



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

**EFFECTO DE LA TETRACICLINA SOBRE LAS VARIABLES DEMOGRÁFICAS DE
TRES ESPECIES DE LA FAMILIA BRACHIONIDAE (ROTIFERA)**

Tesis

Que para obtener el título de

BIÓLOGO

PRESENTA

González Ávila Andrea

Director de tesis

Dr. Singaraju Sri Subrahmanya Sarma

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2020





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.

Índice

1.- Resumen	6
2.- Introducción	7
2.1.- Contaminación por contaminantes emergentes	7
2.2.- Antibióticos	7
2.3.- Tetraciclinas	8
2.4.- Vías de ingreso a cuerpos de agua	9
2.5.- Plantas de tratamiento de aguas residuales	10
2.6.- Daño de antibióticos a organismos no objetivo	11
2.7.- Rotíferos como modelo de estudio	11
3.- Antecedentes	13
4.- Justificación	16
5.- Hipótesis	17
6.- Objetivo general	18
5.1- Objetivos particulares	18
7.- Materiales y métodos	19
7.1.- Aislamiento y cultivo de organismos	19
7.2.- Prueba aguda	20
7.3.- Prueba crónica	21
7.4.- Análisis estadístico	23
8.- Resultados	24
8.1.- Concentración letal media	24
8.2.- Crecimiento poblacional	24
8.3.- Tabla de vida	34
8.4.- Variables de historia de vida	37
9.- Discusión	45
10.- Conclusiones	51
11.- Referencias	52

Dedicatoria:

A mis padres Teresa Ávila Hernández y Andrés González de Aquino, son las personas a las que más les tengo que agradecer por darme vida, por cuidarme siempre y por apoyarme en mi vida personal y mi formación profesional. Es un gran logro para mí el poder llegar hasta aquí hoy después de tanto esfuerzo y complicaciones en el camino. Sin ustedes no sería lo que soy ahora y además yo sé todos los sacrificios que tuvimos que pasar para salir adelante como familia. Los amo. Gracias infinitas a Dios y a la vida por este momento.

Agradecimientos:

A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi alma máter por abrirme las puertas desde el bachillerato a través del Colegio de Ciencias y Humanidades Plantel Naucalpan y Colegio de Ciencias y Humanidades Plantel Sur, donde la calidad de la enseñanza fue excelente y adquirí muchos conocimientos que fueron provechosos para mi formación. Gracias también a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala y a la Carrera de Biología por darme a manos llenas los conocimientos y los recursos para poder ser un profesional con vocación.

Al Dr. Singaraju Sri Subrahmanya por abrirme las puertas del laboratorio confiando en mi buena voluntad por aprender sobre Limnología y Ecología, me ha aportado mucho como profesor y persona. Ha estado siempre para hablar conmigo si hice algo incorrecto e igual ha contribuido de manera mayoritaria a que mi formación se esté completando.

Agradezco a los miembros del comité: Dra. Nandini Sarma, Dr. Pedro Ramírez García, Dr. José Luis Gama Flores y al Dr. Cristian Alberto Espinosa Rodríguez gracias por sus acertadas correcciones y por ayudarme a concluir este proceso. Fueron parte fundamental de mi formación. Gracias infinitas.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca (813216) de ayudante de investigador nivel III (18723). También por el apoyo adicional de PAPIIT-IN214618.

Gracias nuevamente a mis padres por ser el pilar más importante en mi vida, sin ustedes todo esto no sería posible.

A mi familia: mis hermanas Karen y Kenia, mi abuelo q. e. p. d., mi abuelita Alicia, mis tíos Claudia, Eugenia y Miguel Ángel, a dos nuevos integrantes mi cuñado Isaías y mi sobrinita Nelly. Todos han sido parte esencial de mi vida y me han mostrado su apoyo de una u otra forma e incluso mis mascotas han estado conmigo en momentos complicados.

A mis amigos de la carrera: especialmente a Melissa, Sandra y Chucho estuvieron conmigo en gratos y no tan gratos momentos, nos conocemos tan bien después de cuatro años de locuras, días pesados y prácticas de campo pero al fin estamos culminando y ojalá siempre sigan en mi vida los quiero mucho. Pepe, Aida, Víctor y Stan, también fueron muy cercanos a mí y también ocupan un lugar especial.

A mi wera Karina por ser una persona maravillosa y linda conmigo, por ser mi primera amiga en el laboratorio, por mostrar una amistad genuina y dejarme apoyarla en buenos y malos momentos, te quiero muchísimo Kary, también su familia me ha abierto las puertas de su casa, gracias también a ellos.

A mis compañeros de laboratorio: en especial a Brendis, Toño y Mich por su apoyo en el diseño experimental y en las correcciones y observaciones muy acertadas. César, Rosa, Toño nauplii, Tony, Naye, Carlitos, Salma, Denisse, Alejandro, Evelyn, Selene, Cristian, Paulo, Mayra, Meztli, Lety, Sara, Ron, Jose Luis y Noemi por los buenos momentos en el lab y los conocimientos que me transfirieron.

Daniel N. fuiste un gran amigo y te quise mucho, recordare siempre lo mejor de ti gracias por haber estado aunque fuese por un tiempo breve en mi vida.

Estrella Verdejo sigues aquí para mí, ya no tan constante quizás, pero sigues siendo una gran amiga desde la secundaria y también espero que permanezcas en mi vida por mucho más tiempo.

Ismael sigues insistiendo en vernos de vez en cuando, gracias por seguir siendo mi amigo desde el club de tenis donde compartimos gratos momentos, te quiero niño odioso.

Laura, Mayen, Fanny y Melissa (de nuevo), fueron mis compañeros más queridos y cercanos de la preparatoria. Los quiero mucho, no me olviden pronto bobos.

Dany, eres una persona única y maravillosa, gracias por soportarme en nuestra relación y durante la escritura de la tesis, sin ti no sabría que hubiera hecho en esos días sin embargo me calmabas dándome un abrazo y también me insistías para que le echara ganas. Te amo. Quiero estar siempre contigo. Eres mi compañero de vida. Gracias a tu hermosa familia por abrirme las puertas y tratarme como una hija.

Gracias a Dios y a la vida.

Resumen

El aumento de la resistencia a los medicamentos en humanos y animales de granja ha resultado en la aplicación de dosis más altas de antibióticos para tratar enfermedades infecciosas. Entre los antibióticos, las tetraciclinas son ampliamente utilizadas y son los derivados químicos de la naftacenacarboxamida policíclica, con fuertes propiedades antibacterianas. Aunque una parte sustancial de las tetraciclinas se degradan rápidamente en la naturaleza debido a la acción bacteriana, algunos persisten en diferentes formas en los cuerpos de agua y tienen contacto con organismos no objetivo. El zooplancton de agua dulce se compone de copépodos, cladóceros y rotíferos. Los rotíferos son ampliamente utilizados como organismos de prueba en trabajos ecotoxicológicos debido a su relevancia ecológica, fácil cultivo, sensibilidad, tiempo de vida corto y altas tasas de reproducción. Sin embargo, la mayoría de los trabajos ecotoxicológicos en rotíferos están sesgados hacia pesticidas y metales pesados, por ello en el presente estudio se probó el efecto de tres concentraciones subletales de tetraciclina de grado analítico sobre algunas variables demográficas de *Brachionus calyciflorus*, *Brachionus havanaensis* y *Plationus patulus* especies de rotíferos de la familia Brachionidae que habitan en cuerpos de agua dulce comunes en México. Concentraciones nominales 5, 10, 20 mg/L, 7.5, 15, 30 mg/L y 1.25, 2.5, 5 mg/L respectivamente fueron utilizadas con base en la CL₅₀ y la literatura. Se realizó cambio de medio cada 24 h. en todos los experimentos, y los conteos se realizaron cada 24 h. para el crecimiento poblacional y cada 12 h. en tabla de vida. Nuestros resultados mostraron que había una relación entre la concentración de tetraciclina y las variables de historia de vida de rotíferos. Se observa que al incrementar la concentración de tetraciclina en el medio, hubo un decremento en la densidad poblacional de los rotíferos. En tabla de vida la supervivencia y reproducción fueron adversamente afectadas, además de otras variables de historia de vida lo que demuestra la toxicidad del antibiótico.

Introducción

Contaminación del agua por contaminantes emergentes.

Un problema a nivel mundial es la alteración de diversos sistemas de agua marinos y dulceacuícolas por contaminantes emergentes, refiriéndose este término a los compuestos de distinto origen y naturaleza química, cuya presencia no se considera significativa en términos de distribución y/o concentración (Gil et al., 2012). Una de las principales características de los contaminantes emergentes es que no necesitan estar constantemente en el ambiente para causar efectos negativos ya que sus tasas de transformación y remoción se compensan por la introducción continua en el ambiente (Barceló y López, 2007). Los contaminantes emergentes incluyen contaminantes orgánicos, microcomponentes, cianotoxinas, pesticidas, herbicidas, productos de desinfección, disruptores endocrinos, productos farmacéuticos y de cuidado personal así como una gran cantidad de otros compuestos (Tijani, Fatoba y Petrik, 2013). En la actualidad las concentraciones de estas sustancias en el ambiente han incrementado, generando preocupación entre los ecotoxicólogos (Murray et al., 2010). Se espera que el número de estos contaminantes incremente en aguas residuales tratadas y no tratadas debido a la elevada densidad de la población (Tijani et al., 2013).

Antibióticos

El incremento de la población exige un gasto de recursos y el sector salud es uno de ellos. Los antibióticos son uno de los contaminantes emergentes que genera preocupación debido a su amplio uso y alto consumo a nivel mundial (Weng-Jing, Na y Guang-Guo, 2018). Un antibiótico es un agente quimioterapéutico que inhibe o anula el crecimiento de microorganismos como bacterias, hongos o protozoos (Kümmerer, 2009) y estos se agrupan por su estructura química o mecanismo de acción. Kümmerer (2009) señala que son un diverso grupo de químicos que pueden dividirse en subgrupos como beta lactámicos, quinolonas, tetraciclinas, macrólidos, sulfonamidas y otros; además indica que frecuentemente son moléculas que pueden poseer diferentes funciones.

Se estima que el consumo de antibióticos globalmente es de 100,000 a 200, 000 toneladas por año (Marin-Morales et al., 2016). México es el segundo lugar en ventas anuales (14.3%) en farmacias privadas del país y también tiene el segundo mercado farmacéutico más grande (Secretaría de economía, 2013). La proyección realizada en 2013 indica que la producción y consumo incrementaran en 2020. Además, previo a la política de restricción de venta sin receta México era el país latinoamericano con el mayor consumo de antibióticos. Las penicilinas, seguidas por las tetraciclinas y las quinolonas eran los más consumidos (Ortiz-Islas, 2001).

En la mayoría de los países la disposición, prescripción, consumo y desecho son inadecuados lo que conlleva al desecho directo e indirecto en cuerpos de agua o también pueden encontrarse parcialmente metabolizados después de la excreción de humanos y animales (Halling-Sørensen et al., 1998). Dentro de los antibióticos, los más frecuentes y detectados en aguas superficiales y aguas residuales son sulfonamidas, fluoroquinolonas, trimetoprim, clortetraciclina, eritromicina, lincomicina, oxitetraciclina, roxitromicina, tirosina y tetraciclina (Esplugas et al., 2007).

Tetraciclinas

Las tetraciclinas (Figura 1) son agentes de amplio espectro que exhiben actividad contra una amplia gama de bacterias gram-positivas y gram-negativas, organismos atípicos como clamidias, micoplasmas, rickettsias y parásitos protozoarios (Rodríguez et al., 1998). Las propiedades antimicrobianas favorables de estos agentes y la ausencia de efectos secundarios adversos importantes han llevado a su uso extensivo en la terapia de infecciones humanas y animales (Chopra y Roberts, 2001). Constituyen una familia de productos naturales y semisintéticos derivados de diferentes especies de *Streptomyces* spp. Actúan inhibiendo la síntesis de proteínas mediante la unión a la subunidad ribosomal 30S de las bacterias (Vicente y Pérez-Trallero, 2010). Entre las vías de administración la vía oral es la más usual con una absorción del 75% y disminuye si tiene interacción con alimentos, además en los pacientes que cuentan con insuficiencia renal la vida media de la tetraciclina es substancialmente prolongada ya que la vía primaria de eliminación es la renal (Smilack, 1999).

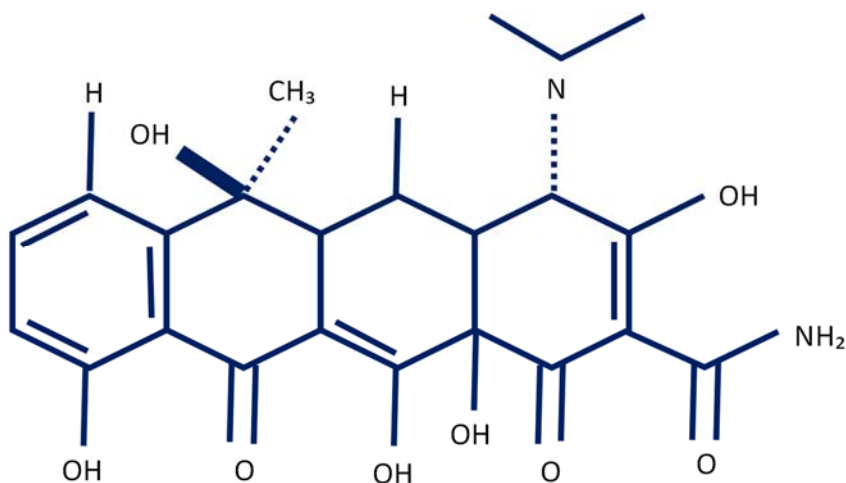


Figura 1.- Estructura química de la tetraciclina

Vías de ingreso a cuerpos de agua

Los residuos de hospitales, acuacultura, ganadería, aguas residuales domésticas y excreción de humanos o animales son las vías en las que los antibióticos ingresan a los cuerpos de agua, aguas subterráneas y que a largo plazo se encontrarán en agua potable como lo muestra la Figura 2. Muy poco se conoce acerca de la ocurrencia, destino y riesgos asociados con la entrada de antibióticos en el ambiente después de ser usados en medicina humana y veterinaria y como promotores de crecimiento en ganado (Kümmerer, 2003). Los niveles de concentración varían en los cuerpos de agua, Bolong y colaboradores (2009) indican que depende del consumo de medicamentos en cada país y/o región, patrones de uso, índices poblacionales e índices potenciales de las plantas de tratamiento. Aunado a la introducción continua de estos compuestos a los cuerpos de agua otro factor a considerar es su complejidad estructural. Rosal y colaboradores (2010) señalan que dicha complejidad es atribuida a sus propiedades físicas y químicas las cuales han contribuido a su distribución prevalente en el ambiente. En el ambiente, los fármacos pueden encontrarse en sus presentaciones farmacéuticas originales, metabolizados o parcialmente metabolizados (Houeto y colaboradores, 2012) Estos contaminantes generalmente se encuentran en plantas de tratamiento de aguas residuales, sin embargo también se han encontrado en agua superficiales, subterránea, potable e incluso hay presencia de cientos de productos igual de dañinos en el agua de mar (Tijani et al., 2013).

