una indicación de como la distancia entre los puntos influye sobre las diferencias en los valores de las variables medidas en ellos. La interpretación del semivariograma utiliza tres conceptos fundamentales: efecto pepita, es el valor del semivariograma en el origen. Resulta del componente aleatorio, no correlacionado espacialmente, que experimenta cualquier variable espacial. Se denomina así por las pepitas de oro que representan un brusco incremento en la variable concentración de oro para distancias muy cortas. Meseta, es el valor máximo que adopta el semivariograma para distancias elevadas más allá de las cuales no hay autocorrelación espacial. Rango, es la distancia a la que se alcanza la meseta. Puede asimilarse a la distancia más allá de la cual dos medidas pueden considerarse independientes (Moreano Viteri, 2008).

En el método de interpolación IDW o Distancia Inversa Ponderada (IDW), presupone que la variable que se representa cartográficamente disminuye su influencia a mayor distancia desde su ubicación de muestra. Los puntos de muestreo se ponderan durante la interpolación de tal manera que la influencia de un punto en relación con otros disminuye con la distancia desde el punto desconocido que se desea crear (Mitchell, 1999). La ponderación es asignada a los puntos de muestreo mediante la utilización de un coeficiente de ponderación que controla cómo la influencia de la ponderación decae mientras la distancia hacia el punto nuevo se incrementa. Mientras más grande sea el coeficiente de ponderación menor será el efecto que los puntos tendrán si están lejos del punto desconocido durante el proceso de interpolación. Conforme el coeficiente se incrementa, el valor de los puntos desconocidos se aproxima al valor del punto de observación más cercano. Es importante hacer notar que el método de interpolación IDW también tiene algunas desventajas: La calidad del resultado de interpolación puede disminuir si la distribución de los puntos de datos de la

muestra es desigual. Además los valores máximos y mínimos en la superficie interpolada pueden ocurrir únicamente en los puntos de datos de la muestra. Esto a menudo resulta en pequeños picos y pozos alrededor de los puntos de datos de la muestra (Brooker & Michael, 2000). En SIG, los resultados de la interpolación usualmente se muestran como una capa ráster de dos dimensiones.

3. ANTECEDENTES

3.1 Tratamiento de agua

Las plantas de tratamiento de agua residual (PTAR's) de nivel secundario, es decir, métodos basados en procesos mecánicos y biológicos, no son capaces de degradar los contaminantes en cuestión (Federman, 2011) debido a su complejidad y a que éstos reaccionan y forman algunos metabolitos más tóxicos que el compuesto original. Tales contaminantes, o microcontaminantes, por lo tanto, se detectan con frecuencia a concentraciones de hasta unos pocos microgramos por litro en el agua superficial. Por lo tanto, los efluentes de las PTAR's se consideran como una de las principales vías para la introducción de microcontaminantes en los ecosistemas acuáticos, mismos que pueden afectar comunidades de macroinvertebrados (Federman, 2011).

Los sistemas naturales de tratamiento (SAT por sus siglas en inglés) se emplean en muchos de los sistemas de reutilización de agua potable puesto que proporcionan una amortiguación ambiental. Sin embargo, la protección a la salud por dichas barreras "naturales" no ha sido demostrado (National Research Council, 2012) por lo que se han sugerido las pruebas ecotoxicológicas para asegurar o garantizar tal protección.

El manantial de Cerro Colorado se ubica en el municipio de Tlahuelilpan en el Estado de Hidalgo (Latitud Norte 20° 07' 13", Longitud Oeste 99°15'43") (Figura 1) en el DR03. Este manantial abastece a cerca de 130 mil personas (INEGI, 2010) a un gasto de 600 L/s. Al igual que los otros manantiales que han surgido en la zona, procede de la infiltración del agua residual, sin previo tratamiento, empleada para riego agrícola (Jiménez, 2013).



Figura 1. Manantial de Cerro Colorado

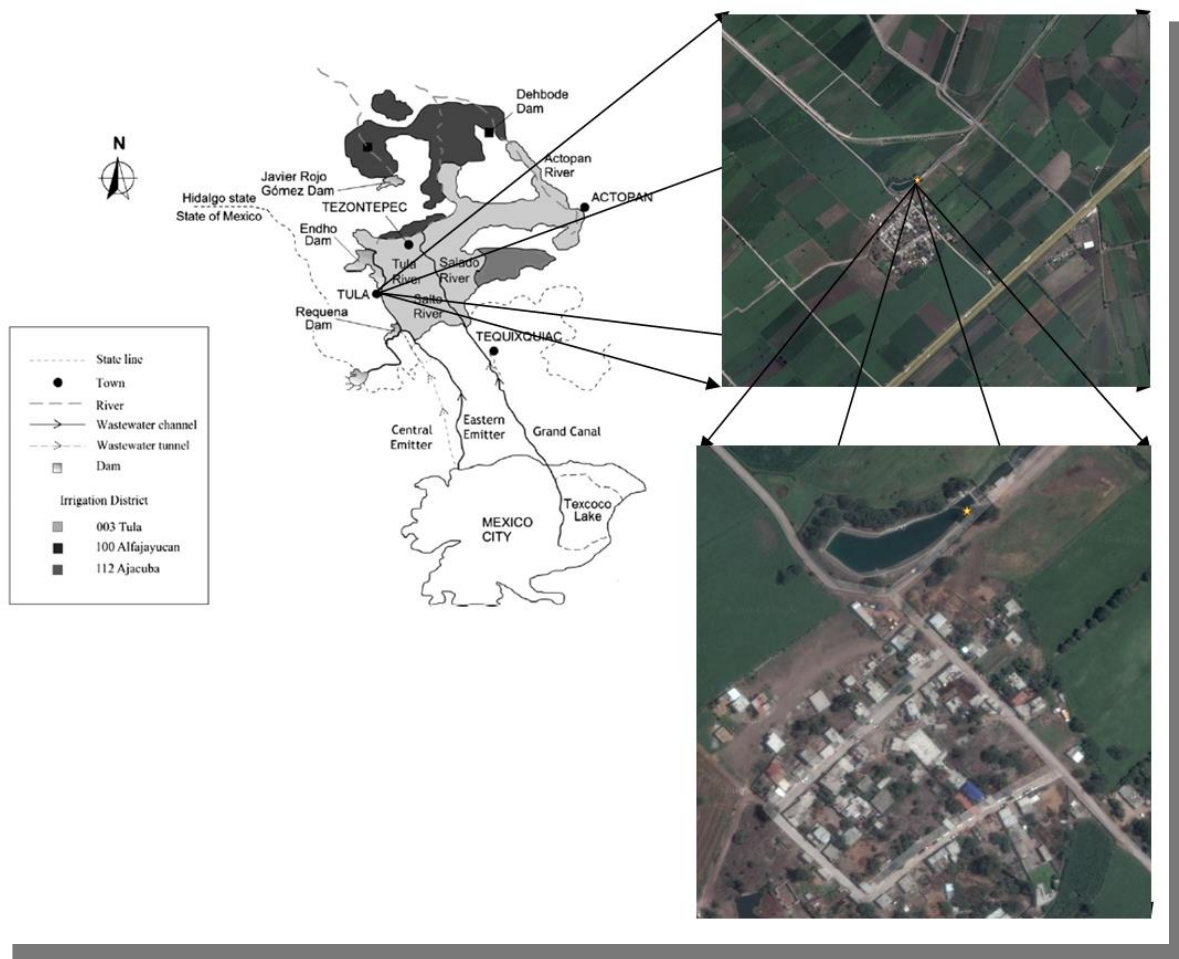


Figura 2. Localización del Valle de Tula tomado de (Chávez, Maya, Gibson, & Jiménez, 2011)

En el manantial Cerro Colorado, se ha reportado la presencia de los compuestos orgánicos que se muestra en la Tabla 1 y en donde se destaca que 8 de 18 contaminantes investigados presentan concentraciones en ng/L destacando los compuestos del 4-nonilfenol, **triclosán (TCS)**, butilbencilftalato (BuBeF), Bisfenol A y DiEtilHexilFtalato (DEHF) debido a su mayor concentración en relación a los otros contaminantes reportados (Jiménez, 2013).

Ante la necesidad de potabilización del agua, el grupo dirigido por Jiménez en 2013 instaló una planta piloto a base de membranas de nanofiltración debido a que tiene la capacidad de rechazar contaminantes con tamaño de partícula hasta de 0.001 μm y por considerarse más barata de operar que la ósmosis inversa pero potencialmente efectiva para remover los contaminantes que las membranas de

ultrafiltración, sin embargo, Agenson *et al.*, (2003); Boussu *et al.*, (2005); Braekenet *et al.*, (2005); Verliefde *et al.*, (2006) citado en (Jiménez, 2013) observan que a pesar de que la nanofiltración presenta altas retenciones para la mayoría de los micro-contaminantes orgánicos, existe un remanente en los permeados de los sistemas de nanofiltración (Ver Tabla 2).

Tabla 1. Contaminantes emergentes entre 1997 y 2011, Manantial Cerro Colorado, Tula, Hidalgo Adaptación y modificación de: Jiménez, (2013)						
Parámetros	Mín	Máx	Promedio	DS	Formula molecular	Daño Potencial a la Salud o al Ambiente
Contaminantes emergentes (ng/L)						
4-Nonilfenol	1.82	16	6.13	1.82	$C_{15}H_{24}O$	Disruptor endocrino estrogénico
Triclosán	0.76	8.9	2.68	0.76	$C_{12}H_7O_2Cl_3$	Efectos tóxicos, posible disruptor endocrino
Bisfenol-A	0.81	2.15	1.54	0.81	$C_{15}H_{16}O_2$	Mutagénico y carcinogénico
BuBeF	0.95	16.7	6.64	0.95	$C_{14}H_{20}O_2$	Carcinogénicos en seres humanos
DEHF	15.8	70.4	52.23	15.8	$C_{24}H_{38}O_4$	Nocivos para el aparato reproductor masculino y son tóxicos para la reproducción
Estrona	0.165	0.26	0.23	0.16	$C_{18}H_{22}O_2$	Agente teratogénico en mujeres
Estradiol	0.06	0.06	0.06	0.06	$C_{18}H_{24}O_2$	Alteración hormonal, migraña, depresión
EtilEstradiol (EE2)	0.06	0.06	0.06	0.06	$C_{20}H_{24}O_2$	Disruptor endocrino estrogénico, feminización en los machos
Ácido clofibrico	0	0.18	0.09	0	$C_{10}H_{11}ClO_3$	Disminución de la libido, impotencia.
Ketoprofeno	0	0.17	0.08	0	$C_{16}H_{14}O_3$	Elevación de enzimas hepáticas y daño fetal precoz
Gemfibrozil	0	0.06	0.03	0	$C_{15}H_{22}O_3$	Elevación de enzimas hepáticas
Ibuprofeno	0	1.5	0.46	0	$C_{13}H_{18}O_2$	Sobreesfuerzo cardíaco
Ácido salicílico	0.29	11.4	6.19	0.29	$C_7H_6O_3$	No es considerado peligroso para el ambiente
Naproxeno	0	0.99	0.51	0	$C_{14}H_{14}O_3$	Daños hepáticos y renales en peces
Diclofenaco	0	0.4	0.1	0	$C_{14}H_{11}NCl_2O_2$	Necrosis tubular en el riñón
Carbamazepina	0	7.7	5.1	0	$C_{15}H_{12}N_2O$	Acumulación, alteraciones en el comportamiento y fisiología, así como inhibición del crecimiento

Tabla 2. Concentraciones de los contaminantes emergentes en tres diferentes matrices (permeado, agua de manantial, agua ablandada fortificada con microcontaminantes orgánicos) (ng/L).

Grupo	Contaminantes emergentes	Agua Cruda manantial	Agua ablandada fortificada	Permeado de membrana	% de remoción
fármacos	Ácido salicílico	11±1.2	4214±179	378±94.7	91
	Carbamazepina	<LOD	1087±52.51	<LOD	100
	Diclofenaco	<LOD	926±94	12.2	99
	Ibuprofeno	2.47±1.06	366±10.7	5.6±2.2	98
	Naproxeno	13±4.29	2,153±30.90	24±11.8	98
	Gemfobrozil	3.4±0.86	9.61±2.6	7.75±3.5	19
Fenoles, disruptores endocrinos y hormonas	Triclosán	218±139	118,535±1224	235±21	98
	Mezcla de nonilfenoles	163±4.88	899±42.4	135±7.5	85
	Bisfenol-A	1004±60.4	10,825±2006	2.554±292	76
	BuBeF	77	20,422±627	<LOD	100
	DEHF	2008±1330	1,717±1870	277±213	84
	Estrona	<LOD	115±75	<LOD	100
	Estradiol	<LOD	59.6±7.5	<LOD	100
	(<LOD = menor al límite de detección o no detectado)				

Adaptada de (Jiménez, 2013)

4. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad y como una medida de adaptación ante el cambio climático, existe gran interés por parte de la comunidad científica y de las instituciones responsables de la regulación de la calidad del agua en la utilización de fuentes no convencionales, de manera que una vez obtenida una calidad aceptable, de acuerdo a la normatividad local, sea posible distribuirla a la red de agua potable.

Análogo a esto, existe un creciente interés por la comunidad científica por conocer el efecto en cuestión de ecotoxicidad de los denominados contaminantes emergentes (CE's), los cuales no habían sido, hasta hace poco tiempo, objeto de investigaciones profundas, debido al desconocimiento de su presencia en el ambiente, dada su baja concentración en las diversas matrices ambientales (agua,

aire, suelo y vegetal (Gil, 2012). Estas sustancias, al formar parte de productos de uso común como fármacos, artículos de cuidado personal y aditivos para alimentos, no se contemplan en las normas ambientales y de salud existentes, por lo que surge la necesidad de monitorearlas (Modificado de Barceló & López, 2008).

Algunos de estos compuestos son llamados disruptores endócrinos por su capacidad de incorporarse en blancos proteínicos y alterar funciones hormonales en diversas especies. Además, poco se sabe acerca de los efectos que pueden causar en los seres humanos tanto los compuestos disruptores endócrinos, así como el consumir dosis subterapéuticas de mezclas complejas de fármacos a través de la ingesta de agua contaminada con los mismos (Pomati *et al.*, 2006).

Muchos organismos acuáticos con vías metabólicas, receptores o biomoléculas similares a las que poseen los humanos son expuestos a los CE's liberados en el medio ambiente, por lo tanto la evaluación integral de los efectos tóxicos deberá incluir el desarrollo de pruebas específicas que abarquen a los efectos agudos (registro de la tasa de mortalidad) y a los efectos crónicos (exposición a diferentes concentraciones de un compuesto químico durante un periodo de tiempo prolongado) a través de la medición de parámetros específicos, tales como el índice de crecimiento o la tasa de reproducción. La problemática radica en que los estudios de los efectos agudos en los organismos pertenecientes a diferentes niveles tróficos (algas, plancton otros invertebrados y peces) predominan sobre los estudios de efectos crónicos, pruebas de bioacumulación, toxicidad crónica y disrupción endocrina son escasos debido probablemente al complejo trabajo experimental que implica (Santos, 2010).

La Ciudad de México, con cerca de 18 millones de habitantes, se encuentra en una cuenca cerrada. Para evitar las inundaciones y para drenar el sistema de alcantarillado combinado se han construido tres salidas artificiales (el Emisor Central, el Túnel Emisor Oriente y el Gran Canal de drenaje) para enviar el agua residual hacia el Valle de Tula desde 1890 (Jiménez y Chávez, 2003). En la

actualidad, de acuerdo con las Estadísticas del Agua en México (CONAGUA, 2015) se envían desde 40 hasta 75 m³/s de agua residual sin tratamiento dependiendo la época del año, ya que se produce un incremento durante la temporada de lluvias pero sólo por unas pocas horas al día, y de estos gracias a la construcción de la planta de tratamiento de aguas residuales de Atotonilco se tratarán entre 23 (en época de secas) y 35 m³/s (en lluvias).

