



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

Efecto de cianobacterias del embalse Valle de Bravo, y microplásticos sobre la demografía y comportamiento alimentario de *Brachionus calyciflorus* y *Brachionus havanaensis* (Rotifera).

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

(Limnología)

PRESENTA:

Biol. Carlos Sánchez Zamora

TUTORA PRINCIPAL:

Dra. Nandini Sarma

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

COMITÉ TUTOR:

Dr. Pedro Ramírez García

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Dr. Gopal Murugan

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Dra. Patricia Bonilla Lemus

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Dr. Sergio Cházaro Olvera

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

CDMX, NOVIEMBRE, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



Efecto de cianobacterias del embalse Valle de Bravo, y microplásticos sobre la demografía y comportamiento alimentario de *Brachionus calyciflorus* y *Brachionus havanaensis* (Rotifera).

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

(Limnología)

PRESENTA:

Biol. Carlos Sánchez Zamora

TUTORA PRINCIPAL:

Dra. Nandini Sarma

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

COMITÉ TUTOR:

Dr. Pedro Ramírez García

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Dr. Gopal Murugan

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Dra. Patricia Bonilla Lemus

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Dr. Sergio Cházaro Olvera

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

MÉXICO, CDMX., NOVIEMBRE, 2021

Dedicatoria

A mi familia:

Toda mi familia me ha apoyado y animado en la realización de esta tesis, pero quiero dar un reconocimiento especial a algunos integrantes por todo lo que me han dado a lo largo de los años.

A mis padres Rosalba Zamora González y Carlos Manuel Sánchez Yoval, sin ellos no estaría aquí, gracias por la infinidad de enseñanzas, entre ellas enseñarme que “las cosas se hacen bien o mejor no se hacen”.

A mi hermana Libertad Sánchez Zamora que como mi segunda mamá me ha enseñado desde que tengo uso de razón, te debo mucho. Gracias por enseñarme que “las ratas no tienen alas”.

También a mi cuñado Raúl Hernández González por todas las pláticas nocturnas donde filosofamos de la vida.

Y claro, a los nuevos integrantes de la familia, a mis sobrinos Yoalli y Noah, que con su sonrisa hacen deslumbrar mi vida.

También quiero hacer un agradecimiento especial a una persona que hoy ya no está con nosotros, mi prima Evelyn Irán Zamora González. Gracias por recurrir a mí con tus dudas, me divertí mucho enseñándote y compartiendo mi fascinación por el universo, siempre te llevaré conmigo.

“Science, my lad, is made up of mistakes, but they are mistakes which it is useful to make, because they lead little by little to the truth.”

-Jules Verne-

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, principalmente a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala y al Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, por la oportunidad de realizar un posgrado y desarrollarme como un profesional de la biología.

A la Dra. Nandini Sarma, por todos estos años de conocerla, en los que he aprendido de ella para poderme desenvolver en esta rama de la biología. Cada regaño y cada reconocimiento que me ha brindado ha ayudado a mejorar cada vez más como profesionista y como persona. Gracias.

A los integrantes de mi comité tutor: Dr. Pedro Ramírez García, Dr. Gopal Murugan, Dra. Patricia Bonilla Lemus y al Dr. Sergio Cházaro Olvera, por el tiempo y los comentarios brindados en este trabajo con el fin de pulirlo.

Al Dr. S.S.S. Sarma, por abrirme las puertas de su laboratorio, sus enseñanzas y asesoramiento durante mi desarrollo en esta área del conocimiento.

A mis compañeros con los que comparto y compartí laboratorio. Gracias por todo (a pesar de que la pandemia nos evitó vernos con la regularidad con la que lo hacíamos): Nayely, Tony, Andy, Mayra, Cesar, Mich, Toño, Lety, Meetz, Ron, Sara, Salma, José Luis, Noemí, Rosa, Paulo, Evelyn

A mis amigos que más que mis amigos son mi familia: Rafa, Priscila, Sam, Adrian, Oscar, Bruno, Yunuen, Ileri, Fer, Dino, Ian, Roy, Sareni, David, Pato y Darinka.

A CONACyT por la beca escolar (816524) y a PAPIIT (UNAM) IG200820.

ÍNDICE GENERAL

1. Resumen	1
1. Abstract	3
2. Introducción	5
3. Antecedentes	15
3.1 Cianobacterias y rotíferos	15
3.2 Microplásticos y rotíferos	16
3.3 Efectos multigeneracionales	18
4. Justificación	20
5. Hipótesis	22
6. Objetivos	22
6.1. Generales:	22
6.2. Particulares:	22
7. Área de estudio	24
8. Materiales y métodos	26
8.1. Obtención de la muestra de cianobacteria	26
8.2. Identificación y cuantificación de las cianobacterias	26
8.3. Medición de equivalentes de microcistinas	26
8.4. Preparación de solución stock microplásticos	27
8.5. Cultivo de organismos	27
8.6. Pruebas de toxicidad aguda	28
8.6.1. Concentración letal media (CL ₅₀) en <i>B. calyciflorus</i>	28
8.6.2. Concentración letal media en <i>B. havanaensis</i>	29
8.7. Pruebas de toxicidad crónica	32
8.7.1. Tabla de vida demográfica multigeneracional en <i>B. calyciflorus</i>	32
8.7.2. Tabla de vida demográfica de dos clones de <i>B. havanaensis</i>	33
8.8. Experimentos de alimentación	34
8.9. Análisis de datos	36
9. Resultados	37
9.1. Cuantificación de cianobacterias	37
9.1.1. Muestra de florecimiento de cianobacterias de octubre del 2018	37
9.1.2. Muestra de florecimiento de cianobacterias de febrero del 2020	37
9.2. Medición de equivalentes de microcistinas	38

9.3. Pruebas de toxicidad aguda.....	39
9.3.1. Concentración letal media (CL ₅₀) en <i>B. calyciflorus</i>	39
9.3.2. Concentración letal media en <i>B. havanaensis</i>	41
9.4. Pruebas de toxicidad crónica.....	42
9.4.1. Tabla de vida demográfica multigeneracional en <i>B. calyciflorus</i>	42
9.4.2. Tabla de vida demográfica de dos clones de <i>B. havanaensis</i>	47
9.5. Experimentos de alimentación.....	52
9.5.1. Tasa de alimentación	52
9.5.2. Tasa de aclaramiento	53
10. Discusión	56
11. Conclusiones	74
12. Literatura citada	75

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1** Embalse de Valle de Bravo, Estado de México, y los cinco efluentes que entran en el embalse..25
- Figura 2** Diseño de las pruebas de toxicidad aguda CL₅₀ con diferentes concentraciones de equivalentes de microcistinas del extracto crudo de cianobacterias en los rotíferos *B. calyciflorus* y *B. havanaensis*. Cuatro repeticiones por tratamiento, incluyendo el grupo control.....30
- Figura 3** Diseño de las pruebas de toxicidad aguda CL₅₀ con diferentes concentraciones de microplásticos de poliestireno y a la combinación de microplásticos con concentraciones subletales del extracto crudo de cianobacterias (0.256 y 1.024 µg/L de equivalentes de microcistinas) en el rotífero *B. calyciflorus*. Cuatro repeticiones por tratamiento, incluyendo el grupo control. La densidad de los microplásticos es expresada en mg/L, mientras que la concentración de extracto crudo en µg/L ..31
- Figura 4** Diseño de la prueba de toxicidad crónica tabla de vida demográfica multigeneracional (F₀ y F₁) en *B. calyciflorus*. Con diferentes concentraciones subletales de extracto crudo de cianobacterias seleccionadas a partir del CL₅₀ obtenido anteriormente. Cuatro repeticiones por tratamiento incluyendo el control.....33
- Figura 5** Diseño de la prueba de toxicidad crónica tabla de vida demográfica en dos poblaciones de *B. havanaensis* con diferentes concentraciones subletales de extracto crudo de cianobacterias obtenidas a partir del CL₅₀ obtenido anteriormente. Cuatro repeticiones por tratamiento incluyendo el control.....34
- Figura 6** Diseño de los experimentos de alimentación *B. calyciflorus* expuesto a extracto crudo de cianobacterias (**A y B**), microplásticos (**C**) y a la combinación de extracto crudo con microplásticos (**D y E**). Las concentraciones de extracto crudo utilizadas son de equivalentes de microcistinas. Cuatro repeticiones por tratamiento incluyendo el control, además, cada tratamiento cuenta con un blanco, el cual tiene el tratamiento sin rotíferos. La densidad de los microplásticos es expresada en mg/L, mientras que la concentración de extracto crudo en µg/L.36
- Figura 7** Especies de cianobacterias encontradas en las muestras obtenidas del embalse de Valle de Bravo, Estado de México. *Microcystis aeruginosa* (**A**), *Dolichospermum planctonicum* (**B**), *Woronichinia naegeliana* (**C**), *Lyngbya birgei* (**D**), *Microcystis wesenbergii* (**E**)38
- Figura 8** CL₅₀ del extracto crudo de cianobacterias en adultos y neonatos de *B. calyciflorus*. La mortalidad representa el porcentaje promedio de hembras que sobrevivieron después de 24 horas de exposición a las condiciones de la prueba. Las concentraciones de extracto crudo utilizadas son de equivalentes de microcistinas presentes en el extracto crudo de cianobacterias utilizado.39
- Figura 9** CL₅₀ de microplásticos en *B. calyciflorus*. La mortalidad representa el porcentaje promedio de hembras que sobrevivieron después de 24 horas de exposición a las condiciones de la prueba. ...40
- Figura 10** CL₅₀ de microplásticos en combinación con dos concentraciones subletales del extracto crudo de cianobacterias de Valle de Bravo en *B. calyciflorus*. La mortalidad representa el porcentaje promedio de hembras que sobrevivieron después de 24 horas de exposición a las condiciones de la prueba. Las concentraciones de extracto crudo utilizadas son de equivalentes de microcistinas presentes en el extracto crudo de cianobacterias utilizado.41
- Figura 11** Toxicidad de extracto crudo de cianobacterias a dos clones de *B. havanaensis*. La mortalidad representa el porcentaje promedio de hembras que sobrevivieron después de 24 horas de

exposición a las condiciones de la prueba. Las concentraciones utilizadas son de equivalentes de microcistinas presentes en el extracto crudo de cianobacterias utilizado.	42
Figura 12 Supervivencia de dos generaciones de <i>B. calyciflorus</i> expuesto a tres concentraciones subletales obtenidas a partir del CL ₅₀ del extracto crudo de cianobacterias. Las concentraciones utilizadas son de equivalente de microcistinas presentes en el extracto crudo de cianobacterias utilizado. Los puntos negros son la F ₀ , mientras que los puntos blancos son la F ₁	43
Figura 13 Fecundidad de dos generaciones de <i>B. calyciflorus</i> expuesto a tres concentraciones subletales obtenidas a partir del CL ₅₀ del extracto crudo de cianobacterias. Las concentraciones utilizadas son de equivalente de microcistinas presentes en el extracto crudo de cianobacterias utilizado. Los puntos negros son la F ₀ , mientras que los puntos blancos son la F ₁	44
Figura 14 Variables demográficas derivadas de la supervivencia y fecundidad de dos generaciones de <i>B. calyciflorus</i> expuesto a tres concentraciones de extracto crudo de cianobacterias. Las concentraciones utilizadas son de equivalente de microcistinas presentes en el extracto crudo de cianobacterias utilizado. Las barras rojas son de la F ₀ , mientras que las naranjas son de la F ₁ . Las diferentes letras señalan las diferencias significativas.	47
Figura 15 Supervivencia de dos clones de <i>B. havanaensis</i> expuesto a dos concentraciones subletales obtenidas a partir del CL ₅₀ de extracto crudo de cianobacteria. El clon de Cuemanco tuvo una baja exposición a cianobacterias, mientras que el clon de Pista tuvo una exposición alta a cianobacterias. Las concentraciones utilizadas son de equivalente de microcistinas presentes en el extracto crudo de cianobacterias utilizado	48
Figura 16 Fecundidad de dos clones de <i>B. havanaensis</i> expuesto a dos concentraciones subletales obtenidas a partir del CL ₅₀ de extracto crudo de cianobacteria. Las concentraciones utilizadas son de equivalente de microcistinas presentes en el extracto crudo de cianobacterias utilizado.....	49
Figura 17 Variables demográficas derivadas de la supervivencia y fecundidad del clon de <i>B. havanaensis</i> de Cuemanco expuesto a dos concentraciones de extracto crudo de cianobacterias. Las concentraciones utilizadas son de equivalente de microcistinas presentes en el extracto crudo de cianobacterias utilizado. Las diferentes letras señalan las diferencias significativas.....	51
Figura 18 Variables demográficas derivadas de la supervivencia y fecundidad del clon de <i>B. havanaensis</i> de Pista expuesto a dos concentraciones de extracto crudo de cianobacterias . Las concentraciones utilizadas son de equivalente de microcistinas presentes en el extracto crudo de cianobacterias utilizado. Las diferentes letras señalan las diferencias significativas.....	52
Figura 19 Tasa de alimentación de <i>Brachionus calyciflorus</i> alimentado con <i>Chlorella vulgaris</i> en presencia de dos concentraciones subletales de extracto crudo de cianobacterias seleccionadas a partir del CL ₅₀ , microplásticos y la combinación de ambos. La densidad de los microplásticos es expresada en mg/L, mientras que la concentración de extracto crudo en µg/L. Las diferentes letras señalan las diferencias significativas.....	53
Figura 20 Tasa de aclaramiento de <i>Brachionus calyciflorus</i> alimentado con <i>Chlorella vulgaris</i> en presencia de dos concentraciones subletales de extracto crudo de cianobacterias seleccionadas a partir del CL ₅₀ , microplásticos y la combinación de ambos. La densidad de los microplásticos es expresada en mg/L, mientras que la concentración de extracto crudo en µg/L. Las diferentes letras señalan las diferencias significativas.....	54
Figura 21 <i>Brachionus calyciflorus</i> con microplásticos en el tracto digestivo.	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Géneros de cianobacterias productores de cianotoxinas y potencialmente formadores de florecimientos. (Catherine <i>et al.</i> , 2013; Buratti <i>et al.</i> , 2017)	7
Tabla 2 Límites permisibles establecidos para prevenir un posible efecto negativo en la salud humana producido por MC-LR. (WHO 1998; EPA, 2015, 2016; SAGARPA, 2017)	8
Tabla 3 Conteo de colonias de cianobacterias por mililitro en la muestra de Valle de Bravo, Estado de México, en octubre del 2018.....	37
Tabla 4 Conteo de colonias de cianobacterias por mililitro en la muestra de Valle de Bravo, Estado de México, en febrero del 2020.	38

1. Resumen

El aumento del proceso de eutrofización invariablemente conduce a la proliferación de cianobacterias, las cuales producen metabolitos secundarios tóxicos (cianotoxinas) que frecuentemente tiene efectos adversos sobre el zooplancton. En el escenario actual de eutrofización y cambio climático, los eventos de florecimientos de cianobacterias pueden durar un tiempo prolongado. Además, junto con el aporte de nutrientes, otros contaminantes antropogénicos, en particular plásticos, ingresan a estos ecosistemas. Los plásticos macro (> 5 mm) y micro (<5 mm) provocan interferencias mecánicas o tienen un efecto tóxico sinérgico con otros contaminantes. En este trabajo se evaluaron los efectos de diferentes concentraciones de extracto crudo de cianobacterias, microplásticos y la mezcla de ambas sobre diferentes aspectos de los rotíferos *Brachionus calyciflorus* y *B. havanaensis*. Para obtener el extracto crudo se filtraron 100 L de agua del embalse de Valle de Bravo, a esto se le estimó la densidad y diversidad de cianobacterias. Después de cinco ciclos de congelación, descongelación y sonicación a 14 MHz, se filtró y se cuantificó la concentración de microcistina basándose en la técnica de ELISA. Una de las muestras estuvo dominada por *Woronichinia naegeliana*, mientras que la otra por *Dolichospermum planctonicum*. También se utilizaron microplásticos esféricos de poliestireno (30 µm, SIGMA). En *B. havanaensis* se determinaron los efectos agudos y crónicos provocados por el extracto crudo de cianobacterias en dos clones de esta especie, un clon de un lugar con poca presencia de cianobacterias, mientras el otro, de un lugar con alta densidad de cianobacterias. Con respecto a *B. calyciflorus* se realizaron pruebas agudas y pruebas crónicas multigeneracionales con exposición a extracto crudo de cianobacterias. Asimismo, se realizaron pruebas agudas y experimentos de alimentación en *B. calyciflorus* con presencia de microplásticos, extracto crudo y la combinación de ambos. En los experimentos con *B. havanaensis* se encontró que el CL₅₀ para cada clon fue diferente, siendo mayor la sensibilidad en el clon que no había sido expuesto a altas concentraciones de cianobacterias (34.25 y 42.6 µg/L, respectivamente), además, en las pruebas crónicas se mantuvo la misma tendencia al ser menos sensible a comparación del clon expuesto a

baja densidad de cianobacterias. En *B. calyciflorus* se observó algo similar, donde una segunda generación tuvo un mejor desempeño en supervivencia y fecundidad en comparación a la generación inicial (con un valor de r de 0.19 a 0.24 en la F_0 y de 0.16 a 0.42 en la F_1). La CL_{50} para *B. calyciflorus* para los microplásticos fue de 21.91 mg/L mientras que la mezcla de microplásticos y extracto crudo de cianobacterias resultó en un mayor efecto letal de los microplásticos con una CL_{50} de 16.64 mg/L. En los experimentos de alimentación se mostró una disminución parecida en la alimentación y en el aclaramiento cuando se utilizaron por separado el extracto crudo y los microplásticos, mientras que cuando se utilizaron combinados se pudo apreciar una disminución mayor. Los resultados obtenidos en este trabajo destacan los efectos que pueden generar las cianobacterias en rotíferos, además de los efectos negativos de los microplásticos y la sinergia que pueden presentar con otro factor estresante en el agua.

1. Abstract

Eutrophication often leads to the proliferation of cyanobacteria, which produce toxic secondary metabolites (cyanotoxins) that frequently have adverse effects on zooplankton. In the current scenario of eutrophication and climate change, cyanobacterial blooms can last longer. Along with the input of nutrients, other anthropogenic pollutants such as plastics enter these ecosystems. Macro (>5 mm) and micro (<5 mm) plastics cause mechanical interference or have a synergistic effect with other pollutants. In this study, different concentrations of cyanobacterial crude extracts, microplastics and a mixture of both were evaluated on the demography of the rotifers *Brachionus calyciflorus* and *B. havanaensis*. To obtain the crude extract, 100 L of water from the Valle de Bravo reservoir was filtered; the density and diversity of cyanobacteria were estimated. After five cycles of freezing, thawing and sonication at 14 MHz, the microcystin concentration was quantified based on the ELISA technique. One sample was dominated by *Woronichinia naegeliana*, while the other by *Dolichospermum planctonicum*. The combined effect of the cyanotoxins and spherical polystyrene microplastics (30 µm, SIGMA) was also tested. In *B. havanaensis*, the acute and chronic effects caused by the cyanobacterial crude extract were determined in two clones of this species, one clone from a site with low concentrations of cyanobacteria, and the other from a site with a high density of cyanobacteria. Acute and chronic multigenerational tests were carried out with the crude extract on *B. calyciflorus*. Also, acute and feeding tests were carried out in *B. calyciflorus* with microplastics, crude extracts and a mix of both. Acute toxicity tests show that the clone of *B. havanaensis* previously not exposed to cyanobacteria was more sensitive to cyanotoxins than the clone from the site with dense cyanobacterial blooms (34.25 and 42.6 µg/L, respectively). Similar trends were observed in the chronic bioassays. In the multigenerational study on *B. calyciflorus* it was observed that the second generation, previously exposed to the toxins, had a better performance in survival and fecundity compared to the original generation (r value range 0.19 to 0.24 in F₀ and 0.16 to 0.42 in F₁). The LC₅₀ for *B. calyciflorus* with microplastics was 21.91 mg/L while the mixture of microplastics and crude extract of cyanobacteria resulted in a greater lethal effect of microplastics with an LC₅₀ of 16.64 mg/L. In feeding experiments, a decrease in feeding and clearance rate was observed when the crude extract and microplastics were used separately, while in combination, the adverse effect was more pronounced. The results obtained in this work highlight the effects that cyanobacteria provoke in rotifers, in addition to the

negative effects of microplastics and the synergistic interactions due to the presence of multiple stressors in aquatic ecosystems.

2. Introducción

El agua es ampliamente considerada como uno de los recursos naturales más esenciales, sin embargo, está directa e indirectamente amenazada por actividades antropogénicas; a través del cambio de uso de suelo, urbanización, industrialización, construcción de reservorios, riego, transferencias entre cuencas para el acceso del humano al agua, entre otros (Schwarzenbach *et al.*, 2010; Vörösmarty *et al.*, 2010). Gran parte de los ecosistemas en la Tierra sufren algún tipo de perturbación, tanto por fuentes orgánicas como inorgánicas, y entre los ecosistemas, los de agua epicontinental enfrentan un declive cinco veces mayor de la biodiversidad que los ecosistemas terrestres (Ricciardi y Rasmussen, 1999; Altshuler *et al.*, 2011).

Entre las perturbaciones que provocan una disminución de la diversidad está la eutrofización, proceso por el cual aumenta la cantidad de nutrientes (principalmente fósforo y nitrógeno) ya sea de forma natural o como sucede actualmente debido a las actividades antropogénicas (Patricia *et al.*, 2005; Huntington, 2006). Como resultado de este proceso hay una fuerte proliferación de organismos fitoplanctónicos (también llamado florecimiento), entre los cuales se encuentran las cianobacterias (Bartram *et al.*, 1999; Okumura *et al.*, 2007). Además, en conjunto con el aumento de la temperatura, debido al calentamiento global, se ha aseverado la frecuencia e intensidad de florecimientos de cianobacterias (Jöhnk *et al.*, 2008; Paerl y Huisman, 2008; Rigosi *et al.*, 2014).

Las cianobacterias, o también llamadas algas verde-azules, son un grupo muy antiguo, diverso y abundante de organismos, los cuales poseen una estructura celular procariota, además de tener capacidad autotrófica. Producen clorofila *a* como pigmento fotosintético, además de producir ficocianina, el cual les da una coloración verde-azul. El origen de este grupo se data cerca de 3500 millones de años, esta antigüedad ha permitido su distribución cosmopolita, habitando en distintos ambientes (tanto terrestres como acuáticos) y bajo diversas condiciones que podrían considerarse adversas (p.ej. altos valores de alcalinidad y temperatura) (Whitton y Potts, 2012). Su intervalo óptimo de

crecimiento está entre los 20 y 35°C, creciendo mejor a altas temperaturas que otros organismos del fitoplancton (You *et al.*, 2017).

La constante presencia de estos organismos puede tener tanto efectos negativos en el ecosistema, como también tener afecciones en la salud de la población humana, ya que estos organismos producen metabolitos secundarios tóxicos tanto para los animales terrestres y acuáticos, como también para los humanos (Huisman *et al.*, 2018; Svirčev *et al.*, 2017). Estos metabolitos secundarios presentan una gran variedad de estructuras químicas (Carmichael *et al.*, 2001). Entre estas, las más conocidas son las llamadas cianotoxinas, esto debido a los efectos negativos que provocan principalmente en mamíferos, aunque también tienen efecto en organismos como: aves, peces, plantas, zooplancton, bacterias, etc. (Yadav *et al.*, 2011; Ferrão-Filho y Kozlowsky-Suzuki, 2011; El Khalloufi *et al.*, 2012; Nováková *et al.*, 2012). El aumento mundial en los reportes de florecimientos de cianobacterias es una problemática que también incluye a México, con diversos géneros de cianobacterias con potencial para formar florecimientos (Tabla 1). De los cuerpos de agua que tienen esta problemática, muchos son usados para agricultura, recreación y/o fuentes de agua potable (Vasconcelos *et al.*, 2010).

Tabla 1 Géneros de cianobacterias productores de cianotoxinas y potencialmente formadores de florecimientos. (Catherine *et al.*, 2013; Buratti *et al.*, 2017).

Género de cianobacteria	Cianotoxina producida
<i>Anabaena</i> *	Microcistinas, Cylindroespermopsinas, Anatoxina-a, Saxitoxinas, Lipopolisacáridos
<i>Anabaenopsis</i>	Microcistinas, Lipopolisacáridos
<i>Aphanizomenon</i>	Cilindroespermopsinas, Anatoxina-a, Saxitoxinas, Lipopolisacáridos
<i>Aphanocapsa</i>	Microcistinas, Lipopolisacáridos
<i>Arthrospira</i>	Microcistinas, Lipopolisacáridos
<i>Chrysoosporum</i>	Cilindroespermopsinas, Lipopolisacáridos
<i>Cuspidothrix</i>	Anatoxina-a, Saxitoxinas, Lipopolisacáridos
<i>Cylindroespermopsis</i> *	Cilindroespermopsinas, Saxitoxinas, Lipopolisacáridos
<i>Dolichospermum</i> *	Microcistina, Anatoxina-a, Anatoxina-a(s), Saxitoxinas, Lipopolisacáridos
<i>Gloeotrichia</i>	Microcistinas, Lipopolisacáridos
<i>Leptolyngbya</i>	Microcistinas, Lipopolisacáridos
<i>Lyngbya</i>	Microcistinas, Saxitoxinas, Cilindroespermopsinas, Lipopolisacáridos
<i>Microcystis</i> *	Microcistinas, BMAA, Lipopolisacáridos
<i>Nodularia</i>	Microcistinas, Nodularinas, Lipopolisacáridos
<i>Nostoc</i> *	Microcistinas, BMAA, Lipopolisacáridos
<i>Oscillatoria</i> *	Anatoxina-a, Cilindroespermopsinas, Lipopolisacáridos
<i>Phormidium</i>	Microcistinas, Anatoxina-a, Homonatoxina-a, Lipopolisacáridos
<i>Planktothrix</i> *	Microcistinas, Lipopolisacáridos
<i>Plectonema</i>	Microcistinas, Lipopolisacáridos
<i>Pseudanabaena</i> *	Microcistinas, Lipopolisacáridos
<i>Raphidiopsis</i>	Cilindroespermopsinas, Lipopolisacáridos
<i>Scytonema</i>	Saxitoxinas, Lipopolisacáridos
<i>Synechococcus</i> *	Microcistinas, Lipopolisacáridos
<i>Woronichinia</i> *	Microcistinas, Microgininas, Lipopolisacáridos

***Presentes en México**

Los compuestos producidos por las cianobacterias pueden ser clasificados de acuerdo con su estructura en; péptidos cíclicos (microcistinas, p. ej. MC-LR), alcaloides (anatoxinas, p. ej. anatoxina-a), y lipopolisacáridos (Whitton y Potts, 2012). Derivado de esta problemática, diversas instituciones han establecido límites permisibles de MC-LR para agua de uso recreacional y de consumo humano (Tabla 2).

Tabla 2 Límites permisibles establecidos para prevenir un posible efecto negativo en la salud humana producido por MC-LR. (WHO 1998; EPA, 2015, 2016; SAGOB, 2017).

Organización/País	Uso	Límite permisible
OMS	Consumo	1 µg/L
	Recreacional	<10 µg/L (Bajo)
		10-20 µg/L (Moderado)
		20-2000 µg/L (Alto)
		>2000 µg/L (Muy alto)
EPA	Consumo	0.7 µg/L (Personas < 6 años)
		3 µg/L (Personas > 6 años)
	Recreacional	8 µg/L
México	Consumo y recreacional	1 µg/L

En los sistemas acuáticos, el aumento en la densidad de este grupo de organismos representa un desbalance en la estructura y funcionamiento del ecosistema. Los florecimientos de cianobacterias pueden bloquear la entrada de luz al agua afectando a otros organismos fitoplanctónicos, además la muerte y posterior descomposición del florecimiento suele conducir a una disminución en la concentración de oxígeno disuelto en estos sistemas (Camargo *et al.*, 2007). También afecta directamente al zooplancton fitoplanctívoro, el cual es la base del flujo de energía (Hansson *et al.*, 2007; Tillmanns *et al.*, 2008). Aunque, no sólo afecta al zooplancton por la producción de sustancias tóxicas, también son conocidas por ser bajas en contenido nutricional, ser de difícil consumo por la formación de largos filamentos o colonias, además de la producción de mucílago (Rohrlack *et al.*, 1999; Alva-Martínez *et al.*, 2009).

Los trabajos que se han realizado sobre la interacción de las cianobacterias con zooplancton han sido mayormente enfocados a exposiciones cortas, de una sola generación en diferentes aspectos de su ciclo de vida como: alimentación, demografía, comportamiento, etc. (Gilbert, 1996; Ferrão-Filho y Azevedo, 2003; Ghadouani *et al.*, 2004; Haney y Lampert, 2013). En estos trabajos se ha determinado que pueden producir inhibición de la alimentación, disminución en la supervivencia y fecundidad, entre otros (Nandini *et al.*, 2000; Hochmuth *et al.*, 2014). No obstante, algunas especies pueden

responder de manera diferente a la presencia de las cianobacterias o de las sustancias producidas por éstas, al tener adaptaciones conductuales o fisiológicas, lo cual les permite aumentar la posibilidad de coexistir (Sarnelle y Wilson, 2005). Por lo que, el daño podría ser menor en organismos que en su hábitat natural cohabitan naturalmente con las cianobacterias (Gustafsson y Hansson, 2004).

De manera común, los trabajos sobre la interacción entre diferentes organismos pertenecientes al zooplancton y la toxicidad de las cianobacterias se realizan teniendo en cuenta sólo un clon de la especie usada. Sin embargo, en un mismo sistema interactúan diferentes clones de una misma especie (Hebert y Crease, 1980). Si bien, cada grupo de organismos e incluso cada especie responde diferente a los cambios ambientales, la variabilidad de clones es identificada como un factor de adaptación (Hietala *et al.*, 1997; Rossi *et al.*, 2006). Este tipo de adaptaciones y de diferencia entre clones se ha visto que también ocurre en la interacción de zooplancton y cianobacterias (Hairston *et al.*, 2001).

Además de la introducción antropogénica de nutrientes, la introducción de productos creados por el humano provoca perturbaciones en los ecosistemas, debido a su uso cotidiano y mal manejo de los residuos (Driedger *et al.*, 2015). Los materiales que mayormente entran en los cuerpos de agua son los plásticos. Estos son polímeros sintéticos principalmente derivados de aceites y gases de hidrocarburos, comúnmente combinados con una gran variedad de químicos, para hacerlos más fuertes, duraderos, ligeros y baratos (Andrady y Neal, 2009). Debido a su variado uso en actividades humanas (Fendall y Sewell, 2009) la producción de este material no ha dejado de aumentar desde sus inicios en los 1900's (Piringer y Baner, 2008). Entre los más comunes se encuentran los hechos a partir de monómeros de hidrocarburos; polipropileno (PP), polietileno (PE), poliestireno (PS) y policloruro de vinilo (PVC) (Peller *et al.*, 2020).