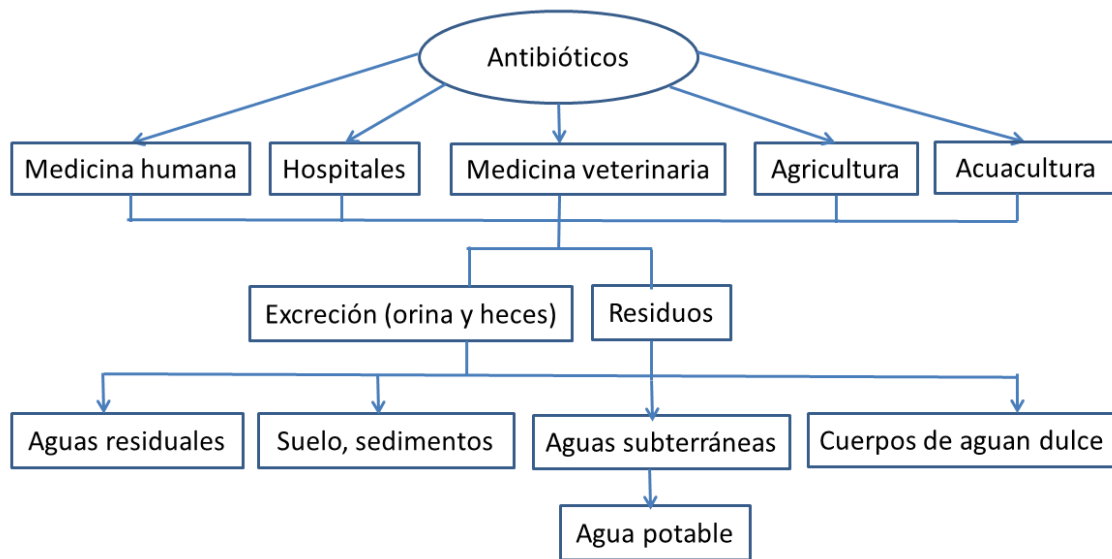


Figura 2. Rutas en las que los antibióticos ingresan a los cuerpos de agua, modificado (Kümmerer, 2003).

Plantas de tratamiento de aguas residuales

Las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR), tienen como objetivo eliminar la mayor cantidad posible de contaminantes antes de su vertido, buscando que los niveles de contaminación que queden en los efluentes tratados cumplan los límites legales existentes y puedan ser asimilados de forma natural por los cauces receptores, todo esto a través de un conjunto de operaciones físicas, biológicas y químicas (CENTA, 2014). Sin embargo, actualmente no hay un adecuado y eficiente servicio de tratamiento de aguas capaz de eliminar y degradar efectivamente los tóxicos y compuestos recalcitrantes de sustancias inofensivas como los antibióticos (Gulkowska et al., 2008). Teijon y colaboradores en 2010 señalan que las plantas de tratamiento de aguas residuales emplean métodos convencionales que no son eficientes, porque se ha encontrado que varios compuestos persisten sin ninguna alteración, aun después de haber sido sometidos a un tratamiento terciario. La introducción de agentes extraños a los cuerpos de agua conlleva a problemas de salud pública y ambiental afectando a los organismos que habitan ahí, pues la contaminación induce cambios en la función biológica de los sistemas acuáticos, en la estructura de las comunidades, y al propio organismo, afectando su ciclo de vida, crecimiento y su condición reproductiva (Batram y Ballance, 1996).

Daño de antibióticos a organismos no objetivo

Debido a que las plantas de tratamiento de aguas residuales no son del todo efectivas, estas sustancias tendrán contacto directo con organismos que no son su objetivo, aquí se incluyen vertebrados acuáticos como peces, anfibios, reptiles, plantas, macroalgas y microalgas, así como invertebrados del zooplancton como cladóceros, copépodos y rotíferos afectando así toda una red trófica. Por lo tanto, los antibióticos pueden tener un riesgo potencial sobre la supervivencia y la historia de vida de los organismos. Los efectos a corto y largo plazo no se han estudiado ampliamente entre los diferentes grupos. Se han realizado algunos estudios contemplando diferentes clases de antibióticos de uso veterinario como tetraciclina, sulfonamida, estreptomicina, tirmetorpim, bacitracina, macrólidos entre otros y de estos la mayoría se enfocan en ensayos de toxicidad aguda como la Concentración Letal Media (CL₅₀) o la Concentración Efectiva Media (CE₅₀) donde solo se observan efectos adversos en un tiempo reducido (Repetto y Sanz, 1995). Pocos estudios contemplan ensayos de toxicidad crónica como crecimientos poblacionales o tablas de vida donde se pueden observar los efectos en los organismos durante y después de la exposición de alguna sustancia durante el ciclo de vida de los organismos.

Rotíferos como modelo de estudio

Algunos organismos pueden proporcionar información de cambios físicos y químicos en el agua, ya que a lo largo del tiempo revelan modificaciones en la composición de la comunidad (Laws, 1981). Los rotíferos son sensibles en campo y en los bioensayos, son un grupo de invertebrados de tamaño pequeño que van desde los 25 µm a los 2.5 mm de largo aproximadamente. Son acuáticos y semiacuáticos y comprenden alrededor de 120 géneros y 2100 especies (Sarma y Nandini, 2017). Son organismos insegmentados, pseudocelomados y poseen simetría bilateral, además su morfología es fácilmente reconocible en tres regiones: corona, tronco y pie (Segers, 2002).

Entre los brachionidos las especies *Brachionus calyciflorus* y *Brachionus plicatilis* están aprobadas como organismos de pruebas toxicológicas por la Asociación Americana de Ensayos Materiales (ASTM, 2012) de acuerdo a los estándares internacionales mundiales. En cambio, la Asociación Estadounidense de Salud Pública (APHA, 1999)

incluye además a *Brachionus rubens* y *Plationus patulus* como especies recomendadas para este tipo de pruebas. Los rotíferos son utilizados en toxicología ya que tienen amplia distribución y diversidad, altas tasas de eficiencia de consumo y asimilación, tasa metabólica rápida, capacidad de crecer en aguas residuales, altas tasas de reproducción gracias a su reproducción partenogenética, ciclo de vida breve (Figura 3) y bajos costos en cultivo Sarma (2000). En la subclase monogononta el ciclo de vida es haplodiploide con partenogénesis como fase dominante en la que hembras amícticas producen huevos diploides por meiosis (King y Snell, 2016). La relación huevo-hembra propuesta por Edmonson (1965), indica el número de huevos por hembra lo cual permite medir las tasas de crecimiento de la población y ayuda a predecir las fluctuaciones en las poblaciones (Jiménez-Contreras et al., 2018) aunado a esto la dinámica poblacional de los rotíferos está bien caracterizada y es útil para investigar los principios ecológicos y demográficos (Rico-Martinez y colaboradores, 2016).

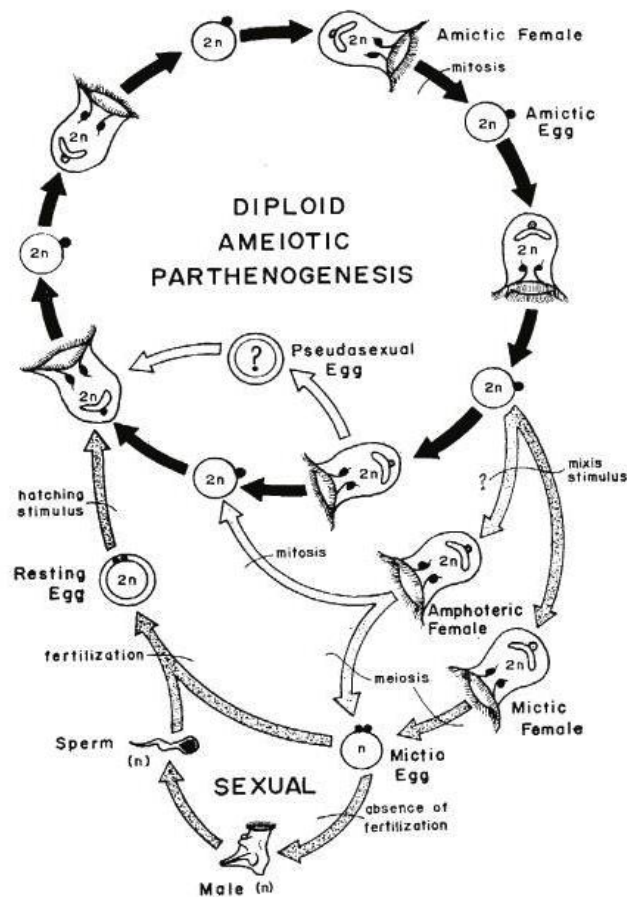


Figura 3.- Ciclo de vida generalizado de rotíferos monogonontos. Tomado de King y Snell (1977).

Antecedentes

Pruebas agudas

Holten y colaboradores (1998) utilizaron siete agentes antibacteriales sobre tres especies de algas. La toxicidad CE₅₀ con oxitetraciclina hidrociorada fue de 0.207 mg/L para *Microcystis aeruginosa* la cual mostro mayor sensibilidad, 1.6 mg/L para *Selenastrum capricornutum* y 4.5 mg /L con *Rhodomonas salina*.

Halling-Sørensen, (2000) evaluó el efecto de ocho agentes antibacteriales, entre ellos la tetraciclina y la clortetraciclina sobre *Microcystis aeruginosa* y *Selenastrum capricornutum*, la toxicidad (valores de CE₅₀, mg/L) fue de 0.09 en tetraciclina y 0.05 en clortetraciclina para *M. aeruginosa* y de 2.2 en tetraciclina y 3.41 en clortetraciclina para la especie de *S. capricornutum*. El autor menciona que *M. aeruginosa*, fue dos veces más sensible que *S. capricornutum* en relación a la supervivencia.

Isidori y colaboradores (2005) utilizaron seis antibióticos sobre *Vibrio fischeri*, *Brachionus calyciflorus*, *Thamnocephalus platyurus*, *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia dubia* y *Danio rerio*. Uno de los antibióticos, la oxitetraciclina mostro valores de CL₅₀ de 34.21 mg/L para *B. calyciflorus*, 22.64 mg/L para *D. magna* y 18.65 mg/L para *C. dubia*.

Pelaez (2015) probo el efecto de la tetraciclina sobre las especies *Lemna minor* y *Daphnia pulex* en pruebas agudas con 25 mg/L y 50 mg/L respectivamente. Indicaron que en *Lemna minor* la supervivencia se redujo respecto al control y además algunas frondas estaban descoloridas y/o amarillas. Respecto a *Daphnia pulex* esta especie no tuvo ningún sobreviviente en el tratamiento.

Havelkova y colaboradores (2016) utilizaron tres antibióticos: penicilina G, vancomicina y tetraciclina sobre el productor (*Pseudokirchneriella subcapitata*), el consumidor (*Daphnia magna*) y el descomponedor (*Vibrio fischeri*). Además del colémbolo *Folsomia candida* y la lombriz de tierra *Eisenia fétida*. Señalan que la mayor toxicidad fue por tetraciclina en el alga con CE₅₀ de 1.82 mg/L y la pulga de agua con CE₅₀ de 8.16 mg/L.

Hui-zhu y colaboradores (2008), estudiaron los efectos tóxicos de la tetraciclina y clortetraciclina sobre algunos organismos acuáticos (*Daphnia magna*, *Danio rerio* y *Carassius auratus*). Las pruebas agudas de CL₅₀, mg/L para *D. rerio*, *C. auratus* y *D.*

magna con tetraciclina fueron de 322.8, 406.0 y 617.2 respectivamente. Con clortetraciclina fue de 137.59 (EC₅₀), 61.15 y 34.68 (en ambos CL₅₀). Tetraciclina tuvo una toxicidad baja para estos organismos, pero la clortetraciclina tuvo una toxicidad intermedia para *D. rerio* and *C. auratus*.

Freitas y colaboradores (2018) usaron cloranfenicol y oxitetraciclina para evaluar los efectos a corto y largo plazo sobre *Ceriodaphnia silvestrii*. La CE₅₀ a 48 h fue de 26.19 y 17.08 mg/L respectivamente y la CE₅₀ a 7 días tuvo valores de 0.27 y 0.30 mg/L y mencionan que hubo efectos adversos sobre la movilidad, la reproducción y la tasa de crecimiento del cladóceros.

Pruebas crónicas

Pomati y colaboradores (2004) utilizaron antibióticos de uso común como eritromicina, ibuprofeno y tetraciclina sobre *Synechocystis* sp. y *Lemna minor*. Las concentraciones utilizadas fueron 1, 10, 100 y 1000 µg/L para los tres antibióticos. La eritromicina redujo el crecimiento de *Synechocystis* sp. en 15% en la concentración más baja y hasta 70 % en la más elevada. En *L. minor* se redujo solo en la más elevada en 20%. El ibuprofeno estimuló el crecimiento de la cianobacteria en los primeros cinco días, mientras que en la lenteja de agua se redujo el crecimiento en la concentración más elevada en un 25%. La tetraciclina inhibió el crecimiento de *Synechocystis* sp. en un 20 y 22% en las concentraciones de 10 y 100 µg/L, mientras que en *L. minor* solo la concentración de 1000 µg/L redujo el crecimiento. También determinaron que la exposición a los tres fármacos produjo la hormona del estrés, el ácido abscísico (ABA), en *L. minor*, donde la eritromicina y la tetraciclina fueron más efectivas para promover la síntesis de ABA.

Wollenberger y colaboradores (2000) evaluaron el efecto de nueve antibióticos de uso veterinario sobre *Daphnia magna*; entre ellos tetraciclina y oxitetraciclina. La toxicidad aguda mostró valores CE₁₀ en 48 h de 340 mg/L para tetraciclina en la cual no se observó un efecto significativo en la supervivencia y en oxitetraciclina la CE₁₀ fue de 100 mg/L y si observó un efecto significativo. Para la toxicidad crónica la concentración mínima utilizada fue de 7.8 mg/L de ambos antibióticos donde se observan efectos en la fecundidad pues esta se reduce al igual que la supervivencia y donde se observa que la pendiente incrementó en relación a la concentración del fármaco.

Araujo y McNair (2007) evaluaron el efecto del hidrocloreuro de tetraciclina, sulfato de estreptomina y tartrato de tilosina (cuatro concentraciones en un rango de 5.6-2000 mg L⁻¹) individualmente y a nivel poblacional sobre *Brachionus calyciflorus* y *Brachionus plicatilis*. Los resultados mostraron que *B. calyciflorus* mostró mayor sensibilidad al ser expuesto a los fármacos. En ambas especies, la reproducción se redujo al incrementar la concentración de hidrocloreuro de tetraciclina y la supervivencia se vio adversamente afectada en las dos concentraciones más elevadas, 360 mg/L y 2000 mg/L. La concentración más baja observada (LOEC) que tuvo un efecto significativo en *B. calyciflorus* fue de 5.6 mg/L.

Kim y colaboradores (2012) probaron diferentes concentraciones de tetraciclina (0, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5 y 10 mg/L) sobre *Daphnia magna* a través de generaciones, las concentraciones menores a 10, no tuvieron diferencias significativas en la reproducción en comparación con el control en todas las generaciones. El efecto de la tetraciclina aumentó en las generaciones posteriores a F0.

El efecto del paracetamol y diclofenaco fue evaluado por González-Pérez (2012) en el crecimiento poblacional de *Platonus patulus*. Concluye que ambos antibióticos son adversos en la supervivencia y reproducción de ambos rotíferos a concentraciones superiores a 16 mg/L en paracetamol y a 32 mg/L con diclofenaco.

Justificación

El consumo de antibióticos incrementa cada año y el uso de estos fármacos es amplio en medicina humana y veterinaria. El interés por parte del área médica sobre los efectos en los organismos solo radica en humanos y mamíferos vertebrados que les proporcionen información sobre la relación dosis-respuesta. La tasa de degradación de tetraciclina es relativamente alta (9–12 h), sin embargo, su ingreso en los cuerpos de agua es constante y no siempre se completa la degradación persistiendo así en el ambiente en la forma original o transformada. Los efectos de estos sobre organismos no objetivo son desconocidos y no se sabe que repercusión pueda tener a corto y largo plazo. Los rotíferos se utilizan como modelo de estudio en ecotoxicología por su amplia distribución, fácil cultivo en laboratorio, altas tasas de reproducción al igual que altas densidades que brinden mayor significancia estadísticamente. Actualmente solo la especie *Brachionus calyciflorus* y *Brachionus plicatilis* están aprobadas como organismos de pruebas toxicológicas por la Asociación Americana de Ensayos Materiales (ASTM) de acuerdo a los estándares internacionales mundiales por tal motivo el utilizar especies nativas de la familia Brachionidae brindará una mejor percepción sobre el efecto que tendrá el antibiótico en los organismos zooplanctónicos de los cuerpos de agua mexicanos. El impacto de un tóxico se suele valorar mediante dinámicas poblacionales de crecimiento o con tablas de historia de vida. Con las primeras se tiene estimación de la densidad máxima y el tiempo que tarda en alcanzarla. Con la tabla se completan aspectos tales como promedio de vida, esperanza de vida, tasa de reproducción bruta, tasa de reproducción neta, tiempo generacional y tasa intrínseca de incremento poblacional dando una descripción más completa de las respuestas de una cohorte al tóxico. Los antibióticos son sustancias xenobióticas que se hallan comúnmente en los cuerpos de agua, por ello es importante evaluar sus efectos sobre organismos sensibles como los rotíferos.