La principal actividad en el Valle de Tula es la agricultura, la cual es practicada en tres distritos de irrigación Tula (DR003), Alfajayucan (DR100) y Ajacuba (DR112) que juntos representan cerca de 85,000 ha (SEMARNAT, 2010) con un total de 60, 062 usuarios en 2013 (Jiménez, 2013) que se alimentan del agua residual proveniente de la ciudad de México y como resultado se ha dado la recarga artificial del acuífero, como consecuencia el nivel freático ha subido y varios manantiales se han manifestado con flujos entre 100 a 600 L/s (Jiménez y Chávez, 2003) el más importante de estos, es el de Cerro Colorado, que con un gasto de 600 L/s abastece de agua a los municipios de Tezontepec, Tetepango, Mixquiahuala, Progreso y Francisco Madero; es decir, proporciona agua a 137, 983 personas (INEGI para el año 2010), extraído de (SEDESOL, 2015), además no existe un tratamiento adicional más que la infiltración del suelo y en un futuro, el agua que se infiltra al acuífero tendrá un tratamiento secundario en la planta denominada Atotonilco, efecto que tendrá que ser evaluado. Sin embargo, gracias a algunos estudios de calidad de agua en el acuífero (Jiménez, 2013) se ha demostrado la presencia de CE's en el manantial a concentraciones de ng/L tales como bisfenol A (1.54 ng/L) y EE2 (0.06 ng/L), lo que hace suponer que los tratamientos biológicos y químicos de esta futura PTAR podrían no remover del todo los contaminantes existentes, principalmente fármacos. Estas sustancias, aparentemente inocuas, tienen una continua introducción al medio ambiente debido a descargas de aguas residuales no tratadas y almacenada, fármacos excretados sin metabolizar, jabones y desinfectantes de uso industrial y de uso cotidiano en el hogar y la carencia de controles medioambientales que los legislen, lo que hace necesario el uso de una serie de metodologías que permitan

obtener datos respecto a su distribución medioambiental, así como alertar de su riesgo potencial, de uso cotidiano en los hogares. Aun cuando en la mayoría de los casos, la toxicidad aguda de estos compuestos es baja, pueden ser precursores de otras especies, considerados contaminantes prioritarios que si tienen efectos perjudiciales probados en la salud. Además, se tienen algunos estudios que demuestran que su presencia en el medio ambiente ha provocado el desarrollo de cepas bacterianas resistentes a agentes bactericidas, malformaciones de los órganos sexuales en animales, cambio de sexo en los peces y descenso de fertilidad en humanos (Tierney *et al.*, 2013). Incluso algunos autores han puesto de manifiesto la posible relación entre ciertos tipos de cáncer y el uso de estos compuestos en productos de cuidado personal (Olea, 2001). En particular el triclosán es descargado continuamente al medio ambiente y su introducción puede producir efectos adversos sobre la flora y fauna acuática. Las algas, organismos unicelulares y peces han sido los principales organismos en los que se ha estudiado su toxicidad, pero no hay suficientes investigaciones que demuestren daños al sistema endocrino por este antibacterial en organismos, lo que demuestra la importancia de generar este conocimiento específico sobre sus efectos en seres vivos.

Por último, se desconoce cómo influye la ruta de la que se abastece el acuífero en el ciclo de los CE's, es decir si existen procesos a lo largo de su trayectoria desde su salida de la Cd. De México hasta su paso por el acuífero del Valle de Tula y cuál es el área de contaminación inducida por la disposición final del agua residual, aunque este haya sido tratado previamente y el riesgo social que esto atribuye. Para ello, el uso de los Sistemas de Información Geográfica podrían responder estas preguntas, ya que han sido ampliamente difundidos para la gestión de temas ambientales, permitiendo facilitar el monitoreo a través de datos plasmados en SIG, creando una o varias bases de datos, es decir utilizar información SIG no sólo para mapear y realizar consultas, sino para analizar tendencias y tomar decisiones mediante las aplicaciones que brindan los análisis espaciales y que estos resulten en el seguimiento a posibles soluciones del caso en estudio.

Si bien se ha determinado mediante diversos estudios la presencia de estos contaminantes en la zona y se tiene el conocimiento de los posibles efectos de los que pueden ser responsables, surge la necesidad de obtener a través de otras herramientas (SIG) la simulación, la descripción y el análisis de las concentraciones de estos datos para conocer los comportamientos en el espacio y sus representaciones.

5. OBJETIVOS

Objetivo General

- Evaluar la presencia de triclosán como disruptor endocrino, su efecto ecotoxicológico en el agua del manantial de Cerro Colorado y la distribución espacial de su concentración en el área de estudio.

Objetivos Particulares

- Determinar la UT_a y CE_{50} del triclosán para el método Microtox® y comparar con los datos reportados en su hoja de seguridad.
- Cuantificar mediante pruebas de ELISA la vitelogenina presente en *Danio rerio* como disruptor endocrino.
- Generar un mapa de presencia y concentración del contaminante estudiado en el área de estudio por el método de interpolación IDW para conocer su comportamiento en épocas de lluvia y estiaje.

6. HIPOTESIS

Se presentará un daño en el metabolismo de las bacterias de la especie *Vibrio fischeri*, específicamente en la producción de la enzima luciferasa, lo que permite que la luminiscencia disminuya traduciéndose como una fuente de daño ecotoxicológico presentando efectos muy tóxicos en *Vibrio fischeri*, la toxicidad

aumentará conforme al tiempo de exposición debido a las propiedades bactericidas de este agente químico.

Al revelarse el efecto que tienen los contaminantes emergentes y el triclosán de forma particular en el estudio de toxicidad, se buscará su posible faceta como disruptor endocrino utilizando la producción de la proteína vitelogenina (VTG) como biomarcador, en el cual se observará un aumento en la producción de VTG en peces de la especie *Danio rerio* (pez cebra) que estén bajo el tratamiento de agua de manantial cruda (AMC) de Cerro Colorado y triclosán además del 17β estradiol (control positivo). Dicho aumento será perceptible en las hembras al ya producir esta proteína para originar el vitelo contenido en sus óvulos y que es crucial en el desarrollo embrionario de la especie, pero se incrementará de manera anormal en machos en los que es probable que alterare su proceso reproductivo.

El triclosán (TCS) se utiliza en una variedad de productos y puede llegar a los medios acuáticos y edáficos después de las descargas por el drenaje de la Cd. de México, al tener un modelo aproximado de las concentraciones de TCS desarrollada mediante los SIG que este mediada por la hidrografía de la zona de trabajo se sabrá que el uso a largo plazo de triclosán en los hogares revela la persistencia de este agente químico en las aguas subterráneas y superficiales traduciéndose como la contaminación de los pozos y manantiales en el Valle de Tula mostrando concentraciones muy altas a mayor cercanía de la Cd. de México.

7. METODOLOGÍA

7.1 Localidad

El manantial de Cerro Colorado se ubica en el municipio de Tlahuelilpan en el estado de Hidalgo (Latitud Norte 20° 07'13", Longitud Oeste 99°15'43") en el distrito de riego del Valle del Mezquital. Este manantial con un gasto de 600L/s abastece a cerca de 137, 983 personas (INEGI, 2010). Al igual que los otros manantiales que han surgido en la zona, procede de la infiltración del agua residual, sin previo tratamiento, empleada para riego (Jiménez, 2013).

7.1.1 Muestreo de agua para pruebas de toxicidad.

Se recolectaron muestras simples del agua del manantial Cerro Colorado rotulándolas como matriz ACM, y se almacenaron en recipientes nuevos y limpios de vidrio ámbar, de boca angosta con una capacidad de 4 L y garrafones de 20 L los cuales se llenaron al tope y cerraron perfectamente sin dejar burbujas de aire en el interior, las muestras se mantuvieron a una temperatura adecuada dentro de una hielera con geles refrigerantes para su traslado hasta el laboratorio, no fue necesario agregar ningún conservador.

Los análisis de toxicidad se realizaron dentro de los cinco días de haber recolectado las muestras para evitar variaciones en los resultados.



Figura 3. Muestreo en Cerro Colorado

7.2 Diseño de experimentos

7.2.1 Microtox

Es un bioensayo que examina la toxicidad aguda de muestras medioambientales y compuestos puros basándose en la reducción de la bioluminiscencia natural de la bacteria marina *Vibrio fischeri* en presencia de agentes contaminantes. La toxicidad se expresa como la concentración de un agente que produce la reducción del 50% de la luminiscencia inicial (EC_{50}). Básicamente el ensayo consistió en preparar 2 hileras, en la primera se dejó un blanco sólo con diluyente y se prepararon diluciones de la concentración inicial en forma decreciente en cada

celda. En la segunda hilera se colocaron las celdas de reacción donde se agrega el diluyente y la suspensión bacteriana de *V. fischeri*, en este momento se hizo la lectura inicial de “cero minutos”, posteriormente se trasladaron las concentraciones de las celdas de la primera hilera a la segunda en el mismo orden establecido, se cronometraron en tiempos de reacción de 5, 15 y 30 min y se determinó el porcentaje en el que disminuyó la luminiscencia. Las determinaciones de toxicidad aguda se realizaron con el equipo “Microtox 500 analyzer” a lo cual es importante hacer mención que se revisó que la última calibración estuviera vigente y que todos los reactivos tuvieran la documentación que valide su óptima funcionalidad. Para cada determinación se usaron celdas de lectura nuevas y se desecharon al terminar el ensayo.

- Una vez revisado su funcionamiento, se realizó la determinación ecotoxicológica de las 2 matrices mediante el test básico al 90 % el cual constó de una concentración inicial del 90% (al ser considerado un volumen extra por el ajuste osmótico) y cuatro diluciones del 45%, 22.5%, del 11.25%, 5% y el blanco en los pozos A5 al A1 respectivamente (Ver ANEXO 1).
- Agua cruda de Manantial (ACM).
- Triclosán en agua sintética (agua milli Q).

7.2.2 *Vibrio Fischeri*

Vibrio fischeri (antes *Photobacterium phosphoreum*). Es una bacteria marina, bioluminiscente, no patógena de forma bacilar, Gram-negativa, anaerobia facultativa, halofílica, posee un flagelo en uno de sus extremos. La bacteria liofilizada (NRRL B-11177) debió mantenerse almacenada a una temperatura de -18°C a -20°C.

7.3 OECD/OCDE 230 Actividad estrogénica

El trabajo fue realizado en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental del Instituto de Ingeniería con el apoyo de otros dos laboratorios del Instituto de Investigaciones Biomédicas, ambos ubicados en C.U. UNAM. Se realizaron 9 diferentes tratamientos (Ver Tabla 3) cada tratamiento se constituyó de 6 unidades de pez

cebra de un peso de 0.6 g para hembras y 0.4 g para machos ($\pm 20\%$), los cuales fueron colocados en una pecera durante 9 días previos como periodo de aclimatación, donde no hubo separación de género alguno y para evitar interferencias en los tratamientos, el agua sintética fue preparada como agua semidura reconstituida (Ver ANEXO 1 Tabla 8).

	Tratamiento	Abreviatura	Pecera
1	Agua sintética (triclosán) C1 (15 ng/L)	C1	PT1
2	Agua sintética (triclosán) C2 (150 ng/L)	C2	PT2
3	Agua sintética (triclosán) C3 (1500 ng/L)	C3	PT3
4	Agua de manantial cruda	AMC	PT4
5	Agua de manantial fortificada (triclosán C1)	AMC+C1	PT5
6	Agua de manantial fortificada (triclosán C2)	AMC+C2	PT6
7	Agua de manantial fortificada (triclosán C3)	AMC+C3	PT7
8	Control Positivo	CP	PT8
9	Control Negativo	CN	PT9

Tabla 3. Tratamientos

Las diferentes concentraciones de triclosán en cada uno de los tratamientos así como de los controles negativo y positivo fueron determinados mediante la técnica **SPE-LC-MS/MS** (Gibson *et al.*, 2007). Todo esto para asegurar que a pesar de la administración de oxígeno, los tratamientos se encontrarán en condiciones similares.

La alimentación de los peces fue a base de comida comercial Tetramin en relación al 2% del peso de las unidades de prueba dispersos 2 veces al día alternando cada tercer día con crustáceos braquiópodos de la especie

comercialmente más usada *Artemia franciscana*, en fines de semana fue aceptable dejar una mayor cantidad de alimento para los dos días. La comida no consumida y el material fecal se retiró de los recipientes de ensayo por lo menos dos veces a la semana.

Al noveno día del periodo de aclimatación se separaron los peces en machos y hembras y se colocaron uno de cada género en las peceras con su debido tratamiento (3 machos y 3 hembras por tratamiento) como se muestra en la Figura 11 (Ver ANEXO 1). Durante los 21 días se realizó el monitoreo de la temperatura, oxígeno disuelto, pH, conductividad. Cada pecera tuvo un recambio de agua cada 2 días, pero sustituyendo solamente 3 L de los 5 L iniciales.

Cada pecera estuvo dotada con una entrada de oxígeno capaz de mantener un OD arriba de 6 mg/L como mínimo para lo cual se utilizó una pipeta Pasteur de vidrio para evitar el contacto de plástico dentro de las peceras con tratamiento, la malla de tela se colocó en la boca de la pecera y se cubrió con plástico para evitar la entrada de contaminantes externos. Se utilizó un timer programado con 12 hrs luz/ 12 hrs oscuridad, a partir de las 08:00 y las 20:00 horas. La limpieza se programó cada tercer día, con ayuda de una pipeta de 10 mL de vidrio, un matraz Kitasato y el sistema de vacío, procurando recuperar el volumen perdido con agua del mismo tratamiento (aproximadamente 100 mL).

En el día 21, al término de la exposición, se identificó el género de la unidad de prueba y el pez fue sacrificado, utilizando 3 gotas de esencia de clavo para disminuir el ritmo cardíaco del organismo y como anestésico, procediendo a sacrificar por el método de decapitación con la mayor rapidez posible para evitar crueldad innecesaria. A continuación se muestreo el tejido para la determinación de la vitelogenina, por lo que las unidades fueron transportadas al Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Posteriormente a la decapitación del pez, se procedió a disectar el hígado y contenido visceral, en un tubo eppendorf se colocó el hígado, determinó el peso de las muestras y se siguió el siguiente criterio para adicionar el PBS (buffer salino de fosfatos), se agregaron 50 µL de buffer por cada mg de muestra de hígado (fue necesario limpiar con

metanol todo el equipo de disección entre cada pez y cada tratamiento). En el laboratorio de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas se realizó la lisis del tejido con ayuda choques térmicos con nitrógeno líquido (congelamiento) y baño maría a 37 °C durante 30 segundos dos veces, para posteriormente disgregar el tejido con ayuda de un sonicador de punta a cada una de las muestras hasta obtener una suspensión homogénea, la cual fue centrifugada a razón de 14000 RPM durante 10 minutos y se extrajo el sobrenadante del pool de hígado.



Figura 4. Montaje experimental



Figura 5. Disección y muestreo de tejido

7.3.1 Técnica de ELISA

La determinación de niveles de vitelogenina se realizó mediante la técnica de inmunoensayo de unión enzimática ELISA (por sus siglas en inglés), utilizando kits específicos para vitelogenina de Pez cebra de Biosense Laboratories (Bergen, Norway; www.biosense.com). Las muestras de los tratamientos (3 pool por tratamiento) y controles se sembraron en 3 diluciones (1:500, 1:300,000 y 1:1,800,000). La lectura de la placa de ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay* por sus siglas en inglés) fue realizada en un espectrofotómetro (Biorad 680 Microplate Reader) a 492 nm en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química. Las concentraciones de vitelogenina se calcularon a partir de la ecuación obtenida de la curva de calibración y expresadas en ng/mL. (Biosense Laboratorios, 2005). Se comprobó la normalidad de los datos (curtosis <2). Para identificar la posible actividad endocrina de una sustancia química, las respuestas se compararon entre tratamientos y grupos de control utilizando análisis de varianza (ANOVA) prueba de Fisher LSD y prueba de Rangos Múltiples para determinar las diferencias significativas entre los tratamientos, también la homogeneidad de varianza mediante el test de Levene. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa STATGRAPHICS.

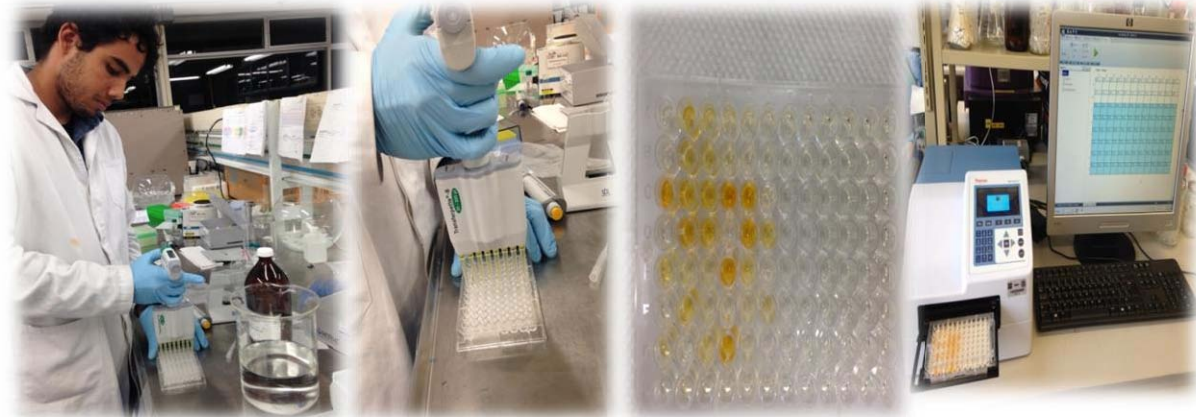


Figura 6. Pruebas ELISA y lectura de placas

7.3.2 Balance de masa

Se extrajeron 3 L por cada recambio de agua para cada uno de los tratamientos de Agua sintética y ACM + Agua sintética para un total de 4 recambios al cabo de 21 días con el fin de obtener la concentración de TCS bioacumulado en los organismos y verificar que las concentraciones aplicadas fueron las correctas a lo largo de la experimentación. Se utilizó la extracción en fase sólida como técnica de cuantificación y detección del compuesto de interés a partir de los recambios de agua los cuales se filtraron con membranas de fibra de vidrio 0.45μ de diámetro antes de la extracción en fase sólida en cartuchos de la marca Cayman para su posterior elución y derivatización necesario para el análisis cromatográfico SPE-LC-MS/MS (ver Anexo 2. Procedimiento 1) en un cromatógrafo marca Agilent Technologies 6890N/Mass Selective Detector 5973. La respuesta del cromatógrafo para cada recambio fue analizada usando la ecuación para cada intervalo de respuesta con la que se determinó la concentración de TCS). Con el fin de determinar si el triclosán presente en los distintos tratamientos se había bioacumulado en los organismos se realizó el balance de masa por cada tratamiento bajo el supuesto de que la concentración de entrada debe ser mayor a la de salida siendo esta diferencia la bioacumulación teórica del contaminante en los tejidos de los organismos. Para esto se multiplicó la concentración inicial (15, 150, 1500 ng/L) por el volumen inicial de las peceras (5L) y la concentración

inicial por el volumen adicionado después de cada recambio (3L) la suma de estos datos correspondió a la concentración TCS de entrada. La concentración de salida fue determinada con los valores de TCS que arrojó el análisis cromatográfico, estos datos fueron multiplicados por el volumen analizado de los recambios (3L) y el volumen final (5L). La diferencia entre la concentración de entrada y salida corresponde a la bioacumulación teórica de TCS.