La producción global de plásticos es estimada en cerca de 359 millones de toneladas por año, siendo Asia (principalmente China) el mayor productor, seguido de América del Norte y Europa (Plastics Europe, 2019). Parte de estos pueden ser directa o indirectamente introducidos en océanos y cuerpos de agua epicontinentales (Shahul Hamid *et al.*, 2018; Alimba y Faggio, 2019). La mayor cantidad proviene de fuentes terrestres (p. ej.:

escorrentía de ríos y lluvia, transporte de basura por viento, turismo y descargas de aguas residuales), lo cual está directamente relacionado con la densidad poblacional de la zona (Browne *et al.*, 2011; Avio *et al.*, 2017). Son clasificados en tres categorías con respecto a su tamaño: macro (> 5 mm), micro (< 5 mm) (Barnes *et al.*, 2009) y nano (1 μm - 100 nm) (Bergami *et al.*, 2016).

Los microplásticos, además de encontrarse en sistemas naturales, se han registrado tanto en industria alimentaria como en tratamiento de aguas (Van Wezel *et al.*, 2016; Toussaint *et al.*, 2019; Shruti *et al.*, 2020 a, b). Estos pueden entrar de dos formas; de manera primaria, directamente como partículas pequeñas (desperdicios industriales y productos de higiene personal y cosméticos) (Napper *et al.* 2015), o de manera secundaria, procedentes de objetos más grandes ya presentes y fragmentados por procesos químicos y mecánicos (Hidalgo-Ruz *et al.*, 2012; Auta *et al.*, 2017).

La disponibilidad de plásticos en sistemas acuáticos es un riesgo tanto para organismos de talla grande como peces (Sanchez *et al.*, 2014; Biginagwa *et al.*, 2016) así como para organismos filtradores no selectivos (Galloway *et al.*, 2017). El zooplancton, debido a su tipo de alimentación y tamaño de partícula podría potencialmente consumirlo (Rehse *et al.*, 2016; Ziajahromi *et al.*, 2017). Además del efecto mecánico en la ingesta, los plásticos pueden transportar distintos compuestos químicos (Barnes *et al.*, 2009; Teuten *et al.*, 2009). Asimismo, pueden acumular y mantener diversas sustancias con mejor eficacia que los sedimentos naturales (Teuten *et al.*, 2007).

El transporte de sustancias en plásticos se da de dos formas: absorción, la adición de la sustancia dada a la matriz absorbente (el plástico), que varía dependiendo de la porosidad de la matriz, manteniendo la sustancia por fuerzas de Van der Waals, que son relativamente débiles (Mayer *et al.*, 2000). O puede ser por adsorción, la adhesión de la sustancia en la superficie del material, involucrando diferentes fuerzas de interacción; fuerzas de Van der Waals, interacciones π - π , enlaces iónicos, estéricos y covalentes (Cornelissen *et al.*, 2005). La ingesta de microplásticos contaminados podría propiciar una vía alterna de exposición, teniendo efecto directo en los órganos, además las condiciones

ambientales (pH, temperatura, etc.) podrían tener un efecto en la liberación de los contaminantes en el organismo (Bakir *et al.*, 2014).

Los estudios en zooplancton se han realizado en cladóceros y rotíferos, viendo efectos en la ingesta, supervivencia y reproducción. Enfocándose principalmente en *Daphnia* (Rehse *et al.*, 2016; Canniff y Hoang, 2018; Beiras *et al.*, 2018), en el caso de cladóceros, aunque también hay en otros géneros de este grupo (Ziajahromi *et al.*, 2017). Mientras que en *Brachionus*, en el caso de rotíferos (Jeong *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2019), aunque poco en organismos dulceacuícolas (Xue *et al.*, 2020). Por otro lado, hay poca información de los efectos de la combinación de microplásticos con algún otro tóxico (Banaee *et al.*, 2019; Beiras *et al.*, 2018). Debido a que la interacción de contaminantes es común en cuerpos de agua (De Frond *et al.*, 2019), es importante estudiar el efecto provocado con sustancias tóxicas encontradas en cuerpos de agua, así como las cianotoxinas. Además, hay que tener en mente que la interacción entre contaminantes puede aumentar (sinergismo) o disminuir (antagonismo) la toxicidad (Sharma *et al.*, 1999). Por lo tanto, determinar si hay un efecto sinérgico es de vital importancia debido a la mayor frecuencia con la que se encuentran los plásticos en el medio ambiente.

El cómo los organismos se adaptan a los cambios ambientales ha sido objetivo de estudio desde hace tiempo, siendo el efecto materno uno de los importantes mecanismos que se han observado. El efecto materno es la habilidad que tienen las especies de alterar la expresión de los rasgos (plasticidad fenotípica) de la descendencia, en presencia de factores estresantes (Mousseau y Fox, 1998; Agrawal *et al.*, 1999; Tsui *et al.*, 2004; Chen y Stillman, 2012; Walsh *et al.*, 2014; Yin *et al.*, 2015). Con estos cambios, la progenie puede amortiguar cambios ambientales y aumentar la eficacia biológica (Burgess y Marshall, 2011). Estos cambios o adaptaciones pueden ser obtenidas en poco tiempo, y del mismo modo puede perderse. En zooplancton se ha visto que una tolerancia moderada puede ocurrir entre dos a tres meses (o alrededor de 5-10 generaciones) (Coldsnow *et al.*, 2017) y perderse en un tiempo similar (Jiang *et al.*, 2016). Aunque no siempre aumenta el desempeño de la progenie, a veces lo reduce para aumentar el periodo de vida de la madre (Marshall y Uller, 2007).

Los efectos de la preexposición de progenitores es un área de la ecotoxicología poco estudiada (Galus *et al.*, 2014). Tales efectos (multigeneracionales o transgeneracionales) son más fáciles de estudiar en el laboratorio con especies de ciclo de vida corto (Dietrich *et al.*, 2010), como lo son los miembros del zooplancton, a diferencia de organismos como los vertebrados. En el zooplancton, los trabajos sobre el efecto multigeneracional se han realizado con distintas sustancias tóxicas (metales pesados, disruptores endócrinos, insecticidas, cianotoxinas, etc.) sobre cambios en variables del ciclo de vida en diferentes especies de cladóceros (Tsui & Wang, 2004; Guan & Wang, 2006; Zaluzniak y Nuggeoda, 2006; Gama-Flores *et al.*, 2017) y rotíferos (Gilbert, 2002; Hagiwara *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2012; Heine-Fuster *et al.*, 2017; González-Pérez *et al.*, 2018). Aunque los trabajos donde se vieron efectos multigeneracionales de cianobacterias o cianotoxinas en su mayoría han sido realizados en cladóceros, un género específico, *Daphnia* (Gustafsson *et al.*, 2005; Ortiz-Rodríguez *et al.*, 2012; Lyu *et al.*, 2017; Dao *et al.*, 2010, 2018). En cuanto a rotíferos, el efecto en este grupo ha sido poco estudiado (Beyer y Hambright *et al.*, 2017).

Aunque en zooplancton se ha visto que la preexposición puede inducir tolerancia, en organismos como los invertebrados, la resistencia puede ser muy diferente, incluso entre especies (Roex *et al.*, 2000; Tillmanns *et al.*, 2008; Drugă *et al.*, 2016) que podría estar basado en diferencias genéticas de cada especie (Liu *et al.*, 2019). No obstante, poco es conocido acerca de cómo el zooplancton enfrenta la exposición constante a cianobacterias, ya que pueden tener duración de semanas o meses, durando varias generaciones (Mowe *et al.*, 2015). Se han observado efectos a largo plazo principalmente en supervivencia y fecundidad (Dao *et al.*, 2018; Beyer y Hambright *et al.*, 2017).

Se han observado que diferentes factores tienen relación con la adaptación de organismos del zooplancton frente a la toxicidad de cianobacterias, como cambios biomoleculares (p. ej. enzimas) (Blom *et al.*, 2006) o el efecto materno (Gustafsson *et al.*, 2005; Lyu *et al.*, 2016). Los cuales podrían estar relacionadas con las condiciones en su lugar de origen (Barrios *et al.*, 2017). La constante exposición de sustancias tóxicas de diferentes fuentes es costosa para los organismos, incluso a concentraciones subletales, ya que esto involucra diferentes mecanismos fisiológicos para desintoxicar y reparar heridas en los

tejidos, lo que descuida otros factores importantes en el ciclo de vida del organismo (van Straalen y Hoffmann, 2000; Newman, 2001). Las respuestas de los organismos expuestos a florecimientos de cianobacterias dependen de varios factores como: concentración de cianotoxina, frecuencia y duración de la exposición. Las características del florecimiento no son siempre las mismas, aunque su presencia puede ser constante (Alillo-Sánchez *et al.*, 2014). Además, los efectos directos e indirectos de cianotoxinas, está la posible sinergia con otras sustancias naturales o antropogénicas (Havens, 2008).

En ecotoxicología, el uso de organismos del zooplancton, en específico de rotíferos, es muy común debido a su importancia ecológica, desarrollo y reproducción rápida, además de su alta sensibilidad a sustancias tóxicas derivadas de otros organismos o de sustancias xenobióticas (Snell y Janssen, 1995). En específico el género de rotíferos *Brachionus* es ampliamente utilizado para evaluaciones de contaminación del agua (Snell y Marcial, 2017). Los estudios en esta área principalmente son evaluaciones en laboratorio, las cuales se dividen en dos; pruebas agudas y crónicas (Sarma y Nandini, 2006).

Las pruebas crónicas están basadas en respuestas demográficas a largo plazo de los organismos a cierta sustancia (p. ej. experimentos de crecimiento poblacional y de tabla de vida). Este tipo de pruebas aporta parámetros demográficos importantes reflejados en la supervivencia y fecundidad, aunque dependiendo del tipo de ensayo el enfoque de los resultados es distinto. En los experimentos de tabla de vida, que se enfocan en una generación, no muestran una posible adaptación a los tóxicos por parte de los neonatos, efecto que se podría ver en un experimento de crecimiento poblacional o se pueden realizar mediante experimentos consecutivos de tabla de vida (multigeneracionales) (Hammers-Wirtz y Ratte, 2000).

Por otro lado, las pruebas agudas son a corto plazo, donde se busca determinar el efecto de una sustancia dada en un tiempo definido dependiendo de la especie a utilizar (p. ej. concentración letal media, concentración efectiva media, tasas de consumo y aclaramiento, entre otros) (Juchelka y Snell, 1994; Dahms *et al.*, 2011; Rico-Matínez *et al.*, 2016). Se ha visto que experimentos de este tipo son importantes para la recopilación de datos en poco tiempo y como indicadores sensibles de estrés tóxico. Cambios en la

alimentación puede ser la respuesta inicial de un organismo a las condiciones ambientales, además, este tipo de experimentos pueden ayudar a explicar de mejor manera las observaciones realizadas en experimentos a largo plazo (Ferrando *et al.*, 1993).

3. Antecedentes

3.1 Cianobacterias y rotíferos

Gilbert en 1996 evaluó el efecto de *Anabaena flos-aquae*, además de la anatoxina producida por esta cianobacteria sobre el crecimiento poblacional de dos rotíferos (*Brachionus calyciflorus* y *Asplanchna girodi*) a diferentes temperaturas. Los experimentos se llevaron a cabo realizando pruebas crónicas de crecimiento poblacional. Sus resultados muestran que el aumento en la temperatura aumenta significativamente el efecto tóxico, provocando que la tasa de crecimiento poblacional disminuya conforme aumenta la temperatura.

Huang y colaboradores en el 2012 determinaron la respuesta demográfica provocada por microcistina-LR (MC-LR) en el rotífero *Brachionus calyciflorus*, además de ver estos efectos a diferentes temperaturas. Los organismos fueron expuestos a ocho concentraciones de MC-LR en un rango de 0-200 µg/L en donde se observó el crecimiento poblacional de los organismos. Sus resultados muestran que el aumento en la temperatura estimuló un mayor crecimiento poblacional. También muestran que el organismo tiene una tolerancia a MC-LR a concentraciones por debajo de los 200 µg/L. Todas las concentraciones incrementaron las tasas de crecimiento, pero disminuyeron la cantidad de hembras con huevos y las hembras míticas a 30°C.

Pérez-Morales y colaboradores en 2014 cuantificaron las tasas de alimentación y filtración de tres especies de cladóceros (*D. pulex*, *Moina micrura* y *Ceriodaphnia dubia*) y de tres rotíferos (*Brachionus calyciflorus*, *B. rubens* y *Plationus patulus*) utilizando células de *Microcystis aeruginosa* sola o mezclada con *Scenedesmus acutus* en diferentes proporciones. En donde encontraron que a pesar de que todas las especies utilizadas consumieron cianobacteria, en el caso de los rotíferos, en los tratamientos con porcentaje alto de cianobacteria tanto la tasa de alimentación, como de filtración fue menor en comparación con los tratamientos donde había porcentaje alto de *S. acutus*.

Barrios y colaboradores en 2017 determinaron el efecto de extractos crudos de cianobacterias de dos lugares distintos sobre las poblaciones de dos clones de diferentes

lugares del rotífero *B. calyciflorus*, observando los efectos en experimentos de crecimiento poblacional de ambos clones. Encontraron que, si bien los extractos crudos de cianobacterias tienen efectos negativos en el crecimiento poblacional de ambos clones, el efecto para cada clon es diferente.

Nandini y colaboradores en el 2019 determinaron el efecto de dos extractos crudos de cianobacterias diferentes en la demografía del rotífero *Brachionus calyciflorus*, además de ver cambios en la toxicidad dependiendo de la temperatura a la que se encontraban los organismos. Sus resultados muestran que ambos extractos crudos de cianobacterias fueron tóxicos para el organismo utilizado, aunque las densidades de cianobacterias eran diferentes en cada muestra y eso se vio reflejado en la toxicidad causada, el extracto con menor concentración de cianotoxinas fue más tóxico. Además, observaron que a mayor temperatura los efectos tóxicos eran más evidentes, esto en ambos extractos utilizados.

3.2 Microplásticos y rotíferos

Snell y Hicks en el 2011 caracterizaron los efectos a corto y largo plazo provocados por nanopartículas (37 – 2980 nm de diámetro) de poliestireno en el rotífero *B. manjavacas*. En sus resultados reportan la disminución de la tasa de crecimiento poblacional de hasta el 89% con partículas de 37 nm, cosa que con las partículas más grandes (2980 nm) no observaron. También observaron la capacidad de los organismos de ingerir las partículas de poliestireno, observando que fueron menos consumidas las de 37 nm a comparación de las partículas de 2980 nm. Además, mencionan que las partículas más pequeñas eran distribuidas en los tejidos de los rotíferos, mientras que las más grandes podían ser defecadas en algún momento. Por último, se menciona la importancia de estudiar la interacción de este tipo de partículas con otros tóxicos.

Jeong y colaboradores en el 2016 evaluaron la acumulación y efectos adversos de la ingesta de microplásticos de poliestireno de diferentes tamaños en el rotífero *B. koreanus*. Encontraron que los organismos utilizados, con tres tamaños de partículas fueron consumidos y observados en el organismo. Por otro lado, observaron reducción en la tasa de crecimiento poblacional, fecundidad, esperanza de vida, además de un aumento en el

tiempo necesario para la reproducción. Además, observaron un aumento en la actividad enzimática, particularmente de las enzimas antioxidantes.

Beiras y colaboradores en el 2018 determinaron la toxicidad aguda de diferentes organismos marinos en contacto con microplásticos de polietileno limpios y microplásticos añadidos con benzofenona. Entre los organismos utilizados se encuentra el rotífero *B. plicatilis*, el cual expusieron a diferentes concentraciones y tamaños de microplásticos. Sus resultados muestran que los microplásticos que no tenían añadidos ninguna sustancia tuvieron efectos en los organismos desde los 0.01 mg/L, mientras que los que tenían una sustancia añadida tuvieron efectos en concentraciones por encima de 10 mg/L. Además, señalan que se deben hacer más estudios de la interacción de los microplásticos con diferentes organismos y con otras sustancias.

Jeong y colaboradores en el 2018 evaluaron la acumulación de microplásticos y nanoplásticos en el rotífero marino *Brachionus koreanus*, además de determinar si había efectos de estrés oxidativo. Asimismo, determinaron un posible efecto sinérgico dado por la preexposición de los organismos a las partículas de plástico con éter de tetrabromodifenilo y triclosán, esto se observó tanto en la actividad proteica como en las variables demográficas. Sus resultados muestran que la acumulación de las partículas de plástico aumenta conforme el tamaño de éstas son menores. Además, observaron que la preexposición a plásticos aumentó los efectos tóxicos de las sustancias utilizadas tanto en las variables bioquímicas medidas como en las demográficas, resaltando la posible sinergia de los microplásticos con otros contaminantes que se encuentren en el ambiente.

Sun y colaboradores en el 2019 evaluaron el efecto que tiene diferentes tamaños y concentraciones de microplásticos en la historia de vida del rotífero *Brachionus calyciflorus*, además del efecto en su consumo de *Phaeocystis globosa*. Sus resultados muestran que los plásticos de menor tamaño (0.07 μm) en las concentraciones altas (< 5 $\mu\text{g/ml}$) disminuyó la supervivencia y reproducción, prolongó el tiempo de maduración y disminuyó el tamaño del cuerpo a la madurez, mientras que los de tamaño más grande (0.7 y 7 μm) no tuvieron efectos significativos. Mientras que, los efectos en el consumo

fueron provocados por la presencia de los microplásticos de menor tamaño induciendo disminución en la alimentación.

Xue y colaboradores en el 2020 determinaron el efecto en distintos aspectos del rotífero *B. calyciflorus* cuando es expuesto a microplásticos de polietileno de un diámetro de entre 10 y 22 μm . Esto determinó cambios en la tabla de vida, velocidad de nado, efectos en metabolismo, además se observó la ingesta de los microplásticos. Se presentó una reducción en la supervivencia, fecundidad y en el nado de los organismos conforme aumentó la concentración de microplásticos. En cuanto al efecto en el metabolismo, hubo una disminución de superoxidasa desmutasa, mientras que aumentó la actividad de glutatión peroxidasa.

3.3 Efectos multigeneracionales

Gilbert en el 2002 determinó el cambio que había en la producción de hembras míticas a partir de hembras eclosionadas de huevos de resistencia, observando esto durante varias generaciones del rotífero *Brachionus calyciflorus*. Sus resultados señalan que la proporción de producción de hembras míticas cambiaron significativamente a través de las generaciones, donde en las primeras generaciones las proporciones eran muy bajas y conforme fueron avanzando las generaciones la proporción aumentó gradualmente. El autor especula que los huevos de resistencia contienen algún tipo de sustancia que prevé el desarrollo de hembras míticas y conforme pasan las generaciones esta sustancia está presente en menor concentración permitiendo que gradualmente haya un mayor desarrollo de este tipo de hembras.

Yin y colaboradores en el 2015 determinaron el efecto materno en el desarrollo de las espinas posterolaterales del rotífero *Brachionus calyciflorus* utilizando las cairomonas producidas por el rotífero depredador *Asplanchna brightwellii*. En donde encontraron que la progenie de los organismos expuestos a cairomonas formaban espinas posterolaterales más largas que la progenie de organismos no expuestas al infoquímico del depredador. Además, especulan que este efecto materno se verá “diluido” conforme pasen las generaciones si estos dejan de estar expuestos al infoquímico hasta el punto en que las espinas de los organismos tengan el tamaño promedio.

Beyer y Hambright en el 2017 determinaron el efecto que tiene el tipo de alimentación materna en el desarrollo de la descendencia del rotífero *B. calyciflorus*. Alimentaron a las madres con la cianobacteria tóxica *M. aeruginosa* o la no tóxica alga verde *Chlamydomonas* sp. Sus resultados muestran que hay un efecto negativo en la fecundidad y en la supervivencia de la progenie cuando es expuesta a *M. aeruginosa*, sin importar el tratamiento previo. Aunque muestran que existe un cambio en el efecto mostrado por la progenie dependiendo del alimento al cual fueron expuestas las madres. Viendo el efecto en diferentes aspectos de la historia de vida de este organismo, además de cambios en la actividad enzimática.

Heine-Fuster y colaboradores en el 2017 evaluaron el costo potencial que hay en el crecimiento poblacional derivado de la exposición subletal del pesticida metamidofos y la expresión de defensas morfológicas por cairaomonas en el rotífero *Brachionus calyciflorus*, esto presente tanto en organismos expuestos a los factores estresantes como en su descendencia. Sus resultados muestran un incremento de los costos, reflejándose en la disminución de la tasa de crecimiento poblacional debido a la producción de defensas, aunque únicamente en organismos que habían sido expuestos al pesticida, indicando que los efectos de las cairaomonas se incrementaron cuando hubo una exposición a metamidofos.

González-Pérez y colaboradores en el 2018 determinaron el efecto multigeneracional de dos rotíferos comunes en ecosistemas acuáticos (*Plationus patulus* y *B. havanaensis*) los cuales fueron expuestos a triclosán. Realizaron experimentos de tabla de vida de dos generaciones consecutivas a diferentes concentraciones subletales del medicamento. Encontrando que, independientemente de la concentración y la generación, el triclosán tuvo un efecto negativo en las poblaciones de ambos rotíferos. Aunque observaron que la segunda generación tuvo un efecto diferente, incluso, en *P. patulus* el efecto se vio reducido en comparación con la primera generación.

4. Justificación

Derivado de los cambios ambientales, procesos como la eutrofización son encontrados en gran parte del mundo, incluyendo México (Olvera-Viascan *et al.*, 1998) que, sumado a otros fenómenos, como el aumento de la temperatura representen condiciones adecuadas para el desarrollo de cianobacterias (Paerl y Huisman, 2008). El aumento significativo de la biomasa de las cianobacterias y a su vez la formación de florecimientos tiene como consecuencias la reducción de la diversidad y abundancia de diferentes especies acuáticas. Esto debido a la producción de cianotoxinas, además de las alteraciones en la calidad del agua, ya que se ve afectada en propiedades organolépticas y fisicoquímicas (Carmichael, 2001).

Con el aumento constante de la población humana y en paralelo las actividades como la industria y la agricultura aumenta la cantidad y frecuencia con la que diversos contaminantes ingresan en los sistemas naturales (Schwarzenbach *et al.*, 2010) entre estos contaminantes se encuentran los plásticos. A pesar del aumento constante en la producción y en los reportes alrededor del mundo acerca de la presencia de microplásticos en distintos ambientes (Eriksen *et al.*, 2013; Castañeda *et al.*, 2014; Mathalon y Hill, 2014) los estudios se han enfocado principalmente en el mar y sólo recientemente han empezado a aumentar los estudios en aguas epicontinentales (Sarijan *et al.*, 2020). En México ha sido poco desarrollado este campo de estudio y de estos, la mayor parte también están enfocados a las costas (Pelamatti *et al.*, 2019; Ramírez-Álvarez *et al.*, 2020). Aunque hay un trabajo realizado en el río Atoyac en Puebla, México (Shruti *et al.*, 2019) el cual pasa cerca de la Ciudad de Puebla, donde se encontraron un total de 4,500 fragmentos/Kg en sedimentos de esta zona, representando una potencial amenaza a la comunidad que ahí habita. Por lo cual es de creciente importancia determinar el efecto que tienen los microplásticos en diferentes escenarios.

Comúnmente, lo estudios de ecotoxicología se enfocan en los efectos producidos por una sustancia durante el ciclo de vida de un organismo o durante un tiempo determinado, sin tomar en cuenta los efectos que pueden ser transferidos a las siguientes generaciones. Si

bien, pruebas crónicas de crecimiento poblacional engloban varias generaciones no detallan los efectos de una generación a otra. Los estudios a través de las generaciones tienen como propósito determinar estos cambios provocados en los organismos por una preexposición parental para tener un mejor entendimiento de las estrategias de historia de vida y cómo se adaptan a los cambios ambientales. En este sentido, el uso de zooplancton, y en específico de rotíferos, para este tipo de pruebas es muy adecuado debido a sus cortos ciclos de vida, lo cual permite el seguimiento de varias generaciones en poco tiempo.

Para ver el efecto que tienen diferentes contaminantes en ambientes acuáticos de agua dulce, la Asociación Americana de Salud Pública (“APHA” por sus siglas en inglés) tiene estipulado el uso de especies específicas de zooplancton, entre las cuales está *Brachionus calyciflorus* y *B. plicatilis* (APHA, 1994). Sin embargo, el rotífero *B. havanaensis* es un organismo común en los cuerpos de agua en México (Nandini *et al.*, 2005) por lo que también es recomendable su uso. Los miembros del género de rotíferos *Brachionus*, son comúnmente usados en bioensayos de diversas sustancias xenobióticas (Snell y Janssen, 1995), además de tener una amplia distribución en todo el mundo. El uso de zooplancton para estudios de ecotoxicología es muy común por su importancia ecológica, rápido crecimiento y alta reproducción, además de la sensibilidad que tienen a diferentes sustancias en el ambiente (Snell y Marcial, 2017). Estos factores hacen que sean un modelo ideal para los objetivos del presente trabajo.

5. Hipótesis

Si la exposición previa de rotíferos a cianobacterias o cianotoxinas provoca una tolerancia hacia estas, entonces la descendencia de organismos con exposición previa se verá menos afectada por estas sustancias.

Si se ha visto que la presencia de microplásticos tiene efectos adversos en rotíferos y que estas partículas tienen la capacidad de transportar sustancias tóxicas, entonces al exponer a rotíferos a la combinación de microplásticos con cianotoxinas, podría presentarse un efecto sinérgico.

6. Objetivos

6.1. Generales:

1. Evaluar si la exposición previa a cianobacterias o cianotoxinas provoca una tolerancia en la descendencia de dos especies de rotíferos del género *Brachionus*.
2. Evaluar si la combinación de extracto crudo de cianobacterias con microplásticos provoca un efecto sinérgico en la alimentación del rotífero *B. calyciflorus*.

6.2. Particulares:

1. Cuantificar la concentración de cianotoxinas presentes en las muestras de cianobacterias de la Presa Valle de Bravo.
2. Determinar la concentración letal media de extracto crudo de cianobacterias, microplásticos y la mezcla de extracto crudo con microplásticos sobre *Brachionus calyciflorus*.
3. Determinar la concentración letal media de extracto crudo de cianobacterias sobre dos clones de *Brachionus havanaensis*.
4. Realizar pruebas crónicas con extracto crudo de cianobacterias sobre dos clones diferentes de *Brachionus havanaensis*.
5. Realizar pruebas crónicas multigeneracionales con extracto crudo de cianobacterias sobre *Brachionus calyciflorus*.

6. Realizar experimentos sobre la alimentación de *B. calyciflorus* con extracto crudo de cianobacterias, microplásticos y la mezcla de extracto crudo con microplásticos.

7. Área de estudio

La presa de Valle de Bravo es un embalse con un clima templado cálido, que se localiza al oeste de la ciudad de Toluca en el Estado de México. Se encuentra a una altitud de 1780 metros sobre el nivel del mar en las coordenadas: 19°11'38.71" N y 100°09'02.59" O; tiene una capacidad de almacenamiento de 418.25×10^6 m³, abarcando una superficie de 18.55 km² y una profundidad promedio de 21.1 m (Olvera, 1990). Cinco ríos desembocan en esta reserva (Amanalco, Molino, González, Tizates y Carrizal) (Merino-Ibarra *et al.*, 2008).

La presa de Valle de Bravo fue construida en 1947 formando parte del sistema hidroeléctrico "Miguel Alemán". En la actualidad, la presa forma parte del sistema hidráulico "Cutzamala" que provee agua al área metropolitana del Valle de México, aportando 331.5 hm³/año (CONAGUA, 2005).

Además de la importancia de la presa por ser parte del sistema de aguas del área metropolitana de la Ciudad de México, esta presa es un importante sitio turístico del Estado de México, aparte de ser económicamente importante para la población local, por la pesca de carpa, tilapia y pez blanco. Las perturbaciones antropogénicas existentes en la presa incluyen la entrada de aguas residuales domésticas de la población local y del turismo que principalmente provienen del río Tizates y el alcantarillado de la ciudad (Nandini *et al.*, 2008).

En la cuenca de Amanalco hay una carga considerable de nutrientes que entran debido a las actividades agrícolas que se realizan alrededor de esta, aportando aproximadamente el 50% de nutrientes que entran al embalse, el 40% entra a través de las aguas residuales de distintas procedencias, mientras que el 10% restante es a través de los tres ríos y otras fuentes (Olvera-Viascan *et al.*, 1998).

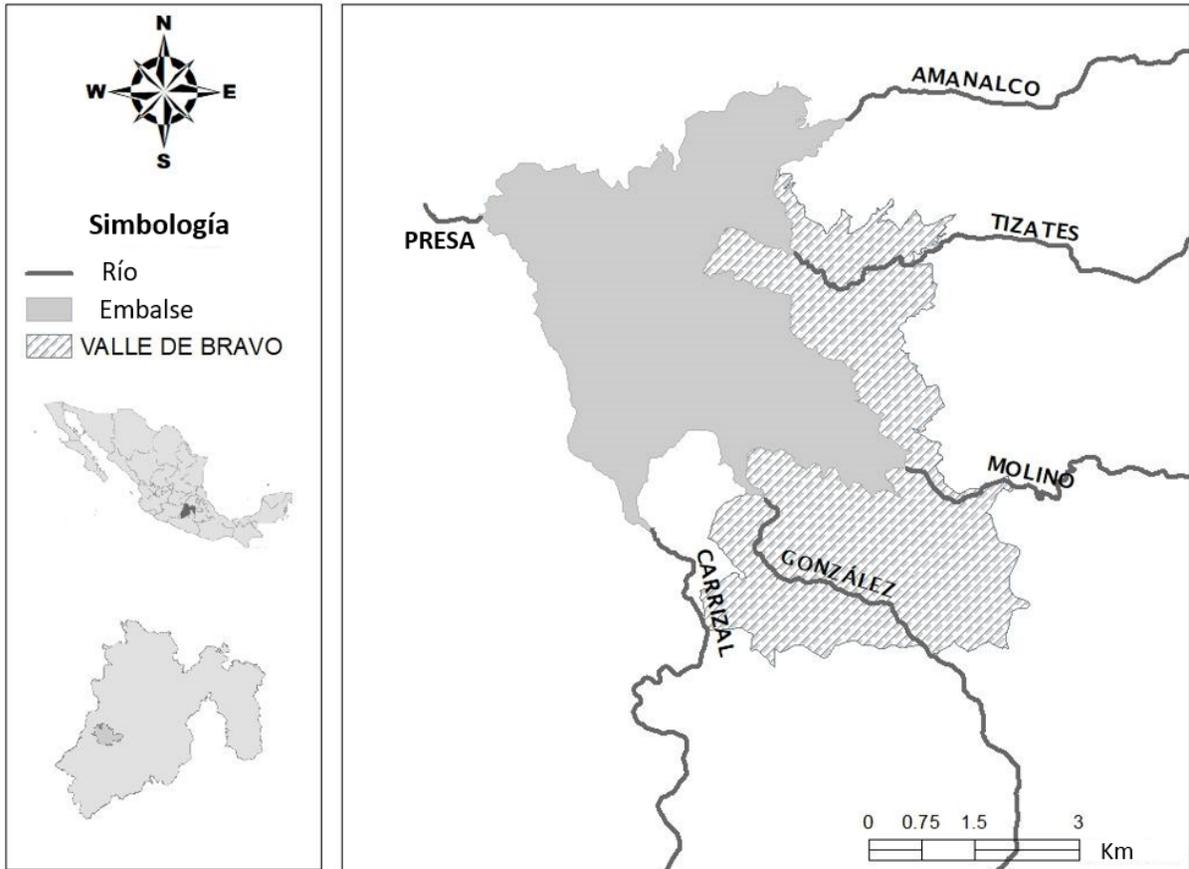


Figura 1 Embalse de Valle de Bravo, Estado de México, y los cinco efluentes que entran en el embalse.