Hipótesis

La tetraciclina, al ser inhibidor de la síntesis de proteínas en microorganismos, también puede afectar negativamente a otros organismos más pequeños, como los rotíferos en el crecimiento de la población y la demografía, de una manera dependiente de la concentración.

Objetivo general

- Analizar el efecto del antibiótico tetraciclina sobre variables demográficas de *Brachionus havanaensis*, *Brachionus calyciflorus* y *Plationus patulus*.

Objetivos particulares

- Determinar la concentración letal media para cada especie expuesta a tetraciclina.
- Comparar las curvas de crecimiento poblacional así como las gráficas de supervivencia y fecundidad de los rotíferos expuestos a diferentes concentraciones de tetraciclina.
- Evaluar la tasa de incremento poblacional, día de abundancia máxima, densidad poblacional máxima y relación hembra huevo de los rotíferos expuestos al antibiótico.
- Evaluar el efecto de la tetraciclina sobre los parámetros de promedio de vida, esperanza de vida, tasa de reproducción bruta, tasa de reproducción neta, tiempo generacional, y tasa de incremento poblacional de las especies expuestas las concentraciones de tetraciclina.

Materiales y métodos

Aislamiento y cultivo de organismos

Las cepas de los rotíferos de la familia Brachionidae: *Brachionus havanaensis* Rousselet, 1911, *Brachionus calyciflorus* Pallas, 1766 y *Platyonus patulus* Müller (1786) (Figura 4), fueron aislados del canal Cuemanco que se localiza en las inmediaciones del Lago de Xochimilco con una malla de 50 µm y se recolectó en recipientes de plástico de 300 ml. Se trasladaron al laboratorio de Zoología Acuática de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Previo al experimento, se mantuvieron en condiciones de laboratorio y se realizó un cultivo monoclonal a partir de una hembra partenogénica y se mantuvieron en agua moderadamente dura (medio EPA), preparada con 60 mg de CaSO₄, 60 mg de MgSO₄, 96 mg de NaHCO₃ y 4 mg de KCl por litro. El alga de experimentación *Chlorella vulgaris* cepa CL V-3, CICESE, Ensenada, México (Figura 5) se cultivó en medio basal Bold en contenedores de 2 L agregando cada tres días 0.5 g de bicarbonato de sodio como fuente adicional de carbono con luz y aireación constante. Cuando llegó a una densidad elevada se cosechó, fue sedimentada y decantada para posteriormente ser resuspendida en agua destilada. Finalmente se cuantificó en la cámara de Neubauer y se administró a los organismos en densidades de 0.5x10⁶ céls./mL. Los rotíferos permanecieron en periodos de luz/obscuridad y temperatura ambiente 20 ± 2°C y el cambio de medio se realizó cada tres días.



Figura 4.- Organismos utilizados en las pruebas agudas y crónicas. *Brachionus calyciflorus* (izquierda), *Brachionus havanaensis* (centro) y *Platyonus patulus* (derecha).

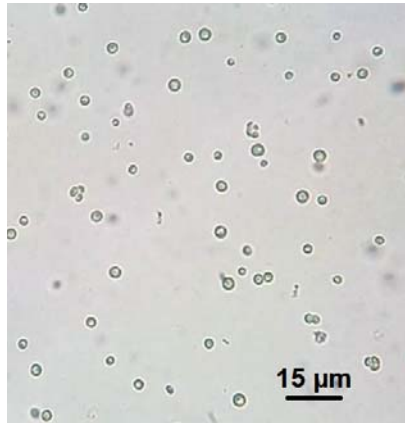


Figura 5.- Alga utilizada en la experimentación. *Chlorella vulgaris*. La concentración de alga utilizada en todos los tratamientos y el control fue de 0.5×10^6 células por mililitro.



Figura 6.- Antibiótico de amplio espectro tetraciclina.

Prueba aguda

El antibiótico tetraciclina (Figura 6) se obtuvo a través de Sigma Aldrich (25 gr) con una pureza de $\geq 98\%$. Posteriormente, se realizó una solución stock de 200 mg/L y se realizaron las diluciones correspondientes a partir de la solución stock para obtener las concentraciones a utilizar en la prueba aguda de concentración letal media (CL_{50}): 25, 50, 75 y 100 mg/L para *B. calyciflorus*, 100, 125, 150, 175 y 200 mg/L para *B. havanaensis* y 12.5, 25, 50, 75 y 100 mg/L para *P. patulus*. La prueba aguda tuvo una

duración de 24 h donde se añadieron 20 ml de las concentraciones seleccionadas y para control medio EPA sin alimento, se añadieron 20 neonatos, al final del lapso se procedió con los conteos, se realizaron los cálculos para obtener en análisis probit y con base en el valor se seleccionó la concentración donde murió el 50% de los organismos.

Prueba crónica

De acuerdo con lo obtenido en la CL₅₀ de la prueba aguda, se seleccionaron las concentraciones nominales que fueron utilizadas en las pruebas crónicas, que incluyeron crecimiento poblacional y tabla de vida. Para todos los tratamientos incluyendo el control se realizaron cuatro réplicas. Se utilizaron contenedores de 50 mL de capacidad con un volumen total de 20 mL que contenían medio EPA y las concentraciones seleccionadas de tetraciclina (5, 10 y 20 mg/L para *B. calyciflorus*, 7.5, 15 y 30 mg/L para *B. havanaensis* y 1.25, 2.5 y 5 mg/L para *P. patulus*, la densidad inicial fue de 1 ind/mL (20 neonatos) adicionando 0.5x10⁶ céls./mL de *C. vulgaris* Los conteos y cambio de medio se realizaron diariamente durante un periodo de 24 días para crecimiento poblacional. La tasa de incremento poblacional (r) se obtuvo utilizando la ecuación exponencial de Krebs (1985):

$$r = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{t}$$

Dónde:

N₀= densidad de la población inicial

N_t= densidad de la población después del tiempo

t= tiempo en días

Respecto a tabla de vida se realizaron conteos cada doce horas, cambio de medio diario y la duración fue hasta que el último individuo de la cohorte murió. Se calcularon los siguientes parámetros de tabla de vida con la ecuación de Krebs (1985).

Supervivencia:

$$l_x = \frac{nx}{N^\circ \text{ inicial de individuos}}$$

Fecundidad:

$$m_x = \frac{N^\circ \text{ de individuos producidos}}{nx}$$

Promedio de vida:

$$\sum_0^{\infty} l_x$$

Esperanza de vida:

$$e_0 = \frac{T_x}{n_x}, \quad T_x = \sum_0^{\infty} L_x, \quad L_x = \frac{n_x + n_{x+1}}{2}$$

Tasa de reproducción bruta:

$$\sum_0^{\infty} m_x$$

Tasa de reproducción neta:

$$R_0 = \sum_0^{\infty} l_x m_x$$

Tiempo generacional:

$$T = \frac{\sum l_x m_x * x}{R_0}$$

Tasa de incremento poblacional (r):

$$\sum_{x=0}^{\infty} e^{-rx} l_x m_x = 1$$

Donde l_x es la probabilidad de que un individuo sobreviva a una clase de edad dada, m_x es la fecundidad específica de edad y R_0 es el número de descendencia promedio por hembra.

En ambos experimentos las condiciones experimentales contemplaron temperatura $20 \pm 2^\circ\text{C}$, $\text{pH} \sim 7.5$, luz continua y difusa.

Análisis estadístico

La concentración letal cincuenta se obtuvo a partir del modelo Probit. Se obtuvo el valor en el que murió el cincuenta por ciento de los organismos, además del límite inferior y límite superior. Se graficó modificando los valores de las concentraciones en logaritmo base 10 y se realizó una regresión lineal para obtener la significancia estadística y la ecuación de la curva.

El análisis estadístico para crecimiento poblacional se realizó colocando los datos en bruto en una matriz, obteniendo el promedio, desviación y error estándar, al obtenerlos se graficó el crecimiento en función del tiempo, además se obtuvo la tasa de crecimiento poblacional, día de abundancia máxima y densidad máxima a los cuales se les aplicó un análisis de varianza (ANDEVA) de una vía para observar las diferencias significativas entre tratamientos. Se obtuvo la relación huevo-hembra y se graficó contrastándola con la densidad poblacional y para obtener la significancia estadística se realizó una regresión lineal para obtener la ecuación de la curva.

En relación a la tabla de vida, de los datos en bruto se obtuvo el promedio, desviación y error estándar y se graficó la supervivencia y fecundidad en función al tiempo en el programa Sigma Plot. Se colocaron los datos de las variables en una matriz para obtener los datos de promedio de vida, esperanza de vida, tasa de reproducción bruta, tasa de reproducción neta, tiempo generacional, y tasa de incremento poblacional de acuerdo a las fórmulas antes mencionadas. Además, se obtuvo la relación entre promedio de vida y tiempo generacional a la cual se le aplicó un análisis de regresión lineal y así observar la significancia estadística. Un análisis de varianza (ANDEVA) de una vía se efectuó para observar las diferencias significativas en cada una de las variables demográficas.

Resultados

Concentración letal media

La concentración letal media de las tres especies se muestra en la Figura 7. Se observa el valor de la LC_{50} , límite inferior y superior. Los valores obtenidos difieren entre sí, y el valor más alto lo presentó *B. havanaensis* con 147.96 mg/L, seguido de *B. calyciflorus* con 77.07 mg/L y *P. patulus* con 30.01 mg/L. Con esto se puede inferir que *P. patulus* es más sensible al fármaco.

Crecimiento poblacional

El crecimiento poblacional de las tres especies de brachionidos incrementó a lo largo del tiempo, sin embargo, la cantidad de individuos por mililitro se ve afectada en los tratamientos en los que se utilizó el antibiótico por lo cual se observó un crecimiento deficiente dentro de los primeros días (Fig. 8). Independientemente del aumento en la concentración del tóxico tuvo un efecto adverso en el crecimiento del rotífero. En general, la concentración del antibiótico superior a 5 mg/L para *B. calyciflorus*, 15 mg/L para *B. havanaensis* y 2.5 mg/L para *P. patulus* resultó en un menor crecimiento de la población en comparación con los controles. Los patrones de crecimiento de la población de las especies de rotíferos probados mostraron una curva sigmoidea típica donde la población tuvo una fase de retraso inicial, seguida de una fase exponencial rápida y finalmente un estado de retraso donde los individuos se mantuvieron en una densidad particular o comenzaron a disminuir en abundancia.

El efecto del fármaco sobre los rotíferos tratados es evidente desde la menor concentración por ejemplo en *B. calyciflorus* en la concentración más baja se reduce la densidad final hasta en un 82%. En la especie *B. havanaensis* en un 31% y finalmente en *P. patulus* decreció un 27% denotando con ello que las concentraciones menores tienen un efecto negativo adverso.

Dos de tres características del crecimiento de la población tuvieron un efecto significativo dependiendo de la concentración del antibiótico. Estos fueron: la abundancia de población máxima (Fig. 9) y la tasa de aumento de la población (Fig. 10). El día de máxima densidad de población para las tres especies de rotíferos

analizados no difirió significativamente ($p>0.05$, ANDEVA) (Fig. 11) cuando estuvo expuesto a las diferentes concentraciones de tetraciclina.

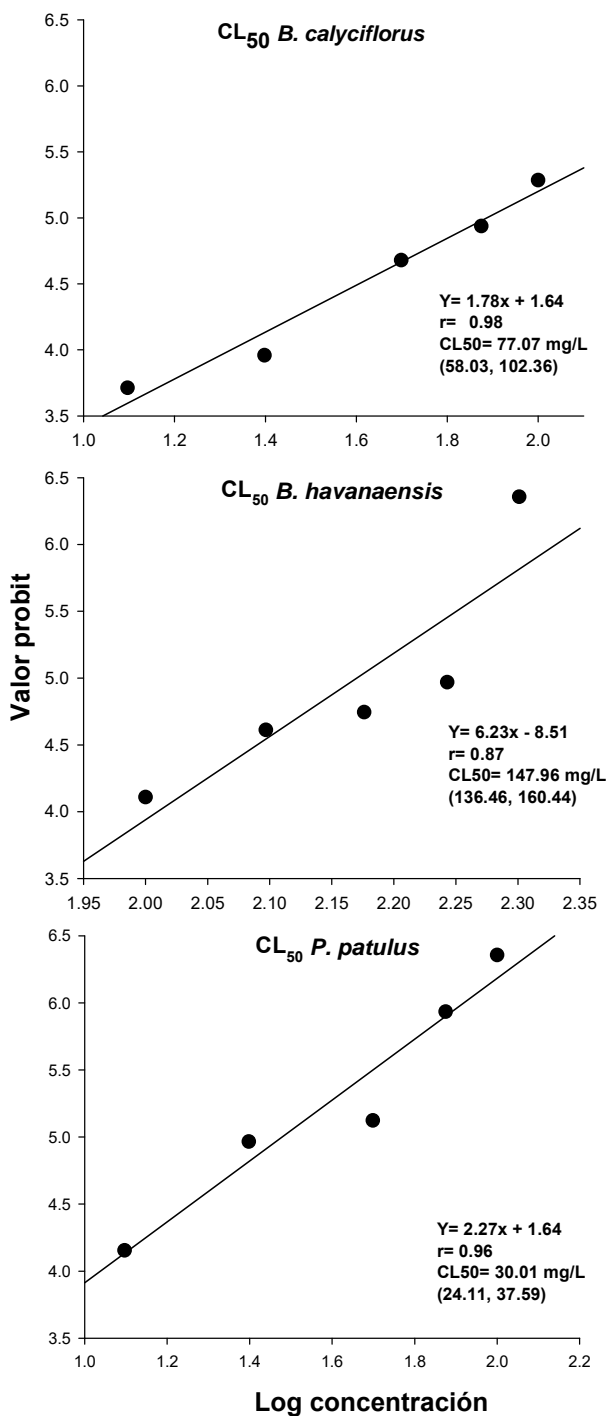


Figura 7.-Concentración letal media. Se observa la tendencia y el valor CL50 con límite inferior y superior.

