



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

“Dinámica poblacional de *Asplanchna sieboldii* (depredador) alimentado con *Plationus patulus* expuesto a microplásticos y cadmio”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

LIMNOLOGÍA

PRESENTA:

José Antonio Hernández Lucero

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. Singaraju Sri Subrahmanya Sarma
Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

COMITÉ TUTOR:

Dr. José Luis Gama Flores
Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

Dr. Marcelo Silva Briano
Universidad Autónoma de Aguascalientes.

Dr. Pedro Ramírez García
Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

Dra. Patricia Bonilla Lemus
Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

CDMX., ENERO, 2022



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.

El sentirse capaz de cualquier cosa por el mero hecho de que exista un Buck Rogers que puede hacernos soñar, que nos diga que no importa lo que hagamos porque nos gusta lo que hacemos, y que los demás no tienen ni idea y nunca la tendrán. Ese Rogers es un algo irracional e inexistente, tu propio desencaje, nacido de un deseo incomprensible para el resto, pero no para ese yo que es como tu hermano pequeño, el yo al que debes proteger, que te hace primero temer pero que luego te anima a no dejarte llevar por nadie que no seas tú mismo.

Laura Fernández

DEDICATORIA

A mis padres, **Imelda Lucero Moreno** y **Antonio Hernández Martínez**, su amor, confianza y apoyo me ha permitido recorrer este camino y concluirlo satisfactoriamente. Si no fuese por ustedes esto hubiera sido aún más complejo de lo que lo hizo la pandemia y las demás adversidades.

A mi hermano, **Eduardo Armando Hernández Lucero**, tu compañía en las actividades fuera de la academia me dan un respiro cuando lo necesito, me siento agradecido por tenerte como cómplice en los buenos y malos momentos.

A mi abuela, **María Teresa Moreno García**, por siempre estar atenta y dispuesta a lo que se necesite.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala y en particular al **Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología** por el apoyo brindado durante este proyecto.

Al CONACYT (1046849) y **PAPIIT** (IG200820) por el financiamiento de este proyecto.

Al Dr. S. S. S. Sarma por guiarme, alentarme y siempre estar atento al proyecto a pesar de las complicaciones que hubieron por la pandemia.

Al Dr. José Luis Gama Flores que siempre tuvo comentarios y reflexiones que me permitieron ver y desarrollar desde otra perspectiva los resultados del proyecto y la vida misma.

Al Dr. Marcelo Silva Briano por su curiosidad hacia el proyecto, sus preguntas permitieron que este proyecto tuviera el mejor desarrollo.

Al Dr. Pedro Ramírez García que siempre estuvo atento a los pequeños detalles tanto del proyecto como de este escrito.

A la Dra. Patricia Bonilla Lemus su atención y preguntas hacia el proyecto permitieron que quedara de la mejor manera posible.

A Meetz, Andrea, Mayra, Lety, Toño, César, Mich, Paulo, Sara, Ron, Nayeli, Carlos y Uriel colegas que pertenecen o pertenecieron al laboratorio de Zoología Acuática con quienes a pesar de la pandemia siempre pude compartir inquietudes, risas, conocimiento y las desgracias comunes del laboratorio.

A mis amigos Iván, Abraham, Ale, Isra, Ricardo, Pris, Dany, Jareck y Diego del equipo de natación PEC, mi otra familia con quien he compartido victorias y derrotas personales desde hace ya algunos años. Los entrenamientos, competencias y la maestría no se hubieran disfrutado tanto de no ser por su compañía y aliento, son los mejores.

A mis amigos biólogos y casi biólogos Almeja, Armando, Tupper, Vero y Pao que desde la licenciatura han estado dando lata y que espero así sigan años más, por más salidas trucas pero con el apoyo de siempre.

A mi compañera de equipo, Lilian Ponce, siempre atenta a mis ñoñerías. Durante este préstamo voluntario de tu tiempo me ayudaste a comprender y sentir la vida desde otras realidades con momentos inolvidables, te quiero requeteharto.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
CAPÍTULO I	3
CONTAMINACIÓN ACUÁTICA.....	3
MICROPLÁSTICOS.....	4
CADMIO	6
ECOTOXICOLOGÍA EN ROTÍFEROS.	7
<i>ASPLANCHNA SIEBOLDII</i>	10
JUSTIFICACIÓN	14
CAPÍTULO II	15
INTRODUCCIÓN	15
ANTECEDENTES	17
HIPÓTESIS	18
OBJETIVOS	18
<i>Objetivo General</i>	18
<i>Objetivos Particulares</i>	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
<i>Aislamiento y cultivo de organismos</i>	18
<i>Microesferas de poliestireno (PS)</i>	19
<i>Solución stock de cadmio (Cd)</i>	20
<i>Pruebas de Concentración Letal Media (CL₅₀)</i>	20
<i>Tasa de alimentación de P. patulus</i>	21
<i>Comportamiento alimentario de A. sieboldii</i>	22
RESULTADOS.....	23
<i>Concentración Letal Media</i>	23
<i>Tasas de alimentación</i>	24
<i>Comportamiento alimentario de A. sieboldii</i>	25
DISCUSIÓN	27
CONCLUSIONES.....	30

CAPÍTULO III.....	32
INTRODUCCIÓN	32
ANTECEDENTES	35
HIPÓTESIS	37
OBJETIVO	37
<i>Objetivo General.....</i>	<i>37</i>
<i>Objetivos Particulares.....</i>	<i>37</i>
MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
<i>Crecimiento poblacional</i>	<i>37</i>
<i>Tabla de vida.....</i>	<i>38</i>
RESULTADOS.....	40
<i>Crecimiento poblacional</i>	<i>40</i>
<i>Tabla de vida.....</i>	<i>43</i>
DISCUSIÓN	51
CONCLUSIONES.....	55
LITERATURA CITADA.....	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida generalizado de rotíferos monogonontos (Tomado de King y Snell, 1977).....	8
Figura 2. Trophi de 5 especies del género <i>Asplanchna</i> . a) <i>A. girodi</i> Sin dientes en el margen interno de los ramus y ausencia de apófisis, presenta subapófisis b) <i>A. brightwellii</i> Presenta dientes en el margen interno de los ramus, además de apófisis y subapófisis bien desarrolladas. c) <i>A. sieboldii</i> Presencia de dientes en el margen interno de los ramus muy robustas, alula en la parte apical, así como apófisis y subapófisis. d) <i>A. silvestrii</i> Presencia de dientes en el margen interno de los ramus, apófisis y subapófisis, destaca la presencia de dos alulas semicirculares en la parte apical. e) <i>A. cf. tropica</i> Sin dientes en el margen interno de los ramus en su lugar tiene prolongaciones de los ramus, pequeñas apófisis y subapófisis. ALU = alula semicircular, A = apófisis, DMIR = Diente en el Margen Interno del Ramus, y SA = Subapófisis. (Tomado de Jiménez-Contreras, 2015).....	11
Figura 3. Morfotipos de <i>Asplanchna sieboldii</i> . a) Saquiforme b) Cruciforme c) Campaniforme o campanulado	15
Figura 4. Mortalidad de <i>P. patulus</i> expuesto a diferentes concentraciones nominales de 2 contaminantes (Cd: cadmio y MPs: microplásticos) y la combinación de ambos. Se muestran los valores y límites de confianza (95%) de la CL ₅₀ de cada prueba.....	24
Figura 5. Tasas de ingesta y filtración de <i>P. patulus</i> expuesto a cadmio (0.009 y 0.018 mg L ⁻¹), microplásticos (40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25 y 0.625 mg L ⁻¹) y la combinación de ambos contaminantes. Se muestra el promedio de 5 repeticiones con su ± error estándar. Los * indican diferencias significativas ($p < 0.05$ ANDEVA una vía).....	155
Figura 6. Comportamiento alimentario de <i>A. sieboldii</i> con <i>P. patulus</i> expuesto previamente a cadmio (0.009 y 0.018 mg L ⁻¹), microplásticos (5 mg L ⁻¹) y la combinación de ambos contaminantes. Se muestra el promedio de 5 repeticiones con su ± error estándar. Los * indican diferencias significativas ($p < 0.05$ ANDEVA una vía).....	26
Figura 7. Curvas de crecimiento poblacional de <i>A. sieboldii</i> alimentado con 1, 2 y 4 ind. mL ⁻¹ de <i>P. patulus</i> expuestos previamente a 10%Cd (0.009 mg L ⁻¹), 20%Cd (0.018 mg L ⁻¹), MPs (5 mg L ⁻¹) y la combinación de ambos contaminantes. Se muestra el promedio de 5 repeticiones con su ± error estándar	41

Figura 8. a) Abundancia máxima y b) Día de abundancia máxima de *A. sieboldii* alimentado con 1, 2 y 4 ind. mL⁻¹ de *P. patulus* expuestos previamente a 10%Cd (0.009 mg L⁻¹), 20%Cd (0.018 mg L⁻¹), MPs (5 mg L⁻¹) y la combinación de ambos contaminantes. Se muestra el promedio de 5 repeticiones con su ± error estándar. Los datos que llevan una letra diferente son estadísticamente significativos ($p < 0.05$, prueba de Tukey).....32

Figura 9. Tasa de crecimiento poblacional (r^{-1}) de *A. sieboldii* alimentado con 1, 2 y 4 ind. mL⁻¹ de *P. patulus* expuestos previamente a 10%Cd (0.009 mg L⁻¹), 20%Cd (0.018 mg L⁻¹), MPs (5 mg L⁻¹) y la combinación de ambos contaminantes. Se muestra el promedio de 5 repeticiones con su ± error estándar. Los datos que llevan una letra diferente son estadísticamente significativos ($p < 0.05$, prueba de Tukey).....42

Figura 10. Curvas de supervivencia en edades específicas (días) de *A. sieboldii* alimentado con 1, 2 y 4 ind. mL⁻¹ de *P. patulus* expuestos previamente a 10%Cd (0.009 mg L⁻¹), 20%Cd (0.018 mg L⁻¹), MPs (5 mg L⁻¹) y la combinación de ambos contaminantes. Se muestra el promedio de 5 repeticiones (cohortes) con su ± error estándar44

Figura 11. Curvas de fecundidad de *A. sieboldii* alimentado con 1, 2 y 4 ind. mL⁻¹ de *P. patulus* expuestos previamente a 10%Cd (0.009 mg L⁻¹), 20%Cd (0.018 mg L⁻¹), MPs (5 mg L⁻¹) y la combinación de ambos contaminantes. Se muestra el promedio de 5 repeticiones (cohortes) con su ± error estándar45

Figura 12. Variables demográficas de *A. sieboldii* alimentado con 1, 2 y 4 ind. mL⁻¹ de *P. patulus* expuestos previamente a 10%Cd (0.009 mg L⁻¹), 20%Cd (0.018 mg L⁻¹), MPs (5 mg L⁻¹) y la combinación de ambos contaminantes. Se muestra el promedio de 5 repeticiones (cohortes) con su ± error estándar. Los datos que llevan una letra distinta son estadísticamente significativos ($p < 0.05$, prueba de Tukey).....47

Figura 13. a) Microesferas de poliestireno utilizadas en investigación, b) MPs y algas verdes, c) *P. patulus* expuesto a solución de hipoclorito de sodio al 4% para visualizar MPs ingeridos, d) *A. sieboldii* alimentado con *P. patulus* expuesto a MPs+10%Cd y e) Estómago de *A. sieboldii*, se observan los MPs que fueron ingeridos y transferidos por *P. patulus* al depredador50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Análisis de varianza de una vía (ANDEVA) sobre el comportamiento alimentario de <i>A. sieboldii</i> alimentado con <i>P. patulus</i> expuesto previamente a concentraciones subletales de cadmio, microplásticos y la combinación de ambos contaminantes. GL: Grados de Libertad; SC: Suma de Cuadrados; MC: Media de Cuadrados ($\alpha=0.05$). Tratamientos con asterisco (*) representa diferencias significativas	26
Tabla 2. Análisis de varianza de dos vías (ANDEVA) sobre las variables del crecimiento poblacional de <i>A. sieboldii</i> alimentado con las densidades seleccionadas de <i>P. patulus</i> expuesto previamente a concentraciones subletales de cadmio, microplásticos y la combinación de ambos contaminantes. GL: Grados de Libertad; SC: Suma de Cuadrados; MC: Media de Cuadrados ($\alpha=0.05$). Tratamientos con asterisco (*) representa diferencias significativas.	43
Tabla 3. Análisis de varianza de dos vías (ANDEVA) sobre las variables demográficas en tabla de vida de <i>A. sieboldii</i> alimentado con <i>P. patulus</i> expuesto previamente a concentraciones subletales de cadmio, microplásticos y la combinación de ambos contaminantes. GL: Grados de Libertad; SC: Suma de Cuadrados; MC: Media de Cuadrados ($\alpha=0.05$). Tratamientos con asterisco (*) representa diferencias significativas	48

Abreviaturas

MPs: Microplásticos

PS: Poliestireno

Cd: Cadmio

10% Cd: 0.009 mg L⁻¹ Cd

20% Cd: 0.018 mg L⁻¹ Cd

LC₅₀: Concentración Letal Media

Ctrl ó Cv: Control

Resumen

Mundialmente, como consecuencia del aumento en la producción de plásticos y la inminente fragmentación de materiales mayores, los microplásticos se han convertido en un contaminante que afecta a los sistemas acuáticos epicontinentales. Esto supone un problema a todos los grupos de organismos que habitan en estos ecosistemas como lo es el zooplancton. Las recientes investigaciones demuestran que este grupo se ve afectado por el tamaño de los microplásticos (< 5mm) ya que pueden interferir en el proceso de alimentación hasta ser ingeridos lo cual tiene un efecto en la demografía ante una exposición crónica. Además, este contaminante tiene la capacidad de adsorber otras sustancias que se encuentran en el medio como metales pesados (cadmio). Sin embargo, son pocas las investigaciones que muestren el efecto de los microplásticos en un nivel trófico superior como *Asplanchna*. El objetivo de este trabajo fue evaluar la demografía de *A. sieboldii* alimentado con *P. patulus* expuesto a cadmio y microplásticos. Se utilizaron tres densidades de presa (1, 2 y 4 ind. mL⁻¹), dos concentraciones subletales de cadmio (0.009 y 0.018 mg L⁻¹) y una concentración de microplásticos (5 mg L⁻¹) que se seleccionaron tras haber evaluado como estos contaminantes, mezclados y separados, afectaron el proceso de alimentación de la presa y depredador, y bajo exposición a una concentración aguda. Los resultados mostraron que la combinación de contaminantes presenta un efecto sinérgico, afectan la alimentación de la presa, el comportamiento alimentario de *A. sieboldii* y disminuyen la tasa de reproducción y supervivencia del depredador. El daño mecánico de los MPs, así como las afectaciones en la fisiología de los depredadores tras haber ingerido presas contaminadas con MPs y Cd son la principal causa por la que se presentó un cambio en la alimentación de los organismos y la demografía del depredador.

Abstract

As a consequence of the increase in the production of plastics, microplastics have become a pollutant that affects epicontinental aquatic systems all over the world. This poses a threat to all groups of organisms that inhabit these ecosystems, such as zooplankton. Recent research shows that zooplankton is affected by the size of microplastics (<5mm) since they can interfere with the feeding process until they are ingested. This has an effect on the demography of zooplankton up on chronic exposure. In addition, microplastics have the ability to adsorb other substances such as heavy metals (cadmium) present in the environment. However, few investigations show the effect of microplastics at higher trophic level such as the effect on the carnivorous species including *Asplanchna*. The objective of this work was to evaluate the demography of *Asplanchna sieboldii* fed the herbivorous rotifer prey *Plationus patulus* previously exposed to cadmium and microplastics. Three prey densities were used (1, 2 and 4 ind. ML⁻¹), two sublethal concentrations of cadmium (0.009 and 0.018 mg L⁻¹) and one concentration of microplastics (5 mg L⁻¹) that were selected based on preliminary evaluations. The results showed that these contaminants, separately and together, affected the feeding process of both prey and predator when exposed to acute toxicity. The study also showed that the combination of contaminants had a synergistic effect, affecting the prey feeding rates and the feeding behaviour of the predator. There was a significant decrease in the reproduction and survival rates of the predator. The mechanical damage caused by the microplastics as well as the effects on the physiology of the predators after having ingested prey contaminated with microplastics and Cd are the main cause for the observed changes in the feeding behaviour and the demography of the predator.

Capítulo I.

Introducción general

Contaminación acuática

En general, los sistemas acuáticos cubren el 71% de la superficie terrestre y se clasifican como sistemas acuáticos marinos, salobres y epicontinentales. Dada su importancia en el desarrollo de las actividades y desarrollo humano, estos ecosistemas resienten una contaminación permanente de origen antropogénico (Bashir et al. 2020). Como consecuencia de las actividades humanas, una gran variedad de contaminantes orgánicos e inorgánicos son vertidos en los ecosistemas acuáticos que actúan como receptores de químicos y/o contaminantes sólidos (Bonilla-Lemus et al. 2014; Hampel et al. 2015).

En particular, los sistemas epicontinentales se encuentran más expuestos a los contaminantes, en comparación con otros medios naturales ya que su agua es utilizada en varias actividades industriales y urbanas, misma que regresa a los cuerpos de agua con una gran variedad de desechos (Demirak et al. 2006). Además de esta vía directa de contaminación a la que están sometidos los sistemas epicontinentales, otra sería la escorrentía en temporada de lluvias o el riego en ciertas zonas que pueden transportar e indirectamente afectar los sistemas acuáticos a partir de los contaminantes que se encuentran en el suelo, sistemas subterráneos y/o en la atmósfera (Mushtaq et al. 2019).

Aunque los sistemas acuáticos tienen la capacidad de asimilar contaminantes en la medida que puedan ser peligrosos para la abundancia, diversidad y estructura de la biota, término que se conoce como capacidad asimilativa, la gran mayoría de los sistemas epicontinentales están sometidos a una alta carga de contaminantes donde la conversión de sustancias orgánicas a inorgánicas y las mismas sustancias inorgánicas que se vierten, crean condiciones de demanda biológica de oxígeno, eutrofización y/o interferencia en las interacciones biológicas (Beeby, 1993). De las incontables actividades antropogénicas que generan diversos contaminantes, llegan directa y/o indirectamente hacia los sistemas acuáticos como los que provienen de la

agricultura, ganadería, minería, plantas de tratamiento y refinerías que amenazan y dañan la biota y la calidad del medio, dejando los cuerpos de agua inhabitables para los organismos acuáticos e inutilizables para los humanos (Ekubo y Sikoki 2011).

Entre los contaminantes que contribuyen a los problemas de contaminación acuática que amenazan la salud de los seres vivos y la calidad del medio se encuentran, detergentes, microfibras, fertilizantes, insecticidas, plásticos y metales pesados entre otros (Abowel y Sikoki, 2005).

Microplásticos

Mundialmente la producción de plástico se distribuye en diversas formas y colores, se presenta en cinco tipos: el polietileno, polipropileno, policloruro de vinilo, teraftalato de polietileno y poliestireno (GESAMP, 2015). De todos estos, su producción se ha incrementado exponencialmente desde 1960; en el 2015 se produjeron 381 millones de toneladas, resultando en un acumulado de 6,300 millones de toneladas de desechos plásticos producidos mundialmente, de este total, alrededor del 9% fueron reciclados, 12% incinerados y 79% se depositaron en vertederos o directamente en el ambiente (PlasticsEurope, 2016; Greyer et al. 2017).

El poliestireno es uno de los principales compuestos y tiene altos volúmenes de producción, y como consecuencia del poco manejo que se tiene de los desechos plásticos, estos pueden ser transportados por el viento o por la corriente de agua llegando inevitablemente a sistemas acuáticos, en donde se acumulan en lagos y ríos llegando hasta las costas y al mar abierto (Dris et al. 2015). Estos contaminantes se depositan en los ecosistemas acuáticos como plásticos de gran tamaño y también como microplásticos (Eerkes-Medrano et al. 2015).

Los microplásticos son pequeñas partículas y fibras de polímeros sintéticos cuyo diámetro es inferior a 5 mm, esta clasificación abarca hasta las nanopartículas que constituyen fragmentos de menos de 100 nanómetros (FAO, 2017). Este contaminante emergente que se encuentra en los ecosistemas acuáticos se clasifica como microplásticos primarios, es decir, partículas que originalmente son producidas en ese tamaño y que se adiciona a productos de cuidado personal,

cosméticos, resina plástica, pellets para chorro de aire industrial, así como su utilización para producir otros plásticos, entre otros (Mato et al. 2001; Fendall y Sewell, 2009). Los microplásticos secundarios son resultado de la degradación de macropelásticos por efecto de la radiación UV, abrasión mecánica durante el transporte tanto por el viento como por agua, degradación biológica y/o desintegración (Andrady, 2011; Cole et al. 2011).

Las investigaciones realizadas con microplásticos, en campo y laboratorio, se han centrado principalmente sobre organismos de sistemas marinos (Carpenter et al. 1972; Browne et al. 2011; Barnes et al. 2009). Como resultado de degradación pueden tener un tamaño pequeño, se ha observado que pueden ser ingeridos por animales de diferente nivel trófico como el zooplancton (Desforbes et al. 2015), peces (Lusher et al. 2013), corales (Hall et al. 2015) o ballenas (Lusher et al. 2015). Su presencia al interior de los organismos activa los procesos inflamatorios, estrés oxidativo, agotamiento energético, reducción en la alimentación, disminución de supervivencia y reproducción.

A diferencia de la gran cantidad de literatura que describe cómo los organismos, componentes del medio marino son afectados al ingerir microplásticos, las investigaciones en los sistemas epicontinentales son escasas a pesar de que se ha demostrado la presencia de estos contaminantes en los sedimentos, superficie y dentro de columna de agua en algunos lagos, humedales y ríos (Zbyszewski y Corcoran, 2011; Eriksen et al. 2013). Además, algunas investigaciones que se han realizado sobre peces y ciertos organismos pertenecientes a la comunidad zooplanctónica como son los cladóceros, al igual que en las especies del medio marino de diferentes niveles tróficos, se les reportaron efectos negativos en su eficacia biológica (Peters y Bratton, 2016; Rist et al. 2017; Ziajahromi et al. 2017).

Un impacto adicional de los microplásticos sobre la fauna acuática, es que tienen la capacidad de adsorber sustancias químicas orgánicas y/o inorgánicas que están frecuentemente en los sistemas acuáticos como los metales pesados (Bakir et al. 2014; Bayo et al. 2017; Llorca et al. 2018).

