



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

**Efecto de microplásticos de Acrilonitrilo Butadieno
Estireno (ABS) sobre la tabla de vida de *Daphnia pulex*
Linnaeus, 1758**

TESIS

Que para obtener el título de

Licenciado en Biología

PRESENTA:

Jesus Ismael Briceño Torres

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Diego de Jesus Chaparro Herrera



Los Reyes Iztacala EDO. DE MEX. 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria

Por todo tu esfuerzo, por toda tu dedicación, por todo tu entusiasmo y las ganas de salir adelante, por luchar contra tus sombras que te hacían dudar todos los días y te hacían preguntarte si estabas en el lugar correcto; por vencer tu más grande miedo, tú mismo, por tu perseverancia y tu fe.

A ti, recuerda que este trabajo, este proceso, este momento y espacio es resultado nada más y nada menos que de tus decisiones, disfrútalo como nunca has disfrutado de una victoria, gózalo de manera activa, no temas ni te acobardes, sé fuerte y valiente, siempre

Y, por último, quiero que recuerdes esta victoria como muestra de que puedes hacer todo lo que te propongas, que fuiste capaz de vencerte a ti mismo, tus miedos e inseguridades, comodidades y conformismos, recuerda siempre hacer las cosas mejor, mejor que el día anterior; recuerda la diferencia entre querer ser e intentar ser, y también recuerda, “todo antes, después ni lamentarse”.

A MIS PADRES

Quiero que sepan que este trabajo de investigación, y no sólo de manera física y temporal, si no también todo lo que significa, todo lo que conlleva, es gracias a ustedes, gracias a su formación y valores, gracias a todas las pláticas, consejos, llamadas de atención, pero, sobre todo, a todo el amor y cuidado que siempre me brindaron, y por supuesto a estos genes que me siento orgulloso de portar, sé que en mi ser llevo lo mejor de ustedes y pretendo siempre que todo lo que pueda expresar refleje a los excelentes padres que hay detrás, delante y junto a mí, los amo mamá y papá.

Agradecimientos

No temas, porque yo estoy contigo; no desmayes, porque yo soy tu Dios que te esfuerzo; siempre te ayudaré, siempre te sustentaré con la diestra de mi justicia.

Isaías 41-10

Gracias por poner en mi corazón los deseos y la voluntad de servir desde lo más pequeño hasta lo más grande de tu creación, por poner en mi corazón el ímpetu y la gran necesidad de saber, de saber ¿qué es? ¿cómo funciona? ¿para qué sirve? y gracias por poner en mi corazón el poder maravillarme con cada nuevo aprendizaje, maravillarme viendo cómo el sol atraviesa las ramas y las hojas de un árbol en la facultad y en el campo, maravillarme de poder entender la complejidad de las interacciones entre seres vivos y factores abióticos con los mismos, gracias por la oportunidad de maravillarme al ver una raya águila en su ambiente natural, por cada átomo, cada célula, cada tejido, organismo, población, comunidad y ecosistema, gracias por la carrera de Biología, y, aunque mucho tiempo tuve la incertidumbre de estar o no en el lugar correcto, tú siempre lo supiste, Gracias por todo.

A mi mamá y a mi papá, no existen palabras y tampoco cantidad de ellas para poder expresar cuán agradecido y el amor inmenso que siento por ustedes, desde que inició mi proceso dentro de esta facultad (y mucho antes por supuesto) me alentaron, me motivaron, y me obligaron a dar lo mejor de mí, a nunca rendirme, a siempre ir hacia delante, y si era para atrás, solo para tomar vuelo, a realizar todo lo necesario antes de los acontecimientos, porque después, ni lamentarse, gracias por preocuparse por mí cada vez que llegaba triste, cansado, agobiado y siempre recetarme unas inyecciones para el sistema nervioso, aunque nunca las quisiera, gracias por manufacturar todos aquellos aparatejos y curiosidades que la carrera demandaba, nadie nunca tuvo mejores herramientas, no sólo por la excelente hechura, sino también porque estaban hechas con el amor más grande que existe y cada que los veía o los usaba (o me los chuleaban) podía escuchar los “te quiero”

más grandes y poderos que nadie nunca escuchó jamás, por darme siempre todo lo que necesito, por reconocer en mí lo que muchas veces me costó tanto trabajo verlo en mí mismo, y gracias porque tengo lo mejor de los dos, la inteligencia, los valores, y mucho, mucho más. Los amo.

A mis hermanos, Sac y Gabrielush, porque siempre has sido mis confidentes y mi apoyo, cada que necesito y me pueden ayudar me ofrecen su tiempo, sus habilidades, y todos y cada uno de los días tengo la certeza de su cariño, con las risas y sonrisas que me sacan cuando voy caminando por la calle y leo alguno de los memes que envían al grupo, cada que esperan con ansias a que llegue a la casa para platicarme algún chisme, porque muchas veces saben más de mí que yo mismo y me ayudan a verlo, y por todo su interés y sorpresa cuando después de aprender algo nuevo en la universidad corría a contárselos y ustedes con la misma admiración y sorpresa me escuchaban, por alentarme a continuar con este camino cuando muchas veces me encontraba ahogándome en mi vaso de agua, porque son los mejores amigos y hermanos que alguien pueda tener, porque sé que cuento con ustedes siempre y para siempre.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por acogerme, cuando era mi más grande anhelo, mi más grande deseo, cuando hice todo lo posible y deje de hacer muchas cosas por asegurar el éxito, entrar a la más grande casa de estudios; por impregnar mi corazón y mi piel con tus colores, por volverme parte de una de las mejores universidades mexicanas y de Latinoamérica, por darme el sentido de pertenencia, sentido del que soy orgulloso portador, por poder entonar un “Goya” desde el alma y desde el corazón.

A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, por ser mi segunda casa, un refugio cuando no hay otro lugar al que pueda ir, un templo cuando delante de tu entrada principal tan imponente me plantaba antes de comenzar las clases, por ser de mis lugares favoritos, un lugar para bailar y reír, aprender, descansar en cualquiera de tus “pastos” y, sobre todo, maravillarme de existir una escuela tan bella, la mejor; aquí conocí a las mejores personas de las que puedo dar fe, personas que me enseñaron lo que les apasiona, y personas que me cobijaron, que se convirtieron

en colegas, amigos, por esos amores, algunos tan fugaces y otros que serán eternos.

Daniela Diaz, mi mejor amiga, por mi tesoro máspreciado. Mi relación con Dios (A ti que sabes que tan importante es para mí y para ti y sabes que es el mayor regalo que alguien pudiera dar y recibir jamás) y tu amistad, por estar ahí siempre y en cada momento, por tus oraciones que sé que son aquellas que Dios más escucha, por ser mi alfa y mi omega, porque a pesar del tiempo y la distancia siempre seremos amigos tú y yo.

Erika, por ser la persona más increíble que pude conocer en la carrera, porque fue por ti que pude superar innumerables pruebas a lo largo de tanto tiempo que estuvimos juntos, y aun ahora por todo lo que me enseñaste y a todo lo que me demuestras con tu valentía y tu fuerza es que quiero salir adelante y ser mejor cada día, por todos los abrazos que parecían detener el tiempo y que alejaban todos los conflictos que teníamos, por todas las comidas que probamos y todos los lugares nuevos que conocíamos juntos, aun en horas de clase, por todas las pláticas eternas cuando nos encontrábamos atorados alguna noche de regreso a nuestras casas, por todo el cariño y todo el amor que jamás volveré a experimentar, nunca de la misma manera como tú me lo demostrabas, por todas las veces que fui inmortal gracias a alguno de tus textos que con tanta destreza y pasión elaborabas, sé que tal vez no se pueda comparar este pequeño fragmento, este pedazo de muro a comparación de tantos castillos que tú hiciste, pero quiero que sepas que también serás inmortal en mi corazón y nadie nunca le va a ganar a eso.

Fanny, aprendí a poder decir en voz alta te quiero, te amo, aprendí por tu forma de ser tan encantadora y dulce a dar todo de mí, a pensar tanto en los demás incluso por encima de mí mismo, a dar hasta la última gota de dolor y también de amor por quien no me conocía, a amar hasta el dolor, tú me enseñaste el valor de la amistad, a ti, por todas las veces que estuviste a mi lado a pesar de mi pésima actitud, a pesar de mi cara, a pesar de la terrible persona que puedo llegar a ser, tú nunca te cansaste y siempre me recibías con una taza de café y con la sonrisa más linda y el abrazo más cálido que alguien pudiera ofrecer, tú secaste mis lágrimas y me

sacaste las carcajadas que hacían perder la noción del tiempo, pude compartir contigo tantas y tantas cosas, y te mostrabas tan emocionada e insistente cuando regresando de la escuela me preguntabas acerca de mi día y los nuevos aprendizajes y conocimientos, y me elevabas a la posición más alta en la que cualquier ser humano pudiera estar, diciéndome que al final podría ser yo quien remediara una de las situaciones más tristes y complicadas de la humanidad, por todo eso y más, por todos los detalles tan minuciosamente elaborados con tus manos, por todos los mensajes por todos los medios posibles, por ser mi mejor team, #Y&F, porque a través de ti pude ver la cara más amorosa de Dios, a través de su más grande y amoroso instrumento, por tanto y tanto amor.

A mis profesores. Al Dr Diego de Jesus Chaparro Herrera, por abrirme las puertas de su laboratorio, de su confianza, por demostrar que se puede ser joven para siempre inmortalizándose en el corazón de todos sus alumnos, por toda su ayuda, por todo su tiempo, por todos sus aprendizajes. A la Dra Yolanda Irasema Chirino López, por enseñarme que la perfección existe a través de la responsabilidad y el trabajo duro y que la excelencia es fácil de alcanzar, que sólo es cuestión de un poco más de esfuerzo. A la Dra Normita, por ser un ángel siempre, porque demuestra que la alegría, el amor y el sacrificio, pueden apreciarse dentro de los laboratorios con las más altas exigencias, por siempre estar al pendiente de todos sus alumnos a pesar de todo el trabajo. A Ingrid, por convertirse en mi madre académica, por enseñarme las mejores prácticas dentro de un universo que me encanta, el laboratorio, por no desistir a pesar de mis tropiezos y estar al pendiente a pesar de estar del otro lado del mundo. A Carito, porque tus risas, tu sonrisa y tu buen humor alegraban siempre mis mañanas, por tus palabras de aliento y por enseñarme un sinfín de técnicas y procedimientos, por ser un ser humano tan lindo. A Alex y Torna por ser mis pokeamigos. A la Mtra Sanabria por ser una madre, estricta pero amorosa, por sus palabras de aliento. A la Mtra Deny por que encontré mi lugar cuando me sentía perdido, por su plática tan cálida, por su ternura y su amabilidad. A tantos profesores que compartieron conmigo todos sus conocimientos, su tiempo, y a pesar de que un gran número de ellos nunca van a leer estas palabras, quiero que este espacio siempre me recuerde el trabajo tan

grande y tan importante que tantas personas están dispuestas a hacer por otras, por el futuro de México, por mantener en alto el nombre de la UNAM y que siempre me recuerde que permanecerán, en primera instancia, en mi cabeza, en forma de conocimientos y habilidades, y en mi corazón, ya que al compartir un tiempo y un espacio con todos ustedes el aprendizaje no sólo se vuelve un proceso intelectual, si no, risas, experiencias únicas, sensaciones desagradables, anécdotas, se vuelven parte de mí.

A Naye, Estoy totalmente convencido de que Dios te puso en el momento y en el lugar correcto, cuando me estaba desmoronando, pero fue tu amabilidad y tu buena voluntad, tu cariño y tu compañerismo lo que me permite este día poder tener un proyecto de titulación que amo.

Al proyecto PAPIIT IA209118 por el apoyo económico brindado para la culminación de este proyecto de investigación.

... GRACIAS.

INDICE		
	Dedicatorias	2
	Agradecimientos	3
	Índice	8
	Resumen	10
	Abstract	12
1	Introducción	14
2	Antecedentes	18
3	Justificación	23
4	Hipótesis	24
5	Objetivos	25
6	Material y Métodos	26
6.1	Cultivo de Zooplancton	26
6.2	Obtención de Microplásticos	26
6.3	Exposición de <i>D. pulex</i> a microplásticos	26
6.4	Evaluación del efecto toxico del plástico fragmentado ABS sobre la dinámica poblacional	27
6.5	Análisis de microplásticos en el tracto digestivo de <i>D. pulex</i>	28
6.6	Análisis de fluorescencia de microplásticos	28
6.7	Análisis estadístico de los valores de la tabla de vida demográfica	28
	Esquema de material y métodos	30
7	Resultados	31
7.1	Evaluación de la supervivencia, fecundidad y esperanza de vida en la tabla de vida de <i>D. pulex</i>	31
7.2	Análisis Demográfico	37

7.3	Análisis de la ingesta de microplásticos de ABS dentro del tracto digestivo de <i>D. pulex</i> mediante microscopio estereoscópico	43
7.4	Análisis de ingesta de microplásticos por fluorescencia	46
8	Discusión	49
9	Conclusiones	56
10	Literatura citada	57
11	Anexos Análisis estadísticos	63

Efecto de micro plásticos de Acrilonitrilo Butadieno Estireno (ABS) sobre la tabla de vida de *Daphnia pulex* Linnaeus, 1758

Resumen

Los plásticos una vez terminada su vida útil llegan al ambiente en donde sufren fragmentación, reduciendo su tamaño a niveles nanométricos, contaminando diferentes ecosistemas entre ellos los acuáticos. Uno de los plásticos que más problemas presenta en ambiente acuático es el polímero ABS (Acrilonitrilo-Butadieno-Estireno). Las partículas del polímero ABS pueden acumularse en tracto digestivo y otros órganos, atrofiando procesos como la nutrición y reproducción, en los niveles tróficos basales como en el zooplancton. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la contaminación producida por micro plásticos de ABS en *Daphnia pulex* (Cladóceras). Esto se llevó a cabo con recipientes de vidrio de 50 ml en los cuales se introdujeron 10 individuos (*D. pulex*) en medio de cultivo (EPA) esto como unidad experimental, se realizaron 4 repeticiones por tratamientos los cuales fueron: grupo control (0); 200 y 300 µg/L de microplásticos ABS. Se realizó un estudio de tabla de vida para evaluar supervivencia, fecundidad y esperanza de vida, con ayuda de un microscopio estereoscópico, así mismo se observaron algunos organismos para corroborar la ingesta de las partículas de ABS. En los resultados se observó que en el grupo control presentó una supervivencia típica (Tipo I), donde el 80% de la población inicial se mantuvo viva hasta el día 10 y decayendo continuamente hasta el día 25, mientras que en las concentraciones de 200 y 300 µg/L se observó un comportamiento lineal (Tipo II) teniendo un decremento en la supervivencia de manera constante desde el día 1 hasta el día 30. En el caso de la fecundidad, el grupo control tiene un comportamiento típico, ciclos repetidos a lo largo del experimento (2 neonatos/hembra), mientras que en las concentraciones de 200 y 300 µg/L la fecundidad es similar con valores que oscilan entre 0 y 2 neonatos/hembra con respecto al grupo control, hasta los últimos 5 días del experimento donde hay un aumento drástico de la fecundidad llegando a valores de 8 y 10 neonatos/hembra (200 y 300 µg/L respectivamente), en el caso de la esperanza de vida las concentraciones de 200 y 300 µg/L presentaron una

esperanza de vida más prolongada, llegando hasta el día 30 en comparación con el grupo control (25 días). Para el caso de las observaciones en microscopio estereoscópico se identificaron micropartículas de ABS en los tractos digestivos de los cladóceros expuestos en las concentraciones de 200 y 300 µg/L. En conclusión, se observa que existe un efecto negativo y de estrés, provocado por el micro plástico de ABS en *D. pulex*, y baja fecundidad.