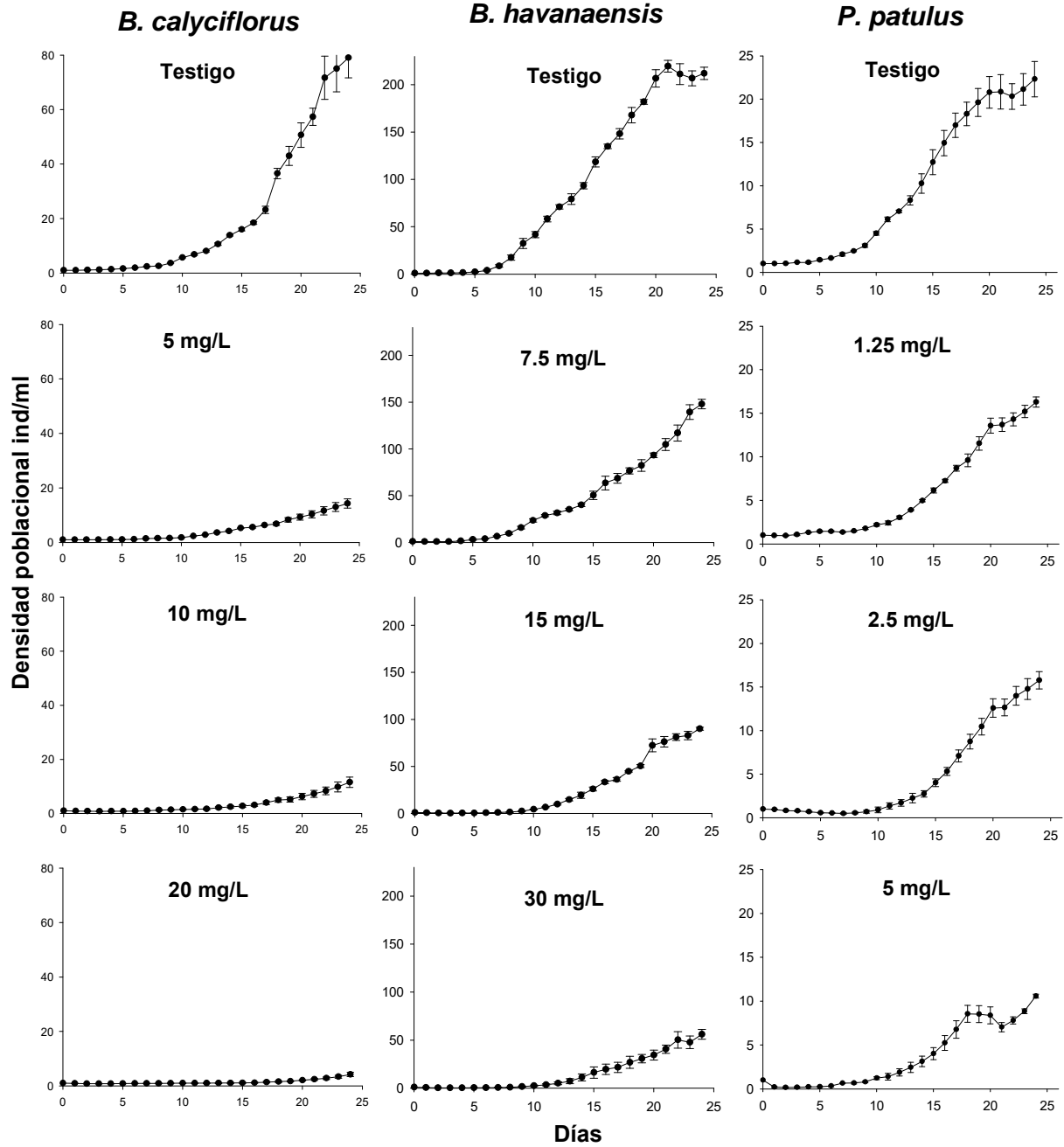


Figura 8.- Crecimiento poblacional de los rotíferos *B. calyciflorus*, *B. havanaensis* y *P. patulus* expuesto al antibiótico de uso común tetraciclina. Los valores indican el promedio \pm el error promedio de tres repeticiones.

La evaluación estadística incluyó comparaciones múltiples entre los tratamientos con diferentes concentraciones del antibiótico y los controles para cada una de las tres especies de rotíferos el cual mostró tendencias variables, dependiendo la especie y la variable considerada. Para la variable de la densidad máxima de *B. calyciflorus* el control fue significativamente mayor que los tratamientos con antibiótico, sin embargo, dentro de los tratamientos de antibióticos no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$, ANDEVA). Por otro lado, para *B. havanaensis* y *P. patulus* las diferencias dentro los tratamientos y con el control fueron significativas.

Con respecto a la tasa de incremento poblacional hubo diferencias significativas entre el control y los tratamientos en las tres especies ($p < 0.05$, ANDEVA), sin embargo, para *B. calyciflorus* y *B. havanaensis* las dos primeras concentraciones probadas no tuvieron diferencias significativas entre sí. En comparación *P. patulus* no tuvo diferencias significativas en la concentración de 2.5 mg/L con la concentración de 1.25 y 5mg/L, pero todas fueron diferentes significativamente comparado con el control.

La relación entre huevos y hembras de *B. calyciflorus* en el control y en los tratamientos con el antibiótico se muestra en la Figura 12 en donde se puede observar que en el control esta relación fue negativa y significativa ($p < 0.05$, ANDEVA), en la concentración del antibiótico (5 mg/L) fue negativa y no significativa, sin embargo, cuando aumenta la concentración esta relación fue positiva y significativa.

Cuando los datos sobre la relación diaria de huevos (huevos/hembra) de *B. havanaensis* se presentaron en función de la densidad de población, hubo una relación inversa entre estas dos variables (Fig. 13). Sin embargo, la relación fue significativa ($p < 0.05$, ANDEVA) para el control y dos tratamientos con antibiótico (7.5 y 15 mg/L). Para la más alta concentración de tetraciclina (30 mg/L), la relación no fue significativa.

La relación entre huevos/ hembras con la densidad poblacional de *P. patulus* fue negativa y significativa ($p < 0.05$, ANDEVA) en el control y los tratamientos de tetraciclina (1.25, 2.5 y 5 mg/L) (Fig. 14).

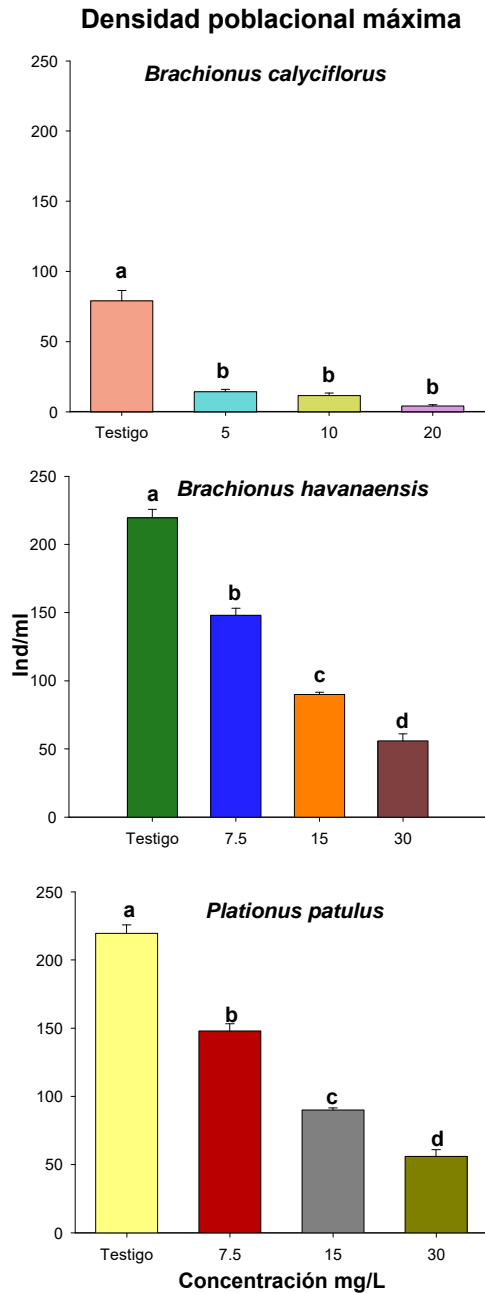


Figura 9.- Densidad poblacional máxima de los rotíferos *Brachionus calyciflorus*, *Brachionus havanaensis* y *Plationus patulus* expuestos a diferentes concentraciones tetraciclina. Los valores muestran el promedio de tres repeticiones y las letras las diferencias entre los tratamientos a través del análisis post hoc de Tukey.

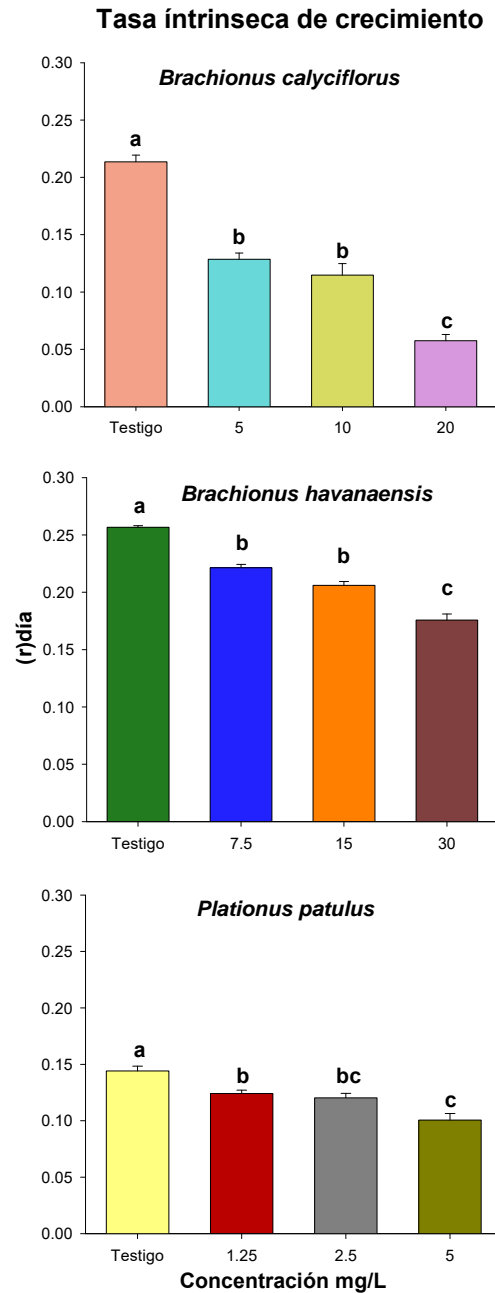


Figura 10.- Tasa intrínseca de incremento poblacional de los rotíferos *Brachionus calyciflorus*, *Brachionus havanaensis* y *Plationus patulus* expuestos a diferentes concentraciones tetraciclina. Los valores muestran el promedio de tres repeticiones y las letras las diferencias entre los tratamientos a través del análisis post hoc de Tukey.

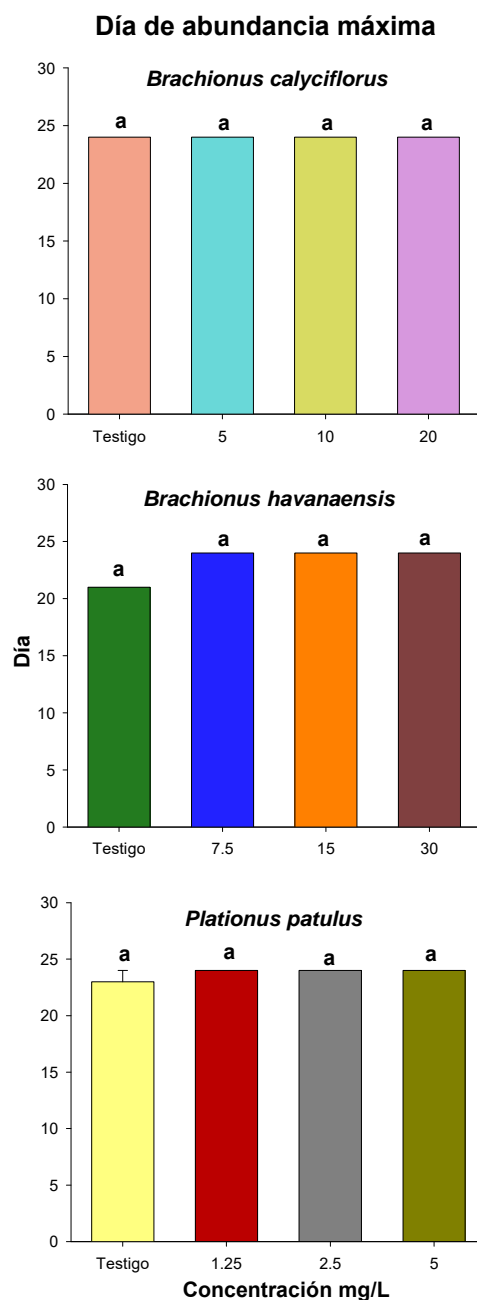


Figura 11.- Día de abundancia máxima de los rotíferos *Brachionus calyciflorus*, *Brachionus havanaensis* y *Plationus patulus* expuestos a diferentes concentraciones tetraciclina. Los valores muestran el promedio de tres repeticiones y las letras las diferencias entre los tratamientos a través del análisis post hoc de Tukey.

