



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES IZTACALA**

**Toxicidad individual y combinada de la
oxitetraciclina y cobre en el rotífero marino
*Brachionus ibericus***

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIOLÓGO**

P R E S E N T A:

JOSÉ MIGUEL MÉNDEZ HERNÁNDEZ

Director de tesis:

Dr. Uriel Arreguin Rebolledo

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. Méx.
Septiembre, 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.

Índice

I. Introducción	4
II. Antecedentes	9
II. 1. Rotíferos en ecotoxicología.....	9
II.2. Impacto ambiental de la acuicultura en México	10
II.3. Oxitetraciclina	11
II.4. Cobre	11
II.5. Efectos de la toxicidad combinada de OTC y Cu	12
III. Justificación	14
IV. Objetivo general	15
IV.1. Objetivos particulares	15
V. Hipótesis	15
VI. Materiales y métodos	16
VI.1. Cultivo y mantenimiento de los rotíferos	16
VII.2. Soluciones stock	16
VII.4. Toxicidad aguda de la combinación OTC-Cu.....	17
VII.5. Toxicidad crónica de la exposición individual y combinada de OTC y Cu ...	18
VII.6. Análisis de los datos	20
VII. Resultados	21
VII.1. Toxicidad aguda (CL_{50}) y unidad tóxica (UT_{50}).....	21
VII.2. Toxicidad crónica de la exposición individual y combinada de OTC y Cu ...	22
VIII. Discusión	27
IX. Conclusiones	33
X. Referencias	34

Resumen

La acuicultura marina es una fuente potencial importante de agentes antibacterianos y metales pesados para los ambientes acuáticos. A nivel global, la oxitetraciclina (OTC) y el cobre (Cu) se utilizan ampliamente en tierras agrícolas y acuícolas, por lo que es de suponer una posible interacción en el campo. En este estudio se utilizó al rotífero eurihalino *Brachionus ibericus* para evaluar los efectos de la toxicidad aguda y crónica de la OTC y Cu, solos y en combinación, a dos salinidades (15 y 35 UPS). La CL₅₀ se determinó probando siete concentraciones de OTC (1 – 150 mg/L) y de Cu (1 – 100 µg/L). Para estimar la UT₅₀, el valor de CL₅₀ de cada químico fue multiplicado por siete factores de aplicación (FA: 0.1 – 1.5) y se mezclaron a una razón de 1:1 (OTC-Cu). La toxicidad crónica de la OTC y Cu, individual o mezcla, se evaluó mediante ensayos de reproducción de cinco días usando 0.05, 0.1, 0.2 y 0.4 como FA, respecto a la CL₅₀. i) La CL₅₀ de OTC, Cu y la UT₅₀ de la mezcla a 15 UPS fue 57.24 mg/L, 42.04 µg/L, y 0.42, respectivamente. A 35 UPS, la CL₅₀ de OTC fue 76.24 mg/L; Cu, 51.99 µg/L; y la UT₅₀ de la mezcla, 0.35. ii) Las tasas de incremento fueron significativamente menores bajo la mezcla que en la exposición individual a OTC y Cu. Individualmente o en combinación, la OTC y el Cu fueron ligeramente más tóxicos a 15 que 35 UPS. iii) En la mayoría de los casos, la mezcla OTC-Cu indujo efectos sinérgicos sobre la tasa de incremento poblacional de *B. ibericus* a 15 y 35 UPS. La contaminación por Cu es muy común en los ambientes costeros y aquí se demostró que intensifica la vulnerabilidad de los organismos cuando interactúa con un antibiótico de uso común en la acuicultura. Los efectos sinérgicos producidos por la combinación de sustancias químicas merecen mayor atención en la evaluación de riesgos ecológicos más realistas.

Palabras clave: Rotíferos; Ecotoxicología; CL₅₀; UT₅₀; Sinergismo

I. Introducción

Actualmente, se han descrito más de 2300 especies de rotíferos alrededor del mundo y cerca de 400 especies en México (Sarma et al., 2021). Los rotíferos son microinvertebrados (25 – 2500 μm) que habitan en casi todos los ecosistemas acuáticos. Son fundamentales en la estructura ecológica de los sistemas de agua dulce y marinos. En particular, las especies del complejo *Brachionus plicatilis* se han utilizado durante mucho tiempo como organismos modelo en la evaluación del riesgo ambiental (Dahms et al., 2011). Hasta hoy, se han descrito al menos 15 especies de rotíferos del complejo *B. plicatilis*, incluyendo *B. rotundiformis*, *B. manjavacas*, *B. koreanus* y *B. ibericus* (Mills et al., 2017).