Abstract

Plastics once finished their useful life reach the environment where they suffer fragmentation, reducing their size to nanometric levels, contaminating different ecosystems including aquatic ones. One of the plastics that presents the most problems in an aquatic environment is the ABS polymer (Acrylonitrile-Butadiene-Styrene). ABS polymer particles can accumulate in the digestive tract and other organs, atrophying processes such as nutrition and reproduction, at basal trophic levels such as zooplankton. The objective of this work was to evaluate the effect of the contamination produced by micro ABS plastics in *Daphnia pulex* (Cladocera). This was carried out with 50 ml glass containers in which 10 individuals (*D. pulex*) were introduced into culture medium (EPA) this as an experimental unit, 4 repetitions were performed for treatments which were: control group (0); 200 and 300 $\mu\text{g} / \text{L}$ of ABS microplastics. A life table study was carried out to evaluate survival, fertility and life expectancy, with the help of a stereoscopic microscope, and some organisms were observed to corroborate the intake of ABS particles. In the results it was observed that in the control group it presented a typical survival (Type I), where 80% of the initial population remained alive until day 10 and decaying continuously until day 25, while in the concentrations of 200 and 300 $\mu\text{g} / \text{L}$ a linear behavior (Type II) was observed having a decrease in survival steadily from day 1 to day 30. In the case of fertility, the control group has a typical behavior, repeated cycles at throughout the experiment (2 infants / female), while in the concentrations of 200 and 300 $\mu\text{g} / \text{L}$ the fertility is similar with values ranging between 0 and 2 infants / female with respect to the control group, until the last 5 days of the experiment where there is a dramatic increase in fertility reaching values of 8 and 10 neonates / female (200 and 300 $\mu\text{g} / \text{L}$ respectively), in the case of life expectancy concentrations of 200 and 300 $\mu\text{g} / \text{L}$ presented a life expectancy longer, reaching up to day 30 compared to the control group (25 days). In the case of observations under stereoscopic microscopy, ABS microparticles were identified in the digestive tracts of the cladoceres exposed in the concentrations of 200 and 300 $\mu\text{g} / \text{L}$. In conclusion, it is observed that there is a negative and stress effect, caused by the micro ABS plastic in *D. pulex*, and low fertility.

1. Introducción

"Sí, en efecto, los microplásticos ya han entrado a la cadena alimenticia en todos aquellos sitios en donde la gente quema la basura."

Dra. Esperanza Huerta Lwanga

En entrevista para Agencia Informativa CONACyT,
Microplásticos contaminando el alimento de los mexicanos,
Ciudad de Mexico, 27 de enero del 2018

El plástico es un material inorgánico compuesto a base de carbono y presenta moléculas de cadenas largas, por consiguiente también se puede referir a ellos como polímeros. Debido a su gran versatilidad y maleabilidad se ha extendido y diversificado el uso de estos polímeros, desde pequeños componentes hasta productos más grandes como, bolsas, embalaje, tela y/o cosméticos (Góngora, 2014; Chang, 2015). En 1950 inicio la producción de plástico, esto ha ido en aumento constante, teniendo producciones históricas en 2012 y 2016 (288 y 335 millones de toneladas respectivamente), esta producción representa un sin número de residuos (PlasticsEurope, 2018). Durante un largo periodo, los plásticos han sido el centro de atención, no obstante, desde el año 2000, se observó que fragmentos pequeños de plástico como fibras o gránulos (microplásticos) eran contaminantes de los sistemas acuáticos (Cole et al, 2011).

Entre los plásticos que se producen comúnmente son: Tereftalato de polietileno (PET), Polipropileno (PP), Poliestireno (PS), Polietileno (PE), Policloruro de vinilo (PVC), Poliuretano (PUR), Resinas epoxi, Poliéster no saturado, entre muchos otros (GESAMP, 2015). La mayoría de estos plásticos presentan vidas útiles muy cortas (minutos u horas), y muchos no son reciclables, terminando como residuos, dando como resultado la contaminación por plástico, siendo este un problema muy fuerte, y que va en aumento cada día (PlasticsEurope, 2018). Al terminar su vida útil, los plásticos sufren deterioro y fragmentación (Intemperismo), causando la diseminación de partículas y la aparición de micro y nano plásticos.

Por su tamaño los plásticos se dividen en nano, micro y meso. El término nanoplásticos se refiere a aquellas partículas que miden entre 1 y 100 nm, micro

plásticos a partículas de 0.1 μm (1000 nm) a 5000 μm y meso plásticos a todos los materiales de más de 5 mm (PlasticsEurope, 2018). Los microplásticos se dividen en dos grupos principales: los microplásticos primarios que son fabricados intencionalmente para tener un tamaño en concreto; mientras que los plásticos secundarios son el resultado del deterioro de materiales inicialmente más grandes. Ejemplos de micro plásticos primarios son: gránulos, polvos y microesferas para uso industrial o cosmético (Zitko & Hanlon, 1991), que, al ser vertidos en sistemas acuáticos quedan disponibles para ser consumidos por los consumidores primarios de las redes tróficas causándoles afecciones como obstrucción de tractos respiratorios o digestivos además de movilidad (Lima et al., 2015). De los organismos que se ha comprobado la ingesta de microplásticos tenemos a los invertebrados, *Daphnia magna* (Cladópera), *Gammarus pulex* (Anfípoda), *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta), *Notodromas monacha* (Ostracoda) (Hoellein et al., 2014; Imhof et al., 2013; Rosenkranz et al., 2009); así como en diferentes especies de peces, como: *Cathorops spixii*, *Cathorops agassizii*, *Sciades herzbergii* (Erkes-Medrano et al., 2015; Possatto et al., 2011).

Otros organismos afectados por la ingesta de microplásticos son los peces, que de acuerdo con Lusher, Holmann & Mendoza (2017) ~50% de las especies de importancia piscícola a nivel mundial se les ha detectado microplásticos, por lo que este problema ha causado estragos en la salud humana y la economía por bajar la calidad de los alimentos. Por lo tanto, se ha comenzado a plantear un problema emergente en materia de salubridad y seguridad alimentaria, debido a que la toxicidad de los plásticos que contaminan los ambientes acuáticos, no han sido evaluados por los comités científicos internacionales.

El conocimiento que se tiene a cerca de los microplásticos en cuerpos dulceacuícolas como lagos o ríos es mucho menor al que se tiene en sistemas marinos, sin embargo, en los últimos años, estudios han demostrado la presencia de microplásticos (<5 mm) en cuerpos de agua en Norteamérica, Europa y Asia, siendo de los plásticos más abundantes el polietileno, el polipropileno y el poliestireno a través de las aguas residuales domésticas, los microplásticos de

origen industrial como polvos, gránulos de resinas como microplásticos primarios y microplásticos secundarios como resultado de la degradación de macroplásticos. En cuanto a los efectos que la presencia y la ingesta de microplásticos tienen sobre los organismos, aun no se encuentra bien descritos, por lo que se necesitan esfuerzos por detallar cada uno de ellos, tanto en vertebrado como invertebrados dulceacuícolas, sin embargo, se sabe que dichos efectos tienen una gran semejanza con los producidos en organismos marinos (Eerkes-Medrano et al., 2015).

Se sabe además que algunos monómeros de plástico están asociados con procesos cancerígenos al crear depósitos en tejidos sin poder eliminarse (granulocitoma) (Auta et al., 2017 & Von Moos et al., 2012) o producir otro tipo de toxicidad si son ingeridos, aunado a esto se sospecha que muchos aditivos plásticos pueden inducir desórdenes a nivel endocrino y los contaminantes tóxicos absorbidos por los plásticos pueden liberarse y bioacumularse (Meeker et al., 2009 y UNEP, 2008). Algunas autoridades científicas internacionales como el JECFA, han realizado evaluaciones exhaustivas sobre la toxicidad potencial a la luz de los nuevos datos científicos generados. Este complejo proceso de evaluación es clave para todas las fases que incluye el análisis de riesgos (evaluación de riesgos, gestión de riesgos y comunicación de riesgos). Los avances que han tenido lugar en materia de nanotoxicología desde principios de siglo, sugieren que se pueden estar diseminando en el medio ambiente nanopartículas capaces de penetrar en los tejidos de los seres vivos y acumularse con efectos desconocidos. La mayoría de los restos de plásticos que se localizan en las zonas de acumulación corresponden a los materiales más utilizados, siendo polietileno, polipropileno y poliestireno los más frecuentes en los muestreos de diferentes investigaciones (Lusher, Holmann & Mendoza, 2017).

Se ha reportado que los micoplásticos se acumulan en el tracto digestivo de peces (marinos y epicontinentales), crustáceos, equinodermos y bivalvos, estos últimos de mayor preocupación porque consumimos el organismo entero con todo y tracto gastrointestinal (EFSA, 2016) De los reportes de sobre concentración de

microplásticos en mejillones tenemos que países Europeos reportan menos de 0.5 partículas/g de mejillones, mientras que China reporta niveles altos de con un valor de 4 partículas/g (EFSA, 2016)

Además de los vertebrados y macroinvertebrados, el estudio de toxicidad en el grupo del zooplancton es de vital importancia ya que estos se sitúan en el primer eslabón de flujo de energía entre los productores primarios, y los niveles energéticos superiores, además de aporta nitrógeno y fósforo al medio acuático a través de su excreción (Acosta, 2005). En el caso particular de *D. pulex*, es un excelente modelo para realizar pruebas en toxicología de microplásticos ya que es una especie cosmopolita de sistemas epicontinentales, presentar ciclos de vida cortos (30 días), de fácil mantención en laboratorios y fácil mantención en los mismos y tener hábitos filtradores generalistas, además de que es un modelo comúnmente usado en ensayos toxicológicos de otros compuestos (SARMA 2006).

2. Antecedentes

Se realizó una búsqueda de trabajos relacionados a microplásticos en sistemas acuáticos (marinos y continentales) de México (Figura 1), ya que la situación de la investigación en México es muy particular al tener líneas de costa tanto en el Este como en el Oeste, y un sin número de cuerpos de agua continentales, con todo lo anterior debería de ser un país a la vanguardia en cuanto a investigación en campos como contaminación acuática y mayormente por microplásticos en ambientes acuáticos, además de investigaciones del efecto de estos microplásticos en grupos de suma importancia como lo es el plancton, sin embargo, después de realizar búsquedas en la base de datos de PubMed, solo se encontraron tres trabajos realizados en México y relacionados con los microplásticos en ambientes marinos a pesar de la gran cantidad de artículos que se han publicado.

El primer trabajo publicado en 2016 a cargo del Instituto Politécnico Nacional (Retama et al, 2016), en el que demuestran la presencia de microplásticos en los sedimentos en zona de playa seca de la bahía turística de Huatulco, el segundo en el mismo año en donde observan los efectos negativos de los microplásticos en macrofauna marina (ballenas) desde alteraciones en fracciones de ADNmt hasta la detección de aditivos plásticos (ftalatos), compuestos organoclorados y respuestas de biomarcadores y peroxidación lipídica comparando el Mar Mediterráneo y el Mar de Cortés, encontrando una mayor concentración de microplásticos en el mar mediterráneo en comparación con el mar de Cortés (Fossi et al, 2016) y por último en 2018 una investigación a cargo de la Universidad Autónoma de Baja California demuestra la presencia de microplásticos en playas arenosas del Mar de Cortés siendo estas de 135 +/- 92 partículas kg⁻¹ y la forma de fibras la más abundante que comprende el 91% de todos los microplásticos analizados (Piñon-Colin et al, 2018).

Respecto a cuerpos de agua de ambientes dulceacuícolas, Shruti y colaboradores (2019) detectaron microplásticos en el sedimento de la cuenca del Rio Atoyac, Puebla, México. A pesar de que son escasos los trabajos la problemática de los microplásticos es grave y se puede percibir con los más de 2000 resultados que se

generan de investigaciones de Estados Unidos hechas en la parte norte del Golfo de México, por lo que se precisa urgente el desarrollo de más investigaciones en el campo de los microplásticos en ambientes marinos y dulceacuícolas.

Por otro lado reportes fuera de la región Maiju Lehtiniemi y colaboradores (2018) observaron la ingesta de microplásticos primarios (manufacturados) y secundarios (producto de la degradación) siendo Poliestireno el plástico primario y PET y ABS los secundarios, estos microplásticos fueron ofrecidos a planctívoros pequeños (peces y camarones) junto con su comida habitual. Los resultados de esta investigación arrojaron que todos los organismos dentro del experimento mostraron microplásticos en el contenido estomacal y que los plásticos secundarios más comúnmente presentes fueron los fragmentos de ABS (encontrados en el 75% de los camarones), se encontraron fragmentos de ABS en el 100% de los organismos usados en el tratamiento de la mezcla de los microplásticos, además de que fueron los fragmentos mayormente encontrados en camarones (15 fragmentos de ABS en un solo individuo).

Algunos otros puntos relevantes de esta investigación fueron que el 8% de los camarones también habían ingerido fibras plásticas, aunque estas no se ofrecían intencionalmente en los experimentos, los plásticos primarios fueron ingeridos en el 50% de los camarones sin embargo mencionan que se ha observado un incremento proporcional al aumento de las concentraciones únicamente en microplásticos primarios y no corresponde el aumento en microplásticos secundarios, en adición, exhortan a que las investigaciones futuras se centren en microplásticos secundarios y en concentraciones más cerca de las condiciones naturales como sea posible.

En cuanto a investigaciones internacionales existen trabajos relevantes para esta investigación como es el caso de LeMoine y colaboradores (2018) los cuales evaluaron el impacto de altas concentraciones de microplásticos de polietileno (5 y 20 mg/L) en las primeras etapas del pez cebra evaluando principalmente secuencias de ARN, observando acumulación en el tracto gastrointestinal, además de cambios transitorios y extensos en las expresiones de genes larvales.

En el caso de micro crustáceos, Jemec y colaboradores en 2016 emplearon fibras textiles de PET desde 62-1400 μm para ver los efectos en *D. magna* después de una exposición aguda (48 h) y posterior a un tiempo de recuperación (24 h) mostrando que el tamaño promedio ingerido de fibras era de 300 μm sin embargo se encontraron fibras hasta de 1400 μm dentro de las Daphnias, además de observar un decremento en la supervivencia de los organismos y se observó que no hubo recuperación después de 24 h libres de los microplásticos.