Cadmio

En los ecosistemas epicontinentales, son diversos los contaminantes que se pueden encontrar, destacan los metales pesados ya que han ido aumentando su ocurrencia en las últimas 5 décadas (Osuna, 2012). Esto debido al aumento de las actividades antropogénicas como las actividades industriales, urbanas y mineras que vierten directa o indirectamente sus desechos sobre los sistemas acuáticos (Gómez et al. 2001). Dichas actividades humanas, incluida la deposición atmosférica y el flujo de aguas subterráneas propician un aumento en los niveles de metales pesados que eventualmente, junto con los microplásticos, tienen un efecto sobre la estructura de los ecosistemas y la salud humana (Duffus, 2002).

Los metales pesados son un grupo de elementos metálicos que tienen densidades relativamente altas $> 5 \text{ g cm}^{-3}$ comparadas con el agua. El cobre (Cu), mercurio (Hg), plomo (Pb), arsénico (As) y cadmio (Cd) son parte de este grupo de contaminantes y son de gran importancia para la toxicología por su uso extensivo y toxicidad a pesar de estar en bajas concentraciones (Pan y Wang, 2012).

Hace unos años se registraron altos niveles de metales pesados en los ecosistemas acuáticos epicontinentales mexicanos, en los que destacan el cobre, mercurio y cadmio (Cervantes y Moreno-Sánchez, 1999). Actualmente, se han realizado algunas investigaciones en las cuales se ha estudiado el efecto del cadmio sobre animales acuáticos vertebrados e invertebrados, habiendo mayor énfasis sobre estos últimos, reportándose que este metal causa una reducción en la reproducción y supervivencia en concentraciones de $6 \mu\text{g L}^{-1}$ a ciertos organismos invertebrados microscópicos, lo que representa una amenaza sobre la salud humana y las comunidades acuáticas (Nandini et al. 2007; Juárez-Franco et al. 2007).

El cadmio (Cd) es uno de los metales pesados más tóxicos que comúnmente se encuentran en el ambiente (Cabrera et al. 1998; Yang et al. 2018). Al no tener un rol biológico conocido, induce toxicidad y estrés sobre los seres vivos. A pesar de ello, este contaminante es vertido en aguas superficiales tras ser utilizado en la producción de aleaciones, galvanización, pigmentos, baterías y plásticos (Wright y Welbourn, 2002).

Ecotoxicología en rotíferos.

La ecotoxicología estudia los efectos de las sustancias tóxicas sobre los organismos terrestres y acuáticos en el ecosistema, en la cual queda incluida también la perspectiva química y ecológica (Van Leeuwen y Vermeire, 2007). Hay dos razones principales para medir los efectos de las sustancias tóxicas. Primero, para evaluar los cambios que se están llevando a cabo en los sistemas ecológicos bajo la influencia de los tóxicos vertidos. Segundo, para entender y tratar de anticipar cómo es que los tóxicos impactan niveles específicos y posteriormente sistemas complejos. Esta última perspectiva de las pruebas se aplica sobre los contaminantes que ya se han vertido pero que se desconocen sus efectos en campo (Calow, 2009).

Una manera de comprender la manera en que los tóxicos como el cadmio y microplásticos pueden interferir y afectar en los sistemas acuáticos, es evaluando sus efectos directamente en organismos mediante pruebas de toxicidad (Snell y Janssen, 1995; Moreno, 2003). Estas pruebas de toxicidad se usan para identificar como los agentes químicos pueden tener efectos adversos sobre los organismos; aportando datos para posteriormente evaluar los riesgos asociados a los escenarios donde el agente químico, el organismo y las condiciones están definidos. De tal manera que una prueba de toxicidad se usa para medir el grado de respuesta producido por un estímulo en un nivel específico (Rand y Petrocelli, 1985).

En las últimas décadas, se han utilizado las pruebas de toxicidad crónica que evalúan los efectos de concentraciones subletales de contaminantes en el comportamiento y la dinámica poblacional de organismos acuáticos en tiempos relativamente cortos, de esta manera se pueden comparar varios criterios de valoración como pueden ser: comportamiento (tasa de ingesta y filtración e interacciones depredador-presa), parámetros de crecimiento (supervivencia, tiempo generacional, fecundidad, tasa de crecimiento poblacional, tiempo generacional, esperanza de vida y mortalidad), y bioacumulación (Krebs, 1985; Wallace et al. 2006).

Desde la década de los 80's se han estudiado los mecanismos de alimentación, demografía y natación de la comunidad zooplanctónica, particularmente los rotíferos (Ramírez-García et al. 2002). El filo Rotifera tiene

alrededor de 120 géneros y 2100 especies de rotíferos en el mundo (Fontaneto y De Smet, 2015). Por su amplia distribución, diversidad e importancia dentro la comunidad zooplanctónica al ser determinantes en el flujo de energía hacia niveles tróficos superiores, estos organismos son utilizados para investigar principios ecológicos y demográficos en sistemas acuáticos ya que se tiene bien estudiada su historia de vida y su sensibilidad a los tóxicos (Guo et al. 2012; Rico-Martínez et al. 2016). Además, tienen un fácil manejo y cultivo en laboratorio que permite tener muchos individuos en poco volumen resultado de su alta tasa metabólica con tiempos generacionales cortos, y por su reproducción haploide partenogenética en donde la fase dominante las hembras amícticas producen huevos diploides por meiosis (Figura 1), esto permite obtener rápidamente resultados con significancia estadística (Sarma, 2000).

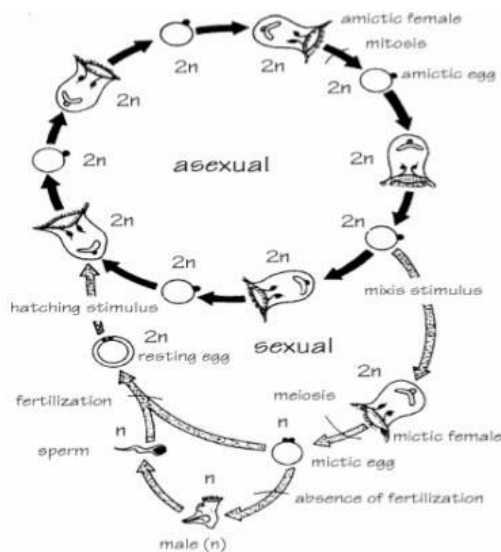


Figura 1. Ciclo de vida generalizado de rotíferos monogonontos (Tomado de King y Snell, 1977).

Estos organismos son metazoos, pseudocelomados, eutélicos con simetría bilateral cuyo tamaño oscila entre 50 – 2500 μm , tienen un par de características diacríticas: el mástax que es un órgano faríngeo de masticación, se compone de 7 piezas quitinosas que en conjunto reciben el nombre de trophi (estructura determinante en la identificación taxonómica), y una corona que es una estructura ciliar anterior que es utilizada para locomoción y alimentación mediante la creación de microcorrientes (Nogrady et al. 1993; Wallace y Snell, 2001; Wallace et al. 2006). De forma general, su morfología se puede dividir en tres regiones: cabeza que es

en donde se localiza la corona ciliar, una porción más gruesa que aloja la mayoría de los órganos que es el tronco y el pie ubicado en la parte posterior y puede incluir o no a los dedos (Segers, 2002).

A pesar de la diversidad, abundancia y facilidades de los rotíferos para realizar estudios ecotoxicológicos, la mayoría de las investigaciones se han realizado con dos especies, *Brachionus calyciflorus* para sistemas dulceacuícolas y *Brachionus plicatilis* para sistemas marinos y salobres (Snell y Janssen, 1995; Won et al. 2017). Los criterios de selección para organismos de prueba son: a) considerar que sean especies abundantes y fácilmente disponibles. b) el utilizar especies nativas o representativas del ecosistema. c) las especies deben tener importancia económica y/o ecológica. d) disponibilidad de las especies para mantener una rutina en el laboratorio. e) contar con los datos de información de su biología básica para poder interpretar los datos de prueba fácilmente (Rand y Petrocelli, 1985). Hay otras especies como *Asplanchna sieboldii* (Leydig), uno de los rotíferos depredadores más voraces en los sistemas lacustres mexicanos que es capaz de alimentarse de casi todos los braquióridos (Gilbert, 2016) y *Plationus patulus*, rotífero herbívoro de sistemas epicontinentales cumplen dichos criterios; además, coexisten en diversos sistemas acuáticos epicontinentales mexicanos que en su mayoría están contaminados; por ejemplo, el Lago de Xochimilco, México (Nandini et al. 2005).

Por ello, un estudio del efecto de *P. patulus*, rotífero herbívoro en sistemas epicontinentales, expuesto a cadmio ante la presencia de microplásticos sobre la dinámica poblacional de un rotífero depredador como *A. sieboldii*, revelaría información adicional de los cambios en la demografía de un depredador que son más sensibles a tóxicos; así como la posible bioacumulación y transferencia de dichos contaminantes que no se podría obtener al analizar por separado a las especies presa o depredador (Gama-Flores et al. 2007). Considerando también la tasa de alimentación de la presa (*P. patulus*) y el comportamiento alimentario del depredador se tiene un panorama más amplio de cómo estos contaminantes afectan a los rotíferos en su demografía y alimentación.

Asplanchna sieboldii

Pertenece a la familia Asplanchnidae que comprende de 15 especies de tres géneros: *Harringia*, organismos litorales con pie desarrollado, *Asplanchnopus*, organismos semilitorales con pie reducido y *Asplanchna* (Walsh et al. 2005). Al igual que sus congéneres es completamente planctónico; además de esta especie, en México se han reportado otras 5, es decir, 6 de las 9 especies que comprenden al género *Asplanchna* las cuales se distribuyen desde zonas templadas hasta regiones tropicales (Segers, 2007; Sarma, 1999).

Para poder identificar a estos asplácnidos, debido a que es muy similar su morfología con sus congéneres se requiere la extracción y observación del trophi (Ruttner-Kolisko, 1974; Wallace et al. 2006). Esta labor requiere tiempo y experiencia dado que las características que lo diferencian se basan en criterios particulares (Altindag et al. 2009; Chang et al 2010). En general, estos rotíferos presentan un trophi incudado que es característico de la familia, el unci y los manubria están reducidos, fulcrum corto y rami largo, curvado, en forma de pinzas que permiten capturar a la presa para después introducirla a la boca y posteriormente al estómago (Segers, 1992; Wallace et al. 2006). Las características del trophi que diferencian a *A. sieboldii* son la presencia de dientes muy gruesos en el margen interno de los ramus, una alula en la parte apical, apófisis y subapófisis (Figura 2).

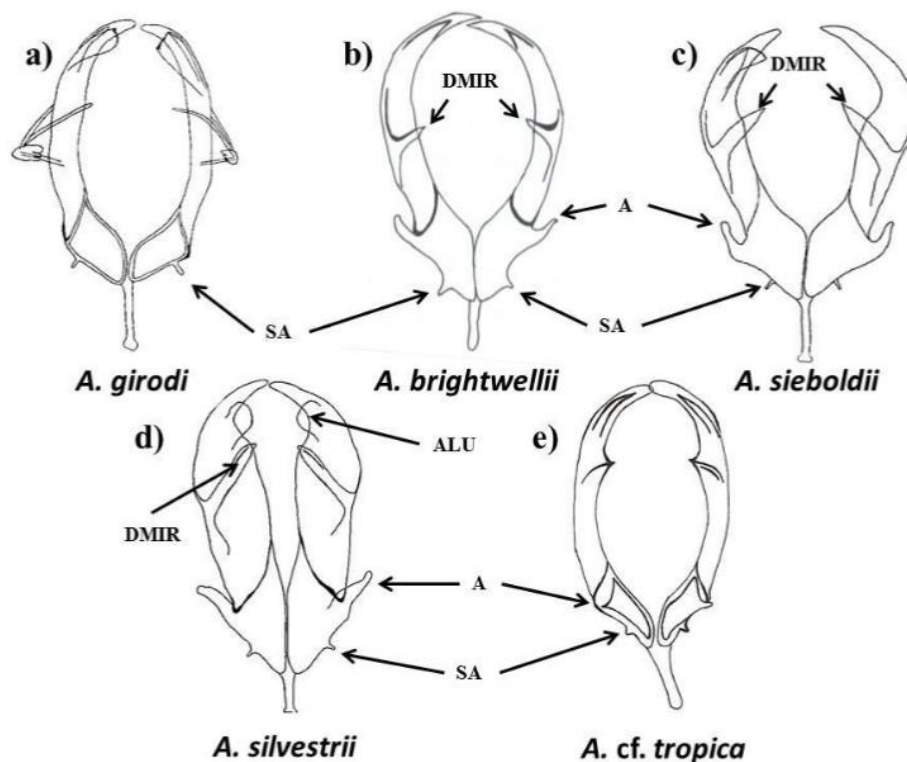


Figura 2. Trophi de 5 especies del género *Asplanchna*. a) *A. girodi* Sin dientes en el margen interno de los ramus y ausencia de apófisis, presenta subapófisis b) *A. brightwellii* Presenta dientes en el margen interno de los ramus, además de apófisis y subapófisis bien desarrolladas. c) *A. sieboldii* Presencia de dientes en el margen interno de los ramus muy robustas, alula en la parte apical, así como apófisis y subapófisis. d) *A. silvestrii* Presencia de dientes en el margen interno de los ramus, apófisis y subapófisis, destaca la presencia de dos alulas semicirculares en la parte apical. e) *A. cf. tropica* Sin dientes en el margen interno de los ramus en su lugar tiene prolongaciones de los ramus, pequeñas apófisis y subapófisis. ALU = alula semicircular, A = apófisis, DMIR = Diente en el Margen Interno del Ramus, y SA = Subapófisis. (Tomado de Jiménez-Contreras, 2015).

El trophi además de ser relevante en la identificación taxonómica de estos organismos, también lo es en aspectos fisiológicos y ecológicos, particularmente en la alimentación (dieta) de los asplácnidos, ya que las características particulares que diferencian a cada una de las 9 especies del género *Asplanchna* son determinantes en los hábitos alimentarios de los asplácnidos (Salt et al. 1978; Hampton y Starkweather, 1998). *Asplanchna sieboldii*, al tener estructuras del trophi gruesas, es una especie capaz de manipular y consumir rotíferos, pequeños cladóceros e incluso nauplios de copépodo por lo que se le considera depredador (Koste, 1978; Williamson, 1983). En el Capítulo II “Alimentación”, se habla de la

estrategia de este depredador al alimentarse, así como su comportamiento alimentario ante presas contaminadas.

Asplanchna sieboldii es una especie representada por hembras solitarias de nado libre con cuerpo translúcido en forma de saco cuya talla varía entre 400 y 2500 μm (Wallace et al. 1989). Su reproducción es principalmente partenogenética a partir de hembras ovovivíparas diploides, es decir, que la gran mayoría son clones y se forman a partir de huevos que se desarrollan dentro de la hembra, una vez desarrollado el neonato es expulsado para iniciar su alimentación fuera e independiente de la madre (Iyer, 1989).

Las hembras de *A. sieboldii* presentan cambios fenotípicos (ciclomorfosis) en generaciones sucesivas las cuales se asocian con su alimentación (Gilbert, 1968). Las presas con altos niveles de α -tocoferol (vitamina E), tienen un efecto en el polimorfismo de este rotífero al cual se le reconocen tres morfotipos (Figura 3):

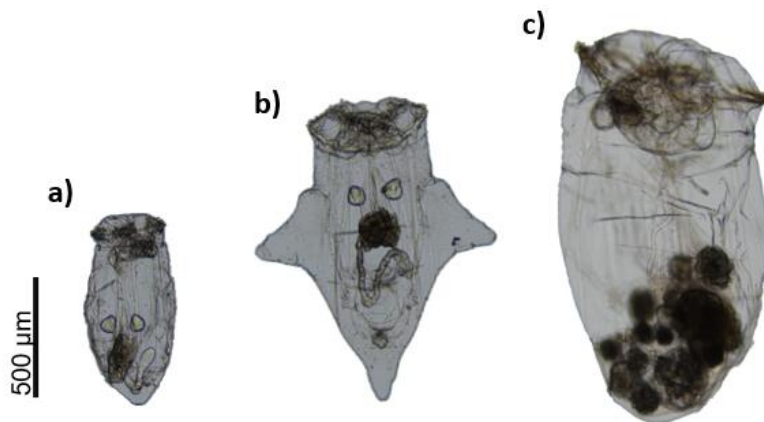


Figura 3. Morfotipos de *Asplanchna sieboldii*. a) Saquiforme b) Cruciforme c) Campaniforme o campanulado.

Saquiforme, hembras de talla pequeña que emergen de las estructuras de resistencia, su reproducción es partenogenética. Cruciforme, son hembras de talla intermedia que poseen 4 prolongaciones o jorobas en el cuerpo, dos laterales, una posterior y una posterodorsal como resultado de la ingesta de presas con altas concentraciones de α -tocoferol y la presión por canibalismo, este morfotipo es más probable que se reproduzca sexualmente, aunque también lo puede hacer partenogenéticamente. Campaniforme o campanulado, hembras de mayor talla con reproducción sexual y partenogenética adaptadas a ingerir presas de mayor tamaño

incluyendo individuos de su propia especie (Gilbert, 1980). Además de la concentración de α -tocoferol y el canibalismo, estos organismos expresan sus morfotipos, cruciforme principalmente, cuando hay presencia de contaminantes en su dieta, tema que se discute en el Capítulo III “Demografía”.

Aunado a lo anterior y dada la importancia que tiene la depredación en la estructuración de las comunidades, en la literatura se menciona más a los copépodos como controladores de las poblaciones de sus presas (Stemberger y Gilbert, 1987); sin embargo, hay lagos donde gracias a la gran diversidad de organismos que puede ingerir *A. sieboldii*, este rotífero depredador voraz, incapaz de regular su consumo, puede controlar las poblaciones de sus presas, principalmente de rotíferos herbívoros (Arndt, 1993; Conde-Porcuna y Declerck, 1998).

Dadas sus características morfológicas e importancia ecológica, esta especie se ha estudiado desde principios de los años setentas (Gilbert, 1971). Por su facilidad de cultivo y manejo, continúa el estudio de su ecología en el laboratorio donde se ha mostrado su potencial para ser utilizado como organismo de bioensayo, ya que este depredador es sensible cuando es expuesto directamente a metales pesados (Santos-Medrano y Rico-Martínez, 2013), cambia su demografía cuando se le ofrecen presas con diferentes defensas estructurales (Nandini et al. 2003), y cuando indirectamente es expuesto a partir de su presa que es cultivada en diferentes dietas (Sarma et al. 2002) y/o expuesta a contaminantes (Sarma et al. 1998).

Justificación

Las actividades antropogénicas producen muchos tipos de desechos químicos que interactúan entre sí, por lo tanto, está la posibilidad de que se aumente la toxicidad de estos contaminantes en los sistemas acuáticos en donde son vertidos. Hasta ahora, la mayoría de los trabajos evalúan solo un contaminante a la vez, los microplásticos pueden adsorber sustancias, como los metales pesados que se encuentran en los sistemas naturales y tener un efecto sinérgico sobre el zooplancton. Otro aspecto importante en la ecotoxicología, que se ha abordado muy poco, es determinar el efecto a través de una cadena trófica con al menos dos contaminantes. No es posible tener una amplia perspectiva y entender lo que ocurre en los sistemas acuáticos, si solo se prueba el efecto de ciertas sustancias tóxicas en un nivel trófico, por ejemplo, herbívoros. Estos organismos que son capaces de resistir tóxicos, pueden bioacumularlos y transferirlos a los zooplanctívoros, el siguiente nivel trófico en donde se encuentran los rotíferos depredadores que pueden ser más sensibles a tóxicos. Esta relación rara vez estudiada, será abordada en mi trabajo evaluando la dinámica poblacional de un rotífero depredador, expuesto a los contaminantes a través de su presa. De esta manera, también se podrá evidenciar la posible transferencia y el efecto sobre la depredación de estos contaminantes.

Capítulo II

Alimentación

Introducción

Para que un individuo pueda tener una buena eficacia biológica, primero debe sobrevivir y posteriormente reproducirse para aportar al acervo genético de la población. Para tener éxito reproductivo, el individuo debe evitar o superar factores como la depredación, las enfermedades y la competencia; para ello, el organismo debe obtener energía a partir de los recursos que requiere (Gliwicz, 2003).

De acuerdo con Tillman (1982), un recurso es cualquier sustancia o factor que puede propiciar un incremento del crecimiento poblacional conforme aumenta su disponibilidad, y que es consumido por los individuos. Para los organismos heterótrofos, su alimento, que implica consumir otros organismos, es un recurso crítico que requieren para mantener su metabolismo basal, sobrevivir y reproducirse ya que es la única manera en que estos individuos obtienen su energía y nutrientes (Salt, 1987).

Desde la década de los 80's se han estudiado los mecanismos de alimentación del zooplancton, particularmente en rotíferos, la mayoría obtienen su alimento filtrando el medio (Bogdan et al. 1980). En general, para el filo Rotifera su alimentación depende de la estructura y función de dos órganos que son diacríticos para el filo: Corona ciliar, es la estructura encargada de producir microcorrientes para locomoción y para acercar las partículas de alimento a la boca donde previamente serán seleccionadas por cerdas sensoriales y después al mástax, el cual es un aparato de masticación cuya función es triturar las partículas de alimento, está compuesto de músculos y un complejo set de estructuras esclerotizadas denominadas trophi las cuales son estructural y funcionalmente complejas en función del tipo de alimento y comportamiento alimentario (Segers, 2004).

Para los rotíferos herbívoros como *Plationus patulus*, el proceso de alimentación consiste de dos fases: fase de ingesta, las microcorrientes van hacia la boca y acercan el alimento y fase de rechazo, las microcorrientes fluyen a la inversa dispersando el alimento restante (Monakov, 2003). En ésta última fase, el rechazo del alimento puede deberse a que el tamaño de la partícula no es el

adecuado para la boca o por el “mal sabor” que es detectado por las cerdas sensoriales. Cuantitativamente lo anterior se ha estudiado por la ingestión de las partículas filtradas, así como el volumen del medio filtrado, tasa de ingestión y filtración respectivamente, desde un punto de vista ecológico (Peters, 1984); por ello, algún cambio en los patrones de la tasa de aclaramiento e ingestión implica posibles cambios en la historia de vida en estos animales (Starkwather, 1980).