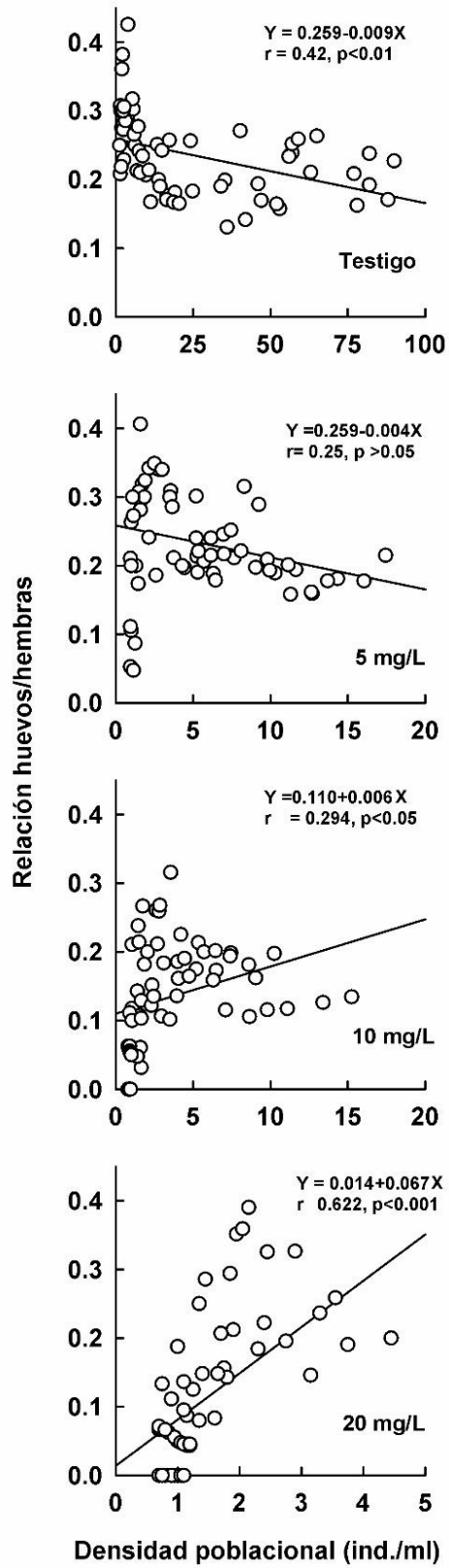


Figura 12.- Relación huevo hembra de *B. calyciflorus*

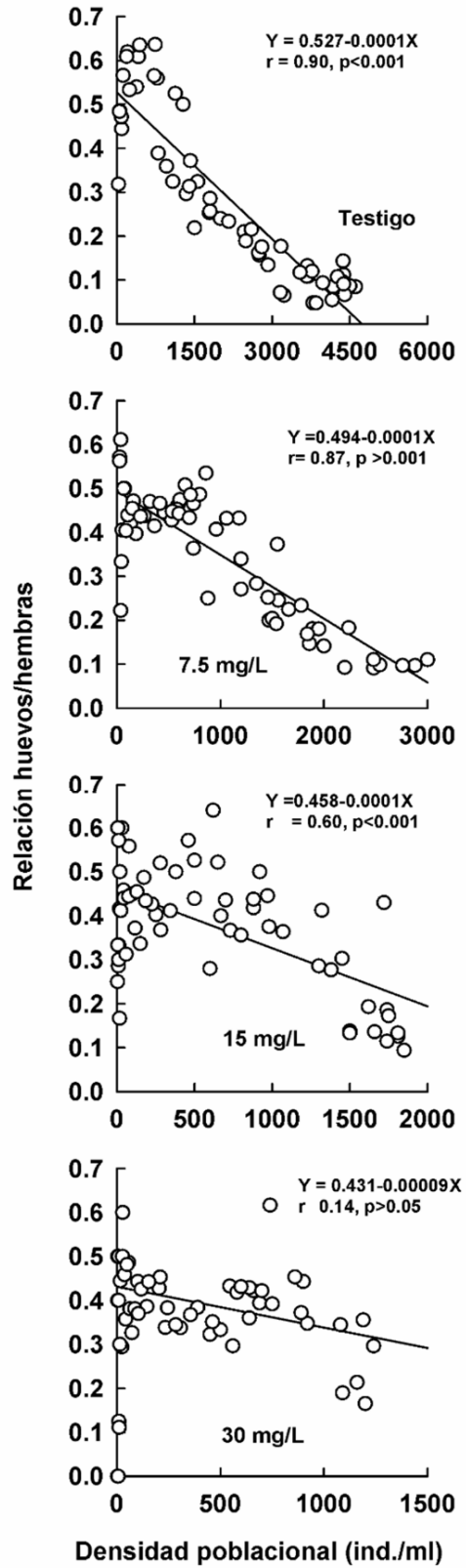


Figura 13.- Relación huevo hembra de *B. havanaensis*

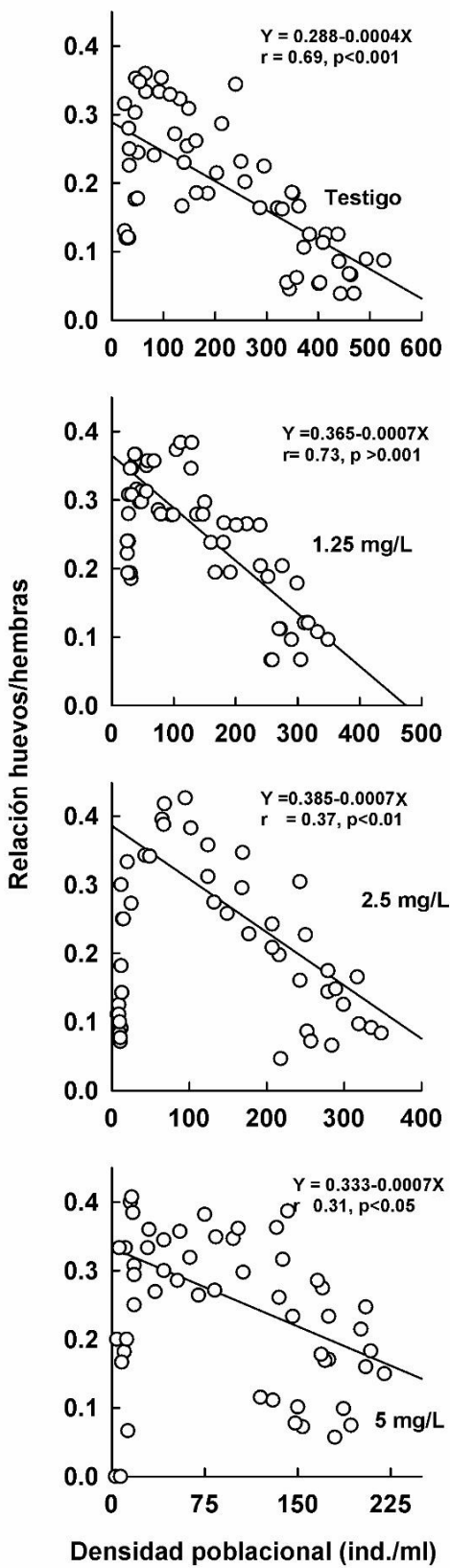


Figura 14.- Relación huevo hembra de *P. patulus*

Tabla de vida

En la tabla de vida la supervivencia (Fig. 15) de los controles muestra una curva de tipo I donde en general, las tres especies mostraron patrones típicos de curva rectangular donde había poca mortalidad durante los primeros 7-10 días y luego la mortalidad incrementó con el aumento de la edad de la población de la cohorte. En los tratamientos es visible que mientras incrementa la concentración del fármaco la forma de la curva se pierde acentuando la pendiente, lo que indica mayor mortandad.

En relación con la fecundidad, los controles de *B. calyciflorus* y *P. patulus* tienen una tendencia de reproducción constante y similar dentro de los días 5 a 22, mientras que en *B. havanaensis* la reproducción presentó un pico en la producción de descendientes de los días 4 a 10 (Fig. 16). La misma tendencia fue presentada en los tratamientos con antibiótico, sin embargo, con incremento en la concentración hubo una disminución de número de descendientes por día. También la duración del periodo reproductivo disminuyó con el incremento de tetraciclina ya que los testigos de las tres especies presentan mayor producción de individuos de los días 5 a 21 y en los tratamientos es variable por especie y concentración, ya que presentan una reducción en la fecundidad en relación al tiempo y a los descendientes producidos e incluso en las concentraciones más elevadas esta disminuye hasta más del 50%.

Independientemente de la concentración del antibiótico el número de descendientes producidos por día de *B. calyciflorus* (alrededor 1 huevo/hembra) fue significativamente menor que en *B. havanaensis* (alrededor 2.5 huevo/hembra) o *P. patulus* (alrededor de 1.5 huevos/hembra). Es importante señalar que aunque todas las especies se expusieron a concentraciones del antibiótico en todos los tratamientos hubo una reproducción diaria aunque baja y en ningún caso hubo cesión completa de la reproducción.

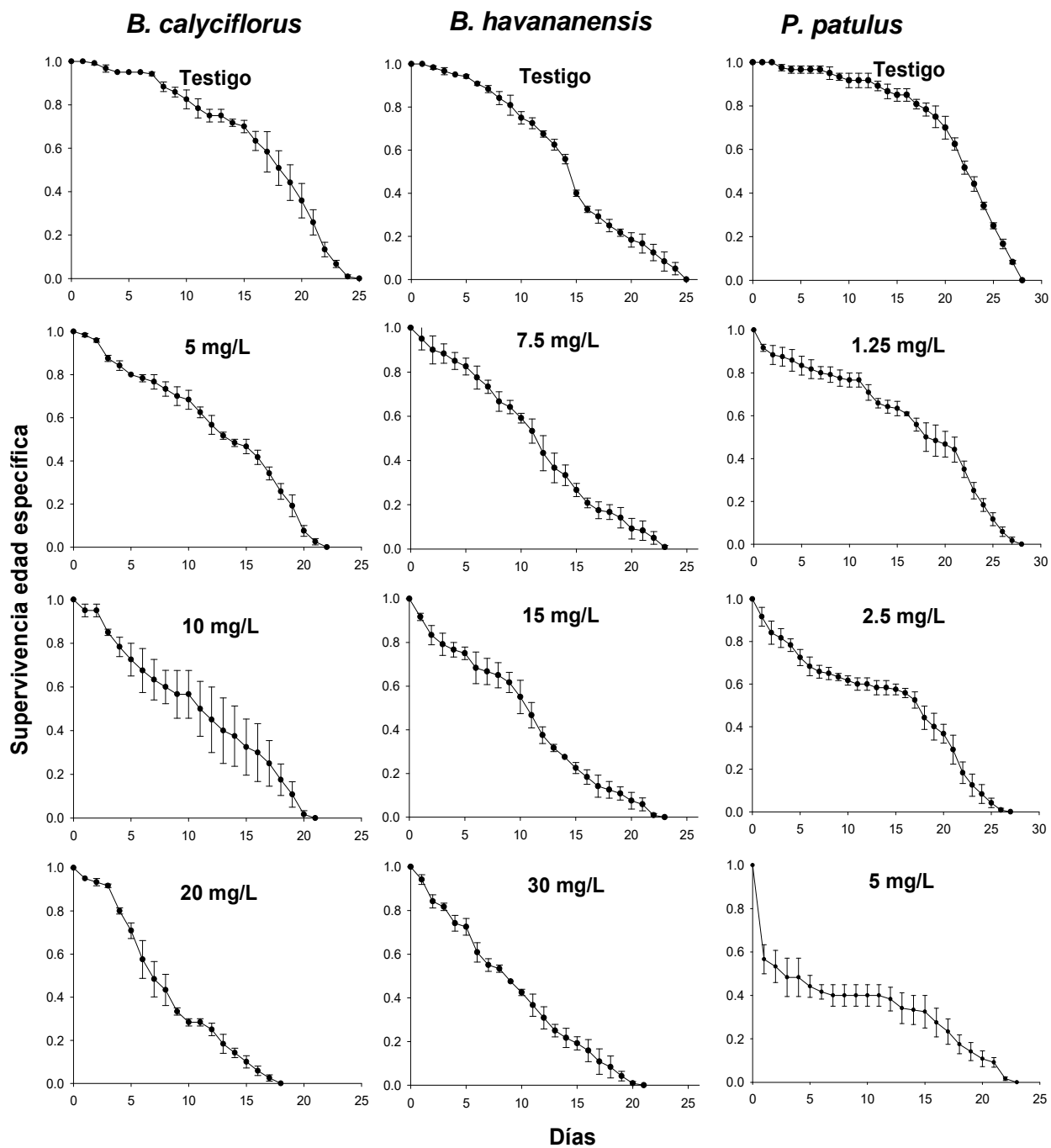


Figura 15.- Curvas de supervivencia de las tres especies de brachionidos expuestas a distintas concentraciones del antibiótico tetraciclina. Los valores indican el promedio \pm el error promedio de tres repeticiones.

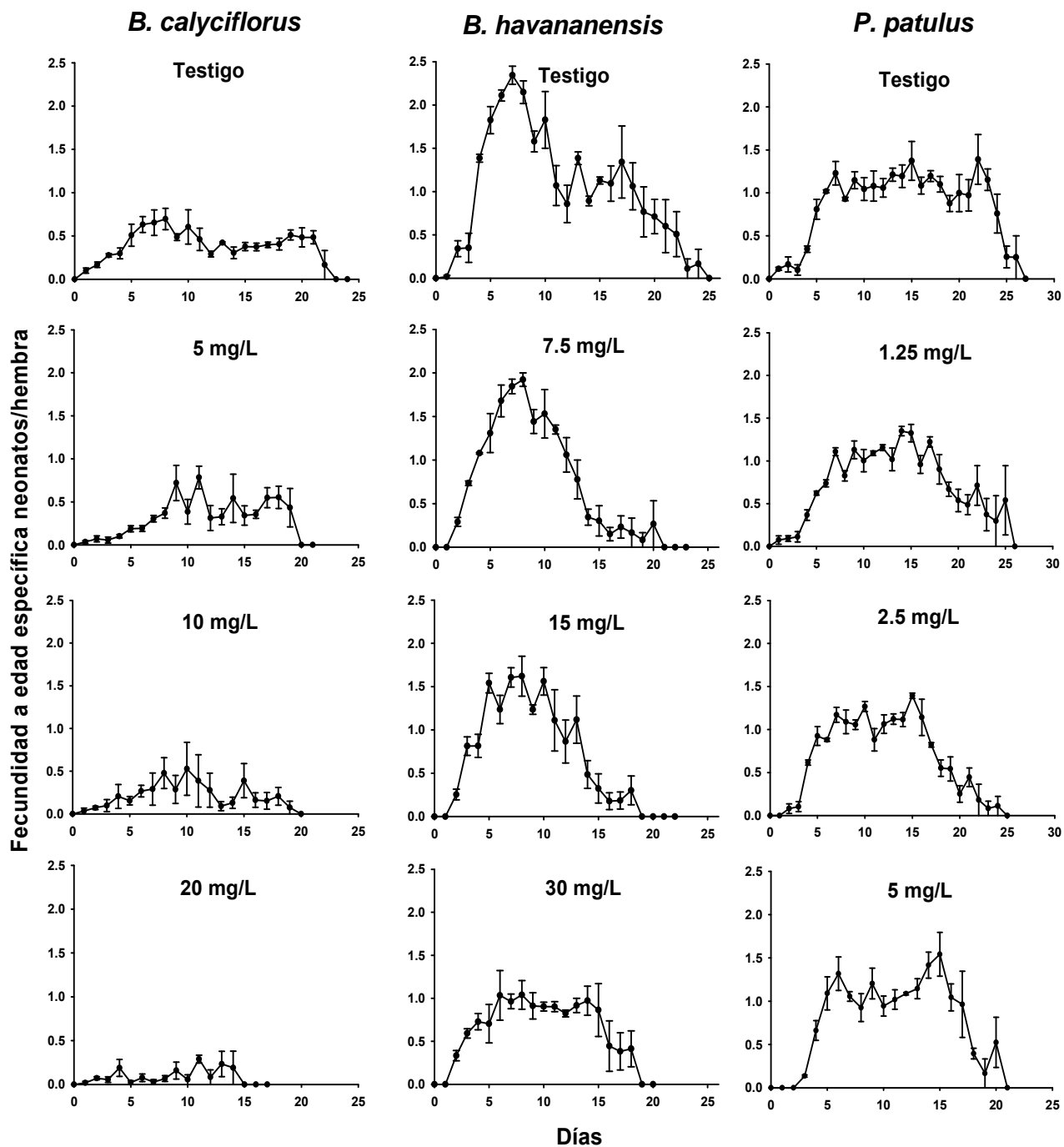


Figura 16.- Curvas de fecundidad de las tres especies de brachionidos expuestas a tetraciclina. Los valores indican el promedio \pm el error promedio de tres repeticiones.

Variables de historia de vida

Los datos sobre las variables de historia de vida seleccionadas, derivadas del estudio de la tabla de vida, de las tres especies de rotíferos expuestos a diferentes concentraciones de antibióticos se muestran en las Figuras 17, 18 y 19. Para *B. calyciflorus* el promedio de vida y esperanza de vida varió entre 7 y 17 días dependiendo la concentración del antibiótico y generalmente estas variables mostraron una tendencia de decremento con el aumento en la concentración de tetraciclina y con diferencias significativas respecto al control. Entre tratamientos la concentración de 5 y 10 mg/L no fueron diferentes estadísticamente ($p > 0.05$, ANDEVA).

La tasa de reproducción bruta de *B. calyciflorus* varió entre 1 y 9 huevos/hembra/duración de vida, dependiendo la concentración de antibiótico en el medio. También hubo un decremento en la tasa de reproducción bruta con el incremento de la concentración del antibiótico en el medio. Estadísticamente la tasa de reproducción bruta en el control fue significativamente distinta a los tratamientos y entre tratamientos ($p < 0.05$, ANDEVA).

La tasa de reproducción neta de *B. calyciflorus* varió de 0 a 7 huevos/hembra/duración de vida, dependiendo de la concentración de tetraciclina en el medio. Como en la tasa de reproducción bruta, en esta variable también se observa un decremento en el número de descendientes con el incremento del antibiótico. El análisis estadístico de comparaciones múltiples indicó que hubo diferencias entre los tratamientos y el control ($p < 0.05$, ANDEVA).

Con respecto al tiempo generacional de *B. calyciflorus* esta variable varió entre 6 y 11 días dependiendo la concentración de antibiótico. Estadísticamente en la más alta concentración (20 mg/L) del antibiótico disminuyó significativamente ($p < 0.05$, ANDEVA) el tiempo generacional comparando con el testigo.

La tasa de incremento poblacional de *B. calyciflorus* varió de 0 a 0.3 por día dependiendo la concentración. Hubo diferencias significativas ($p < 0.05$, ANDEVA) entre tratamientos y control. Las concentraciones de 5 y 10 mg/L no tuvieron diferencias entre sí.