7.4 Análisis espacial del triclosán en SIG

Se utilizó el análisis IDW de interpolación que permite predecir y visualizar la distribución espacial de los datos en la región mediante el uso del software Arc GIS versión 10.3 (ver ANEXO 1. Figura 13.)

Haciendo un análisis espacial usando bases de datos de concentraciones de triclosán en agua residual, del acuífero superficial, pozos y manantiales del Valle de Tula, Hgo determinados por el Instituto de Ingeniería de la UNAM en épocas de lluvia y estiaje de los años 2007 y 2008, y utilizando modelos matemáticos compatibles se analizó el contaminante (triclosán) permitiendo obtener mapas de la concentración de este en el área total de los muestreos. El DATUM utilizado fue WGS84 UTM Zona 14 N como referencia espacial.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Ecotoxicidad por Microtox

Los ensayos de ecotoxicidad por Microtox se realizaron utilizando dos tipos de análisis: el test básico que emplea diluciones de la muestra al 5, 11, 22 y 45% de la concentración inicial; y, el test de inhibición que analiza la muestra a un 90% de la concentración inicial, reportándose el efecto del triclosán, expresada en mg/L, sobre la bioluminiscencia de la bacteria *Vibrio fischeri*.

La determinación de la CE_{50} del triclosán reportó un dato de 0.33, 0.34 y 0.38 mg/L a los 5 minutos, 15 minutos y 30 minutos respectivamente y en unidades de toxicidad se reporta como muy tóxicas a los tres tiempos (Tabla 4). Los análisis de

Microtox® son análisis de ecotoxicidad aguda, que demuestran el efecto que el contaminante tiene en el momento del análisis sobre una bacteria.

Tabla 4. Resultados de toxicidad en *Vibrio fisheri* y triclosán 3.395 mg/L

Matriz	Concentración (mg/L)	% de Efecto		
		Tiempo (min)		
		5	15	30
triclosán 3.395 mg/L	1.53	97.36	98.68	98.68
	0.76	78.82	80.33	77.3
	0.38	56.84	52.67	45.71
	0.19	30.39	27.49	18.79
EC₅₀ (mg/L)		0.3255	0.3403	0.3832
UT_a		10.42	9.972	8.856

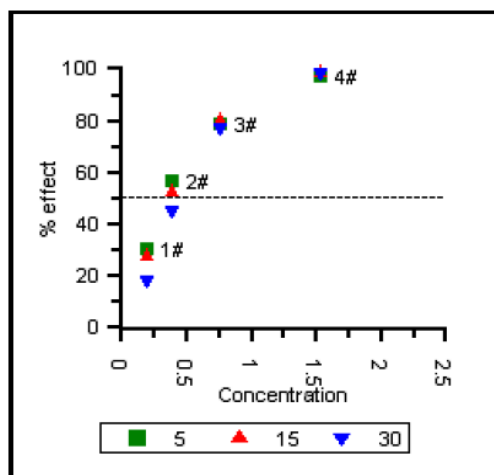
$$UT_a = 100 / CE_{50} = 8.856 \text{ ut}$$

$$EC_{50} = 0.3832 \text{ mg/L}$$

Al hacer la comparación con el valor indicado en la hoja de seguridad del triclosán fue similar que es de 4.3 mg/L y tóxico para organismos acuáticos. Además, Tatarazako et al (2003) reporta ensayos de Microtox en bacterias, crustáceos y peces donde estos tenían sensibilidades similares hacia la toxicidad del triclosán , IC₂₅= 0,07-0,29 mg / L TCS). Por lo tanto, TCS es altamente tóxico para los animales acuáticos, y muy tóxico para *V. fisheri* según la propuesta de Zagatto y Bertolletti (2006) donde clasifican el nivel de toxicidad de un vertimiento o cuerpo de agua basada en Unidades de Toxicidad (UT).

Nivel de Incidencia	Unidades Tóxicas
No Tóxico	1
Levemente Tóxico	> 1 – 1.3
Moderadamente Tóxico	> 1.3 – 2
Tóxico	> 2 – 4
Muy Tóxico	> 4

Tabla 5. Unidades de Toxicidad



Gráfica 1. CE₅₀ de las concentraciones matriz de triclosán en agua sintética

En cuanto a la segunda matriz los resultados son evidentes, no existe concentración efectiva 50 en ninguna matriz de AMC, por lo que de acuerdo con los resultados obtenidos, las concentraciones de los contaminantes emergentes presentes en el manantial (Tabla 1) no muestran daño ecotoxicológico para el metabolismo de las bacterias *Vibrio fischeri*, específicamente en el complejo luciferina/luciferasa, lo que permite que la bioluminiscencia no disminuya en presencia de las muestras de manantial (Tabla 6), para determinar la eficacia de la prueba en cada corrida de los muestreos que se realizaron se hicieron las cartas control de los tóxicos estándar (fenol y ZnSO₄) dando una respuesta correcta para cada uno. Las concentraciones en las que se encuentra este contaminante en el ambiente acuático indican que el agua de manantial de Cerro Colorado no generó riesgo toxico agudo en el estudio de ecotoxicidad. Sin embargo, se menciona que no se excluye el efecto potencial de ecotoxicidad crónica en el ambiente de este PCP's ensayado (Iannacone & Alvaríño, 2009).

Tabla 6. Resultados de toxicidad en *Vibrio fisheri* ACM

Matriz	Concentración (%)	MAYO 2015		JULIO 2015		OCTUBRE 2015	
		EC ₅₀	UT _a	EC ₅₀	UT _a	EC ₅₀	UT _a
Agua de Manantial cruda	90	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	45						
	22.5						
	11.25						

ND = NO DETECTADA

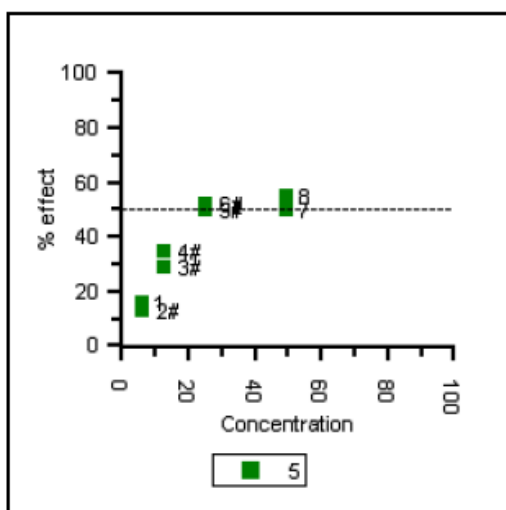


Gráfico 3. Curva estándar de Fenol

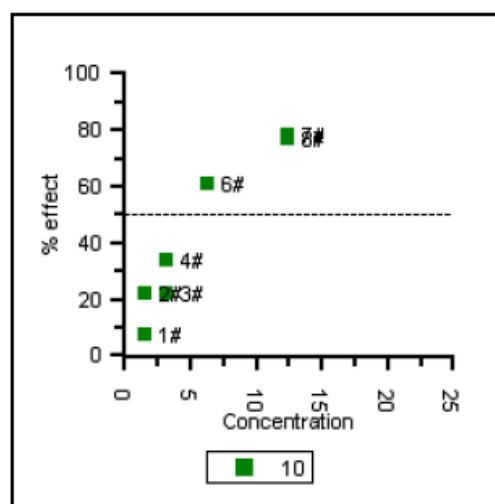


Gráfico 2. Curva estándar de ZnSO₄

8.2 Balance de masa

En la Tabla 7 se muestra la bioacumulación teórica de TCS por cada tratamiento al cabo de 21 días y cuatro recambios de agua. Se realizó el análisis cromatográfico después de la derivatización con bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) y piridina. La extracción de muestras de agua se realizó por extracción en fase sólida (SPE) siguiendo la metodología establecida por Gibson *et al.*, (2007). Con el fin de determinar si el triclosán presente en los distintos

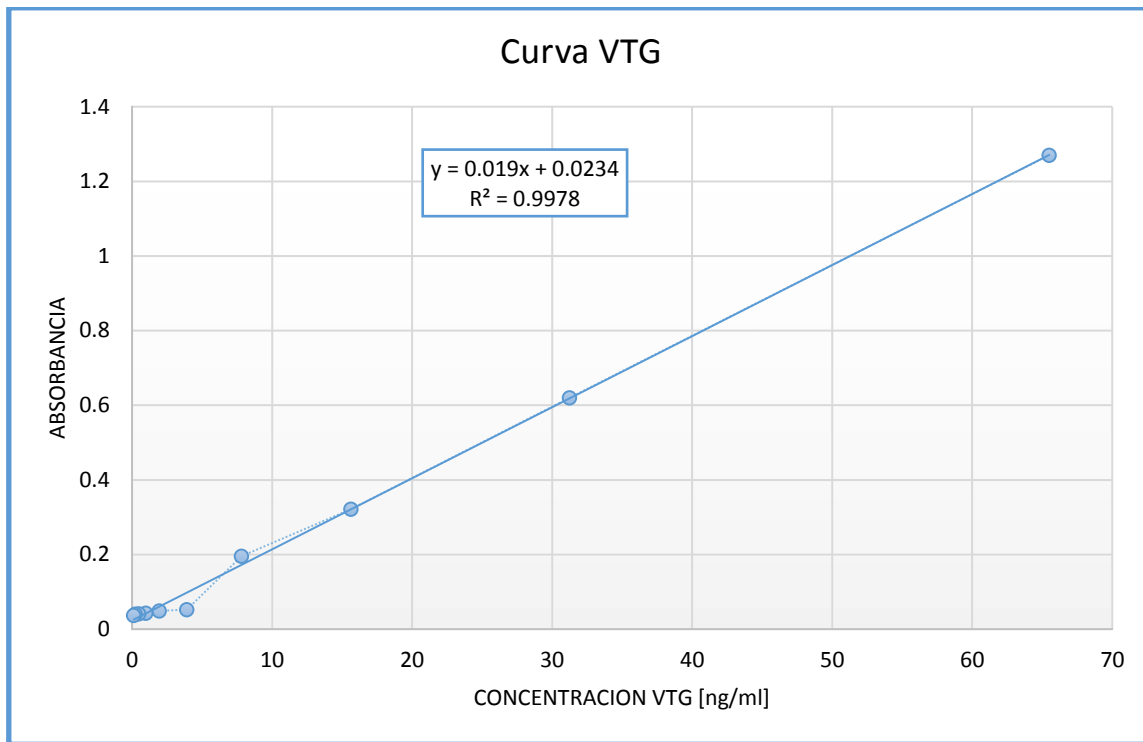
tratamientos se había bioacumulado en los organismos. El TCS es lipófilo así que puede acumularse en los tejidos de los organismos aumentando su concentración con el paso del tiempo atribuyéndolas respuestas generadas en el ensayo ecotoxicológico a la biocumulación de las concentraciones utilizadas de TCS (15; 150; 1500 ng/L) en los tratamientos donde se dispusieron los organismos modelo (*Danio rerio*).

Tabla 7. Balance de masa y bioacumulación por tratamiento

CLAVE	Ecuación (9,000-18,000)	Ecuación (18,000-70,000)	Ecuación (60000-160000)	Entrada			Salida			Bioacumulación
				15 ng/ml	150 ng/ml	1500 ng/ml	15 ng/ml	150 ng/ml	1500 ng/ml	
	Y= 0.0014 x - 12.193	Y= 0.0022 x - 30.816	Y= 0.011x - 586.27							ng/ml
PT1R1	10,944			75			32,831			0,304
PT1R2				45			0			
PT1R3	14,430			45			43,291			
PT1R4	26,715			45			133,574			
				210			209,696			
PT2R1					750			0		1,663
PT2R2		73,272			450			219,817		
PT2R3					450			0		
PT2R4		43,421			450			217,107		
					2100			436,924		
PT3R1		32,083				7500			96,250	20,723
PT3R2		45,275				4500			135,826	
PT3R3		15,174				4500			45,521	
PT3R4						4500				
						21000			277,597	
PT5R1	5,763			75			17,289			ND
PT5R2		31,429		45			94,286			
PT5R3		20,718		45			62,153			
PT5R4			53,680	45			268,402			
				210			442,131			
PT6R1		60,849			750			182,548		1,453
PT6R2		40,745			450			122,235		
PT6R3		26,591			450			79,774		
PT6R4			52,548		450			262,739		
					2100			647,295		
PT7R1						7500				20,586
PT7R2						4500				
PT7R3		48,669				4500			146,008	
PT7R4			53,589			4500			267,944	
						21,000			413,952	
PT11R1	7,084					7500			21,253	20,854
PT11R2		13,715				4500			41,145	
PT11R3						4500				
PT11R4	16,742					4500			83,708	
						21000			146,106	

8.3 Niveles de vitelogenina en *Danio rerio*

En la Figura 4 se presenta la curva estándar de vitelogenina (VTG) realizada para esta experimentación, a partir de la cual se obtuvo la ecuación para el cálculo de las concentraciones de dicha proteína para cada tratamiento empleado. La curva muestra un coeficiente R² de 0.9978 que indica una alta calidad del modelo para replicar los resultados.



Grafica 4. Curva estándar de VTG

En la totalidad de los tratamientos de peces machos se observan diferencias significativas en la concentración de vitelogenina con respecto a los controles negativo y positivo tomando como referencia los valores de la media Control

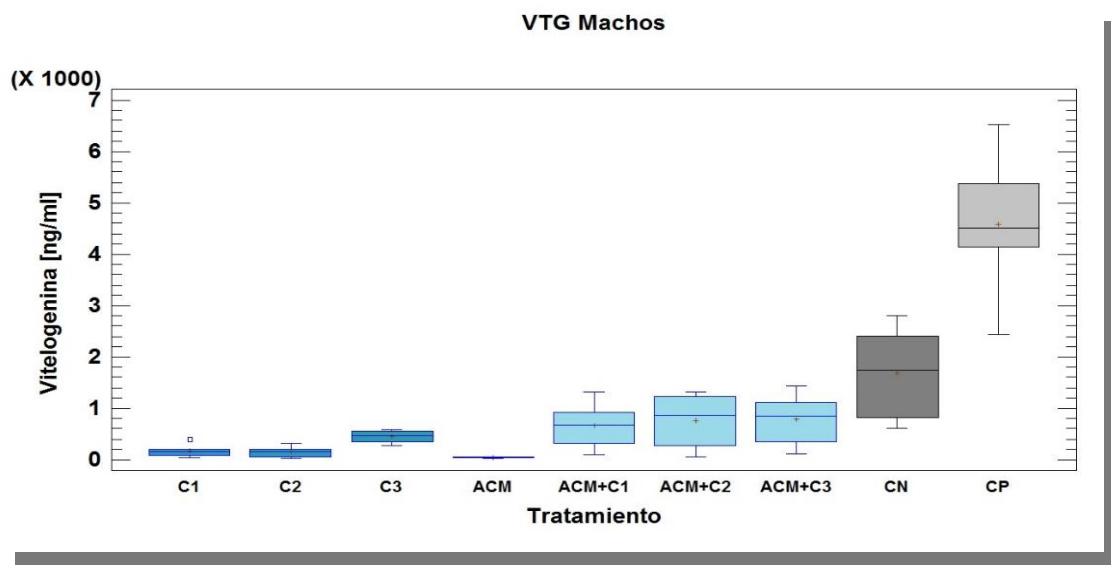


Fig. 7. Niveles de VTG en machos *Danio rerio*. C1 (15ng/L TCS); C2 (150ng/L TCS) C3 (1500ng/L TCS); ACM (Agua Cruda de Manantial); ACM+C1 (Agua Cruda de manantial + 15 ng/L TCS); ACM+C2 (Agua Cruda de manantial + 150 ng/L TCS); ACM+C3 (Agua Cruda de manantial + 1500 ng/L TCS); CN (Control Negativo); CP (Control Positivo).

Negativo (CN) = 1687.5 ng/ml y media Control Positivo (CP)= 4580.36 ng/ml mostrando una clara tendencia al decremento del valor medio de los tratamientos significando que la producción de VTG es mínima. La comparación entre los tratamientos ACM y ACM+C3 también muestra diferencias significativas (valor $p = 0.0002$) al realizar prueba de Fisher LSD y prueba de Rangos Múltiples. (Fig.7)

Por su parte los tratamientos de peces hembras también muestran un claro decrecimiento y diferencias significativas de los valores medios con respecto a los controles positivo y negativo (CP=110307 ng/ml y CN=55872 ng/ml) mostrando que la producción de VTG en hembras ha sido afectada por los tratamientos disminuyendo los niveles de VTG (Fig. 8).