Dentro del zooplancton, además de los consumidores primarios hay diversos consumidores secundarios, es decir, depredadores invertebrados como copépodos y rotíferos como *Asplanchna sieboldii*, éstos últimos carnívoros voraces (Wetzel, 2001). Dado que estos depredadores zooplanctónicos no son depredadores visuales, ni tienen la capacidad para detectar turbulencias producidas por sus posibles presas, son incapaces de ubicarlas a distancia. Entonces, para poder alimentarse su presa debe tocar la corona y así es que estos organismos tienen la opción de iniciar un ataque a partir de contactos fortuitos (encuentros). Una vez que encuentran a su posible presa, la boca del depredador se abre, atrae a la presa con la musculatura del mástax que se contrae, en ese momento eyecta el trophi (ataque) y sujeta al individuo para jalarlo al esófago (captura) y de ahí al estómago (ingesta) (Gilbert, 1980; Iyer y Rao, 1996).

Ese es el comportamiento alimenticio de un depredador que en esencia es una función de las relaciones entre el número de ataques, capturas e ingestas que siguen tras los encuentros aleatorios con las presas. Aunque se menciona que *A. sieboldii* no es un depredador selectivo, el éxito de captura e ingestión dependen de variables como el tamaño de la presa que debe oscilar entre 50 y 400 μm , sus posibles defensas corporales, velocidad de natación y patrones de desplazamiento de la presa, así como, su “sabor” cuando su medio o la presa está contaminada es detectado por sus quimiorreceptores que se encuentran alrededor de la corona ciliar y cerca de la boca (Iyer, 1989).

Desde la perspectiva ecológica, el conocer los cambios en las tasas de ingesta y aclaramiento de rotíferos herbívoros como *P. patulus*, así como en el comportamiento alimentario de un depredador como *A. sieboldii*, a corto plazo, dan un indicio de lo que puede ocurrir demográficamente con estos organismos a los que se les ofrece alimento contaminado con cadmio y/o microplásticos.

Antecedentes

Gilbert (1980) a partir de métodos de observación directa desarrolló, clasificó y cuantificó de manera detallada el conjunto de acciones que se desencadenan una vez que *A. sieboldii* se encuentra con sus presas.

Day y Kaushik (1987) expusieron a diversos organismos componentes del zooplancton a fenvalerato y evaluaron su efecto sobre la tasa de asimilación del alga, así como en la tasa de ingesta y filtración. De las concentraciones subletales seleccionadas (0.005, 0.01, 0.05, 0.1 y 0.5 $\mu\text{g L}^{-1}$), conforme iba aumentando la concentración del tóxico, la tasa de ingesta y filtración de las especies fueron disminuyendo. En cuanto a la tasa de asimilación, los cambios significativos se presentaron cuando la concentración del insecticida era letal para los organismos.

Nandini et al. (2003) evaluaron el efecto de la densidad (cuatro densidades 1, 2, 4 y 8 ind. mL^{-1}) y la morfología de las presas sobre el comportamiento alimentario y crecimiento poblacional de *Asplanchna sieboldii* ofreciendo 5 especies de braquiúridos (*P. patulus*, *B. havanaensis*, *B. macracanthus*, *B. rubens* y *B. calyciflorus*) como alimento. El máximo número de presas consumidas dependió del tamaño del cuerpo y la longitud de las espinas, siendo *P. patulus* la presa con mayor tasa de encuentros y por ende ataques, capturas e ingestiones.

Fernández-Casalderrey et al. (1993) realizaron un estudio donde expusieron a *Brachionus calyciflorus* a concentraciones subletales de metil paratión para determinar su efecto sobre la tasa de filtración e ingesta. Concluyeron que, ante un incremento en la concentración del pesticida, el proceso de alimentación del rotífero se vio disminuido hasta un 50% por las afecciones en el movimiento de los cilios; además, demostraron como los cambios en la tasa de alimentación pueden ser usados como herramientas sensibles para monitorear el efecto de concentraciones subletales de los tóxicos.

Chang et al. (2010) a partir de estudios en campo y haciendo énfasis en las estructuras del trophi, determinaron la preferencia alimentaria de los asplácnidos reportando a estos organismos como omnívoros, por la presencia de rotíferos, protozoos y algunas algas en su tracto digestivo, al ser poco probable que subsistan

a base de una dieta herbívora su presencia se explica a partir de los ataques fortuitos que no concluían con la captura de rotíferos.

Hipótesis

1. Si la alimentación del zooplancton, particularmente de rotíferos, puede verse influida por la toxicidad y concentración de los contaminantes que hay en el medio, así como también los microplásticos que son capaces de interferir mecánicamente hasta ser ingeridos. Entonces, se esperaría una disminución en la tasa de ingesta y filtración de *P. patulus* a mayores concentraciones de cadmio en presencia de microplásticos.

2. Si los quimio y mecanorreceptores de *A. sieboldii* son determinantes en el proceso de alimentación del depredador. Entonces, las presas expuestas a cadmio y microplásticos serán menos capturadas.

Objetivos

Objetivo General

- Evaluar el efecto del cadmio y microplásticos en la alimentación de *Platyonus patulus* y el comportamiento alimentario de *Asplanchna sieboldii*.

Objetivos Particulares

- Determinar la CL₅₀ del cadmio en *P. patulus*
- Determinar la CL₅₀ de microplásticos en *P. patulus*.

Materiales y Métodos

Aislamiento y cultivo de organismos

La presa *Platyonus patulus* es de una cepa que tiene más de un año siendo cultivada en el laboratorio, fue aislada del Lago de Xochimilco, México. El cultivo monoclonal se estableció a partir de una hembra partenogenética usando el alga unicelular, *Chlorella vulgaris* como alimento a una densidad de 1×10^6 cel. mL⁻¹ y agua moderadamente dura como medio (medio EPA). El medio EPA se preparó

disolviendo 1.9 g de NaHCO₃, 1.2 g de CaSO₄, 1.2 de MgSO₄ y 0.04 g de KCl en 20 L de agua destilada (Weber, 1993). *Chlorella vulgaris* fue cultivada en reactores transparentes de 2 L usando medio basal Bold (Borowitzka y Borowitzka, 1988) suplementado con 0.5 g L⁻¹ de NaHCO₃ cada tres días (Barrios et al. 2017). Cuando el alga estuvo en fase logarítmica (7 días después de haber sido cultivada) se cosechó, centrifugó a 3000 rpm y posteriormente fue resuspendida con agua destilada. Para mantener las condiciones favorables de los cultivos de *P. patulus*, se cambiaron cada 2 días y se mantuvieron a un pH 7 – 7.5, temperatura 25±1 °C e iluminación continua y difusa. El rotífero depredador *Asplanchna sieboldii* fue aislado del Lago de Xochimilco, México y del cual se estableció un cultivo monoclonal iniciando con una hembra partenogenética proporcionándole una dieta mixta de rotíferos braquiiónidos como alimento. Para evitar la reproducción sexual de *A. sieboldii*, se mantuvo a bajas densidades en medio EPA que se cambió cada dos días, manteniendo una temperatura de 25±1 °C y pH 7 – 7.5 e iluminación continua y difusa.

Microesferas de poliestireno (PS)

Se utilizaron micropartículas de poliestireno (PS) con 30 µm de diámetro (Sigma-Aldrich). Del vial con las micropartículas de PS se tomó 1 µL y se hicieron diluciones 1:100,000 para estimar la cantidad total de perlas, para hacer dicho conteo se utilizó una cámara de Sedgewick-Rafter. Una vez determinado el total de perlas, a partir de la densidad referida en la hoja de seguridad de Sigma-Aldrich se calculó el peso de una perla y del total de perlas considerando las siguientes fórmulas:

$$V = \left(\frac{3}{4}\right)(\pi)(r^3)$$

Donde:

V: volumen

r: radio

$$m = (\rho)(V)$$

Donde:

m: masa

ρ: densidad

V: volumen

A partir de la masa calculada se preparó una solución stock de 40 mg L⁻¹. Previo a ser utilizada, la solución stock se sonicó a una frecuencia de 20 kHz 10 watts durante 3 minutos para ser homogeneizada, este procedimiento se llevó a cabo cada que la solución iba a ser utilizada para los estudios realizados.

Solución stock de cadmio (Cd)

Se preparó una solución stock de 1 g L^{-1} de $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5 \text{ H}_2\text{O}$ (Fermont, Lote: 80702, pureza 99.7%) en un matraz aforado de 100 mL con agua destilada de tal modo que cada mL de la solución contenía 1 mg de Cd. Previamente, toda la cristalería utilizada en los ensayos paso por el siguiente procedimiento de limpieza (Moody y Lindstrom, 1977):

1. Se sumergió en una solución de ácido clorhídrico (HCl) 2 N durante 24 horas.
2. Se enjuagó con agua de la llave.
3. Se sumergió en una solución de ácido nítrico (HNO_3) 2 N durante 24 horas.
4. Se enjuagó con agua destilada.

*Una vez que la cristalería fue utilizada, para reutilizarla se le dio nuevamente un baño de 12 horas con ácido nítrico (HNO_3) y se enjuagó con agua destilada.

Pruebas de Concentración Letal Media (CL_{50}).

Basado en la literatura (Sarma et al. 2001), se seleccionaron 6 concentraciones nominales de Cd (18.125 , 36.25 , 72.5 , 145 , 290 y $580 \mu\text{g L}^{-1}$) para determinar la Concentración Letal Media (24 h - CL_{50}). Cada unidad experimental tuvo 20 neonatos (< 7 h) de *P. patulus* en viales de vidrio de borosilicato con 20 mL de medio EPA, 0.1×10^5 cél. mL^{-1} de *C. vulgaris* como alimento y se pusieron en una incubadora a una temperatura de 25 ± 1 °C. En total, se utilizaron 40 viales (2 controles (positivo y negativo) x 6 concentraciones de Cd x 5 repeticiones). Una vez pasadas las 24 horas, se contabilizó el número de organismos muertos en cada una de las repeticiones.

Se realizó otra prueba considerando lo reportado por Chang-Bum et al. (2016) y Eltemsah y Bohn (2019), se seleccionaron 7 concentraciones nominales de microplásticos (40 , 20 , 10 , 5 , 2.5 , 1.25 y 0.625 mg L^{-1}) para determinar la Concentración Letal Media (24 h - CL_{50}) de este contaminante. Las concentraciones seleccionadas se obtuvieron a partir de diluciones seriadas de la solución stock de

40 mg L⁻¹. Cada unidad experimental tenía 10 hembras adultas sin huevo (> 12 h) de *P. patulus* en viales de borosilicato con 5 mL de medio EPA y 0.1x10⁵ cél. mL⁻¹ de *C. vulgaris* como alimento, estas pruebas se realizaron a una temperatura de 25±1 °C. En total, se utilizaron 112 viales (2 controles (positivo y negativo) x 7 concentraciones de Cd x 5 repeticiones). Pasadas las 24 horas, se contabilizó el número de organismos muertos en cada una de las repeticiones.

Una vez determinada la 24 h - CL₅₀ del cadmio, se realizaron las pruebas de toxicidad aguda con 2 concentraciones subletales de cadmio (10 y 20%) junto con 7 concentraciones de microplásticos (40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25 y 0.625 mg L⁻¹). Cada unidad experimental tenía 10 hembras adultas sin huevo (> 12 h) de *P. patulus* en viales de borosilicato con 5 mL de medio EPA, 0.1x10⁵ cél. mL⁻¹ de *C. vulgaris* como alimento y una de las siete concentraciones seleccionadas de microplásticos con 10 o 20% de Cd, estas pruebas se realizaron a la misma temperatura que las anteriores. En total, se utilizaron 112 viales (2 controles (positivo y negativo) x 7 concentraciones de MPs + 10% o 20% Cd x 5 repeticiones). Al finalizar el tiempo establecido, se contabilizó el número de organismos muertos en cada una de las repeticiones mediante un microscopio estereoscópico.

Para obtener el valor de la 24 h - CL₅₀ de las tres pruebas realizadas, se analizaron los datos con una hoja de cálculo (Microsoft Excel 2013) para calcular las regresiones lineales a partir de las cuales se estimó la concentración letal media. También, se utilizó el método Probit para determinar este valor con un límite de confianza de los datos al 95% (Finney, 1971).

Tasa de alimentación de P. patulus.

La tasa de ingesta de *P. patulus* se evaluó considerando dos concentraciones subletales de cadmio de acuerdo a la CL₅₀ obtenida (10 y 20% mg L⁻¹ de Cd), siete concentraciones de microplásticos (40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25 y 0.625 mg L⁻¹), la combinación de ambos contaminantes, un control y un blanco por tratamiento. En total, fueron 6860 viales de vidrio de borosilicato con 20mL de capacidad (2 concentraciones subletales de Cd x 7 concentraciones de MPs x 7 MPs + 10%Cd x 7 MPs + 20%Cd x 2 control/blanco x 5 repeticiones). Cada vial contenía 5 mL de medio EPA con 2 ind. mL⁻¹ de *P. patulus*, 5x10⁵ cél. mL⁻¹ de *C. vulgaris*, una

determinada concentración de cadmio y/o una concentración de microplásticos seleccionada (mg L^{-1}). Los organismos que se utilizaron para estas pruebas fueron hembras adultas sin huevo que previamente estuvieron expuestas 24 h a su concentración subletal de Cd seleccionada; además, antes iniciar los experimentos se dejaron a los rotíferos en inanición durante 20 minutos. Posteriormente, el tiempo de alimentación fue de 20 minutos y el alga que no fue ingerida fue contada con una cámara de Neubauer. De los datos registrados se obtuvo la tasa de alimentación y tasa de filtración a partir de las siguientes fórmulas (Rigler, 1971):

$$f = \frac{v(C_o - C_t)}{t N}$$

En donde f: Tasa de alimentación, v: Volumen del medio, Co: Concentración de células inicial, Ct: Concentración final, t: Tiempo de alimentación (min) y N: Número de individuos.

$$F = \left(\frac{(\ln C_o - \ln C_t) W}{t N} \right)$$

En donde F: Tasa de filtración, $\ln C_o$: Logaritmo natural de la concentración de células inicial, $\ln C_t$: Logaritmo natural de la concentración final, W: volumen del medio t: Tiempo de alimentación (min) y N: Número de individuos.

Para cuantificar las diferencias estadísticamente significativas de las tasas de alimentación y filtración entre los tratamientos, los datos fueron analizados mediante ANDEVA de una vía y una prueba *post-hoc* de Tukey con ayuda del programa Sigma Plot versión 11.

Comportamiento alimentario de A. sieboldii

El comportamiento alimentario de *Asplanchna sieboldii* se evaluó usando una densidad de 7 ind. mL^{-1} de *P. patulus* en cajas petri con 3 mL de medio EPA, 1×10^5 cel. mL^{-1} de *C. vulgaris* como alimento y un depredador adulto de morfotipo campaniforme que previamente fue dejado 3 h en inanición. Antes de inocular las presas, éstas fueron expuestas 1 hora a alguna de las concentraciones subletales de Cd (10 y 20%) y 5 mg L^{-1} de microplásticos. De cada tratamiento hubo 5 repeticiones con observaciones durante 10 minutos donde se consideraron los siguientes parámetros: encuentro, cuando hay contacto entre depredador-presa; ataque, cuando el depredador intente capturar a la presa; captura, cuando el

depredador tenga a la presa dentro de su boca; ingesta, cuando el depredador ha consumido la presa (Snell, 1980).

El número de interacciones entre depredador-presa se evaluó estadísticamente con un ANDEVA de una vía con una prueba *post-hoc* de Tukey con ayuda del programa SigmaPlot versión 11.

Resultados

Concentración Letal Media

El valor de la Concentración Letal Media para *P. patulus* expuesto a los diferentes contaminantes por separado fue de 90 $\mu\text{g L}^{-1}$ con cadmio y 0.2 mg L^{-1} con microplásticos. En la Figura 4, se muestran dichos resultados junto con los datos obtenidos de la combinación de ambos contaminantes (10 y 20% Cd + 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25 y 0.625 mg L^{-1} MPs), de estas pruebas el valor de la CL_{50} fue de 0.01 y 0.03 mgL^{-1} para la combinación de 10 y 20%Cd con microplásticos respectivamente. Se puede observar que el cadmio es un contaminante que conforme va aumentando su concentración aumenta la mortalidad de los organismos, a diferencia de los microplásticos que a menores concentraciones afecta a un mayor número de organismos sin llegar a afectar a la mitad de la población. Cuando se agrega alguna de las dos concentraciones subletales de cadmio a las mismas concentraciones de microplásticos, solo se observa un aumento de la mortalidad en las menores concentraciones (0.625, 1.25, 2.5 y 5 mg L^{-1}), mientras que en las demás concentraciones fue menor o igual la cantidad de organismos fallecidos comparado con la prueba de microplásticos limpios. En todos los controles (positivo y negativo) de cada prueba realizada, la supervivencia osciló de 98 a 100%.

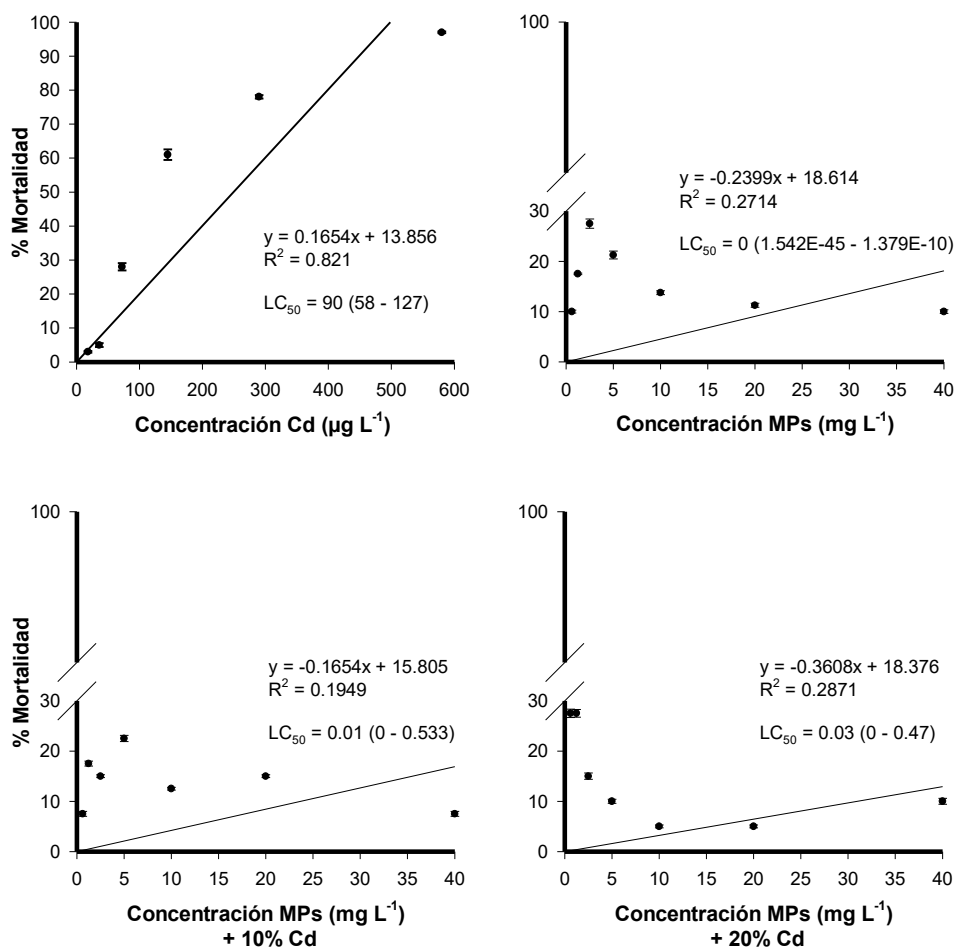


Figura 4. Mortalidad de *P. patulus* expuesto a diferentes concentraciones nominales de 2 contaminantes (Cd: cadmio y MPs: microplásticos) y la combinación de ambos. Se muestran los valores y límites de confianza (95%) de la CL_{50} de cada prueba.

Tasas de alimentación

La tasa de ingesta (media \pm ES) de *Platyonus patulus* cuando fue expuesto a alguna de las dos concentraciones subletales de cadmio, aumentó, llegando a incrementar significativamente con el 20% de Cd ($p < 0.05$, ANDEVA una vía). Al contrario de lo encontrado con puro cadmio, una vez que se expuso a este rotífero herbívoro a los microplásticos limpios, su tasa de ingesta fue disminuyendo conforme iba aumentando la concentración del contaminante, y a partir de la concentración de 5 a 40 mg L^{-1} hubo un cambio significativo en el proceso de alimentación de hasta un 60% ($p < 0.05$, ANDEVA una vía). Asimismo, el incremento en la tasa de alimentación de *P. patulus* cuando se expuso al cadmio, no cambió el hecho de que la combinación de este contaminante con microplásticos disminuyera

la tasa de ingesta significativamente conforme aumentaba su concentración a partir de los 5 mg L⁻¹ ($p < 0.05$, ANDEVA una vía). Lo anterior se observa en la Figura 5.