Los rotíferos desempeñan un papel cada vez más importante en la evaluación del riesgo ambiental debido a su i) relevancia ecológica, ii) pequeño tamaño, iii) ciclos de vida cortos, iv) reproducción partenogenéticamente que permite alcanzar altas tasas de crecimiento poblacional y altas densidades en tiempos razonables, v) poca variabilidad genética entre las poblaciones de prueba y, vi) la producción de huevos diapáusicos, los cuales se pueden almacenar en el laboratorio por mucho tiempo para la experimentación (Dahms et al., 2011; Snell et al., 2019).

Los metales pesados y los antibióticos son dos grupos de contaminantes ambientales preocupantes. A medida que aumenta la demanda industrial (p. ej. ganadería y la acuicultura), incrementa la probabilidad de que las concentraciones ambientales tanto de metales pesados como de antibióticos aumenten en los ambientes acuáticos (Wang et al., 2018).

Los antibióticos son compuestos naturales, sintéticos o semisintéticos que pueden matar o inhibir el crecimiento o la actividad metabólica de los microorganismos y son considerablemente utilizados en la sociedad moderna para tratar tanto humanos como animales (Kovalakova et al., 2020). El motivo de preocupación ambiental es que los antibióticos se usan masivamente en el cultivo de organismos acuáticos (peces y crustáceos), donde comúnmente se aplican en grandes cantidades directamente en el agua o la dieta de los animales (Shao, 2001).

La oxitetraciclina (OTC) es un antibiótico que pertenece al grupo de las tetraciclinas y se produce por *Streptomyces*, que tiene altos efectos inhibidores sobre las bacterias (He et al., 2020). La OTC es uno de los antibióticos más utilizados en la acuicultura, principalmente por su eficacia, bajo costo, alta potencia y amplio espectro (Daghrir & Drogui, 2013). Cuando la OTC se administra en la dieta de los organismos, solo se absorben entre el 10 y 30% del compuesto y más del 70% ingresa al medio ambiente en su forma activa, mientras que, cuando se aplica directamente en los estanques de cultivo, el 100% de antibiótico tiene el potencial de introducirse al medio ambiente a través de las descargas acuícolas (Kovalakova et al., 2020). En el noroeste de México (Nayarit, Sinaloa y Sonora) la OTC es altamente utilizada para el control de *Vibrio* en los cultivos del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Lyle-Fritch et al., 2006); los ecosistemas más vulnerables a la contaminación por este antibiótico son los humedales, estuarios y las lagunas costeras cercanos a la región acuícola.

Ya sea de manera natural o antropogénica, los metales pesados están presentes en casi todos los ecosistemas acuáticos. Según su función biológica, estos elementos químicos pueden clasificarse como esenciales o no esenciales (Ansari et al., 2004). Metales como el Cu (cobre), Zn (zinc), Cr (cromo) y Fe (hierro) son esenciales en la homeostasis de los organismos acuáticos, mientras que el arsénico (As), mercurio (Hg), plomo (Pb) y cadmio (Cd) son elementos sin función biológica, que incluso a aún en concentraciones bajas pueden ser altamente tóxicos para la vida (Farrell et al., 2012; Wood et al., 2012). Independientemente de su función, todos los metales pueden atravesar las paredes celulares (Foulkes, 2000). Primero, se bioconcentran y biacumulan en los animales y después se biomagnifican a través de la cadena trófica; lo que incrementa un riesgo ambiental en humanos y la biota acuática (Ali et al., 2019).

El Cu es contaminante típico en tierras agrícolas y acuícolas (Páez-Osuna et al., 2017). La persistencia del Cu en los ambientes marinos se debe a que se utiliza comúnmente como a) suplemento alimenticio para los organismos en cautiverio tales como *L. vannamei* (Lyle-Fritch et al., 2006), b) biocida para controlar el brote de algas indeseadas en los estanques acuícolas y c) antiincrustante en los cultivos de moluscos (Fitridge et al., 2012). En ambientes perturbados de México, incluyendo humedales y aguas marinas, se han detectado concentraciones considerables de Cu. El cobre es un elemento de alta relevancia ambiental ya que aún en concentraciones muy bajas resulta altamente tóxico para la vida acuática (Ansari et al., 2004).