Rosenkranz y colaboradores en el 2009 evaluaron la absorción, acumulación y la depuración de poliestireno carboxilado en dos tamaños diferentes (20 y 1000 nm) sobre el cladóceros *D. magna* encontrando una rápida acumulación en el tracto gastrointestinal después de una hora de exposición tanto en adultos como en neonatos, además de evidencia de que los microplásticos cruzaron la barrera epitelial intestinal, en el caso de la depuración fue del 90% para las partículas de 1000 nm y 40% para las de 20 nm.

En el caso de la micro y nanotecnología también existen registros de toxicidad en otros materiales como el dióxido de titanio, como el estudio publicado por Clement y colaboradores en el 2013 en donde se realizó una prueba de toxicidad aguda de 48 y 72 horas, mostrando toxicidad dosis dependiente, también en el caso de Hamilton y colaboradores en el 2009 que, aunque no utilizan un modelo en plancton, demuestran las severas consecuencias de las nanopartículas de TiO_2 sobre macrófagos pulmonares.

Otros factores que pueden influir en la dinámica poblacional del género *Daphnia* es la temperatura y la alimentación y estos efectos se ven exacerbados cuando existen contaminantes como el cadmio, tal es el caso del artículo publicado por Heugens y colaboradores en el 2006 en el que se demuestra que incluso en condiciones favorables de temperatura existe un decremento en la supervivencia de la población cuando hay un contaminante en el ambiente (cadmio).

Setälä y colaboradores en el 2014 demostró la capacidad de transferencia de las microesferas de poliestireno de organismos de un mismo un taxa, con una

exposición inicial de 12 horas a los microplásticos, la red de transferencia se vio en organismos como poliquetos, camarones, cladóceros, y rotíferos.

LAJUS y colaboradores en el 2004 evaluaron la plasticidad fenotípica de *Daphnia pulex* y los cambios morfológicos tanto en adultos como en neonatos sometidos a diferentes condiciones de luz y oscuridad, encontrando que los cambios de duración del día solo explica del 1-2% de la variación fenotípica, mientras que la inestabilidad del desarrollo explica del 98-99% de la variación fenotípica debido a esto la contribución de la inestabilidad del desarrollo a la variación fenotípica debe considerarse al estudiar rasgos fenotípicos.

Weber y colaboradores en el 2018 probaron la toxicidad de fragmentos (microplásticos) irregulares de PET fluorescente en individuos juveniles y adultos de *Gammarus pulex* durante 24 horas y 48 días, demostrando que en el primer periodo la ingesta de microplásticos depende de la concentración y de la edad ya que los juveniles consumen más que los adultos, sin embargo al termino del experimento se demostró que los microplásticos no afectaron significativamente la supervivencia, el desarrollo, el metabolismo y la actividad alimentaria, esto atribuido a la variación en los regímenes de exposición, características plásticas, así como los rasgos morfológicos, fisiológicos y de comportamiento específicos de la especie.

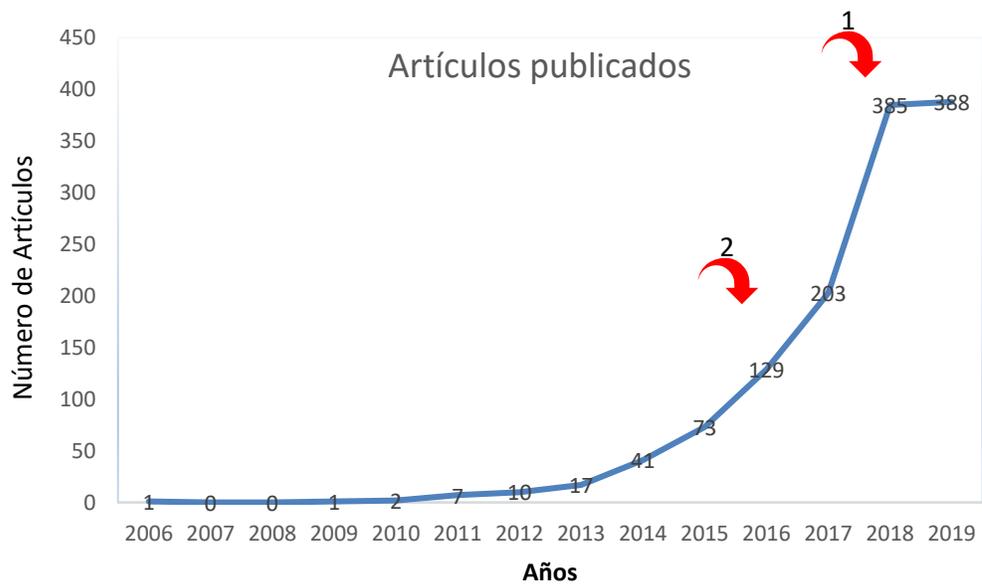


Figura 1: Número de artículos publicados por año relacionados con microplásticos (Datos obtenidos de la base de datos de PubMed) artículos mexicanos marcados con flechas rojas.

3. Justificación

La obtención y asimilación de energía es un proceso vital para todos los seres vivos y el proceso por el cual lo hacen crea una compleja red de interacciones, que a lo largo de las historias evolutivas y de competencia todos los organismos han encontrado un nicho que permanece en equilibrio, hasta que factores externos como la contaminación, producto de las actividades humanas, alteran este estado de “equilibrio”, uno de los contaminantes emergentes más comunes son los diferentes tipos de polímeros o plásticos, que en la actualidad podemos encontrar en diferentes ambientes siendo los ecosistemas acuáticos de los más afectados, desde los ríos que acarrean los diferentes plásticos terminando en cuerpos de agua más grandes como los lagos principalmente.

Estos plásticos son depositados en diferentes tamaños por el proceso de intemperismo volviéndolos “disponibles” para su consumo y peligroso para los consumidores primarios, porque el consumo de plástico en los eslabones primarios de las redes tróficas podría acarrear consecuencias al resto de los niveles de la trama trófica, dañando a los últimos consumidores, ejemplo de estos últimos consumidores es el hombre, además de catástrofes ambientales severas que nos involucran, México es un caso muy particular, ya que al tener líneas de costa en ambos lados del territorio nacional y un gran número de cuerpos de agua continentales, debería de ser un país a la vanguardia en cuanto a investigación en campos como contaminación por microplásticos en ambientes acuáticos, por lo tanto en esta investigación se plantea la evaluación del efecto que tienen los microplásticos en las redes tróficas de los ambientes acuáticos, haciendo énfasis en los consumidores primarios como el zooplancton, siendo el cladóceros *Daphnia pulex* un modelo ideal para este estudio, ya que al ser un filtrador generalista es capaz consumir partículas de microplásticos además de ser sensible a factores que contaminen su ambiente.

4. Hipótesis

Por su tamaño, los microplásticos son frecuentemente consumidos por organismos generalistas que no pueden seleccionar su alimento, tales como el cladóceros *Daphnia pulex*. Si este organismo es expuesto a microplásticos de Acrilonitrilo Butadieno Estireno (ABS) esperamos observar una acumulación de las partículas en el tracto digestivo provocando una obstrucción. Esto resultara en una disminución en la supervivencia y fecundidad y cambiando la curva típica de *D. pulex*, así mismo si se expone a diferentes concentraciones de microplásticos se espera observar los efectos más adversos en la concentración más elevada

5. Objetivos

General

Evaluar el efecto de microplásticos de Acrilonitrilo Butadieno Estireno (ABS) en la tabla de vida del cladóceros *Daphnia pulex*

Particulares

- Estudiar la supervivencia, fecundidad y esperanza de vida de *D. pulex* expuesta a diferentes concentraciones de microplásticos de ABS.
- Analizar el porcentaje de ingesta de microplásticos de ABS dentro del tracto digestivo de *D. pulex*.

6. Material y Métodos

6.1 Cultivo de Zooplancton

Los Cladóceros (*Daphnia pulex*) se obtuvieron de una cepa cultivada en el laboratorio de microbiología ambiental (Procariontes) de la Unidad de Investigación Interdisciplinaria en Ciencias de la Salud y la Educación UIICSE-FES Iztacala UNAM, dicha sepa se obtuvo naturalmente de los canales de Xochimilco en la Ciudad de México, los cuales se mantenían en un recipiente de vidrio (pecera) de 10 litros de volumen útil, con medio EPA, alimentados cada tercer día con microalgas (*Scenedesmus acutus* y *Chlorella vulgaris*) a temperatura ambiente (20-22 °C). Para los experimentos, los cladóceros fueron agrupados en decenas de organismos por recipiente conservando los parámetros de la cepa (medio de cultivo EPA – CaSO₄, MgSO₄, NaHCO₃, KCL- temperatura ambiente), excepto la alimentación, la cual fue de 100 µl por recipiente, con una densidad de 250 000 cel/ml.

6.2 Obtención de Microplásticos

Se utilizó plástico ABS triturado para uso comercial, obtenido de un molino industrial en el municipio de Ciudad Azteca, Ecatepec, Estado de México, posteriormente el plástico obtenido fue triturado en un molino manual para granos, consecutivamente se tamizó el polvo resultante y posteriormente el plástico se licuo en seco para lograr un tamaño de partícula menor, este polvo plástico se tamizó con una malla con diámetro de poro de 10 µm

6.3 Exposición de *D. pulex* a microplásticos

Los organismos (*D. pulex*) fueron expuestos a dos concentraciones, 200 y 300 µg/L de microplásticos en medio EPA, además de un grupo control (sin microplásticos) todo esto hasta que murió el último organismo (30 días). En recipientes de 80 mL se colocaron 50 mL de medio EPA, posteriormente se agregaron 10 organismos de *D. pulex* (con menos de 48 horas de nacidos) a cada uno de los recipientes y se

realizaron 4 repeticiones por tratamiento y grupo control el medio fue cambiado cada 48 horas. Todos los organismos fueron alimentados con *C. vulgaris*.

6.4 Evaluación del efecto toxico del plástico fragmentado ABS sobre la dinámica poblacional

Diariamente se registró el número de organismos vivos de la misma cohorte y los individuos recién nacidos, los cuales eran contados y retirados de los recipientes. El experimento termino cuando murió el último organismo de la cohorte inicial. Sobre la base de datos de supervivencia (l_x) y fecundidad (m_x) se calcularon las variables demográficas según las ecuaciones de Krebs (1985) siendo estas, promedios de vida, tasa de reproducción bruta, tasa de reproducción neta, tiempo generacional y tasa de incremento poblacional.

Los resultados de la tabla de vida y de las pruebas demográficas se realizaron con las siguientes formulas.

Supervivencia

$$l_x = \frac{ax}{a0}$$

Esperanza de vida

$$e_x = \sum_{y=x}^J \frac{l_y}{l_x}$$

Fecundidad

$$m_x = \frac{nx - (nx + 1)}{nx}$$

Tasa reproductiva bruta

$$\sum_0^a m_x$$

Tasa reproductiva neta R_0

$$\sum_0^a l_x m_x$$

Tiempo generacional

$$\frac{\sum l_x m_x \cdot X}{R_0}$$

Tasa de incremento poblacional (r)

$$\sum_{x=0}^n e^{-rx} L_x m_x = 1$$

6.5 Análisis de microplásticos en el tracto digestivo de *D. pulex*

Se detectó la ingesta de microplásticos de manera visual utilizando un microscopio estereoscópico, revisando el tracto digestivo de individuos de cada tratamiento (Control, 200 y 300 μ /L de microplásticos) seleccionados al azar, vivos y algunos muertos con pocas señales de descomposición para poder visualizar el tracto digestivo y su contenido. (Figura 2)

6.6 Análisis de fluorescencia de microplásticos

Los plásticos en suspensión se observaron en microscopio de fluorescencia Nikon ECLIPSE E600 en campo de luz UV-2A, de la misma manera, los organismos después de la exposición a los microplásticos de ABS se observaron montados en portaobjetos en las mismas condiciones que las micropartículas en suspensión.

6.7 Análisis estadístico de los valores de la tabla de vida demográfica

Se realizaron pruebas de ANOVA para identificar las diferencias significativas de los valores de supervivencia, fecundidad y esperanza de vida en el software SIGMA Plot 11.0 buscando diferencias estadísticamente significativas para los tratamientos contra el grupo control y entre los tratamientos (200 y 300 μ g/L de microplásticos).

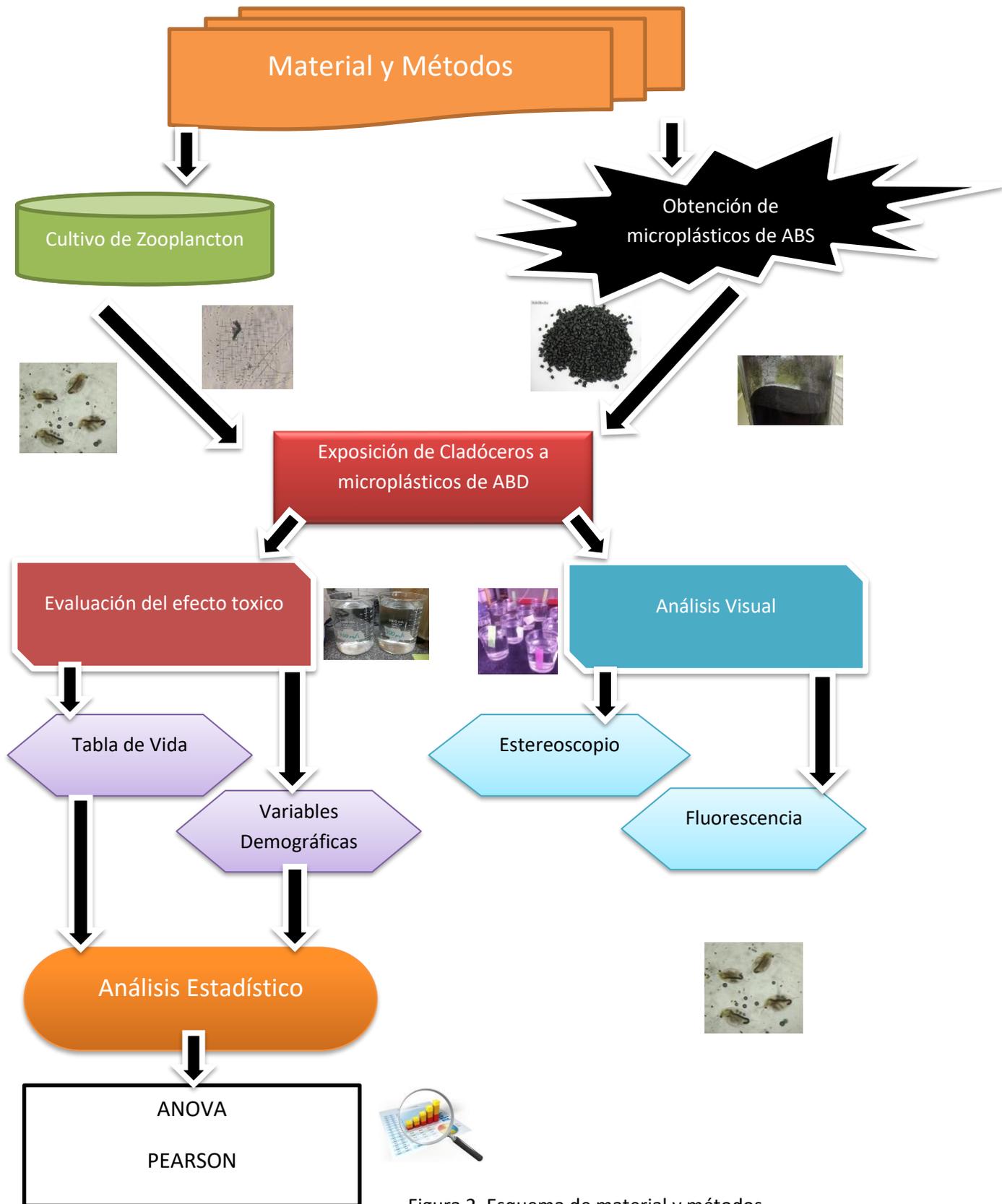


Figura 2. Esquema de material y métodos

7 Resultados

7.1 Evaluación de la supervivencia, fecundidad y esperanza de vida en la tabla de vida de *D. pulex*

En cuanto al grupo control podemos observar en la Figura 3A la línea de supervivencia de tipo I típica de *D. pulex*, sin embargo, en la Figura 3B y Figura 3C que corresponden a los tratamientos de microplásticos de 200 y 300 µg/L respectivamente, se observa un decremento en la supervivencia de los individuos expuestos a las partículas de ABS desde los primeros días, mostrando una curva similar al tipo dos. Para el grupo control, se puede observar que el inicio en el descenso en la supervivencia es posterior al día cinco, mientras que para el grupo de 200 µg/L comienza cerca del día 4 y para el grupo de 300 µg/L se aprecia a partir del segundo día de exposición, también se observa que tanto en el grupo control como en el de 200 µg/L el 50% de la población muere alrededor de los 18 días, a comparación del grupo de 300 µg/L en donde el 50% de la población muere a los 13 días (5 días menos con respecto al grupo control)