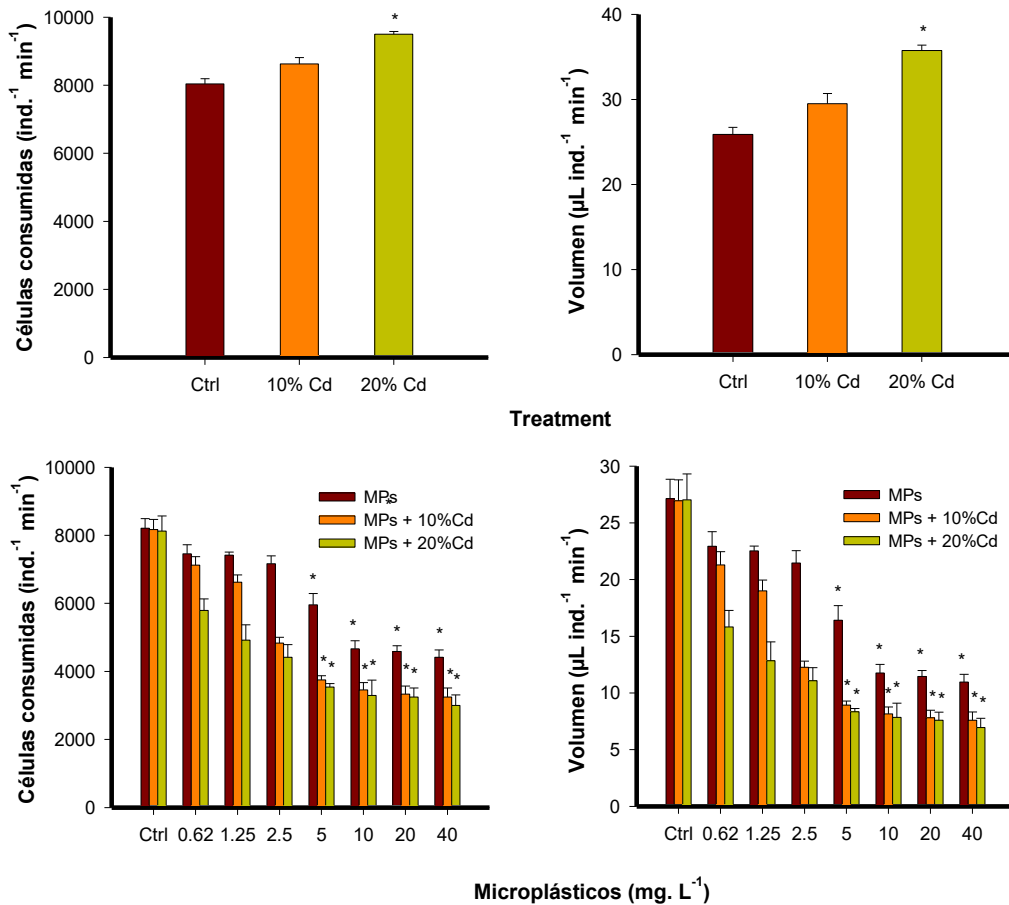


Figura 5. Tasas de ingesta y filtración de *P. patulus* expuesto a cadmio (0.009 y 0.018 mg L⁻¹), microplásticos (40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25 y 0.625 mg L⁻¹) y la combinación de ambos contaminantes. Se muestra el promedio de 5 repeticiones con su \pm error estándar. Los * indican diferencias significativas ($p < 0.05$ ANDEVA una vía).

Comportamiento alimentario de *A. sieboldii*

Los datos de los parámetros evaluados (media \pm ES), Encuentro, Ataque, Captura e Ingesta que se encuentran en la Figura 6, muestran que los encuentros del rotífero depredador *A. sieboldii* con su presa *P. patulus* expuesta previamente una hora a uno o la combinación de contaminantes no se ve afectada y se mantiene al igual que los ataques.

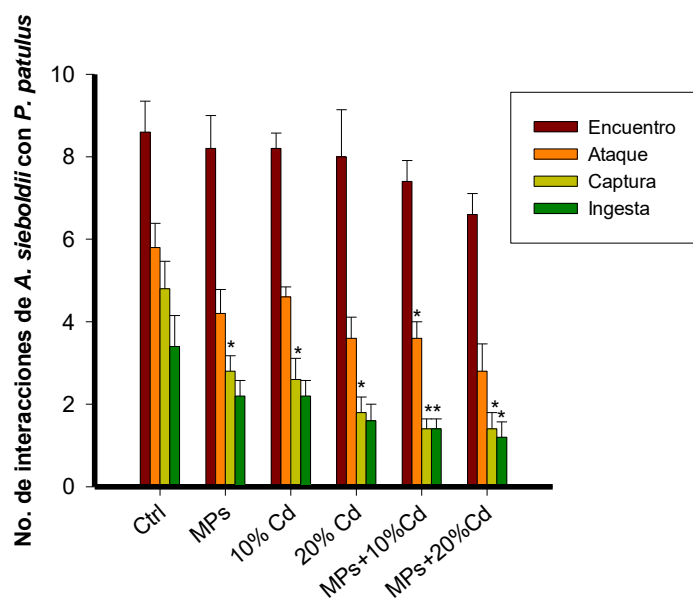


Figura 6. Comportamiento alimentario de *A. sieboldii* con *P. patulus* expuesto previamente a cadmio (0.009 y 0.018 mg L⁻¹), microplásticos (5 mg L⁻¹) y la combinación de ambos contaminantes. Se muestra el promedio de 5 repeticiones con su \pm error estándar. Los * indican diferencias significativas ($p < 0.05$ ANDEVA una vía).

Sin embargo, la captura disminuyó significativamente ($p < 0.05$, ANDEVA una vía; Tabla 1) con las presas expuestas a las concentraciones subletales de cadmio y microplásticos. Cuando las presas fueron expuestas a ambos contaminantes, se obtuvieron los valores más bajos de captura e ingesta, en estos parámetros hubo una disminución del 71 y 61% respectivamente comparados con el control. Esto muestra que *A. sieboldii* tiene una respuesta en la depredación ante *P. patulus* contaminado con la combinación de microplásticos y cadmio.

Tabla 1. Análisis de varianza de una vía (ANDEVA) sobre el comportamiento alimentario de *A. sieboldii* alimentado con *P. patulus* expuesto previamente a concentraciones subletales de cadmio, microplásticos y la combinación de ambos contaminantes. GL: Grados de Libertad; SC: Suma de Cuadrados; MC: Media de Cuadrados ($\alpha=0.05$). Tratamientos con asterisco (*) representa diferencias significativas.

Fuente de variación	GL	SC	MC	F	P
<i>Encuentro</i>					
Entre grupos	5	12.967	2.593	0.985	0.447
Error	24	63.2	2.633		
<i>Ataque</i>					
Entre grupos	5	26.7	5.34	4.005	0.009*
Error	24	32	1.333		

<i>Captura</i>					
Entre grupos	5	41.467	8.293	8.293	<0.001*
Error	24	24	1		
<i>Ingesta</i>					
Entre grupos	5	16	3.2	3.2	0.024*
Error	24	24	1		

Discusión

Durante los últimos años, la mayoría de los estudios ecotoxicológicos se han centrado en ciertas especies del complejo *B. plicatilis* en el caso de sistemas marinos o salobres, y *B. calyciflorus* para los ambientes epicontinentales (Snell y Janssen, 1995; Won et al. 2017). Ahora bien, si se consideran los trabajos donde se realicen estudios que evalúen la toxicidad de los microplásticos, la literatura se ha centrado en investigaciones con microorganismos invertebrados marinos de otros grupos o pocas especies epicontinentales que son exóticas para México (Cole et al. 2013; Coppock et al. 2019; Schrank et al. 2019). En este trabajo se comparó la sensibilidad de *P. patulus* y *A. sieboldii*, ambos rotíferos, uno herbívoro y el otro carnívoro, coexisten en diversos sistemas acuáticos epicontinentales mexicanos que en su mayoría están contaminados (Nandini et al. 2005), lo que facilitó su obtención para pruebas de laboratorio.

De la prueba de 24 h - CL₅₀ con cadmio utilizando a *P. patulus* se obtuvo el mismo valor al igual que lo reportado por Sarma et al. (2006) en donde llevaron a cabo sus pruebas a una temperatura de 24 °C, este es el segundo trabajo donde se reporta la Concentración Letal Media para esta especie en presencia de cadmio. Comparando la CL₅₀ obtenida con la de otras especies pertenecientes la familia Brachionidae, *P. patulus* es más sensible a este metal pesado comparado con *B. calyciflorus*, *B. rubens*, *B. havanaensis* y *B. macracanthus* (Snell y Persoone, 1989; Snell et al. 1991; Juárez-Franco et al. 2007). Por su sensibilidad a tóxicos, tamaño pequeño, estabilidad taxonómica, reproducción partenogenética y altas tasas de reproducción, *P. patulus* es considerado como un organismo estándar de bioensayos por la Asociación Americana de la Salud (APHA) y la Sociedad Americana para Pruebas y Materiales (ASTM) (ASTM, 2012; Rice et al. 2017).

A pesar de que *P. patulus* está categorizado como organismo para bioensayos, y que para las pruebas donde se utilizaron microplásticos se emplearon condiciones ambientales relevantes, es decir, concentraciones de microplásticos que se pueden encontrar en sistemas naturales epicontinentales (Dris et al. 2015; Mendoza y Balcer, 2019). Este es de los primeros reportes del efecto de los microplásticos para esta especie y para rotíferos epicontinentales en general. De la CL₅₀ con microplásticos de *P. patulus* se esperaba que, a mayor concentración, aumentara la mortalidad de los organismos como ocurre con el rotífero de sistemas marinos *B. plicatilis* que fue expuesto a microesferas de polietileno con tamaño de 25 µm (Beber y Yurtsever, 2018); sin embargo, con *P. patulus* la mortalidad fue mayor con algunas concentraciones bajas y disminuyó conforme disminuían o aumentaban las concentraciones de microplásticos. Este hallazgo coincide con lo reportado por Kaposi et al. (2013), Cole et al. (2015) y Vroom et al. (2017) ya que expusieron a diferentes organismos componentes del zooplancton marino a pruebas de toxicidad aguda y ningún modelo biológico estudiado tuvo una mortalidad significativa ante la presencia de microplásticos de diferente tamaño.

Pese a que los microplásticos tienen la capacidad de adsorber una amplia gama de contaminantes, incluido el cadmio, y que se les ha reportado como vectores hacia organismos acuáticos a través de su ingestión (Wang et al. 2019; Wang et al. 2020). En este trabajo se muestra que no hay un mayor efecto ante una exposición aguda, ya que cuando se expuso a *P. patulus* a microplásticos con la concentración subletal de cadmio, la letalidad fue muy parecida a cuando se expusieron estos organismos con microplásticos solos. Beiras et al. (2018) cuando expusieron en pruebas de toxicidad aguda a *B. plicatilis* y otros modelos biológicos marinos con microplásticos de dos tamaños diferentes contaminados con BP-3, al igual que en esta investigación no hubo una mayor mortalidad comparado con el tratamiento de microplásticos solos. Aunque con *P. patulus* no se encontró un valor de la CL₅₀ en las pruebas de toxicidad aguda con microplásticos solos o contaminados, hay otros parámetros que se pueden evaluar a los que se les ha reportado un efecto adverso, dichas pruebas se han realizado con crustáceos dulceacuícolas pero de igual manera se pueden estudiar en rotíferos, éstos son los criterios de valoración conductuales relacionados con la motilidad e ingestión que

pueden ser herramientas para evaluar el efecto de la contaminación por microplásticos en los microorganismos invertebrados acuáticos (Cole et al. 2015; Gambardella et al. 2017).

Considerando que el proceso de alimentación del zooplancton es una función fisiológica que puede cambiar ante la exposición a tóxicos, los efectos de los contaminantes seleccionados observados en las tasas de alimentación de *P. patulus* son un posible cambio en la historia de vida de este rotífero herbívoro, ya que este es el proceso a partir del cual se obtiene energía para su sobrevivencia y reproducción (Moreira et al. 2016). Al contrario de lo que se esperaba, hubo un incremento en este comportamiento cuando los rotíferos fueron expuestos al cadmio, estas bajas concentraciones del tóxico potenciaron la obtención de alimento. Esto se conoce como efecto hórmesis, que es un tipo de estímulo para compensar el estrés producido por el metal pesado que en principio se ve reflejado en la producción de la descendencia (Mattson et al. 2008). Gama-Flores et al. (2007) cuando expusieron a un organismo componente del zooplancton a bajas concentraciones de cadmio, reportaron un incremento en su metabolismo y como resultado de ello, un mayor número descendientes. Este efecto también se presenta con otros contaminantes como insecticidas (Lv et al. 2010; Guo y Chen, 2015), fungicidas (Alvarado-Flores et al. 2015) y medicamentos (Tian et al. 2017). Sin embargo, ante la presencia de solo microplásticos ocurre lo contrario, y cuando se combina el cadmio con los microplásticos la tasa de alimentación de *P. patulus* se ve afectada aún más, evidenciando que el incremento en la tasa de alimentación de este organismo expuesto a bajas concentraciones de cadmio no cambia el hecho de que los microplásticos interfieren mecánicamente lo cual puede deformar la corona ciliar y el funcionamiento de los cilios de estos organismos que desde neonatos filtran el medio para obtener su alimento (Sun et al. 2019). Esta disminución en la alimentación también ocurrió con *Brachionus manjavacas* cuando Snell y Hicks (2011) expusieron a estos organismos a microplásticos solos, y al igual que en esta investigación, hubo una mayor disminución en la alimentación cuando fueron expuestos a altas concentraciones de microplásticos. Cuando los microplásticos tienen el tamaño adecuado, no solo interfieren en el proceso de alimentación de los rotíferos herbívoros. También, pueden ser ingeridos y

acumularse en el tracto digestivo de los organismos hasta 48 h después de haber sido ingeridos (Jeong et al. 2016). Esto deja abierta la posibilidad de que los microplásticos que interfieren en la alimentación de *P. patulus* pueden ser ingeridos y bioacumulados tras adsorber el cadmio, y llegar a niveles tróficos superiores.

Respecto a las interacciones de *A. sieboldii* y su presa contaminada, hay modelos que consideran cinco variables que determinan el comportamiento del depredador: 1) la tasa de movimiento de la comida, 2) el tamaño de la presa, 3) la velocidad de movimiento del depredador, 4) densidad del alimento y 5) el campo receptivo del organismo (Salt, 1987). Al no haber una diferencia en los encuentros entre el depredador y su presa que fue expuesta a diferentes contaminantes, esto implica que no hubo algún cambio en la natación de *P. patulus* que de igual manera mantuvo su tamaño. En cuanto a la velocidad de movimiento del depredador, todos los individuos eran del morfotipo campaniforme y no fueron expuestos directamente a los contaminantes. Entonces, los cambios en el número de ataques, capturas e ingesta recaen sobre el campo receptivo del depredador, para *Asplanchna* que es un depredador no visual, su campo receptivo es corto y depende de los órganos sensoriales que detectan su alimento, estos quimio y mecanorreceptores que se encuentran alrededor de la corona ciliar, en el centro y cerca de la boca seleccionaron el alimento disminuyendo significativamente las capturas e ingestas ante las presas contaminadas con cadmio y microplásticos (Joanidopoulos y Marwan, 1998). Otra investigación en la cual se evidenció la selectividad de *A. sieboldii*, fue la reportada por Gilbert (1977) y (1980) donde este depredador no capturó a sus clones y congéneres a pesar de encontrarlos constantemente. Sin embargo, esta es de las primeras investigaciones donde se evidencia la posible acción de estos quimio y mecanorreceptores ante presas limpias y contaminadas con dos contaminantes juntos o separados.

Conclusiones

- La exposición aguda a cadmio tuvo efectos tóxicos sobre *P. patulus*, encontrándose en 24h la CL₅₀ con un valor igual al reportado en la literatura. Sin embargo, cuando *P. patulus* se expone a microplásticos solos y contaminados con cadmio, no se observaron efectos en la mortalidad.

- Los contaminantes evaluados tuvieron un efecto sobre la tasa de filtración e ingesta de *P. patulus*. A diferencia de las concentraciones subletales de cadmio que incrementaron la tasa de ingesta, los microplásticos la disminuyeron. Cuando los contaminantes se combinaron, a mayor concentración de microplásticos, la tasa de alimentación se veía más afectada.
- El comportamiento alimentario de *A. sieboldii* presentó cambios ante la presencia de los contaminantes. Con cada contaminante las capturas se vieron afectadas, y cuando se combinaron los contaminantes los ataques, capturas e ingestas disminuyeron significativamente.
- Es evidente que hay un efecto de los microplásticos y cadmio, separados y juntos, en la alimentación de organismos filtradores como *P. patulus*, y en la selección de presas en depredadores como *A. sieboldii*.

Capítulo III.

Demografía

Introducción

El cadmio (Cd), es uno de los elementos químicos que se encuentra enlistado como contaminante prioritario por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (por siglas en inglés USEPA), esto debido a su alta toxicidad en casi todos los niveles de organización biológica llegando a ser un peligro en diferentes ambientes (Burger, 2008). Es uno de los elementos más abundantes que se pueden encontrar comúnmente en los sistemas acuáticos mexicanos, incluso más que el mercurio (Cervantes y Moreno, 1999). Este contaminante no tiene un rol biológico conocido e induce estrés oxidativo y altera la homeostasis del Ca^{2+} ; además, los iones de Cd provocan una amplia gama de respuestas celulares que modulan las características del ciclo de vida en los organismos acuáticos lo cual resulta en un daño severo a muchos sistemas, tejidos y membranas por la inducción de la apoptosis (Méndez-Armenta y Ríos, 2007). Ante la constante contaminación de los ecosistemas acuáticos por este tipo de metales pesados que son descargados por actividades domésticas, industriales y otras actividades antropogénicas, la biota acuática, específicamente el zooplancton, se desarrolla en condiciones estresantes que restringen sus respuestas fisiológicas lo cual afecta su supervivencia y fecundidad (Livingstone, 2001). En los últimos años se han discutido los efectos adversos del Cd en las funciones fisiológicas y dinámica poblacional del zooplancton, así como su efecto en la red trófica acuática (Koivisto et al. 1997; Pempkowiak et al. 2006; Gama-Flores et al. 2017).

En la naturaleza existe una gran variedad de contaminantes, el plástico y particularmente los microplásticos que son pequeñas partículas y fibras de polímeros sintéticos cuyo diámetro es inferior a 5 mm y llegar hasta 100 nm (FAO, 2017), esto se ha incrementado debido al mal manejo y la alta demanda de las actividades antropogénicas. Por ejemplo, de 1960 a la fecha la producción mundial de plástico ha incrementado exponencialmente hasta tener un acumulado de 6,300 millones de toneladas de desechos plásticos; de este total, únicamente 9% fueron reciclados (PlasticsEurope, 2016; Greyer et al. 2017). En diversos sistemas

acuáticos mexicanos que son impactados por el desarrollo urbano e industrial (Andrade et al. 2015), se pueden encontrar una gran abundancia y diversidad de microplásticos (Shruti et al. 2019; Sánchez-Hernández et al. 2021). La evaluación de los efectos que pueden tener los microplásticos sobre la biota acuática marina han mostrado que propician inflamación, estrés oxidativo, agotamiento energético, reducción en la alimentación, disminución de supervivencia y reproducción (Yu et al. 2018); sin embargo, son pocas las investigaciones que se realizan con organismos epicontinentales. Además, son pocos los estudios que han analizado los efectos de dos contaminantes como son el cadmio y los microplásticos en rotíferos, a pesar de que se ha reportado que estos últimos actúan como vectores de metales pesados (Selvam et al. 2021).

La interacción entre contaminantes puede intensificar la toxicidad (sinergismo), reducirla (antagonismo) o no producir ningún efecto (aditivo) (Liess et al. 2020). El caso más conocido de antagonismo entre contaminantes es el descubierto a finales de los 80's, donde el selenio, un metal esencial reduce la toxicidad del mercurio, el cual es un metal pesado altamente tóxico (Khan y Wang, 2009). No todas las interacciones entre contaminantes producen un efecto antagónico, en la mayoría de los casos se produce un efecto sinérgico como el de los microplásticos contaminados con BP-3 (Na et al. 2020). Aunque existen excepciones donde los microplásticos contaminados con otro contaminante tienen un efecto aditivo, es decir, no hay ningún cambio en el efecto que tienen estos contaminantes combinados sobre ciertos invertebrados acuáticos (Beiras et al. 2018).

Son evidentes los efectos del cadmio y los microplásticos en microorganismos invertebrados herbívoros del medio marino (Kang et al. 2019; Beber y Yurtsever, 2018); además, se ha demostrado que ambos contaminantes juntos o por separado tienen efecto sobre la alimentación del zooplancton epicontinental (Capítulo II Alimentación) y de igual manera podrían influir significativamente en la supervivencia y fecundidad en un nivel trófico superior, es decir, un depredador como *A. sieboldii*, un enfoque poco estudiado que se abordará en este capítulo.

Asplanchna sieboldii, es una especie representada por hembras con cuerpo translúcido cuya talla varía entre 400 – 2500 μm (Wallace et al. 1989). Este rotífero

depredador voraz presenta cambios fenotípicos (cicломorfosis) que van asociados en gran medida a su dieta, si ingiere organismos cuyos niveles de α -tocoferol (vitamina E) son variables, en las generaciones sucesivas se irán presentando alguno de los tres morfotipos que se le reconocen a esta especie: campaniforme o campanulada, saquiiforme y cruciforme (Gilbert, 1968). Este último morfotipo (cruciforme), cuya presencia implica mayores probabilidades de que haya reproducción sexual es muy característico porque presenta 4 prolongaciones o jorobas en el cuerpo, dos laterales, una posterior y una posterodorsal, y se expresa por tres factores: 1) ingesta de presas con altas concentraciones de α -tocoferol, 2) presión por canibalismo y 3) presencia de contaminantes en el medio o dieta (Gilbert, 1980).

Para analizar los cambios numéricos de una población y la expresión de morfotipos de *A. sieboldii* expuesto a microplásticos, cadmio y la combinación de ambos contaminantes, hay un par de instrumentos que permiten visualizar estos cambios a través del tiempo. El primero es el crecimiento poblacional, que permite calcular la relación de nacimientos a partir de una densidad inicial a través del tiempo considerando diferentes generaciones de la población de estudio ante ciertos factores, en este caso dos contaminantes (Krebs, 2009). El otro es la tabla de vida, que es una manera de plasmar las características numéricas de la mortalidad y la natalidad específica por edades, ayuda a detectar las fuentes de mortalidad no aleatorias que operan durante el desarrollo ontogenético de una cohorte y que cambian según su envejecimiento (Sarma, 1996).

Para complementar los cambios en la alimentación de los rotíferos herbívoros y el comportamiento alimentario de un depredador como *A. sieboldii* que se mostraron en el Capítulo II “Alimentación”. Desde la perspectiva ecológica, el conocer los cambios en la demografía de una cohorte y en diversas generaciones de un nivel trófico superior (depredador) que será expuesto a contaminantes únicamente a través de su presa, nos propician un panorama más amplio para analizar los efectos del cadmio y microplásticos, juntos o separados, y su posible transferencia en la cadena trófica teniendo un efecto sinérgico, aditivo o antagónico entre estos contaminantes.

Antecedentes

Jeong et al. (2016) evaluaron la bioacumulación y los efectos adversos ocasionados por la ingestión de microplásticos de diferentes tamaños en las variables demográficas del rotífero *Brachionus koreanus*. La exposición a microesferas de poliestireno produjo efectos significativos dependientes del tamaño, como son la disminución en la tasa de crecimiento poblacional, fecundidad, esperanza de vida e inmadurez sexual. Respecto a la bioacumulación, tras haber expuesto a los rotíferos a microesferas fluorescentes, todos los tamaños de microplásticos se encontraron dentro de los rotíferos hasta 48 h después de haberlos ingerido. Estas observaciones proveen indicios de como estos contaminantes además de bioacumularse podrían ser transferidos a niveles tróficos superiores.