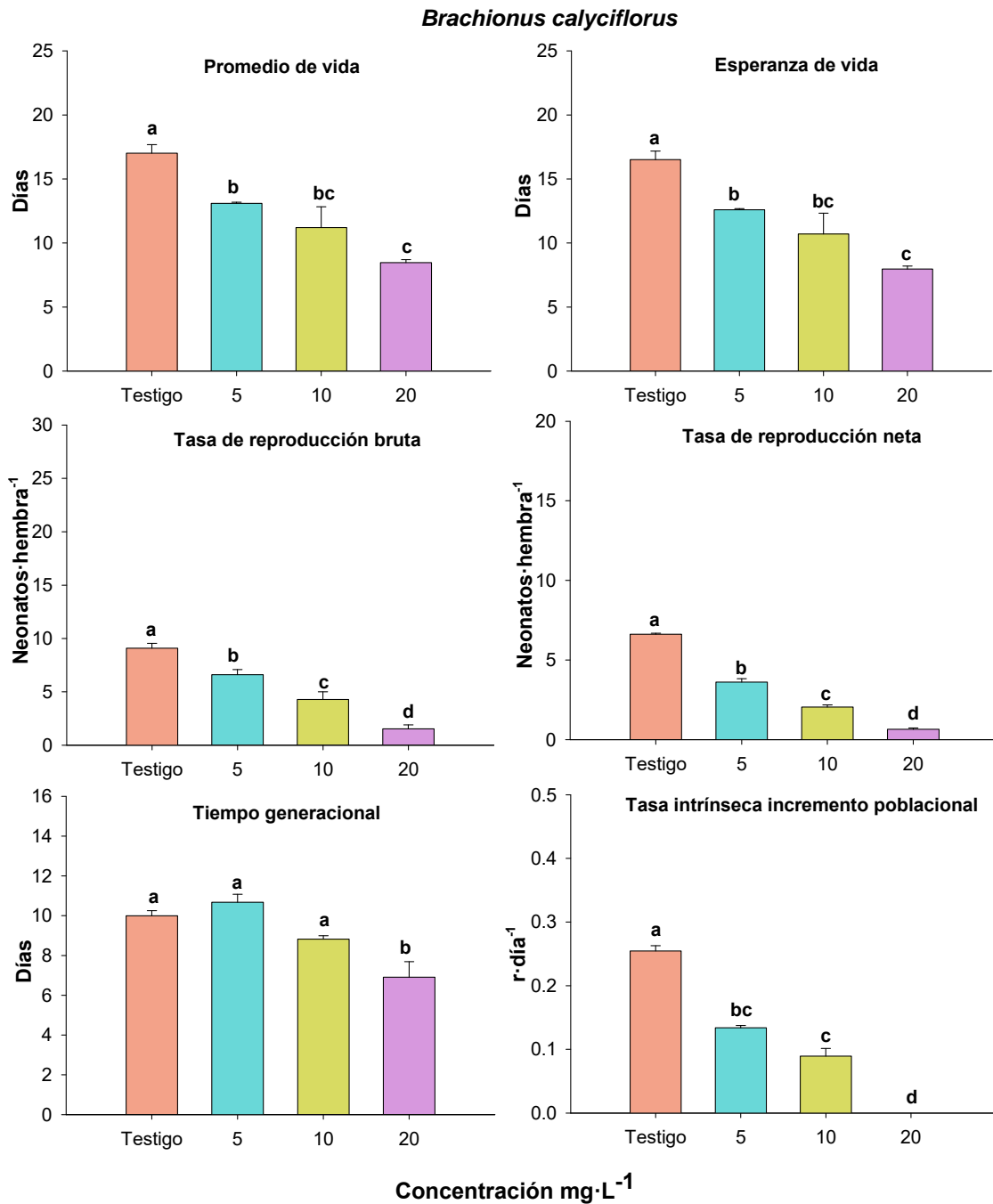


Figura 17.- Variables de tabla de vida de *Brachionus calyciflorus* expuesto a distintas concentraciones tetraciclina. Los valores muestran el promedio de tres repeticiones y las letras las diferencias entre los tratamientos a través del análisis post hoc de Tukey.

Brachionus havanaensis tuvo un promedio de vida entre 9 y 15 días donde mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$, ANDEVA) en el promedio de vida respecto a los tratamientos, pero entre tratamientos solo hay diferencias significativas entre la concentración más elevada y la más baja. La tendencia fue similar en esperanza de vida donde los valores fueron entre los 8 y 15 días.

La tasa de reproducción bruta del rotífero varió entre 12 y 26 huevos/hembra/duración de vida y presenta una disminución al incrementar la concentración, por lo cual existen diferencias significativas ($p < 0.05$, ANDEVA) entre el control y los tratamientos. Entre tratamientos la primera y segunda concentración fueron similares, por lo cual solo hubo diferencias entre la concentración más elevada y la más baja.

La tasa de reproducción neta presentó valores de 5 a 17 huevos/hembra/duración de vida, existen diferencias significativas entre el control y las concentraciones probadas ($p < 0.05$, ANDEVA), pero entre tratamientos solo hay diferencia significativa entre la concentración más elevada y la más baja.

Respecto al tiempo generacional de *B. havanaensis*, se observaron diferencias entre el control y las dos primeras concentraciones ($p > 0.05$, ANDEVA), sin embargo, entre tratamientos todos fueron similares. Los valores presentados fueron de 7 a 9 días.

En la tasa intrínseca de incremento poblacional se ve esclarecido el efecto de la tetraciclina sobre *B. havanaensis* pues este tiene diferencias significativas respecto al control y entre tratamientos. Además, es claro que conforme aumenta la concentración disminuyen los valores de $r \cdot \text{día}^{-1}$ pues todos los tratamientos fueron significativos ($p < 0.05$, ANDEVA) con valores entre 0.2 y 0.5.

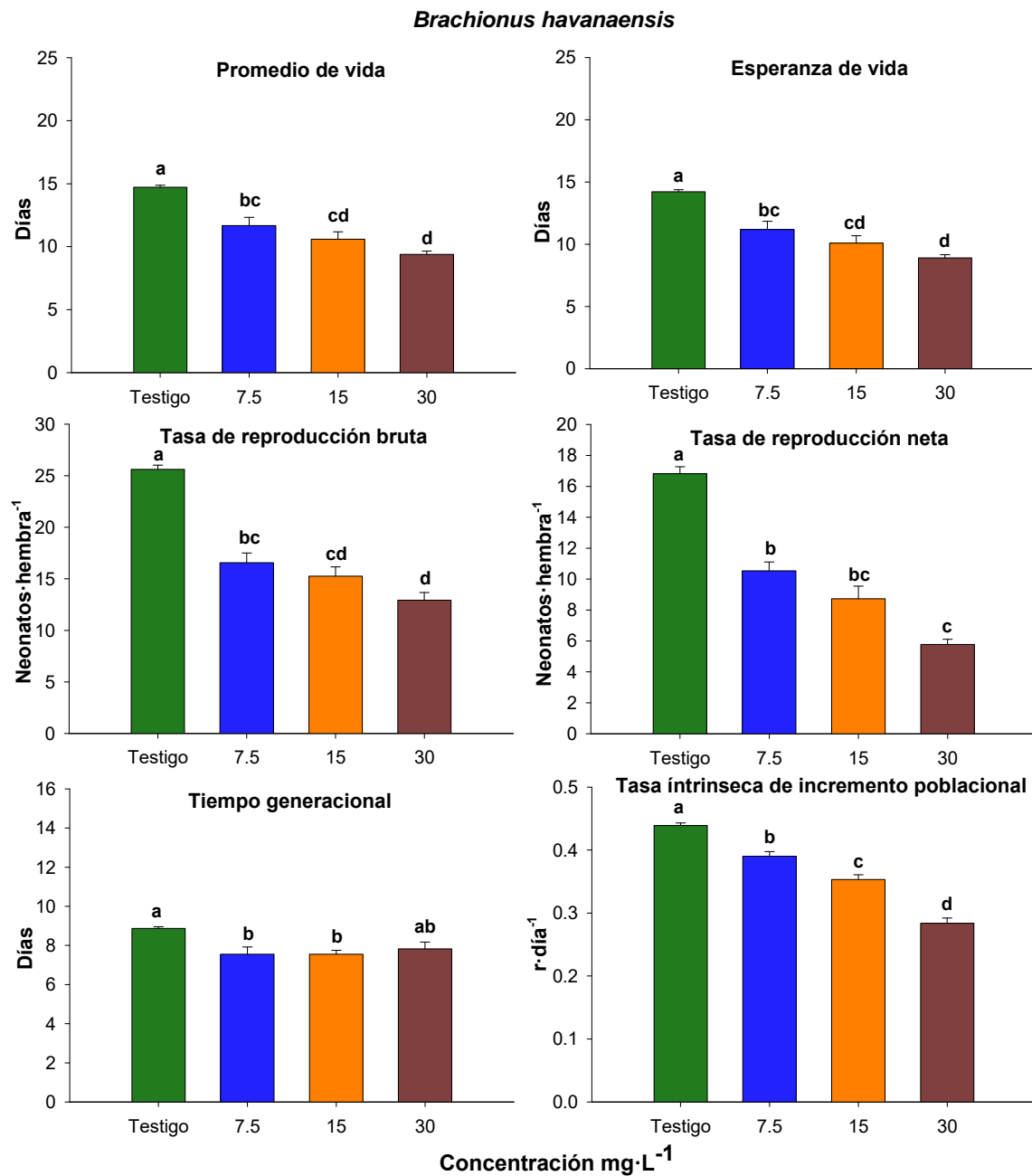


Figura 18.- Variables de tabla de vida de *Brachionus havanaensis* expuesto a distintas concentraciones tetraciclina. Los valores muestran el promedio de tres repeticiones y las letras las diferencias entre los tratamientos a través del análisis post hoc de Tukey.

Los días de promedio de vida de la especie *P. patulus* oscilaron entre 8 y 22 días mientras que para la esperanza de vida estos valores fueron de entre 7 y 21 días. En ambos, el control tiene diferencias significativas ($p < 0.05$, ANDEVA) con los tratamientos a los que se les añadió el fármaco y entre tratamientos hay diferencias entre la concentración más alta y las dos más bajas (7.5 y 15 mg/L).

En *P. patulus* la tasa de reproducción bruta tuvo diferencias significativas entre el control y los tratamientos ($p < 0.05$, ANDEVA), sin embargo, los tratamientos fueron similares. La tasa de reproducción bruta tuvo valores de 16 a 23 huevos/hembra/duración de vida.

La tasa de reproducción neta presentó valores en un rango de 5 a 19 huevos/hembra/duración de vida. Respecto al control hubo diferencias significativas ($p < 0.05$, ANDEVA) y entre tratamientos las dos primeras fueron similares, pero fueron diferentes a la concentración de 5 mg/L.

El tiempo generacional de *P. patulus* se estimó de entre 10 y 14 días. Aquí cabe señalar que el control solo presentó diferencias con la segunda y tercera concentración ($p < 0.05$, ANDEVA). Entre tratamientos solo la más alta tuvo diferencias significativas contra las otras dos concentraciones de antibiótico.

En la tasa intrínseca de incremento poblacional los valores de $r \cdot día$ que van de 0.1 a 0.4 disminuyeron cuando se incrementó la concentración del fármaco y además existieron diferencias significativas entre el control y los tratamientos ($p < 0.05$, ANDEVA); entre tratamientos las diferencias se presentan en la concentración más elevada (5mg/L y las dos más bajas (1.25 y 2.25 mg/L).

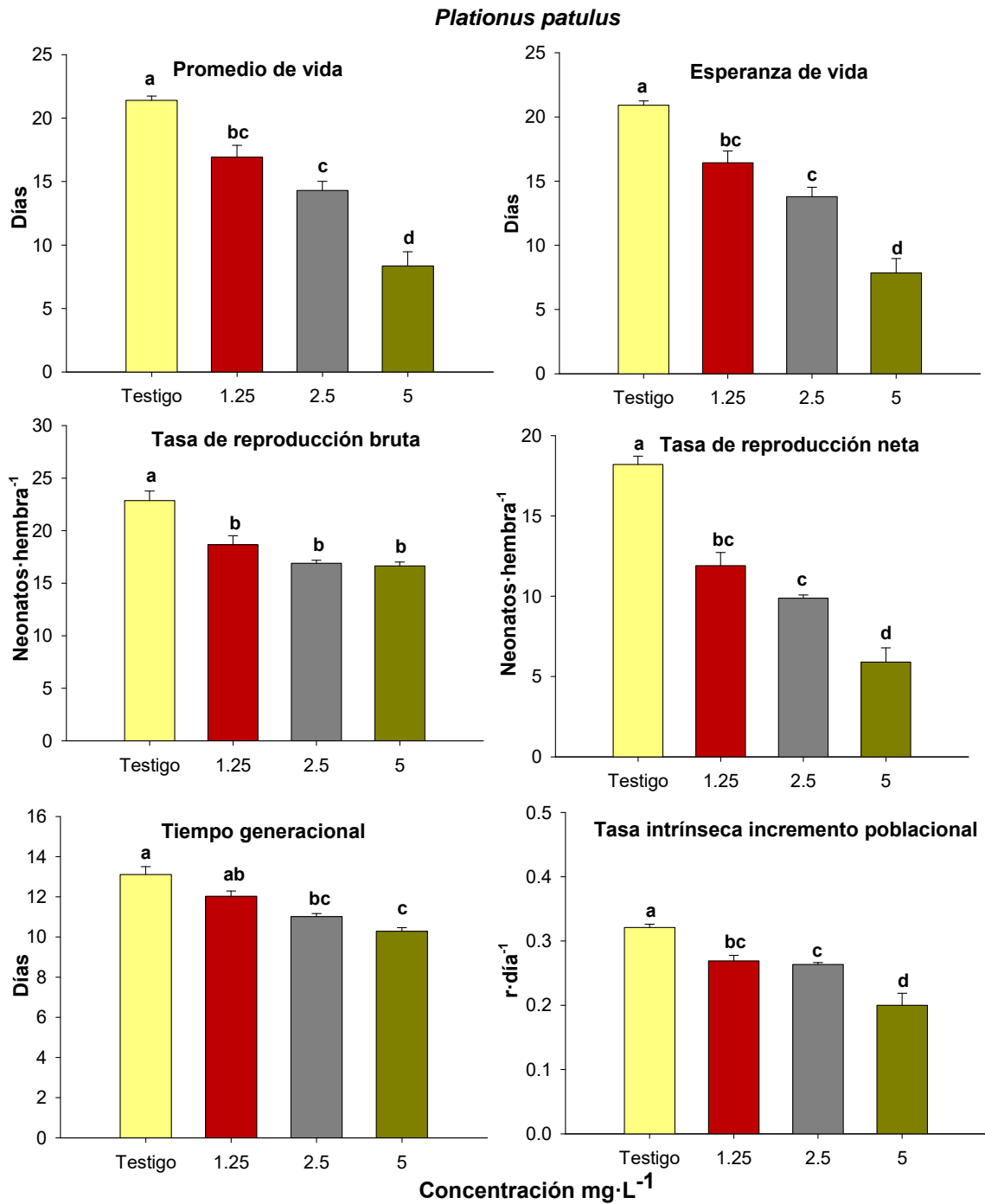


Figura 19.- Variables de tabla de vida de *Plationus patulus* expuesto a distintas concentraciones tetraciclina. Los valores muestran el promedio de tres repeticiones y las letras las diferencias entre los tratamientos a través del análisis post hoc de Tukey.

Se obtuvo la relación entre promedio de vida y tiempo generacional por especie de rotíferos seleccionados. Se observó una relación positiva entre promedio de vida y tiempo generacional, sin embargo, la pendiente de la regresión varió dependiendo la concentración de tetraciclina. En la Figura 20 se observa que los valores del tiempo generacional en los testigos son aproximadamente la mitad del promedio de vida. Por ejemplo, con *B. calyciflorus* la proporción del control es de 1.7, en cambio los tratamientos difieren, pues con 5 mg/L presentó un valor de 1.22, el de 10 mg/L tuvo 1.26 y la concentración más elevada de 20 mg/L un valor de 1.22.

La relación entre promedio de vida y tiempo generacional de *B. havanaensis* muestra el valor en el control de 1.65, mientras que en los tratamientos la relación es de 1.54 para 7.5 mg/L; 1.2 en 15 mg/L y 1.29 en la mayor concentración de 30 mg/L en las cuales también se observa que se pierde la proporción.

En *P. patulus* la relación entre promedio de vida y tiempo generacional tuvo el valor de 1.63 en el control. En los tratamientos presentó valores de 1.4 en la concentración de 1.25 mg/L; 1.29 en 2.5 mg/L y 0.81 para la concentración más elevada de 5 mg/L, donde la conclusión es la misma que para las otras dos especies ya que se pierde la relación.

En general la relación entre promedio de vida y tiempo generacional entre especies es similar en cuanto a tendencia, y se observa una pérdida de la relación en todos los tratamientos a los que se les aplicó la tetraciclina.