Los antibióticos y los metales pesados se detectan cada vez más en los ambientes acuáticos, cuyas mezclas incrementan las preocupaciones ecotoxicológicas, dado que la vulnerabilidad de los organismos a la contaminación se intensifica cuando las sustancias interactúan en un mismo escenario (Zhang et al., 2012). En ecotoxicología, la exposición a la mezcla de al menos dos sustancias químicas puede producir una respuesta 1) aditiva, es decir, el efecto de la combinación de las dos sustancias es igual a la toxicidad observada en la exposición individual, 2) respuesta de sinergismo, se observa cuando la toxicidad de la mezcla es mucho mayor que la suma de los efectos individuales de las sustancias, y 3) antagonismo, se refiere a una respuesta de menor de toxicidad cuando se combinan las sustancias que cuando están por separado (Preston et al., 2000). A pesar de que es bien sabido que los contaminantes interactúan constantemente en el ambiente, todavía son escasos los estudios que se enfocan en evaluar los efectos de las mezclas como un escenario real que suelen enfrentar muchos organismos acuáticos (Wu et al., 2016; Rebolledo et al., 2022).

Los efectos tóxicos de las mezclas tienden a incrementar cuando los organismos son expuestos a un estrés fisiológico causado por la salinidad del agua (Heugens et al., 2001). La salinidad es un factor clave en la diversidad y distribución de las especies (Telesh et al., 2013). En los ambientes marinos incluyendo humedales, estuarios, lagunas y aguas marinas, la salinidad oscila de 0.05 a 38 UPS (unidades prácticas de salinidad) (Vazquez et al., 1991). Muchos invertebrados acuáticos son eurihalinos, es decir toleran un amplio rango de salinidad para crecer y reproducirse, sin embargo, los costos fisiológicos de la

osmorregulación afectan su desempeño biológico (Heugens et al., 2001). La salinidad juega un papel clave en la toxicidad de los metales pesados. Por ejemplo, a baja salinidad, la toxicidad del Cu se intensifica debido a que existe una mayor disponibilidad de iones metálicos en el ambiente, en contraste, a mayor salinidad, la toxicidad tiende a disminuir (Piazza et al., 2016). En este contexto, es importante tener una mejor comprensión sobre la respuesta de los organismos a escenarios más realistas en donde las fluctuaciones de salinidad y la mezcla de contaminantes son muy comunes.

El rotífero *B. ibericus* es una especie eurihalina que comúnmente habita en estanques de camarón del noroeste de México (Rebolledo et al., 2018). En estos estanques los cambios de salinidad son muy constantes (5 – 68 UPS), así como la entrada de antibióticos y metales pesados (Lyle-Fritch et al., 2006). *Brachionus ibericus* ha sido introducido en la ecotoxicología marina como una especie prometedora en la evaluación del riesgo ambiental de la contaminación por metales pesados en diferentes escenarios de salinidad (Rebolledo et al., 2020).

En este trabajo se utilizó al rotífero *B. ibericus* para analizar los efectos individuales y combinados de la oxitetraciclina y el cobre (sustancias químicas utilizadas en la acuicultura del noroeste de México) en diferentes escenarios de salinidad.

II. Antecedentes

II. 1. Rotíferos en ecotoxicología

El término ecotoxicología fue introducido a finales de los años 60 e implica el conocimiento de tres disciplinas principales: toxicología, ecología y química. En su conjunto, la ecotoxicología es el estudio de los efectos de las sustancias químicas sobre las especies desde un nivel subcelular hasta la biosfera (Traas & Van Leeuwen, 2007). Los estudios ecotoxicológicos como las pruebas agudas (CL_{50} = concentración letal que mata o inhibe al 50% de organismos expuestos a un químico en un determinado tiempo) y las pruebas crónicas (exposición prolongada a concentraciones subletales del químico) son importantes para la evaluación del riesgo ambiental (ERA) de los contaminantes de forma individual o de mezclas complejas. ERA es un proceso para evaluar la probabilidad de que el medio ambiente se vea afectado como resultado de la exposición a uno o más factores ambientales estresantes (McIntosh & Pontius, 2016).