8. Materiales y métodos

8.1. Obtención de la muestra de cianobacteria

La muestra utilizada para los experimentos con *B. havanaensis* fue recolectada del embalse de Valle de Bravo en el mes de octubre del 2018, y de acuerdo con Gaytan-Herrera *et al.* (2011) es uno de los meses con mayor predominancia de cianobacterias en el sistema. Por otro lado, la muestra utilizada para los experimentos realizados con *B. calyciflorus*, fue recolectada en la misma zona, en febrero del 2020, donde de acuerdo con Figueroa-Sánchez *et al.* (2014) es uno de los meses del año con mayor concentración de cianotoxinas. En ambas muestras se encontraron las mismas cinco especies, siendo el diferenciador entre las muestras la densidad de las especies de cianobacterias. Las especies que se encontraron fueron: *Woronichinia naegeliana*, *Microcystis aeruginosa*, *M. wesenbergii*, *Lyngbya birgei* y *Dolichospermum planctonicum*.

Para obtener las cianobacterias se filtraron 100 L con una red cónica de 20 μm , que posteriormente en el laboratorio se concentró en medio litro. La biomasa de cianobacteria obtenida se congeló a -20°C y almacenada por dos días, después de eso se descongeló a temperatura ambiente. Una vez descongelado, el material fue sonicado por 10 min a 14 MHz (Sonicador, Cole Parmer, modelo CP130PB-1) y congelado de nuevo, siguiendo el método descrito por Pietsch *et al.* (2001). El ciclo de congelación, descongelación y sonicado fue repetido 5 veces. Posteriormente el extracto crudo fue centrifugado a 4000 rpm por 30 min y filtrado por un filtro de 0.45 μm para remover todos los restos celulares. Finalmente, el extracto crudo fue almacenado a -20°C hasta el día en que se usó.

8.2. Identificación y cuantificación de las cianobacterias

De la muestra tomada, previo a la concentración de esta, 100 mL por muestra fueron fijados con formol al 3% para hacer la identificación taxonómica, siguiendo las claves de Wehr y Sheath (2003). Para la cuantificación de las cianobacterias se utilizó una cámara de Sedgwick-Rafter.

8.3. Medición de equivalentes de microcistinas

La concentración de equivalentes de microcistinas presentes en los extractos crudos de

cianobacterias utilizados durante las pruebas fue determinada utilizando el “QuantiPlate for Microcystins” de EnviroLogix™ siguiendo las indicaciones dadas por el fabricante. El procedimiento está basado en la prueba de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*). Además, a partir de la medición de equivalentes de microcistinas realizada a los extractos crudos de cianobacterias, se hizo una estimación de la concentración de equivalentes de microcistinas en el agua del embalse de la siguiente manera:

$$EMEm = \frac{(EMEx)(VEx)}{VMEm}$$

EMEm: Equivalente de microcistinas en el embalse.

EMEx: Equivalente de microcistinas en el extracto crudo de cianobacterias.

VEx: Volumen del extracto crudo de cianobacterias.

VMEm: Volumen de la muestra tomada de embalse.

8.4. Preparación de solución stock microplásticos

Se utilizarán microplásticos de poliestireno esféricos con un tamaño de 30 µm de grado analítico los cuales son distribuidos por Sigma-Aldrich. La concentración a la cual estaban los microplásticos era de 188.5 mg/L. A partir de este valor se hizo una solución stock de 40 mg/L. Los microplásticos fueron diluidos en agua moderadamente dura (medio de cultivo EPA) la cual también es usada en el cultivo de los organismos y en los bioensayos con los mismos. Como los microplásticos en solución tienden a adherirse entre sí, la solución fue homogenizada siendo sonicada a 14 MHz por 3 minutos con el fin de minimizar el aglomeramiento de las partículas. Repitiendo este proceso de homogenización cada que se utilizara la solución stock.

8.5. Cultivo de organismos

Para el mantenimiento de los cultivos de zooplancton utilizados se cultivó *Chlorella vulgaris* en botellas de 2 L, usando medio basal Bold (Borowitzka y Borowitzka, 1988), agregando 0.5 g de NaHCO₃ cada tres días como fuente adicional de carbono, además de aireación y luz constante. El alga fue cosechada durante la fase exponencial, sedimentada,

decantada y resuspendida en agua destilada.

Se utilizó el rotífero *Brachionus calyciflorus*, el cual fue aislado del canal de Cuemanco en Xochimilco, Ciudad de México. También se utilizaron dos clones del rotífero *Brachionus havanaensis*, uno de los clones fue obtenido del canal de Cuemanco en Xochimilco, Ciudad de México, el cual es un cuerpo de agua con poca presencia de cianobacterias a lo largo del año. Por otro lado, el otro clon fue obtenido de la Pista de Remo y Canotaje “Virgilio Uribe”, en Xochimilco, Ciudad de México, la cual tiene presencia alta de cianobacterias a lo largo del año.

El cultivo de los organismos utilizados se inició a partir de un solo organismo. Para mantener los cultivos se usó agua moderadamente dura (medio de cultivo EPA), el cual es preparado disolviendo 1.9 g de NaHCO₃, 1.2 g de CaSO₄, 1.2 g de MgSO₄ y 0.04 g de KCL en 20 L de agua destilada (Weber, 1993). Además, fue mantenido con *C. vulgaris* como alimento a una densidad de 0.5x10⁶ cel/mL, la densidad fue establecida usando un hematocitómetro.

8.6. Pruebas de toxicidad aguda

Para las pruebas agudas se realizaron bioensayos de concentración letal media (CL₅₀), el cual es un bioensayo donde se busca la concentración de una sustancia dada la cual reduzca la población en estudio en un 50% en un periodo de tiempo variable dependiendo del organismo a utilizar. Se realizarán CL₅₀ con tres tipos de sustancias; uno de únicamente el extracto crudo de cianobacteria, otro de únicamente los microplásticos y otro de la combinación de extracto crudo de cianobacteria con microplásticos.

8.6.1. Concentración letal media (CL₅₀) en *B. calyciflorus*

Para la prueba con únicamente extracto crudo de cianobacteria se realizó en dos edades; neonatos (<6 horas de vida) y adultos sin huevo (<24 horas de vida). Para cada edad se expusieron a 20 organismos de *B. calyciflorus* por recipiente. Estos organismos fueron expuestos a diferentes concentraciones del extracto crudo diluido en 20 mL de medio de cultivo EPA, siendo las concentraciones a las que se expusieron; 0.477, 0.954, 1.908, 3.816, 7.632, 15.264 µg/L de equivalentes de microcistinas presentes en el extracto crudo, las cuales se seleccionaron en una prueba preliminar. Y como alimento, se usó una

densidad de 0.5×10^6 cel/mL de *C. vulgaris*. Todos los tratamientos con cuatro repeticiones, además de un grupo control. Todo lo anterior se colocó en una incubadora a 20°C. Pasado el periodo de 24 horas se cuantificó la sobrevivencia de los individuos.

Para la prueba de únicamente microplásticos se expusieron a 10 adultos sin huevo (<24 horas de vida) de *B. calyciflorus*, con el fin de asegurar la ingesta de los microplásticos. Estos organismos se expusieron a las siguientes concentraciones: 2.5, 5, 10, 20 y 40 mg/L de la solución stock de microplásticos, las cuales se seleccionaron en una prueba preliminar. Todo diluido en 5 mL de medio de cultivo EPA con *C. vulgaris* a una concentración de 0.5×10^6 cel/mL. De igual manera, todos los tratamientos tuvieron cuatro repeticiones, además de un grupo control y fueron colocados en una incubadora a 20°C para su posterior cuantificación 24 horas después.

Para determinar el CL₅₀ de la combinación de extracto crudo de cianobacterias con microplásticos se expuso a 10 adultos sin huevo (<24 horas de vida) de *B. calyciflorus*. Fueron expuestos a las mismas concentraciones usadas en la prueba con únicamente microplásticos (2.5, 5, 10, 20 y 40 mg/L) con una de las dos concentraciones seleccionadas de extracto crudo de cianobacterias realizado para los adultos de esta especie. Las dos concentraciones seleccionadas fueron el 10 y el 40% del CL₅₀ del extracto crudo. Todo disuelto en 5 mL de medio de cultivo EPA a una densidad de 0.5×10^6 cel/mL de *C. vulgaris* como alimento. Todos los tratamientos tuvieron cuatro repeticiones, además de un grupo control. Todo lo anterior se colocó en una incubadora a 20°C. Pasado el periodo de 24 horas se cuantificó la sobrevivencia de los individuos.

8.6.2. Concentración letal media en *B. havanaensis*

Para determinar el CL₅₀ del extracto crudo de cianobacterias utilizado en ambos clones de *B. havanaensis* se expusieron a 20 neonatos de cada clon a las siguientes concentraciones: 13.1, 26.2, 39.3, 52.4, 65.5 y 78.6 µg/L de equivalentes de microcistinas presentes en el extracto crudo de cianobacterias utilizado para estos experimentos. Las concentraciones antes mencionadas fueron seleccionadas con base en una prueba preliminar. Todas las diluciones fueron realizadas en 20 mL de medio de cultivo EPA a una densidad de 0.5×10^6 cel/mL de *C. vulgaris* como alimento. Cada uno de los tratamientos con 4 repeticiones,

además de un grupo control. Todo fue colocado a 20°C en una incubadora por 24 horas, después de ese tiempo se cuantificó la sobrevivencia de los organismos.

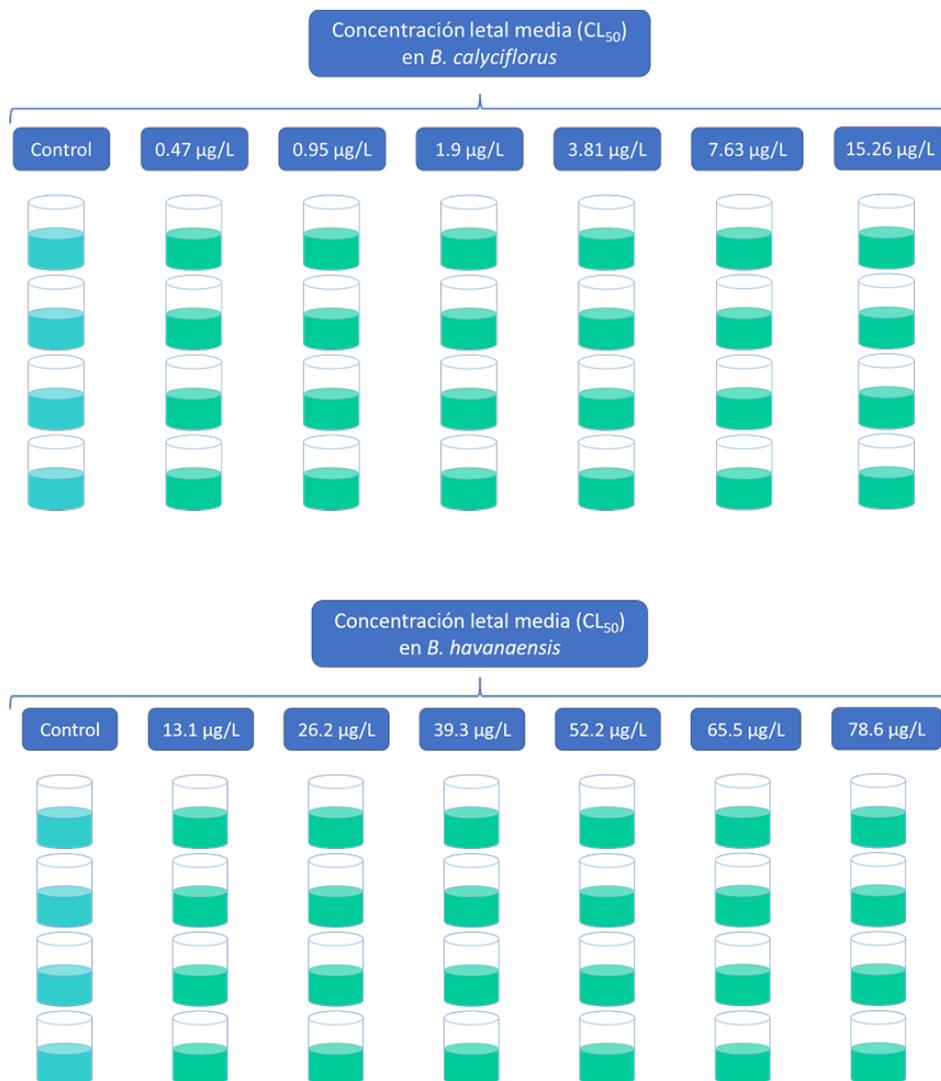


Figura 2 Diseño de las pruebas de toxicidad aguda CL₅₀ con diferentes concentraciones de equivalentes de microcistinas del extracto crudo de cianobacterias en los rotíferos *B. calyciflorus* y *B. havanaensis*. Cuatro repeticiones por tratamiento, incluyendo el grupo control.

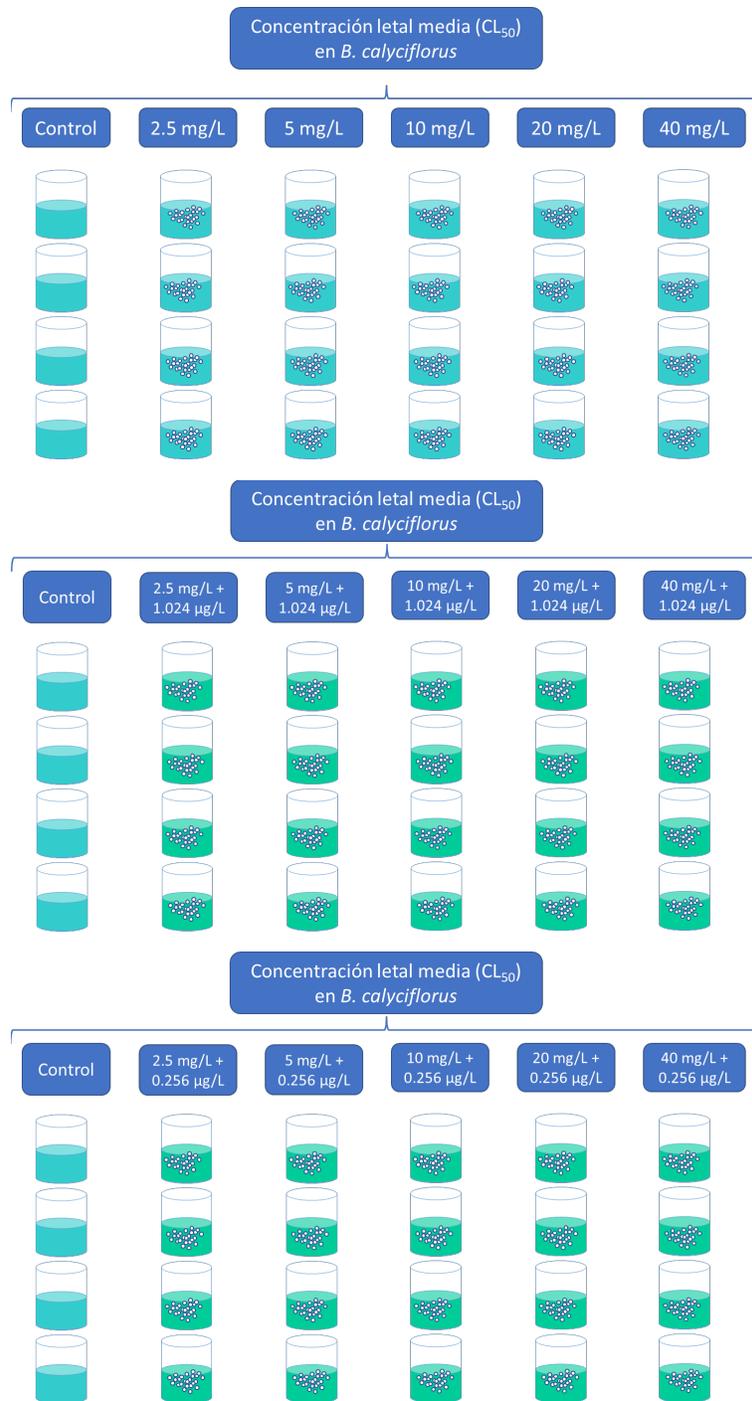


Figura 3 Diseño de las pruebas de toxicidad aguda CL₅₀ con diferentes concentraciones de microplásticos de poliestireno y a la combinación de microplásticos con concentraciones subletales del extracto crudo de cianobacterias (0.256 y 1.024 µg/L de equivalentes de microcistinas) en el rotífero *B. calyciflorus*. Cuatro repeticiones por tratamiento, incluyendo el grupo control. La densidad de los microplásticos es expresada en mg/L, mientras que la concentración de extracto crudo en µg/L

8.7. Pruebas de toxicidad crónica

8.7.1. Tabla de vida demográfica multigeneracional en *B. calyciflorus*

La prueba fue realizada en dos partes usando dos generaciones (F_0 y F_1). La primera parte consiste en la tabla de vida demográfica de la F_0 con tres concentraciones subletales diferentes del extracto crudo de cianobacterias; 10%, 20% y 40% del CL_{50} realizado para neonatos. Todo con una concentración de 0.5×10^6 cel/mL de *Chlorella vulgaris* como alimento, además de un grupo control sin extracto crudo de cianobacterias, sólo con alimento (*C. vulgaris*). El bioensayo fue realizado en contenedores de capacidad de 60 mL con 30 mL de medio de cultivo EPA, además de 30 individuos en cada recipiente. Cada tratamiento tuvo cuatro réplicas. Para la F_1 se utilizaron los neonatos obtenidos de la F_0 . Los cuales fueron obtenidos al tercer día de la prueba con la F_0 . Los neonatos obtenidos tanto en el grupo control, como en los diferentes tratamientos se recolocaron en las mismas condiciones en la que su progenitora estaba. De igual forma, cada tratamiento contó con cuatro réplicas, aunque debido a la cantidad de neonatos obtenidos de la F_0 la cantidad de neonatos puestos en cada repetición fue de 20 individuos.

Todos los días se cuantificaron los individuos sobrevivientes y los neonatos nacidos. Posteriormente al conteo los neonatos fueron retirados del experimento. Los conteos se realizaron cada 12 horas (2 veces al día) debido a su ciclo reproductivo. El experimento se siguió hasta que todos los organismos de la cohorte inicial murieron.

A partir de los datos obtenidos se calculó la supervivencia, fecundidad y parámetros demográficos relacionados usando las siguientes fórmulas propuestas por Krebs (1985):

Supervivencia

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

Fecundidad

$$mx = \frac{N^{\circ} \text{ de neonatos producidos}}{nx}$$

Tasa bruta de reproducción

$$\sum_0^{\infty} mx$$

Tasa neta de reproducción

$$R_0 = \sum_0^{\infty} lx \cdot mx$$

Esperanza de vida

$$e_x = \frac{T_x}{n_x}$$

Tasa intrínseca de crecimiento

$$\sum_{x=w}^n e^{-rx} \cdot lx \cdot mx = 1$$

siguió hasta que todos los organismos murieron. A partir de los datos obtenidos se calculó la supervivencia, fecundidad y parámetros demográficos relacionados usando las fórmulas propuestas por Krebs (1985) (Ver sección anterior).

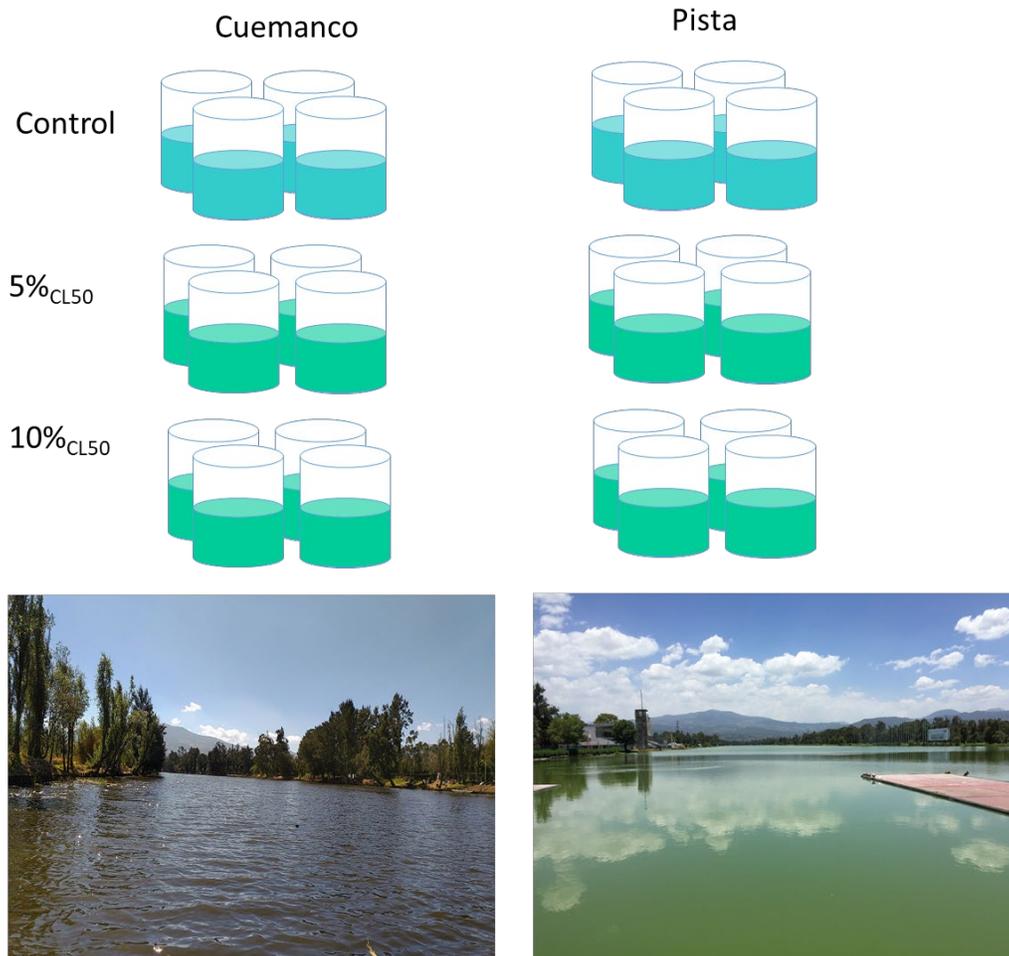


Figura 5 Diseño de la prueba de toxicidad crónica tabla de vida demográfica en dos poblaciones de *B. havanaensis* con diferentes concentraciones subletales de extracto crudo de cianobacterias obtenidas a partir del CL₅₀ obtenido anteriormente. Cuatro repeticiones por tratamiento incluyendo el control.

8.8. Experimentos de alimentación

Los experimentos de alimentación se realizaron midiendo las tasas de alimentación y aclaramiento de individuos adultos del rotífero *B. calyciflorus*. Los cuales se realizaron en recipientes con una capacidad de 20 mL con 5 mL de contenido. Se colocaron 10 organismos adultos sin huevo (<24 horas de vida) con *C. vulgaris* como alimento a una densidad de 4×10^5 cel/ml. Previo al experimento hubo un tiempo de inanición de los organismos de 30 minutos, además, hubo una preexposición de 24 horas a las

concentraciones de extracto crudo de cianobacterias utilizadas para este experimento. Los tratamientos fueron: dos concentraciones subletales del extracto crudo de cianobacterias (10% y 40% del CL₅₀, lo que corresponde a 0.256 y 1.024 µg/L de equivalentes de microcistinas del extracto crudo), una concentración de microplásticos (20 mg/L) y combinaciones de ambos contaminantes; 10% del CL₅₀ del extracto crudo de cianobacterias y la concentración de microplásticos antes mencionadas y de la misma forma con el 40% del CL₅₀ del extracto crudo de cianobacterias con la concentración de microplásticos, esto haciendo un total de 5 tratamientos. Además, de un grupo control que sólo contenía el medio de cultivo EPA con la misma concentración de alga antes mencionada (4x10⁵ cel/ml). Cada tratamiento (incluyendo el control) tuvo 4 réplicas y un blanco (el cual sólo tenía el tratamiento sin los organismos) (Figura 6). Todo lo anterior fue colocado en una incubadora a 20°C. Pasado un tiempo de 20 minutos fue contada el alga restante con un hematocitómetro. El cálculo de las tasas de ingesta y aclaramiento se realizó usando las fórmulas propuestas por Rigler (1971).

$$f = \frac{V (C_0 - C_t)}{(t)(N)}$$

f: Tasa de alimentación

V: Volumen del medio

C₀: Concentración de células inicial

C_t: Concentración final

t: Tiempo de alimentación (min.)

N: Número de individuos

$$F = \frac{(\ln C_0 - \ln C_t)V}{(t)(N)}$$

F: Tasa de aclaramiento

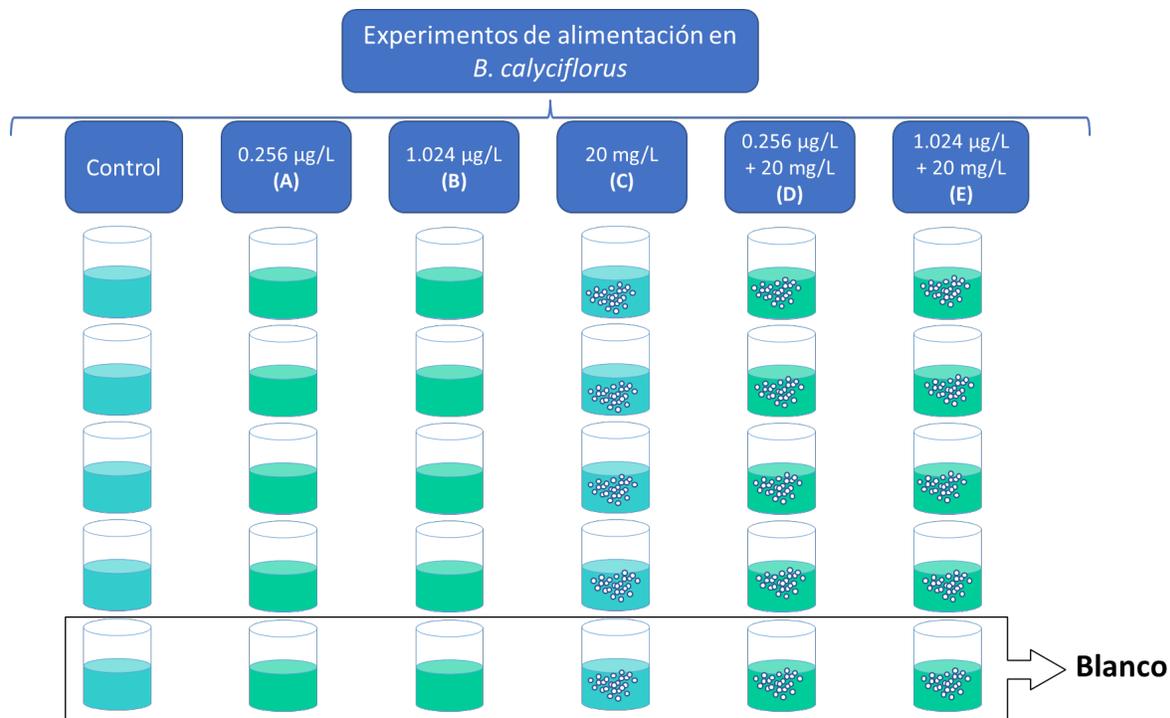


Figura 6 Diseño de los experimentos de alimentación *B. calyciflorus* expuesto a extracto crudo de cianobacterias (**A y B**), microplásticos (**C**) y a la combinación de extracto crudo con microplásticos (**D y E**). Las concentraciones de extracto crudo utilizadas son de equivalentes de microcistinas. Cuatro repeticiones por tratamiento incluyendo el control, además, cada tratamiento cuenta con un blanco, el cual tiene el tratamiento sin rotíferos. La densidad de los microplásticos es expresada en mg/L, mientras que la concentración de extracto crudo en µg/L.

8.9. Análisis de datos

Para determinar la concentración letal media (CL_{50}) se utilizó el método Probit (Finney, 1971). Para evaluar las diferencias en la supervivencia de F_0 y F_1 en el experimento crónico de tabla de vida multigeneracional en *B. calyciflorus* se realizó una prueba de Kaplan-Meyer. Además, mediante ANDEVA de dos vías se buscaron efectos estadísticamente significativos en las variables demográficas obtenidas de ambos experimentos crónicos y en las tasas de alimentación y aclaramiento ambas pruebas seguidas de una prueba post hoc de Tukey. Todos los datos fueron graficados y analizados utilizando el programa Sigma Plot 11.

9. Resultados

9.1. Cuantificación de cianobacterias

9.1.1. Muestra de florecimiento de cianobacterias de octubre del 2018

La muestra del florecimiento de cianobacterias que fue utilizada para los experimentos en ambos clones de *Brachionus havanaensis* estuvo representada por cinco especies de cianobacterias, siendo *Dolichospermum planctonicum* la que mayor densidad tuvo, seguida *Microcystis wesenbergii*. (Tabla 3).

Tabla 3 Conteo de colonias de cianobacterias por mililitro en la muestra de Valle de Bravo, Estado de México, en octubre del 2018.

Especie	Colonias/ml
<i>Woronichinia naegeliana</i>	130
<i>Microcystis aeruginosa</i>	1810
<i>Microcystis wesenbergii</i>	4260
<i>Lyngbya birgei</i>	190
<i>Dolichospermum planctonicum</i>	15360

9.1.2. Muestra de florecimiento de cianobacterias de febrero del 2020

La muestra del florecimiento de cianobacterias que se utilizó para los experimentos en *Brachionus calyciflorus* estuvo representada por cinco especies de cianobacterias siendo *Woronichinia naegeliana* la que mayor densidad tuvo, seguida de *Microcystis aeruginosa*, aunque esta con una densidad mucho menor (Tabla 4).

Tabla 4 Conteo de colonias de cianobacterias por mililitro en la muestra de Valle de Bravo, Estado de México, en febrero del 2020.