La prueba ANOVA para la supervivencia entre los tratamientos encontró que la diferencia entre los valores de los tratamientos es mayores a lo que se esperaba, esto por casualidad, por lo que hay una diferencia significativa ($P < 0.001$), posteriormente se realizó una prueba de comparación múltiple por el método de DUNN ($P < 0.05$) arrojando diferencias significativas entre los dos tratamientos contra el grupo control, sin embargo, no existen diferencias significativas entre los tratamientos de 200 y 300 µg/L (Anexo 1 y 2).

Supervivencia Ix

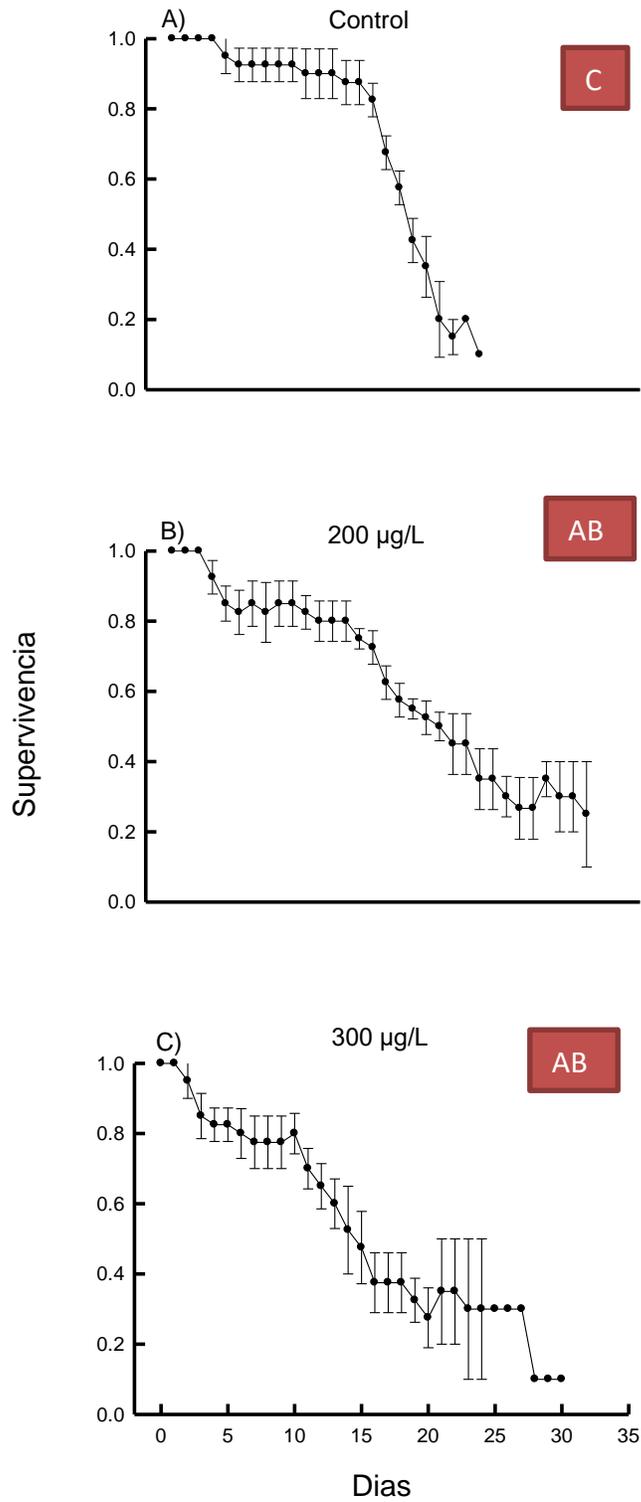


Figura 3. Gráficas de supervivencia A) grupo control, B) 200 µg/L y C) 300 µg/L, índice de supervivencia contra días del experimento. (P<0.05)

En la fecundidad (Figura 4) se puede observar el inicio de la reproducción al rededor del día 3 tanto en el grupo control como en los tratamientos, en el caso de grupo control el pico máximo de reproducción es de 2 neonatos por día como promedio, para el grupo de 200 µg/L el pico máximo de reproducción es de 7 neonatos por día, este valor se obtuvo cercano al día 25 del experimento, en el caso del grupo de 300 µg/L el pico máximo de reproducción es de 10 neonatos por día, este valor se obtuvo al rededor del día 25, ambos tratamientos superando por mucho al grupo control.

En el grupo control (Figura 4 inciso A) se observa que la fecundidad tiene un comportamiento típico de *D. pulex*, el cual, al alcanzar la edad reproductiva las daphnias tienen crías de manera cíclica a lo largo del tiempo del tratamiento (30 días) sin embargo el comienzo de la reproducción se ve adelantado, comenzando cerca del día 3, mientras que en los tratamientos de 200 y 300 µg/L (Figura 4 incisos B y C respectivamente) el comportamiento es similar (reproducción cíclica) hasta los últimos días de tratamiento en los que observa una tendencia al incremento de la fecundidad, aunque también la fecundidad se ve adelantada.

La prueba de ANOVA para identificar diferencias significativas entre los tratamientos en la prueba de la fecundidad arrojó que las diferencias entre los valores de los tratamientos no son lo suficientemente grandes por lo que no hay una diferencia estadísticamente significativa ($P= 0.924$).

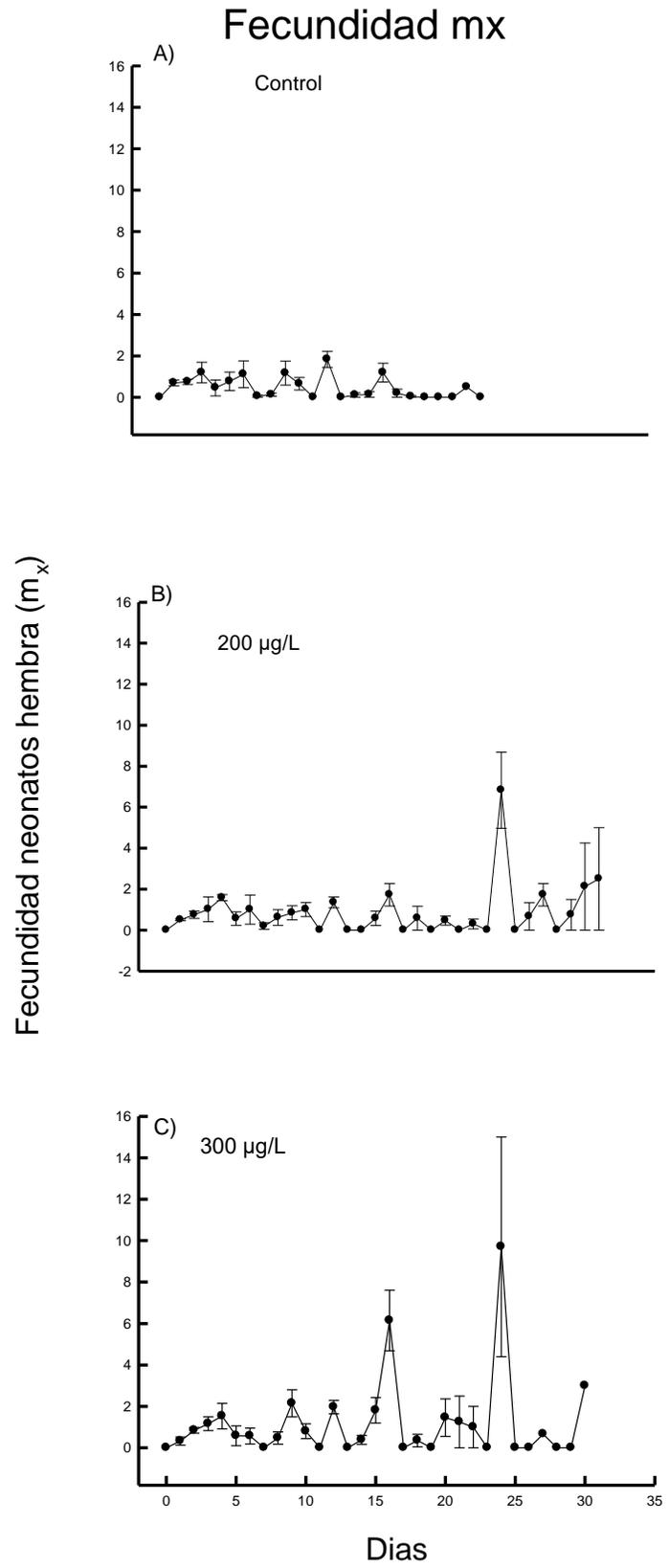


Figura 4. Graficas de fecundidad A) grupo control, B) 200 µg/L y C) 300 µg/L, índice de fecundidad contra días del experimento. (P= 0.924), no diferencia significativa.

Para la esperanza de vida, en el caso del control (Figura 5 inciso A), llegó hasta el día 25, mientras que para los grupos con tratamiento de 200 y 300 $\mu\text{g/L}$ (Figura 5 incisos B y C respectivamente) la esperanza de vida fue mayor, siendo de 32 días para el grupo de 200 $\mu\text{g/L}$ y de 30 días para el grupo de 300 $\mu\text{g/L}$.

La prueba de ANOVA para la esperanza de vida entre los tratamientos arrojó que la diferencia de los valores entre los grupos de tratamientos son mayores a lo que se esperaría por casualidad, por consiguiente hay una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.001$), posteriormente se realizó la prueba de comparación múltiple por el método de Holm-Sidak, con un nivel de significancia igual a 0.05, mostrando diferencias significativas entre el grupo de 200 $\mu\text{g/L}$ de ABS contra el grupo control y el grupo de 300 $\mu\text{g/L}$ de ABS, pero no entre el grupo control y el tratamiento con la concentración más alta (300 $\mu\text{g/L}$ de ABS) (Anexo 4 y 4.1).

Esperanza de Vida ex

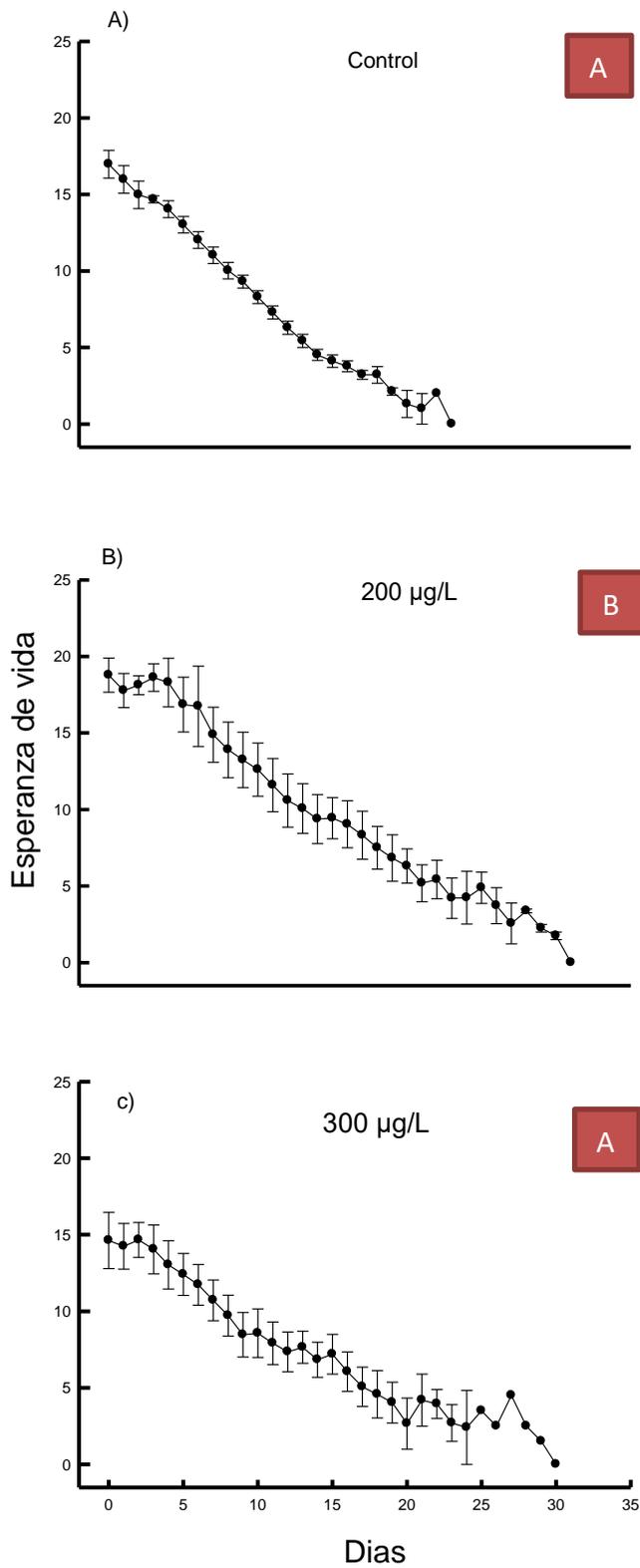


Figura 5. Graficas de esperanza de vida A) grupo control, B) 200 µg/L y C) 300 µg/L, índice de esperanza de vida contra días del experimento. (P=0.05)

7.2 Análisis Demográfico

En el caso de los promedios de vida (Figura 6), en el grupo control el valor de promedio de vida es de 17 días +/- 1 día aproximadamente, se encontró que el tratamiento de 200 µg/L tuvo un valor de promedio de vida de los 20 días de exposición +/- 1 día, y el grupo con un menor valor de promedio de vida sería el de la concentración más alta (300 µg/L) siendo este valor de 14.5 +/- 2 días, exceptuando el comportamiento del segundo grupo que corresponde a la primera concentración (200 µg/L), es un comportamiento esperado que entre más alta la concentración, el promedio de vida fuera menor.