Nandini et al. (2003) evaluaron el efecto de la densidad (cuatro densidades 1, 2, 4 y 8 ind. mL⁻¹) y la morfología de las presas sobre el comportamiento alimentario y crecimiento poblacional de *Asplanchna sieboldii* ofreciendo 5 especies de braquiónidos (*P. patulus*, *B. havanaensis*, *B. macracanthus*, *B. rubens* y *B. calyciflorus*) como alimento. Independientemente de la presa, la tasa de crecimiento de *Asplanchna* se incrementó proporcionalmente a la cantidad de alimento inoculado. A pesar de que el crecimiento poblacional de *A. sieboldii* fue aumentando proporcionalmente a la cantidad de presa inoculada, en términos de biomasa su crecimiento no tuvo una correlación entre las presas seleccionadas considerándose que la digestibilidad de las presas es lo que influyó sobre el crecimiento poblacional del depredador.

Sarma et al. (2007) evaluaron el crecimiento poblacional del depredador *Asplanchna brightwellii* alimentado con 5 braquiónidos ofrecidos como presa (*Brachionus angularis*, *P. patulus*, *B. rubens*, *B. havanaensis* y *B. macracanthus*), de forma individual o combinando dos especies en proporción 1:1 a dos densidades diferentes (1 y 5 ind. mL⁻¹). El crecimiento del depredador *A. brightwellii* difirió dependiendo de las características morfológicas de la presa, obteniendo un menor crecimiento poblacional con la mezcla de *B. macracanthus* y *B. havanaensis* que tienen espinas largas posteriores y/o postero-laterales. Sin embargo, *A. brightwellii* creció bien con *B. havanaensis* y *P. patulus* ofrecidos de forma individual.

Independientemente de la densidad, morfología o combinación de las presas, el pico de abundancia máxima del depredador varió de 0.2 a 1.7 ind. mL⁻¹, mientras que la tasa de crecimiento poblacional (r) presentó datos que van de 0.025 a 0.25 por día, dependiendo del tratamiento.

Sarma et al. (1998) evaluaron el efecto de *Brachionus calyciflorus* limpio, contaminado con metil paratión, muerto por el pesticida y muerto por congelamiento sobre el crecimiento poblacional del rotífero depredador *Asplanchna sieboldii*. Independientemente del tratamiento que tuvo la presa, a mayor densidad de *B. calyciflorus* fue mayor la abundancia del depredador. Sin embargo, comparando la tasa de crecimiento poblacional entre los tratamientos, hubo una disminución de esta variable. En principio, los tratamientos con presas muertas no lograron mantener a *Asplanchna* el tiempo que duró el experimento por los pocos encuentros que a su vez disminuyen la probabilidad de capturar e ingerir alimento. Respecto a las presas vivas contaminadas con metil paratión, la disminución en la tasa de crecimiento del depredador muestra que hay un efecto indirecto a partir de la ingestión de presas contaminadas.

Gama-Flores et al. (2007) evaluaron el efecto combinado de dos metales pesados (CuSO₄ y CdCl₂ separadamente, a 0.1, 0.2 y 0.4 mg L⁻¹) y tiempo de exposición sobre el rotífero depredador *Asplanchna brightwellii* a través de sus presas (*B. havanaensis* y *B. calyciflorus*). A bajas concentraciones de Cu, estimuló el crecimiento de *A. brightwellii* comparado con los controles. Sin embargo, bajo una mayor concentración de Cd y un mayor tiempo de exposición, *B. calyciflorus* provocó un menor crecimiento del depredador. *B. havanaensis* previamente expuesta a Cu condujo a una reducción en el crecimiento de *A. brightwellii*, especialmente bajo una alta concentración de metales. Independientemente del tiempo de exposición, *B. calyciflorus* expuesto a Cu y *B. havanaensis* expuesto a Cd estimuló la tasa de crecimiento de *A. brightwellii*. Mostrando la acción indirecta de los tóxicos sobre *A. brightwellii* que nunca fue expuesto a los metales pesados.

Wang et al. (2020) evaluaron la toxicidad de la interacción de MPs con metales pesados haciendo ensayos crónicos de 21 días sobre el cladóceros *Moina monogolica*. Utilizaron una concentración de MPs (300 µg L⁻¹) y dos concentraciones de Cd (5 y 10 µg L⁻¹). Los MPs que adsorbieron Cd tuvieron un

mayor efecto sobre las variables demográficas del cladóceros, esto sugiere que los MPs además de dañar directamente a los organismos, también pueden afectar indirectamente a través de la adsorción de contaminantes y fungir como un vector que libera contaminantes dentro del zooplancton.

Hipótesis

Si los microplásticos y el cadmio tuvieron un efecto sobre el comportamiento alimentario del rotífero depredador *A. sieboldii* y sobre la alimentación de *P. patulus* al bioacumular las microesferas de poliestireno limpias y contaminadas. Entonces, se esperaría una disminución en la dinámica poblacional de *A. sieboldii* en el tratamiento con mayor densidad de presa inoculada expuesta solo a cadmio y con microplásticos. Además, se esperaría que el morfotipo cruciforme de *A. sieboldii* se exprese antes en los tratamientos expuestos a ambos contaminantes, debido a la toxicidad del cadmio y por los microplásticos como un nuevo vector de este metal, propiciando un efecto sinérgico cuando se combinan ambos contaminantes.

Objetivo

Objetivo General

- Evaluar la dinámica poblacional del depredador *Asplanchna sieboldii* alimentado con *Plationus patulus* expuesto a microplásticos y cadmio.

Objetivos Particulares

- Cuantificar los cambios en las variables demográficas del crecimiento poblacional de *A. sieboldii*.
- Cuantificar los cambios en las variables demográficas de la tabla de vida de *A. sieboldii*.

Materiales y Métodos

Crecimiento poblacional

La respuesta demográfica de *Asplanchna sieboldii* se evaluó usando 3 densidades (1, 2 y 4 ind. mL⁻¹) de *P. patulus* como presa que se expuso al menos 24 horas a alguna de las dos concentraciones subletales de Cd (10 y 20%) y una concentración de microplásticos (5 mg L⁻¹). En total, fueron 90 viales de borosilicato con 25 mL de capacidad (3 densidades x 6 tratamientos x 5 réplicas). Cada vial

contuvo 20 mL de medio EPA con *P. Patulus* a una densidad de 1, 2 y 4 ind. mL⁻¹ que fue expuesta al tratamiento seleccionado al menos 24 h, 1x10⁵ cel. mL⁻¹ de *C. vulgaris* para mantener a la presa activa y un adulto con huevo de *A. sieboldii* (morfotipo campaniforme) que nunca fue expuesto directamente a los contaminantes. Los viales fueron colocados en una incubadora a 25 ± 1 °C con iluminación continua y difusa. Los conteos del depredador en el control y tratamientos, así como la renovación del medio y de presas pre-expuestas se hizo cada 24 h, los experimentos se detuvieron a los 16 días cuando la población de *A. sieboldii* empezó a disminuir en la mayoría de las repeticiones. De los datos registrados se obtuvo la abundancia máxima, el día de abundancia máxima y la tasa de crecimiento poblacional (*r*) usando diferentes grupos de datos a lo largo de la curva de crecimiento poblacional de *A. sieboldii* para calcular la media por réplica, tomándose de 3 – 5 grupos de datos en la fase exponencial como lo realizó Dumont et al. (1995) a partir de la siguiente fórmula (Krebs, 1985):

$$r = \frac{\ln(N_t) - \ln(N_o)}{t}$$

En donde *r*: tasa de crecimiento poblacional por día, *N_t*: número de individuos después de cierto tiempo, *N_o*: poblacional inicial y *t*: tiempo en días.

Para cuantificar las diferencias estadísticamente significativas de la tasa de crecimiento poblacional, abundancia máxima y día de abundancia máxima, los datos fueron analizados mediante ANDEVA de dos vías y una prueba *post-hoc* de Tukey con ayuda del programa Sigma Plot versión 11.

Tabla de vida

Para los experimentos de tabla de vida se usó el mismo diseño experimental que en los tratamientos del crecimiento poblacional, se utilizaron neonatos de *A. sieboldii* con una edad menor a 3 h. Pasadas 24 h se contaron las hembras sobrevivientes y los neonatos que al igual que los adultos fallecidos fueron removidos, el medio fue renovado y se inoculó la densidad de presa tratada apropiadamente. Cada repetición tuvo 1 neonato de *A. sieboldii* para evitar canibalismo, los experimentos se detuvieron 6 días después cuando la cohorte inicial falleció.

Para calcular la tasa de crecimiento poblacional se utilizó el método de Jackknife (Meyer et al. 1986), los demás parámetros fueron calculados de acuerdo a Krebs (1985) y Begon et al. (1996), usando las siguientes fórmulas:

Supervivencia (proporción de supervivientes):

$$l_x = \frac{N_x}{N_0}$$

Dónde: N_x = número de supervivientes N_0 = número inicial de individuos

Fecundidad (proporción de neonatos)

$$m_x = \frac{N_1}{N_x}$$

Dónde: N_1 = número de supervivientes N_x = supervivientes

Esperanza de vida

$$ex = \frac{T_x}{l_x}$$

Tasa reproductiva bruta

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

Tasa reproductiva neta

$$R_0 = \sum l_x m_x$$

Tasa intrínseca de crecimiento poblacional

$$r = \sum_{(x=0)} e^{(-rx)} l_x m_x = 1$$

Tiempo generacional

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

En donde N_x es el número de individuos en cierto tiempo, N_0 es el número inicial de individuos, R_0 es el promedio de descendientes por hembra.

Para cuantificar las diferencias estadísticamente significativas de las variables demográficas de tabla de vida entre los tratamientos, los datos fueron analizados mediante ANDEVA de dos vías y una prueba *post-hoc* de Tukey con ayuda del programa SigmaPlot versión 11.

Resultados

Crecimiento poblacional

Las curvas de crecimiento poblacional de *Asplanchna sieboldii* alimentado con *P. patulus* a 1, 2 y 4 ind. mL⁻¹ expuestos previamente a 10% Cd (0.009 mg L⁻¹), 20% Cd (0.018 mg L⁻¹), MPs (5 mg L⁻¹) y la combinación de ambos contaminantes se muestran en la Figura 7. En general, se observa que todas las curvas de crecimiento poblacional del depredador inician con una fase de crecimiento exponencial y después de 4 u 8 días se encuentran en una fase estacionaria. En términos de la densidad de presa inoculada, hay una relación positiva con el crecimiento de *A. sieboldii*; sin embargo, los contaminantes tuvieron efectos sobre la abundancia de *Asplanchna*, de manera positiva con 10% Cd y negativamente con los demás tratamientos.

Los datos de la Figura 8A, muestran como la abundancia máxima del rotífero depredador va aumentando conforme aumenta la densidad de presa y que los cambios son notablemente diferentes con relación al tratamiento que tiene a las presas expuestas a 10% Cd. En los controles, la abundancia máxima fue de 0.28 – 0.72 ind. mL⁻¹ y con el tratamiento con 10% Cd fue 0.31 – 0.94 ind. mL⁻¹, esto implica un aumento de 28% que es significativamente mayor ($p < 0.05$, ANDEVA dos vías; Tabla 2) comparado con los demás tratamientos que tuvieron un aumento o disminución de 2 – 6%.

Como se puede apreciar en la Figura 8B, los datos indican que el día en que se alcanzó la abundancia máxima del depredador fue entre los 3 y 8 días, primero en los tratamientos con menor densidad de presa contaminada (1 ind. mL⁻¹) y después con la mayor densidad de presa (4 ind. mL⁻¹). El tratamiento con 10% Cd tardó 12 días en alcanzar su pico máximo, cuando se juntó esta concentración de cadmio con microplásticos y al igual que con los demás tratamientos, el día de abundancia máxima se adelantó 6 días ($p < 0.05$, ANDEVA dos vías; Tabla 2).

La tasa de crecimiento poblacional de *A. sieboldii* se muestra en la Figura 9. En comparación con el control, la tasa de crecimiento poblacional disminuyó significativamente ($p < 0.05$, ANDEVA dos vías) en todas las densidades seleccionadas cuando sus presas fueron expuestas a 20% Cd, 10% Cd + MPs y

20%Cd + MPs. Un aumento en la densidad de presa (4 ind. mL⁻¹) expuesta a 10%Cd aumentó significativamente ($p < 0.05$, ANDEVA dos vías; Tabla 2) la r de *A. sieboldii*.

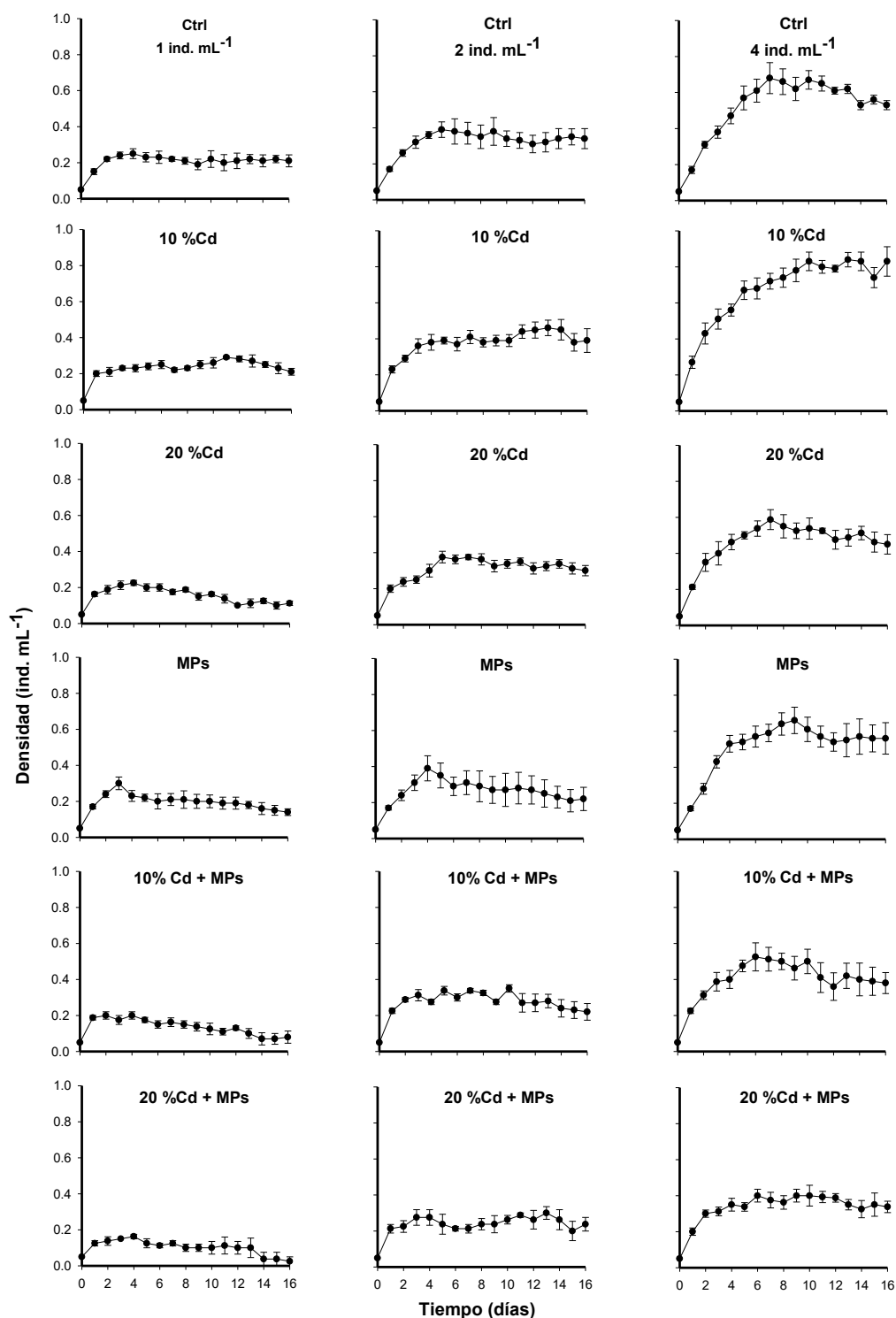


Figura 7. Curvas de crecimiento poblacional de *A. sieboldii* alimentado con 1, 2 y 4 ind. mL⁻¹ de *P. patulus* expuestos previamente a 10%Cd (0.009 mg L⁻¹), 20%Cd (0.018 mg L⁻¹), MPs (5 mg L⁻¹) y la combinación de ambos contaminantes. Se muestra el promedio de 5 repeticiones con su \pm error estándar.

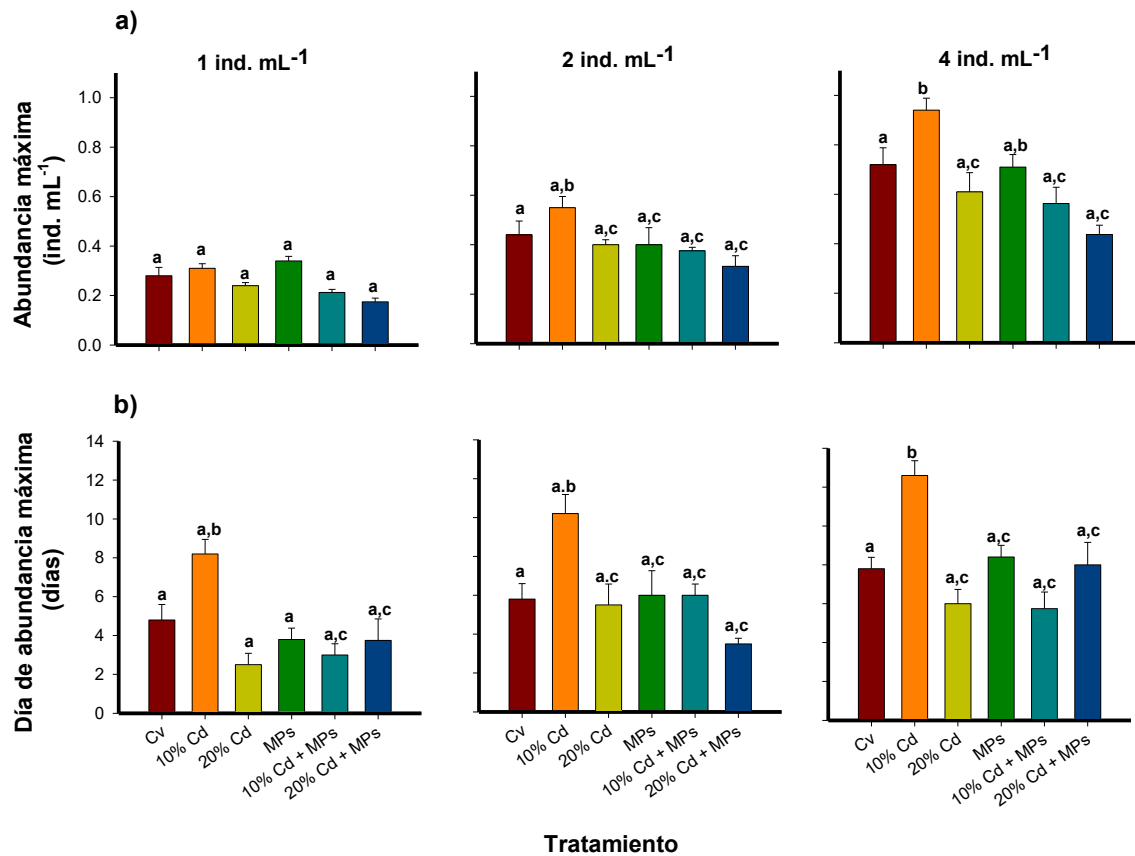


Figura 8. a) Abundancia máxima y b) Día de abundancia máxima de *A. sieboldii* alimentado con 1, 2 y 4 ind. mL⁻¹ de *P. patulus* expuestos previamente a 10%Cd (0.009 mg L⁻¹), 20%Cd (0.018 mg L⁻¹), MPs (5 mg L⁻¹) y la combinación de ambos contaminantes. Se muestra el promedio de 5 repeticiones con su \pm error estándar. Los datos que llevan una letra diferente son estadísticamente significativos ($p < 0.05$, prueba de Tukey).

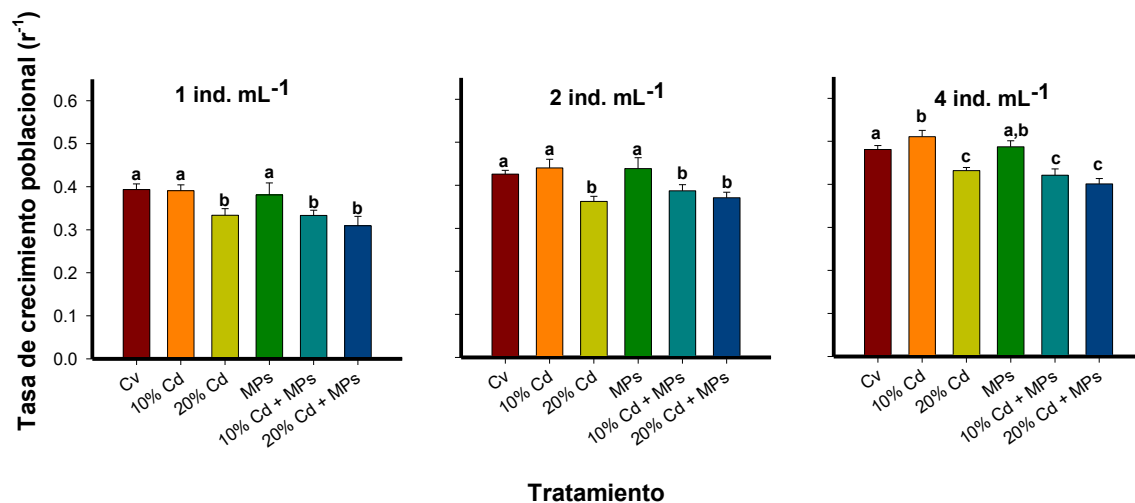


Figura 9. Tasa de crecimiento poblacional (r^{-1}) de *A. sieboldii* alimentado con 1, 2 y 4 ind. mL⁻¹ de *P. patulus* expuestos previamente a 10%Cd (0.009 mg L⁻¹), 20%Cd (0.018 mg L⁻¹), MPs (5 mg L⁻¹) y la combinación de ambos contaminantes. Se muestra el promedio de 5 repeticiones con su \pm error estándar. Los datos que llevan una letra diferente son estadísticamente significativos ($p < 0.05$, prueba de Tukey).