Los primeros estudios ecotoxicológicos con rotíferos comenzaron en los años 80 (Halbach et al., 1983). Desde entonces los rotíferos han servido para evaluar los efectos tóxicos de pesticidas, metales pesados, nutrientes, derivados del petróleo, fármacos, microplásticos, entre otros (Dahms et al., 2011). Los rotíferos *B. calyciflorus* y *B. plicatilis* son especies estandarizadas para estudios ecotoxicológicos de agua dulce y marina, respectivamente. Hasta hoy, *B. plicatilis* ha sido el rotífero más estudiado en ecología, biología evolutiva, acuicultura y las ciencias ambientales (Won et al., 2017). En ecotoxicología marina la mayoría de

trabajos se han limitado a especies del complejo *B. plicatilis* (alrededor de cinco especies), mientras que para agua dulce se han probado más de 20 especies diferentes (Won et al., 2017; Rico-Martínez et al., 2017). *Brachionus ibericus* es un organismo representativo de los ambientes costeros y ha demostrado ser un buen organismo modelo para evaluar los efectos de la contaminación costera (Rebolledo et al., 2020).

II.2. Impacto ambiental de la acuicultura en México

La acuicultura del camarón blanco (*L. vannamei*) en México se desarrolla principalmente al noroeste del país. Tan solo en 2017, se reportó una producción acuícola de 404,551 toneladas. La mayor parte de esta producción fue por los estados de Sonora y Sinaloa (Porchas-Cornejo et al., 2018). A pesar de que esta actividad económica beneficia al país, existe una creciente preocupación debido a la gran variedad de productos químicos usados en las granjas de camarón y sus posibles impactos al medio ambiente (Lyle-Fritch et al., 2006). Entre los productos químicos de mayor utilización se encuentran los antibióticos como la oxitetraciclina y compuestos de cobre como el sulfato de cobre. De acuerdo con Lyle-Fritch et al. (2006), se aplican de 3 a 5 kg de OTC por tonelada de alimento en un periodo de 7 a 14 días continuos a fin de eliminar bacterias no deseadas. Por otra parte, el sulfato de cobre, que es utilizado como como suplemento y biocida en la mayoría de las granjas, se adiciona en una cantidad aproximada de 5 kg por hectárea. Es predecible que cantidades sustanciales de estos químicos terminan en los ecosistemas costeros circundantes, lo que plantea un riesgo ambiental persistente.

II.3. Oxitetraciclina

En las últimas décadas el uso de la oxitetraciclina ha aumentado con el desarrollo de la acuicultura (Li et al., 2019). Como consecuencia, se han detectado hasta 4695 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de OTC en sedimentos de un estuario (Liu et al., 2016). A pesar del extenso uso de OTC en la acuicultura del noroeste de México (Lyle-Fritch et al. 2006), no existe literatura actualizada sobre las cantidades aplicadas del antibiótico, ni de sus niveles ambientales en la zona costera de la región. Se ha encontrado que la presencia de OTC produce efectos en la biota acuática. Por ejemplo, en peces afecta el desarrollo embrionario (Oliveira et al., 2013) y en invertebrados como la *Artemia* disminuye su crecimiento poblacional (Ferreira et al., 2007). La sensibilidad de los invertebrados acuáticos a la OTC es variable. Para los cladóceros *Daphnia magna* y *Ceriodaphnia dubia*, se reportó una CE_{50} (concentración efectiva) de 197 – 669 y 18.65 mg/L de OTC, respectivamente (Kolar et al., 2014; Isidori et al., 2005). En el crustáceo, *A. ceoparthenogenetica*, la CE_{50} es de 871 mg/L (Ferreira et al., 2007) y para *Thamnocephalus platyurus* de 25 mg/L, mientras que el rotífero *B. calyciflorus* tiene una CE_{50} de 27.53 mg/L (Isidori et al., 2005). Se ha reportado que rotífero marino *B. rotundiformis* tolera concentraciones crónicas de 10 a 1000 $\mu\text{g}/\text{L}$ de OTC (Park et al., 2018).