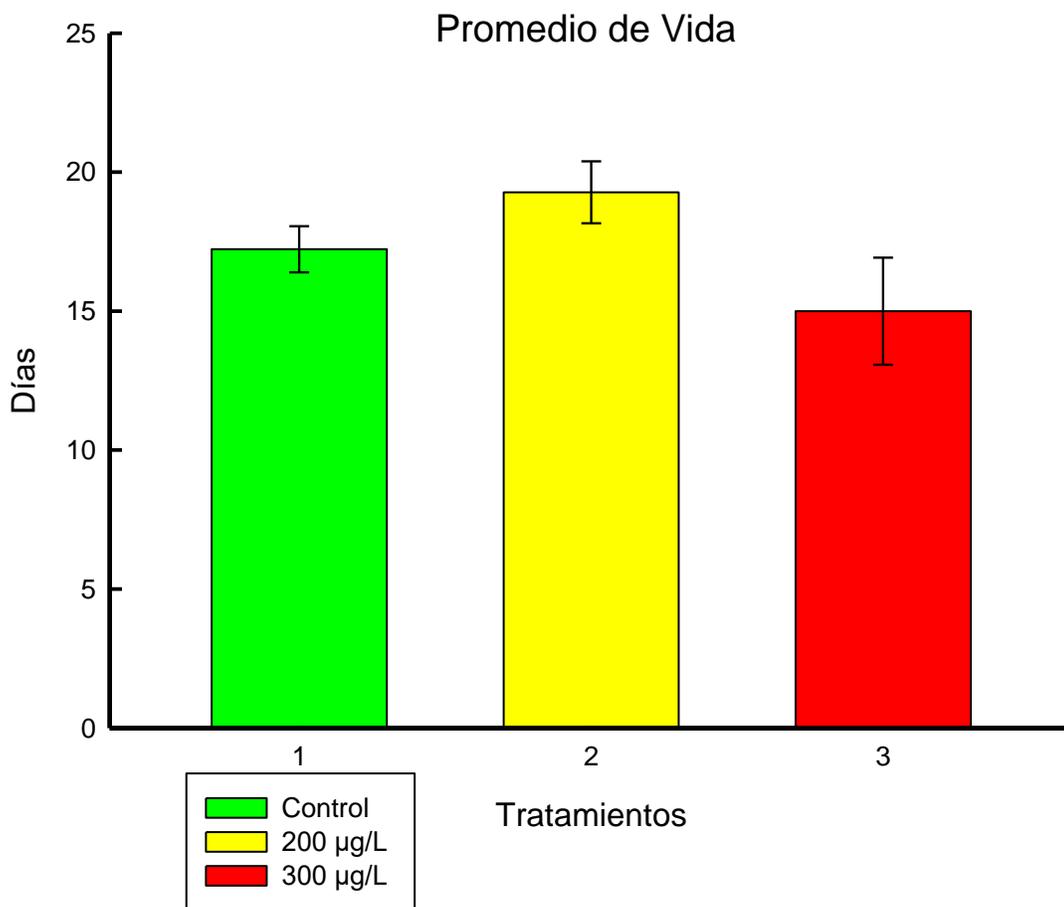


Figura 6. Gráfica de promedios de vida. Grupo Control, 200 µg/L y 300 µg/L (Barras de izquierda a derecha respectivamente) con desviación estándar.

En la tasa reproductiva bruta (Figura 8) se observó una tendencia al aumento dependiendo de la concentración de microplásticos, es decir, entre mayor fue la

$P=0.143$

concentración de microplásticos de ABS (300 $\mu\text{g/L}$), se encontró un valor mayor en la tasa reproductiva bruta (24 neonatos para el grupo de 200 $\mu\text{g/L}$ y 27 para el grupo de 300 $\mu\text{g/L}$), mientras que en el caso del control que tiene una cantidad de microplásticos igual a cero, se observa el valor de reproducción bruta más bajo. En la gráfica de la reproducción neta (Figura 9) se encontraron dos fenómenos interesantes el primero es la reducción por la mitad del valor que presentaban los tratamientos, tanto el de 200 como el de 300 $\mu\text{g/L}$ de ABS, que mientras en la gráfica de reproducción bruta oscilaba entre un valor de 30, en la gráfica de reproducción neta caen en ambos tratamientos hasta valores por debajo de los 14, siendo el más bajo el tratamiento de 300 $\mu\text{g/L}$ de ABS llegando hasta prácticamente 12.

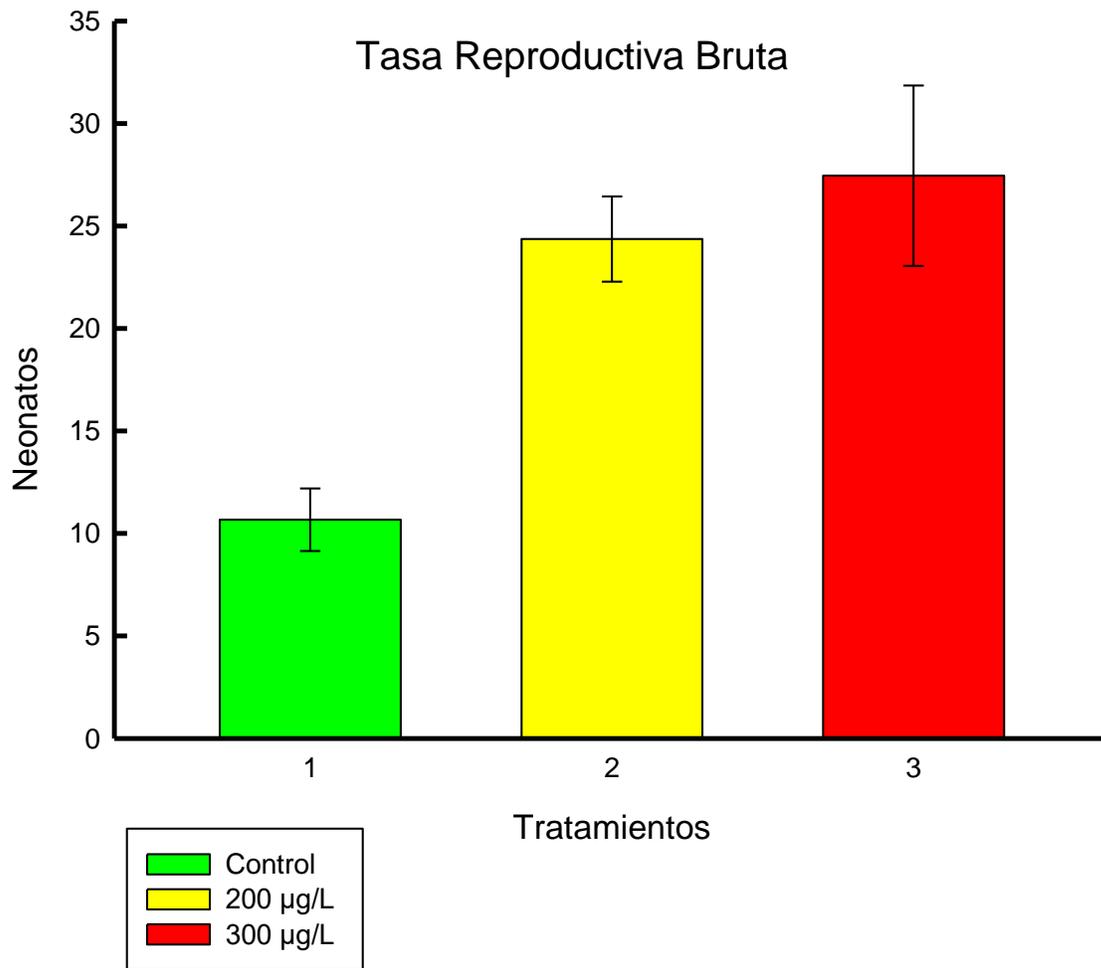


Figura 8. Grafica de reproducción bruta, grupo control, 200 µg/L y 300 µg/L (Barras de izquierda a derecha respectivamente) con desviación estándar. $P < 0.050$

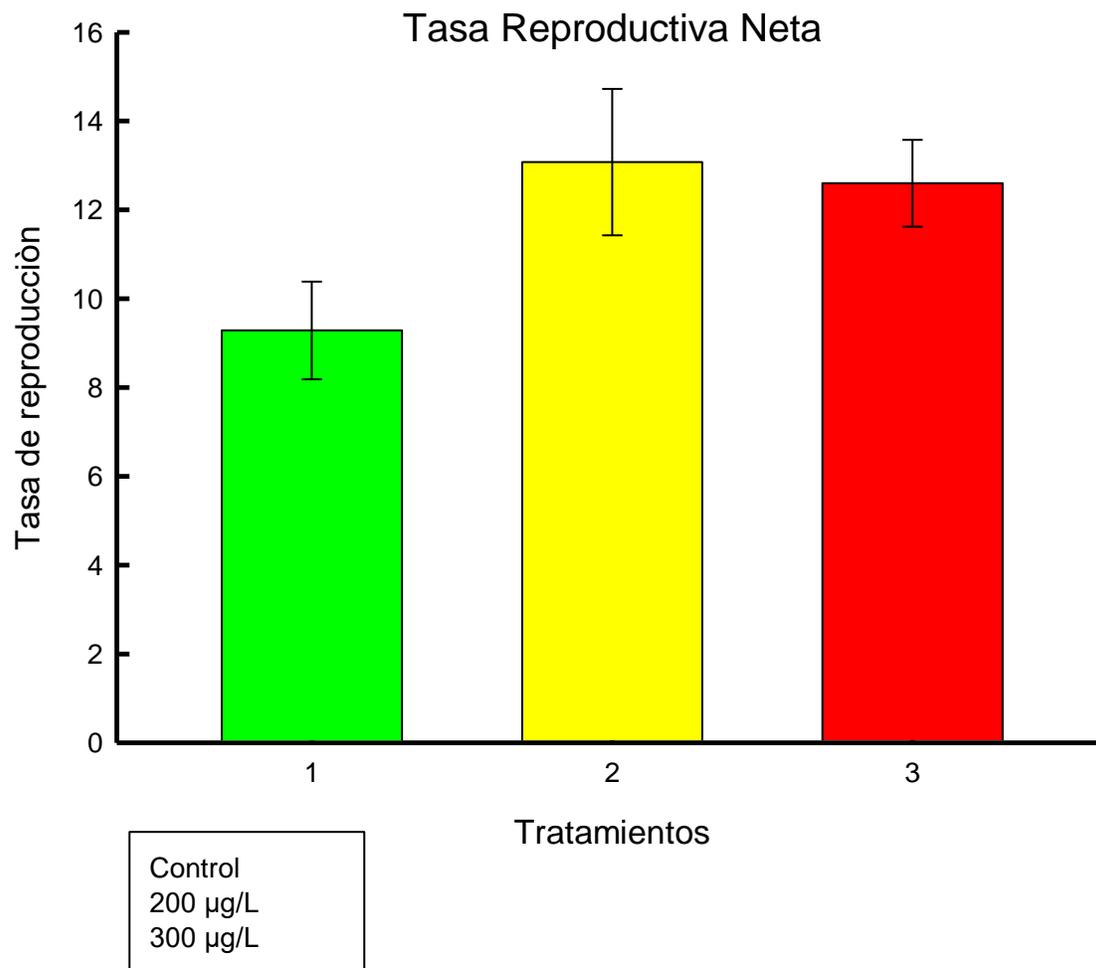


Figura 9. Grafica de reproducción neta, grupo control, 200 µg/L y 300 µg/L (Barras de izquierda a derecha respectivamente) con desviación estándar. $P > 0.050$

El tiempo generacional (Figura 10) en el caso del control es más rápido, teniendo crías alrededor ocho días en promedio, mientras que, para los dos tratamientos, 200 y 300 µg/L de ABS, el tiempo generacional es más prolongado siendo en promedio de 12 días para el grupo de 200 µg/L y 11 días para el grupo de 300 µg/L aproximadamente.

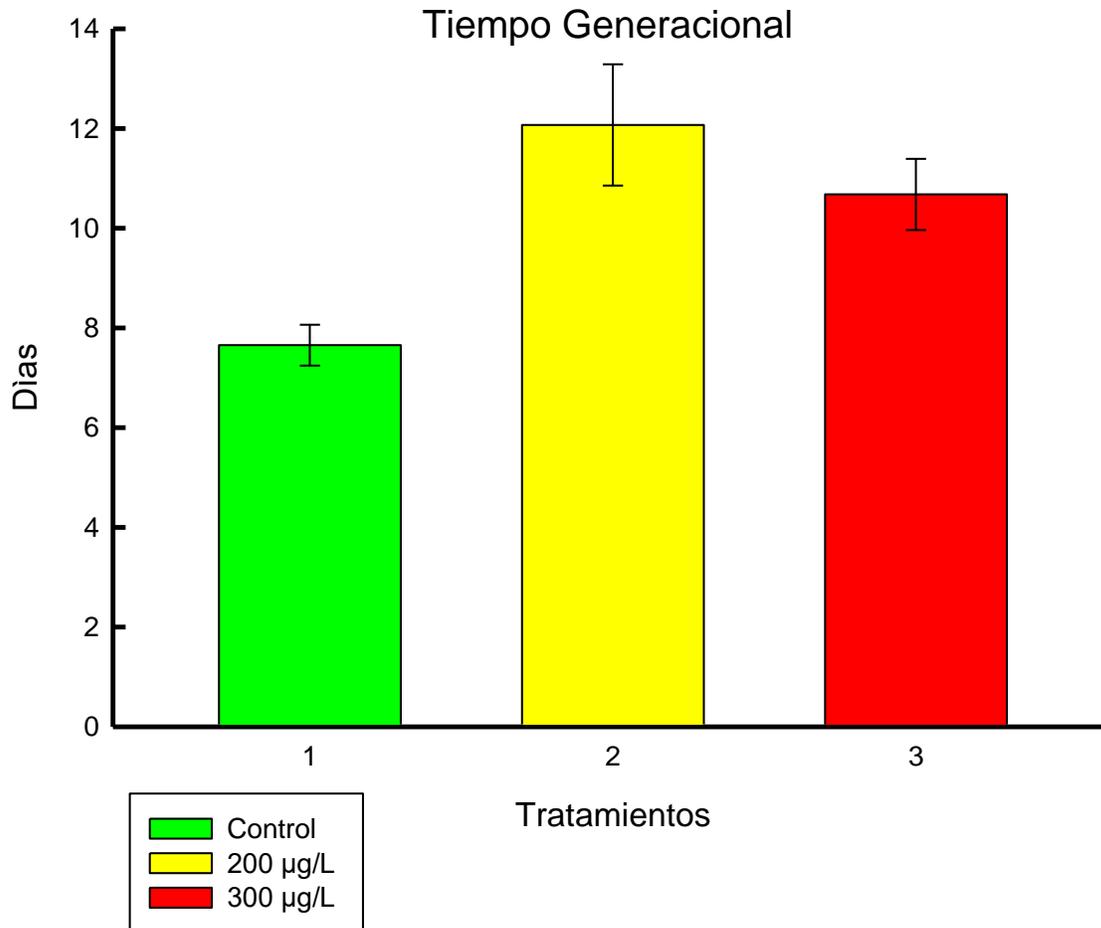


Figura 10. Grafica de tiempo Generacional, grupo control, 200 µg/L y 300 µg/L (Barras de izquierda a derecha respectivamente) con desviación estándar. $P > 0.050$

En cuanto a la tasa de crecimiento poblacional (Figura 11) se observa en la gráfica que los tratamientos y el grupo control tienen valores por debajo de uno, teniendo en el caso del grupo control 0.4 ± 0.2 individuos por día, en el caso de grupo de 200 µg/L el crecimiento se encuentra por encima de 0.5 ± 0.05 individuos y por último el grupo de 300 µg/L se observa un incremento de 0.5 ± 0.1 individuos por día, sin embargo, aunque no se encontraron diferencias significativas, existe una tendencia marcada de los dos tratamientos (200 y 300 µg/L de ABS) a ser mayor la tasa de crecimiento poblacional en comparación con el grupo control.