Tabla 2. Análisis de varianza de dos vías (ANDEVA) sobre las variables del crecimiento poblacional de *A. sieboldii* alimentado con las densidades seleccionadas de *P. patulus* expuesto previamente a concentraciones subletales de cadmio, microplásticos y la combinación de ambos contaminantes. GL: Grados de Libertad; SC: Suma de Cuadrados; MC: Media de Cuadrados ($\alpha=0.05$). Tratamientos con asterisco (*) representa diferencias significativas.

Fuente de variación	GL	SC	MC	F	P
<i>Día de abundancia máxima</i>					
Tratamiento (A)	5	328.995	65.799	11.452	<0.001*
Densidad (B)	2	194.451	97.226	16.921	<0.001*
A x B	10	42.333	4.233	0.737	0.688
Error	72	413.702	5.746		
<i>Abundancia máxima</i>					
Tratamiento (A)	5	353.122	70.624	19.379	<0.001*
Densidad (B)	2	933.956	466.978	128.134	<0.001*
A x B	10	102.844	10.284	2.822	0.005*
Error	72	262.4	3.644		
<i>Tasa de crecimiento poblacional</i>					
Tratamiento (A)	5	0.0878	0.0176	3.593	0.006*
Densidad (B)	2	0.245	0.122	25.062	<0.001*
A x B	10	0.0361	0.00361	0.739	0.685
Error	72	0.352	0.00489		

Tabla de vida

La supervivencia de *A. sieboldii* se muestra en la Figura 10, cuando se alimentó de presas expuestas a 10%Cd su supervivencia aumentó 1 día comparado con el control y los demás tratamientos en todas las densidades seleccionadas. En los tratamientos de 10%Cd + MPs y 20%Cd + MPs, se observa que los organismos fallecen más 1 o 2 días antes de que la población llegue a 0. Con la combinación de contaminantes, los rotíferos depredadores fueron más vulnerables.

Como se puede observar en la Figura 11, la producción de neonatos de *A. sieboldii* en el control y todos los tratamientos aumenta conforme aumentan las presas

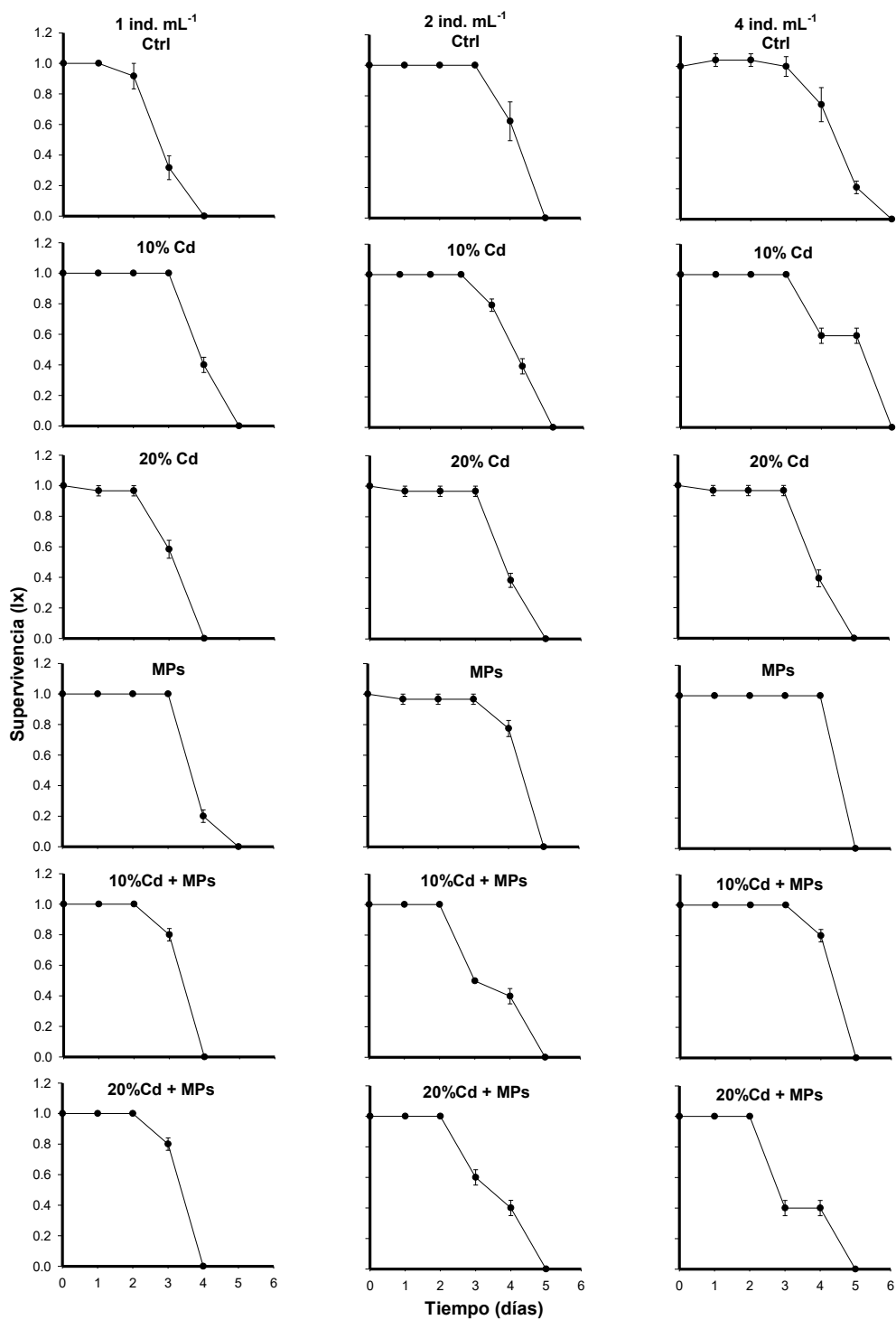


Figura 10. Curvas de supervivencia en edades específicas (días) de *A. sieboldii* alimentado con 1, 2 y 4 ind. mL⁻¹ de *P. patulus* expuestos previamente a 10%Cd (0.009 mg L⁻¹), 20%Cd (0.018 mg L⁻¹), MPs (5 mg L⁻¹) y la combinación de ambos contaminantes. Se muestra el promedio de 5 repeticiones (cohortes) con su \pm error estándar.

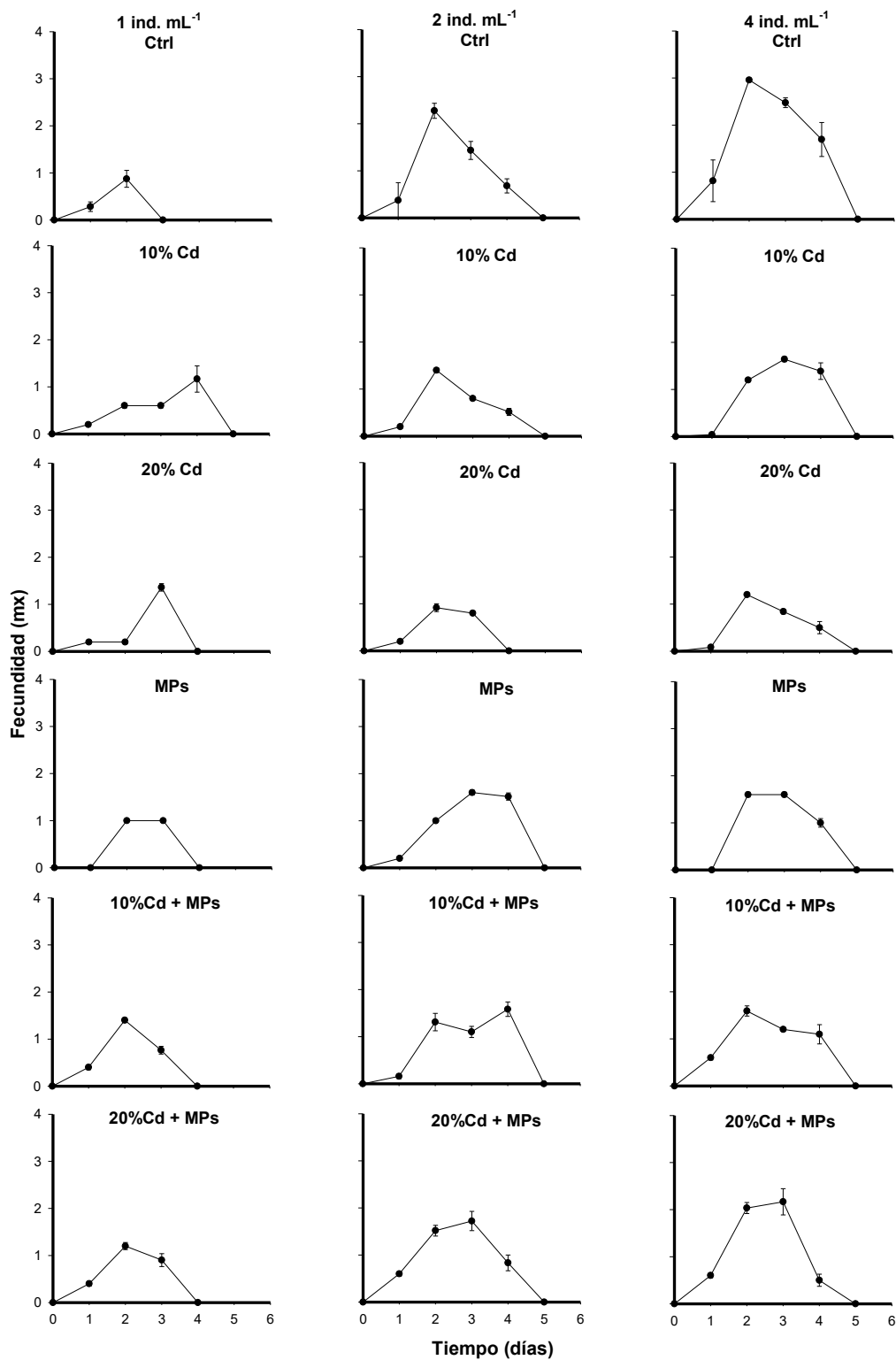


Figura 11. Curvas de fecundidad de *A. sieboldii* alimentado con 1, 2 y 4 ind. mL⁻¹ de *P. patulus* expuestos previamente a 10%Cd (0.009 mg L⁻¹), 20%Cd (0.018 mg L⁻¹), MPs (5 mg L⁻¹) y la combinación de ambos contaminantes. Se muestra el promedio de 5 repeticiones (cohortes) con su \pm error estándar.

disponibles y hubo fecundidad desde el día 1, excepto cuando su presa fue expuesta a microplásticos limpios. Comparando entre los tratamientos, la mayor fecundidad se observa cuando se combinan ambos contaminantes llegando a tener 2 neonatos hembra⁻¹ día⁻¹, un 50% menos que el control, pero un 50% más que los demás tratamientos.

El promedio de vida de *A. sieboldii* osciló de 3.35 – 5.2 d⁻¹ y la esperanza de vida al nacer varió de 2.8 – 4.5 d⁻¹. En todas las densidades de presa seleccionadas, estas variables se vieron afectadas significativamente ($p < 0.05$, ANDEVA dos vías; Tabla 3) cuando *P. patulus* fue expuesto a 20%Cd + MPs y sólo 20%Cd disminuyendo 25 y 28% respectivamente. Cuando la presa a una densidad de 1 y 2 ind. mL⁻¹ fue expuesta a 10%Cd hubo un aumento significativo ($p < 0.05$, ANDEVA dos vías; Tabla 3) del 30 y 32% en ambas variables como se observa en la Figura 12.

El periodo reproductivo de *A. sieboldii* que se muestra en la Figura 12, disminuyó en relación con la concentración de cadmio, particularmente con 20%. La tasa reproductiva bruta (TRB) varió de 1.23 – 7.96 neonatos hembra⁻¹ siendo mayor a una densidad de presa de 4 ind. mL⁻¹ en el control. La tasa reproductiva neta (TRN) osciló de 1.15 – 7.95 neonatos hembra⁻¹ y fue superior en el control con 4 ind. mL⁻¹ de *P. patulus*. La toxicidad de los contaminantes solos y combinados disminuyeron significativamente ($p < 0.05$, ANDEVA dos vías; Tabla 3) la TRB en la mayor densidad de presa inoculada (4 ind. mL⁻¹). Algo igual sucedió con la TRN que a mayor densidad de presa disponible, hubo una mayor afectación que fue significativa ($p < 0.05$, ANDEVA dos vías; Tabla 3) en la reproducción de *A. sieboldii*.

Cuando *A. sieboldii* se alimentó de presas contaminadas con cadmio, microplásticos y la combinación de ambos contaminantes, hubo un efecto significativo ($p < 0.05$, ANDEVA dos vías; Tabla 3) en el tiempo generacional (TG). En la menor densidad de *P. patulus* (1 ind. mL⁻¹) esta variable fue mayor en todos los tratamientos y a mayor densidad de presa el TG fue similar en algunos tratamientos comparando con el control.

La tasa de crecimiento poblacional de *A. sieboldii* varió de 0.12 – 0.55 r⁻¹ en el control y tratamientos con 1 ind. mL⁻¹, 0.41 – 0.69 r⁻¹ con 2 ind. mL⁻¹ y 0.37 – 0.99 r⁻¹ con 4 ind. mL⁻¹. Comparado con el control, en la menor densidad los tratamientos

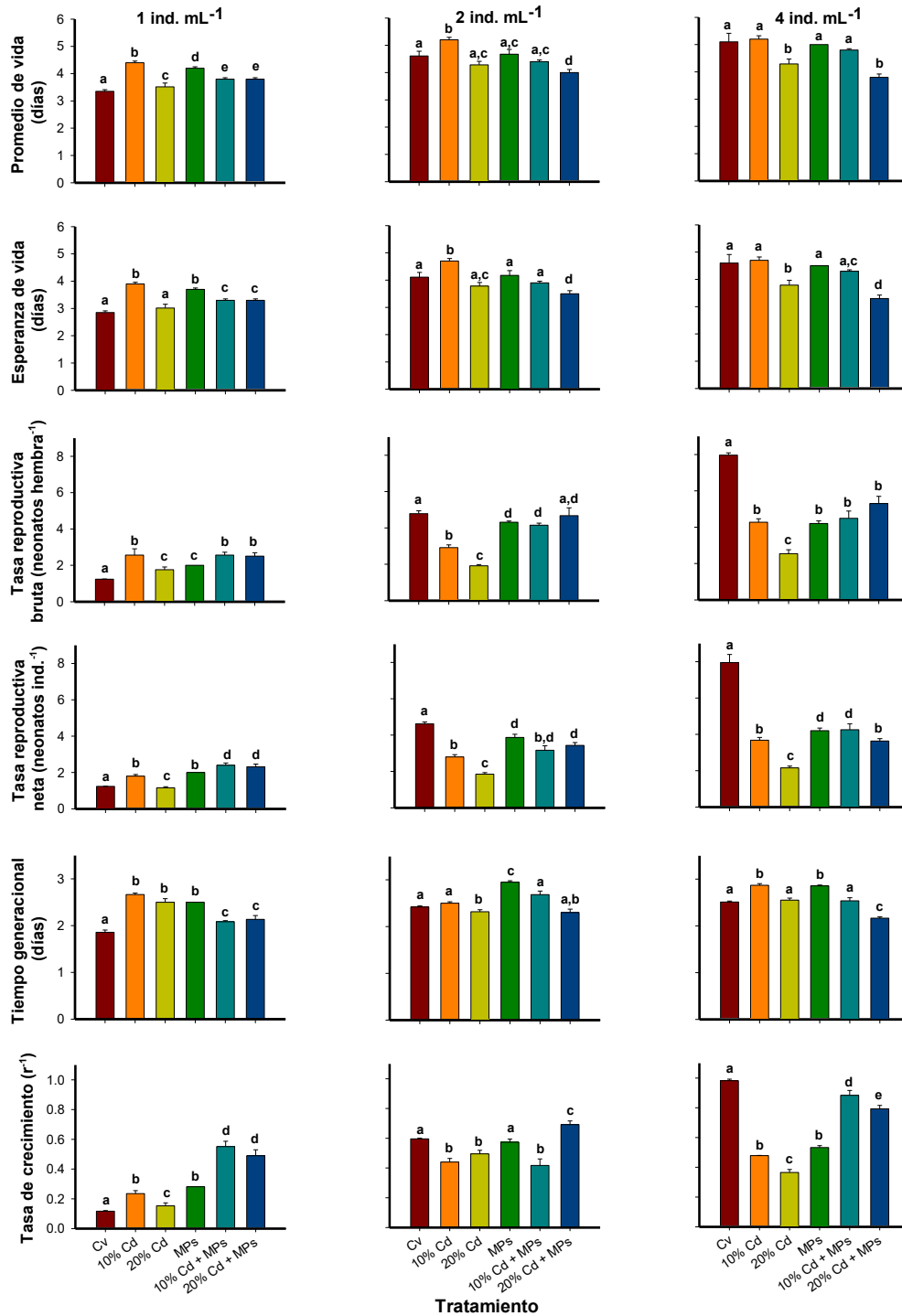


Figura 12. Variables demográficas de *A. sieboldii* alimentado con 1, 2 y 4 ind. mL⁻¹ de *P. patulus* expuestos previamente a 10%Cd (0.009 mg L⁻¹), 20%Cd (0.018 mg L⁻¹), MPs (5 mg L⁻¹) y la combinación de ambos contaminantes. Se muestra el promedio de 5 repeticiones (cohortes) con su \pm error estándar. Los datos que llevan una letra distinta son estadísticamente significativos ($p < 0.05$, prueba de Tukey).

Tabla 3. Análisis de varianza de dos vías (ANDEVA) sobre las variables demográficas en tabla de vida de *A. sieboldii* alimentado con *P. patulus* expuesto previamente a concentraciones subletales de cadmio, microplásticos y la combinación de ambos contaminantes. GL: Grados de Libertad; SC: Suma de Cuadrados; MC: Media de Cuadrados ($\alpha=0.05$). Tratamientos con asterisco (*) representa diferencias significativas.

Fuente de variación	GL	SC	MC	F	P
<i>Promedio de vida</i>					
Tratamiento (A)	5	13.529	2.706	43.942	<0.001*
Densidad (B)	2	14.372	7.186	116.703	<0.001*
A x B	10	4.764	0.476	7.736	<0.001*
Error	90	5.542	0.0616		
<i>Esperanza de vida</i>					
Tratamiento (A)	5	13.529	2.706	43.908	<0.001*
Densidad (B)	2	14.423	7.211	117.019	<0.001*
A x B	10	4.811	0.481	7.806	<0.001*
Error	90	5.546	0.0616		
<i>Tasa de reproducción bruta</i>					
Tratamiento (A)	5	69.922	13.984	71.101	<0.001*
Densidad (B)	2	132.584	66.292	337.05	<0.001*
A x B	10	73.116	7.312	37.174	<0.001*
Error	90	17.702	0.197		
<i>Tasa de reproducción neta</i>					
Tratamiento (A)	5	76.11	15.222	123.794	<0.001*
Densidad (B)	2	111.548	55.774	453.587	<0.001*
A x B	10	66.064	6.606	53.727	<0.001*
Error	90	11.067	0.123		
<i>Tiempo generacional</i>					
Tratamiento (A)	5	4.334	0.867	32.594	<0.001*
Densidad (B)	2	1.831	0.916	34.433	<0.001*
A x B	10	2.443	0.244	9.187	<0.001*
Error	90	2.393	0.0266		
<i>Tasa de crecimiento poblacional</i>					
Tratamiento (A)	5	1.556	0.311	69.996	<0.001*
Densidad (B)	2	2.092	1.046	235.371	<0.001*
A x B	10	0.909	0.0909	20.441	<0.001*
Error	90	0.4	0.00445		

tuvieron una mayor tasa de crecimiento mientras que a mayor densidad de presa el control fue superior. En todas las densidades el tratamiento de *P. patulus* expuesto

a 20%Cd fue significativamente menor ($p < 0.05$, ANDEVA dos vías; Tabla 3). En general, la interacción Tratamiento x Densidad afectaron la tasa de crecimiento poblacional de *A. sieboldii* en la tabla de vida ($p < 0.001$; Tabla 3).

En la Figura 13A se muestran las microesferas de poliestireno que se utilizaron en esta investigación, la comparación de tamaño de los MPs y las algas verdes se muestra en la Figura 13B. A pesar de la diferencia de tamaño, en la Figura 13C se muestra a un individuo de *P. patulus* que ingirió MPs y que al bioacumularlos los transfiere al rotífero depredador *A. sieboldii*, lo anterior se observa en la Figura 13D y Figura 13E.