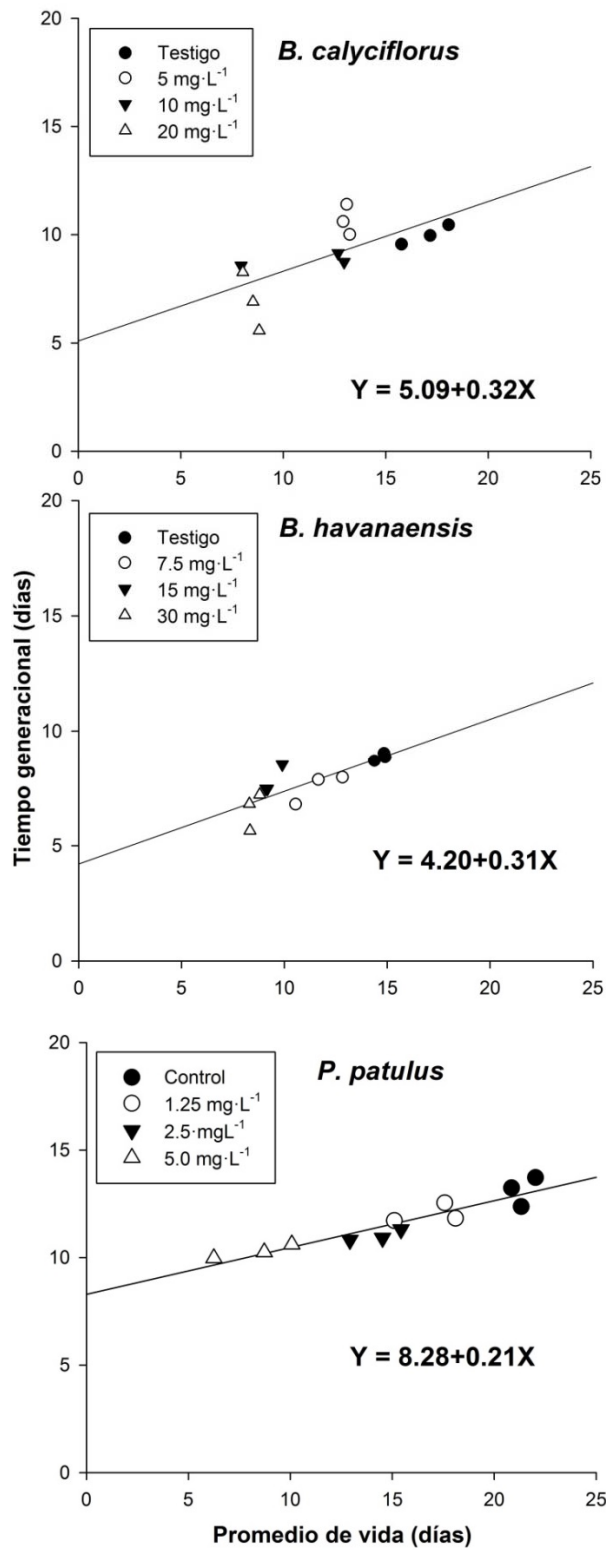


Figura 20.- Relación entre promedio de vida y tiempo generacional. Cada concentración muestra 3 valores que corresponden a las réplicas.

Discusión

La ocurrencia de xenobióticos en cuerpos de agua ha incrementado, muchas de estas sustancias son fármacos y los efectos que tienen en los organismos aún son desconocidos. El potencial tóxico de antibióticos sobre invertebrados acuáticos está aun pobremente comprendido y a menudo es polémico (Contardo-Jara et al., 2011). En general muchos estudios son dirigidos en relación a los compuestos con límites permisibles estipulados en cada país, por ejemplo, en México esta regulación está establecida por la Norma Oficial Mexicana 001 (NOM-001-SEMARNAT-1996) e indica los límites permisibles en mg/L de solidos suspendidos totales, demanda química y bioquímica de oxígeno, fosforo, nitrógeno y de algunos pocos metales, por ello muchos estudios van dirigidos hacia dichos contaminantes. La norma no indica los límites de otros compuestos de relevancia como pesticidas, productos de cuidado personal o fármacos, aunque se sabe que existe un alto consumo anual de ellos. Los estudios realizados con tetraciclina o sus derivados son dirigidos a vertebrados mamíferos para evaluar el efecto dosis-respuesta en veterinaria y medicina dejando de lado a los organismos acuáticos. Los estudios publicados de tetraciclina sobre organismos acuáticos implican estudios individuales generalmente agudos para evaluar la calidad del agua (Rico-Martínez et al., 2016). En los estudios crónicos en la mayoría de los casos se evalúa únicamente el crecimiento poblacional o tabla de vida.

El estudio de toxicología con rotíferos esta ya estandarizado por la Asociación Americana de Ensayos Materiales (AAEM, en inglés ASTM), donde se incluyen como organismos de prueba a *B. plicatilis* y *B. calyciflorus*. El primer organismo es de agua salada por lo cual su distribución en el país es reducida a las costas y aunque el segundo si se halla en cuerpos de agua dulce y cuenta con una amplia distribución, el ingresar más rotíferos a la lista aprobada de la ASTM incrementaría la comprensión de los efectos de contaminantes al zooplancton. La Asociación Estadounidense de Salud Pública (APHA) incluye además la estandarización de la técnica para *P. patulus* en la cual muchos estudios se han basado para probar los efectos de sustancias como metales sobre rotíferos (Sarma et al., 2008). *Brachionus havanaensis* es un rotífero de importancia en los cuerpos de agua nacionales debido a que tiene una amplia

distribución y también es sensible como otros rotíferos brachionidos. Además, siendo pequeña, esta especie alcanza abundancias mucho más altas en comparación con otras *Brachionus* spp. en condiciones comparables (Pavón-Meza et al. 2004). Estudios recientes demuestran que esta especie tiene una tendencia invasiva (Sarma et al. 2019). Por lo tanto, el uso de esta especie en bioensayos también tiene aplicaciones desde el punto de vista de la perspectiva global.

La LC₅₀ es una prueba muy utilizada en estudios toxicológicos, nuestros resultados indicaron LC₅₀ diferentes para cada especie ya que *B. havanaensis* tuvo la más elevada (147.96 mg/L.), seguida de *Brachionus calyciflorus* (77.07 mg/L) y *P. patulus* (24.11 mg/L). El estudio previo de Isidori (2005) mostro una LC₅₀ de 34.21 mg/L para *Brachionus calyciflorus*, de 22.64 mg/L para *Daphnia magna* y de 10.65 mg/L para *D. pulex* con oxitetraciclina observando mayor sensibilidad para cladóceros. En cambio, autores como Hui-zhu (2008) hallaron concentraciones más elevadas en *Daphnia magna* ya que obtuvieron concentraciones superiores a 300 mg/L en la CL₅₀ con tetraciclina y superiores a 100 mg/L con oxitetraciclina. Algunos estudios también se han enfocado a algas verdes y cianobacterias como el estudio de Holten (1998) en el cual la CE₅₀ tuvo valores de 0.207 mg/L para *M. aeruginosa*, 1.6 mg/L para *S. capricornotum* y 4.25 mg/L para *R. salina*. Es importante mencionar que el autor indica que ambos grupos presentan alta sensibilidad e incluso presenta un poco más el grupo de las cianobacterias ya que tienen estructura similar al de las bacterias. Estos estudios agudos nos brindan una perspectiva de los efectos inmediatos de un tóxico sobre los organismos probados sin embargo las concentraciones utilizadas siempre son mucho más elevadas que las que se hallan en los cuerpos de agua, es por ello que nuestro estudio contemplo además el efecto crónico del antibiótico.

En este trabajo la densidad poblacional de *B. calyciflorus* alcanzo los 80 ind/ml parecido a lo que reporta Pavón y colaboradores (2001) ya que ellos obtuvieron 55 ind/ml y ($r = 0.5$) a la misma concentración de alimento. La densidad poblacional de *B. havanaensis* alcanzó un máximo de 212 ind/ml, esto se asemeja a lo que reporto Pavón y colaboradores (2004) pues el estudio del rotífero a una concentración de alimento

(1×10^6 céls/ml) y a temperatura de 20°C tuvo densidades de superiores a 200 ind/ml y ($r > 0.20$) e indican que incluso pueden tener densidades más elevadas a mayor concentración de alimento. *P. patulus* alcanzo 22 ind/ml y varía un poco respecto los resultados de Sarma y Rao (1990) ya que los autores reportaron 50-60 ind/ml y ($r \sim 0.12$ por día) a una temperatura de 25°C y el doble de alimento. Estos valores indican que los controles tuvieron características similares a las reportadas con anterioridad en la literatura con pequeñas variaciones. Sin embargo se observa que en los tratamientos a los que se les aplico la tetraciclina disminuyeron en densidad respecto a los controles y también se redujo la tasa intrínseca de incremento de la población.

En la literatura no se ha probado el efecto de la tetraciclina o sus derivados sobre crecimientos poblacionales sobre rotíferos; sin embargo, González- Pérez (2012) utilizo analgésicos como paracetamol y diclofenaco sobre *P. patulus* sus resultados arrojaron que el paracetamol tuvo un efecto adverso a concentraciones de 16 y 32 mg/L y el diclofenaco a 12.5 y 25 mg/L ya que ambos redujeron la densidad y la r por día. La densidad poblacional de acuerdo con Gama-flores y colaboradores (2009) se reduce bajo condiciones de estrés, por lo tanto, se infiere que las poblaciones tratadas con tetraciclina también sufrieron estrés por parte del toxico y por ende la densidad y la r por día disminuyo. Otro estudio de crecimiento poblacional evaluado en distintas generaciones fue realizado por Kim y colaboradores (2012). Ellos probaron el efecto de la tetraciclina sobre el crecimiento poblacional del cladóceros *Daphnia magna* y sus descendientes donde se utilizaron concentraciones de 0-10 mg/L durante un periodo de 21 días. En el estudio la población empezó a crecer en diferentes días dependiendo de la generación (F_0 , F_1 , F_2 y F_3) y la concentración, pero se observó relación sinérgica pues a mayor concentración y generación disminuye el crecimiento poblacional, con afectaciones similares en el aspecto reproductivo. Este trabajo de *D. magna* muestra valores de la tasa de incremento poblacional de 0 a 0.43 r día^{-1} siendo el testigo quien presenta la tasa más alta y se reduce en los tratamientos y aún más en las siguientes generaciones, mostrando así que puede haber efectos multigeneracionales. En el presente trabajo, aunque no se evaluó el efecto del antibiótico a través de las generaciones, el efecto adverso de la tetraciclina fue evidente en la primera y única

generación debido a la sensibilidad de los rotíferos, lo que indica que es suficiente evaluar una generación para observar la toxicidad.

Los resultados particulares de nuestro estudio muestran una relación inversa en la proporción de huevos y densidad de hembras en *Brachionus calyciflorus* solo en el testigo y la concentración más baja. En comparación, las especies de *B. havanaensis* y *P. patulus* tuvieron una relación inversa para los controles y todos los tratamientos, lo cual es equiparable a lo ya discutido por Sarma y colaboradores (2005), ya que indican que existe una relación inversa entre la densidad de población y proporción de huevos, lo que implica que bajo condiciones limitantes, se canaliza menos energía hacia la producción de huevos. La discrepancia de la relación en las concentraciones de 10 y 20 mg/L en la especie *B. calyciflorus* (la cual tuvo una relación positiva) puede deberse a que la densidad poblacional fue baja hasta ese punto pues comparado con el control que tuvo 79 ind/ml, la densidad poblacional fue de 11 ind/ml en la concentración de 10 mg/L y de 4 ind/ml en la concentración de 20 mg/L, lo que sugiere que la población crecía lentamente.

Los efectos crónicos evaluados en tablas de vida utilizando derivados de tetraciclina han sido realizados por Araujo y McNair (2007) donde utilizaron el hidruro de tetraciclina sobre *B. plicatilis* y *B. calyciflorus*. La concentración más baja utilizada fue de 5.6 mg/L y el efecto no fue significativo en la reducción de la supervivencia, pero si disminuyeron la reproducción. Los autores indican que *B. calyciflorus* fue más sensible que el rotífero de agua salada y además argumentan que existen diferentes respuestas entre especies e incluso entre cepas de la misma especie a tóxicos. Esto posiblemente es también el caso de nuestro estudio donde empleamos tres especies de rotíferos con diferentes tamaños corporales. En la literatura parece no haber correlación entre el tamaño corporal del rotífero y su sensibilidad a los tóxicos. En este trabajo, *B. havanaensis* es el más pequeño de todos, mientras que *B. calyciflorus* fue el más grande. Wollenberger y colaboradores (2000) evaluaron el efecto de la tetraciclina y de la oxitetraciclina sobre la tabla de vida de *Daphnia magna* ellos observaron reducción de la reproducción desde la concentración más baja (5mg/L) con ambos derivados de tetraciclina. Las variables

de historia de vida también fueron afectadas adversamente. *Brachionus calyciflorus* tuvo diferencias significativas en la mayoría de las variables comparadas con el control a excepción de la concentración de 5mg/L pues solo tuvo diferencias significativas ($p < 0.05$, ANDEVA) en los parámetros de tasa de reproducción neta y tasa de incremento poblacional. *Brachionus havanaensis* si tuvo diferencias en el control contrastado con todos los tratamientos ($p < 0.05$, ANDEVA) y *P. patulus* también tuvo diferencias significativas en la mayoría de las variables comparado con el control a excepción de la concentración de 1.25 mg/L donde un parámetro no fue significativo ($p > 0.05$, ANDEVA). El tiempo generacional en los controles es aproximadamente la mitad del promedio de vida por lo cual al dividirse debe tener un valor aproximado al 2, de acuerdo a la hipótesis establecida por King (1982). En este trabajo se obtuvo la relación siguiente: *B. calyciflorus* (1.7), *B. havanaensis* (1.65) y *P. patulus* (1.63). En los resultados se mencionó que conforme incrementó la concentración en el medio esta relación iba descendiendo, esta es una evidencia más del efecto negativo del antibiótico sobre los rotíferos.

El efecto de fármaco en este trabajo pudo haber actuado en tres formas, la primera a través de la microalga ya que pudo haber afectado la calidad del alimento, la segunda a través del medio ya que el antibiótico pudo ingresar cuando los rotíferos lo filtraban y la tercera sería considerando el efecto de ambos. Teniendo en cuenta que el alga es más resistente que los rotíferos es posible que el efecto de tetraciclina sobre el alga y a su vez sobre rotíferos no sea necesariamente significativo. En general, el efecto del antibiótico sobre los parámetros a nivel de población de las tres especies de rotíferos indicó algunas conclusiones interesantes: cuando se compara la densidad de la población de los controles con el nivel más alto de tetraciclina, *B. calyciflorus* fue mayormente afectado (>90%), mientras que *P. patulus* fue menos afectado (50%) y significativamente más bajo. La tasa de aumento de la población en los tratamientos con el nivel más alto de antibióticos se redujo en aproximadamente un 70% para *B. calyciflorus* y aproximadamente un 30% para las otras dos especies de rotíferos en condiciones comparables. Los parámetros de la historia de vida obtenidos del estudio también indicaron el efecto adverso del antibiótico en las especies de rotíferos

analizados. En comparación con los controles, el tratamiento con la concentración más alta del antibiótico redujo significativamente las tasas reproductivas brutas y netas, así como la tasa de aumento de la población de *B. calyciflorus* (30-125%). El efecto fue menor pero aun significativamente adverso (27-35%) para los otros dos rotíferos en condiciones de prueba comparables. Sin embargo, las variables de supervivencia (promedio de vida y esperanza de vida) de *P. patulus* fueron más sensibles al nivel más alto del antibiótico (con una reducción de hasta > 60% en comparación con los controles) que *B. calyciflorus* y *B. havanaensis*.