Tasa de incremento poblacional (r)

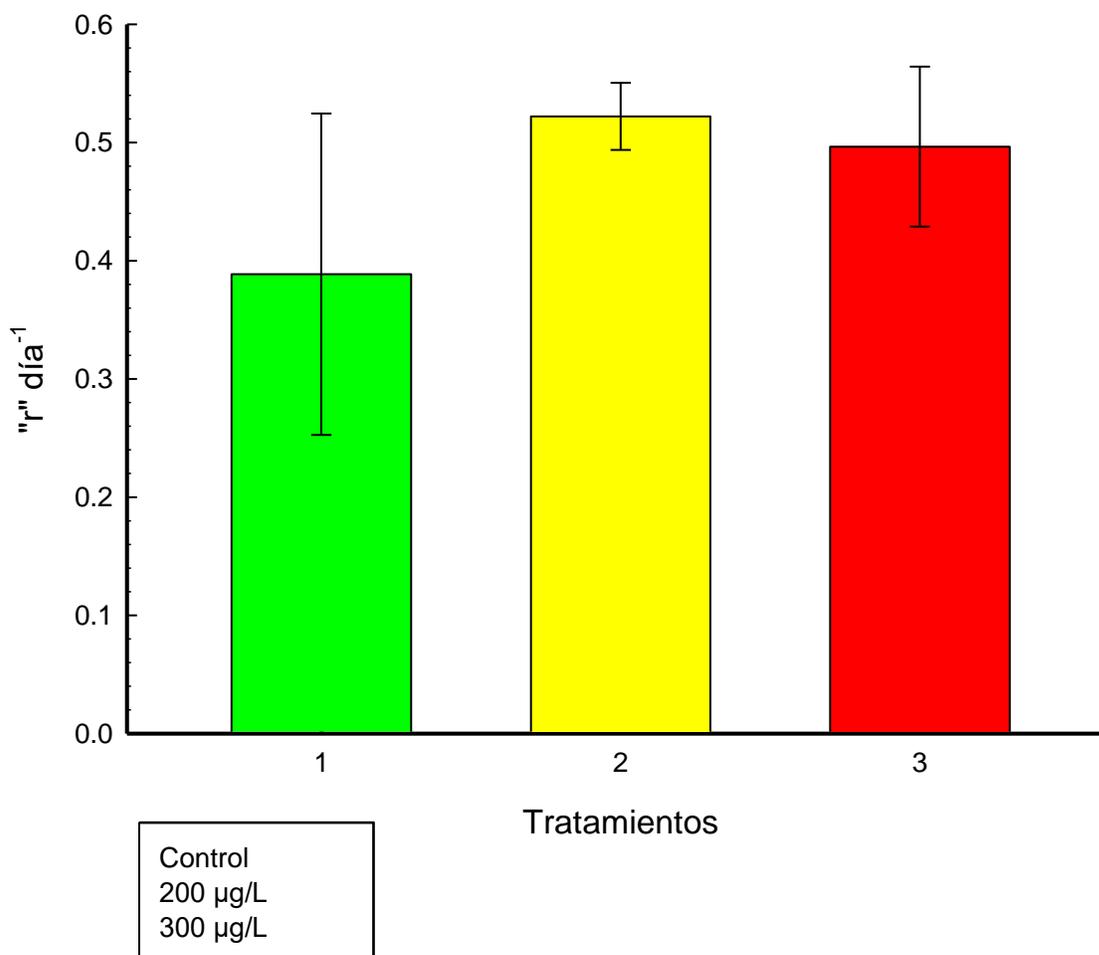


Figura 11. Grafica de crecimiento poblacional (r), grupo control, 200 µg/L y 300 µg/L (Barras de izquierda a derecha respectivamente) con desviación estándar. $P > 0.050$

7.3 Análisis de la ingesta de microplásticos de ABS dentro del tracto digestivo de *D. pulex* mediante microscopio estereoscópico

Como primer paso en el análisis de los microplásticos se realizó una evaluación del tamaño de partículas de ABS mediante el uso de microscopia estereoscópica con el fin de garantizar que fuera físicamente posible la ingesta de plástico por *D. pulex* posteriormente al proceso de fragmentación y tamizado con malla de 10 micras de

tamaño de poro, encontrando partículas del tamaño de células de *Chlorella vulgaris* que son uno de las algas consumidas por *D. pulex*, en la Figura 12 podemos apreciar las células de *C. vulgaris* en color verde claro de fondo, y partículas de plástico de diferentes dimensiones, con un círculo de color rojo se encuentra señalada la partícula con un tamaño similar a *C. vulgaris*.



Figura 12. Partículas de ABS comparadas con *C. vulgaris*

En el análisis visual de la ingesta de microplásticos de ABS en el tracto digestivo de *D. pulex* mediante microscopio estereoscópico se encontró que después de 30 días (aproximadamente) de exposición a los microplásticos (<10 micrómetros), se puede observar la presencia de partículas de color oscuro en diferentes posiciones a lo largo de su tracto digestivo, esto después de analizar a las Daphnias de ambos tratamientos encontrando presencia de microplásticos al menos en 50% de los organismos, esto visto únicamente en estereoscopio, por lo tanto, se infiere que estas partículas son microplásticos de ABS, lo que se muestra en la Figura 13, un organismo de *D. pulex*, su tracto digestivo de un característico

color verde debido al consumo de micro algas y de color mucho más oscuro, partículas de ABS señaladas con una circunferencia de color rojo.



Figura 13. Partículas de ABS en el interior del intestino de *D. pulex*

Al término de los 30 días de la exposición a micropartículas de ABS podemos observar en los desechos de *D. pulex* restos (folículos fecales) de micropartículas y algunas fibras plásticas tanto dentro como fuera de los desechos, las partículas fuera de los desechos se las podemos atribuir al precipitado de las mismas, sin embargo, se aprecian zonas mucho más oscuras en los desechos (Figura 14), por lo que podemos inferir que las partículas de ABS fueron consumidas y que algunas de ellas pueden atravesar el tracto digestivo y ser desechadas junto con el resto de materia orgánica consumida.

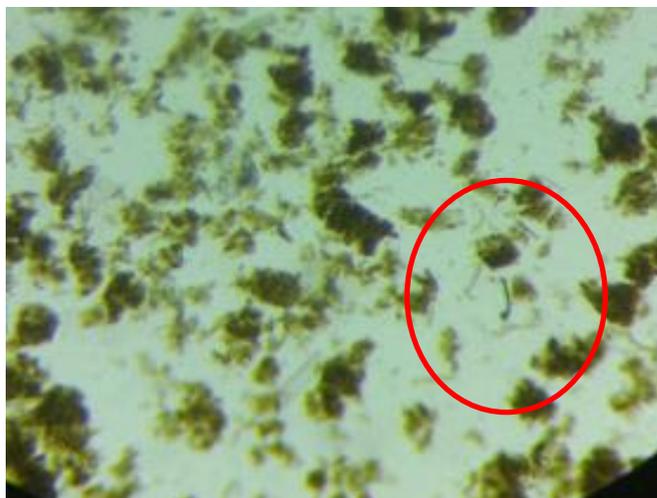


Figura 14. Partículas de ABS en los desechos de *D. pulex* a los 30 días de tratamiento.

7.4 Análisis de ingesta de microplásticos por fluorescencia

Se realizó el análisis de las micropartículas de ABS suspendidas en medio EPA vistas en microscopio de Fluorescencia en el campo de luz UV, encontrando que las micropartículas de ABS fluorescen en color azul, se realizó además una mezcla de las micropartículas con *C. vulgaris*, encontrando micropartículas de ABS del tamaño de dichas células y continuando con la fluorescencia de color azul, mientras que las células de las algas fluorescían en color rojo (Figura 15).

Se realizaron pruebas de fluorescencia de *Daphnias* expuestas a los microplásticos a los 30 días de exposición (aproximadamente), encontrando que los plásticos se pueden acumular en las diferentes estructuras externas de los organismos, también se encontraron micropartículas en el interior de estas, de formas muy variadas como es el caso de las fibras y partículas amorfas (Figura 16).

Gracias al análisis de fluorescencia se pudieron observar micropartículas de plástico ABS en el tracto digestivo de *D. pulex* y en el interior del organismo cerca del tracto digestivo, presentando diferentes formas del plástico ABS (Figura 17). Por último, se realizó un análisis visual del contenido del tracto digestivo de *D. pulex* con ayuda del microscopio de fluorescencia en donde se encontraron partículas de ABS que fluorescen en color azul junto con células ingeridas de *C. vulgaris* en rojo, lo que

confirma la ingesta de micropartículas de plástico de Acrilonitrilo-Butadieno-Estireno (ABS) (Figura 18).

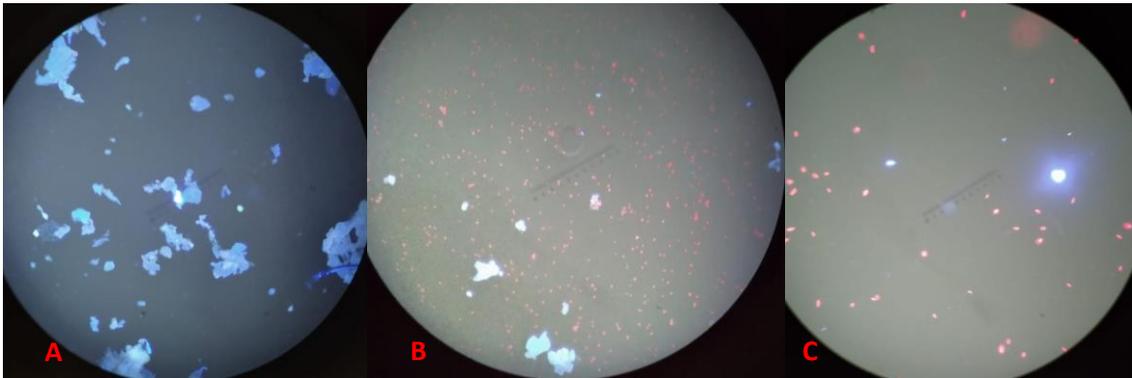


Figura 15. Partículas de ABS vistas en microscopio de fluorescencia con luz UV, A) Partículas de ABS a 40X, B) Partículas de ABS (Azul) y células de *C. vulgaris* (Rojo) a 40x, C) Partículas de ABS (Azul) y *C. vulgaris* (Rojo) a 100X

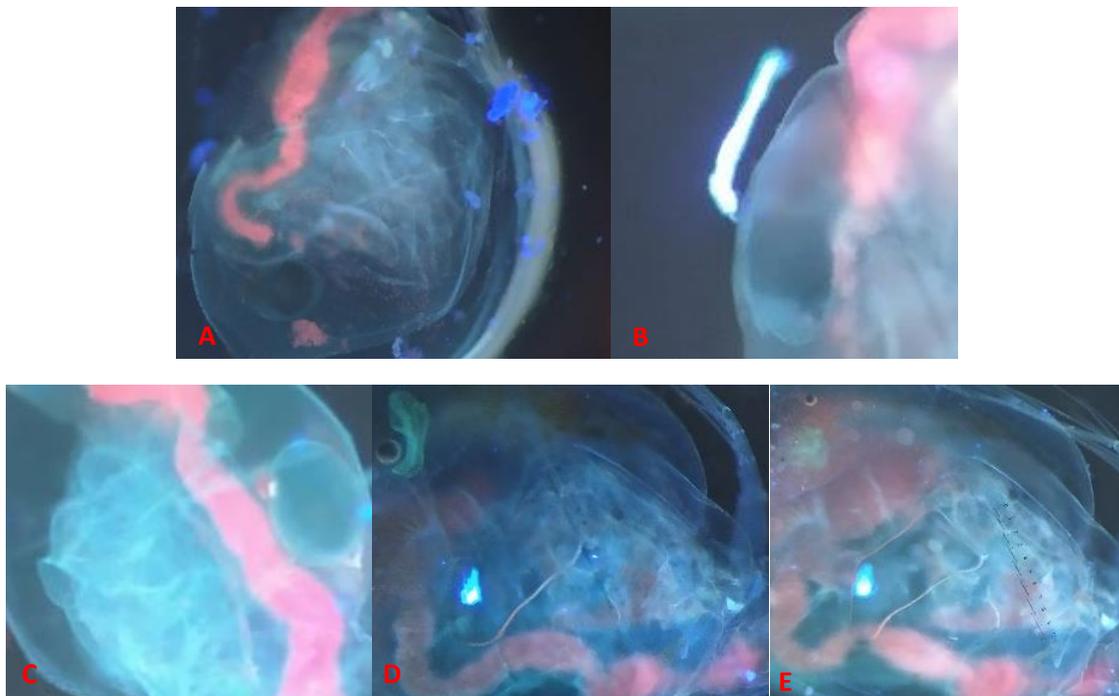


Figura 16. Partículas de ABS en Cladóceros vistas en microscopio de fluorescencia con luz UV, A) y B) Partículas de ABS (Azul) por fuera de los organismos, tracto digestivo en color rojo D), E) y F) Partículas de ABS (Azul) dentro de organismos 10x.