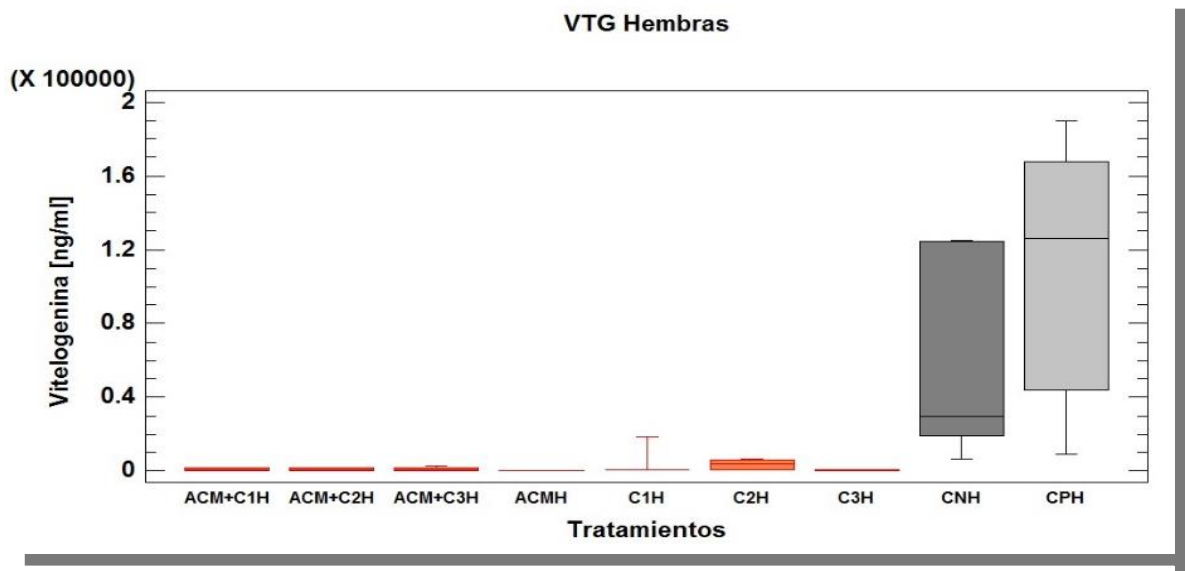


Fig. 8. Niveles de VTG en hembras *Danio rerio*. C1H (15ng/L TCS); C2H (150ng/L TCS) C3H (1500ng/L TCS); ACMH (Agua Cruda de Manantial); ACM+C1H (Agua Cruda de manantial + 15 ng/L TCS); ACM+C2H (Agua Cruda de manantial + 150 ng/L TCS); ACM+C3H (Agua Cruda de manantial + 1500 ng/LTCS); CNH (Control Negativo); CPH (Control Positivo).

Al comparar los niveles de VTG de machos y hembras entre ellos se observa claramente que se encuentran por debajo del valor medio de CN y CP excepto por C2H con niveles equiparables en el valor promedio a CP (4831.58 ng/ml y 4580.36 ng/ml) mientras que los elevados valores de CNH y CPH interferían con su

representación gráfica al compararlas en conjunto con los otros tratamientos al mostrar diferencias en el rango y distribución de sus valores muy por encima de los otros tratamientos. (Fig. 9).

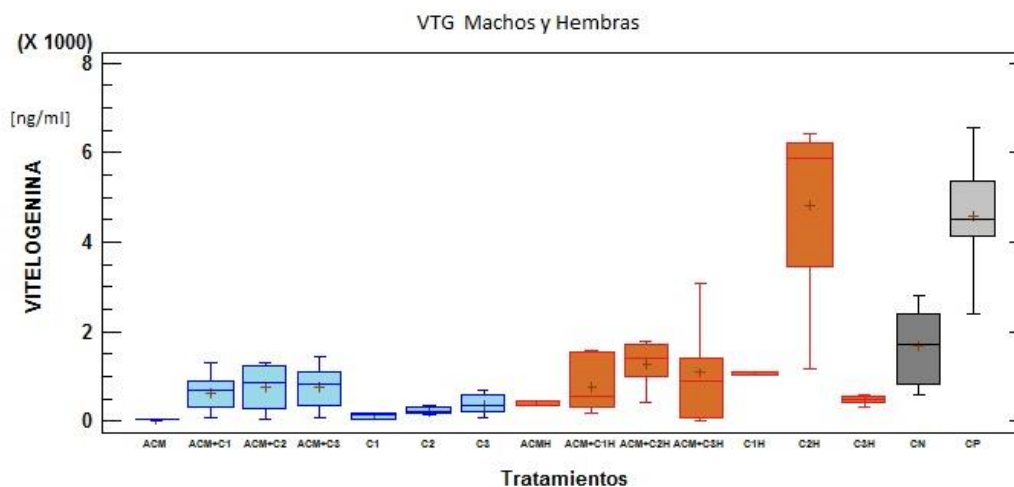


Fig. 9. Niveles de VTG en machos y hembras *Danio rerio*. C1 (15ng/L TCS); C2 (150ng/L TCS) C3 (1500ng/L TCS); ACM (Agua Cruda de Manantial); ACM+C1 (Agua Cruda de manantial + 15 ng/L TCS); ACM+C2 (Agua Cruda de manantial + 150 ng/L TCS); ACM+C3 (Agua Cruda de manantial + 1500 ng/L TCS); CN (Control Negativo); CP (Control Positivo). C1H (15ng/L TCS); C2H (150ng/L TCS) C3H (1500ng/L TCS); ACMH (Agua Cruda de Manantial); ACM+C1H(Agua Cruda de manantial + 15 ng/L TCS); ACM+C2H (Agua Cruda de manantial + 150 ng/L TCS); ACM+C3H (Agua Cruda de manantial + 1500 ng/L TCS); CNH (Control Negativo); CPH (Control Positivo).

La comparación entre los grupos control de ambos sexos también mostró una amplia dispersión en los datos y diferencias significativas en las pruebas estadísticas realizadas (Fig. 10).

Durante todo el período del ensayo se produjeron muertes de individuos menores al 10% en los tratamientos evaluados, lo cual valida el ensayo en referencia al

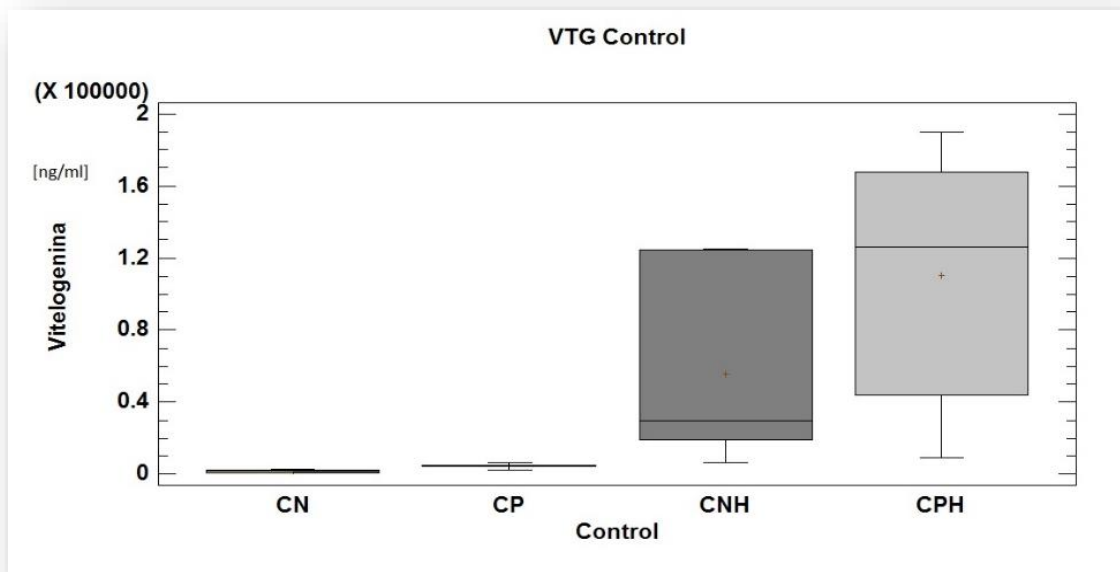


Fig. 10. Comparación de los niveles de VTG en grupos control de ambos sexos

registro de mortalidad (Matsumura et al., 2005).

Los resultados obtenidos en los niveles de vitelogenina en los grupos control para machos mostraron valores promedio de 1687.5 ng/ml para el C. Negativo y 4580.36 ng/ml para el C. Positivo de E2. Los valores encontrados coinciden o son similares con los reportados por Nielsen *et al*, (2004) en un ensayo de validación para cuantificar VTG mediante test ELISA's, donde reportan que la concentración de VTG determinada en una muestra preparada a partir de machos no expuestos fue de 1,400 ng/ml. También reportó valores dentro de un intervalo de 2000 ng/ml a varios mg/ml en una serie de muestras de pez cebra obtenidas mediante la exposición a agua con triclosán en un periodo de 2-9 días, confirmando validez a los resultados a este ensayo.

8.3.1 Disrupción endocrina en machos *Danio rerio*

Los resultados indican un marcado efecto de los tratamientos, observándose un decremento de las concentraciones a lo largo del gradiente longitudinal con respecto a los grupos control, mostrando diferencias significativas ($p < 0.05$) con el

resto de los tratamientos. En el análisis entre tratamientos de peces cebra machos sólo se observaron diferencias significativas entre los tratamientos de ACM (Agua Cruda de Manantial) (44.27 ng/mL) y ACM+C3 (780.914 ng/mL). ACM arrojó los niveles de concentración de VTG más bajos de toda la experimentación mientras que ACM+C3 los más altos, sin embargo todos se encuentran por debajo de la concentración del CN y CP por lo que la producción de VTG fue mínima. A la luz de estos resultados y con base en las condiciones del experimento realizado, surgen cuestionamientos legítimos entorno a el potencial del triclosán como Disruptor Endocrino estrogénico, ya que la exposición de peces machos a sustancias estrogénicas exógenas está fundamentada por la síntesis de VTG. Así, los niveles elevados de VTG circulante en peces machos lo han convertido en el biomarcador biológico predeterminado para contaminantes ambientales acuáticos con actividad estrogénica (Hansen *et al.*, 1998). Es decir que el triclosán pudiera no comportarse como una sustancia estrogénica en las concentraciones estudiadas y que no compromete el eje hormonal hipotálamo-hipófisis-gónadas (HPG). Sin embargo, los valores de VTG son tan mínimos que existen diferencias significativas con el valor promedio del CN por lo que también podría indicar que los tratamientos generaron cambios significativos a nivel bioquímico molecular (disminución de vitelogenina). Esto estaría indicando que el agua de Manantial de Cerro Colorado y los CE's presentes en ella son capaces de generar disrupción endocrina y que las matrices estudiadas minimizan la síntesis de VTG, debido a que provocan un potencial androgénico o anti-estrogénico que favorecen la producción de hormonas masculinas o bloquea/inhibe la expresión de los genes responsables de la producción de estrógeno, el cual es el activador de la producción de VTG.

Además, presumiblemente al aumentar la concentración de triclosán en las matrices, el nivel de la VTG aumenta, pero permaneciendo por debajo de los valores reportados en peces no expuestos. Tanto las matrices de Agua de Manantial de Cerro Colorado fortificadas con triclosán (ACM+C1, ACM+C2, ACM+C3) y los tratamientos C1, C2, C3 correspondientes a matrices de agua con

concentraciones solo de triclosán se presentaron valores de VTG más altos que ACM sin ser estadísticamente significativos ($p = 0.0024$) pero lo suficientemente bajos para pensar también en un efecto androgénico o anti-estrogenico del triclosán a concentraciones de 15,150 y 1500 ng/L. Estos supuestos deben de ofrecer conclusiones más satisfactorias al compararse con los resultados de hembras de *Danio rerio*.

8.3.2 Disrupción endocrina en hembras *Danio rerio*

Los tratamientos de peces hembras al igual que los machos también mostraron un claro decremento de la concentración de VTG y diferencias significativas ($p = 0.0096$) de los valores medios con respecto a los controles positivo y negativo (CP=110307 ng/mL y CN=55872 ng/ml). Al comparar algunos de los mismos tratamientos para machos y hembras (ACM y ACMH; ACM+C1 y ACM+C1H; ACMH y C1) estos no muestran diferencias significativas entre si traduciéndose lo anterior en niveles de concentración muy bajos de VTG anormales para ambos sexos. Si bien el *Danio rerio* se está empleando como modelo animal para trabajos exploratorios o generadores de hipótesis enfocados sobre los efectos de DE's con diferentes respuestas de genes y proteínas (Hoffmann *et al.*, 2008) los niveles de VTG en hembras normalmente no son considerados un biomarcador útil de influencia de alteración endocrina debido a que el papel fundamental desempeñado por la VTG en el proceso reproductivo de la hembra significa que a través de su ciclo de vida, los niveles circulantes de VTG se extienden a través de un intervalo de concentración extrema y muestran una considerable variabilidad inter-individual, enmascarando potencialmente los efectos de los moduladores endocrinos exógenos con base en lo establecido por Sandoval y Hernández, (2013) ya que los principales reguladores endógenos de expresión de genes de VTG son los esteroides gonadales como 17β -estradiol (E2). Pero es necesario tomarlos en cuenta en este estudio al presentar niveles menores a CNH infiriendo una inhibición de dichos genes responsables de la producción del biomarcador.

Este comportamiento encaja al tomar al TCS como un anti-estrogénico, si bien, todos los peces tienen estrógeno y testosterona en la sangre, la proporción de las

dos hormonas varía entre hembras y machos, y esta proporción es importante para los dos sexos ya que influye en la diferenciación sexual en procesos reproductivos. La mayor parte del conocimiento generado apoya la idea de que los DE son potencialmente estrogénicos, es decir desequilibran esta proporción a favor de los estrógenos y el TCS, como tal, ha sido blanco de algunos estudios ideados para conocer su comportamiento (Chacón *et al.*, 2007) ya que su potencial para actuar como un DE aumenta gracias a que su estructura química es parecida a los estrógenos no esteroideos conocidos como BPA o NPH. Pero estos mismos estudios se han encontrado con un efecto más bien androgénico/anti-estrogénico. Sumpter y Jobling en 1995 encontraron que la presencia de fenoles estaba asociada con niveles reducidos tanto de estrógeno como de testosterona en carpas. Esta relación pudo tener un impacto relevante en la producción de VTG gracias a la exposición a un fenol como TCS en hembras y machos, inhibiendo la producción estrogénica. Algunos otros estudios apoyan la idea de que TCS no se comporta como un DE estrogénico. Se ha encontrado que TCS, en combinación con hormonas tiroideas naturales, provoca un aumento en las tasas de metamorfosis y la expresión de genes para la aleta caudal en la rana toro norteamericana, *Rana catesbeiana*, a 0,15 mg / L (Veldhoen *et al.*, 2006). Además produce efectos androgénicos débiles en alevines de medaka Japónes (*Oryzias latipes*), y débiles efectos anti-estrogénicos en varones de ranas *Xenopus laevis* (Foran *et al.*, 2000) (Matsumura *et al.*, 2005) al disminuir los niveles de VTG y testosterona con respecto al grupo control.

Según estudios los DE's pueden actuar de cuatro formas distintas: agonista a la acción de la hormona; antagonizando la acción de la hormona; alterando el patrón de síntesis y el metabolismo de la hormona; modulando el nivel de los receptores correspondientes. Si bien se han hecho estudios sobre los límites de exposición segura, éstos suelen ser imprecisos, ya que los efectos en seres vivos son muy tardíos, esto porque en condiciones naturales los seres vivos están expuestos a muy bajas concentraciones, por lo que se comienzan a acumular en los tejidos y

órganos, llegando a concentraciones tóxicas, ocasionando los efectos nocivos correspondientes (Chacón *et al.*, 2007).

Gran parte del trabajo de investigación que se ha hecho hasta la fecha es sobre los CE´s con actividad similar al estrógeno y se ha prestado menos atención a las sustancias que muestran actividad anti-estrogénica, es decir, compuestos que antagonizan o inhiben los procesos dependientes de estrógenos. En particular, para xenobióticos tales como 2,3,7,8 - tetraclorodibenzo - p-dioxina (TCDD) y los bifenilospoliclorados (PCB) , que se unen al receptor Arylhydrocarbon (AhR) y con ello inducen la biotransformación de la enzima citocromo P450 1A (1A CYP), en la que se han observado efectos anti-estrogénicos (Segura , 1994 y Navas y Segner , 1998) . En los peces teleósteos, tanto en estudios *in vivo* e *in vitro* han descrito que la exposición a TCDD o PCB podría estar asociada con una reducción de la producción de vitelogenina (VTG) o con problemas de desarrollo de las gónadas (Chen *et al.*, 1985, Thomas, 1989, Wannemacher *et al.*, 1992 y Smeets, 1999 en Jackson & Sutton, 2008).