Especie	Colonias/ml
<i>Woronichinia naegeliana</i>	23750
<i>Microcystis aeruginosa</i>	1550
<i>Microcystis wesenbergii</i>	7050
<i>Lyngbya birgei</i>	200
<i>Dolichospermum planctonicum</i>	150



Figura 7 Especies de cianobacterias encontradas en las muestras obtenidas del embalse de Valle de Bravo, Estado de México. *Microcystis aeruginosa* (A), *Dolichospermum planctonicum* (B), *Woronichinia naegeliana* (C), *Lyngbya birgei* (D), *Microcystis wesenbergii* (E)

9.2. Medición de equivalentes de microcistinas

El extracto crudo obtenido de la muestra tomada en octubre del 2018 tuvo una concentración de 131 $\mu\text{g/L}$ de equivalentes de microcistinas. A partir de este dato se hizo una extrapolación para obtener la concentración a la que estaba el agua del embalse,

siendo de 0.655 $\mu\text{g/L}$ de equivalentes de microcistinas. Por otro lado, el extracto obtenido en febrero del 2020 tuvo una concentración de 95.4 $\mu\text{g/L}$ de equivalentes de microcistinas, mientras que la concentración a la que estaba el embalse fue de 0.238 $\mu\text{g/L}$ de equivalentes de microcistinas.

9.3. Pruebas de toxicidad aguda

9.3.1. Concentración letal media (CL_{50}) en *B. calyciflorus*

9.3.1.1. Extracto crudo de cianobacterias

Del extracto crudo de cianobacterias realizado con la muestra obtenida del embalse de Valle de Bravo en febrero del 2020 se obtuvo una concentración letal media (CL_{50}) para adultos de *B. calyciflorus* de 2.56 $\mu\text{g/L}$ de equivalentes de microcistinas, a partir de este valor se escogieron las concentraciones subletales de: 0.256 y 1.024 $\mu\text{g/L}$ de equivalentes de microcistinas. Por otro lado, la concentración letal media para los neonatos de *B. calyciflorus* fue de 2.38 $\mu\text{g/L}$ de equivalentes de microcistinas (Figura 8). A partir de este resultado se tomaron las tres concentraciones subletales; 0.238, 0.476 y 0.952 $\mu\text{g/L}$ de equivalentes de microcistinas.

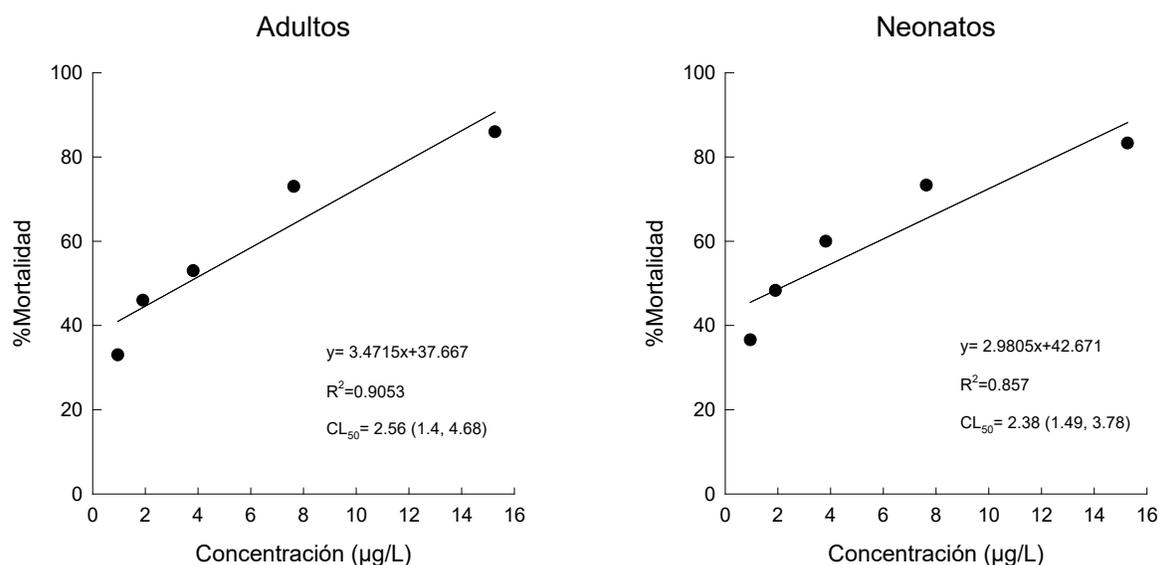


Figura 8 CL_{50} del extracto crudo de cianobacterias en adultos y neonatos de *B. calyciflorus*. La mortalidad representa el porcentaje promedio de hembras que sobrevivieron después de 24 horas de exposición a las condiciones de la prueba. Las concentraciones de extracto crudo utilizadas son de equivalentes de microcistinas presentes en el extracto crudo de cianobacterias utilizado.

9.3.1.2. Microplásticos

La concentración letal media obtenida para los microplásticos de poliestireno en adultos de *B. calyciflorus* fue de 21.91 mg/L (Figura 9).

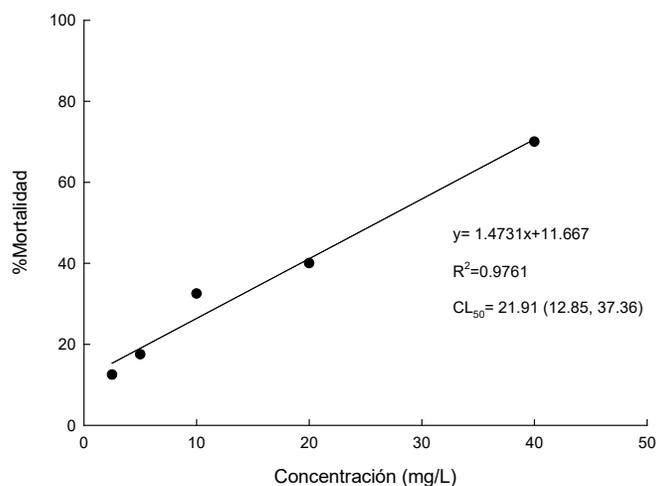


Figura 9 CL₅₀ de microplásticos en *B. calyciflorus*. La mortalidad representa el porcentaje promedio de hembras que sobrevivieron después de 24 horas de exposición a las condiciones de la prueba.

9.3.1.2. Extracto crudo de cianobacterias combinado con microplásticos.

La concentración letal media obtenida de la combinación del extracto crudo de cianobacteria y microplásticos en adultos de *B. calyciflorus* fue de 18.24 mg/L cuando se combinó con el 10% del CL₅₀ del extracto crudo (0.256 µg/L de equivalente de microcistinas). Por otro lado, cuando se combinó con el 40% del CL₅₀ del extracto crudo (1.024 µg/L de equivalente de microcistinas) se obtuvo un valor de 16.64 mg/L (Figura 10). De forma que, las mismas concentraciones de microplásticos usadas anteriormente tuvieron un efecto mayor cuando se combinó con concentraciones subletales del extracto crudo de cianobacteria.

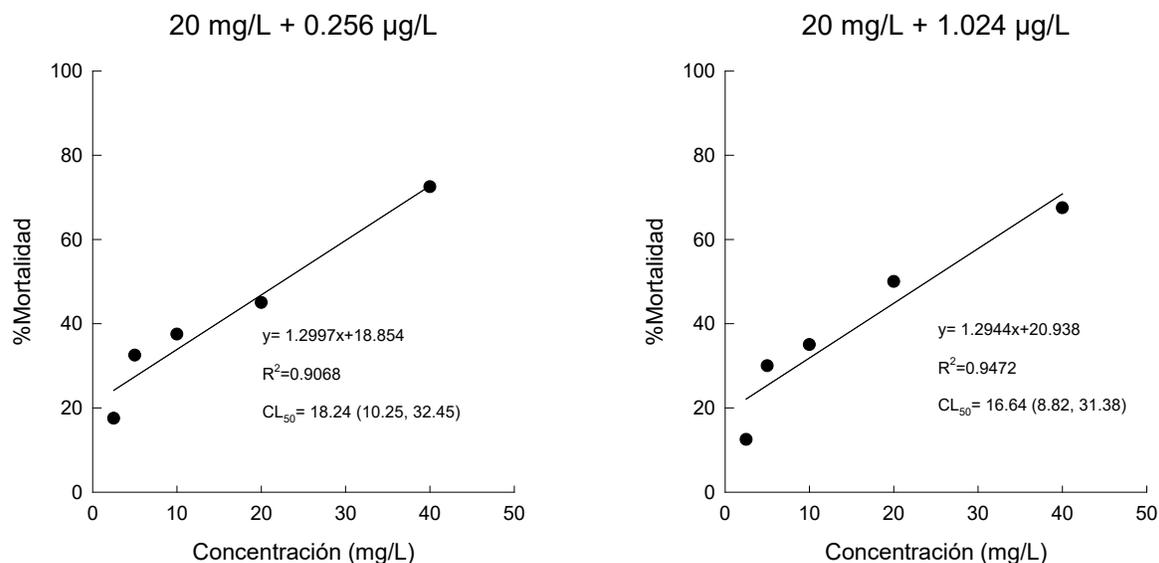


Figura 10 CL_{50} de microplásticos en combinación con dos concentraciones subletales del extracto crudo de cianobacterias de Valle de Bravo en *B. calyciflorus*. La mortalidad representa el porcentaje promedio de hembras que sobrevivieron después de 24 horas de exposición a las condiciones de la prueba. Las concentraciones de extracto crudo utilizadas son de equivalentes de microcistinas presentes en el extracto crudo de cianobacterias utilizado.

9.3.2. Concentración letal media en *B. havanaensis*

De la muestra tomada del embalse de Valle de Bravo en octubre del 2018, la concentración letal media (CL_{50}) del extracto crudo de cianobacteria obtenida fue diferente para cada uno de los clones. Siendo menor en el clon obtenido del canal de Cuemanco, con un valor de 34.25 µg/L de equivalente de microcistinas, mientras que en el clon obtenido de la Pista de Remo y Canotaje obtuvo un valor de 42.6 µg/L de equivalente de microcistinas (Figura 11). A partir de estas concentraciones se tomaron las concentraciones subletales para las pruebas crónicas. Para el clon de Cuemanco las concentraciones subletales fueron; 1.7 y 3.4 µg/L de equivalente de microcistinas (el 5 y 10% del CL_{50}), mientras que para el clon de la Pista fueron; 2.1 y 4.2 µg/L de equivalente de microcistinas (el 5 y 10% del CL_{50}).

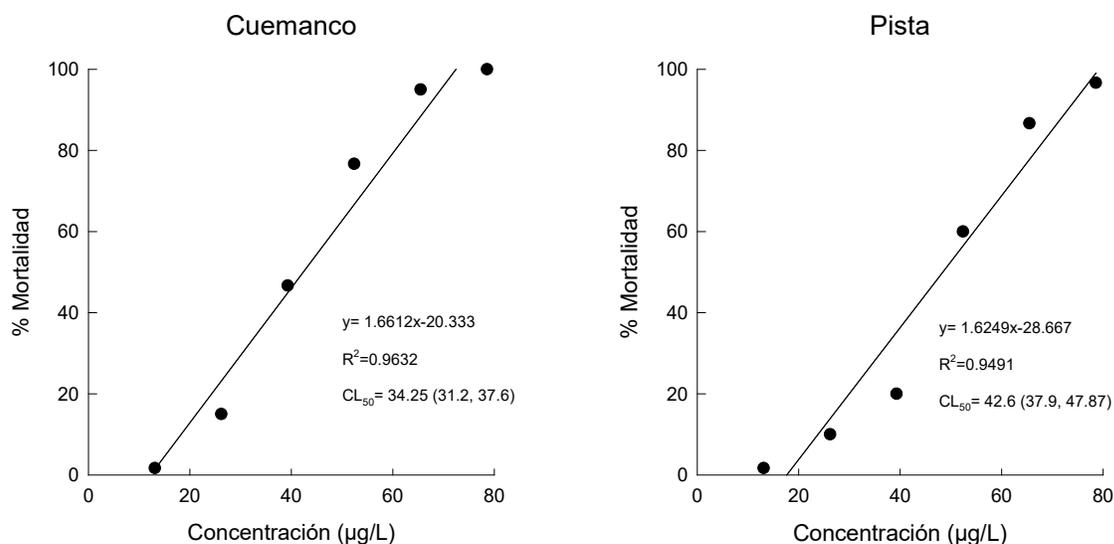


Figura 11 Toxicidad de extracto crudo de cianobacterias a dos clones de *B. havanaensis*. La mortalidad representa el porcentaje promedio de hembras que sobrevivieron después de 24 horas de exposición a las condiciones de la prueba. Las concentraciones utilizadas son de equivalentes de microcistinas presentes en el extracto crudo de cianobacterias utilizado.

9.4. Pruebas de toxicidad crónica

9.4.1. Tabla de vida demográfica multigeneracional en *B. calyciflorus*

9.4.1.1. Supervivencia y fecundidad

Las curvas de supervivencia de *B. calyciflorus* muestran una reducción en el tiempo de vida conforme aumenta la concentración del extracto crudo de cianobacteria, reduciendo, en la concentración alta, su tiempo de vida seis días. En cuanto a la F_1 , no se siguió el mismo patrón que en la F_0 . Si bien, con la concentración baja no hubo un cambio en los días de supervivencia, es a partir de la concentración de $0.476 \mu\text{g/L}$ de equivalente de microcistinas que hay una diferencia. En la F_1 tanto la concentración de 0.476 y $0.952 \mu\text{g/L}$ de equivalente de microcistinas tienen un aumento en su supervivencia de dos y tres días, respectivamente, esto con respecto a la supervivencia vista en los mismos tratamientos de la F_0 . A pesar de este aumento en la supervivencia, el grupo control tuvo una supervivencia tres días mayor. Cabe mencionar que el control no tuvo un cambio en su supervivencia en ninguna de las generaciones (Figura 12)

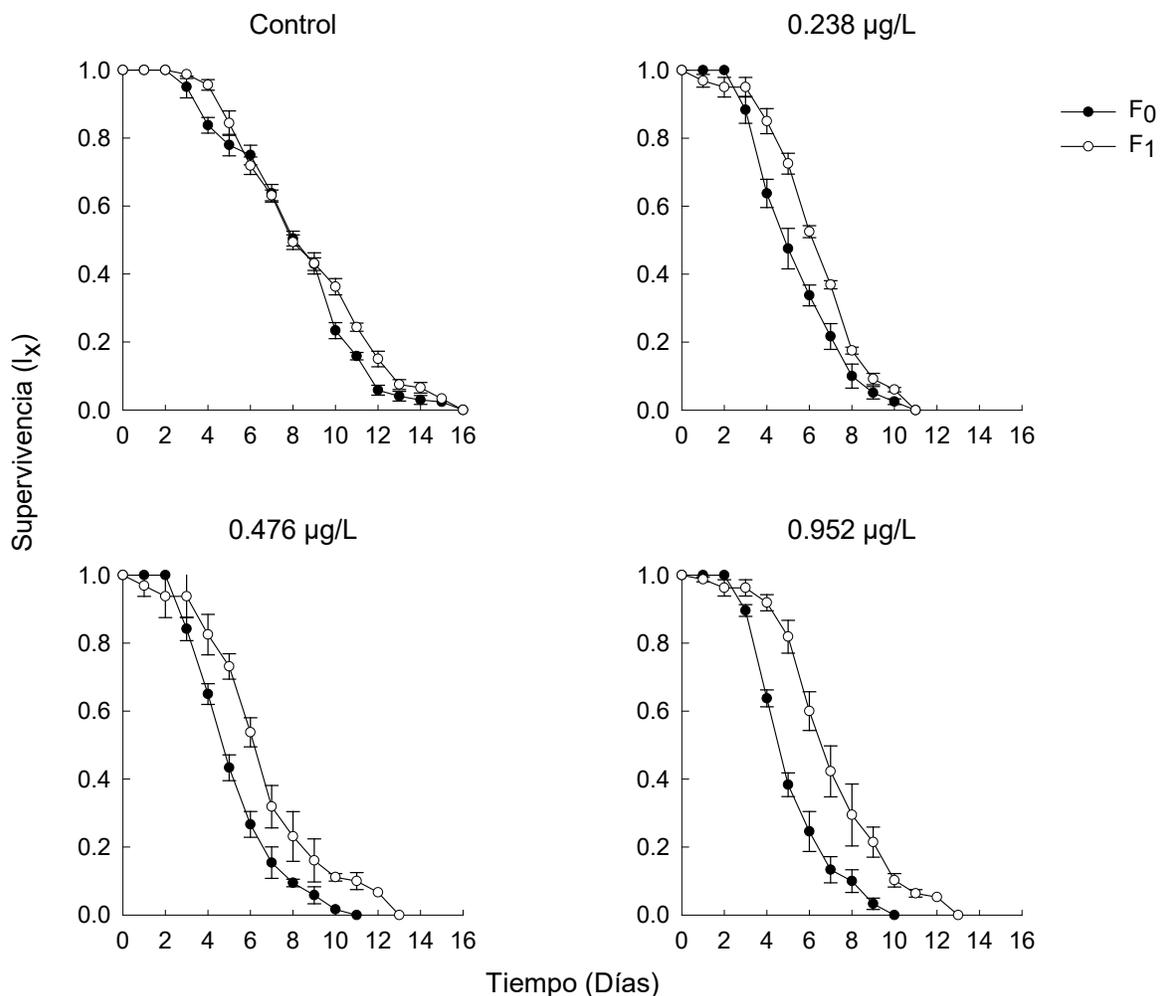


Figura 12 Supervivencia de dos generaciones de *B. calyciflorus* expuesto a tres concentraciones subletales obtenidas a partir del CL₅₀ del extracto crudo de cianobacterias. Las concentraciones utilizadas son de equivalente de microcistinas presentes en el extracto crudo de cianobacterias utilizado. Los puntos negros son la F₀, mientras que los puntos blancos son la F₁.

En cuanto a la fecundidad, en ambas generaciones del grupo control hubo un comportamiento muy parecido, donde los picos de alta fecundidad se encontraron al inicio y al final del ciclo de vida. En cuanto a los tratamientos, en la concentración de 0.238 µg/L, a pesar de que el tiempo de reproducción fue el mismo hay diferencias, al principio la F₀ fue la que tuvo el pico más alto de fecundidad y al final del tiempo reproductivo fue la F₁ la que tuvo el pico de fecundidad más alto. En los otros dos tratamientos (0.476 y 0.952 µg/L) lo más notable es el aumento de dos días en el periodo de reproducción de la F₁ con respecto a la F₀. En el tratamiento de 0.476 µg/L la fecundidad es más alta al final del ciclo de vida en la F₁ en comparación con la F₀. Por otro lado, en el tratamiento de

0.952 $\mu\text{g/L}$ al principio del ciclo de vida se tuvieron los valores más altos de fecundidad en ambas generaciones, a pesar de ser más bajos los valores al final del tiempo reproductivo, la F_1 tuvo valores más altos a comparación de la F_0 . (Figura 13).

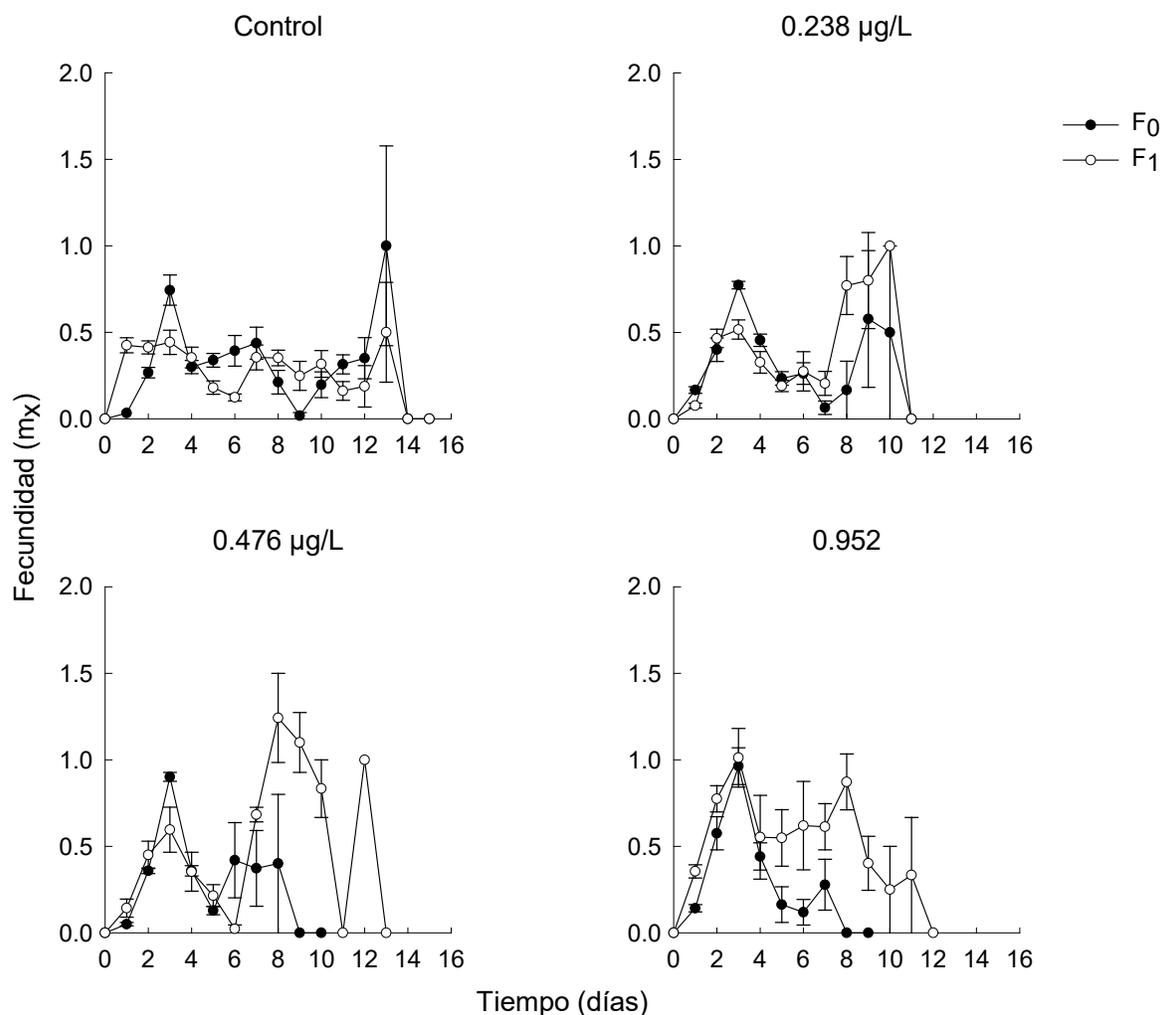


Figura 13 Fecundidad de dos generaciones de *B. calyciflorus* expuesto a tres concentraciones subletales obtenidas a partir del CL_{50} del extracto crudo de cianobacterias. Las concentraciones utilizadas son de equivalente de microcistinas presentes en el extracto crudo de cianobacterias utilizado. Los puntos negros son la F_0 , mientras que los puntos blancos son la F_1 .

9.4.1.2. Análisis de Kaplan-Meier

Haciendo una comparación de las curvas de supervivencia obtenidas en este trabajo se realizó una prueba de Kaplan-Meier de Log Rank donde se muestra que con el aumento de la concentración del extracto crudo de cianobacteria la supervivencia disminuye significativamente tanto en la F_0 ($P < 0.007$) como en la F_1 ($P < 0.022$). En cuanto a la

diferencia entre generaciones, el efecto adverso observado en la F_0 a comparación de la F_1 tuvo diferencias significativas sólo en la concentración de extracto crudo más alta utilizada ($P < 0.009$).

9.4.1.3. *Parámetros demográficos*

Los parámetros demográficos derivados de la supervivencia y fecundidad tuvieron una diferencia con respecto al control. En el caso del promedio de vida, esta variable estuvo en un rango de 5.3 y 9. En la primera generación (F_0), en presencia con el extracto crudo de cianobacterias hubo una disminución significativa ($P < 0.001$, prueba de Tukey) con respecto al control, aunque entre los tratamientos no hubo una diferencia significativa. Por otro lado, la F_1 tuvo diferencias significativas con los datos obtenidos en la F_0 , esto tanto en tratamientos ($P < 0.001$, prueba de Tukey) como en los controles ($P < 0.05$, prueba de Tukey). Con respecto a los tratamientos de la F_1 , el control fue significativamente mayor que los tratamientos ($P < 0.001$, prueba de Tukey), aunque entre los tratamientos únicamente hubo diferencias significativas entre el tratamiento de 0.238 y 0.952 $\mu\text{g/L}$ ($P < 0.05$, prueba de Tukey) (Figura 14).

En cuanto a la expectativa de vida, los valores fluctuaron entre 4.8 y 8.4. En esta variable se obtuvo un comportamiento parecido al del promedio de vida. En la F_0 , el control tuvo un valor más alto que en los tratamientos, esto siendo significativamente diferente ($P < 0.001$, prueba de Tukey), mientras que entre tratamientos no hubo diferencias significativas. En la otra generación (F_1), el control obtuvo valores más altos que todos los tratamientos ($P < 0.001$, prueba de Tukey), aunque el tratamiento de 0.952 $\mu\text{g/L}$ obtuvo un valor más alto que el tratamiento de 0.238 $\mu\text{g/L}$, teniendo diferencia significativa ($P < 0.05$, prueba de Tukey). Entre ambas generaciones hubo diferencias significativas, tanto en el control ($P < 0.04$, prueba de Tukey) y entre los tratamientos ($P < 0.001$, prueba de Tukey) teniendo valores más altos la F_1 . (Figura 14).

El tiempo generacional vario entre 2.9 y 4.6 día. En la F_0 el control fue mayor con respecto con los tres tratamientos, esto teniendo diferencias significativas ($P < 0.001$, prueba de Tukey), mientras que entre los tratamientos no hubo diferencia significativa. En cuanto a la F_1 , no hubo una diferencia significativa entre los tratamientos y el control, y aunque hay

diferencia numérica entre los tratamientos, no fue lo suficiente para ser significativa. Sin embargo, entre la F_0 y la F_1 sí hubo diferencias entre los tratamientos, siendo mayores los valores en la F_1 . En el tratamiento de 0.238 $\mu\text{g/L}$ la diferencia fue menor, pero sí fue significativa ($P < 0.01$, prueba de Tukey), y tanto en los tratamientos de 0.476 y 0.952 $\mu\text{g/L}$ la diferencia fue mayor ($P < 0.001$, prueba de Tukey). Aunque entre los controles hubo diferencia numérica no fue suficiente para ser significativa (Figura 14).

En el caso de la tasa bruta de reproducción los valores fluctuaron entre 2.6 y 6.2. En la F_0 no hubo diferencias significativas entre los tratamientos y el control, ni entre tratamientos, aunque sí se aprecia una diferencia numérica. En cuanto a la F_1 , no hubo diferencia significativa entre el control y los tratamientos, aunque sí numérica. Aunque entre tratamientos sí hubo diferencia significativa, entre el tratamiento de 0.238 y el de 0.952 $\mu\text{g/L}$ ($P < 0.05$, prueba de Tukey). Al comparar entre generaciones, tanto en el control como en el tratamiento de 0.238 $\mu\text{g/L}$ no hay diferencias significativas, pero en cuanto a los tratamientos de 0.476 y 0.952 $\mu\text{g/L}$ sí hay diferencias significativas, siendo mayores en el tratamiento de 0.952 $\mu\text{g/L}$ ($P < 0.001$, prueba de Tukey) que la encontrada en el tratamiento de 0.476 $\mu\text{g/L}$ ($P < 0.003$, prueba de Tukey), donde los valores fueron más altos en la F_1 . (Figura 14).

Referente a la tasa neta de reproducción, los datos fluctuaron entre 1.7 y 4. En la F_0 no hubo diferencias significativas entre el control y los tratamientos, ni entre tratamientos. Por otro lado, en la F_1 donde hubo diferencias significativas fue en el tratamiento de 0.952 $\mu\text{g/L}$, teniendo diferencias significativas con el control ($P < 0.004$, prueba de Tukey) y con los tratamientos ($P < 0.001$, prueba de Tukey), con valores más altos en ambos casos. De igual forma, al comparar entre generaciones, donde hubo diferencias significativas fue en el tratamiento de 0.952 $\mu\text{g/L}$ ($P < 0.001$, prueba de Tukey) (Figura 14).

Sobre la tasa intrínseca de reproducción la fluctuación de los valores fue entre 0.15 y 0.42. En la F_0 no hubo diferencias significativas, aunque el tratamiento de 0.952 $\mu\text{g/L}$ muestra una diferencia numérica. Mientras que, en la F_1 , el control sólo tuvo diferencias significativas con el tratamiento de 0.238 $\mu\text{g/L}$ ($P < 0.04$, prueba de Tukey). Entre tratamientos el tratamiento de 0.952 $\mu\text{g/L}$ tuvo diferencias significativas tanto como con

los otros dos tratamientos como con el control ($P < 0.001$, prueba de Tukey). Al comparar entre generaciones sólo hubo diferencias significativas en el tratamiento de $0.952 \mu\text{g/L}$ ($P < 0.001$, prueba de Tukey), que obtuvo valores más altos (Figura 14).

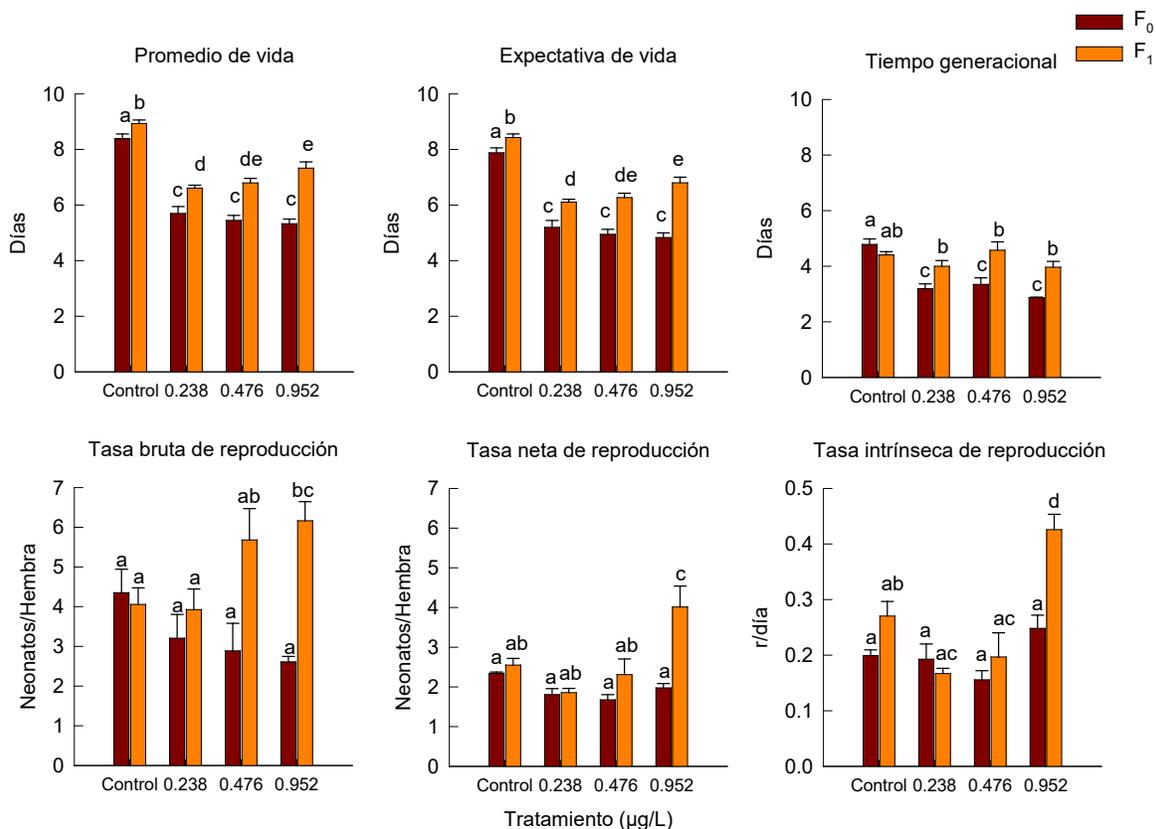


Figura 14 Variables demográficas derivadas de la supervivencia y fecundidad de dos generaciones de *B. calyciflorus* expuesto a tres concentraciones de extracto crudo de cianobacterias. Las concentraciones utilizadas son de equivalente de microcistinas presentes en el extracto crudo de cianobacterias utilizado. Las barras rojas son de la F₀, mientras que las naranjas son de la F₁. Las diferentes letras señalan las diferencias significativas.