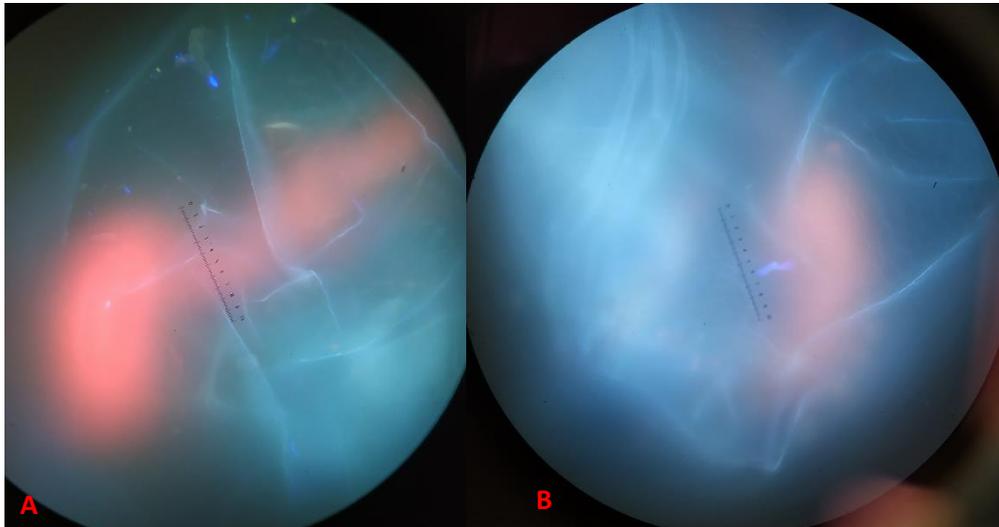


Figura 17. Partículas de ABS (ABS) en tracto digestivo de *D. pulex* vistas en microscopio de fluorescencia con luz UV, A) partículas, B) Fibra, 40x

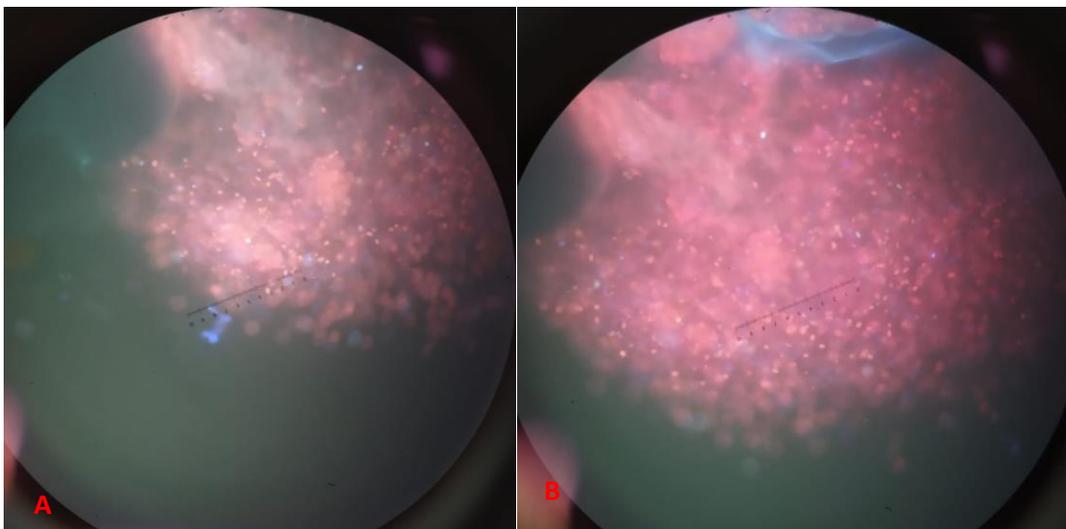


Figura 18. Partículas de ABS (Azul) en contenido estomacal (Rojo) de *D. pulex* vistas en microscopio de fluorescencia con luz UV, A) Fibra, B) Partícula.

8 Discusión

En la actualidad, el tema de los plásticos y en particular el de los microplásticos, es muy controversial, teniendo en un extremo un sin número de estudios que evidencian la presencia de estos polímeros fraccionados o manufacturados en diferentes tipos de ambientes tanto acuáticos como terrestres (Liu et al, 2018), junto con evidencia que demuestra la aparición de microplásticos en diferentes órganos en animales de consumo humano, y presencia de microplásticos en animales que son de gran importancia ambiental y ecológica al ser base de las redes tróficas (Ma et al, 2016 & Karami et al, 2016) y por otro extremo la renuencia de muchas personas y miembros de la sociedad científica a priorizar el impacto que estas partículas pueden tener ya que la cantidad de estudios referentes a los microplásticos es muy poca comparada con otros campos de estudio.

El presente trabajo se suma a los esfuerzos de muchos científicos, puesto que en él se intenta demostrar cómo afectan los microplásticos a organismos específicos (*Daphnia pulex*), debido a que al ser organismos cosmopolitas se encuentran en un gradiente ambiental desde hábitats sumamente favorables hasta hábitats con un grado alto grado de alteración, por lo cual las pruebas toxicológicas en estos organismos permiten evaluar de manera muy clara el riesgo que pueden provocar los diferentes tipos de contaminantes. y los efectos que estos pueden tener en su dinámica poblacional, planteándose si las micropartículas de Acrilonitrilo Butadieno Estireno o ABS pueden tener un efecto negativo en la tabla de vida del Cladóceros dulceacuícola *Daphnia pulex*, sin embargo, las diferentes pruebas obtenidos muestran resultados un tanto diferentes a los esperados en nuestra hipótesis sin ser estrictamente contrarios a ella. Un ejemplo de este comportamiento es de grupos cercanos a los cladóceros (Rotífera) que se ha observado pueden vivir en ambientes perturbados sin presentar mayores alteraciones en sus dinámicas poblacionales (ul Haq et al, 2011).

El método de obtención de microplásticos se realizó de manera manual, sin embargo, pudimos obtener el tamaño de partícula deseada, siendo este $<10 \mu\text{m}$, dicho tamaño se encuentra dentro de los rangos en los que los cladóceros pueden

ingerir los microplásticos al confundirse con su comida habitual (fitoplancton) (Sun et al, 2017). Este método puede aproximarse a lo que sucede de manera natural (intemperismo) a diferencia de partículas manufacturadas empleadas en otros trabajos de toxicidad por microplásticos (Wright et al 2013), teniendo las micropartículas formas bien definidas (esferas), mientras que las empleadas en este trabajo son amorfas, Lehtiniemi en 2018 en su trabajo de investigación demuestra que los plásticos secundarios en bajas concentraciones son mayormente consumidos que los plásticos primarios, en cuanto a crustáceos planctívoros se refiere, por lo cual se plantea que este método de manufacturación del plástico y las concentraciones podrían provocar efectos severos en los organismos, sin embargo tales concentraciones deberían de compararse con otras formas para corroborar esto.

Para la supervivencia, al mostrarse un decremento en ella desde los primeros días de exposición existe un efecto negativo al estar expuestos los cladóceros a los microplásticos de ABS, siendo el grupo de 300 $\mu\text{g/L}$ el que más afectado se vio, perdiendo el 50% de los organismos en tan solo 13 días, mientras que el grupo control y de 200 $\mu\text{g/L}$ pierden el 50% de los organismos alrededor de los 18 días, lo que coincide con numerosos estudios similares en donde las concentraciones más altas tienen una disminución en la supervivencia (LeMoine et al, 2018; Jemec et al, 2016; Rosenkranz et al, 2009)

En el caso de la fecundidad se han encontrado estudios que mencionan que las Daphnias al estar sometidas a estrés, generan más estructura de resistencia (Gerhard 2015), esto se puede observar en los resultados, donde ambos tratamientos tienen una mayor tasa reproductiva neta (+/- 25% más que el grupo control) y bruta (hasta 50% más que el grupo control)

La prueba para evaluar las diferencias estadísticamente significativas (ANOVA) entre los valores obtenidos para el caso de la fecundidad no arrojó diferencias entre ninguno de los tratamientos, esto puede ser provocado por que en la mayor parte del experimento se tiene un comportamiento similar en cuanto a la fecundidad, valores que oscilan entre cero y hasta 4 organismos por día, la diferencia se observa

gráficamente en los últimos días en donde se observa un aumento en ambos grupos con microplásticos (200 y 300 $\mu\text{g/L}$) este comportamiento también puede ser explicado por la gran tolerancia que tiene el género *Daphnia* ante ambientes sumamente contaminados, como lo demuestra Martínez-Jerónimo y colaboradores en el 2008 comparando dos cladóceros de géneros diferentes (*Daphnia magna* contra *Simocephalus mixtus*) ante toxicidad provocada por hidrocarburos, observando una menor inhibición de la reproducción por parte de *Dhaphnia* (24%) a comparación de *Simocephalus* (72%) siendo necesario realizar una prueba comparando diferentes organismos con diferentes grados de tolerancia y que formen parte del zooplancton además de pruebas estadísticas más robustas o un análisis diferente en donde se puedan comparar los grupos dependiendo de su comportamiento debido a que la potencia de la prueba realizada (0.050) está por debajo de la potencia deseada de 0.800, esto indica que es menos probable que se detecte una diferencia cuando realmente existe una (Anexo 3 y 3.1) . .

La esperanza de vida es un caso muy particular ya que esta aumenta proporcionalmente al incremento de los tratamientos (25 para el grupo control, 28 para el grupo de 200 $\mu\text{g/L}$ y 30 para el grupo de 300 $\mu\text{g/L}$), siendo el grupo de 300 $\mu\text{g/L}$ el que tiene una mayor esperanza de vida, a los 30 días, 5 días más que el grupo control, Heugens (2006) demostró que la disponibilidad de alimento puede afectar de manera positiva o negativa cuando el cladóceros *Daphnia* se encuentra en un ambiente con algún grado de toxicidad, reduciendo los efectos tóxicos, también menciona que la disponibilidad de alimento puede ayudar a la supervivencia de las Daphnias, incluso ante cambios de temperatura, por lo que la concentración de microplásticos junto con la de alimento pudiera ser la responsable de la mitigación del efecto adverso en los valores de la esperanza de vida (28 para el grupo de 200 $\mu\text{g/L}$ y 30 para el grupo de 300 $\mu\text{g/L}$) sin embargo son necesarios más estudios para comprobar esta hipótesis.

Es impreciso mencionar que los efectos observados son provocados por alguna característica en particular de los microplásticos empleados, en cuanto a los datos

obtenidos de los análisis demográficos se refiere, como el tamaño o la forma de la partícula, las concentraciones empleadas, el tipo de material (ABS), entre otras características, sin embargo, se ha visto en otras micropartículas que las concentraciones influyen en el grado de toxicidad que estas pueden llegar a tener y los efectos como se muestra en los promedios de vida (17, 20 y 15 días para grupo control, 200 y 300 $\mu\text{g/L}$, respectivamente) (Figura 6) en el que una concentración en específico (200 $\mu\text{g/L}$ en este caso) tiene un efecto diferente al del resto de concentraciones, se ha visto en copépodos, cladóceros, poliquetos y rotíferos que en concentraciones más bajas (debajo de 200 $\mu\text{g/L}$) o más altas (arriba de 500 $\mu\text{g/L}$) tiene efectos diferentes y no necesariamente las concentraciones más altas provocan el mayor daño (Setälä, 2014), esto corresponde con lo mostrado en la figura 6 de promedio de vida en la que la concentración más baja (200 $\mu\text{g/ml}$) tiene un mayor promedio de vida (19 días aproximadamente), superando los 20 días, incluso por encima del grupo control (por debajo de los 20 días), efecto que podemos atribuírselo a la concentración.

El efecto de las bajas concentraciones, antes mencionado, también puede explicar el caso de la figuras 8 y 9 además de las gráficas de la figura 4, en donde se observa una tendencia al incremento de nacimientos (hasta 12 neonatos en fecundidad y por arriba del 25% en las figuras 8 y 9) en la concentración más baja (200 $\mu\text{g/L}$ de ABS) y la disminución aparente de nacimientos en la concentración más alta (300 $\mu\text{g/L}$) con respecto al grupo control, Korpelainen (1986) comprobó que los descensos de temperatura y el cambio en el fotoperiodo pueden provocar un aumento en la producción de crías y diferencias en la tasa de producción de machos y hembras, esto producto del estrés ambiental, por lo cual, es posible que los cladóceros al estar sometidos e estrés empleen estrategias para la supervivencia de la especie, a pesar de ello, al ser factores diferentes la temperatura, el fotoperiodo y los contaminantes como microplásticos.

Otro caso muy particular es el que se muestra con las figuras 8 y 9 de que corresponden a reproducción bruta y neta respectivamente, donde se observa que en los grupos de tratamientos (200 y 300 $\mu\text{g/L}$) tienen una tendencia al aumento

directamente proporcional (lineal) en el caso de la reproducción bruta (Mas del 50%) y aumentando solo a comparación del grupo control pero no tan evidente entre ambos tratamientos en el caso de la reproducción neta (más del 20% aproximadamente), el fenómeno de un aumento en ambos valores de reproducción de las concentraciones con respecto al grupo control, como se había mencionado anteriormente, puede ser provocado por el estrés al que estuvieron sometidos los organismos al tener en su ambiente micropartículas de ABS y al ingerir las mismas, provocando un aumento en las tasas de reproducción (entre 20 y 50 % de aumento), desde estructuras de resistencia (efipios) hasta crías ya que se sabe que este comportamiento ante situaciones adversas es común en este grupo (Lajus, 2004, Sarma 2006).

A pesar del aumento en la reproducción que se tuvo en los grupos de 200 y 300 µg/L una gran cantidad de neonatos no son viables debido a que algunos de ellos parecían inmóviles incluso ante estímulos mecánicos realizados con la pipeta Pasteur, no obstante, no se cuantificaron la cantidad de neonatos inmóviles sin embargo sí se pudo observar en los conteos diarios con el microscopio estereoscópico, Weber et al en 2018 demuestra que las micropartículas de PET no muestran efectos negativos en *Gammarus pulex*, esto debido a las características fisiológicas de la especie, por lo que los efectos que se demuestran en este y otros artículos relacionados con los microplásticos tienen que ver con el tipo de partícula que se evalúa y las características de la especie en concreto.

En el caso del tiempo generacional (Figura 8), se observa que es mayor en los tratamientos, dicho fenómeno es atribuido al efecto de los microplásticos, sin embargo, hay registros de que los microplásticos y otros factores que provocan estrés en los ambientes acuáticos, tengan efecto en los tiempos reproductivo del género *Daphnia* y otros microcrustáceos, no obstante, para el caso de *D. pulex* es el primer registro de efectos de aumento en el tiempo generacional producido por microplásticos de ABS, sin embargo Shurin y Dodson en 1997 describen un comportamiento parecido, analizando el efecto sub letal de cianobacterias y nonilfenol en *Dhaphnia sp.* observando un incremento en el inicio de la reproducción

por parte del nonilfenol (alrededor de los 15 días) a comparación de las cianobacterias (10 días).

La tasa de crecimiento es otro comportamiento que es posible explicar por el estrés provocado por los microplásticos debido a que a pesar de que todos los valores, tanto en el grupo control como en los tratamientos, son por debajo de uno, se observa una tendencia al aumento en los grupos de 200 y 300 $\mu\text{g/L}$, lo que se puede justificar con lo antes mencionado, el grado de estrés en el que se encuentran los organismos.

A pesar de no tener una caracterización de las micropartículas de ABS se pudo hacer un análisis tanto del tamaño como de la forma de las micropartículas, siendo físicamente posible la ingesta de estas por los organismos, sin embargo, es necesario realizar la caracterización de las micropartículas para atender a las recomendaciones de entidades internacionales (JECFA, EFSA), en consecuencia de que México no cuenta con leyes ni recomendaciones en cuanto a producción, seguridad, manejo o desecho de micropartículas, en general necesaria una legislación nacional para atender lo antes mencionado, obteniendo los valores de tamaño promedio de las micropartículas, tamaño superficial, carga, si se aglomeran, entre otras características, para tener la posibilidad de replicar las pruebas de la manera más fidedigna posible.