Es posible que de acuerdo con lo anterior que el TCS tenga un comportamiento parecido y se una en la activación del receptor AhR que afecta a la actividad del receptor de estrógenos (ER) lo que puede provocar alteraciones en la regulación hormonal del proceso reproductor, dando lugar, por ejemplo a una disminución de la producción de VTG (Navas y Segner, 2000). Esta alteración disminuiría la calidad de los huevos y por tanto mermaría la eficiencia reproductora de los peces. Multitud de estudios previos han mostrado que existe una relación inversa entre los procesos mediados por el ER y los mediados por el AhR (Navas y Segner, 1998), lo que estaría en consonancia con la disminución de los niveles de ER y de VTG (ambos genes estrógeno dependientes).

Teniendo en cuenta la magnitud de la inducción de los procesos dependientes del AhR en el hígado de los peces cebra todo hace pensar que no sólo el TCS sino también el Agua del Manantial de Cerro Colorado funciona como inductor de este

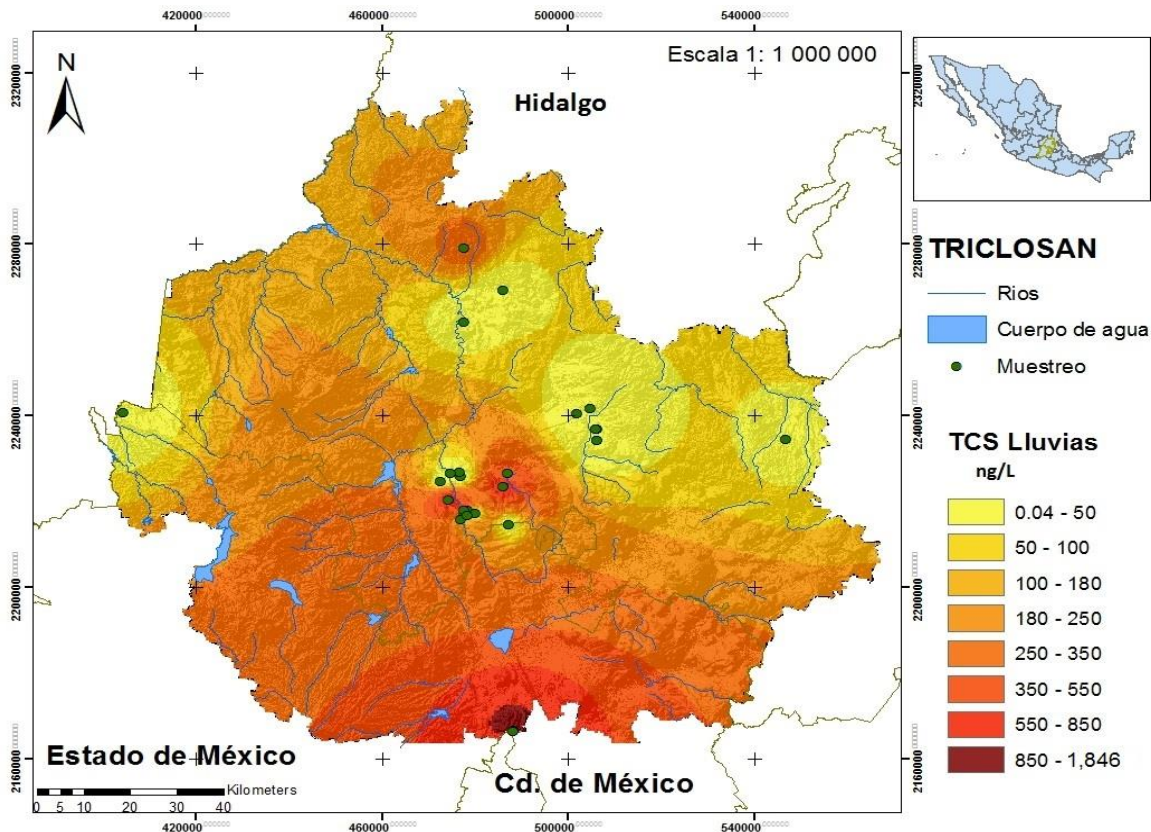
gen/receptor convirtiéndose en un DE anti-estrogénico capaz de mermar las funciones reproductivas de la especie *Danio rerio*.

8.4 Análisis Espacial del triclosán

Se utilizó el análisis de interpolación IDW para predecir y visualizar la distribución espacial de los datos de concentración de TCS en agua superficial, pozos y manantiales mediante el uso de software ArcGIS 10.3. Este método y otros similares han sido reportados por Chen *et al.*, 2013; Pintado-Herrera *et al.*, 2016 y Price *et al.*, 2010 donde se trazan los mapas de distribución de PBDE, TCS y otros contaminantes en los sedimentos y ríos de su área de muestreo.

Para el análisis se utilizaron 84 datos por temporada de lluvia y estiaje (Tabla 10, 11, en Anexo 1) para un total de 168 datos de concentración de TCS en 25 puntos de muestreo. El análisis de la distribución espacial permite la visualización de los puntos de muestreo donde se obtuvieron las concentraciones de TCS destacando las más altas y su posible concentración en el resto del terreno. En TCS Lluvias (ver Mapa 1) las concentraciones más altas corresponden a Emisor Central con 1,846 ng/L, canal Requena 1037 ng/L. Manantiales y pozos muestran zonas de concentración baja desde 0.04 a 380 ng/L. Por su parte las concentraciones en TCS Estiaje (Mapa 2) disminuyen claramente con respecto a la época de lluvias. Emisor Central (456 ng/L) no es la concentración más alta, esta corresponde al pozo CIC 14 (643 ng/L) cercano espacialmente al primero. En general las concentraciones de la época de estiaje disminuyen con respecto a la de lluvias debido a la disminución del caudal proveniente de la Ciudad de México, la acumulación en suelos aledaños y cuerpos de agua no superficiales pero es difícil saber si la disminución de TCS se debe a procesos puramente ambientales (físico-químico-biológicos). Las cantidades de TCS que entran al sistema son difíciles de estimar debido a la sensibilidad comercial a través de diferentes fabricantes y formuladores, es difícil conocer la cantidad de TCS usada per cápita, cuanta desechada en agua residual y cuanta la eliminada de las plantas de tratamiento de aguas residuales (STP). Sin embargo, la eficiencia en la eliminación

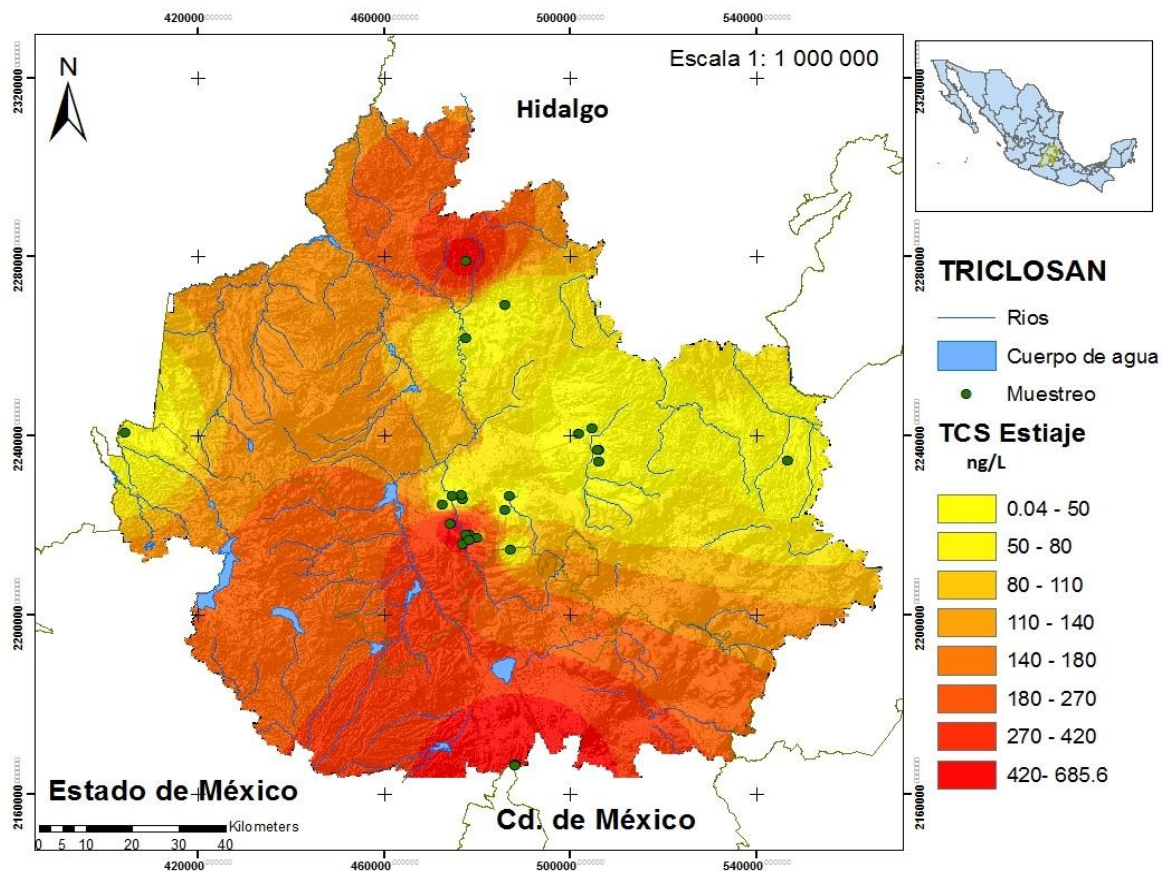
probablemente si aunque sea muy variable (por ejemplo McAvoy *et al.*, 2002). Por otro lado el TCS sufre transformaciones determinadas por un multitud de factores como el pH, biodegradación, absorción y muchas otras aún sin determinar del todo (Price *et al.*, 2010). Es posible observar que las zonas donde se observan mayores concentraciones corresponden a lugares con mayor antigüedad de riego con agua residual y las zonas de menor concentración corresponden a áreas con una antigüedad de riego menor a 20 años.



Mapa 1. Distribución de la concentración de TCS en época de lluvias del año 2007

El Análisis Espacial en los SIG comprende un conjunto de procedimientos utilizados para abordar el estudio de la estructura y de las relaciones territoriales a partir del conocimiento de la posición, geografía y de las características de las variables involucradas. Gracias a este tipo de análisis es posible visualizar sitios de importancia donde esas concentraciones puedan tener efectos en los organismos y la salud pública. Se ha demostrado que un número de diferentes especies de algas pueden ser muy sensibles a TCS a concentraciones entre 530 y

2.600 ng/L (Capdevielle *et al.*, 2008). El mismo autor estima una PNEC (Predicted No-Effect Concentration) de TCS de 1.550 ng/L basado en la sensibilidad de distribución de las especies. Sin embargo, otros estudios han propuesto PNEC sustancialmente más bajos. Reiss *et al.*, (2002), por ejemplo, sugirió una PNEC conservador de 69 ng/L basado en la NOEC (No observed effect concentration) de algas más bajo disponible en el momento. Las estimaciones de la exposición que aquí se presentan sugieren que las concentraciones superarán los 1.550 ng/L en muy pocos sitios, y sólo por un corto período de tiempo, aunque las concentraciones superiores a 69 ng/L si se predice puedan ser mucho más generalizadas. Existe, por tanto, cierta ambigüedad acerca de los riesgos que presentan los TCS en las regiones consideradas pero es de tomar en cuenta lo generalizada que esta su presencia en el área de muestreo.



Mapa 2. Distribución de la concentración de TCS en la época de estiaje del año 2008

9. CONCLUSIONES

En relación a las pruebas de toxicidad y DE y con base en el análisis del estudio de microtoxicidad, se concluye que bajo las concentraciones de estudio el TCS genera un daño en el metabolismo de las bacterias de la especie *Vibrio fischeri*, específicamente en la producción de la enzima luciferasa a los 5, 15 y 30 min lo que ocasiona que la luminiscencia disminuya traduciéndose esto como una fuente de daño toxicológico presentando efectos muy tóxicos en *V. fischeri* a una concentración de 0.38 mg/L siendo esta una concentración superior a la que se encuentra en el agua de manantial. Por su parte el agua de Manantial de Cerro Colorado cuya concentración oscila entre 0.76 y 8.9 ng/L no presentó disminución alguna de la bioluminiscencia de *Vibrio fischeri* respecto al tiempo de exposición, por lo que se puede concluir que no presenta toxicidad aguda en este estudio.

En lo concerniente al TCS como disruptor endocrino utilizando la producción de la proteína vitelogenina (VTG) como biomarcador, se observó una disminución en la producción de VTG en machos y hembras de peces de la especie *Danio rerio* (pez cebra) bajo el tratamiento de Agua del Manantial Cruda de Cerro Colorado (AMC); los tratamientos de agua sintética de triclosán (C1= 15; C2= 150 y C3= 1500 ng/ml) y ACM +C1, ACM +C2 y ACM +C3 con respecto a sus respectivos controles negativo y positivo (17β estradiol). Se esperaba un aumento perceptible en las hembras al ya producir esta proteína para originar el vitelo contenido en sus óvulos, crucial en el desarrollo embrionario de la especie y un aumento significativo en los niveles de VTG para machos lo que definiría al TCS como un DE estrogénico, sin embargo ambos mostraron niveles de VTG por debajo de los valores de sus respectivos controles negativo sugiriendo un comportamiento anti-estrogénico. En conclusión tanto el Agua de Manantial de Cerro Colorado como los tratamientos de TCS evaluados alteran/interfieren con el eje hipófisis-hígado-gónada responsable de la producción de VTG en peces *Danio rerio*.

En cuanto al análisis espacial del TCS en el valle de Tula se determinó que en las dos épocas siguen patrones de distribución similares, mostrando concentraciones

mayores en la parte más cercana a la Cd. De México, que corresponde al Emisor Central (descarga de aguas residuales), sigue el flujo hasta cruzar toda la zona hasta el Canal Requena donde se encuentra la presa del mismo nombre. Los vertidos son la principal fuente de este contaminante y es bien sabido que las aguas residuales provenientes de la Cd. De México se emplean en riego para después incorporarse al acuífero de la zona gracias a la recarga artificial indirecta, recarga acompañada de CE's incluido el TCS y aunque el suelo actúa como medio depurador y remueve gran cantidad de los contaminantes que originalmente se encuentran presentes, los CE's como el TCS persisten en la zona a concentraciones de hasta 1,846 ng/L. Es posible reconocer ahora zonas con características que las hacen susceptibles a más análisis para corroborar los procesos aquí realizados.

10. RECOMENDACIONES

Se considera importante para conferir de mayor validez a este estudio, investigar sobre otros aspectos relacionados a los posibles efectos del TCS y otros contaminantes presentes en el agua de manantial de Cerro Colorado desde una perspectiva más específica a lo largo del ciclo de vida del organismo modelo *Danio rerio* como pueden ser:

- Extender los estudios expuestos en esta tesis a ensayos de comportamiento y movilidad en *Danio rerio*, y utilizar al pez cebra para identificar objetivos moleculares de la acción de EDC's para determinar los umbrales de efecto en el organismo en generaciones posteriores.
- Estudiar la transformación dentro del pez cebrade las sustancias y su comportamiento de absorción y movilidad dentro del organismo para comprender cómo los EDC's inducen cambios en expresión génica y se traducen en enfermedad.
- Dar seguimiento a la evolución de la concentración de los EDC's presentes en el valle de Tula en las matrices aumentadas e incorporar otras, para una toma de decisiones oportuna.

11. REFERENCIAS

- Adriano, D. C. (2001). Arsenic. En: Trace Elements in the Terrestrial Environments. Biogeochemistry, Bioavailability and Risks of Metals. 2nd Edition. SpringerVerlag. New York. 867 pp.
- Agenson, K. O., Oh, J. I., & Urase, T. (2003). Retention of a wide variety of organic pollutants by different nanofiltration/reverse osmosis membranes: controlling parameters of process. *Journal of Membrane Science*, 225(1), 91-103.
- Ando, Y., Niwa, K., Yamada, N., Enomoto, T., Irie, T., Kubota, H., ... & Akiyama, H. (2008). Firefly bioluminescence quantum yield and colour change by pH-sensitive green emission. *Nature Photonics*, 2(1), 44-47.
- Aranzazu D, Rodríguez B, Arboleda L, Restrepo LF, Vieco B. (2009). Efecto del 0,0 dietil 0-(3, 5, 6-tricloro-2-piridil fosforotioato) en machos adultos de tilapia (*Oreochromis spp*). *Rev ColombCiencPecu*; 22:556-557.
- Aranzazu D, Vieco B, Balvín DI, Duque BA, Restrepo LF, Rodríguez B. (2011). Evaluación inmunocitoquímica de peces nativos colombianos candidatos para centinelas en estudios de ecotoxicidad. *Rev Colomb Cienc Pecu*; 24:530-531.
- Argemini, F.; Cianni, N. y Porta, A. (2005). Disrupción endócrina: perspectivas ambientales y salud pública. *Acta Bioquím. Clin. Lationam*. 39(3): 291 – 300.
- Arukwe A, Gokoyr A. (2000). Eggshell and egg yolk proteins in fish: hepatic proteins for the next generation: oogenetic, population, and evolutionary implications of endocrine disruption. *CompHepatol* 2003; 4:1-21. Gil, F. El papel de los biomarcadores en Toxicología humana. *Revista de Toxicología*, 17(1), 19-26.
- Arukwe A, Knudsen FR, Goksoyr A. (1997). Fish zone radiate (eggshell) protein: A sensitive biomarker for environmental estrogens. *Environ Health Perspect*, 105:418-422.