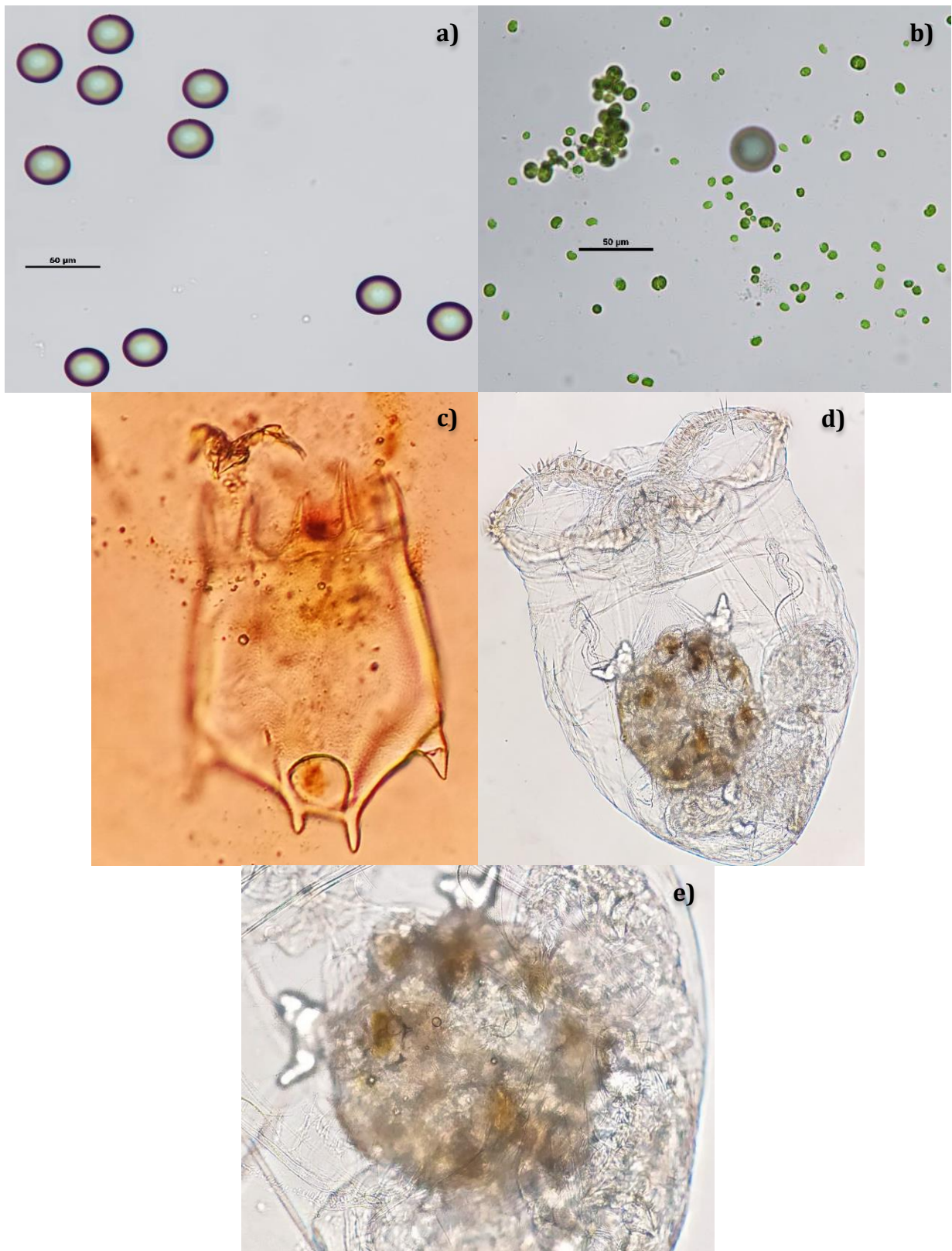


Figura 13. a) Microesferas de poliestireno utilizadas en investigación, b) MPs y algas verdes, c) *P. patulus* expuesto a solución de hipoclorito de sodio al 4% para visualizar MPs ingeridos, d) *A. sieboldii* alimentado con *P. patulus* expuesto a MPs+10%Cd y e) Estómago de *A. sieboldii*, se observan los MPs que fueron ingeridos y transferidos por *P. patulus* al depredador.

Discusión

Los efectos de las interacciones entre contaminantes como metales (Frías-Espéricueta et al. 2009), pesticidas (Faust et al. 1994) y microplásticos con otros contaminantes (Rehse et al. 2018) son analizados comúnmente mediante pruebas rápidas de toxicidad aguda (CL₅₀) de 24 a 96-h y en un solo nivel de la cadena trófica, por lo general herbívoros. A pesar de la información útil que se genera a partir de ensayos crónicos, son pocos los trabajos que evalúan los efectos en la alimentación y crónicos con al menos un contaminante (Jensen et al. 2009), como cadmio, y aún más escasos aquellos que evalúan los efectos de dos contaminantes sobre un nivel trófico superior como la presente investigación.

Los rotíferos, por su corto ciclo de vida presentan cambios significativos en su dinámica poblacional cuando el medio donde habitan presenta una mezcla de sustancias tóxicas, algo muy común en los sistemas epicontinentales mexicanos (Sarma et al. 2010). En este trabajo se utilizó al rotífero depredador *A. sieboldii* y a *P. patulus* como presa porque se distribuyen naturalmente en sistemas epicontinentales mexicanos contaminados, por ejemplo, el Lago de Xochimilco y el Lago del Bosque de Aragón (Nandini et al. 2005) y cumplen con los requisitos básicos para ser utilizados como organismos de bioensayos ecotoxicológicos (Rand y Petrocelli, 1985).

Muchos contaminantes interactúan en los sistemas acuáticos contaminados, entre ellos es común encontrar Cd (Cervantes y Moreno-Sánchez, 1999), y microplásticos (Dris et al. 2015). En comparación con el Cd, hay poca literatura sobre la problemática en los ambientes acuáticos epicontinentales por los microplásticos (Eerkes-Medrano et al. 2015). Por lo anterior, son pocas las investigaciones que reporten la presencia de Cd y microplásticos en un mismo sitio; sin embargo, la presencia de los microplásticos como contaminante “cosmopolita” nos permite pensar que hay sitios donde se encuentren ambos contaminantes interaccionando en uno o varios sitios. En esta investigación, se encontró evidencia que sugiere que los microplásticos tienen un efecto sinérgico cuando se combinan con Cd en un nivel trófico superior, es decir, un depredador como *A. sieboldii*.

Los resultados de la interacción 10%Cd+MPs y 20%Cd+MPs en las pruebas de toxicidad aguda y de alimentación en *P. patulus* y el comportamiento alimentario de *A. sieboldii*, muestran que tanto los rotíferos herbívoros como los depredadores, que son más sensibles a tóxicos, son afectados por la combinación de estos contaminantes (Capítulo II Alimentación). La toxicidad de ambos contaminantes se intensificó cuando se combinaron y esto fue más evidente cuando el 10%Cd se combinó con los microplásticos, haciendo evidente el sinergismo entre ambos contaminantes. La interacción entre otros contaminantes también ha producido un efecto sinérgico sobre la biota acuática (Altenburger et al. 1996). En comparación con *P. patulus*, el rotífero depredador *A. sieboldii* fue más sensible a la combinación de contaminantes e individualmente para cada contaminante (Capítulo II “Alimentación”).

En los estudios ecotoxicológicos, los rotíferos herbívoros son los organismos más estudiados (Gama-Flores et al. 2007; González-Pérez et al. 2018). Se conoce su respuesta cuando se exponen a diversos contaminantes separadamente. Es poca la información que hay sobre el efecto en un nivel trófico superior como *A. sieboldii*, y aún más escasa cuando se trata del efecto de dos contaminantes. En las curvas de crecimiento poblacional de *A. sieboldii* se refleja la sinergia del cadmio y microplásticos cuando se combinan. Aunque el antagonismo es más común, los efectos varían con relación al organismo de ensayo, las mezclas y las concentraciones de los contaminantes (Roex et al. 2000). Por lo general, con los microplásticos combinados con otro contaminante se obtiene un efecto sinérgico (Wang et al. 2020), aunque también se ha encontrado un efecto aditivo (Beiras et al. 2018). Numéricamente, el rotífero depredador *A. sieboldii* creció menos en los tratamientos donde se combinaron las dos concentraciones subletales de Cd y microplásticos. Pero creció más cuando se expuso a la concentración subletal más baja (10%Cd), presentando una respuesta de hormesis al igual que sus congéneres que fueron alimentados con presas expuestas a metales pesados (Gama-Flores et al. 2007).

Para la evaluación de riesgo ambiental con ensayos ecotoxicológicos, la tasa de crecimiento poblacional, así como la abundancia máxima son variables ecológicas relevantes por su sensibilidad ante contaminantes (Sarma et al. 2010;

Dahms et al. 2011). Estas variables demográficas que fueron utilizadas para valorar los efectos crónicos del Cd y microplásticos, juntos y separados en generaciones solapadas del depredador *A. sieboldii* a través de su alimento, mostraron un mejor crecimiento con 10%Cd, como se ha demostrado con rotíferos herbívoros ante concentraciones bajas de un tóxico (Guo y Chen, 2015; García-García et al. 2017). Cuando se aumenta la concentración de cadmio a 20%Cd y en las combinaciones de contaminantes, se encontró que los rotíferos tuvieron una menor densidad poblacional. En el Capítulo II “Alimentación”, se observó algo similar con la alimentación de la presa *P. patulus* y en el comportamiento alimentario del depredador *A. sieboldii*.

En las variables de tabla de vida del depredador *A. sieboldii*, se observa que la supervivencia aumenta con 10% Cd y se ve afectada con la presencia de MPs y la combinación de ambos contaminantes. En cuanto a la fecundidad, esta variable aumentó cuando el depredador se alimentó de sus presas expuestas a la combinación de contaminantes, este compromiso generó un mayor costo energético en las hembras y afectó su esperanza de vida. Esta respuesta se ha reportado para varias especies rotíferos herbívoros, tanto de sistemas epicontinentales como marinos (Xiao-Ping et al. 2020; Zhang et al. 2021). A diferencia de los resultados derivados del crecimiento poblacional, la tasa de crecimiento poblacional con una cohorte (tabla de vida) muestra que, *A. sieboldii* alimentado con presas expuestas a la combinación de contaminantes acelera su metabolismo, aumentan su descendencia, pero reducen su esperanza de vida. Estas variaciones vuelven más susceptibles a las poblaciones y los cambios son más evidentes a través de las generaciones.

A partir del análisis estadístico se muestra que la interacción Tratamiento (Cd y/o MPs) x Densidad afecta la supervivencia y reproducción del depredador *A. sieboldii* a través de su alimento contaminado. Esta interacción sugiere que *P. patulus* bioacumula el Cd, MPs o su combinación, y lo transfieren a *A. sieboldii*. La poca información sobre la transferencia de contaminantes dentro del zooplancton se centra principalmente en copépodos marinos (Coppock et al. 2019), a pesar de la relevancia ecológica de *Asplanchna*. Este trabajo destaca que sin haber contaminantes en el medio del depredador *A. sieboldii*, presas como *P. patulus*

pueden bioacumular y tener un efecto sobre la demografía de *Asplanchna*. En este trabajo se encontró una respuesta similar a la que reporta Gama-Flores et al. (2007), en el que el rotífero depredador *A. brightwellii* fue afectado en su demografía indirectamente a través de la ingestión de presas expuestas a cobre y cadmio. Asimismo, Sarma et al. (2002) reportaron que la misma especie de *Asplanchna* utilizada en este trabajo, es afectada por la dieta que tiene su presa.

En los sistemas acuáticos epicontinentales mexicanos, la Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996 permite una descarga máxima de $200 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd, mientras que para los microplásticos aún no hay un límite máximo permisible. Las concentraciones que se han registrado en ecosistemas epicontinentales son de más de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd (Bervoets et al. 2009), y de 10mg L^{-1} de microplásticos (Dong et al. 2020). Para los experimentos realizados en esta investigación, la presa *P. patulus* fue expuesta a concentraciones reales que están dentro de los límites permisibles de Cd y concentraciones reales de MPs, los cambios en las tasas de crecimiento poblacional y variables demográficas del depredador *A. sieboldii* resultado de una dieta contaminada, son evidentes. Además, estas concentraciones de cadmio y microplásticos utilizadas que fueron menores a las reportadas en la naturaleza, mostraron efectos en pruebas con los contaminantes por separado y sinergismo cuando estos se combinaron. Se recomienda se continúe estudiando la transferencia de uno o más contaminantes, así como su interacción entre ellos y cómo los depredadores pueden ser afectados. Haciendo énfasis en los microplásticos, de este contaminante emergente son pocas las investigaciones que estudian su interacción con otros contaminantes y los efectos sobre organismos acuáticos (Wang et al. 2020).

Conclusiones

- ✓ En las variables de crecimiento poblacional, los datos obtenidos muestran que los contaminantes de manera individual cambian la demografía de *A. sieboldii* y al ser combinados la afectan de manera significativa.
- ✓ En el ensayo crónico de una cohorte (tabla de vida), los contaminantes combinados disminuyeron la supervivencia y aumentaron la fecundidad de *A. sieboldii*.
- ✓ Los microplásticos y el Cd, tanto por separado como combinados fueron bioacumulados y transferidos a través de *P. patulus*.
- ✓ Los microplásticos como vector de otro contaminante como el Cd, dio como resultado un efecto sinérgico sobre la demografía del rotífero depredador *A. sieboldii*.

Literatura citada

Abowel, J. F. N. y Sikoki, F. D. 2005. Water pollution management and control. Double Trust, Port Harcourt.

American Society of Testing and Materials. 2012. Standard guide for acute toxicity tests with the rotifer *Brachionus*. Annual Book of ASTM Standards. Vol. 11.04, E 1440, Philadelphia.

Andrady, A. L. 2011. Microplastics in the marine environment. Mar. Pollut. Bull. 62(8): 1596 – 1605.

Arcury T. A., Quandt S.A. y Russell G.B. 2002. Pesticide safety among farmworkers: perceived risk and perceived control as factors reflecting environmental justice. Environ Health Perspect. 110: 233 – 239.

Bakir, A., Rowland, S. J. y Thompson, R.C. 2014. Transport of persistent organic pollutants by microplastics in estuarine conditions. Estuar. Coast Shelf Sci. 140: 14 – 21.

Barnes, D. K. A., Galgani, F., Thompson, R. C. y Barlaz, M. 2009. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. Philos. Trans. R. Soc. B. 364 (1526): 1985 – 1998.

Barrios, C. A. Z., Nandini, S. y 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.

Bashir, I., Lone, F.A., Bhat, R.A., Mir, S.A., Dar, Z.A. y Dar, S.A. 2020. Concerns and Threats of Contamination on Aquatic Ecosystems. In: Hakeem K., Bhat R., Qadri H. (eds) Bioremediation and Biotechnology Kummongkol, D., Canterford, G. S. y Fryer, C. 1982. Accumulation of heavy metals in unicellular algae. Biotechnol. Bioen. 24: 2643 – 2660.

Bayo, J., Martínez, A., Guillen, M., Olmos, S., Roca, M.-J. y Alcolea, A. 2017. Microbeads in commercial facial cleansers: threatening the environment. Clean. - Soil, Air, Water 45: 1600683.

Beeby, A. 1993. Measuring the effect of pollution. In Applying ecology. London/New York: Chapman and Hall.

Begon, M., Harper, J. L. y Townsend, C. R. 1996. Ecology: Individuals, populations and communities. 3rd Ed. Blackwell Science, Oxford, UK.

- Beiras, R., Bellas, J., Cachot, J., Cormier, B., Cousin, X., Engwall, M., Gambardella, C., Garaventa, F., Keiter, S., Le Bihanic, F., López-Ibáñez, S., Piazza, V., Rial, D., Tato, T. y 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.
- Berber, A. A. y Yurtsever, M. 2018. Toxicological effect of polyethylene microsphere on *Brachionus plicatilis* and *Daphnia magna*. *Fresenius Environmental Bulletin* 27(7): 4973 – 4979.
- Besseling, E., Foekema, E. M., Van Franeker, J. A., Leopold, M. F., Kühn, S., Bravo Rebolledo, E. L., Hebe, E., Mielke, L., IJzer, J., Kamminga, P., Koelmans, A. A. 2015. Microplastic in a macro filter feeder: Humpback whale *Megaptera novaeangliae*. *Mar. Pollut. Bull.* 95: 248 – 252.
- Borowitzka, M. y Borowitzka, L. 1988. *Micro-algal biotechnology*. Cambridge University Press. London.
- 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. *Environ. Sci. Technol* 45(21) 9175 – 9179.
- Cabrera, C., Ortega, E., Lorenzo, M. L. y López, M. D. C. 1998. Cadmium contamination of vegetable crops, farmlands, and irrigation waters. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 154: 55 – 81.
- Cain, J. R., Paschal, D. C. y Hayden, C. M. 1980. Toxicity and bioaccumulation of cadmium in the colonial green alga *Scenedesmus obliquus*. *Arch. Environ. Contam. Toxcol.* 9: 9 – 16.
- Calow, P. P. (Ed.). 2009. *Handbook of ecotoxicology*. John Wiley & Sons.
- Canniff, M. P. y Hoang, T. C. 2018. Microplastic ingestion by *Daphnia magna* and its enhancement on algal growth. *Science of the Total Environment* 633: 500 – 507.
- Cervantes, C. y Moreno-Sánchez, R. (Eds). 1999. *Contaminación ambiental por metales pesados. Impacto en los seres vivos*. A. G. T. Publishers, México City, México.
- Cervantes, M. 2007. Conceptos fundamentales sobre ecosistemas acuáticos y su estado en México. En *Perspectivas sobre conservación de ecosistemas acuáticos en México*. Ed. Sánchez, O., Herzig, M., Peters, E., Márquez, R. y Zambrano, L.

Chang-Bum, J., Eun-Ji, W., Hye-Min, K., Min-Chul, L., Dae-Sik, H., Un-Ki, H., Bingsheng, Z., Sami, S., Su-Jae, L. y Jae-Seong, L. 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: 8849 – 8857.

Cole, M. y Galloway, T. S. 2015. Ingestion of nanoplastics and microplastics by pacific oyster larvae. *Environ. Sci. Technol.* 49: 14625 – 14632.

Cole, M., Lindeque, P., Fileman, E., Halsband, C. y Galloway T. S. 2015. The impact of polystyrene microplastics on feeding, function and fecundity in the marine copepod *Calanus helgolandicus*. *Environ. Sci. Technol.* 45: 1130 – 1137.

Cole, M., Lindeque, P., Fileman, E., Halsband, C., Goodhead, R., Moger, J. y Galloway, T. S. 2013. Microplastic ingestion by zooplankton. *Environmental Science & Technology* 47: 6646 – 6655.

Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C. y Galloway, T. S. 2011. Microplastics as contaminants in the marine environment: A review. *Mar. Pollut. Bull.* 62: 2588 – 2597.

Coppock, R. L., Galloway, T. S., Cole, M., Fileman, E. S., Queirós, A. M. y Lindeque, P. K. 2019. MPs alter feeding selectivity and faecal density in the copepod *Calanus helgolandicus*. *Science of Total Environment* 687: 780 – 789.

Cury, P. M., Fréon, P., Moloney, C. L., Shannon, L. J. y Shin, Yunne-Jai. 2005. Processes and patterns of interactions in marine fish populations: an ecosystem perspective. In: Robinson, A. R. McCarthy, B. J. y Rothschild, B. J. (eds) *The Sea*. Harvard University Press, Cambridge 13: 475 – 553.

Davison, P. y Asch, R., 2011. Plastic ingestion by mesopelagic fishes in the North Pacific Subtropical Gyre. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 432, 173 – 180.

Del Razo, L. M., Arellano, M. A., y Cebrián, M. E. 1990. The oxidation states of arsenic in well water from a chronic arsenicism area of northern Mexico. *Environmental pollution*, 64(2), 143 – 153.

Demirak, A., Yilmaz, F., Levent Tuna, A. y Ozdemir, N. 2006. Heavy metals in water, sediment and tissues of *Leuciscus cephalus* from a stream in southwestern Turkey. *Chemosphere* 63(9): 1451–1458.

Demirak, A., Yilmaz, F., Levent, T. A. y Ozdemir, N. 2006. Heavy metals in water, sediment and tissues of *Leuciscus cephalus* from a stream in southwestern Turkey. *Chemosphere* 63(9):1451–1458.

Dris, R., Imhof, H. K., Löder M. G. J., Gasperi, J., Laforsch, C. y Tassin, B. 2018. Microplastic contamination in freshwater systems: Methodological challenges, occurrence and sources. In: *Microplastic contamination in aquatic environments* 51 – 93.

Duffus, J. H. 2002. Heavy metals – a meaningless term? *Pure Appl Chem* 74: 793 – 807.

Dumont, H. J., Sarma, S. S. S. y Ali, A. J. 1995. Laboratory studies on the population dynamics of *Anuraeopsis fissa* (Rotifera) in relation to food density. *Freshwater Biology* 33: 39 – 46.

Eerkes-Medrano, D., Thompson, R. C. y Aldridge, D. C. 2015. Microplastics in freshwater systems: A review of emerging threats, identification of knowledge gaps and prioritization of research needs. *Water research* 75: 63 – 82.

Ekubo, A. T. y Abowei, J. F. N. 2011. Aspects of aquatic pollution in Nigeria. *Research Journal of Environmental and Earth Sciences*, 3(6): 673–693.

Eltemsah, Y. S. y Bohn, T. 2019. Acute and chronic effects of polystyrene microplastics on juvenile and adult *Daphnia magna*. *Environmental Pollution* 254: 112919.

EPA (U.S. Environmental Protection Agency). 1998. Methyl parathion. MRID Nos. 26 40364103 and 142803. EPA special docket EPA-HQ-OPP-2007-0151.

Eriksen, M., Mason, S., Wilson, S., Box, C., Zellers, A., Edwards, W., Farley, H. y Amato, S. 2013. Microplastic pollution in the surface waters of the Laurentian Great Lakes. *Mar. Pollut. Bull.* 77: 177.

Fendall, L. S. y Sewell, M. A. 2009. Contribution to marine pollution by washing your face: Microplastics in facial cleaners. *Marine Pollution Bulletin* 58: 1225 – 1228.

Fernández-Casalderrey, A., Ferrando, M. D., & Andreu-Moliner, E. (1993). *Effect of the insecticide methyl parathion on filtration and ingestion rates of Brachionus calyciflorus and Daphnia magna*. *Science of The Total Environment*, 134, 867–876.

Carpenter, E. J., Smith, K. L., Carpenter, E. J. 1972. Plastics on the Sargasso Sea Surface. *Science* 175(4027): 1240 – 1241.

- Ferrusquía-García, Ch. J., Roa-Morales, G., García-Fabila, M. M., Amaya-Chávez, A. y Pavón-Silva, T. B. 2008. Evaluación de la degradación de metil paratión en solución usando fotocátalisis heterogénea. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales* 4(2): 285 – 290.
- Fontaneto, D. y De Smet, W. H. 2015. Rotifera. In: Schmidt-Rhaesa, A. (Ed.) *Handbook of Zoology, Gastrotricha, Cycloneuralia and Gnathifera*. De Gruyter 3:217 – 300.
- Gama-Flores J. L., Castellanos Páez, M. E., Sarma, S. S. S. y Nandini, S. 2007. Effect of pulsed exposure to heavy metals (copper and cadmium) on some population variables of *Brachionus calyciflorus* Pallas (Rotifera: Brachionidae: Monogononta). *Hydrobiologia* 593: 201 – 208.
- Gama-Flores, J. L., Ferrara-Guerrero, M. J., Sarma, S. S. S. y Nandini, S. 2007. Prey (*Brachionus calyciflorus* and *Brachionus havanaensis*) exposed to heavy metals (Cu and Cd) for different durations and concentrations affect predator's (*Asplanchna brightwellii*) population growth. *Journal of Environmental Science and Health Part A* 42(10): 1483 – 1488.
- Gama-Flores, J. L., Huidobro-Salas, M. E., Sarma, S. S. S. y Nandini, S. 2014. Combined effects of temperature (level and oscillation) and cadmium concentration on the demography of *Brachionus calyciflorus* (Rotifera). *International Review of Hydrobiology* 99: 173 – 177.
- Gama-Flores, J. L., Sarma, S. S. S. y Nandini, S. 2004. Acute and chronic toxicity of the pesticide methyl parathion to the rotifer *Brachionus angularis* (Rotifera) at different algal (*Chlorella vulgaris*) food densities. *Aquatic Ecology* 38: 27 – 36.
- Gambardella, C., Morgana, S., Ferrando, S., Bramini, M., Piazza, V., Costa, E., Garaventa, F. y Faimali, M. 2017. Effects of polystyrene microbeads in marine planktonic crustaceans. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 145: 250 – 257.
- Gilbert, J. J. 1980. Developmental Polymorphism in the Rotifer *Asplanchna sieboldii*: Three distinct female morphotypes, controlled by the level of dietary vitamin E, or tocopherol, allow this small aquatic organism to adapt rapidly to environmental changes. *American Scientist* 68(6): 636 – 646.