9.4.2. Tabla de vida demográfica de dos clones de *B. havanaensis*

9.4.2.1. Supervivencia

Las curvas de supervivencia de los dos clones de *B. havanaensis* fueron diferentes, además, en ambos clones se muestra una disminución en la supervivencia junto con el aumento de la concentración del extracto crudo de cianobacterias, reduciendo hasta cinco días su tiempo de vida. Al comparar ambos clones, se ve una tendencia a una mayor supervivencia del clon de la Pista, incluso en los tratamientos con extracto crudo de

cianobacterias, donde se vio que sobrevivió dos días más que el clon de Cuemanco (Figura 15).

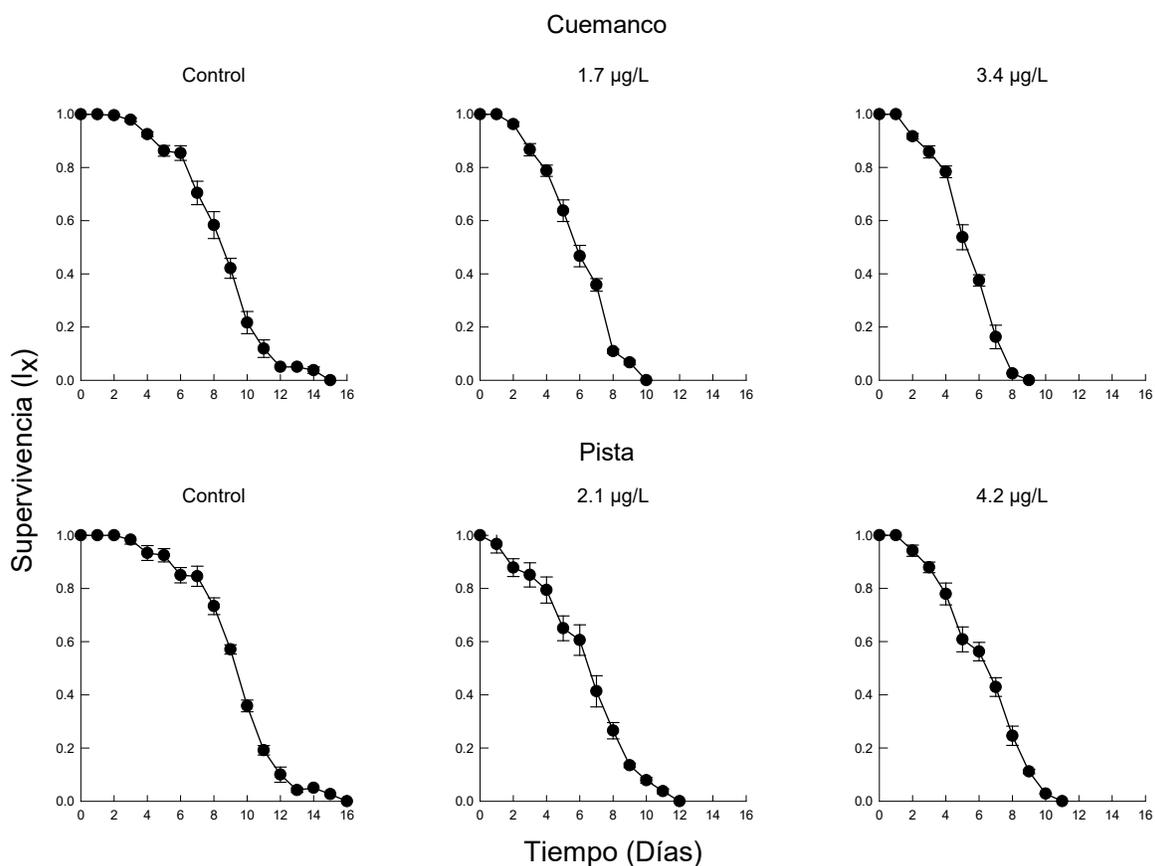


Figura 15 Supervivencia de dos clones de *B. havanaensis* expuesto a dos concentraciones subletales obtenidas a partir del CL₅₀ de extracto crudo de cianobacteria. El clon de Cuemanco tuvo una baja exposición a cianobacterias, mientras que el clon de Pista tuvo una exposición alta a cianobacterias. Las concentraciones utilizadas son de equivalente de microcistinas presentes en el extracto crudo de cianobacterias utilizado.

9.4.2.2. Fecundidad

En cuanto a las curvas de fecundidad, hubo una notoria diferencia entre los dos clones en los tratamientos utilizados, mientras que en los controles no hubo una diferencia tan notoria. En los tratamientos del clon de Cuemanco se ve una disminución en la fecundidad con respecto al aumento de la concentración de extracto crudo de cianobacterias, aunque en los dos el mayor pico de fecundidad se vio alrededor del día tres, en la concentración baja se alcanza a apreciar dos puntos de alta fecundidad, mientras que en tratamiento de 3.4 µg/L se aprecia sólo uno. Ambos tratamientos tuvieron una reducción en el tiempo de reproducción en comparación con el grupo control. Por otro lado, el clon de la Pista tuvo

una fecundidad más alta en los tratamientos, incluso en comparación con el grupo control. En el tratamiento de 2.1 µg/L hubo tres momentos de alta fecundidad, aunque cada uno más bajo que el siguiente, en el tratamiento de concentración alta también se notaron estos tres puntos de alta fecundidad, aunque el segundo no tan notorio.

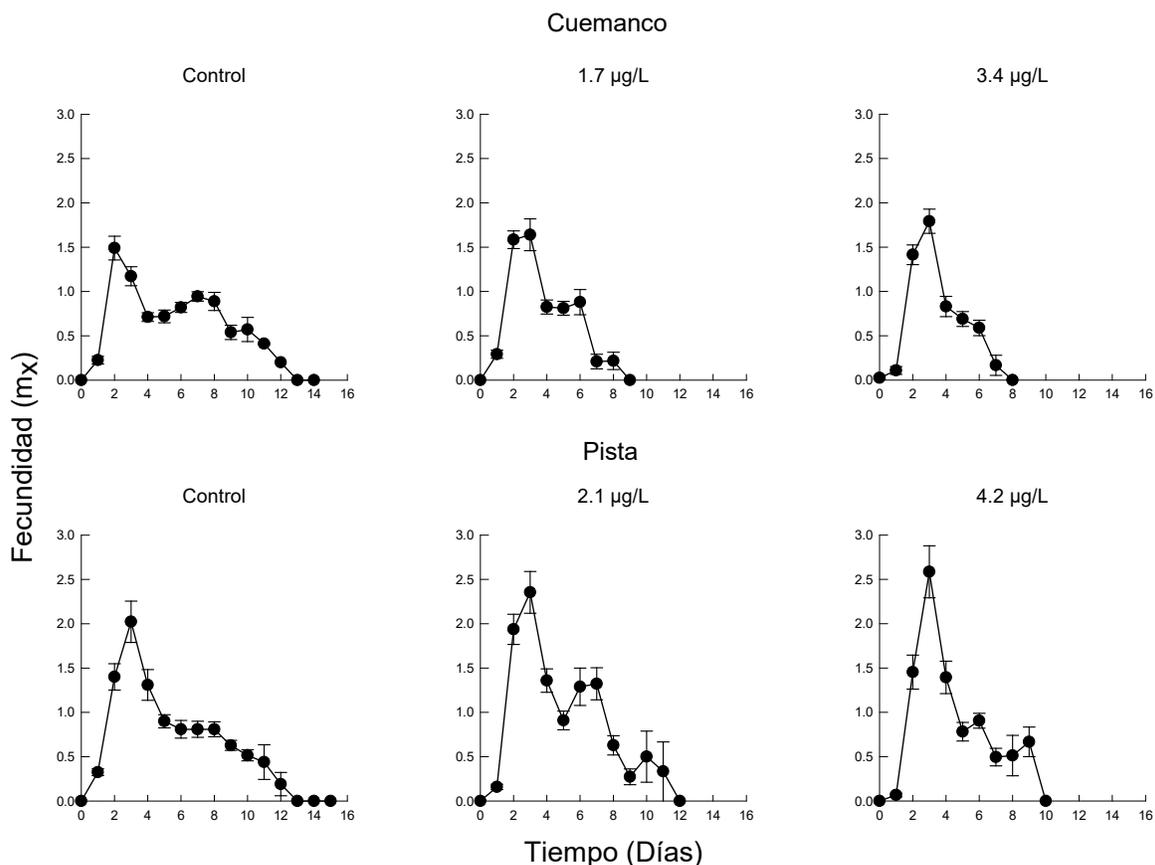


Figura 16 Fecundidad de dos clones de *B. havanaensis* expuesto a dos concentraciones subletales obtenidas a partir del CL₅₀ de extracto crudo de cianobacteria. El clon de Cuemanco tuvo una baja exposición a cianobacterias, mientras que el clon de Pista tuvo una exposición alta a cianobacterias. Las concentraciones utilizadas son de equivalente de microcistinas presentes en el extracto crudo de cianobacterias utilizado.

9.4.2.3. Parámetros demográficos

En los parámetros demográficos derivados de la supervivencia y fecundidad en el clon de Cuemanco se tuvo una diferencia significativa de los tratamientos con respecto al control ($P < 0.001$, prueba de Tukey) en promedio de vida (en un rango de 5.6 a 8.6), expectativa de vida (en un rango de 5.1 y 8.1) y en el tiempo generacional (en un rango de 3.1 y 4.6), aunque en ninguno hubo diferencias significativas entre los tratamientos. En cuanto a la tasa neta de reproducción (en un rango de 4.2 a 6.5) se tuvo una diferencia significativa

mayor en el tratamiento de concentración baja ($P < 0.002$, prueba de Tukey) que en el tratamiento de concentración alta ($P < 0.05$, prueba de Tukey). Por otro lado, en la tasa bruta de reproducción (en un rango de 5.6 y 10) también se tuvieron diferencias significativas de los tratamientos con respecto al control ($P < 0.05$, prueba de Tukey), aunque no se obtuvieron diferencias significativas en ninguna combinación en la tasa intrínseca de reproducción (en un rango de 0.51 a 0.55). (Figura 17).

En cuanto a las variables demográficas del clon de Pista, se obtuvo un patrón similar a lo visto en el clon de Cuemanco, donde el promedio de vida (en un rango de 6.57 a 9.5), esperanza de vida (en un rango de 6 a 9) y tiempo generacional (en un rango de 3.8 a 4.5) tuvieron una diferencia significativa entre el control y los tratamientos ($P < 0.001$, prueba de Tukey). A diferencia de lo observado en clon de Cuemanco, en la tasa bruta de reproducción (en un rango de 8.8 a 10.7) sólo se tuvieron diferencias significativas en la concentración 4.2 $\mu\text{g/L}$ ($P < 0.05$, prueba de Tukey), mientras que en las otras combinaciones no hubo diferencias significativas. Por otro lado, en la tasa neta de reproducción (en un rango de 6.1 a 8.3) sí se tuvieron diferencias significativas entre los tratamientos y el control, siendo mayores en el tratamiento de concentración alta ($P < 0.05$, prueba de Tukey), que lo obtenido en la concentración de 2.1 $\mu\text{g/L}$ ($P < 0.045$, prueba de Tukey). Además, en la tasa intrínseca de crecimiento (en un rango de 0.58 a 0.63) no se obtuvieron diferencias significativas, pero sí numéricas (Figura 18).

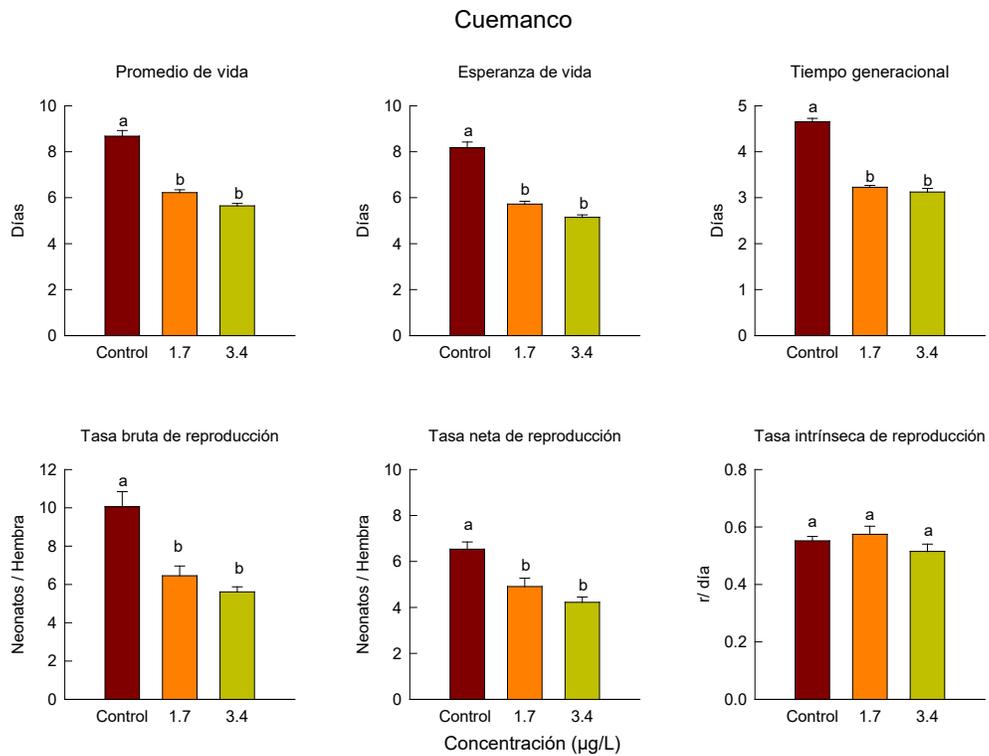


Figura 17 Variables demográficas derivadas de la supervivencia y fecundidad del clon de *B. havanaensis* de Cuemanco expuesto a dos concentraciones de extracto crudo de cianobacterias. Las concentraciones utilizadas son de equivalente de microcistinas presentes en el extracto crudo de cianobacterias utilizado. Las diferentes letras señalan las diferencias significativas.

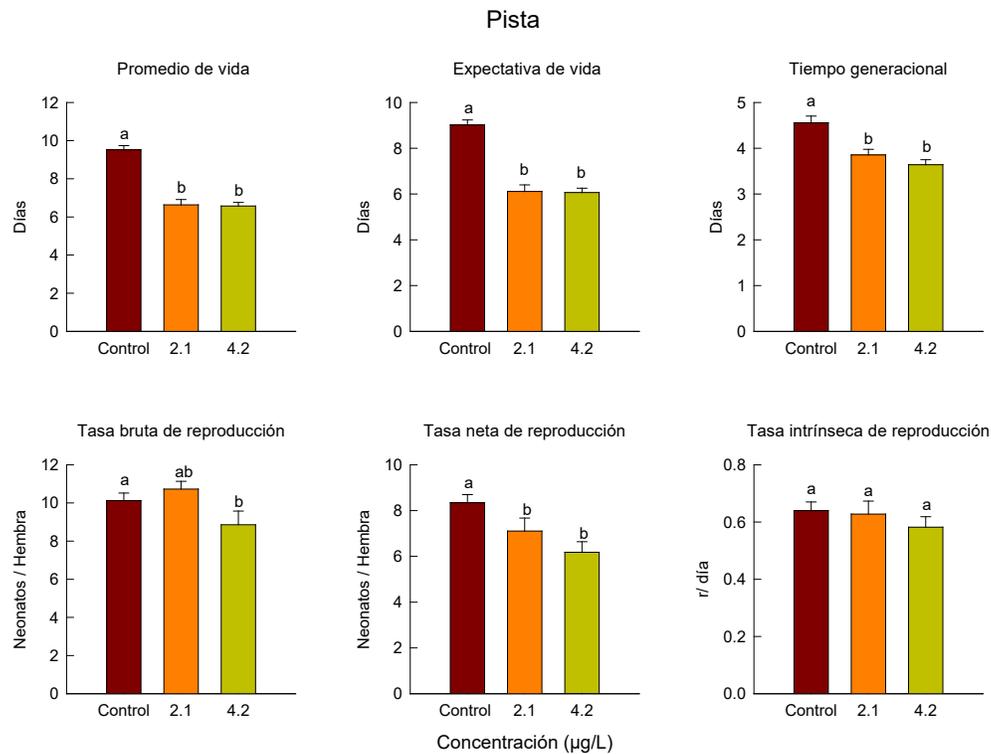


Figura 18 Variables demográficas derivadas de la supervivencia y fecundidad del clon de *B. havanaensis* de Pista expuesto a dos concentraciones de extracto crudo de cianobacterias. Las concentraciones utilizadas son de equivalente de microcistinas presentes en el extracto crudo de cianobacterias utilizado. Las diferentes letras señalan las diferencias significativas.

9.5. Experimentos de alimentación

9.5.1. Tasa de alimentación

La tasa de alimentación de *B. calyciflorus* fue diferente dependiendo del tratamiento al que fue expuesto, siendo en el control donde hubo el mayor consumo de células, teniendo diferencias significativas con todos los tratamientos ($P < 0.001$, prueba de Tukey). Con respecto a los tratamientos, el que tuvo el mayor consumo de células fue en el que hubo baja concentración de extracto crudo de cianobacterias, teniendo diferencias significativas con el resto de los tratamientos probados en el experimento ($P < 0.001$, prueba de Tukey), exceptuando al grupo control, con el cual no hubo diferencias significativas, aunque sí numérica. Los demás tratamientos no tuvieron una diferencia significativa, aunque sí se puede apreciar diferencia numérica en algunos tratamientos. La concentración alta de extracto crudo de cianobacterias y el tratamiento con microplásticos tuvo un comportamiento similar. Por otro lado, la combinación de

microplásticos y la concentración baja de cianobacterias provocó una disminución numérica mayor con respecto a los tratamientos con únicamente microplásticos o extracto crudo. El aumento en la concentración del extracto crudo provocó una disminución mayor de la tasa de alimentación de *B. calyciflorus*, aunque, como fue anteriormente mencionado, no suficiente para tener diferencias significativas (Figura 19).

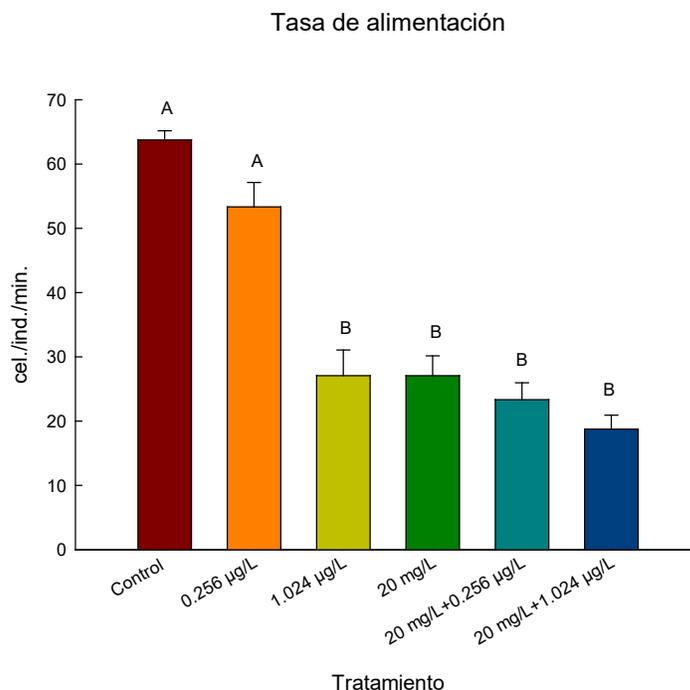


Figura 19 Tasa de alimentación de *Brachionus calyciflorus* alimentado con *Chlorella vulgaris* en presencia de dos concentraciones subletales de extracto crudo de cianobacterias seleccionadas a partir del CL_{50} (0.256 y 1.024 µg/L), microplásticos (20 mg/L) y la combinación de ambos. La densidad de los microplásticos es expresada en mg/L, mientras que la concentración de extracto crudo en µg/L. Las diferentes letras señalan las diferencias significativas.

9.5.2. Tasa de aclaramiento

Con respecto a la tasa de aclaramiento de los adultos de *B. calyciflorus* expuestos a extracto crudo de cianobacterias, microplásticos y la combinación de ambos. Se obtuvo la misma tendencia observada con la tasa de alimentación. El mayor volumen filtrado se obtuvo en el grupo control, el cual tuvo diferencias significativas con respecto a todos los tratamientos ($P < 0.001$, prueba de Tukey), exceptuando el tratamiento con concentración baja de extracto crudo, donde únicamente se aprecia diferencia numérica. Entre los demás tratamientos, al igual que en la tasa de alimentación, sólo hubo diferencias

numéricas en algunos tratamientos. Los tratamientos con únicamente un factor estresante tuvieron un comportamiento parecido. En los tratamientos con combinación de extracto crudo y microplásticos se aprecia una mayor disminución del volumen filtrado con el aumento de la concentración de extracto crudo de cianobacterias, siendo la diferencia entre estos dos tratamientos únicamente numérica (Figura 20).

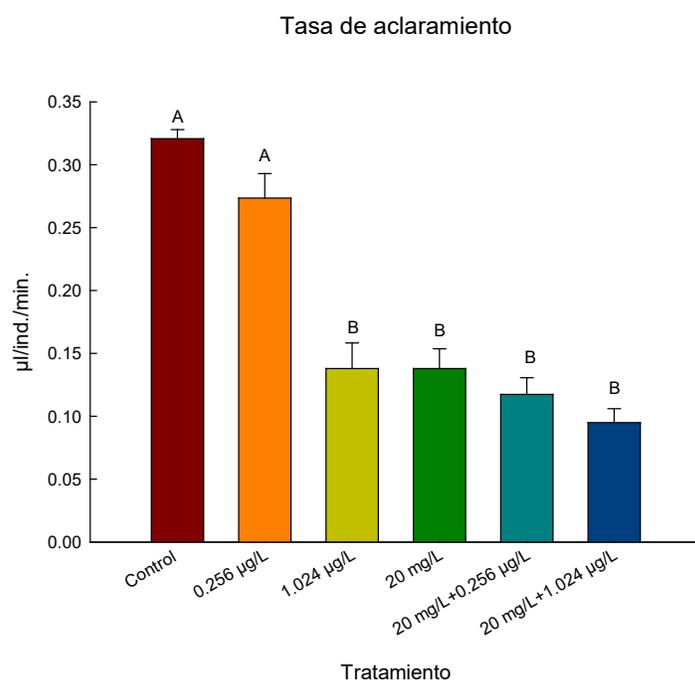


Figura 20 Tasa de aclaramiento de *Brachionus calyciflorus* alimentado con *Chlorella vulgaris* en presencia de dos concentraciones subletales de extracto crudo de cianobacterias seleccionadas a partir del CL_{50} (0.256 y 1.024 $\mu\text{g/L}$), microplásticos (20 mg/L) y la combinación de ambos. La densidad de los microplásticos es expresada en mg/L , mientras que la concentración de extracto crudo en $\mu\text{g/L}$. Las diferentes letras señalan las diferencias significativas.



Figura 21 *Brachionus calyciflorus* con microplásticos en el tracto digestivo.

10. Discusión

Los organismos acuáticos, debido a las circunstancias desfavorables han desarrollado diferentes estrategias para enfrentar estresores ambientales, las cuales son tanto de origen natural como antropogénico (Hanazato, 2001). En México, un diverso número de cuerpos de agua se han reportado con la presencia de cianobacterias, al menos en una temporada del año, dicha presencia tiene un efecto negativo en las comunidades que habitan estos lugares (Berry y Lind, 2010). Valle de Bravo en el Estado de México es uno de los sistemas acuáticos en el país que tiene presencia de cianobacterias durante todo el año. En las muestras tomadas del florecimiento presente en este cuerpo de agua se identificaron cinco especies de cianobacterias: *Woronichinia naegeliana*, *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis wesenbergii*, *Lyngbya birgei* y *Dolichospermum planctonicum*. Dichas especies son también reportadas por Gaytan-Herrera *et al.* (2011) y, al igual que en ese trabajo, las densidades de las especies de cianobacterias observadas fueron diferentes para cada muestra. Además, se ha visto que las cianobacterias reportadas en las muestras utilizadas en este trabajo tienen efectos tóxicos en organismos del zooplancton (Barrios *et al.*, 2015; Nandini *et al.*, 2019).

Las extrapolaciones realizadas a partir de la concentración de equivalentes de microcistinas obtenidas en los extractos crudos utilizados obtuvieron los valores de; 0.655 µg/L de equivalentes de microcistinas en octubre del 2018, mientras que 0.238 µg/L de equivalentes de microcistinas en febrero del 2020, lo cual concuerda con lo observado con Figueroa-Sánchez *et al.* (2014) donde los valores observados fueron debajo de 1 µg/L. Los cuales, de acuerdo con los límites permisibles de la OMS, EPA y la legislación mexicana están dentro de los límites permisibles para consumo y recreación (Ver Tabla 2) (WHO, 1998; EPA, 2015 y 2016; SEGOB, 2017), únicamente el valor obtenido en octubre estaría cerca de pasar el límite permisible dado por la EPA para el consumo en personas menores a 6 años. Aunque, cabe mencionar que, Alillo-Sánchez *et al.* (2014) reportaron niveles de cianotoxinas en diferentes puntos del embalse de Valle de Bravo durante gran parte del año, esto en el 2010, donde encontraron valores por encima de 1 µg/L principalmente en

la primera mitad del año y con valores máximos de 7.5 µg/L. Por lo cual se debe realizar un constante monitoreo tanto de los niveles de cianotoxinas, como de las cianobacterias que conforman los florecimientos de cianobacterias, ya que se ha visto que una mayor concentración de cianotoxinas no necesariamente significa una mayor toxicidad, como lo vio Nandini *et al.* (2019).

En otros cuerpos de agua en el centro del país se han reportado niveles parecidos a los reportados en este trabajo, e incluso más altos. Uno de los más altos son los reportados en el Lago de Zumpango, en el Estado de México, con valores reportados de 34.13 µg/L en el 2017 (Zamora-Barrios *et al.*, 2019) e incluso llegando hasta los 62.4 µg/L en el 2008 (Vasconcelos *et al.*, 2010). También se han reportado concentraciones altas de cianotoxinas en el Lago Mayor de Chapultepec en la Ciudad de México, con concentraciones de 78 µg/L en el 2008. Además, en La presa de Los Ángeles, en el estado de Hidalgo, tiene reportes de valores de 26.3 µg/L, esto viéndose en el 2008 (Vasconcelos *et al.*, 2010). Por otro lado, en otros sitios se han encontrado concentraciones más bajas, como en la Pista de Remo y Canotaje “Virgilio Uribe”, en la Ciudad de México, con valores de 3.59 µg/L en el 2019 (Nandini *et al.*, 2020). Con valores más bajos se encuentran el lago de Tezozómoc, en la Ciudad de México, con 1.615 µg/L en el 2018, el Lago Menor de Chapultepec, en la Ciudad de México, con 6.31 µg/L en el 2018 (Ortiz Barajas, 2019) y el Canal de Cuemanco, en la Ciudad de México, con 4.9 µg/L en el 2008 (Vasconcelos *et al.*, 2010).

En las muestras analizadas en este trabajo, la cianobacteria predominante en la muestra de octubre fue *Dolichospermum planctonicum*, la cual anteriormente era parte del género *Anabaena*, aunque de acuerdo con estudios taxonómicos, se separaron organismos formadores de florecimientos pelágicos y bentónicos en dos géneros distintos, el primer grupo en el género *Dolichospermum*, mientras que el otro grupo continuó como *Anabaena* (Wacklin *et al.*, 2009). El anterior grupo *Anabaena* es uno de los principales productores de anatoxinas (p. ej. anatoxina-a y saxitoxinas) entre las cianobacterias filamentosas y el segundo mayor productor de cianotoxinas sólo superada por el género *Microcystis*. Se ha observado que las toxinas producidas por esta cianobacteria tienen

efectos negativos en la fertilidad, disminuyendo la cantidad de descendencia y retrasando la madurez de los organismos, esto tanto de rotíferos como de cladóceros (Barrios *et al.*, 2015). Las anatoxinas son conocidas por sus efectos sobre el sistema nervioso, pudiendo afectar la sinapsis de las neuronas (Wilson y Hay, 2007; Ferrão-Filho y Kozlowsky, 2011). Los efectos ya observados de las cianotoxinas producidas por *Dolichospermum planctonicum* también se vieron en los resultados de este trabajo. Las variables relacionadas con la fecundidad de *B. havanaensis* (del clon que no había sido expuesto con anterioridad a cianobacterias) fueron las más afectadas cuando fue expuesto al extracto crudo de cianobacterias. Después de *Dolichospermum planctonicum*, la siguiente cianobacteria más abundante fue *Microcystis wesenbergii*, la cual, se ha visto en otros estudios que no es productora de cianotoxinas al no tener el gen *mcy* (Kurmayer *et al.*, 2002; Via-Ordorika *et al.*, 2004) por lo que no se le podría adjudicar la toxicidad por cianotoxinas. Por otro lado, en la muestra de febrero las cianobacterias predominantes fueron diferentes, siendo *Woronichinia naegeliana* la que tuvo la mayor densidad, de la cual existen pocos trabajos donde se demuestre su toxicidad en zooplancton, principalmente por la dificultad que hay para cultivarla en laboratorio (Rajaniemi-Wacklin *et al.*, 2006). Esta especie de cianobacteria se ha visto que produce microginina FR3, la cual es un tipo de péptido lineal que se ha visto son inhibidores de la leucina aminopeptidasa (LAP), además se ha visto que esta cianobacteria produce un tipo diferente de MC-LR, la cual es más tóxica que la obtenida de *M. aeruginosa* (Bober y Bialczyk, 2017). En esta muestra, la otra cianobacteria con mayor densidad fue *M. aeruginosa*, la cual es una de las cianobacterias más importantes responsable de la toxicidad de los florecimientos en cuerpos de agua continentales (Boyer, 2008), cerca de 80 variaciones de microcistinas han sido identificadas en este género, las cuales difieren principalmente en los aminoácidos en las posiciones 2 y 4 (Dawson, 1998). La microcistina leucina-arginina (MC-LR) es la más común y la más tóxica (Yeung *et al.*, 2016).