II.4. Cobre

El cobre es un elemento esencial, sin embargo, en concentraciones de 1 – 10 $\mu\text{g}/\text{L}$, es muy peligroso para la vida acuática (Ansari et al., 2004). En ambientes de agua dulce de México se han detectado hasta 1992 $\mu\text{g}/\text{L}$ de Cu (García-

Hernández et al., 2013), mientras que, en aguas marinas los niveles oscilan de 1.61– 48.52 µg/L (Jonathan et al., 2011). En rotíferos de ambientes salobres o marinos, la toxicidad del cobre varía según la especie, por ejemplo, la CL₅₀ para *B. plicatilis* es de 63 µg/L (Snell et al., 1991); 1200 µg/L para *B. koreanus* (Han et al., 2013); 39 – 110 µg/L para *P. similis*, según la salinidad (Rebolledo et al., 2021); y en una cepa del complejo *B. plicatilis*, la CL₅₀ resulto ser de 4900 µg/L (Snell & Persoone, 1989). En copépodos marinos como *Tigriopus brevicornis* y *T. japonicus*, la CL₅₀ oscila de 150 µg/L a 32.75 mg/L, siendo esta última la más elevada para este grupo de zooplancton (Barka et al. 2001; Park et al., 2014). En rotíferos, la toxicidad del Cu tiende hacer más alta a baja que a mayor salinidad (Rebolledo et al., 2021), no obstante, se ha observado que este hecho puede cambiar según la adaptabilidad de las especies a los cambios de salinidad, en donde el costo metabólico en osmorregulación podría aumentar la vulnerabilidad de los organismos a medida que aumenta la salinidad (Gama-Flores et al., 2005).

II.5. Efectos de la toxicidad combinada de OTC y Cu

Los metales pesados y los fármacos tienen el potencial de interactuar en los sistemas acuáticos (Alsop & Wood, 2013). Los efectos de la mezcla de un metal pesado y un fármaco son variables. Por ejemplo, Rebolledo et al. (2022), reportaron que la combinación de Cu y cloroquina induce efectos sinérgicos en el crecimiento del rotífero *P. similis*. Gomiero & Viarengo (2014), encontraron que al mezclar OTC y Cu, las respuestas biológicas son sinérgicas tanto en la tasa de endocitosis de protozoos como en los lisosomales. En la lombriz de tierra *Eisenia*

fétida, Gao et al. (2014), observaron que a nivel celular las mezclas de OTC y Pb pueden producir efectos antagónicos y sinérgicos, según la concentración de los químicos. Otro ejemplo de antagonismo fue detectado al combinar carbamazepina y Cd, que producen efectos biológicos menores que la toxicidad individual de cada químico en la almeja *Ruditapes philippinarum* (Almeida et al., 2018). Al combinar Cu con otras sustancias como biocidas (Irgarol), también se han presentado fuertes efectos sinérgicos en la supervivencia y crecimiento del copépodo *Tigriopus japonicus* (Bao et al., 2013). En este contexto, la contaminación por Cu en los ambientes marinos merece mayor atención en la evaluación del riesgo ambiental dada su persistencia, concentraciones ambientales considerables y alta toxicidad para la vida acuática (Rebolledo et al., 2022). Es importante mencionar que como en la toxicidad individual, los cambios en la salinidad del agua influyen en la toxicidad de las mezclas de contaminantes, que en algunos casos suelen intensificar los efectos de los tóxicos por sí solos (Damasceno et al., 2017).

III. Justificación

Los antibióticos como la oxitetraciclina y los metales como el cobre son ampliamente utilizados en acuicultura del camarón blanco del noroeste de México. Los antibióticos son necesarios para prevenir y eliminar enfermedades en los organismos en cautiverio, mientras que el cobre se usa como suplemento y biocida en los estanques de cultivos. Si bien, ambos químicos benefician la producción acuícola de camarón, existe una creciente preocupación por las altas descargas de estos contaminantes en el ambiente marino. *Brachionus ibericus* es un rotífero que habita tanto en estanques camaroneros como en estuarios y lagunas costeras cercanas a las granjas camaroneras. El elevado uso de químicos en la acuicultura incrementa la persistencia y concentraciones de OTC y Cu en el ambiente. En este trabajo se evalúa el potencial riesgo ambiental de la oxitetraciclina y cobre solos o combinados para invertebrados que forman parte fundamental en la estructura ecológica de los sistemas marinos. Hasta ahora no existe información disponible sobre la toxicidad combinada de la OTC y Cu en rotíferos de ambientes marinos como *B. ibericus*. Esta especie de rotífero fue recientemente introducida en la ecotoxicología marina y es necesario seguir explorando su potencial como organismo modelo en estudios ecotoxicológicos. Los datos generados en esta investigación pueden ser potencialmente utilizados en programas de regulación ambiental.

IV. Objetivo general

El objetivo global de esta investigación es evaluar la toxicidad aguda y crónica de la oxitetraciclina sola y en combinación con el cobre para el rotífero *B. ibericus* expuesto a dos escenarios de salinidad.