- Barceló, D., & López, M. J. (2008). Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. *Jornadas de presentación de resultados: el estado ecológico de las masas de agua. Panel científico-técnico de seguimiento de la política de aguas, Sevilla.*
- Bocco, G. (2000). El desarrollo de sistemas de información geográfica en la Frontera Norte de México. *EL COLEF, Investigaciones Científicas*, 42 (1).
- Bopp, S., Weiß, H., & Schirmer, K. (2005). Time-integrated monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in groundwater using the Ceramic Dosimeter passive sampling device. *Journal of Chromatography A*, 1072(1), 137-147.
- Boussu, K., Van der Bruggen, B., Volodin, A., Snauwaert, J., Van Haesendonck, C., & Vandecasteele, C. (2005). Roughness and hydrophobicity studies of nanofiltration membranes using different modes of AFM. *Journal of colloid and interface science*, 286(2), 632-638.
- Braeken, L., Ramaekers, R., Zhang, Y., Maes, G., Van der Bruggen, B., & Vandecasteele, C. (2005). Influence of hydrophobicity on retention in nanofiltration of aqueous solutions containing organic compounds. *Journal of Membrane Science*, 252(1), 195-203.
- Bridges JW, Bridges O. (2004). Integrated risk assessment and endocrine disrupters. *Toxicology* ; 205:11-15.
- Brooker, S., & Michael, E. (2000). The potential of geographical information systems and remote sensing in the epidemiology and control of human helminth infections. *Advances in parasitology*, 47, 245-288.
- Burns, E. (2009). Repensar la cuenca: la gestión de ciclos del agua en el Valle de México. México. UAM/CENTLI. Van Cauteren H, de Kok MCM, Van Schooten FJ (1996). Cancer risk evaluation. In: Niesink RJM, de Vries J, Hollinger MA (eds). *Toxicology. Principles and applications*. CRC, New York, pp. 384-413.

- Cairns Jr, J., McCormick, P. V., & Niederlehner, B. R. (1993). A proposed framework for developing indicators of ecosystem health. *Hydrobiologia*, 263(1), 1-44.
- Caldwell, D. J. (2008). Derivation of an Aquatic Predicted No-Effect Concentration for the Synthetic Hormone, 17 α -Ethinyl Estradiol. *Environ. Sci. Technol.*, 7046–7054.
- Capdevielle, M., Van Egmond, R., Whelan, M., Versteeg, D., Hofmann-Kamensky, M., Inauen, J., Woltering, D. (2008). Consideration of exposure and species sensitivity of triclosan in the freshwater environment. *Integrated environmental assessment and management*, 4(1), 15-23.
- Carrillo, J. F. (2009). Determinación de concentraciones de triclosán (disruptor del sistema endocrino) en lodos del alcantarillado de bogotá y en agua cruda y biosólido de la TPAR el salitre. bogotá: Universidad de los Andes. 20-38.
- Chacón, O., Cuevas, F., De La Fuente, C., Díaz, F., Huaquín, L., (2007). Disrupción endocrina e imposex. *Avances en Ciencias Veterinarias* 22: 42-48.
- Chávez, A., Maya, C., Gibson, R., & Jiménez, B. (2011). The removal of microorganisms and organic micropollUTants from wastewater during infiltration to aquifers after irrigation of farmland in the Tula Valley, Mexico. *Environmental Pollution.*, 1354-1362.
- Chen, Z. Q., Ullsh, L. S., DuBois, G., & Shih, T. Y. (1985). Posttranslational processing of p21 ras proteins involves palmitoylation of the C-terminal tetrapeptide containing cysteine-186. *Journal of virology*, 56(2), 607-612.
- Chrisman, N. (2002): Exploring Geographic information systems, Jonh Wiley & Sons, Nueva York.

- CONAGUA. (1 de Noviembre de 2011). Comision Nacional del Agua. Obtenido de
AGUA SUBTERRÁNEA:
<http://www.conagua.gob.mx/Contenido.aspx?n1=3&n2=62&n3=62>
- CONAGUA. (2007). Sistema Hidrológico del Valle de México. Comision Nacional del Agua México: SEMARNAT.
- CONAGUA, C. (2013). Estadísticas del agua en México. Comision Nacional del Agua. México: SEMARNAT.
- CONAGUA. (2015). Estadísticas del Agua en México, edición 2015. Comision Nacional del Agua. México: SEMARNAT.
- Contreras, D. M. (2009). La disponibilidad de agua en México y la participación de los grandes conglomerados internacionales.
- Davis LK, Bradley K. Fox, Chhorn Lim, Naoshi Hiramatsu, Craig V. Sullivan, Tetsuya Hirano, E. Gordon Grau. (2009). Induction of vitellogenin production in male tilapia (*Oreochromis mossambicus*) by commercial fish diets. *Comp Biochem Physiol* 2009; 154:249-254.
- Delgado, S. (2011). Evaluación De Tecnologías Potenciales De Reducción De La Contaminación De Las Aguas De Canarias (Tecnoagua). Canarias: Departamento de Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica.
- Peinador, M. E. (2010). Sensibilidad Química Múltiple, Enfermedad Ambiental Emergente. *Revista Enfermería C y L*, 2(1).
- ENTOX/TIWET (The Faculty of the Department of Environmental Toxicology and The Institute of Wildlife and Environmental Toxicology-Clemson University) (1996). Aquatic and Terrestrial Ecotoxicology. In: Klaassen CD (ed). Casarett and Doull's Toxicology. McGraw-Hill, USA, pp. 883-905.
- EPA (Environmental Protection Agency). (2003). Region/ORD Workshop on Emerging PollUTants August 11-14.

- Federman, D. K. (2011). Proyecto de planta piloto de tratamiento avanzado para la recarga artificial del acuífero. *Revista Digital Universitaria*, 1067-6079.
- Foran, C. M., Bennett, E. R., & Benson, W. H. (2000). Developmental evaluation of a potential non-steroidal estrogen: triclosan. *Marine Environmental Research*, 50(1), 153-156.
- Fossi MC , Casini S, Marsili L, Neri G, Mori G, Ancora S, Moscatelli A, Ausili A, Notarbartolo-di-Sciara G. (2002). Biomarkers for endocrine disruptors in three species of mediterranean large pelagic fish. *Mar Environ Res*; 54:667-671.
- García Vélez, J. L., Ramírez Callejas , C. A., & Barba Ho, L. E. (2007). Evaluación de la presencia de sustancias tóxicas en algunos afluentes del Río Cauca. Santiago De Cali: Escuela de Ingeniería de Recursos Naturales y del Ambiente. 150-154.
- García, M. L. (2004). Bioensayo de toxicidad por Microtox® en sedimentos mineros estabilizados con CaCO₃. Proyecto Fin de Carrera. Universidad de Murcia.
- Garcia-Segura, L. M., Chowen, J. A., Parducz, A., & Naftolin, F. (1994). Gonadal hormones as promoters of structural synaptic plasticity: cellular mechanisms. *Progress in neurobiology*, 44(3), 279-307.
- Gatidou, G., Thomaidis, N. S., Stasinakis, A. S., & Lekkas, T. D. (2007). Simultaneous determination of the endocrine disrupting compounds nonylphenol, nonylphenol ethoxylates, triclosan and bisphenol A in wastewater and sewage sludge by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1138(1), 32-41.
- Gibson, R.; Becerril-Bravo, E.; Silva-Castro, V. y Jiménez, B. (2007). Determination of acidic pharmaceuticals and potential endocrine disrupting compounds in wastewaters and spring waters by selective elution and

analysis by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1169, 31–39, Elsevier.

Gil, M. J. (2012). Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos. *Producción más Limpia*, 52-73.

Gonzalez E., Keshavan D. (2006). Messing with Bacterial Quorum Sensing. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70:859–875.

Goodchild, M. F., Haining, R.P. (2005). «SIG y análisis espacial de datos: perspectivas convergentes». *En Investigaciones Regionales*. Número 006. Asociación española de Ciencia Regional, Alcalá de Henares, España. pp. 175-201.

Grandjean, P., Brown, S.S., Reavey, P., Young, D.S. (1994). Biomarkers of chemical exposure: State of the art. *Clin Chem* 40: 1360-1362.

Hansen, P.-D., Dizer, H., Hock, B., Marx, A., Sherry, J., McMaster, M., and Blaise, C. (1998). Vitellogenin— A biomarker for endocrine disruptors. *Trends Anal. Chem.* 17:448–451

Herron, C. A. (2013). Agua y Cambio Climático en México 2007-2012: Análisis y Recomendaciones a Futuro. México, D.F.: conagua y premia.

Hewitt, N. J. (2001). Studies Comparing In Vivo:In Vitro Metabolism Of Three Pharmaceutical Compounds In Rat, Dog, Monkey, And Human Using Cryopreserved Hepatocytes, Microsomes, And Collagen Gel Immobilized Hepatocyte Cultures. *Drug Metabolism And Disposition*, 1042–1050.

Hoffmann, J.L., Thomason, R.G., Lee, D.M., Brill, J.L., Price, B.B., Carr, G.J., Versteeg, D.J., (2008). Hepatic gene expression profiling using GeneChips in zebrafish exposed to 17 α -methyl-dihydrotestosterone. *Aquat. Toxicol.* 87, 69–80.

- Hutchinson TH, Ankley GT, Segner H, Tyler C. (2006). Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as “signpost”, not “traffic lights”, in risk assessment. *Environ Health Perspect* ; 114:106-114.
- Hyndman KM, Biales A, Bartell SE, Schoenfuss HL. (2010). Assessing the effects of exposure timing on biomarker expression using 17beta-estradiol. *Aquat Toxicol* ; 96:264-272.
- Inui MA, Takenaka S, Nakasawa M, Ueda M, Watanabe H, Mori C, Iguchi T, Miyatake K. (2003). Effects of UV screens and preservatives on Vtg and choriogenina production in male medaka. *Toxicology*; 194:43-50.
- IPCS. Global assessment of the state of the science of endocrine disruptors. (2002). World Health Organization. International Programme on Chemical Safety. 133p. URL: http://www.who.int/ipcs/publications/new_issues/endocrine_disruptors/en/ (Noviembre/2006).
- Jackson, J., & Sutton, R. (2008). Sources of endocrine-disrupting chemicals in urban wastewater, Oakland, CA. *Science of the total environment*, 405(1), 153-160.
- Jackson, J., & Sutton, R. (2008). Sources of endocrine-disrupting chemicals in urban wastewater, Oakland, CA. *Science of the total environment*, 405(1), 153-160.
- Jiménez, B. E., & Chavez, A. (2013). Reúso del agua del manantial de Cerro Colorado (Valle de Tula) para la recarga del acuífero del Valle de México. Distrito Federal: Instituto de Ingeniería.
- Jimenez, C. (2003). Quality assessment a potencial use of an aquifer recharged with wastewater “El Mezquital Case”. 4th International Symposium on Wastewater Reclamation and Reuse., (pág. Memorias en Disco CD Press 45). Mexico City.

- Jimenez, L. M. (2005). El agua en México vista desde la academia. México, D.F.: Academia Mexicana de Ciencias.
- Kai-Erik, U., Eivind, L., Kjell Birger, Ø., Mari, M., & Bjørnstad-Hjelle, A. (2010). Ecotoxicology goes MudPIT. *Marine Environmental Research*, S34–S36.
- Kashiwada S, Ishikawa H, Miyamoto N, Ohnishi Y, Magara Y. (2002). Fish test for endocrine-disruption and estimation of water quality of Japanese rivers. *Water Res*; 36:2161-2166.
- Kocher, T. D., Thomas, W. K., Meyer, A., Edwards, S. V., Pääbo, S., Villablanca, F. X., & Wilson, A. C. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(16), 6196-6200.
- Kumar, V., Balomajumder, C., & Roy, P. (2008). Disruption of LH-induced testosterone biosynthesis in testicular Leydig cells by triclosan: probable mechanism of action. *Toxicology*, 250(2), 124-131.
- Larsson DGJ, Adolffsson EM. (2002). Ethinylestradiol-an undesired fish contraceptive? *Aquat Toxicol*; 45:91-97.
- Longely, P., Goodchild, M., Maguire, D., Rhind, D. (2001). «Geographic Information Systems and Science». John Wiley & Sons. Chichester. Capítulos 13 y 14.
- Marín, S. (2005). Movilización de metales pesados en residuos y suelos industriales afectados por la hidrometalurgia del cinc. Murcia: MEMORIA.
- Marta, C. I. S., & Moorillón, G. V. N. (2010). La bioluminiscencia de microorganismos marinos y su potencial biotecnológico. *Ene*, 2(3), 1.
- Martínez, F. (2016). Prohíben en EU jabones antibacteriales por dañar sistema inmunológico. La Jornada, [online] p.Única Pagina. Available at: <http://www.jornada.unam.mx/ultimas/2016/09/03/prohiben-en-eu-jabones-antibacteriales-por-danar-sistema-inmunologico> [Accessed 7 Nov. 2016].

- Mastandrea, C., Chichizola, C., Ludueña, B., Sánchez, H., Álvarez, H., & Gutiérrez, A. (2005). Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Riesgos para la salud y marcadores biológicos. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 39(1), 27-36.
- Matsumura, N., Ishibashi, H., Hirano, M., Nagao, Y., Watanabe, N., Shiratsuchi, H. & Arizono, K. (2005). Effects of nonylphenol and triclosan on production of plasma vitellogenin and testosterone in male South African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28(9), 1748-1751.
- McAvoy, D., Schatowitz, B., Jacob, M., Hauk, A., Eckhoff, W. (2002). Measurement of triclosan in wastewater treatment systems. *Environ Toxicol Chem*, 2002;21:1323–9.
- Mitchel, A. (2005). The ESRI Guide to GIS analysis, Volume 2: Spatial measurements and statistics. *ESRI Guide to GIS analysis*.
- Mills, L., Chichester, C. (2005) Review of evidence: Are endocrine disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations?. *Sci Total Environ* ; 343:1-34.
- Moreano Viteri, R. J. (2008). Sistema de información para la interpolación espacial y temporal de datos sobre el tiempo atmosférico y el clima del Ecuador.
- Moreira, M. A. (1996). “Los Sistemas de Información Geográfica y sus aplicaciones en la diversidad biológica”. *Revista Ciencia y Ambiente.*, pág. 80-86.
- Moreno, J.(2014). Pez Cebra (Danio Rerio). Desafíos de la Ingeniería.
- National Research Council. (2012). Water Reuse Potential for expanding the nation's water supply through reuse of municipal wastewater. Washington, D.C.: Water Science and Technology Board.
- Navas, J. M., & Segner, H. (1998). Antiestrogenic activity of anthropogenic and natural chemicals. *Environmental Science and Pollution Research*, 5(2), 75-82.

- Navas, J. M., & Segner, H. (2000). Antiestrogenicity of β -naphthoflavone and PAHs in cultured rainbow trout hepatocytes: evidence for a role of the arylhydrocarbon receptor. *Aquatic Toxicology*, 51(1), 79-92.
- Nilsen, B. M., Berg, K., Eidem, J. K., Kristiansen, S. I., Brion, F., Porcher, J. M., & Goksøyr, A. (2004). Development of quantitative vitellogenin-ELISAs for fish test species used in endocrine disruptor screening. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 378(3), 621-633.
- Olaya, V. (2012). Sistemas de información geográfica. Tomos I y II. Disponible libre formato Pdf en.
- Olea, N. (2001). La exposición a disruptores endocrinos. Laboratorio de Investigaciones Médicas Hospital Clínico.
- Oliveira, R., Domingues, I., Grisolia, C. K., & Soares, A. M. (2009). Effects of triclosan on zebrafish early-life stages and adults. *Environmental Science and Pollution Research*, 16(6), 679-688.
- Petrovic, M. (2003). Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. *Trends in Analytical Chemistry*, 685-696.
- Pintado-Herrera, M. G., Wang, C., Lu, J., Chang, Y. P., Chen, W., Li, X., & Lara-Martín, P. A. (2016). Distribution, mass inventories, and ecological risk assessment of legacy and emerging contaminants in sediments from the Pearl River Estuary in China. *Journal of hazardous materials*.
- Pombo, M.; Castro, L. (2005). Disruptores endocrinos.
URL:<http://www.seep.es/privado/download.asp?url=congresos/C2005/Conferencias/Conferencia-Manuel%20Pombo.pdf> (abril/06).
- Prado N. (2009). Biodegradation by activated sludge and toxicity of tetracycline into a semi-industrial membrane bioreactor. *Bioresour Technol*, 69-74.
- Price, C.P., (2001), Immunoassay, *Encyclopedia of life sciences*, Macmillan Publishers Ltd. Nature Publishing Group/www.els.net

- Price, O. R., Williams, R. J., van Egmond, R., Wilkinson, M. J., & Whelan, M. J. (2010). Predicting accurate and ecologically relevant regional scale concentrations of triclosan in rivers for use in higher-tier aquatic risk assessments. *Environment international*, 36(6), 521-526.
- Purdom, C. (1994). Estrogenic effects os effluents from sewage treatment works. *Chemistry and ecology*, 275-285.
- Reiss, R., Mackay, N., Habig, C., Griffin, J., (2002). An ecological risk assessment for triclosan in lotic systems following discharge from wastewater treatment plants in the United States. *Environ Toxicol Chem*;21:2483–92.
- Repetto, M. (1997). Diagnóstico de la intoxicación. En: Repetto M (ed). *Toxicología Fundamental*. Díaz de Santos, Madrid, pp. 327-333.
- Repetto, G., Hazen, M., Molero, M., del Peso, A., Salguero, M., del Castillo, P., Repetto, M. (2001). A test battery for the ecotoxicological evaluation of pentachlorophenol. *Toxicology in Vitro*, 503-509.
- Roitt , I.M., Delves, P.J. (2003).Inmunología, fundamentos, Editorial Medica Panamericana, Argentina,
- Chen, S. J., Feng, A. H., He, M. J., Chen, M. Y., Luo, X. J., & Mai, B. X. (2013). Current levels and composition profiles of PBDEs and alternative flame retardants in surface sediments from the Pearl River Delta, southern China: comparison with historical data. *Science of the Total Environment*, 444, 205-211.
- Sandoval Villasana, A. M., & Hernández Romano, J. (2013). Valoración de la potencia biológica de mezclas de estrógenos ambientales utilizando las vitelogeninas como biomarcadores moleculares inducidas en el pez *Danio rerio*.
- Santos, L. H. (2010). Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Aquatic environment*, 45-95.