- Gilbert, J. J. 2016. Non-genetic polymorphisms in rotifers: environmental and endogenous controls, development, and features for predictable or unpredictable environments. *Biological Reviews* 92(2): 964 – 992.
- Gómez, L., Larduet, Y. y Abrahantes, N. 2001. Contaminación y biodiversidad en ecosistemas acuáticos. El fitoplancton de la Bahía de Santiago de Cuba. *Rev. Invest. Mar* 22: 191 – 197.
- Graham, E. R. y Thompson, J. T. 2009. Deposit- and suspension-feeding sea cucumbers (Echinodermata) ingest plastic fragments. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 368, 22 – 29.
- Greyer, R., Jambeck, J. R. y Lavender, L. K. 2017. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science advances* 3 (7): e1700782.
- Guo, R., Ren, X. y Ren, H. 2012. Assessment the toxic effects of dimethoate to rotifer using swimming behavior. *Bull Environ Contam Toxicol* 89: 568 – 571.
- Gliwicz, M. Z. (2003). Between Hazards of Starvation and Risk of Predation: The ecology of Offshore Animals. In O. Kinne (Ed.), *Excellence in ecology*. Luhe, Germany: International Ecology Institute.
- Hampel, M., Blasco, J. y Segner, H. 2015. Molecular and cellular effects of contamination in aquatic ecosystems. *Environ Sci Pollut Res* 22: 17261–17266.
- Hampel, M., Blasco, J. y Segner, H. 2015. Molecular and cellular effects of contamination in aquatic ecosystems. *Environ Sci Pollut Res* 22:17261–17266
- Hart, B. A. y Scaife, B. D. 1977. Toxicity and bioaccumulation of cadmium in *Chlorella pyrenoidosa*. *Environ. Res.* 14: 401 – 413.
- Hernández, G. M. M., Jiménez, G. C., Jiménez, A. F. R. y Arceo, G. M. E. 2007. Caracterización de las intoxicaciones agudas por plaguicidas: Perfil ocupacional y conductas de uso de agroquímicos en una zona agrícola del Estado de México, México. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 23(4): 159 – 167.
- Juárez-Franco Marissa Fernanda, S. S. S. Sarma & S. Nandini. 2007. Effect of cadmium and zinc on the population growth of *Brachionus havanaensis* (Rotifera: Brachionidae). *Journal of Environmental Science and Health Part A* 42: 1489 – 1493.
- Juárez-Franco, M. F., Sarma, S. S. S. y Nandini, S. 2007. Effect of cadmium and zinc on the population growth of *Brachionus havanaensis* (Rotifera: Brachionidae). *Journal of Environmental Science and Health Part A* 42 (10): 1489 – 1493.

- Kaposi, K. L. Mos, B., Kelaher, B. P. y Dwirjany, S. A. 2013. Ingestion of microplastic has limited impact in a marine larva. *Environ. Sci. Technol.* 48: 1638 – 1645.
- King, C. E. y Snell, W. 1977. Sexual recombination in rotifers. *Heredity* 39(3): 357 – 360.
- Krebs, C. J. 1985. *Ecology; the experimental analysis of distribution and abundance*. 3rd Ed. Harper & Row, New York, 592 pp
- Liu, X.-J., Ni, I.-H., & Wang, W.-X. 2002. Trophic transfer of heavy metals from freshwater zooplankton *Daphnia magna* to zebrafish *Danio rerio*. *Water Research*, 36(18), 4563–4569.
- Llorca, M., Schirinzi, G., Martínez, M., Barceló, D. y Farré, M. 2018. Adsorption of perfluoroalkyl substances on microplastics under environmental conditions. *Environ. Pollut.* 235: 680 – 691.
- Mangas-Ramírez, E., Sarma, S. S. S. y Nandini, S. 2004. Recovery patterns of *Moina macrocopa* exposed previously to different concentrations of cadmium and methyl parathion: life-table demography and population growth studies. *Hydrobiologia* 526: 255 – 265.
- Mato, Y., Isobe, T., Takada, H., Kanehiro, H., Ohtake, C., Kaminuma, T. 2001. Plastic resin pellets as a transport medium for toxic chemicals in the marine environment. *Environ. Sci. Technol.* 35(2): 318 – 324.
- Mattson, M. P. 2008. Hormesis defined. *Ageing Res Rev.* 7(1):1–7.
- Molina-Morales, Y., Flores-García, M., Balza-Quintero, A., Benítez-Díaz, P. y Miranda-Contreras, L. 2012. Niveles de plaguicidas en aguas superficiales de una región agrícola del estado de Mérida, Venezuela, entre 2008 y 2010. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 28(4): 289 – 301.
- Mushtaq, N., Singh, D. V., Bhat, R. A., Dervash, M. A. y Hameed, O. 2019. Freshwater Contamination: Sources and Hazards to Aquatic Biota. *Fresh Water Pollution Dynamics and Remediation*, 27–50.
- Nandini, S., Picazo-Páez, E. A. y Sarma, S. S. S. 2007. The combined effects of heavy metals (copper and zinc), temperature and food (*Chlorella vulgaris*) level on the demographic characters of *Moina macrocopa* (Crustacea: Cladocera). *Journal of Environmental Science and Health Part A* 42 (10): 1433 – 1442.

- Nandini, S., Ramírez-García, P. y 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 – 295.
- Nogrady, T., Wallace, R. L. y Snell, T. W. 1993. Guides to the identification of macroinvertebrates of the continental waters of the world. Rotifera (1). Biology, ecology and systematic. S. B. P. Academic Publishers, The Hague, The Netherlands 142 p.
- Osuna, M. C. C. 2012. Biomonitorio de la disponibilidad de metales pesados (Cd, Cu, Hg, Pb y Zn) y biotoxinas marinas (amnésicas y paralizantes) en el ostión de mangle *Crassostrea corteziensis*, en sistemas lagunares de Sinaloa. Tesis de doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México, 161 pp.
- Pan, K. y Wang, W. X. 2012. Trace metal contamination in estuarine and coastal environments in China. *Science of the Total Environment*, 421, 3 – 16.
- Peters, C. A. y Bratton, S. P. 2016. Urbanization is a major influence on microplastic ingestion by sunfish in the Brazos River Basin, Central Texas, USA. *Environ. Pollut.* 210: 380 – 387.
- Rainbow, P. S. y Luoma, S. N. 2011. Metal toxicity, uptake and bioaccumulation in aquatic invertebrates—modelling zinc in crustaceans. *Aquat Toxicol* 105: 455 – 465.
- Ramírez-García, P., Nandini, S., Sarma, S. S. S., Robles-Valderrama, E., Cuesta, I. y Hurtado-Maria, D. 2002. Seasonal variations of zooplankton abundance in the freshwater reservoir Valle de Bravo (Mexico). *Hydrobiologia* 467: 99 – 108.
- Ramírez-Pérez, T. y Sarma, S. S. S. 2008. Combined effects of heavy metal (Hg) concentration and algal (*Chlorella vulgaris*) food density on the population growth of *Brachionus calyciflorus* (Rotifera: Brachionidae). *Journal of Environmental Biology* 29(2): 139 – 142.
- Rand, G. y Petrocelli, S. 1985. Fundamentals of aquatic toxicology. Hemisphere Corporation, Washington, D. C.
- Rice, E. W., Baird, R. B. y Eaton, A. D. (Eds). Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association. 23th Edition, New York.
- Rico-Martínez, R., Arzate-Cárdenas, M. A., Robles-Vargas, D., Pérez-Legaspi, I. A., Alvarado-Flores, J. y Santos-Medrano, G. E. 2016. Rotifers as models in toxicity

- screening of chemicals and environmental samples. In Larramendy, M. L. y Soloneski, S. (Eds.), *Invertebrates-experimental models in toxicity screening* pp 57 – 100.
- Ríos, M. L. M. y Balcer, M. 2019. Microplastics in freshwater environments: A review of quantification assessment. *Trends in Analytical Chemistry* 113: 402 – 408.
- Rist, S., Baun, A. y Hartmann, B. N. 2017. Ingestion of micro- and nanoplastics in *Daphnia magna* – Quantification of body burdens and assessment of feeding rates and reproduction. *Environmental Pollution* 238: 398 – 407.
- Rosas, I., R. Belmont, Armienta, A. and Baez, A. 1999. Arsenic concentrations in water, soil, milk and forage in Comarca Lagunera, Mexico. *Water Air Soil Pollut.* 112: 133 – 149.
- Santos-Medrano, G. E. y Rico-Martínez, R. 2013. Lethal effects of five metals on the freshwater rotifers *Asplanchna brightwellii* and *Brachionus calyciflorus*. *Hidrobiológica* 23(1): 82 – 86.
- Sarma S. S. S. y Nandini S. 2006. Review of recent ecotoxicological studies on cladocerans. *J. Environ. Sci. Health. B.* 41:1417 – 1430.
- Sarma, S. S. S. 2000. The use of rotifers for ecotoxicological studies in Mexico. In: E. Ríos-Jara et al. (eds). *Estudios sobre plancton en México y el Caribe*. Sociedad Mexicana Planctología / Universidad de Guadalajara, México: 8 – 11.
- Sarma, S. S. S., Corral-Jáquez, F. I., Nandini, S. y Brena-Bustamante, P. 2010. Population level indicators of stress: Effects of two heavy metals (copper and mercury) on the growth of *Lecane quadridentata* (Ehrenberg, 1830) (Rotifera: Lecanidae). *J Env Sci Health A* 45: 32 – 36.
- Sarma, S. S. S., Nandini, S. y Gama-Flores, J. L. 2001. Effect of methyl parathion on the population growth of the rotifer *Brachionus patulus* (O.F. Müller) under different algal food (*Chlorella vulgaris*) densities. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 48: 190-195
- Sarma, S. S. S., Nandini, S. y Stevenson, R. A. A. 1998. Nutritional quality of prey (*Brachionus calyciflorus*) affects the population growth of predatory rotifers (*Asplanchna sieboldii*) (Rotifera). *Hidrobiologica* 8: 73 – 80.
- Segers, H. 2008. Global diversity of rotifers (Rotifera) in freshwater. *Freshwat. Anim. Div. Assessment* 595: 49 – 59.

- Snell, T. W. y Janssen, C. R. 1995. Rotifers in ecotoxicology: a review. *Hydrobiologia* 313, 231–247
- Snell, T. W. y Persoone, G. 1989. Acute toxicity bioassays using rotifers. I. A test for brackish and marine environments with *Brachionus plicatilis*. *Aquatic Toxicology* 14(1): 56 – 80.
- Snell, T. W., B. D. Moffat, C. Janssen & G. Persoone. 1991. Acute Toxicity Tests Using Rotifers IV. Effects of cyst age, temperature, and salinity on the sensitivity of *Brachionus calyciflorus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 21 (3): 308 – 317.
- Stark J. D. y Banks J. E. 2003. Population-level effects of pesticides and other toxicants on arthropods. *Ann. Rev. Entomol.* 48: 505 – 519.
- Van Leeuwen, C. J. y T. G. Vermeire (Eds.). 2007. Risk assessment of chemicals: an introduction. Springer Science & Business Media.
- Vroom, R. J. E., Koelmans, A. A., Besseling, E. y Halsband, C. 2017. Aging of microplastics promotes their ingestion by marine zooplankton. *Environ. Pollut* 231: 987 – 996.
- Wallace, R. L. y Snell, W. T. 2001. Rotifera. In: Thorp, H. y P. Covich (Eds.), *Ecology and classification of North American freshwater invertebrates*. Colorado State University, Department of Fishery and Wildlife. Biology, Fort Collins, EUA
- Wallace, R. L., Snell, W. T. y Nogrady, T. 2006. *Rotifera biology, ecology and systematic*. S. P. B. Academic publishing.
- Wang, F., Yang, W., Cheng, P., Zhang, S., Zhang, S., Jiao, W. y Sun, Y. 2019. Adsorption characteristics of cadmium onto microplastics from aqueous solutions. *Chemosphere* 235: 1073 – 1080.
- Wang, W-X. 2013. Prediction of metal toxicity in aquatic organisms. *Chin Sci Bull* 58: 194–202.
- Wang, Z., Dong, H., Wang, Y., Ren, R., Qin, X. y Wang, S. 2020. Effects of microplastics and their adsorption of cadmium as vector son the cladoceran *Moina monogolica* Daday: Implications for plastic-ingesting organisms. *Journal of Hazardous Materials* 400: 123239.
- Watts, A. J. R., Lewis, C., Goodhead, R. M., Beckett, S. J., Moger, J., Tyler, C. R. y Galloway, T. S. 2014. Uptake and retention of microplastics by the shore crab *Carcinus maenas*. *Environ. Sci. Technol.* 48, 8823 – 8830.

- Weber, C. I. 1993. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. 4th Ed. United States Environmental Protection Agency. Cincinnati, Ohio, EPA/600/4-90/027.
- Wegner, A., Besseling, E., Foekema, E. M., Kamermans, P. y Koelmans, A. A. 2012. Effects of nanopolystyrene on the feeding behavior of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.). Environ. Toxicol. Chem. 31, 2490 – 2497.
- Won, E. J., Han, J., Kim, D. H., Dahms, H. U., & Lee, J. S. (2017). Rotifers in ecotoxicology. In Rotifers (pp. 149-176). Springer, Singapore.
- Wright, D. A. y Welbourn, P. 2002. Environmental toxicology. Cambridge Environmental Chemistry Series, 11.
- Wright, S.L., Rowe, D., Thompson, R.C., Galloway, T.S., 2013. Microplastic ingestion decreases energy reserves in marine worms. Curr. Biol. 23, R1031 – R1033.
- Yang, Q.Q., Li, Z.Y., Lu, X.N., Duan, Q.N., Huang, L. y Bi, J. 2018. A review of soil heavy metal pollution from industrial and agricultural regions in China: Pollution and risk assessment. Sci. Total Environ. 642: 690 – 700.
- Zbyszewski, M. y Corcoran, P. 2011. Distribution and degradation of freshwater plastic particles along the beaches of Lake Huron, Canada. Water Air Soil Pollut. 220: 365.
- Ziajahromi, S., Kumar, A., Neale, P. A. y Leusch, F. D. L. 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.
- Conde-Porcuna, J. M. y Sarma, S. S. S. 1998. Prey selection by *Asplanchna girodi* (Rotifera): the importance of prey defence mechanism. Freshwater Biology 33: 341 – 348.
- Burger, J. 2008. Assessment and management of risk to wildlife from cadmium. Science of The Total Environment, 389(1): 37 – 45.
- Koivisto, S., Arnér, M., y Kautsky, N. 1997. Does cadmium pollution change trophic interactions in rockpool food webs? Environmental Toxicology and Chemistry, 16(6), 1330 – 1336.

Pempkowiak, J., Walkusz-Miotk, J., Bełdowski, J., y Walkusz, W. 2006. Heavy metals in zooplankton from the Southern Baltic. *Chemosphere*, 62(10): 1697 – 1708.

Gama-Flores, J. L., Huidobro-Salas, M. E., Sarma, S. S. S., y Nandini, S. 2017. Four Transgenerational Demographic Performance of *Moina macrocopa* Exposed to Chronic Levels of Cadmium. *Dose-Response*, 15(3) 1 – 8.

Livingstone D. R. 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar Pollut Bull* 42(8): 656 – 666.

Méndez-Armenta, M., y Ríos, C. 2007. Cadmium neurotoxicity. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 23(3): 350 – 358.

Sánchez-Hernández, L. J., Ramírez-Romero, P., Rodríguez-González, F., Ramos-Sánchez, V. H., Márquez Montes, R. A., Romero-Paredes Rubio, H., Sujitha, S. B. y Jonathan, M. P. 2021. Seasonal evidences of microplastics in environmental matrices of a tourist dominated urban estuary in Gulf of Mexico, Mexico. *Chemosphere*, 277: 130261.

Shrutji, V. C., Jonathan, M. P., Rodriguez-Espinosa, P. F., y Rodríguez-González, F. 2019. Microplastics in freshwater sediments of Atoyac River basin, Puebla City, Mexico. *Science of The Total Environment*, 654: 154 – 163.

Yu, Y., Zhou, D., Li, Z., y Zhu, C. 2018. Advancement and Challenges of Microplastic Pollution in the Aquatic Environment: a Review. *Water, Air, & Soil Pollution*, 229(5): 140.

Selvam, S., Jesuraja, K., Venkatramanan, S., Roy, P. D., y Jeyanthi Kumari, V. 2020. Hazardous microplastic characteristics and its role as a vector of heavy metal in groundwater and surface water of coastal south India. *Journal of Hazardous Materials*, 123786.

Liess, M., Henz, S. y Shahid, N. 2020. Modeling the synergistic effects of toxicant mixtures. *Environ Sci Eur* 32, 119.

Na, J., Song, J., Achar, J. C., y Jung, J. 2020. Synergistic effect of microplastic fragments and benzophenone-3 additives on lethal and sublethal *Daphnia magna* toxicity. *Journal of Hazardous Materials*, 123845.

Kang, H. M., Lee, J. S., Lee, Y. H., Kim, M. S., Park, H. G., Jeong, C. B. y Lee, J. S. 2019. Body size-dependent interspecific tolerance to cadmium and their molecular responses in the marine rotifer *Brachionus* spp. *Aquatic Toxicology* 206: 195 – 202.

- Faust, M., Altenburger, R., Boedeker, W., y Grimme, L. H. 1994. Algal toxicity of binary combinations of pesticides. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 53(1): 134 – 141.
- Rehse, S., Kloas, W., y Zarfl, C. 2018. Microplastics Reduce Short-Term Effects of Environmental Contaminants. Part I: Effects of Bisphenol A on Freshwater Zooplankton Are Lower in Presence of Polyamide Particles. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(2): 280.
- Sarma, S. S. S., Corral-Jáquez, F. I., Nandini, S. y Brena-Bustamante, P. 2010. Population level indicators of stress: Effects of two heavy metals (copper and mercury) on the growth of *Lecane quadridentata* (Ehrenberg, 1830) (Rotifera: Lecanidae). *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 45(1): 32 – 36.
- Dahms, H.-U., Hagiwara, A. y Lee, J.-S. 2011. Ecotoxicology, ecophysiology, and mechanistic studies with rotifers. *Aquatic Toxicology* 101(1): 1 – 12.
- Bervoets, L., Van Campenhout, K., Reynders, H., Knapen, D., Covaci, A., y Blust, R. 2009. Bioaccumulation of micropollutants and biomarker responses in caged carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72(3): 720 – 728.
- Altenburger, R., Boedeker, W., Faust, M., y Grimme, L. H. 1996. Regulations for combined effects of pollutants: Consequences from risk assessment in aquatic toxicology. *Food and Chemical Toxicology* 34(11-12): 1155 – 1157.
- González-Pérez, B. K., Sarma, S. S. S., Castellanos-Páez, M. E., y Nandini, S. (2018). Multigenerational effects of triclosan on the demography of *Plationus patulus* and *Brachionus havanaensis* (ROTIFERA). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 147: 275 – 282.
- Gama-Flores, J. L., Castellanos-Páez, M. E., Sarma, S. S. S., y Nandini, S. 2007. Effect of pulsed exposure to heavy metals (copper and cadmium) on some population variables of *Brachionus calyciflorus* Pallas (Rotifera: Brachionidae: Monogononta). *Hydrobiologia* 593(1): 201 – 208.
- Roex, E. W. M., Van Gestel, C. A. M., Van Wezel, A. P., y 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.

- García-García, G., Reyes-Carrillo, G. I., Sarma, S. S. S. y Nandini, S. 2017. Population level responses of rotifers (*Brachionus calyciflorus* and *Platyonus patulus*) to the anti-diabetic drug, metformin. *Journal of Environmental Biology*, supl. Special Issue 38(6): 1213 – 1219.
- Guo, R., y Chen, J. 2015. Assessing the impacts of dimethoate on rotifers' reproduction through the pre-exposure history. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 111: 199 – 205.
- Zhang, X., Tang, X., Yang, Y., Sun, Z., Ma, W., Tong, X., Wang, C. y Zhang, X. 2021. Responses of the reproduction, population growth and metabolome of the marine rotifer *Brachionus plicatilis* to tributyl phosphate (TnBP). *Environmental Pollution*, 273: 116462.
- Xiao-Ping, X., Yi-Long, X. y Xing-Ming, W. 2019. Effects of DDT and Dicofol on life table demography of the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus* Pallas. *Pol. J. Environ. Stud.* 29(2): 1945 – 1951.
- Coppock, R. L., Galloway, T. S., Cole, M., Fileman, E. S., Queirós, A. M., y Lindeque, P. K. 2019. Microplastics alter feeding selectivity and faecal density in the copepod, *Calanus helgolandicus*. *Science of The Total Environment*, 687, 780–789.
- Dong, M., Luo, Z., Jiang, Q., Xing, X., Zhang, Q. y Sun, Y. 2020. The rapid increases in microplastics in urban lake sediments. *Sci Rep*: 10, 848.
- Andrade, M. A., Carrasco M. M., Ortíz, R., Ibarra, M. R., Carmona, J. y Bonilla, P. 2015. Amibas de vida libre y potencialmente patógenas de ríos de la Cuenca de México. En: Alcocer, J., Merino-Ibarra, M. y Escobar-Briones, E. (Eds.). *Tendencias de Investigación en Limnología Tropical* (pp 115 – 122). *Perspectivas Universitarias en Latinoamérica*. Eds.
- Bonilla-Lemus, P., Caballero Villegas, A. S., Carmona Jiménez, J., y Lugo Vázquez, A. 2014. Occurrence of free-living amoebae in streams of the Mexico Basin. *Experimental Parasitology*, 145, S28 – S33.