IV.1. Objetivos particulares

1. Determinar la concentración letal media (CL₅₀) de la oxitetraciclina (OTC) y cobre (Cu) en el rotífero *Brachionus ibericus* expuesto a 15 y 35 UPS
2. Estimar la UT₅₀ de mezcla OTC-Cu en *B. ibericus* a 15 y 35 UPS
3. Evaluar los efectos crónicos (tasa de incremento poblacional) de la toxicidad individual y combinada de la OTC y Cu en *B. ibericus* a 15 y 35 UPS
4. Determinar el tipo de efecto aditivo que producen las mezclas OTC-Cu en la tasa de incremento poblacional del rotífero

V. Hipótesis

Se planteo la hipótesis que el crecimiento poblacional del rotífero *B. ibericus* será afectado en mayor medida bajo una mezcla de OTC-Cu que cuando se expone por separado a cada químico. La segunda hipótesis fue que la toxicidad individual y combinada de Cu será mayor a en condiciones de baja salinidad, donde existe mayor disponibilidad de los iones metálicos libres en el medio.

VI. Materiales y métodos

VI.1. Cultivo y mantenimiento de los rotíferos

El rotífero *B. ibericus* fue originalmente aislado de una granja camaronera (23° 09' 10.53'' N y 106° 18'22.83" W) ubicada al sur de Mazatlán, Sinaloa, México. Desde entonces, se ha mantenido en el laboratorio de Geoquímica y Contaminación Costera – ICMYL, Mazatlán, UNAM. Los organismos fueron cultivados a dos salinidades, 15 y 35 UPS, que representan las condiciones de un sistema lagunar estuarino y un ambiente marino, respectivamente. Los cultivos se mantuvieron en matraces de vidrio de 200 mL y se cambiaron cada tres a cuatro días. El medio salobre y marino se prepararon disolviendo sal artificial (Instan Ocean) en agua tridestilada. Se utilizó como alimento a la microalga marina *Nannochloropsis oculata*. Esta microalga fue cultivada en matraces de vidrio Erlenmeyer de 1 L a 22 °C, 30 UPS y se enriqueció con el medio F/2 de Guillard. La cosecha de la microalga se realiza cuando alcanza su pico de crecimiento exponencial. Posteriormente, se centrifuga a 3000 rpm por cinco minutos para obtener una solución madre de alimento de 700×10^6 células/mL.

VII.2. Soluciones stock

Las soluciones stock de oxitetraciclina (clorhidrato de oxitetraciclina, 97% pureza, Sigma-Aldrich) y cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, >99% pureza, J.T. Baker), se prepararon disolviendo una cantidad adecuada de cada sal en agua tridestilada, de tal forma que la concentración final fue 1 mg del químico/mL.

VII.3. Toxicidad aguda (CL_{50}) de OTC y Cu

Para poder establecer las concentraciones letales de OTC y Cu, primero se realizaron pruebas de rango de toxicidad. Posteriormente, se seleccionaron siete concentraciones nominales de cada químico para las pruebas de toxicidad aguda (CL₅₀ – 24 h) + un control (sin tóxico).

Brevemente, 12 horas antes de iniciar los ensayos, se tomaron 100 hembra grávidas de *B. ibericus* y se trasladaron a un vial de vidrio con 20 mL de medio de cultivo a fin de obtener neonatos recién nacidos (< 12-h edad) para la experimentación. Todas las pruebas se realizaron en placas estériles de cultivo celular de 24 pocillos (Corning Costar®). En cada pocillo se administró 1 mL de medio con las concentraciones deseadas de OTC y Cu a las salinidades de 15 y 35 UPS. Después, se introdujeron 10 neonatos de *B. ibericus* en cada pocillo. Cada tratamiento tuvo cuatro réplicas. No se adicionó alimento. Las placas se mantuvieron en la oscuridad a 25 °C de temperatura por 24 horas. Después del tiempo establecido, se contó el número de organismos vivos en cada pocillo con ayuda de un estereomicroscopio. La concentración letal se determinó utilizando el método Probit (Finney, 1971).