Los datos de concentraciones de tetraciclina detectadas en los cuerpos de agua en México y a nivel mundial aún son escasos y variables. En Canadá se reportan superiores a 2 µg/L (Deblonde et al., 2011), en Estados Unidos de 0.15 µg/L (Lindsey et al. 2001), La clortetraciclina se reporta en cantidades cercanas a 0.5 µg/L en Estados Unidos, 0.9 µg/L en Reino Unido, oxitetraciclina 1.34 µg/L en Estados Unidos, 0.5 en Reino Unido y 71.7 en Inglaterra (Boxall et al., 2004). El único estudio realizado en México donde se detectaron diversos contaminantes entre ellos la tetraciclina fue el que realizaron Robledo y colaboradores (2017) en una planta de tratamiento de aguas residuales de Morelia, Michoacán donde la tetraciclina fue detectada en afluentes en un rango de 2.2 – 160.2 µg/L y una frecuencia de 92.3% y en efluentes en un rango de 2.7 -119.4 µg/L y una frecuencia del 84.6%. Por otro lado como en 2010 la tetraciclina fue uno de los antibióticos más consumidos, antes de la política de venta sin receta, se presume que puede hallarse en concentraciones elevadas.

Debido a los riesgos potenciales del antibiótico se sugieren estudios actuales donde se reporten las concentraciones e incidencia de la tetraciclina en los cuerpos de agua y estudios crónicos en diferentes modelos biológicos ya que pueden ser candidatos a una regulación futura. Este estudio también demuestra la necesidad de utilizar especies no objetivo como los rotíferos para organismos de bioensayo. Los datos obtenidos de dicho estudio serán útiles para establecer criterios de calidad del agua para proteger nuestros cuerpos de agua.

Conclusiones

La concentración letal media indicó que el rotífero *P. patulus* fue más sensible a la tetraciclina con un valor de 30.01 mg/L a 24 h.

Al incrementar las concentraciones del antibiótico tetraciclina en el medio, se observó una disminución significativa en la densidad poblacional y tasa intrínseca de crecimiento poblacional en las tres especies de rotíferos. El crecimiento poblacional fue afectado adversamente en las tres especies siendo el efecto más visible en *B. calyciflorus*.

El día de abundancia máxima fue similar en las tres especies (día 23 y 24) y no tuvo afectación por el fármaco. La densidad poblacional máxima en cambio disminuyó conforme se incrementó la concentración del antibiótico.

En la tabla de vida la supervivencia se redujo conforme se incrementó la concentración del fármaco en el medio y la fecundidad tuvo una tendencia similar, pues se redujo el periodo reproductivo y la cantidad de individuos producidos.

Las variables de la tabla de vida de *B. calyciflorus* disminuyeron en comparación con el testigo, existen diferencias significativas con las concentraciones de 10 y 20 mg/L. En la concentración más baja solo se afectó la tasa de reproducción neta y la tasa intrínseca de incremento poblacional. Lo que indica que las afectaciones comienzan en la reproducción y supervivencia pero a mayores concentraciones el fármaco puede afectar otras variables importantes en la historia de vida del rotífero.

En *B. havanaensis* la tabla de vida mostró diferencias entre el control y todos los tratamientos para la mayoría de las variables, excepto el tiempo generacional donde se observa que no hubo diferencias significativas entre el control y la concentración más elevada por lo cual el tiempo generacional se aceleró en las concentraciones más bajas pero fue similar al del control.

La tabla de vida de *P. patulus* también presentó diferencias significativas entre el control y los tratamientos. Los tratamientos de la variable de tasa de reproducción bruta no tuvieron diferencias significativas entre sí, lo que sugiere que todas las hembras tuvieron un promedio de progenie similar en su ciclo de vida.

Referencias

- Araujo, A. y McNair, J. Individual - and population-level effects of antibiotics on the rotifers, *Brachionus calyciflorus* and *B. plicatilis*. (2007). *Hydrobiologia*, 593, 185–199.
- American Public Health Association (APHA). (1999). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20th ed. Washington, DC: American Public Health Association.
- American Society of Testing Materials (ASTM) E1440-91. (2012). Standard Guide for Acute Toxicity Test with the Rotifer *Brachionus*. ASTM International, West Conshohocken, PA. 2012. DOI: 10.1520/E1440-91R12. www.astm.org
- Barceló, D. y López, M. J. (2007). 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.
- Bartram, J. y Ballance, R. (1996). *Water quality monitoring: A practical guide to the design of freshwater quality studies and monitoring programmes*. Londres: Chapman Hill.
- Bolong, N., Ismail, A. F., Salim, M. R. y Matsura, T. (2009). A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. *Desalination*, 239, 229-246.
- Boxall, A. B. A., Fogg, L. A., Blackwell, P. A., Blackwell, P., Kay, P., Pemberton, E. J., y Croxford, A. (2004). *Veterinary medicines in the environment. In Reviews of environmental contamination and toxicology*. New York, NY: Springer.
- Centro de las Nuevas Tecnologías del Agua de Sevilla (CENTA). (2008). *Manual de depuración de aguas residuales urbanas*. ARPI relieve: Nicaragua.
- Chopra, I. y Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and molecular biology reviews*, 65 (2), 232-260.
- Contardo-Jara, V., Lorenz, C., Pflugmacher, S., Nützmann, G., Kloas, W., y Wiegand, C. (2011). Exposure to human pharmaceuticals Carbamazepine, Ibuprofen and Bezafibrate causes molecular effects in *Dreissena polymorpha*. *Aquatic toxicology*, 105 (3-4), 428-437.
- Deblonde, T., Cossu-Leguille, C. y Hartemann P. (2011). Emerging pollutants in wastewater: a review of the literature. *International journal of hygiene and environmental health*, 214, 442-448.
- Edmondson, W. T. (1965). Reproductive rate of planktonic rotifers as related to food and temperature. *Ecological Monographs*, 35, 61–111.

- Esplugas, S., Bila, D. M., Krause, L. G. T. y Dezotti, M. (2007). Ozonation and advanced oxidation technologies to remove endocrine disrupting chemicals (EDCs) and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in water effluents. *Journal of Hazardous Materials*, 149 (3), 631-642.
- Freitas, E. C., Rocha, O. y Gaeta Espíndola, L. G. (2018). Effects of florfenicol and oxytetracycline on the tropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*: A mixture toxicity approach to predict the potential risks of antimicrobials for zooplankton. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 162, 663–672.
- Gama-Flores, J. L., Sarma, S. S. S. y Nandini, S. (2009). Combined effects of exposure time and copper toxicity on the demography of *Moina macrocopa* (Crustacea: Cladocera), *Journal of Environmental Science and Health*, 44(1), 86-93.
- Gil, M. J., Soto, A. M., Usma, J. I. (2012). Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos. *Producción+Limpia*, 7 (2), 52-73.
- Gulkowska, A., Leung, H. W., So, M. K., Tamiyasu, S., Yamashita, N., Yeung, L. W. Y., Richarson, B. J., Lei, A. P., Gicsy, J. P. y Lam, P. K. S. (2008). Removal of antibiotics from wastewater by sewage treatment facilities in Hongkong and Shenzhen, China. *Water Research*, 42 (1-2), 395-403.
- González-Pérez, B. K. (2012). *Efecto de analgésicos seleccionados (paracetamol y diclofenaco) sobre el crecimiento poblacional del rotífero Plationus patulus (ROTIFERA: BRACHIONIDAE)*. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios superiores Iztacala.
- Halling-Sørensen, B., Nielsen, S. N., Lanzky, P. F., Ingerslev, F., Lützhøft, H. C. H., Jørgensen, S. E. (1998). Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment – a review. *Chemosphere*, 36, 357–393.
- Halling-Sørensen, B. (2000). Algal toxicity of antibacterial agents used in intensive farming. *Chemosphere*, 40, 731-739.
- Havelkova, B., Beklova, M., Kovacova, V., Hlavkova, D. y Pikula, J. (2016). Ecotoxicity of selected antibiotics for organisms of aquatic and terrestrial ecosystems. *Neuroendocrinology Letters*, 37 (Suppl. 1), 38-44.
- Holten Lützhøft, H. C., Halling-Sørensen, B. y Jørgensen, S. E. (1998). Algal toxicity of antibacterial agents applied in Danish fish farm. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 36, 1–6.
- Houeto, P., Carton, A., Guerbet, M., Mauclair, A. C., Gatignol, C., Lechat, P. y Masset, D. (2012). Assessment of the health risks related to the presence of drug residues in water for human consumption: Application to carbamazepine. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 62(1), 41–48.
- Hui-zhu, W., Yi, L., Wen-qing, X., Qi-xing, Z., Bao-hua, T. y Yuan-yuan, W. (2008). Ecotoxic effects of tetracycline and chlortetracycline on aquatic organisms. *Journal of Agricultural and Environmental Science*. http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-NHBH200804048.htm

- Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Pascarella, L. y Parrella, A. (2005). Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. *Science of the Total Environment*, 346, 87–98.
- Jiménez-Contreras, J., Nandini, S. y Sarma, S. S. S. (2018) Diversity of Rotifera (Monogononta) and egg ratio of selected taxa in the canals of Xochimilco (Mexico City). *Wetlands*, 38, 1033-1044.
- King, C. E. y Snell, W. (1977). Sexual recombination in rotifers. *Heredity*, 39 (3), 357-360.
- King, C. E. (1982). The evolution of lifespan. En Dingle, H. y Hegmann, P. (eds.). *Evolution and Genetics of Life Histories* (121-128), New York: Springer Verlag.
- Kim, H. Y., Lee, M. J., Yu, S. H. y Kim, S. D. (2012). The individual and population effects of tetracycline on *Daphnia magna* in multigenerational exposure. *Ecotoxicology*, 21, 993-1002.
- Kümmerer, K. (2003). Significance of antibiotics in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52, 5–7.
- Kümmerer, K. (2009). Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. *Chemosphere*, 75, 417-434.
- Krebs, C. J. (1985). Ecology. *The experimental analysis of distribution and abundance*. New York: Harper & Row.
- Laws, A. E. (1981). *Aquatic pollution*. EUA: Wiley Interscience Publication.
- Lindsey, M. E., Meyer, M., & Thurman, E. M. (2001). Analysis of trace levels of sulfonamide and tetracycline antimicrobials in groundwater and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 73(19), 4640-4646.
- Marin-Morales, M. A., Campos-Pereira, F. D., Flores Navarro, F. y Aparecida de Oliveira, J. (2016). Ecotoxicological impact of pharmaceuticals for human use in aquatic systems. En Hudson, P. y Brayner, R. (Eds.), *Aquatic Toxicology* (1-20). USA: OMICS Group eBooks.
- Murray, K. E., Thomas, S. M. y Bodour, A. A. (2010). Prioritizing research for trace pollutants and emerging contaminants in the freshwater environment. *Environmental Pollution*, 158, 3462-3471.
- Norma Oficial Mexicana 001. Diario Oficial de la Federación, D.F., México, 6 de Enero 1996.
- Ortiz-Islas, R. (2001). *Estudio de utilización de antibióticos en el Servicio de Medicina Interna del Hospital del Niño DIF Hidalgo*. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Hidalgo.
- Pavón, L. E., S.S.S. Sarma y S. Nandini. (2001). Effect of different densities of live and dead *Chlorella vulgaris* on the population growth of rotifers *Brachionus*

calyciflorus and *Brachionus patulus* (rotifera). *Revista de biología tropical*, 49, 895-902.

- Pavón Meza, E. L., Sarma, S. S. S. y Nandini, S. (2004). Combined effects of food (*Chlorella vulgaris*) concentration and temperature on the population growth of *Brachionus havanaensis* (Rotifera: Brachionidae). *Journal of Freshwater Ecology*, 19 (4), 521-530.
- Pelaez, R. (2015). Acute effects of tetracycline on *Lemna minor* and *Daphnia pulex*. *ESSAI*, 13 (33), 105-107.
- Pomati, F., Netting, A. G., Calamari, D. y Neilan, B. A. (2004). Effects of erythromycin, tetracycline and ibuprofen on the growth of *Synechocystis* sp. and *Lemna minor*. *Aquatic Toxicology*, 67, 387-396.
- Repetto, M. y Sanz, P. (1995). *Glosario de términos toxicológicos*. España.
- Rico-Martínez, R., Arzate-Cárdenas, M. A., Robles-Vargas, D., Pérez-Legaspi, I. A., Alvarado-Flores, J. y Santos-Medrano, G. E. (2016). Rotifers as models in Toxicity screening of chemicals and environmental samples. En Larramendy, M. L. y Soloneski, S. (Eds.), *Invertebrates-experimental models in toxicity screening* (57-100). Croacia: InTech DTP team.
- Robledo Zacarías, V. H., Velázquez Machuca, M. A., Montañez Soto, J. L. Pimentel Equihua, J. L., López Calvillo, M. D. y Venegas González J. (2017). Hidroquímica y contaminantes emergentes en aguas residuales urbano industriales de Morelia, Michoacán, México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 33 (2), 221-235.
- Rodríguez Rodríguez, M. A., González-Piñera, J. G., Barreto Penié, J., Lim Alonso, N., Areu, A. y Pardo Núñez, A. (1998). Tetraciclinas. *Acta médica*, 8 (1), 75-79.
- Rosal, R., Rodríguez, A., Perdigón-Meló, J. A., Petre, A., Roefer, P., Synder, S., Zegers, R. E., Rexing, D. J. y Fronk, J. L. (2010). Endocrine disrupting chemicals in a source water. *Journal American Water Works Association*, 92, 52-58.
- Sarma, S. S. S. y Rao, T. R. (1990). Population dynamics of *Brachionus patulus* Muller (Rotifera) in relation to food and temperature. *Animal Science*, 99 (4), 335-343.
- Sarma, S. S. S. (2000). The use of rotifers for ecotoxicological studies in Mexico. En Ríos-Jara, Juárez-Carrillo, Pérez-Peña, M., López-Uriarte, E., Robles-Jarero, E. G., Hernández-Becerril D. U., y Silva Briano (Eds.), *Estudios sobre plancton en México y el Caribe* (8-11). México: Sociedad Mexicana de Planctología y Universidad de Guadalajara.
- Sarma, S. S. S., Gulati, R.D., Nandini, S. (2005). Factors affecting egg-ratio in planktonic rotifers. *Hydrobiologia*, 546, 361-373.
- Sarma, S. S. S., Brena-Bustamante, P. y Nandini, S. (2008). Body size and population growth of *Brachionus patulus* (Rotifera) in relation to heavy metal (copper and

mercury) concentrations. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 43(5): 547-553.

Sarma, S. S. S. y Nandini, S. (2017). *Rotíferos mexicanos*. Universidad Nacional Autónoma de México. México: Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Sarma, S. S. S., Nandini, S., Miracle, M. R. y Vicente, E. (2019). Effect of a cyanobacterial diet on the competition between rotifers: a case study in Lake Albufera of Valencia, Spain. *Limnetica*, 38(1): 279-289.

Secretaría de Economía. (2013). *Industria farmacéutica, unidad de inteligencia de negocios*. México: ProMéxico.

Segers, H. The nomenclature of the rotifera: Annotated checklist of valid family-and genus-group names. *Journal of Natural History*, 36, 631-640.

Smilack, J. D. (1999). The tetracyclines. *Mayo Clinic Proceedings*, 74, 727-729.

Snell, T.W. y Moffat, B.D. (1992). A 2-d life cycle test with the rotifer *Brachionus calyciflorus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11, 1249-1257.

Teijon, G., Candela, L., Tamoh, K., Molina-Días, A. y Fernández-alba, A. R. (2010). Occurrence of emerging contaminants, priority substances (2008/105/CE) and heavy metals in treated wastewater and groundwater at Depurbaix facility. *Science of the Total Environment*, 408, 3584-3595.

Tijani, J. O., Fatoba, O. O. y Petrik, L. F. (2013). A Review of Pharmaceuticals and Endocrine-Disrupting Compounds: Sources, Effects, Removal, and Detections. *Water Air and Soil Pollution*, 224 (1770), 1-29.

Vicente, D. y Pérez-Trallero, E. (2010). Tetraciclinas, sulfonamidas y metrodinazol. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*.

Wen-Jing, D., Na, L. y Guang-Guo, Y. (2018). Antibiotic distribution, risk assessment, and microbial diversity in river water and sediment in Hong Kong. *Environmental Geochemistry and Health*, 40(5), 2191-2203.

Wollenberger, L., Halling-Sørensen, B. y Kusk, K. O. (2000). Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 40, 723-730.