- SEDESOL. (2015). Catálogo de localidades del estado de Hidalgo. Unidad de Microrregiones.
Dirección General Adjunta de Planeación Microrregional.
- Smeets, E., & Weterings, R. (1999). Environmental indicators: Typology and overview (p. 19). Copenhagen: European Environment Agency.
- Solé M, Barcelo D, Porte C. (2002). Seasonal variation of plamatic and hepatic vitellogenin and EROD activity in carp, *Cyprinus carpio*, in relation to sewage treatment plants. *Aquat Toxicol*; 60:233-248.
- Sumpter, J. P., & Jobling, S. (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental health perspectives*, 103(Suppl 7), 173.
- Tatarazako, N., Ishibashi, H., Teshima, K., Kishi, K., & Arizono, K. (2003). Effects of triclosan on various aquatic organisms. *Environmental sciences: an international journal of environmental physiology and toxicology*, 11(2), 133-140.
- Tierney, K. B., Farrell, A. P., & Brauner, C. J. (Eds.). (2013). Fish Physiology: Organic Chemical Toxicology of Fishes (Vol. 33). Academic Press.
- Vecitis, C. D., Park, H., Cheng, J., Mader, B. T., & Hoffmann, M. R. (2009). Treatment technologies for aqueous perfluorooctanesulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA). *Frontiers of Environmental Science & Engineering in China*, 3(2), 129-151.
- Veldhoen, N., Skirrow, R. C., Osachoff, H., Wigmore, H., Clapson, D. J., Gunderson, M. P., ... & Helbing, C. C. (2006). The bactericidal agent triclosan modulates thyroid hormone-associated gene expression and disrupts postembryonic anuran development. *Aquatic Toxicology*, 80(3), 217-227.

- Verliefde, A., Van Vliet, N., Amy, G., Van der Bruggen, B., & Van Dijk, J. C. (2006). A semi-quantitative method for prediction of the rejection of uncharged organic micropollutants with nanofiltration. *Water Practice and Technology*, 1(4), wpt2006084.
- Walker CH, Hopkin SP, Sibly RM y Peakall DB. (1996) Biomarkers. In: Walker CH, Hopkin SP, Sibly RM y Peakall DB (eds). *Principles of Ecotoxicology*. Taylor and Francis , London, pp.175-194.
- Wannemacher, R., Rebstock, A., Kulzer, E., Schrenk, D., & Bock, K. W. (1992). Effects of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on reproduction and oogenesis in zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Chemosphere*, 24(9), 1361-1368.
- Wegrzyn G y Czyz A. (2003). Detection of mUTagenic pollution of natural environment using microbiological assays. *J. Appl. Microbiol.* 95:1175–1181.
- White R, Jobling S, Hoare SA, Sumpter JP, Parker MG.(1994). Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology*; 135:175-182.
- Wixon, J. (2000). Featured organism: *Danio rerio*, the zebrafish. *Yeast*, 17(3), 225-231.
- Zagatto, P.A. y Bertoletti, E. (2006). *Ecotoxicología Acuática: Principios y Aplicaciones*. RIMA editora, Sao Carlos. 478 p.
- Zepeda, B. (2004). SIG: herramienta para el análisis y la presentación de datos. *Boletín de Divulgación técnica*, (92), 20.

ANEXO 1

MICROTOX

Para dicho test es necesario preparar las hileras A y B con celdas nuevas, la hilera A son para las diluciones y la hilera B son las celdas de reacción para la determinación de la bioluminiscencia.

Se colocarán 1000 µL de diluyente en las celdas A1, A2, A3, A4 y 2500 µL de muestra en A5. Posteriormente se tomarán 1000 µL de la celda A5 a la celda A4, se procura una mezcla suficiente y de nuevo se toman 1000 µL de la celda A4 a la A3, se repite el mismo procedimiento y de la celda A2 se toman 1000 µL y se eliminan, no se tiene que mezclar nada en la celda A1 (esta es el blanco).

En la hilera B se colocarán las celdas de reacción, en ellas se dispensa 100 µL de diluyente a cada celda B1 a la B5, posteriormente se coloca 10 µL de la suspensión bacteriana (*Vibrio fischeri*) y se deja estabilizar por 10 minutos, se hace la lectura de “cero minutos” basal e instantáneamente se trasvasan 900 µL de las celdas A1 – A5 a las celdas B1 – B5 y se cronometra las mediciones a 5, 10 y 30 minutos.

Finalmente el equipo determina el %E de la siguiente manera y calcula la CE50 con intervalos de confianza del 95%.

$$\%E = 100 - [LM (100) / LC]$$

Donde:

LC Luz emitida por el control

LM Luz emitida por la muestra

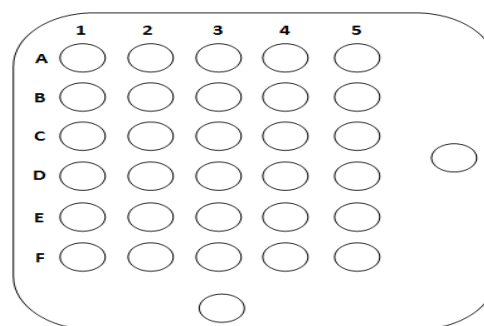
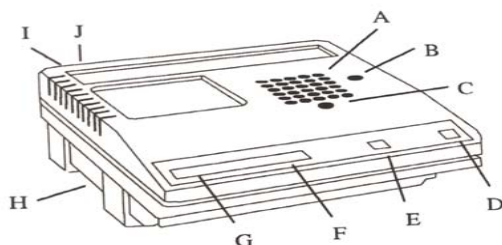


Figura 10. Celdas de incubación.

- a) A1 – A5 celdas de diluciones
- b) B1 – B5 Celdas de reacción

Figura 11. Equipo Microtox, identificación de componentes.

EQUIPO MICROTOX



Letra	Función
A	Pozos de incubación
B	Pozo de reactivo (control temperatura)
C	Pozo de lectura
D	Botón SET (calibración automática)
E	Botón de lectura
F	Luz indicadora de advertencia
G	Pantalla digital
H	Filtro de temperatura fría
I	Selector de voltaje, encendido
J	Selector de modo para set de temperatura

	NaHCO ₃	CaSO ₄	MgSO ₄	KCl
	Gramos por unidad (g/L)			
Volumen (L)	0.096	0.06	0.06	0.004
5	0.48	0.3	0.3	0.02
3	0.288	0.18	0.18	0.012
10	0.96	0.6	0.6	0.04
20	1.92	1.2	1.2	0.08
72	6.912	4.32	4.32	0.288
63	6.048	3.78	3.78	0.252

Tabla 8. Composición del agua semidura reconstituida.

Curvas de los tóxicos de referencia				
Matriz	Concentración (%)	% de Efecto	EC50 (mg/L)	UT50
		Tiempo		
		5 MINUTOS		
Estándar de Fenol	49.5	54.74	22.74	4.397
	24.75	52.33		
	12.38	34.88		
	6.19	12.79		
Estándar de ZnSO4	(%)	10 MINUTOS		
	12.38	77.37	5.244	19.07
	6.19	61.12		
	3.09	33.9		
	1.55	22.23		

Tabla 9. Tóxicos de referencia

Num.	Locacion	Sitio	Triclosan (ng/L)	Fecha	Temporada	X	Y
1	Tezoquiipa	spozo Tezoquiipa 1	2.382	15/07/2007	Lluvia	478272.00	2217759.00
2	Tezoquiipa	spozo Tezoquiipa 2	2.391	15/08/2007	Lluvia	478272.00	2217759.00
3	Tezoquiipa	spozo Tezoquiipa 3	2.469	15/09/2007	Lluvia	478272.00	2217759.00
4	Manantial RN	manantial RN 1	1.575	15/07/2007	Lluvia	546815.23	2234407.17
5	Manantial RN	manantial RN 2	37.016	15/08/2007	Lluvia	546815.23	2234407.17
6	Manantial RN	manantial RN 3	29.119	15/09/2007	Lluvia	546815.23	2234407.17
7	Principal La Cantera	spozo Cantera 1	7.092	15/07/2007	Lluvia	480024.00	2217198.00
8	Principal La Cantera	spozo Cantera 2	3.521	15/08/2007	Lluvia	480024.00	2217198.00
9	Principal La Cantera	spozo Cantera 3	4.029	15/09/2007	Lluvia	480024.00	2217198.00
10	pozo Tablon	spozo Tablon 1	2.435	15/07/2007	Lluvia	477598.00	2216639.00
11	pozo Tablon	spozo Tablon 2	4.595	15/08/2007	Lluvia	477598.00	2216639.00
12	pozo Tablon	spozo Tablon 3	3.653	15/09/2007	Lluvia	477598.00	2216639.00
13	noria (Fam.Gonzalez)	noria (Fam.Gonzalez) 1	0.040	15/07/2007	Lluvia	477633.45	2261755.68
14	noria (Fam.Gonzalez)	noria (Fam.Gonzalez) 2	0.040	15/08/2007	Lluvia	477633.45	2261755.68
15	noria (Fam.Gonzalez)	noria (Fam.Gonzalez) 3	0.040	15/09/2007	Lluvia	477633.45	2261755.68
16	canal Salto	canal Salto 1	1528.263	15/07/2007	Lluvia	477598.00	2217806.00
17	canal Salto	canal Salto 2	1584.834	15/08/2007	Lluvia	477598.00	2217806.00
18	canal Salto	canal Salto 3	1647.702	15/09/2007	Lluvia	477598.00	2217806.00
19	Emisor Central	Emisor Central 1	1801.482	15/07/2007	Lluvia	488213.99	2166573.74
20	Emisor Central	Emisor Central 2	1814.614	15/08/2007	Lluvia	488213.99	2166573.74
21	Emisor Central	Emisor Central 3	1846.155	15/09/2007	Lluvia	488213.99	2166573.74
22	pozo San Isidro	spozo San Isidro 1	0.040	15/07/2007	Lluvia	504769.00	2241553.00
23	pozo San Isidro	spozo San Isidro 2	0.040	15/08/2007	Lluvia	504769.00	2241553.00
24	pozo San Isidro	spozo San Isidro 3	0.040	15/09/2007	Lluvia	504769.00	2241553.00
25	pozo CIC14	pozo CIC14 1	1.864	15/07/2007	Lluvia	488218.71	2166254.93
26	pozo CIC15	pozo CIC14 2	1.419	15/08/2007	Lluvia	488218.71	2166254.93
27	pozo CIC16	pozo CIC14 3	2.002	15/09/2007	Lluvia	488218.71	2166254.93
28	pozo Bothi Baji	spozo Bothi Baji 1	0.040	15/07/2007	Lluvia	506272.00	2236917.00
29	pozo Bothi Baji	spozo Bothi Baji 2	0.040	15/08/2007	Lluvia	506272.00	2236917.00
30	pozo Bothi Baji	spozo Bothi Baji 3	0.040	15/09/2007	Lluvia	506272.00	2236917.00
31	pozo CIC126	spozo CIC126 1	6.264	15/07/2007	Lluvia	506204.00	2234253.00
32	pozo CIC127	spozo CIC126 2	3.876	15/08/2007	Lluvia	506204.00	2234253.00
33	pozo CIC128	spozo CIC126 3	1.816	15/09/2007	Lluvia	506204.00	2234253.00
34	noria (pozo Grande)	noria (pozo Grande) 1	0.040	15/07/2007	Lluvia	404444.00	2240626.00
35	noria (pozo Grande)	noria (pozo Grande) 2	0.040	15/08/2007	Lluvia	404444.00	2240626.00
36	noria (pozo Grande)	noria (pozo Grande) 3	0.040	15/09/2007	Lluvia	404444.00	2240626.00
37	manantial el Dren	manantial el Dren 1	1.141	15/07/2007	Lluvia	501784.00	2240500.00
38	manantial el Dren	manantial el Dren 2	1.920	15/08/2007	Lluvia	501784.00	2240500.00
39	manantial el Dren	manantial el Dren 3	0.753	15/09/2007	Lluvia	501784.00	2240500.00
40	canal Requena	canal Requena 1	1037.690	15/07/2007	Lluvia	474134.66	2220216.00
41	canal Requena	canal Requena 2	997.168	15/08/2007	Lluvia	474134.66	2220216.00
42	canal Requena	canal Requena 3	885.324	15/09/2007	Lluvia	474134.66	2220216.00
43	pozo 11	pozo 11 1	0.036	15/07/2007	Lluvia	474746.00	2226493.00
44	pozo 12	pozo 11 2	0.036	15/08/2007	Lluvia	474746.00	2226493.00
45	pozo 13	pozo 11 3	0.036	15/09/2007	Lluvia	474746.00	2226493.00
46	pozo 5 de mayo	pozo 5 de mayo 1	0.036	15/07/2007	Lluvia	476873.00	2225710.00
47	pozo 5 de mayo	pozo 5 de mayo 2	0.036	15/08/2007	Lluvia	476873.00	2225710.00
48	pozo 5 de mayo	pozo 5 de mayo 3	0.036	15/09/2007	Lluvia	476873.00	2225710.00
49	pozo miravalle	pozo miravalle 1	0.036	15/07/2007	Lluvia	476730.00	2226766.00
50	pozo miravalle	pozo miravalle 2	0.036	15/08/2007	Lluvia	476730.00	2226766.00
51	pozo miravalle	pozo miravalle 3	0.036	15/09/2007	Lluvia	476730.00	2226766.00
52	manantial Cerro Colorado	manantial Cerro Colorado 1	2.106	15/07/2007	Lluvia	472626.00	2224623.00
53	manantial Cerro Colorado	manantial Cerro Colorado 2	1.960	15/08/2007	Lluvia	472626.00	2224623.00
54	manantial Cerro Colorado	manantial Cerro Colorado 3	1.413	15/09/2007	Lluvia	472626.00	2224623.00
55	Canal	canal Requena 1	353.435	15/07/2007	Lluvia	477685.34	2279055.16
56	Canal	canal Requena 2	315.759	15/08/2007	Lluvia	477685.34	2279055.16
57	Canal	canal Requena 3	353.537	15/09/2007	Lluvia	477685.34	2279055.16
58	pozo San Primitivo	pozo San Primitivo 1	0.040	15/07/2007	Lluvia	487144.78	2214380.90
59	pozo San Primitivo	pozo San Primitivo 2	0.040	15/08/2007	Lluvia	487144.78	2214380.90
60	pozo San Primitivo	pozo San Primitivo 3	0.040	15/09/2007	Lluvia	487144.78	2214380.90
61	canal Salto	canal Salto 1	80.690	15/07/2007	Lluvia	476800.00	2215721.00
62	canal Salto	canal Salto 2	88.978	15/08/2007	Lluvia	476800.00	2215721.00
63	canal Salto	canal Salto 3	81.413	15/09/2007	Lluvia	476800.00	2215721.00
64	canal Tezquiipa	canal Tezquiipa 1	47.119	15/07/2007	Lluvia	478272.00	2216639.00
65	canal Tezquiipa	canal Tezquiipa 2	50.857	15/08/2007	Lluvia	478272.00	2216639.00
66	canal Tezquiipa	canal Tezquiipa 3	40.963	15/09/2007	Lluvia	478272.00	2216639.00
67	El Arenal	El Arenal 1	0.036	15/07/2007	Lluvia	474746.00	2226493.00
68	El Arenal	El Arenal 2	0.036	15/08/2007	Lluvia	474746.00	2226493.00
69	El Arenal	El Arenal 3	0.036	15/09/2007	Lluvia	474746.00	2226493.00
70	manantial El Pudehe	manantial El Pudehe 1	0.036	15/07/2007	Lluvia	505912.00	2236841.00
71	manantial El Pudehe	manantial El Pudehe 2	0.036	15/08/2007	Lluvia	505912.00	2236841.00
72	manantial El Pudehe	manantial El Pudehe 3	0.036	15/09/2007	Lluvia	505912.00	2236841.00
73	noria Pozo Grande	noria Pozo Grande 1	0.036	15/07/2007	Lluvia	506204.00	2234253.00
74	noria Pozo Grande	noria Pozo Grande 2	0.036	15/08/2007	Lluvia	506204.00	2234253.00
75	noria Pozo Grande	noria Pozo Grande 3	0.036	15/09/2007	Lluvia	506204.00	2234253.00
76	manantial El Dren	manantial El Dren 1	0.036	15/07/2007	Lluvia	486009.76	2269120.49
77	manantial El Dren	manantial El Dren 2	0.036	15/08/2007	Lluvia	486009.76	2269120.49
78	manantial El Dren	manantial El Dren 3	0.036	15/09/2007	Lluvia	486009.76	2269120.49
79	canal Tez	canal Tez 1	410.264	15/07/2007	Lluvia	486891.00	2226427.67
80	canal Tez	canal Tez 2	341.739	15/08/2007	Lluvia	486891.00	2226427.67
81	canal Tez	canal Tez 3	330.534	15/09/2007	Lluvia	486891.00	2226427.67
82	AR columna (R2)	AR columna (R2) 1	994.394	15/07/2007	Lluvia	486009.76	2223467.00
83	AR columna (R2)	AR columna (R2) 2	913.658	15/08/2007	Lluvia	486009.76	2223467.00
84	AR columna (R2)	AR columna (R2) 3	776.091	15/09/2007	Lluvia	486009.76	2223467.00