En otros trabajos se ha visto que extractos crudos con dominancia de *Woronichinia naegeliana* tiene efectos negativos en la reproducción de *Brachionus calyciflorus* (Nandini *et al.*, 2019). También en el caso del cladóceros *Daphnia pulex* se ha visto que tiene efectos

negativos en la fecundidad, aunque en este caso se vio que dependía de la temperatura a la que se encontraran los organismos (Nandini *et al.*, 2021). Los resultados obtenidos en este trabajo muestran efectos negativos sobre la fecundidad por extracto crudo de cianobacterias con predominancia de *W. naegeliana*, principalmente en la primera generación de *B. calyciflorus* expuesta al extracto crudo de cianobacterias. Es diverso el modo de acción que se han observado de las cianotoxinas. En cuanto a efectos en la maquinaria celular y reacciones dentro de la célula se ha visto que producen la inhibición de fosfatasa de tipo 1 (PP-1), 2A (PP-2A) y 3 (PP-3) de eucariontes (Oziol, y Bouaïcha, 2010; Smutná *et al.*, 2014). También está la producción de estrés oxidativo, el cual se ha visto que deteriora diversas funciones celulares; alteraciones en las propiedades físicas y químicas de la membrana celular por la peroxidación de lípidos, daño en ADN, entrecruzamiento de ADN y proteína, daños en la mitocondria y alteraciones en el sistema de antioxidantes (Wojtal-Frankiewicz *et al.*, 2013). En el caso de la MC-LR, se ha visto que puede unirse a la subunidad beta de la ATP sintasa despolarizando la membrana de la mitocondria, lo cual, promueve la liberación de citocromo C la cual es una señal para apoptosis, además provoca la ruptura de la cadena transportadora de electrones que trae como consecuencia producción de especies reactivas de oxígeno (Amado y Monserrat, 2010). También se ha visto que las cianotoxinas que tienen efecto como disruptor endócrino al tener actividad estrogénica (Sychrová *et al.*, 2012).

Por otro lado debido al volumen molecular, estructura e hidrofiliidad, las cianotoxinas no pueden penetrar por la membrana celular, se ha reportado que son tomadas por polipéptidos transportadores de aniones orgánicos multiespecíficos (Štěpánková *et al.*, 2011), los cuales se han encontrado en tejidos de diferentes órganos que se ha reportado pueden afectar; hígado, riñón, tracto digestivo. Además, se ha visto que las cianotoxinas tienen efectos en la unión intracelular, esto viéndose en de células epiteliales de hígado de rata (Nováková *et al.*, 2012) y en el conducto alimenticio de cladóceros (Chen *et al.*, 2005; Rohrlack, 2005).

El uso de extractos crudos está pensado para representar los eventos que ocurren de manera natural cuando las células mueren al final de su ciclo de vida y liberan los

metabolitos secundarios al ambiente. Además de las cianotoxinas, se ha visto que los lipopolisacáridos (LPS), los cuales son un componente estructural de la membrana de bacterias gran negativas y cianobacterias, pueden tener efectos tóxicos (Lindsay *et al.*, 2006). Están compuestos por; una parte lipídica y cadenas de oligosacáridos y polisacáridos, lo cual representa arriba del 1% del peso seco de las células (Notch *et al.*, 2011). Los LPS o también conocidos como endotoxinas se ha visto que pueden suprimir el sistema citocromo P450 (Pires *et al.*, 2011), en mamíferos se ha visto que producen shock séptico y promueven la liberación de citocinas, además, se ha observado una disminución de sustancias involucradas en la desintoxicación de organismos, como lo es la glutatión S transferasa (GST) en pez cebra (Notch *et al.*, 2011). Por lo anterior, se debe tener en cuenta que no hay certeza de que el efecto sea únicamente debido a cianotoxinas, sino que también puede ser por la interacción de otros metabolitos con características tóxicas (Palíkova *et al.*, 2007; Arzate-Cárdenas *et al.*, 2010), lo cual aumenta la importancia de usar extractos crudos, en lugar de sustancias purificadas.

Las diferentes cianobacterias que pueden conformar un florecimiento, además de las densidades en las que estas se encuentran pueden cambiar sustancialmente el efecto tóxico causado sobre los organismos expuestos. En este trabajo se utilizaron dos muestras de cianobacterias, las cuales fueron tomadas en dos temporadas, y a pesar de tener la misma conformación, las densidades en las cuales se presentaron las cianobacterias fueron diferentes. Además, a pesar de haberse tomado la misma cantidad de muestra, ambas mostraron diferentes concentraciones de cianotoxinas, además de diferentes rangos de toxicidad para los organismos utilizados.

El zooplancton es uno de los grupos de organismos más importantes en los sistemas acuáticos al ser la base de la cadena trófica (Thorp y Covich, 2001). Este grupo está sujeto a diferentes niveles de estrés durante todo su ciclo de vida, tanto por factores naturales, como por antropogénicos. Al estar bajo diferentes condiciones ambientales es importante para las especies la adecuación a las circunstancias presentes, para así poder preservar a la especie (Hutchinson, 1967). En el grupo del zooplancton, en particular en rotíferos, se ha visto que a pesar de los diferentes cambios en el ambiente (bióticos y abióticos) este

grupo es capaz de establecer estrategias diferentes con el fin de mantener a la población (King, 1972). Los datos obtenidos en este trabajo reflejan estas estrategias de vida. En ambas especies de rotíferos que fueron utilizadas, al ser expuestas al extracto crudo de cianobacterias fue reducida su supervivencia y se aumentó su fecundidad, como una manera de mantener la supervivencia de la población.

Para poder observar la respuesta que tienen los organismos ante diferentes factores se utilizan pruebas crónicas y agudas. Las pruebas agudas dan un panorama general de la resistencia que tienen los organismos ante alguna condición ambiental, viéndose reflejado en algún factor de la historia de vida del sujeto de estudio, como por ejemplo la supervivencia. Aunque en un grupo como los invertebrados estas resistencias o debilidades pueden variar, incluso entre especies cercanas (Roex *et al.*, 2000). Por otro lado, las pruebas crónicas no sólo toman en cuenta un factor, pueden tomar más de uno, como por ejemplo la fecundidad y la supervivencia, que en conjunto nos permite obtener otros valores de la historia de vida del organismo, como es el promedio de vida y el tiempo generacional (Krebs, 1985). En este trabajo se utilizaron ambos tipos de pruebas, haciendo experimentos de concentración letal media (prueba aguda) y experimentos de tabla de vida demográfica (prueba crónica).

En primera instancia, en este trabajo se vio la presión que ejerce la presencia de extracto crudo de cianobacterias, esto sobre dos especies del género de rotíferos *Brachionus*, utilizando como método de medición la concentración letal media (CL₅₀), la cual es una prueba aguda que es dependiente de la supervivencia de los organismos expuestos por un periodo de tiempo (usualmente 24 o 48 horas) (Rico-Martínez *et al.*, 2016). Las primeras de estas pruebas fueron las realizadas con *B. calyciflorus*, en contacto con extracto crudo de cianobacterias, las cuales fueron ejecutadas en neonatos y adultos. Se ha visto en otros trabajos que neonatos y adultos tienen diferente resistencia a los contaminantes, siendo los neonatos los más sensibles (Sarma *et al.*, 2007), lo cual concuerda con lo observado en este trabajo, ya que los neonatos obtuvieron un valor de 2.38 µg/L de equivalentes de microcistinas, mientras que los adultos 2.56 µg/L de equivalentes de microcistinas. Ambos valores de CL₅₀ están fuera del valor calculado en este trabajo para el agua del embalse,

pero cae dentro de los valores que se han reportado en el embalse de Valle de Bravo (Alillo-Sánchez *et al.*, 2014).

Por otro lado, se observó la diferencia en la tolerancia que tienen dos poblaciones de la misma especie (*B. havanaensis*), las cuales, a pesar de que las localidades de donde se obtuvieron forman parte del sistema de canales del lago de Xochimilco, presentan características diferentes. Una de las poblaciones fue obtenida del canal de Cuemanco en Xochimilco, donde se ha visto que el fitoplancton está dominado por varias especies de algas verdes como *Desmodesmus sp.* y diatomeas como *Cyclotella meneghiniana* (Gayosso-Morales *et al.*, 2017), mientras que presenta densidades bajas de cianobacterias durante el año, esto observándose entre 2005 y 2006 (Jimenez-Contreras *et al.*, 2018). La otra población fue obtenida de la Pista de Remo y Canotaje “Virgilio Uribe”, en la cual se presentan densidades altas de cianobacterias tóxicas a lo largo del año, principalmente del género *Microcystis* (Arzate-Cárdenas *et al.*, 2010; Nandini *et al.*, 2020), además se ha visto que *B. havanaensis* es de las especies de rotíferos que predominan en esta localidad (Gayosso-Morales *et al.*, 2017).

Anteriormente se ha visto que *B. havanaensis* tiene la capacidad de alimentarse de cianobacterias del género *Microcystis* (Alva-Martínez *et al.*, 2009; Sarma *et al.*, 2019), aunque de acuerdo con otros trabajos, organismos que en su lugar de origen interactúan con cianobacterias constantemente tienen una mayor tolerancia a los efectos negativos que estas pueden provocar (Chen *et al.*, 2015). Lo cual concuerda con lo encontrado en este trabajo, ya que la población obtenida de la pista de remo y canotaje presentó un CL₅₀ mayor (42.6 µg/L de equivalentes de microcistinas) que lo observado en la población del canal de Cuemanco (34.25 µg/L de equivalentes de microcistinas). Estos valores de CL₅₀ obtenidos superan el valor calculado en este trabajo y los reportes en otros trabajos, pero hay reportes en otros cuerpos de agua donde se pueden alcanzar valores incluso mayores de cianotoxinas (Vasconcelos *et al.*, 2010).

Además de las pruebas agudas se realizaron pruebas crónicas, las cuales evalúan alteraciones en periodos de tiempo más largos, comúnmente utilizando concentraciones subletales, en las cuales se busca representar cambios importantes en la historia de vida

de los organismos utilizados (Dahms *et al.*, 2011). En este trabajo se observaron efectos en la demografía de dos clones de *B. havanaensis* donde se vio que existen diferencias en los organismos si existe una preexposición al factor estresante (en este caso los metabolitos secundarios de cianobacterias). Se vio que el clon que ya había sido expuesto a cianotoxinas tuvo un LC₅₀ mayor, además de reducción menor en su supervivencia y mayor fecundidad en comparación con el otro clon.

Además, se vio el efecto del extracto crudo de cianobacterias en la demografía de *B. calyciflorus*, en donde se vieron alteraciones en las variables demográficas de dicha especie en dos generaciones consecutivas (F₀ y F₁). Los resultados muestran una mejor adecuación a la exposición de cianotoxinas, donde la segunda generación (F₁) tuvo tanto una mayor supervivencia como una mayor reproducción en comparación de la F₀. Lo cual es consistente con lo observado en otros rotíferos expuestos a disruptores endócrinos, donde una segunda generación tiene un mejor desempeño en variables como la supervivencia (González-Pérez *et al.* 2018).

En este trabajo se vio que independientemente de la especie utilizada y los tratamientos, la exposición al extracto crudo de cianobacterias tiene un efecto negativo en la supervivencia, fecundidad y en variables demográficas, efecto que también se ha visto en otros trabajos donde los organismos fueron alimentados con cianobacterias de distintos tipos (Gilbert y Durand, 1990; Nandini y Rao, 1997; Soares *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2014; Liang *et al.*, 2017). La exposición de *B. calyciflorus* a el extracto crudo de cianobacteria tuvo como efecto en la F₀ una reducción de hasta seis días en su periodo de vida con respecto al control, lo cual coincide con lo mostrado por Nandini *et al.* (2019) en donde también vieron una disminución de alrededor de cinco días en la supervivencia de la misma especie, al exponerlo a extracto crudo de cianobacterias. De la misma forma, en los resultados obtenidos en *B. havanaensis*, se observó una disminución de alrededor de 5 días, en ambos clones utilizados. En ambas especies utilizadas se observó un mayor efecto, tanto en la supervivencia y fecundidad, conforme hubo un aumento en la concentración del extracto crudo de cianobacterias utilizado, efecto que también observó Nandini *et al.* (2019). Este mismo patrón, en la supervivencia, fecundidad y cambio del

efecto conforme la concentración del extracto crudo lo vio Barrios *et al.* (2015) en *Plationus patulus* al exponerlo a diferentes concentraciones de extracto crudo de cianobacterias.

En cuestión a las variables demográficas derivadas de la supervivencia y fecundidad, variables como el tiempo generacional y la esperanza de vida se vieron reducidas con respecto al control tanto en *B. calyciflorus* como en *B. havanaensis*. Este efecto también es reportado por Gilbert (1996), quien vio este efecto en una población de *B. calyciflorus* alimentada con cianobacteria. De la misma forma, Nandini *et al.* (2019) reportan una disminución en el promedio de vida, expectativa de vida, tasa bruta y neta de reproducción, y tiempo generacional, al igual que en el presente trabajo. En otra especie de rotíferos, Barrios *et al.* (2015) encontró un comportamiento parecido en *Plationus patulus* en la mayoría de las variables demográficas calculadas en este trabajo. Además, Alva-Martínez *et al.* (2007 y 2009) reporta una reducción en la tasa de crecimiento de las dos especies utilizadas en este trabajo, al alimentarlas con cianobacteria, lo cual coincide con lo observado en este trabajo. Sin embargo, en el caso de *B. calyciflorus* hubo un aumento en la tasa intrínseca de reproducción en la concentración más alta.

Por otro lado, también se realizaron experimentos de alimentación, en donde se observaron los efectos de la exposición a extracto crudo de cianobacterias en el consumo de *Chlorella vulgaris* en adultos de *Brachionus calyciflorus*. Se observó una disminución en la cantidad de células consumidas y en el volumen filtrado por *B. calyciflorus*, esto siendo mayor en con la concentración alta de extracto crudo (tasa de aclaramiento disminuyó 59% y la tasa de alimentación 57%, ambas con respecto al control) que con la concentración baja (tasa de aclaramiento disminuyó 15% y la tasa de alimentación 16%, ambas con respecto al control). Esto concuerda con los datos obtenidos por autores que ofrecieron como alimento la combinación de alga verde con cianobacterias, en donde encontraron que la alimentación se deducía en presencia de cianobacterias (Lürling y Grinten, 2003; Pérez-Morales *et al.*, 2013), esto debido a la presencia de cianotoxinas en las células de cianobacterias. Aunque también se ha visto que no necesariamente se debe a la presencia de cianotoxinas, Davis y Gobler (2011) determinaron el efecto en la

alimentación de cepas de *Microcystis sp.* con y sin producción de microcistinas en la alimentación del cladóceros *Daphnia pulex*, donde observaron que no siempre la cepa con producción de microcistinas era en la que se obtenían las tasas de alimentación y de aclaramiento más bajas. Esto debiéndose a que las cianobacterias no únicamente producen microcistinas, sino una gama amplia de metabolitos con posible efecto tóxico en los organismos expuestos. Además, se ha visto una reducción en la alimentación con otros tóxicos como: cobre, pentaclorofenolato, dicloroanilina, lindano, cadmio, mercurio, naftol y clorpirifos (Ferrando y Andreu, 1993; Ferrando *et al.*, 1993; Juchelka y Snell, 1994).

En conjunto con la entrada de nutrientes debido a los procesos de eutrofización se propicia la entrada de otros contaminantes debido a las actividades del humano, como es el caso de microplásticos (Peller *et al.*, 2020; Hanik *et al.*, 2019). El aumento en los reportes de microplásticos en diferentes ambientes alrededor del mundo ha provocado un creciente aumento en el estudio del efecto que tienen estas partículas en los organismos que están en contacto con ellas (Bradney *et al.*, 2019). En el caso del zooplancton de agua dulce poco ha sido estudiado hasta el momento. En este trabajo se observó la concentración letal media (CL₅₀) que tienen microplásticos de poliestireno de 30 µm en *B. calyciflorus*, observándose un CL₅₀ de 21.91 mg/L. En rotíferos de agua salada se ha visto un CL₅₀ de 10 mg/L con microplásticos de polietileno de 4 a 6 µm en *B. plicatilis* (Beiras *et al.*, 2018). Este valor está por debajo en contraste con lo observado en este trabajo. El motivo está directamente relacionado con el tamaño de los microplásticos y la sensibilidad de cada especie, ya que el tamaño de ambas especies es muy parecido.

A pesar de que los rotíferos se pueden considerar filtradores generalistas, se ha visto que la alimentación en *B. calyciflorus* está muy bien regulada por la corona ciliar, la cual tiene una serie de mecanismos para regular la entrada de alimento (Gilbert y Starkweather, 1977), esta regulación puede estar relacionada con el tamaño de partículas. El tamaño de partículas que comúnmente consumen los rotíferos está alrededor de 20 µm (Pourriot, 1977), aunque se ha visto que puede alimentarse de partículas más grandes (Pagano, 2008), dependiendo de la densidad a la que están las partículas.

En otros trabajos con zooplancton de agua dulce se ha visto un rango amplio de las concentraciones que producen un efecto. En *Daphnia magna* se ha visto que la concentración efectiva media (CE₅₀) necesaria para provocar la inmovilización de los organismos fue de 57.43 mg/L con partículas de polietileno de 1 a 4 µm (Rehse *et al.*, 2016). Por otro lado, con microplásticos del mismo material y tamaño en *Ceriodaphnia dubia*, un cladóceros de tamaño pequeño, donde se vio un CL₅₀ de 2.2 mg/L (Ziajahromi *et al.*, 2017).

En sistemas epicontinentales alrededor del mundo se han reportado diferentes cantidades. En América del Norte y Sur varía de 52508 a 748027 partículas/km², en Europa de 55.1 a 892777 partículas/km² y en Asia de 293 a 19860 partículas/m³ (Sarijan *et al.*, 2020). En cuanto a reportes en México, en el río Atoyac, Puebla, se reportaron microplásticos en un rango de 833.33 a 1633.34 partículas/kg (Shruti *et al.*, 2019). Cabe mencionar que, en los reportes mencionados anteriormente, son variables las metodologías de muestreo, las unidades en las que los reportan y se encuentran en diferentes formas y tamaños los microplásticos. En este trabajo se encontró que la CL₅₀ de *Brachionus calyciflorus* fue de 21.91 mg/L de esferas de poliestireno de 30 µm, que es equivalente a 1476017.247 partículas/L, lo cual está muy por encima de la cantidad de partículas reportadas en otros trabajos. A pesar de que no se han reportado concentraciones cercanas al CL₅₀ de este trabajo, se tiene que considerar el efecto de concentraciones bajas por un largo periodo de tiempo. Se ha reportado que concentraciones de 0.1 mg/L causa reducción en la reproducción, crecimiento poblacional y el crecimiento de los organismos, además que a través de varias generaciones se mantienen estos efectos negativos, pudiendo provocar la extinción de la población (Martins y Guilhermino, 2018).

Además del efecto que tiene por sí solas las partículas, se ha visto que pueden transportar diferentes contaminantes como metales pesados y sustancias orgánicas (Bakir *et al.*, 2014; Brennecke *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2019) lo cual puede provocar un efecto sinérgico. Este tipo de materiales pueden transportar sustancias ya sea por absorción o por adsorción y, debido a que muchos de estos son menos densos que el agua les permite ser transportado

por las corrientes de mares y ríos (Teuten *et al.*, 2007). Al tener distintos medios de transporte y junto con ellos otras sustancias, hace que sea primordial conocer el efecto que tienen en diferentes organismos, ya sea individuales o en conjunto. En este trabajo también se vio si la adición de una concentración subletal del extracto crudo de cianobacterias tenía un efecto en la concentración letal media de microplásticos. Cuando se pusieron combinados los contaminantes hubo una disminución del CL₅₀, al adicionar el 10% del CL₅₀ del extracto crudo (0.256 µg/L de equivalentes de microcistinas) la concentración letal media fue de 18.24 mg/L de microplásticos, mientras que cuando se adicionó el 40% (1.024 µg/L de equivalentes de microcistinas) el CL₅₀ fue de 16.64 mg/L (Figura 10).

Con respecto a los experimentos de alimentación en *B. calyciflorus* en donde hubo presencia de microplásticos, se observó una disminución en la tasa de aclaramiento y de alimentación con respecto al control (reducción del 59% y 57% respectivamente). Esto concuerda con lo observado por Sun *et al.* (2019) en donde vieron que la presencia de microplásticos disminuyó la capacidad de *B. calyciflorus* para alimentarse de *Phaeocystis globosa*. Esto pudiendo ser por un efecto de obstrucción por parte de los microplásticos. Por otro lado, también se vio el efecto combinado de extracto crudo de cianobacterias y microplásticos, donde se observó que en la combinación donde se usó una concentración baja de extracto crudo obtuvo se obtuvieron resultados más bajos que en presencia de un solo factor (tasa de aclaramiento se redujo 65% y tasa de alimentación 63%, ambas con respecto al control). Cuando se expuso a la concentración alta de extracto crudo, la tasa de alimentación tuvo una reducción mayor que el tratamiento anterior (tasa de aclaramiento se redujo 71% y tasa de alimentación 70%). Estos datos concuerdan con lo que se ha observado con otros tóxicos; Jeong *et al.* (2018) determinaron el efecto combinado de microplásticos con éter de tetrabromodifenilo (BDE-47) y también con triclosán sobre aspectos demográficos, donde vieron una disminución en la supervivencia y crecimiento poblacional de *B. koreanus*. También, se ha observado el aumento en el efecto negativo de los microplásticos en combinación con cadmio sobre variables bioquímicas de *Cyprinus carpio* (Banae *et al.*, 2019).

Es importante una mayor cantidad de estudios en esta área de investigación, debido a que Beiras *et al.* (2018) no observaron un cambio en la toxicidad de microplásticos añadidos con benzofenona, ya que en algunas variables encontraron efectos con microplásticos en concentraciones por debajo de los 0.01 mg/L mientras que, cuando utilizaron combinaciones, en concentraciones por encima de 10 mg/L, aunque, mencionan la importancia de estudiar la interacción de otras sustancias con microplásticos y otros organismos.

Se ha observado que, además del efecto mecánico que hay por parte de los microplásticos, también tienen como efectos el estrés oxidativo en rotíferos (Jeong *et al.*, 2018). De la misma forma, se ha observado que las cianotoxinas también tienen un efecto en este mismo aspecto en zooplancton y otros organismos acuáticos (Amado y Monserrat, 2010; Wojtal-Frankiewicz *et al.*, 2013). Al tener un efecto sobre la misma variable podríamos especular que sí existe un efecto sinérgico entre estos dos, aunque se necesitarían más estudios para poder comprobarlo completamente.

Las poblaciones se ven en una constante presión por diferentes cambios en el ambiente que bien pueden ser naturales o de origen antropogénico, estas afecciones pueden ser capaces de tener un fuerte impacto en la dinámica de poblaciones y comunidades, lo cual puede moldear el funcionamiento de un ecosistema (Beckerman *et al.*, 2002; Ramos-Jiliberto y Aranguiz-Acuna, 2013). Han sido variables los factores que pueden afectar el desarrollo de los organismos ante la presencia de estresores en organismos del zooplancton como los rotíferos, tanto de contaminantes como de interacciones biológicas (ej. depredación). Ante estresores en el ambiente un factor importante que deben enfrentar las poblaciones es el relacionado con la reproducción. Una de las estrategias que se ha visto que tiene el zooplancton es el aumento de la reproducción en condiciones desfavorables, con el fin de preservar la especie, como fue observado por Nandini *et al.*, 2021, en donde la presencia de extracto crudo de cianobacterias provocó un aumento en el crecimiento poblacional de *Daphnia pulex*. Aunque también se ha visto que no es necesariamente la mejor estrategia, ya que, puede que la numerosa descendencia tenga poca supervivencia y, por el contrario, organismos que tienen poca descendencia ante un

factor estresante pueden producir progenie de mejor “calidad” (Smith y Fretwell, 1974; Gliwicz y Guisande, 1992). Diferentes factores son importantes en el desarrollo de una progenie con buena eficacia, siendo estas señales químicas (como en el efecto materno) o nutrientes que el progenitor pueda transferir para aumentar su eficacia biológica (Rossiter *et al.*, 1996).

En otros trabajos se ha visto que existe una variación en los efectos de un factor estresante dependiendo del ambiente en el que se hayan desarrollado los organismos. En cladóceros se vio que existe una variación en los efectos ocasionados por cianobacterias dependiendo de la localidad de la cual estos provienen. Sarnelle y Wilson (2005) estudiaron el efecto que tenía la presencia de *Microcystis aeruginosa* en la alimentación de diferentes clones de *Daphnia pulicaria*, los cuales habían sido aislados de cuerpos de agua con presencia de florecimientos de cianobacterias y de otros donde no había registros de florecimientos. En ese trabajo se encontró que los organismos que en su lugar de origen tenían interacción con cianobacterias tenían una mayor tolerancia en la alimentación con estas. De la misma forma Jiang *et al.* (2015) observaron el mismo patrón en diferentes poblaciones de *D. pulex* y *Chydorus sphaericus*, donde además agregan que también hay una correlación de la tolerancia a la alimentación con cianobacteria y la concentración de microcistinas observadas en su lugar de origen.

En cuanto a el efecto de extractos crudos, Nandini *et al.* (2020) observaron el efecto que existía en dos poblaciones de *Moina macrocopa*, una que en su lugar de origen tuvo interacción con cianobacterias, mientras que la otra no. Encontraron que la que había tenido contacto anterior tenía supervivencia y fecundidad mayor en presencia de el extracto crudo de cianobacterias, en comparación con la que no había sido expuesta anteriormente. De la misma forma que en los trabajos antes mencionados se observó en este trabajo, donde el clon de la pista de remo y canotaje tuvo una supervivencia mayor (de dos días), además, la fecundidad fue mayor y duró más tiempo. Esto también concuerda con lo observado por Barrios *et al.* (2017) donde observaron el mismo patrón en dos poblaciones de *B. calyciflorus*, la población que ya había sido expuesta a cianobacterias fue menos sensible a la presencia de extracto crudo de cianobacterias.

Ambas poblaciones utilizadas de *B. havanaensis* fueron mantenidas en condiciones de laboratorio por más de medio año previo a su uso en los bioensayos. A pesar de ello, la población que en su lugar de origen estaba expuesta a cianobacterias, pudo mantener su tolerancia hacia las cianotoxinas presentes en el extracto crudo. Es importante tener en mente que la diferencia en efectos tóxicos aún entre organismos de la misma especie (como en este trabajo) se debe a la variación del genotipo específico de los organismos utilizados, y en el caso de efectos negativos de cianobacterias, se debe considerar una historia coevolutiva en la interacción zooplancton-cianobacteria (Sarnelle *et al.*, 2010). Esta constante interacción puede conducir a una adaptación al estrés cuando la selección local promueve la permanencia de organismos con un genotipo resistente al factor estresante (Kawecki y Ebert, 2004). Genotipos originados bajo ciertas condiciones ambientales están mejor adaptadas que un genotipo originado en condiciones ambientales diferentes (Chen *et al.*, 2015). De la misma forma, organismos que ya tiene resistencia y organismos que no tienen ya esa resistencia pueden inducir un mejor desempeño en la siguiente generación vía efecto materno (Gustafsson *et al.*, 2005).

Otra forma en la que se ha visto hay diferencia en los efectos que pueden ocasionar diversos factores estresantes es por medio del efecto materno, donde el progenitor transfiere cierta información a su progenie con el fin de aumentar su eficacia biológica. Esto se ha observado en interacciones con otras especies, exposiciones a diferentes sustancias tóxicas, o aspectos del ciclo de vida de los organismos. En cuanto a interacciones, como lo es la depredación, se ha visto que la exposición de progenitores a kairomonas producidas por el depredador *Asplanchna sp.* induce un cambio en defensas morfológicas en las siguientes generaciones aun cuando la progenie ya no está en presencia del factor estresante (Gilbert 2002; Yin *et al.*, 2015), aunque progresivamente desaparece el cambio morfológico conforme pasan las generaciones. Además, es mencionado que lo que activa este cambio entre generaciones puede ser debido a alguna señal que es transferida a la progenie, la cual se va “diluyendo” en cada generación (Yin *et al.*, 2015). De igual forma se ha visto que en otras circunstancias, como la eclosión de un huevo de resistencia puede tener efectos con el tipo de descendencia que puede dar el

organismo. En rotíferos monogonontos que acaban de eclosionar de un huevo de resistencia, es menos propensa la descendencia mítica, aunque con el paso de las generaciones aumenta el porcentaje de descendencia mítica (Gilbert y Schröder, 2004).

En los ejemplos anteriores se ve que el efecto materno tiene como propósito un mejor desempeño de la progenie ante diferentes situaciones ambientales, aunque este no siempre es el caso. Hay casos en el que tiene como resultado la producción de progenie de “baja calidad”, esto debido al desgaste energético que puede tener la desintoxicación de algunos contaminantes presentes en el sistema, con el fin de aumentar la tolerancia de los progenitores ante el factor estresante (Marshall, 2008; Fernández-González *et al.*, 2011). Heine-Fuster *et al.* (2017) encontraron que la pre-exposición de *B. calyciflorus* a metamidfos (un plaguicida) no cambió el efecto negativo que tuvo en la primera generación, incluso muestran una disminución en la tasa de crecimiento poblacional. De la misma forma se ha visto que la exposición a otro plaguicida (dimetoato) aumentó la sensibilidad con el paso de las generaciones (Guo *et al.*, 2012), indicando que la exposición parental a un tóxico puede resultar en un incremento de la sensibilidad de la progenie. Aunque no en todos los casos las siguientes generaciones son más sensibles, González-Pérez *et al.* (2018) reportan que la F_0 de *P. patulus* expuesta a triclosán fue más sensible que la F_1 .