VII.4. Toxicidad aguda (UT₅₀) de la combinación OTC-Cu

Para determinar la toxicidad de mezcla OTC-Cu se utilizaron los valores de CL₅₀ de cada químico en las salinidades probadas. Se usaron siete factores de aplicación (FA) para establecer las diferentes combinaciones de OTC-Cu (razón de mezcla = 1:1). En la Tabla 1, se muestran los diferentes FA y las concentraciones nominales de cada químico. Por ejemplo, en la mezcla OTC-Cu

a 0.10 FA a 15 UPS, se combinó una concentración de 4.2 mg/L de OTC y 5.7 µg/L de Cu y en la mezcla OTC-Cu a 1.5 FA a 35 UPS, se combinaron 78 mg/L de OTC y 114 µg/L de Cu. El diseño experimental para estas pruebas fue el mismo que se describe en la sección VII.3., excepto que los químicos fueron combinados. Se utilizó el análisis Probit para estimar la UT_{50} (unidad tóxica a la que muere el 50% de los organismos expuestos) de la mezcla OTC-Cu y determinar el tipo de efecto aditivo.

Tabla 1. Concentraciones nominales de OTC y Cu según el factor de aplicación (FA) para cada valor de la CL_{50} a diferente salinidad.

FA	LC ₅₀ a 15 UPS		LC ₅₀ a 35 UPS	
	OTC = 57 mg/L	Cu = 42 µg/L	OTC = 76 mg/L	Cu = 52 µg/L
0.10	5.7	4.2	7.6	5.2
0.25	14.3	10.5	19	13
0.50	28.5	21.0	38	26
0.75	42.8	31.5	57	39
1.00	57.0	42.0	76	52
1.25	71.3	52.5	95	65
1.50	85.5	63.0	114	78

VII.5. Toxicidad crónica de la exposición individual y combinada de OTC y Cu

Se utilizaron cuatro concentraciones nominales basadas en 0.05, 0.1, 0.2 y 0.4 como FA para cada valor de CL_{50} de OTC y Cu a diferentes salinidades. Las concentraciones individuales probadas fueron las siguientes: OTC a 15 UPS = 0.05 FA (2.85 mg/L); 0.1 FA (5.7 mg/L); 0.2 FA (11.4 mg/L); y 0.4 FA (22.8 mg/L). Cu a 15 UPS = 0.05 FA (2.1 µg/L); 0.1 FA (4.2 µg/L); 0.2 FA (8.4 µg/L); y 0.4 FA (16.8

µg/L). OTC a 35 UPS = 0.05 FA (3.8 mg/L); 0.1 FA (7.6 mg/L); 0.2 FA (15.2 mg/L); y 0.4 FA (30.6 mg/L). Cu a 35 UPS = 0.05 FA (2.6 µg/L); 0.1 FA (5.2 µg/L); 0.2 FA (10.4 µg/L); y 0.4 FA (20.8 µg/L).

Para los tratamientos de OTC-Cu, se combinó la concentración individual de cada FA a una razón de 1:1. Por ejemplo, la primera mezcla corresponde a 0.05 FA y se mezclaron 2.85 mg/L de OCT y 2.1 µg/L de Cu a la salinidad de 15 UPS. Otra combinación a 0.4 FA corresponde a 30.6 mg/L de OTC + 20.8 µg/L de Cu a la salinidad de 35 UPS.

Brevemente, los bioensayos realizaron en placas estériles de cultivo celular de 24 pocillos (Corning Costar®). El medio experimental fue de 1 mL por réplica. Cada mL contenía las concentraciones deseadas de cada químico individualmente y en combinación, así como las diferentes salinidades probadas. Se agregó una concentración de 1×10^6 célula por mL de *N. oculata* como alimento por única vez durante todo el experimento. En cada mL se introdujeron 10 neonatos de *B. ibericus*. Por cada tratamiento se realizaron cuatro réplicas y un control (sin tóxico).

Las placas se mantuvieron en la oscuridad a 25 °C por cinco días. Después del tiempo establecido, se contó el número de organismos vivos en cada pocillo y se determinó la tasa de incremento poblacional con la siguiente fórmula: $r = (\ln N_t - \ln N_0)/t$, donde, N_t es la densidad final y N_0 es la densidad inicial, t es el tiempo en días.

VII.6. Análisis de los datos

Para determinar el tipo de efecto que produce la mezcla OTC-Cu se utilizó el enfoque de unidades tóxicas (UT) según Broderius et al. (2005). Los efectos aditivos se obtuvieron de la suma de dividir el valor de la tasa de crecimiento (r, d^{-1}) de la mezcla OTC-Cu por el valor r, d^{-1} correspondiente de la suma de la toxicidad de los productos químicos individuales. Si $UT = < 0.8$, la acción representa sinergismo potencial (más que aditivo); $UT = 0.8-1.2$, se indica una acción aditiva (adición de concentración); y si $UT = > 1.2$, la acción indica antagonismo potencial (menos que aditivo).