En el caso del análisis en el tracto digestivo se puede inferir que los organismos consumieron microplásticos de ABS gracias a la observación en el microscopio estereoscópico, además que el análisis de fluorescencia en el microscopio se demuestra la capacidad que tienen los organismos de *D. pulex* para consumir microplásticos, además que se observó que los microplásticos también pueden acumularse en diferentes partes del cuerpo de los organismos, sin embargo, es importante realizar análisis mucho más contundentes para asegurar el consumo de microplásticos por parte de los cladóceros empleando técnicas de microscopía de barrido por ejemplo. Por otro lado, las observaciones de los desechos es posible corroborar el filtrado de los microplásticos y el paso por el tracto digestivo de las Daphnias, además del análisis del contenido del tracto digestivo visto en el campo

de luz UV en donde se encuentran las micropartículas, por consiguiente, es posible demostrar el consumo de los plásticos.

Para futuros experimentos se recomienda un aumento en las concentraciones, ya que a pesar de que las concentraciones empleadas han tenido efectos adversos en las dinámicas poblacionales se han visto efectos nocivos mas contundentes en cladóceros, además de hacer pruebas con diferentes organismos pertenecientes al grupo del plancton, otro tipo de cladóceros incluso rotíferos, realizar ensayos con el plástico expuesto a radiación UV para evaluar químicos que se puedan desprender de los microplásticos, además de evaluar la capacidad de los microplásticos para ser sustrato de bacterias o algas que pudieran modificar la cantidad de nutrientes disponibles para los organismos (Li et al, 2019).

9 Conclusiones

Es evidente que existe un efecto asociado a los microplásticos de Acrilonitrilo-Butadieno- Estireno (ABS) sobre la tabla de vida demográfica del cladóceros de agua dulce *Daphnia pulex*:

- Se demostró que *D. pulex* al estar expuestas a concentraciones de microplásticos, disminuye su supervivencia y esperanza de vida, además de un aparente aumento en la natalidad provocado por estrés.
- En cuanto a los valores demográficos, hubo una tendencia al incremento en la reproducción directamente proporcional a las concentraciones de microplásticos de ABS y una disminución inversamente proporcional a las concentraciones de microplásticos de ABS.
- Para los análisis visuales se logró observar microplásticos de ABS en el tracto digestivo de los organismos, sin embargo, son necesarias más pruebas robustas para confirmar el consumo.

Los resultados obtenidos representan un peligro, ya que se tiene escaso conocimiento de los efectos finales que pueden suscitarse después de la exposición a microplásticos, no solo para el género si no para el orden Cladóceros, además del resto de organismos planctónicos y de niveles tróficos con los que interactúa, siendo el ser humano uno de los grupos posiblemente afectados.

Aunado a todo esto, son necesarias más pruebas con un rango de concentraciones más amplio, más alto y más bajo, para determinar cuáles son los factores que provocan los cambios al comportamiento y en los valores típicos de *D. pulex*, además de comprobar si estos cambios son resultado de la toxicidad provocada por los microplásticos o estrés por un ambiente no habitual en los cladóceros.

10 Literatura citada

Acosta F. 2005. Characterization Of The Zooplankton Of Flood Plain Lakes In The Várzea of River Ichilo (Cochabamba - Bolivia). *Rev. Bol. Ecol.* 17: 01-14.

Auta, H. S., Emenike, C. U., & Fauziah, S. H. 2017. Distribution and importance of microplastics in the marine environment: a review of the sources, fate, effects, and potential solutions. *Environment international*, 102, 165-176.

Chang M. 2015. Reducing microplastics from facial exfoliating cleansers in wastewater through treatment versus consumer product decisions. *Mar Pollut Bull.* Dec 15;101(1):330-3.

Clément L, Hurel C, & Marmier N. 2013. Toxicity of TiO₂ nanoparticles to cladocerans, algae, rotifers and plants – Effects of size and crystalline structure. *Chemosphere*, 90(3), 1083–1090.

Cole M., Lindeque, P., Halsband, C., & Galloway, T. S. 2011. Microplastics as contaminants in the marine environment: A review. *Marine Pollution Bulletin*, 62(12), 2588–2597.

Dafne Eerkes-Medrano, Richard C. Thompson David C. Aldridge 2015, Microplastics in freshwater systems: A review of the emerging threats, identification of knowledge gaps and prioritisation of research needs. Aquatic Ecology Group, Department of Zoology, University of Cambridge, Downing Street, Cambridge CB2 3EJ, United Kingdom

EFSA, 2016. Presence of microplastics and nanoplastics in food, with particular focus on seafood. *EFSA J.*, 14(6): 4501.

Fossi, M. C., Marsili, L., Bains, M., Giannetti, M., Coppola, D., Guerranti, C., ... Panti, C. 2016. Fin whales and microplastics: The Mediterranean Sea and the Sea of Cortez scenarios. *Environmental Pollution*, 209, 68–78.

European Food Safety Authority (EFSA), 2016, The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. European Centre for Disease Prevention and Control. 228 pp.

Gerhard, M. (2015). Rol del banco de efipios en la variación anual de la comunidad de cladóceros en un lago somero subtropical.

GESAMP. 2015. "Sources, fate and effects of microplastics in the marine environment: a global assessment". (Kershaw, P. J., ed.). (IMO/FAO/UNESCO-IOC/UNIDO/WMO/IAEA/UN/UNEP/UNDP Joint Group of Experts on, Rep. Stud. GESAMP No. 90, 96 p.

Góngora Pérez J P. 2014. La industria del plástico en México y el mundo. Comercio Exterior, volumen 64, número 5, pag 1-4.

Hamilton, R. F., Wu, N., Porter, D., Buford, M., Wolfarth, M., & Holian, A. 2009. Particle length-dependent titanium dioxide nanomaterials toxicity and bioactivity. *Particle and fibre toxicology*, 6(1), 35.

Heugens, E. H., Tokkie, L. T., Kraak, M. H., Hendriks, A. J., Van Straalen, N. M., & Admiraal, W. (2006). Population growth of *Daphnia magna* under multiple stress conditions: joint effects of temperature, food, and cadmium. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 25(5), 1399-1407.

Hoellein, T.J., McCormick, A., Kelly, J.J., 2014. Riverine microplastic: abundance and bacterial community colonization. In: Joint Aquatic Sciences Meeting. Portland, OR, USA. Abstract.

Imhof, H.K., Ivleva, N.P., Schmid, J., Niessner, R., Laforsch, C., 2013. Contamination of beach sediments of a subalpine lake with microplastic particles. *Curr. Biol.* 23 (19), R867eR868.

Jemec A, Horvat P, Kunej U, Bele M, Kržan A 2016 Uptake and effects of microplastic textile fibers on freshwater crustacean *Daphnia magna*. *Environ Pollut* 219:201–209.

Karami, A., Romano, N., Galloway, T., & Hamzah, H. (2016). Virgin microplastics cause toxicity and modulate the impacts of phenanthrene on biomarker responses in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Environmental research*, 151, 58-70.

LAJUS, D. L., & ALEKSEEV, V. R. 2004. Phenotypic variation and developmental instability of life-history traits: a theory and a case study on within-population variation of resting eggs formation in *Daphnia*. *Journal of Limnology*, 63(1s), 37.

LeMoine, C.M.R., Kelleher, B.M., Lagarde, Raphaë., Northam, C., Elebute, O.O., Cassone, B.J. 2018, Transcriptional effects of polyethylene microplastics ingestion in developing zebrafish (*Danio rerio*), *Environmental Pollution*.

Lehtiniemi, M., Hartikainen, S., Näkki, P., Engström-Öst, J., Koistinen, A., & Setälä, O. (2018). Size matters more than shape: Ingestion of primary and secondary microplastics by small predators. *Food webs*, 17, e00097.

Li, J., Liu, H., & Chen, J. P. 2018. Microplastics in freshwater systems: A review on occurrence, environmental effects, and methods for microplastics detection. *Water Research*, 137, 362-374.

Li, W., Zhang, Y., Wu, N., Zhao, Z., Xu, W., Ma, Z., and Niu, Z. 2019 Colonization Characteristics of Bacterial Communities on Plastic Debris Influenced by Environmental Factors and Polymer Types in the Haihe Estuary of Bohai Bay, China *Environmental Science & Technology* 2019 53 (18), 10763-10773.

Lima, A. R. A., Barletta, M., & Costa, M. F. 2015. Seasonal distribution and interactions between plankton and microplastics in a tropical estuary. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 165, 213–225.

Liu, M., Lu, S., Song, Y., Lei, L., Hu, J., Lv, W., ... & He, D. (2018). Microplastic and mesoplastic pollution in farmland soils in suburbs of Shanghai, China. *Environmental pollution*, 242, 855-862.

Lusher, A.L.; Hollman, P.C.H.; Mendoza-Hill, J.J. 2017 Microplastics in fisheries and aquaculture: status of knowledge on their occurrence and implications for aquatic organisms and food safety. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper*. No. 615. Rome, FAO.

Ma, Y., Huang, A., Cao, S., Sun, F., Wang, L., Guo, H., & Ji, R. (2016). Effects of nanoplastics and microplastics on toxicity, bioaccumulation, and environmental fate of phenanthrene in fresh water. *Environmental pollution*, 219, 166-173.

Martínez-Jerónimo, F., Cruz-Cisneros, J. L., & García-Hernández, L. (2008). A comparison of the response of *Simocephalus mixtus* (Cladocera) and *Daphnia magna* to contaminated freshwater sediments. *Ecotoxicology and environmental safety*, 71(1), 26-31.

Meeker J. D., Sathyanarayana S., Swan S. H. 2009, Phthalates and other additives in plastics: human exposure and associated health outcomes, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2009 Jul 27; 364(1526): 2097–2113.

Piñon-Colin, T. de J., Rodríguez-Jimenez, R., Pastrana-Corral, M. A., Rogel-Hernandez, E., & Wakida, F. T. 2018. Microplastics on sandy beaches of the Baja California Peninsula, Mexico. *Marine Pollution Bulletin*, 131, 63–71.

PlasticsEurope, 2018, Plásticos – Situación en 2017 Un análisis de los datos sobre producción, demanda y residuos de plásticos en Europa. European Association Of Plastics Recycling and Recovery Organisations, 50 pp.

Possatto, F.E., Barletta, M., Costa, M.F., Ivar do Sul, J.A., Dantas, D.V., 2011. Plastic debris ingestion by marine catfish: an unexpected fisheries impact. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 1098e1102.

Retama, I., Jonathan, M. P., Shruti, V. C., Velumani, S., Sarkar, S. K., Roy, P. D., & Rodríguez-Espinosa, P. F. 2016. Microplastics in tourist beaches of Huatulco Bay, Pacific coast of southern Mexico. *Marine Pollution Bulletin*, 113(1-2), 530–535.

Rosenkranz P, Chaudhry Q, Stone V, Fernandes TF 2009 A comparison of nanoparticle and fine particle uptake by *Daphnia magna*. *Environ Toxicol Chem* 28(10):2142–2149.

SARMA, S. S. S., & NANDINI, S. (2006). *Review of Recent Ecotoxicological Studies on Cladocerans. Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 41(8), 1417–1430.

Setälä, O., Fleming-Lehtinen, V., & Lehtiniemi, M. 2014. Ingestion and transfer of microplastics in the planktonic food web. *Environmental Pollution*, 185, 77–83.

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

Shurin, J. B., & Dodson, S. I. (1997). *Sublethal toxic effects of cyanobacteria and nonylphenol on environmental sex determination and development in Daphnia*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16(6), 1269–1276.

Sun, X., Li, Q., Zhu, M., Liang, J., Zheng, S., & Zhao, Y. (2017). Ingestion of microplastics by natural zooplankton groups in the northern South China Sea. *Marine pollution bulletin*, 115(1-2), 217-224.

ul Haq, R., Rehman, A., & Shakoori, A. R. (2001). Survival, culturing, adaptation and metal resistance of various rotifers and a gastrotrich (Minor phyla) isolated from heavily polluted industrial effluents. *Pakistan Journal of Zoology (Pakistan)*.

United Nations Environment Programme (UNEP) 2008, Annual Report, Division of Communications and Public Information, 28-42 ppp.

Von Moos, N., Burkhardt-Holm, P., & Köhler, A. (2012). Uptake and Effects of Microplastics on Cells and Tissue of the Blue Mussel *Mytilus edulis* L. after an Experimental Exposure. *Environmental Science & Technology*, 46(20), 11327–11335.

Wright, S. L., Thompson, R. C., & Galloway, T. S. 2013. *The physical impacts of microplastics on marine organisms: A review*. *Environmental Pollution*, 178, 483–492.

Zitko, V., Hanlon, M., 1991. Another source of pollution by plastics: skin cleansers with plastic scrubbers. *Marine Pollution Bulletin* 22, 41–42.

11 Anexos Análisis estadísticos

Anexo 1. Supervivencia, Análisis de varianza

Grupo	N	Perdidas	Mediana	25%	75%
Control	88	0	9.000E+000	6.000E+000	1.000E+001
200	116	0	7.000E+000	4.000E+000	8.500E+000
300	98	0	6.000E+000	3.000E+000	8.000E+000

Diferencia estadísticamente significativa (P=<0.001)

Anexo 2. Supervivencia, comparación múltiple por pares de supervivencia (Método de Dunn)

Comparación	Diferencia de rangos	Q	P<0.05
Control vs 300	5.914E+001	4.611E+000	si
Control vs 200	4.410E+001	3.573E+000	si
200 vs 300	1.503E+001	1.255E+000	No

Anexo 3. Fecundidad, Análisis de varianza

Nombre del Tratamiento	N	Pérdidas	Media	Std Dev	SEM
Control	77	0	4.857E+000	6.615E+000	7.538E-001
200	115	0	4.591E+000	6.267E+000	5.844E-001
300	101	0	5.010E+000	6.782E+000	6.748E-001

Anexo 3.1. Complemento

Fuente de Variación	DF	SS	MS	F	P
Entre sujetos	114	4.855E+003	4.259E+001	7.956E-002	0.924
Entre Tratamientos	2	6.823E+000	3.412E+000		
Residual	176	7.547E+003	4.288E+001		
Total	292	1.241E+004	4.251E+001		

Anexo 4. Esperanza de Vida, Análisis de varianza

Nombre de Tratamientos	N	Pérdidas	Media	Std Dev	SEM
Control	87	0	8.397E+000	5.107E+000	5.475E-001
200	116	0	1.034E+001	5.982E+000	5.554E-001
300	98	0	8.239E+000	4.669E+000	4.716E-001

Anexo 4.1. Complemento

Fuente de Variación	DF	SS	MS	F	P
Entre sujetos	115	3.390E+003	2.948E+001	9.525E+000	<0.001
Entre Tratamientos	2	5.290E+002	2.645E+002		
Residual	183	5.082E+003	2.777E+001		
Total	300	8.767E+003	2.922E+001		