En cuanto a los resultados obtenidos en este trabajo se vio una menor sensibilidad en la F_1 con respecto a lo visto en la F_0 , de forma contraria a lo que vio Beyer y Hambright (2017) donde vieron un aumento en la sensibilidad de *B. calyciflorus* al ser alimentado con cianobacteria. Esto puede ser debido a la falta de nutrientes en las cianobacterias (Sperfeld y Wacker, 2009; Wacker y Martin-Creuzburg, 2012), entonces, además de la presencia de toxinas por parte de las cianobacterias la carencia de una buena alimentación aumentaría la sensibilidad de la progenie. Aunque en un trabajo realizado con *Daphnia magna* hay una disminución en la sensibilidad de los organismos en la progenie de progenitores expuestos a cianotoxinas (Gustafsson *et al.* 2005), de la misma manera que en este trabajo. Incluso se encontró un mayor aumento en la supervivencia en el tratamiento de concentración más alta. Barrios *et al.* (2017) encontraron un

comportamiento parecido en *B. calyciflorus*, donde la exposición a extractos crudos de cianobacterias aumentó la tasa de crecimiento, siendo atribuido a que las cianobacterias, a pesar de ser bajas en macromoléculas, ácidos grasos y fósforo, son altas en contenido proteico, representando más del 70% del peso seco, lo cual puede apoyar como suplemento alimenticio. Con esto en mente, podría significar que la exposición prolongada de los organismos al extracto crudo de cianobacterias tiene como consecuencia un mejor uso de este tipo de recursos, viéndose reflejado en tratamientos con mayor cantidad de extracto crudo.

Lo anterior muestra que dependiendo de las condiciones a las que sean expuestos los organismos pueden desarrollar diferentes estrategias en su historia de vida. Se ha demostrado que los rotíferos pueden desarrollar respuestas adaptativas a un ambiente fluctuante, además, se ha mostrado que de los miembros del zooplancton, los rotíferos son los más tolerantes a las microcistinas, siendo un modelo ideal para un mejor acercamiento a procesos de adaptación (Hansson *et al.*, 2007; Tarazona *et al.*, 2019), ya que diferentes condiciones pueden ligar a la generación de efectos maternos en las especies (Alekseev y Lampert, 2001), los cuales son importantes al generar patrones fenotípicos en las poblaciones, que ayuda en las adaptaciones a las condiciones ambientales, además son importantes para comprender la evolución de las poblaciones (Schroeder y Gilbert, 2009).

Con el creciente aumento en los reportes de florecimientos de cianobacterias alrededor del mundo, además del aumento en la duración debido al cambio climático y la eutrofización, tiene como consecuencia un aumento en las interacciones del zooplancton y las cianobacterias (Ger *et al.*, 2014). En México hay reportes de florecimientos de cianobacterias en diversos cuerpos de agua (Arzáte-Cárdenas *et al.*, 2010; Vasconcelos *et al.*, 2010), además es mencionado que en los lugares con presencia de florecimientos hay una gran variedad de organismos del zooplancton presentes (Ramírez-García *et al.*, 2002). En estos casos los organismos que habitan estos cuerpos de agua se verán sujetos a procesos de selección más severos.

El creciente reporte de los florecimientos hace fundamental el estudio de las cianobacterias, ya que los efectos negativos no son únicamente en zooplancton, también se dan en plantas, bacterias, mamíferos y otros organismos acuáticos (Notch *et al.*, 2011; El Khalloufi *et al.*, 2012; Nováková *et al.*, 2012; Sychrová *et al.*, 2012; Vishwakarma, 2013; Gélinas *et al.*, 2014). Además, ha sido observada la bioacumulación de cianotoxinas en tejido de peces (Zamora-Barrios *et al.*, 2019) lo cual hace posible la exposición de los humanos a cianotoxinas, no sólo por el contacto directo con el agua, sino por alimentos. Daños citotóxicos y genotóxicos han sido observados en linfocitos cultivados en laboratorio (Mankiewicz-Boczek *et al.*, 2011), además hay casos registrados de humanos intoxicados con cianotoxinas (Svirčev *et al.*, 2017).

En un escenario como el actual, donde hay cambios de temperatura por el cambio climático y un aumento en la eutrofización de los cuerpos del agua, no sólo tiene como resultado el aumento en la cantidad y duración de los florecimientos de cianobacterias. Se ha visto que el aumento en la temperatura provoca un cambio en el efecto que tienen las cianobacterias en organismos del zooplancton (Claska y Gilbert, 1998; Huang *et al.*, 2012; Xiang *et al.*, 2017), además de efectos propios en las cianobacterias. Entre los efectos que se han visto está el aumento en la producción de cianotoxinas, esto en conjunto con la presencia o ausencia de recursos como el CO₂ y nitrógeno (Davis *et al.*, 2009; Horst *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2016). Con lo anterior, en el escenario actual, el estudio de las cianobacterias y su interacción con los organismos con los que cohabitan, además del estudio de la interacción de las cianobacterias con otras sustancias de origen natural o antropogénico es de vital importancia para tener un adecuado entendimiento del ecosistema.

11. Conclusiones

- La exposición a extractos crudos reflejó efectos negativos en las variables demográficas de ambas especies de rotíferos utilizadas, independientemente del tratamiento, pero la exposición previa, tanto a cianobacterias (en el caso de *Brachionus havanaensis*) como a cianotoxinas (en el caso de *B. calyciflorus*), provocó un aumento en la tolerancia de las especies utilizadas provocando un mejor desempeño.
- En *B. havanaensis* se mostró un mejor desempeño ante la presencia de extracto crudo de cianobacterias en el clon que en su lugar de origen tiene un contacto constante con cianobacterias. En las pruebas agudas se mostró menor sensibilidad del clon con preexposición. Al realizar las pruebas crónicas se mantuvo un mejor desempeño de dicho clon, al tener una mayor supervivencia y fecundidad.
- Los experimentos generacionales en *B. calyciflorus* demostraron que la preexposición a condiciones desfavorables puede desencadenar un cambio en la progenie, mediante el cual puede mejorar su desempeño ante malas condiciones. La segunda generación expuesta al extracto crudo de cianobacterias pudo tener una mayor supervivencia y fecundidad, a comparación de la generación parental.
- La tasa de alimentación y de aclaramiento de *B. calyciflorus* se vio afectada en todos los tratamientos utilizados. La presencia de extracto crudo de cianobacterias y de microplásticos provocaron una disminución parecida. Por otro lado, la combinación de ambos factores resultó en una mayor disminución de las variables alimenticias evaluadas.
- La exposición a microplásticos tuvo efectos negativos en la supervivencia de *B. calyciflorus* esto con base en los bioensayos agudos, además, el ser expuesto a una combinación de microplásticos y una concentración subletal de extracto crudo de cianobacterias tuvo como efecto un aumento en la tolerancia a los microplásticos. A pesar de estos datos se deben hacer más estudios para determinar adecuadamente una relación sinérgica.

12.Literatura citada

- Agrawal, A. A., Laforsch, C., & Tollrian, R. (1999). Transgenerational induction of defences in animals and plants. *Nature*, 401(6748), 60.
- Alekseev V. & Lampert W. (2001) Maternal control of resting-egg production in *Daphnia*. *Nature*, 414, 899–901.
- Alillo-Sánchez J.L., Gaytán-Herrera M.L., Martínez-Almeida V.M. & Ramírez-García P., (2014). Microcystin-LR equivalents and their correlation with *Anabaena spp.* (*Dolichospermum spp.*) in the main reservoir of a hydraulic system of Central Mexico. *Inland Waters*, 4: 327-336.
- Alimba, C. G., & Faggio, C. (2019). Microplastics in the marine environment: Current trends in environmental pollution and mechanisms of toxicological profile. *Environmental Toxicology and Pharmacology*.
- Altshuler, I., Demiri, B., Xu, S., Constantin, A., Yan, N. D., & Cristescu, M. E. (2011). An integrated multi-disciplinary approach for studying multiple stressors in freshwater ecosystems: *Daphnia* as a model organism. *Integrative and Comparative Biology*, 51(4), 623-633.
- Alva-Martínez, A. F., Fernández, R., Sarma, S. S. S., & Nandini, S. (2009). Effect of mixed toxic diets (*Microcystis* and *Chlorella*) on the rotifers *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus havanaensis* cultured alone and together. *Limnologica-Ecology and Management of Inland Waters*, 39(4): 302-305.
- Alva-Martínez, A., F., Sarma, S. S. S., & Nandini, S. (2007). Population dynamics of *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus havanaensis* (Rotifera) on mixed diets with *Microcystis aeruginosa* and green algae. *Hidrobiológica*, 17(Su1), 59-67.
- Amado, L. L., & Monserrat, J. M. (2010). Oxidative stress generation by microcystins in aquatic animals: why and how. *Environment International*, 36(2), 226-235.

- Andrady, A.L., Neal, M.A. (2009). Applications and societal benefits of plastics. *Philosophical Transactions of the Royal Society*. B 364, 1977–1984.
- APHA (American Public Health Association). American Water Works Association & Water Pollution Control Federation. (1994). Standard Methods for the examination of water and wastewater. 17 Ed. APHA Washington D.C, 1197.
- Arzate-Cárdenas, M. A., Olvera-Ramirez, R., & Martinez-Jeronimo, F. (2010). *Microcystis* toxigenic strains in urban lakes: a case of study in Mexico City. *Ecotoxicology*, 19(6), 1157-1165.
- Auta, H. S., Emenike, C. U., & Fauziah, S. H. (2017). Distribution and importance of microplastics in the marine environment: a review of the sources, fate, effects, and potential solutions. *Environment International*, 102, 165-176.
- Avio, C. G., Gorbi, S., & Regoli, F. (2017). Plastics and microplastics in the oceans: from emerging pollutants to emerged threat. *Marine Environmental Research*, 128, 2-11.
- Bakir, A., Rowland, S. J., & Thompson, R. C. (2014). Enhanced desorption of persistent organic pollutants from microplastics under simulated physiological conditions. *Environmental Pollution*, 185, 16-23.
- Banaee, M., Soltanian, S., Sureda, A., Gholamhosseini, A., Haghi, B. N., Akhlaghi, M., & Derikvandy, A. (2019). Evaluation of Single and Combined Effects of Cadmium and Micro-Plastic Particles on Biochemical and Immunological Parameters of Common Carp (*Cyprinus carpio*). *Chemosphere*, 236, 124335.
- Barnes, D. K., Galgani, F., Thompson, R. C., & Barlaz, M. (2009). Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1526), 1985-1998.
- Barrios C., S. Nandini & S.S.S. Sarma. (2015). Effect of crude extracts of *Dolichospermum planctonicum* on the demography of *Platyonus patulus* (Rotifera) and *Ceriodaphnia cornuta* (Cladocera). *Ecotoxicology*, 24: 85-93.

- Barrios, C. A. Z., Nandini, S., & Sarma, S. S. S. (2017). Effect of crude extracts from cyanobacterial blooms in Lake Texcoco (Mexico) on the population growth of *Brachionus calyciflorus* (Rotifera). *Toxicon*, 139, 45-53.
- Bartram J., Carmichael W.W., Chorus I., Jones G. & Skulberg O.M. (1999). Introduction. In: Chorus I, Bartram J (eds) Toxic cyanobacteria in water— A guide to their public health consequences, monitoring and management. E & FN Spon, London, 1-13.
- Beckerman, A., Benton, T. G., Ranta, E., Kaitala, V., & Lundberg, P. (2002). Population dynamic consequences of delayed life-history effects. *Trends in Ecology & Evolution*, 17(6), 263-269.
- Beiras, R., Bellas, J., Cachot, J., Cormier, B., Cousin, X., Engwall, M., Gambardella, C., Garaventa, F., Keiter, S., Le Bihanic, F., López-Ibañez, S., Piazza, V., Rial, D., Tato, T., Vidal-Liñán, L. (2018). Ingestion and contact with polyethylene microplastics does not cause acute toxicity on marine zooplankton. *Journal of Hazardous Materials*, 360, 452-460.
- Bergami, E., Bocci, E., Vannuccini, M.L., Monopoli, M., Salvati, A., Dawson, K.A., Corsi, I. (2016). Nano-sized polystyrene affects feeding, behavior and physiology of brine shrimp *Artemia franciscana* larvae. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 123, 18–25.
- Berry, J. P., & Lind, O. (2010). First evidence of “paralytic shellfish toxins” and cylindrospermopsin in a Mexican freshwater system, Lago Catemaco, and apparent bioaccumulation of the toxins in “tegogolo” snails (*Pomacea patula catemacensis*). *Toxicon*, 55(5), 930-938.
- Beyer, J. E., & Hambright, K. D. (2017). Maternal effects are no match for stressful conditions: a test of the maternal match hypothesis in a common zooplankter. *Functional Ecology*, 31(10), 1933-1940.
- Biginagwa, F.J., Mayoma, B.S., Shashoua, Y., Syberg, K., Khan, F.R. (2016). First evidence of microplastics in the African Great Lakes: recovery from Lake Victoria Nile perch and Nile tilapia. *Journal of Great Lakes Research*. 42 (1), 146e149.

- Blom, J. F., Baumann, H. I., Codd, G. A., & Jüttner, F. (2006). Sensitivity and adaptation of aquatic organisms to oscillapeptin J and [D-Asp³,(E)-Dhb⁷] microcystin-RR. *Archiv für Hydrobiologie*, 167(1-2), 547-559.
- Bober, B., & Bialczyk, J. (2017). Determination of the toxicity of the freshwater cyanobacterium *Woronichinia naegeliana* (Unger) Elenkin. *Journal of Applied Phycology*, 29(3), 1355-1362.
- Borowitzka, M. A. & L. J. Borowitzka. (1988). *Micro-algal Biotechnology*. Cambridge University Press, London.
- Boyer, G. L. (2008). Cyanobacterial toxins in New York and the lower Great Lakes ecosystems. In *Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs* (pp. 153-165). Springer, New York, NY.
- Bradney, L., Wijesekara, H., Palansooriya, K. N., Obadamudalige, N., Bolan, N. S., Ok, Y. S., Rinklebe, J, Kim, K., H. & Kirkham, M. B. (2019). Particulate plastics as a vector for toxic trace-element uptake by aquatic and terrestrial organisms and human health risk. *Environment International*, 131, 104937.
- Brennecke, D., Duarte, B., Paiva, F., Caçador, I., & Canning-Clode, J. (2016). Microplastics as vector for heavy metal contamination from the marine environment. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 178, 189-195.
- Browne, M. A., Crump, P., Niven, S. J., Teuten, E., Tonkin, A., Galloway, T., & Thompson, R. (2011). Accumulation of microplastic on shorelines worldwide: sources and sinks. *Environmental Science & Technology*, 45(21), 9175-9179.
- Buratti, F. M., Manganelli, M., Vichi, S., Stefanelli, M., Scardala, S., Testai, E., & Funari, E. (2017). Cyanotoxins: producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation. *Archives of Toxicology*, 91(3), 1049-1130.
- Burgess, S. C., & Marshall, D. J. (2011). Temperature-induced maternal effects and environmental predictability. *Journal of Experimental Biology*, 214(14), 2329-2336.

- Camargo, J. A., & Alonso, A. (2007). Contaminación por nitrógeno inorgánico en los ecosistemas acuáticos: problemas medioambientales, criterios de calidad del agua, e implicaciones del cambio climático. *Revista Ecosistemas*, 16(2).
- Canniff, P. M., & Hoang, T. C. (2018). Microplastic ingestion by *Daphnia magna* and its enhancement on algal growth. *Science of the Total Environment*, 633, 500-507.
- Carmichael, W. W. (2001). Health effects of toxin-producing cyanobacteria: "The CyanoHABs". *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 7(5), 1393-1407.
- Carmichael, W. W., Azevedo, S. M., An, J. S., Molica, R. J., Jochimsen, E. M., Lau, S., & Eaglesham, G. K. (2001). Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environmental Health Perspectives*, 109(7), 663-668.
- Castañeda, R. A., Avlijas, S., Simard, M. A., & Ricciardi, A. (2014). Microplastic pollution in St. Lawrence river sediments. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 71(12), 1767-1771.
- Catherine, Q., Susanna, W., Isidora, E. S., Mark, H., Aurelie, V., & Jean-François, H. (2013). A review of current knowledge on toxic benthic freshwater cyanobacteria—ecology, toxin production and risk management. *Water Research*, 47(15), 5464-5479.
- Chen, W., Song, L., Ou, D., & Gan, N. (2005). Chronic toxicity and responses of several important enzymes in *Daphnia magna* on exposure to sublethal microcystin - LR. *Environmental Toxicology: An International Journal*, 20(3), 323-330.
- Chen, X., & Stillman, J. H. (2012). Multigenerational analysis of temperature and salinity variability affects on metabolic rate, generation time, and acute thermal and salinity tolerance in *Daphnia pulex*. *Journal of Thermal Biology*, 37(3), 185-194.
- Chen, Y., Zhang, L., & Jiang, X. (2015). Fine-scale local adaptation of cyanobacterial tolerance in *Simocephalus vetulus* (Crustacea: Cladocera). *Journal of Plankton Research*, 37(4), 764-772.

- Claska, M. E., & Gilbert, J. J. (1998). The effect of temperature on the response of *Daphnia* to toxic cyanobacteria. *Freshwater Biology*, 39(2), 221-232.
- Coldsnow, K. D., Mattes, B. M., Hintz, W. D., & Relyea, R. A. (2017). Rapid evolution of tolerance to road salt in zooplankton. *Environmental Pollution*, 222, 367-373.
- CONAGUA (Comisión Nacional del Agua). (2005). Sistema Cutzamala: Agua para millones de mexicanos.
- Cornelissen, G., Gustafsson, Ö., Bucheli, T. D., Jonker, M. T., Koelmans, A. A., & van Noort, P. C. (2005). Extensive sorption of organic compounds to black carbon, coal, and kerogen in sediments and soils: mechanisms and consequences for distribution, bioaccumulation, and biodegradation. *Environmental Science & Technology*, 39(18), 6881-6895.
- Dahms, H. U., Hagiwara, A., & Lee, J. S. (2011). Ecotoxicology, ecophysiology, and mechanistic studies with rotifers. *Aquatic Toxicology*, 101(1), 1-12.
- Dao, T. S., Do-Hong, L. C., & Wiegand, C. (2010). Chronic effects of cyanobacterial toxins on *Daphnia magna* and their offspring. *Toxicon*, 55(7), 1244-1254.
- Dao, T. S., Vo, T. M., Wiegand, C., Bui, B. T., & Dinh, K. V. (2018). Transgenerational effects of cyanobacterial toxins on a tropical micro-crustacean *Daphnia lumholtzi* across three generations. *Environmental Pollution*, 243, 791-799.
- Davis, T. W., & Gobler, C. J. (2011). Grazing by mesozooplankton and microzooplankton on toxic and non-toxic strains of *Microcystis* in the Transquaking River, a tributary of Chesapeake Bay. *Journal of Plankton Research*, 33(3), 415-430.
- Davis, T. W., Berry, D. L., Boyer, G. L., & Gobler, C. J. (2009). The effects of temperature and nutrients on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains of *Microcystis* during cyanobacteria blooms. *Harmful Algae*, 8(5), 715-725.
- Dawson, R. M. (1998). The toxicology of microcystins. *Toxicon*, 36(7), 953-962.
- De Frond, H. L., van Sebille, E., Parnis, J. M., Diamond, M. L., Mallos, N., Kingsbury, T., & Rochman, C. M. (2019). Estimating the mass of chemicals associated with ocean plastic

- pollution to inform mitigation efforts. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 15(4), 596-606.
- Dietrich, S., Ploessl, F., Bracher, F. and Laforsch, C. (2010). Single and combined toxicity of pharmaceuticals at environmentally relevant concentrations in *Daphnia magna* – a multigenerational study. *Chemosphere* 79, 60-66.
- Driedger, A. G. J.; Dürr, H. H.; Mitchell, K.; Van Cappellen, P. (2015). Plastic debris in the Laurentian Great Lakes: A review. *Journal of Great Lakes Research*. 41 (1), 9–19.
- Drugă, B., Turko, P., Spaak, P., & Pomati, F. (2016). Cyanobacteria affect fitness and genetic structure of experimental *Daphnia* populations. *Environmental Science & Technology*, 50(7), 3416-3424.
- El Khalloufi, F., El Ghazali, I., Saqrane, S., Oufdou, K., Vasconcelos, V., & Oudra, B. (2012). Phytotoxic effects of a natural bloom extract containing microcystins on *Lycopersicon esculentum*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 79, 199-205.
- Environmental Protection Agency (EPA). (2015). Recommendations for public water systems to manage cyanotoxins in drinking water. USA.
- Environmental Protection Agency (EPA). (2016). Request for Scientific Views: Draft Human Health Recreational Ambient Water Quality Criteria and/or Swimming Advisories for Microcystins and Cylindrospermopsin. USA.
- Eriksen, M., Mason, S., Wilson, S., Box, C., Zellers, A., Edwards, W., Farley H., & Amato, S. (2013). Microplastic pollution in the surface waters of the Laurentian Great Lakes. *Marine Pollution Bulletin*, 77(1-2), 177-182.
- Fendall, L. S., & Sewell, M. A. (2009). Contributing to marine pollution by washing your face: microplastics in facial cleansers. *Marine Pollution Bulletin*, 58(8), 1225-1228.
- Fernández-González, M. A., González-Barrientos, J., Carter, M. J., & Ramos-Jiliberto, R. (2011). Parent-to-offspring transfer of sublethal effects of copper exposure: metabolic rate and life-history traits of *Daphnia*. *Revista Chilena de Historia Natural*, 84(2), 195-201.

- Ferrando, M. D., & Andreu, E. (1993). Feeding behavior as an index of copper stress in *Daphnia magna* and *Brachionus calyciflorus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 106(2), 327-331.
- Ferrando, M. D., Janssen, C. R., Andreu, E., & Persoone, G. (1993). Ecotoxicological studies with the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus* III. The effects of chemicals on the feeding-behavior. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 26(1), 1-9.
- Ferrão-Filho A. & Azevedo S. (2003). Effects of unicellular and colonial forms of toxic *Microcystis aeruginosa* from laboratory cultures and natural populations on tropical cladocerans. *Aquatic Ecology*. 37: 23-25.
- Ferrão-Filho, A. D. S., & Kozłowsky-Suzuki, B. (2011). Cyanotoxins: bioaccumulation and effects on aquatic animals. *Marine Drugs*, 9(12), 2729-2772.
- Figueroa-Sanchez, M. A., Nandini, S., & Sarma, S. S. S. (2014). Zooplankton community structure in the presence of low levels of cyanotoxins: a case study in a high altitude tropical reservoir (Valle de Bravo, Mexico). *Journal of Limnology*, 73(1), 157-166.
- Finney, D.J., (1971). Probit Analysis, 3rd edn. Cambridge University Press, London.
- Galloway, T.S., Cole, M., Lewis, C. (2017). Interactions of microplastic debris throughout the marine ecosystem. *Nature Ecology & Evolution* 1 (5) (pp. 41559-017).
- Galus, M., Rangarajan, S., Lai, A., Shaya, L., Balshine, S., & Wilson, J. Y. (2014). Effects of chronic, parental pharmaceutical exposure on zebrafish (*Danio rerio*) offspring. *Aquatic Toxicology*, 151, 124-134.
- Gama-Flores, J. L., Huidobro-Salas, M. E., Sarma, S. S. S., & Nandini, S. (2017). Four transgenerational demographic performance of *Moina macrocopa* exposed to chronic levels of cadmium. *Dose-Response*, 15(3), 1559325817723732.
- Gayosso-Morales, M. A., Nandini, S., Martínez-Jeronimo, F. F., & Sarma, S. S. S. (2017). Effect of organic and inorganic turbidity on the zooplankton community structure of a shallow waterbody in Central Mexico (Lake Xochimilco, Mexico). *Journal of Environmental Biology*, 38(6), 1183-1196.

- Gaytan-Herrera M. L., Martinez-Almeida V., Oliva-Martinez M. G., Duran-Díaz A. & Ramírez-García P., (2011) Temporal variation of phytoplankton from the tropical reservoir Valle de Bravo, Mexico. *Journal Environmental Biology*, 32: 117-116.
- Gélinas, M., Fortier, M., Lajeunesse, A., Fournier, M., Gagnon, C., Barnabé, S., & Gagné, F. (2014). Responses of freshwater mussel (*Elliptio complanata*) hemocytes exposed in vitro to crude extracts of *Microcystis aeruginosa* and *Lyngbya wollei*. *Ecotoxicology*, 23(2), 260-266.
- Ger, K. A., Hansson, L. A., & Lürling, M. (2014). Understanding cyanobacteria-zooplankton interactions in a more eutrophic world. *Freshwater Biology*, 59(9), 1783-1798.
- Ghadouani, A., Pinel-Alloul, B., Plath, K., Codd, G. A., & Lampert, W. (2004). Effects of *Microcystis aeruginosa* and purified microcystin-LR on the feeding behavior of *Daphnia pulicaria*. *Limnology and Oceanography*, 49(3), 666-679.
- Gilbert J. (1996). Effect of the temperature on the response of planktonic rotifers to a toxic cyanobacterium. *Ecology*, 77: 1174-1180.
- Gilbert, J. J. (2002). Endogenous regulation of environmentally induced sexuality in a rotifer: a multigenerational parental effect induced by fertilisation. *Freshwater Biology*, 47(9), 1633-1641.
- Gilbert, J. J., & Durand, M. W. (1990). Effect of *Anabaena flos-aquae* on the abilities of *Daphnia* and *Keratella* to feed and reproduce on unicellular algae. *Freshwater Biology*, 24(3), 577-596.
- Gilbert, J. J., & Schröder, T. (2004). Rotifers from diapausing, fertilized eggs: unique features and emergence. *Limnology and Oceanography*, 49(4part2), 1341-1354.
- Gilbert, J. J., & Starkweather, P. L. (1977). Feeding in the rotifer *Brachionus calyciflorus*. *Oecologia*, 28(2), 125-131.
- Gliwicz, Z. M., & Guisande, C. (1992). Family planning in *Daphnia*: resistance to starvation in offspring born to mothers grown at different food levels. *Oecologia*, 91(4), 463-467.

- González-Pérez, B. K., Sarma, S. S. S., Castellanos-Páez, M. E., & Nandini, S. (2018). Multigenerational effects of triclosan on the demography of *Plationus patulus* and *Brachionus havanaensis* (Rotifera). *Ecotoxicology and Environmental safety*, *147*, 275-282.
- Guan, R., & Wang, W. X. (2006). Comparison between two clones of *Daphnia magna*: Effects of multigenerational cadmium exposure on toxicity, individual fitness, and biokinetics. *Aquatic Toxicology*, *76*(3-4), 217-229.
- Guo, R., Ren, X., & Ren, H. (2012). Effects of dimethoate on rotifer *Brachionus calyciflorus* using multigeneration toxicity tests. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, *47*(9), 883-890.
- Gustafsson, S., & Hansson, L. A. (2004). Development of tolerance against toxic cyanobacteria in *Daphnia*. *Aquatic ecology*, *38*(1), 37-44.
- Gustafsson, S., Rengefors, K., & Hansson, L. A. (2005). Increased consumer fitness following transfer of toxin tolerance to offspring via maternal effects. *Ecology*, *86*(10), 2561-2567.
- Hagiwara, A., Kadota, Y., & Hino, A. (2005). Maternal effect by stem females in *Brachionus plicatilis*: effect of starvation on mixis induction in offspring. *Hydrobiologia*, *546*(1), 275-279.
- Hairston Jr, N. G., Holtmeier, C. L., Lampert, W., Weider, L. J., Post, D. M., Fischer, J. M., Cáceres, C. E., Fox, J. A., Gaedke, U. (2001). Natural selection for grazer resistance to toxic cyanobacteria: evolution of phenotypic plasticity?. *Evolution*, *55*(11), 2203-2214.
- Hammers-Wirtz, M., & Ratte, H. T. (2000). Offspring fitness in *Daphnia*: is the *Daphnia* reproduction test appropriate for extrapolating effects on the population level?. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, *19*(7), 1856-1866.
- Hanazato, T. (2001). Pesticide effects on freshwater zooplankton: an ecological perspective. *Environmental Pollution*, *112*(1), 1-10.

- Haney, J. F., & Lampert, W. (2013). Spatial avoidance of *Microcystis aeruginosa* by *Daphnia*: fitness consequences and evolutionary implications. *Limnology and Oceanography*, 58(6), 2122-2132.
- Hanik, N., Amstutz, V., & Zinn, M. (2019). Microplastics—from Anthropogenic to Natural. *CHIMIA International Journal for Chemistry*, 73(10), 841-843.
- Hansson, L. A., Gustafsson, S., Rengefors, K., & Bomark, L. (2007). Cyanobacterial chemical warfare affects zooplankton community composition. *Freshwater Biology*, 52(7), 1290-1301.
- Havens, K. E. (2008). Cyanobacteria blooms: effects on aquatic ecosystems. In *Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs* (pp. 733-747). Springer, New York, NY.
- Hebert, P. D. N., & Crease, T. J. (1980). Another planktonic paradox: coexisting clones of *Daphnia pulex* Leydig. *Science*, 207, 1363-1365.
- Heine-Fuster, I., Aránguiz-Acuña, A., & Ramos-Jiliberto, R. (2017). Pesticide increases transgenerational cost of inducible defenses in a freshwater rotifer. *Hydrobiologia*, 799(1), 249-260.
- Hidalgo-Ruz, V., Gutow, L., Thompson, R.C., Thiel, M. (2012). Microplastics in the marine environment: a review of the methods used for identification and quantification. *Environmental Science Technology*, 46, 3060–3075.
- Hietala, J., LAURÉN - MÄÄTTÄ, CAMILLA, & Walls, M. (1997). Sensitivity of *Daphnia* to toxic cyanobacteria: effects of genotype and temperature. *Freshwater Biology*, 37(2), 299-306.
- Hochmuth, J. D., & De Schampelaere, K. A. (2014). The effect of temperature on the sensitivity of *Daphnia magna* to cyanobacteria is genus dependent. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(10), 2333-2343.

- Horst, G. P., Sarnelle, O., White, J. D., Hamilton, S. K., Kaul, R. B., & Bressie, J. D. (2014). Nitrogen availability increases the toxin quota of a harmful cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*. *Water research*, 54, 188-198.
- Huang, L., Xi, Y., Xu, X., & Wen, X. (2012). Responses in population growth and reproduction of the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus* to microcystin-LR at different temperatures. In *Annales de Limnologie-International Journal of Limnology* (Vol. 48, No. 4, pp. 383-390). EDP Sciences.
- Huisman, J., Codd, G. A., Paerl, H. W., Ibelings, B. W., Verspagen, J. M., & Visser, P. M. (2018). Cyanobacterial blooms. *Nature Reviews Microbiology*, 16(8), 471.
- Huntington TG. (2006). Evidence for intensification of the global water cycle: review and synthesis. *Journal of Hydrology*, 319:83–95
- Hutchinson, G., E. (1967). A treatise on Limnology: Introduction to Lake biology and the Limnoplankton. Jhon Wiley.
- Jeong, C. B., Kang, H. M., Lee, Y. H., Kim, M. S., Lee, J. S., Seo, J. S., Wang, M. & Lee, J. S. (2018). Nanoplastic ingestion enhances toxicity of persistent organic pollutants (POPs) in the monogonont rotifer *Brachionus koreanus* via multixenobiotic resistance (MXR) disruption. *Environmental Science & Technology*, 52(19), 11411-11418.
- Jeong, C. B., Won, E. J., Kang, H. M., Lee, M. C., Hwang, D. S., Hwang, U. K., Zhou, B., Souissi, S., Lee, S. J. & Lee, J. S. (2016). Microplastic size-dependent toxicity, oxidative stress induction, and p-JNK and p-p38 activation in the monogonont rotifer (*Brachionus koreanus*). *Environmental Science & Technology*, 50(16), 8849-8857.
- Jiang, X., Gao, H., Zhang, L., Liang, H., & Zhu, X. (2016). Rapid evolution of tolerance to toxic *Microcystis* in two cladoceran grazers. *Scientific Reports*, 6, 25319.
- Jiang, X., Liang, H., Chen, Y., Xu, X., & Huang, D. (2015). Microgeographic adaptation to toxic cyanobacteria in two aquatic grazers. *Limnology and Oceanography*, 60(3), 947-956.