Tabla 10. Base de datos TCS Lluvia año 2007

Num.	Locacion	Sitio	Triclosan (ng/L)	Fecha	Temporada	X	Y
1	Tezoquipa	pozo Tezoquipa 1	0.036	15/02/2008	Estiaje	478272.00	2217759.00
2	Tezoquipa	pozo Tezoquipa 2	0.036	15/03/2008	Estiaje	478272.00	2217759.00
3	Tezoquipa	pozo Tezoquipa 3	0.036	15/04/2008	Estiaje	478272.00	2217759.00
4	Manantial RN	manantial RN 1	0.036	15/02/2008	Estiaje	546815.23	2234407.17
5	Manantial RN	manantial RN 2	0.036	15/03/2008	Estiaje	546815.23	2234407.17
6	Manantial RN	manantial RN 3	0.036	15/04/2008	Estiaje	546815.23	2234407.17
7	Principal La Cantera	pozo Cantera 1	0.036	15/02/2008	Estiaje	480024.00	2217198.00
8	Principal La Cantera	pozo Cantera 2	0.036	15/03/2008	Estiaje	480024.00	2217198.00
9	Principal La Cantera	pozo Cantera 3	0.036	15/04/2008	Estiaje	480024.00	2217198.00
10	pozo Tablon	pozo Tablon 1	0.036	15/02/2008	Estiaje	477598.00	2216639.00
11	pozo Tablon	pozo Tablon 2	0.036	15/03/2008	Estiaje	477598.00	2216639.00
12	pozo Tablon	pozo Tablon 3	0.036	15/04/2008	Estiaje	477598.00	2216639.00
13	noria (Fam.Gonzalez)	noria (Fam.Gonzalez) 1	0.036	15/02/2008	Estiaje	477633.45	2261755.68
14	noria (Fam.Gonzalez)	noria (Fam.Gonzalez) 2	0.036	15/03/2008	Estiaje	477633.45	2261755.68
15	noria (Fam.Gonzalez)	noria (Fam.Gonzalez) 3	0.036	15/04/2008	Estiaje	477633.45	2261755.68
16	canal Salto	canal Salto 1	853.437	15/02/2008	Estiaje	477598.00	2217806.00
17	canal Salto	canal Salto 2	980.677	15/03/2008	Estiaje	477598.00	2217806.00
18	canal Salto	canal Salto 3	1037.524	15/04/2008	Estiaje	477598.00	2217806.00
19	Emisor Central	Emisor Central 1	320.810	15/02/2008	Estiaje	488213.99	2166573.74
20	Emisor Central	Emisor Central 2	456.377	15/03/2008	Estiaje	488213.99	2166573.74
21	Emisor Central	Emisor Central 3	302.773	15/04/2008	Estiaje	488213.99	2166573.74
22	pozo San Isidro	pozo San Isidro 1	1.321	15/02/2008	Estiaje	504769.00	2241553.00
23	pozo San Isidro	pozo San Isidro 2	1.837	15/03/2008	Estiaje	504769.00	2241553.00
24	pozo San Isidro	pozo San Isidro 3	3.811	15/04/2008	Estiaje	504769.00	2241553.00
25	pozo CIC14	pozo CIC14 1	642.875	15/02/2008	Estiaje	488218.71	2166254.93
26	pozo CIC15	pozo CIC14 2	595.218	15/03/2008	Estiaje	488218.71	2166254.93
27	pozo CIC16	pozo CIC14 3	533.083	15/04/2008	Estiaje	488218.71	2166254.93
28	pozo Bothi Baji	pozo Bothi Baji 1	0.036	15/02/2008	Estiaje	506272.00	2236917.00
29	pozo Bothi Baji	pozo Bothi Baji 2	0.036	15/03/2008	Estiaje	506272.00	2236917.00
30	pozo Bothi Baji	pozo Bothi Baji 3	0.036	15/04/2008	Estiaje	506272.00	2236917.00
31	pozo CIC126	pozo CIC126 1	0.036	15/02/2008	Estiaje	506204.00	2234253.00
32	pozo CIC127	pozo CIC126 2	0.036	15/03/2008	Estiaje	506204.00	2234253.00
33	pozo CIC128	pozo CIC126 3	0.036	15/04/2008	Estiaje	506204.00	2234253.00
34	noria (pozo Grande)	noria (pozo Grande) 1	0.036	15/02/2008	Estiaje	404444.00	2240626.00
35	noria (pozo Grande)	noria (pozo Grande) 2	0.036	15/03/2008	Estiaje	404444.00	2240626.00
36	noria (pozo Grande)	noria (pozo Grande) 3	0.036	15/04/2008	Estiaje	404444.00	2240626.00
37	manantial el Dren	manantial el Dren 1	0.036	15/02/2008	Estiaje	501784.00	2240500.00
38	manantial el Dren	manantial el Dren 2	0.036	15/03/2008	Estiaje	501784.00	2240500.00
39	manantial el Dren	manantial el Dren 3	0.036	15/04/2008	Estiaje	501784.00	2240500.00
40	canal Requena	canal Requena 1	374.222	15/02/2008	Estiaje	474134.66	2220216.00
41	canal Requena	canal Requena 2	483.190	15/03/2008	Estiaje	474134.66	2220216.00
42	canal Requena	canal Requena 3	437.316	15/04/2008	Estiaje	474134.66	2220216.00
43	pozo 11	pozo 11 1	0.036	15/02/2008	Estiaje	474746.00	2226493.00
44	pozo 12	pozo 11 2	0.036	15/03/2008	Estiaje	474746.00	2226493.00
45	pozo 13	pozo 11 3	0.036	15/04/2008	Estiaje	474746.00	2226493.00
46	pozo 5 de mayo	pozo 5 de mayo 1	0.036	15/02/2008	Estiaje	476873.00	2225710.00
47	pozo 5 de mayo	pozo 5 de mayo 2	0.036	15/03/2008	Estiaje	476873.00	2225710.00
48	pozo 5 de mayo	pozo 5 de mayo 3	0.036	15/04/2008	Estiaje	476873.00	2225710.00
49	pozo miravalle	pozo miravalle 1	0.036	15/02/2008	Estiaje	476730.00	2226766.00
50	pozo miravalle	pozo miravalle 2	0.036	15/03/2008	Estiaje	476730.00	2226766.00
51	pozo miravalle	pozo miravalle 3	0.036	15/04/2008	Estiaje	476730.00	2226766.00
52	manantial Cerro Colorado	manantial Cerro Colorado 1	0.036	15/02/2008	Estiaje	472626.00	2224623.00
53	manantial Cerro Colorado	manantial Cerro Colorado 2	0.036	15/03/2008	Estiaje	472626.00	2224623.00
54	manantial Cerro Colorado	manantial Cerro Colorado 3	0.036	15/04/2008	Estiaje	472626.00	2224623.00
55	canal Requena	canal Requena 1	309.183	15/02/2008	Estiaje	477685.34	2279055.16
56	canal Requena	canal Requena 2	338.755	15/03/2008	Estiaje	477685.34	2279055.16
57	canal Requena	canal Requena 3	311.038	15/04/2008	Estiaje	477685.34	2279055.16
58	pozo San Primitivo	pozo San Primitivo 1	1.333	15/02/2008	Estiaje	487144.78	2214380.90
59	pozo San Primitivo	pozo San Primitivo 2	4.682	15/03/2008	Estiaje	487144.78	2214380.90
60	pozo San Primitivo	pozo San Primitivo 3	1.167	15/04/2008	Estiaje	487144.78	2214380.90
61	canal Salto	canal Salto 1	386.100	15/02/2008	Estiaje	476800.00	2215721.00
62	canal Salto	canal Salto 2	343.349	15/03/2008	Estiaje	476800.00	2215721.00
63	canal Salto	canal Salto 3	369.656	15/04/2008	Estiaje	476800.00	2215721.00
64	canal Tezquipa	canal Tezquipa 1	460.301	15/02/2008	Estiaje	478272.00	2216639.00
65	canal Tezquipa	canal Tezquipa 2	380.612	15/03/2008	Estiaje	478272.00	2216639.00
66	canal Tezquipa	canal Tezquipa 3	428.603	15/04/2008	Estiaje	478272.00	2216639.00
67	El Arenal	El Arenal 1	0.036	15/02/2008	Estiaje	474746.00	2226493.00
68	El Arenal	El Arenal 2	0.036	15/03/2008	Estiaje	474746.00	2226493.00
69	El Arenal	El Arenal 3	0.036	15/04/2008	Estiaje	474746.00	2226493.00
70	manantial El Pue dhe	manantial El Pue dhe 1	0.036	15/02/2008	Estiaje	505912.00	2236841.00
71	manantial El Pue dhe	manantial El Pue dhe 2	0.036	15/03/2008	Estiaje	505912.00	2236841.00
72	manantial El Pue dhe	manantial El Pue dhe 3	0.036	15/04/2008	Estiaje	505912.00	2236841.00
73	noria Pozo Grande	noria Pozo Grande 1	0.036	15/02/2008	Estiaje	506204.00	2234253.00
74	noria Pozo Grande	noria Pozo Grande 2	0.036	15/03/2008	Estiaje	506204.00	2234253.00
75	noria Pozo Grande	noria Pozo Grande 3	0.036	15/04/2008	Estiaje	506204.00	2234253.00
76	manantial El Dren	manantial El Dren 1	0.036	15/02/2008	Estiaje	486009.76	2269120.49
77	manantial El Dren	manantial El Dren 2	0.036	15/03/2008	Estiaje	486009.76	2269120.49
78	manantial El Dren	manantial El Dren 3	0.036	15/04/2008	Estiaje	486009.76	2269120.49
79	canal Tez	canal Tez 1	0.036	15/02/2008	Estiaje	486891.00	2226427.67
80	canal Tez	canal Tez 2	0.036	15/03/2008	Estiaje	486891.00	2226427.67
81	canal Tez	canal Tez 3	0.036	15/04/2008	Estiaje	486891.00	2226427.67
82	AR columna (R2)	AR columna (R2) 1	0.036	15/02/2008	Estiaje	486009.76	2223467.00
83	AR columna (R2)	AR columna (R2) 2	0.036	15/03/2008	Estiaje	486009.76	2223467.00
84	AR columna (R2)	AR columna (R2) 3	0.036	15/04/2008	Estiaje	486009.76	2223467.00

Tabla 11. Base de datos TCS Estiaje año 2008

Tabla 12. Claves y Tratamientos

Tabla 12. Claves y Tratamientos	
Tratamiento	CLAVE
Agua sintetica C1 final RECAMBIO 1	PT1R1
Agua sintetica C1 final RECAMBIO 2	PT1R2
Agua sintetica C1 final RECAMBIO 3	PT1R3
Agua sintetica C1 final RECAMBIO 4	PT1R4
Agua sintetica C2 final RECAMBIO 1	PT2R1
Agua sintetica C2 final RECAMBIO 2	PT2R2
Agua sintetica C2 final RECAMBIO 3	PT2R3
Agua sintetica C2 final RECAMBIO 4	PT2R4
Agua sintetica C3 final RECAMBIO 1	PT3R1
Agua sintetica C3 final RECAMBIO 2	PT3R2
Agua sintetica C3 final RECAMBIO 3	PT3R3
Agua sintetica C3 final RECAMBIO 4	PT3R4
Agua de Manantial C1 final RECAMBIO 1	PT5R1
Agua de Manantial C1 final RECAMBIO 2	PT5R2
Agua de Manantial C1 final RECAMBIO 3	PT5R3
Agua de Manantial C1 final RECAMBIO 4	PT5R4
Agua de Manantial C2 final RECAMBIO 1	PT6R1
Agua de Manantial C2 final RECAMBIO 2	PT6R2
Agua de Manantial C2 final RECAMBIO 3	PT6R3
Agua de Manantial C2 final RECAMBIO 4	PT6R4
Agua de Manantial C3 final RECAMBIO 1	PT7R1
Agua de Manantial C3 final RECAMBIO 2	PT7R2
Agua de Manantial C3 final RECAMBIO 3	PT7R3
Agua de Manantial C3 final RECAMBIO 4	PT7R4
Agua Sintetica Sin peces C3 final RECAMBIO 1	PT11R1
Agua Sintetica Sin peces C3 final RECAMBIO 2	PT11R2
Agua Sintetica Sin peces C3 final RECAMBIO 3	PT11R3
Agua Sintetica Sin peces C3 final RECAMBIO 4	PT11R4

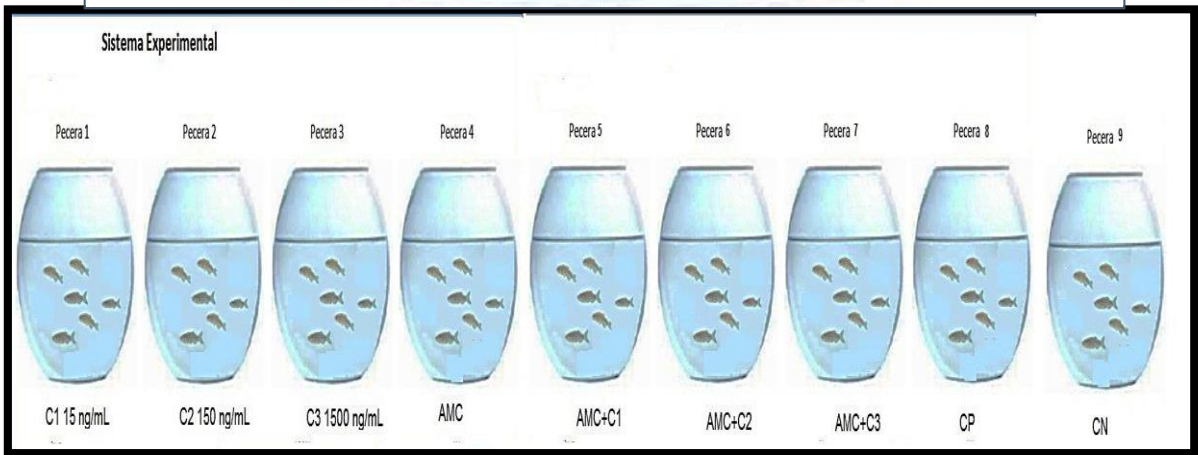


Figura 12. Distribución de peces por tratamiento

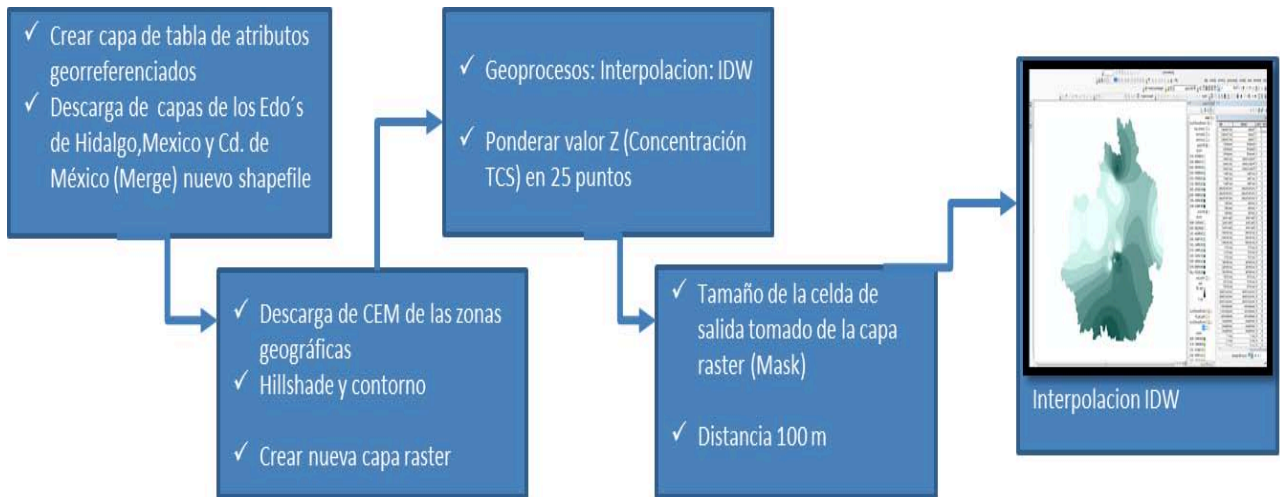


Figura 13. Proceso IDW