- Jiménez-Contreras, J., Nandini, S., & Sarma, S. S. S. (2018). Diversity of Rotifera (Monogononta) and egg ratio of selected taxa in the canals of Xochimilco (Mexico City). *Wetlands*, 38(5), 1033-1044.
- Jöhnk K. D., Huisman, J., Sharples, J., Sommeijer, B., Visser, P. M., & Stroom, J. M. (2008). Summer heatwaves promote blooms of harmful cyanobacteria. *Global Change Biology*, 14(3), 495-512.
- Juchelka, C. M., & Snell, T. W. (1994). Rapid toxicity assessment using rotifer ingestion rate. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 26(4), 549-554.
- Kawecki, T. J., & Ebert, D. (2004). Conceptual issues in local adaptation. *Ecology letters*, 7(12), 1225-1241.
- King, C. E. (1972). Adaptation of rotifers to seasonal variation. *Ecology*, 53(3), 408-418.
- Krebs C. J. (1985). *Ecology: The Experimental Analysis of Distribution and Abundance*. 3rd edition. Harper and Row, New York.
- Kurmayer, R., Dittmann, E., Fastner, J., & Chorus, I. (2002). Diversity of microcystin genes within a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis spp.* in lake Wannsee (Berlin, Germany). *Microbial Ecology*, 43(1), 107-118.
- Liang, Y., Ouyang, K., Chen, X., Su, Y., & Yang, J. (2017). Life strategy and grazing intensity responses of *Brachionus calyciflorus* fed on different concentrations of microcystin-producing and microcystin-free *Microcystis aeruginosa*. *Scientific Reports*, 7, 43127.
- Lin, Q., Sarma, S. S. S., & Han, B. P. (2014). Effect of cyanobacterium on competition between rotifers: a population growth study. *Inland Waters*, 4(3), 319-326.
- Lindsay, J., Metcalf, J. S., & Codd, G. A. (2006). Protection against the toxicity of microcystin-LR and cylindrospermopsin in *Artemia salina* and *Daphnia spp.* by pre-treatment with cyanobacterial lipopolysaccharide (LPS). *Toxicon*, 48(8), 995-1001.
- Liu, J., Van Oosterhout, E., Faassen, E. J., Lürding, M., Helmsing, N. R., & Van de Waal, D. B. (2016). Elevated pCO₂ causes a shift towards more toxic microcystin variants in nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa*. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(2).

- Liu, M., Li, J., Wang, W., & Jiang, X. (2019). Immigration shapes evolutionary tolerance to toxic cyanobacteria in two cladoceran grazers. *Hydrobiologia*, 826(1), 397-409.
- Lürling, M., & van der Grinten, E. (2003). Life - history characteristics of *Daphnia* exposed to dissolved microcystin - LR and to the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* with and without microcystins. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 22(6), 1281-1287.
- Lyu, K., Guan, H., Wu, C., Wang, X., Wilson, A. E., & Yang, Z. (2016). Maternal consumption of non-toxic *Microcystis* by *Daphnia magna* induces tolerance to toxic *Microcystis* in offspring. *Freshwater biology*, 61(2), 219-228.
- Lyu, K., Zhang, L., Gu, L., Zhu, X., Wilson, A. E., & Yang, Z. (2017). Cladoceran offspring tolerance to toxic *Microcystis* is promoted by maternal warming. *Environmental pollution*, 227, 451-459.
- Mankiewicz-Boczek, J., Palus, J., Gaęała, I., Izydorczyk, K., Jurczak, T., Dziubałtowska, E., Stępnik, M., Arkusz, J., Komorowska, M., Skowron, A., & Zalewski, M. (2011). Effects of microcystins-containing cyanobacteria from a temperate ecosystem on human lymphocytes culture and their potential for adverse human health effects. *Harmful Algae*, 10(4), 356-365.
- Marshall, D. J. (2008). Transgenerational plasticity in the sea: Context-dependent maternal effects across the life history. *Ecology*, 89(2), 418-427.
- Marshall, D. J., & Uller, T. (2007). When is a maternal effect adaptive?. *Oikos*, 116(12), 1957-1963.
- Martins, A., & Guilhermino, L. (2018). Transgenerational effects and recovery of microplastics exposure in model populations of the freshwater cladoceran *Daphnia magna* Straus. *Science of The Total Environment*, 631, 421-428.
- Mathalon, A., & Hill, P. (2014). Microplastic fibers in the intertidal ecosystem surrounding Halifax Harbor, Nova Scotia. *Marine Pollution Bulletin*, 81(1), 69-79.

- Mayer, P., Vaes, W. H., & Hermens, J. L. (2000). Absorption of hydrophobic compounds into the poly (dimethylsiloxane) coating of solid-phase microextraction fibers: High partition coefficients and fluorescence microscopy images. *Analytical Chemistry*, 72(3), 459-464.
- Merino-Ibarra, M., Monroy-Ríos, E., Vilaclara, G., Castillo, F. S., Gallegos, M. E., & Ramírez-Zierold, J. (2008). Physical and chemical limnology of a wind-swept tropical highland reservoir. *Aquatic Ecology*, 42(3), 335-345.
- Mousseau, T. A., & Fox, C. W. (1998). The adaptive significance of maternal effects. *Trends in Ecology & Evolution*, 13(10), 403-407.
- Mowe, M. A., Mitrovic, S. M., Lim, R. P., Furey, A., & Yeo, D. C. (2015). Tropical cyanobacterial blooms: a review of prevalence, problem taxa, toxins and influencing environmental factors. *Journal of Limnology*, 74 (2), 205-224.
- Nandini, S., & Rao, T. R. (1997). Somatic and population growth in selected cladoceran and rotifer species offered the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* as food. *Aquatic Ecology*, 31(3), 283-298.
- Nandini, S., Araiza-Vázquez, D. A., & Sarma, S. S. S. (2020). *Moina macrocopa* demographic response to harmful cyanobacteria. *Ecohydrology & Hydrobiology*, 21(2), 333-340.
- Nandini, S., Merino-Ibarra, M., & Sarma, S. S. S. (2008). Seasonal changes in the zooplankton abundances of the reservoir Valle de Bravo (State of Mexico, Mexico). *Lake and Reservoir Management*, 24(4), 321-330.
- Nandini, S., Ramírez-García, P., & Sarma, S. S. S. (2005). Seasonal variations in the species diversity of planktonic rotifers in Lake Xochimilco, Mexico. *Journal of Freshwater Ecology*, 20(2), 287-294.
- Nandini, S., S. S. S. Sarma & P. Ramírez-García, (2000). Life table demography and population growth of *Daphnia laevis* (Cladocera) under different densities of *Chlorella vulgaris* and *Microcystis aeruginosa*. *Crustaceana*, 73: 1273-1286.

- Nandini, S., Sánchez-Zamora, C., & Sarma, S. S. S. (2019). Toxicity of cyanobacterial blooms from the reservoir Valle de Bravo (Mexico): A case study on the rotifer *Brachionus calyciflorus*. *Science of the Total Environment*, 688, 1348-1358.
- Nandini, S., Sánchez-Zamora, C., & Sarma, S. S. S. (2021). Seasonal Response of *Daphnia pulex* to Cyanobacterial Extracts at Different Temperatures in Valle de Bravo Reservoir (Mexico). *Water*, 13(4), 526.
- Nandini, S., Zamora-Barrios, C. A., & Sarma, S. S. S. (2020). A Long-Term Study on the Effect of Cyanobacterial Crude Extracts from Lake Chapultepec (Mexico City) on Selected Zooplankton Species. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 39(12), 2409-2419.
- Napper I. E. Bakir, A. Rowland, S. J. Thompson, R. C. (2015). Characterisation, quantity and sorptive properties of microplastics extracted from cosmetics. *Marine Pollution Bulletin*, 99 (1–2), 178–85.
- Newman, M. C., 2001. Uptake, biotransformation, detoxification, elimination and accumulation. In Newman, M. C. (ed.), *Fundamentals of Ecotoxicology*. CRC Press, Florida: 25–49.
- Notch, E. G., Miniutti, D. M., Berry, J. P., & Mayer, G. D. (2011). Cyanobacterial LPS potentiates cadmium toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environmental Toxicology*, 26(5), 498-505.
- Nováková, K., Bláha, L., & Babica, P. (2012). Tumor promoting effects of cyanobacterial extracts are potentiated by anthropogenic contaminants—evidence from in vitro study. *Chemosphere*, 89(1), 30-37.
- Okumura D., Sotero-Santos R., Takenaka R. & Rocha O. (2007). Evaluation of cyanobacteria toxicity in tropical reservoirs using crude extracts bioassay with cladocerans. *Ecotoxicology*, 16: 263-270.
- Olvera V. V. (1990). Estudio de la eutroficación del embalse de Valle de Brazo, México. M. Sc. Dissertation. Faculty of Science, UNAM, México city. 87pp.

- Olvera-Viascán, V., Bravo-Inclán, L., & Sánchez-Chávez, J. (1998). Aquatic ecology and management assessment in Valle de Bravo reservoir and its watershed. *Aquatic Ecosystem Health & Management*, 1(3-4), 277-290.
- Ortiz Barajas, Karina, B. (2019). El efecto de *Microcystis spp.* y microcistinas sobre las tasas de alimentación y el comportamiento alimentario de algunos invertebrados seleccionados. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Ortiz-Rodríguez, R., Dao, T. S., & Wiegand, C. (2012). Transgenerational effects of microcystin-LR on *Daphnia magna*. *Journal of Experimental Biology*, 215(16), 2795-2805.
- Oziol, L., & Bouaïcha, N. (2010). First evidence of estrogenic potential of the cyanobacterial heptotoxins the nodularin-R and the microcystin-LR in cultured mammalian cells. *Journal of Hazardous Materials*, 174(1-3), 610-615.
- Paerl H. & Huisman J. (2008). Blooms like it hot. *Science*, 320: 57-58.
- Pagano, M. (2008). Feeding of tropical cladocerans (*Moina micrura*, *Diaphanosoma excisum*) and rotifer (*Brachionus calyciflorus*) on natural phytoplankton: effect of phytoplankton size–structure. *Journal of Plankton Research*, 30(4), 401-414.
- Palíková, M., Krejčí, R., Hilscherová, K., Babica, P., Navrátil, S., Kopp, R., & Bláha, L. (2007). Effect of different cyanobacterial biomasses and their fractions with variable microcystin content on embryonal development of carp (*Cyprinus carpio L.*). *Aquatic Toxicology*, 81(3), 312-318.
- Patricia, G. M., Sybil, S., Cynthia, H. A., Joann, B. M., Louis, C. A., & Vince, K. (2005). The Role of Eutrophication in the Global Proliferation of Harmful Algal Blooms New Perspectives and New Approaches. *Oceanography*, 18(2), 198-209.
- Pelamatti, T., Fonseca-Ponce, I. A., Rios-Mendoza, L. M., Stewart, J. D., Marín-Enríquez, E., Marmolejo-Rodríguez, A. J., Hoyos-Padilla E. M., Galván-Magaña F., & González-Armas, R. (2019). Seasonal variation in the abundance of marine plastic debris in Banderas Bay, Mexico. *Marine Pollution Bulletin*, 145, 604-610.

- Peller, J. R., Nelson, C. R., Babu, B. G., Iceman, C., & Kostelnik, E. (2020). A Review of Microplastics in Freshwater Environments: Locations, Methods, and Pollution Loads. *Contaminants in Our Water: Identification and Remediation Methods*, 65-90.
- Pérez-Morales, A., Sarma, S. S. S., & Nandini, S. (2014). Feeding and filtration rates of zooplankton (rotifers and cladocerans) fed toxic cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*). *Journal of Environmental Biology*, 35(6), 1013.
- Pietsch C., Wiegand C., Áme V., Nicklish A., Wunderlin D. & Pflugmacher S. (2001). The effects of cyanobacterial crude extract on different aquatic organisms: evidence for cyanobacterial toxin modulating factors. *Environ Toxicol*, 16: 535-542.
- Pires, L. M. D., Sarpe, D., Brehm, M., & Ibelings, B. W. (2011). Potential synergistic effects of microcystins and bacterial lipopolysaccharides on life history traits of *Daphnia galeata* raised on low and high food levels. *Aquatic Toxicology*, 104(3-4), 230-242.
- Piringer, O. G., & Baner, A. L. (Eds.). (2008). Plastic packaging materials for food: barrier function, mass transport, quality assurance, and legislation. John Wiley & Sons.
- Plastics Europe: Association of Plastic Manufacturers. Plastics – The Facts. (2019). An Analysis of European plastics production, demand and waste data. <<https://www.plasticseurope.org/en/resources/publications/1804-plastics-facts-2019>>
- Pourriot, R. (1977) Food and feeding habits of the Rotifera. *Archiv für Hydrobiologie*, 8, 243–260.
- Rajaniemi-Wacklin, P., Rantala, A., Mugnai, M. A., Turicchia, S., Ventura, S., Komárková, J., Lepistö, L. & Sivonen, K. (2006). Correspondence between phylogeny and morphology of *Snowella* spp. and *Woronichinia naegeliana*, cyanobacteria commonly occurring in lakes. *Journal of Phycology*, 42(1), 226-232.
- Ramírez-Álvarez, N., Mendoza, L. M. R., Macías-Zamora, J. V., Oregel-Vázquez, L., Alvarez-Aguilar, A., Hernández-Guzmán, Sánchez-Osorio, J.L., Moore, C.J., Silva-Jiménez H., & Navarro-Olache, L. F. (2020). Microplastics: Sources and distribution in surface waters

- and sediments of Todos Santos Bay, Mexico. *Science of The Total Environment*, 703, 134838.
- Ramírez-García, P., Nandini, S., Sarma, S. S. S., Robles-Valderrama, E., Cuesta, I., & Dolores-Hurtado, M. (2002). Seasonal variations of zooplankton abundance in the freshwater reservoir Valle de Bravo (Mexico). *Hydrobiologia*, 467(1), 99-108.
- Ramos-Jiliberto, R., & Aranguiz-Acuna, A. (2013). Bidimensional transfer of effects among organisms: An overlooked concept in community ecology. *Revista Chilena de Historia Natural*, 86(1), 15-20.
- Rehse, S., Kloas, W., & Zarfl, C. (2016). Short-term exposure with high concentrations of pristine microplastic particles leads to immobilisation of *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 153, 91-99.
- Ricciardi, A., Rasmussen, J.B. (1999). Extinction rates of North American freshwater fauna. *Conservation Biology*. 13 (5), 1220e1222.
- Rico-Martínez, R., Arzate-Cárdenas, M. A., Robles-Vargas, D., Pérez-Legaspi, I. A., Alvarado-Flores, J., & Santos-Medrano, G. E. (2016). Rotifers as models in toxicity screening of chemicals and environmental samples. *Invertebrates—Experimental Models in Toxicity Screening. InTech*, 57-99.
- Rigler, F.H. (1971). Feeding rates. Zooplankton. In: A manual for the assessment of secondary productivity in freshwaters. IBP Handbook No. 17. (Ed.: Edmonson W.T. and Winberg G.G.). Blackwell, Oxford.
- Rigosi A., Carey, C. C., Ibelings, B. W., & Brookes, J. D. (2014). The interaction between climate warming and eutrophication to promote cyanobacteria is dependent on trophic state and varies among taxa. *Limnology and Oceanography*, 59(1), 99-114.
- Roex, E. W., Van Gestel, C. A., Van Wezel, A. P., & Van Straalen, N. M. (2000). Ratios between acute aquatic toxicity and effects on population growth rates in relation to toxicant mode of action. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(3), 685-693.

- Rohrlack, T., Christoffersen, K., Dittmann, E., Nogueira, I., Vasconcelos, V., & Börner, T. (2005). Ingestion of microcystins by *Daphnia*: intestinal uptake and toxic effects. *Limnology and Oceanography*, 50(2), 440-448.
- Rohrlack, T., Henning, M., & Kohl, J. G. (1999). Mechanisms of the inhibitory effect of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on *Daphnia galeata*'s ingestion rate. *Journal of Plankton Research*, 21(8).
- Rossi, V., Benassi, G., Leonardi, S., Piotti, A., & Menozzi, P. (2006). Clonal diversity of *Heterocypris incongruens* (Crustacea: Ostracoda) in Northern Italian ricefields. *Archiv für Hydrobiologie*, 166(2), 225-240.
- Rossiter, M. (1996). Incidence and consequences of inherited environmental effects. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 27(1), 451-476.
- Sanchez, W., Bender, C., Porcher, J.M. (2014). Wild gudgeons (*Gobio gobio*) from French rivers are contaminated by microplastics: preliminary study and first evidence. *Environmental Research*. 128, 98e100.
- Sarijan, S., Azman, S., Said, M. I. M., & Jamal, M. H. (2020). Microplastics in freshwater ecosystems: a recent review of occurrence, analysis, potential impacts, and research needs. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-16.
- Sarma S.S.S. & Nandini S. (2006). Review of recent ecotoxicological studies on cladocerans. *J Environ Sci Health B*, 41: 1417-1430.
- Sarma, S. S. S., Nandini, S., Miracle, M. R., & 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.
- Sarma, S. S. S., Peredo-Alvarez, V. M., & Nandini, S. (2007). Comparative study of the sensitivities of neonates and adults of selected cladoceran (Cladocera: Crustacea) species to acute toxicity stress. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 42(10), 1449-1452.

- Sarnelle, O., & Wilson, A. E. (2005). Local adaptation of *Daphnia pulicaria* to toxic cyanobacteria. *Limnology and Oceanography*, 50(5), 1565-1570.
- Sarnelle, O., Gustafsson, S., & Hansson, L. A. (2010). Effects of cyanobacteria on fitness components of the herbivore *Daphnia*. *Journal of Plankton Research*, 32(4), 471-477.
- Schroeder, T., & Gilbert, J. J. (2009). Maternal age and spine development in the rotifer *Brachionus calyciflorus*: increase of spine length with birth orders 1. *Freshwater Biology*, 54(5), 1054-1065.
- Schwarzenbach, R. P., Egli, T., Hofstetter, T. B., Von Gunten, U., & Wehrli, B. (2010). Global water pollution and human health. *Annual Review of Environment and Resources*, 35, 109-136.
- Secretaría de gobernación (SEGOB). (2017). PROYECTO de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-127-SSA1-2017, Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de la calidad del agua. Diario oficial de la federación. México.
- Shahul Hamid, F., Bhatti, M. S., Anuar, N., Anuar, N., Mohan, P., & Periathamby, A. (2018). Worldwide distribution and abundance of microplastic: How dire is the situation?. *Waste Management & Research*, 36(10), 873-897.
- Sharma, S. S., Schat, H., Vooijs, R., & Van Heerwaarden, L. M. (1999). Combination toxicology of copper, zinc, and cadmium in binary mixtures: Concentration-dependent antagonistic, nonadditive, and synergistic effects on root growth in *Silene vulgaris*. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 18(2), 348-355.
- Shruti, V. C., Jonathan, M. P., Rodríguez-Espinosa, P. F., & Rodríguez-González, F. (2019). Microplastics in freshwater sediments of Atoyac River basin, Puebla city, Mexico. *Science of the Total Environment*, 654, 154-163.
- Shruti, V. C., Pérez-Guevara, F., & Kutralam-Muniasamy, G. (2020). Metro station free drinking water fountain-A potential “microplastics hotspot” for human consumption. *Environmental Pollution*, 261, 114227.

- Shruti, V. C., Pérez-Guevara, F., Elizalde-Martínez, I., & Kutralam-Muniasamy, G. (2020). First study of its kind on the microplastic contamination of soft drinks, cold tea and energy drinks-Future research and environmental considerations. *Science of The Total Environment*, 726, 138580.
- Smith, C. C., & Fretwell, S. D. (1974). The optimal balance between size and number of offspring. *The American Naturalist*, 108(962), 499-506.
- Smutná, M., Babica, P., Jarque, S., Hilscherová, K., Maršálek, B., Haeba, M., & Bláha, L. (2014). Acute, chronic and reproductive toxicity of complex cyanobacterial blooms in *Daphnia magna* and the role of microcystins. *Toxicon*, 79, 11-18.
- Snell TW & Janssen CR. (1995). Rotifers in ecotoxicology. *Hydrobiologia*, 313/314: 231- 247
- Snell, T. W., & Hicks, D. G. (2011). Assessing toxicity of nanoparticles using *Brachionus manjavacas* (Rotifera). *Environmental Toxicology*, 26(2), 146-152.
- Snell, T. W., & Marcial, H. S. (2017). Using Rotifers to Diagnosis the Ecological Impacts of Toxicants. In *Rotifers* (pp. 129-147). Springer, Singapore.
- Soares, M. C. S., Lürling, M., & Huszar, V. L. (2010). Responses of the rotifer *Brachionus calyciflorus* to two tropical toxic cyanobacteria (*Cylindrospermopsis raciborskii* and *Microcystis aeruginosa*) in pure and mixed diets with green algae. *Journal of Plankton Research*, 32(7), 999-1008.
- Sperfeld, E., & Wacker, A. (2009). Effects of temperature and dietary sterol availability on growth and cholesterol allocation of the aquatic keystone species *Daphnia*. *Journal of Experimental Biology*, 212(19), 3051-3059.
- Štěpánková, T., Ambrožová, L., Bláha, L., Giesy, J. P., & Hilscherová, K. (2011). In vitro modulation of intracellular receptor signaling and cytotoxicity induced by extracts of cyanobacteria, complex water blooms and their fractions. *Aquatic Toxicology*, 105(3-4), 497-507.
- Sun, Y., Xu, W., Gu, Q., Chen, Y., Zhou, Q., Zhang, L., Gu, L., Huang, Y., Lyu K., & Yang, Z. (2019). Small-Sized Microplastics Negatively Affect Rotifers: Changes in the Key Life-

- History Traits and Rotifer–*Phaeocystis* Population Dynamics. *Environmental Science & Technology*, 53(15), 9241-9251.
- Svirčev, Z., Drobac, D., Tokodi, N., Mijović, B., Codd, G. A., & Meriluoto, J. (2017). Toxicology of microcystins with reference to cases of human intoxications and epidemiological investigations of exposures to cyanobacteria and cyanotoxins. *Archives of Toxicology*, 91(2): 621-650.
- Sychrová, E., Štěpánková, T., Nováková, K., Bláha, L., Giesy, J. P., & Hilscherová, K. (2012). Estrogenic activity in extracts and exudates of cyanobacteria and green algae. *Environment International*, 39(1), 134-140.
- Tarazona, E., Hahn, C., Franch-Gras, L., García-Roger, E. M., Carmona, M. J., & Gómez, A. (2019). Ecological genomics of adaptation to unpredictability in experimental rotifer populations. *Scientific Reports*, 9(1), 1-11.
- Teuten E., Saquing J., Knappe D., Barlaz M., Jonsson S., Björn A., Rowland S., Thompson R., Galloway T., Yamashita R., Ochi D., Watanuki Y., Moore C., Viet P., Tana T., Prudente M., Boonyatumanond R., Zakaria M., Akkhang K., Ogata Y., Hirai H., Iwasa S., Mizukawa K., Hagino Y., Imamura A., Saha M. & Takada H. (2009). Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1526), 2027-2045.
- Teuten, E. L., Rowland, S. J., Galloway, T. S., & Thompson, R. C. (2007). Potential for plastics to transport hydrophobic contaminants. *Environmental Science & Technology*, 41(22), 7759-7764.
- Thorpe J.H. & Covich A.P. (2001). Ecology and classification of North American freshwater invertebrates, 2nd edn. Academic Press. San Diego, California.
- Tillmanns, A. R., Wilson, A. E., Pick, F. R., & Sarnelle, O. (2008). Meta-analysis of cyanobacterial effects on zooplankton population growth rate: species-specific

- responses. *Fundamental and Applied Limnology/Archiv für Hydrobiologie*, 171(4), 285-295.
- Toussaint, B., Raffael, B., Angers-Loustau, A., Gilliland, D., Kestens, V., Petrillo, M., Rio-Echevarria, I., M. & Van den Eede, G. (2019). Review of micro-and nanoplastic contamination in the food chain. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 36(5), 639-673.
- Tsui, M. T., & Wang, W. X. (2004). Maternal transfer efficiency and transgenerational toxicity of methylmercury in *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 23(6), 1504-1511.
- van Straalen, N. M., & Hoffmann, A. A. (2000). Review of experimental evidence for physiological costs of tolerance to toxicants. *Demography in Ecotoxicology*, 147-161.
- Van Wezel, A., Caris, I., Koolsoy, S.A.E. (2016). Release of primary microplastics from consumer products to wastewater in the Netherlands. *Environmental Toxicology Chemistry* 35 (7), 1627–1631.
- Vasconcelos, V., Martins, A., Vale, M., Antunes, A., Azevedo, J., Welker, M., Lopez O., & Montejano, G. (2010). First report on the occurrence of microcystins in planktonic cyanobacteria from Central Mexico. *Toxicon*, 56(3), 425-431.
- Via-Ordorika, L., Fastner, J., Kurmayer, R., Hisbergues, M., Dittmann, E., Komarek, J., Erhard, M., & Chorus, I. (2004). Distribution of microcystin-producing and non-microcystin-producing *Microcystis* sp. in European freshwater bodies: detection of microcystins and microcystin genes in individual colonies. *Systematic and Applied Microbiology*, 27(5), 592-602.
- Vishwakarma, R. (2013). Inhibitory microbial activity and GC-MS based metabolite profile of the halophilic cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. *Algological Studies*, 73-91.
- Vörösmarty, C. J., McIntyre, P. B., Gessner, M. O., Dudgeon, D., Prusevich, A., Green, P., Gildden, S., Bunn, S. E., Sullivan, C. A., Reidy Liermann, C. & Davies, P. M. (2010).

- Global threats to human water security and river biodiversity. *Nature*, 467(7315), 555-561.
- Wacker, A., & Martin-Creuzburg, D. (2012). Biochemical nutrient requirements of the rotifer *Brachionus calyciflorus*: co-limitation by sterols and amino acids. *Functional Ecology*, 26(5), 1135-1143.
- Wacklin, P., Hoffmann, L., & Komárek, J. (2009). Nomenclatural validation of the genetically revised cyanobacterial genus *Dolichospermum* (Ralfs ex Bornet et Flahault) comb. nova. *Fottea*, 9(1), 59-64.
- Walsh, M. R., Whittington, D., & Funkhouser, C. (2014). Thermal transgenerational plasticity in natural populations of *Daphnia*. *Integrative and Comparative Biology*, 54(5), 822-829.
- Wang, F., Yang, W., Cheng, P., Zhang, S., Zhang, S., Jiao, W., & Sun, Y. (2019). Adsorption characteristics of cadmium onto microplastics from aqueous solutions. *Chemosphere*, 235, 1073-1080.
- Weber C.I. (1993). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms, 4th edn. United States, Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio, EPA/600/4-90/027.
- Wehr, J. D., Sheath, R. G., & Kociolek, J. P. (Eds.). (2015). *Freshwater algae of North America: ecology and classification*. Elsevier.
- Whitton, B. A., & Potts, M. (2012). Introduction to the cyanobacteria. In *Ecology of Cyanobacteria II* (pp. 1-13). Springer, Dordrecht.
- Wilson, A. E., & Hay, M. E. (2007). A direct test of cyanobacterial chemical defense: Variable effects of microcystin-treated food on two *Daphnia pulicaria* clones. *Limnology and Oceanography*, 52(4), 1467-1479.
- Wojtal-Frankiewicz, A., Bernasińska, J., Jurczak, T., Gwoździński, K., Frankiewicz, P., & Wielanek, M. (2013). Microcystin assimilation and detoxification by *Daphnia spp.* in

two ecosystems of different cyanotoxin concentrations. *Journal of Limnology*, 72(1), e13.

World Health Organization (WHO). (1998). Guidelines for drinking-water quality, 2nd ed. Addendum to Vol. 2. Health criteria and other supporting information. World Health Organization, Geneva.

Xiang, X. L., Chen, Y. Y., Xu, Q. L., Zhu, L. Y., Wen, X. L., & Xi, Y. L. (2017). Combined Effects of Temperature and the Microcystin MC-LR on the Feeding Behavior of the Rotifer *Brachionus calyciflorus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 99(4), 493-499.

Xue, Y. H., Sun, Z. X., Feng, L. S., Jin, T., Xing, J. C., & Wen, X. L. (2020). Algal density affects the influences of polyethylene microplastics on the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus*. *Chemosphere*, 128613.

Yadav, S., Sinha, R. P., Tyagi, M. B., & Kumar, A. (2011). Cyanobacterial secondary metabolites. *Int J Pharm Bio Sci*, 2(1), 144-167.

Yeung, A. C., D'Agostino, P. M., Poljak, A., McDonald, J., Bligh, M. W., Waite, T. D., & Neilan, B. A. (2016). Physiological and proteomic responses of continuous cultures of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 to changes in iron bioavailability and growth rate. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(19), 5918-5929.

Yin, X. W., Zhao, N. X., Wang, B. H., Li, W. J., & Zhang, Z. N. (2015). Transgenerational and within-generational induction of defensive morphology in *Brachionus calyciflorus* (Rotifera): importance of maternal effect. *Hydrobiologia*, 742(1), 313-325.

You, J., Mallery, K., Hong, J., & Hondzo, M. (2018). Temperature effects on growth and buoyancy of *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Plankton Research*, 40(1), 16-28.

Zalizniak, L., & Nugegoda, D. (2006). Effect of sublethal concentrations of chlorpyrifos on three successive generations of *Daphnia carinata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64(2), 207-214.

Zamora-Barrios, C. A., Nandini, S., & Sarma, S. S. S. (2019). Bioaccumulation of microcystins in seston, zooplankton and fish: A case study in Lake Zumpango, Mexico. *Environmental Pollution*, 249, 267-276.

Ziajahromi, S., Kumar, A., Neale, P. A., & Leusch, F. D. (2017). Impact of microplastic beads and fibers on waterflea (*Ceriodaphnia dubia*) survival, growth, and reproduction: implications of single and mixture exposures. *Environmental Science & Technology*, 51(22), 13397-13406.