Se usó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de una prueba post-hoc de Tukey para comparar las diferencias estadísticas entre las medias de los grupos, donde $P < 0.05$ se consideró significativo. Todos los datos se expresan como la media \pm error estándar (SE).

VII. Resultados

VII.1. Toxicidad aguda (CL_{50}) y unidad tóxica (UT_{50})

La CL_{50} de OTC, Cu y la UT_{50} de la mezcla OTC-Cu a 15 UPS para *B. ibericus* fue 57.24 mg/L (39.91 - 82.08), 42.04 μ g/L (34.41 - 51.35), y 0.42 (0.35 - 0.51), respectivamente. A 35 UPS, la CL_{50} de OTC fue 76.24 mg/L (51.32 - 113.26); Cu, 51.99 μ g/L (40.1 - 67.41); y la UT_{50} de la mezcla, 0.35 (0.30 - 0.41).

El valor de UT_{50} (0.42) a 15 UPS indica que el 50% de mortalidad se observa bajo una mezcla de 24.04 mg/L de OTC + 17.64 μ g/L de Cu, es decir 58% menos del valor de CL_{50} individual de cada químico.

Respecto a la UT_{50} (0.35) a 35 UPS, corresponde a 26.68 mg/L de OTC y 18.2 μ g/L de Cu, igual a una reducción del 65% de la CL_{50} individual del químico.

A 35 UPS, las cuatro mezclas de OTC-Cu probadas indujeron efectos sinérgicos y esto fue más fuerte a medida que aumento el FA de cada químico en el medio (Tabla 2). Mientras que, a 15 UPS, se observó un efecto aditivo a 0.1 FA, es decir la toxicidad fue igual en la exposición individual de OTC que en la mezcla OTC-Cu. El resto de las mezclas indujeron efectos sinérgicos.

Tabla 2. Efectos de la mezcla OTC-Cu sobre el crecimiento poblacional de *Brachionus ibericus* a diferentes factores de aplicación (FA) para cada mezcla a diferente salinidad. UT = < 0.8 indica sinergismo potencial y TU = 0.8–1.2 indica un efecto aditivo.

FA	15 UPS	35 UPS
0.05	0.33	0.38
0.1	1.11	0.29
0.2	0.46	0.40
0.4	-0.16	0.34

VII.2. Toxicidad crónica de la exposición individual y combinada de OTC y Cu

La tasa de incremento poblacional (r, d^{-1}) de *B. ibericus* osciló de 0.36 ± 0.02 a 0.38 ± 0.01 en los controles a 15 UPS y no fueron estadísticamente diferente ($P < 0.05$) entre ellas (Figura 1).

En los tratamientos de exposición individual de OTC, varió de 0.25 ± 0.01 a 0.38 ± 0.02 y fue más baja a medida que aumento la concentración del químico en el medio. No se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre el control, la exposición a 0.05 y 0.2 FA. En comparación con los otros tratamientos, las tasas de incremento fueron significativamente ($P < 0.05$) inferiores a 0.1 y 0.4 FA.

Bajo la exposición individual a Cu, la tasa de incremento osciló de 0.13 ± 0.01 a 0.34 ± 0.02 (Figura 1). El incremento poblacional registrado en la exposición a 0.1, 0.2 y 0.4 FA de Cu fueron estadísticamente ($P < 0.05$) inferiores al control. El crecimiento se redujo drásticamente a una concentración de 16.8 $\mu\text{g/L}$ de Cu.

Respecto a las mezclas OTC-Cu, se observó que la tasa de incremento varió de -0.06 ± 0.01 a 0.27 ± 0.02 según el FA. El incremento poblacional fue estadísticamente ($P < 0.05$) más bajo en las mezclas de 0.05, 0.2 y 0.4 FA que en la exposición individual a cada químico.

El crecimiento de la población fue estadísticamente más alto en la mezcla a 0.1 FA que en la exposición individual a Cu al mismo FA. No se encontraron diferencias entre los valores de r alcanzados en la mezcla a 0.1 FA y aquellos de la exposición individual a OTC al mismo FA.

Se observó un valor de r negativo en la mezcla de OTC a 0.4 FA, que fue estadísticamente diferente ($P < 0.05$) al resto de los tratamientos.

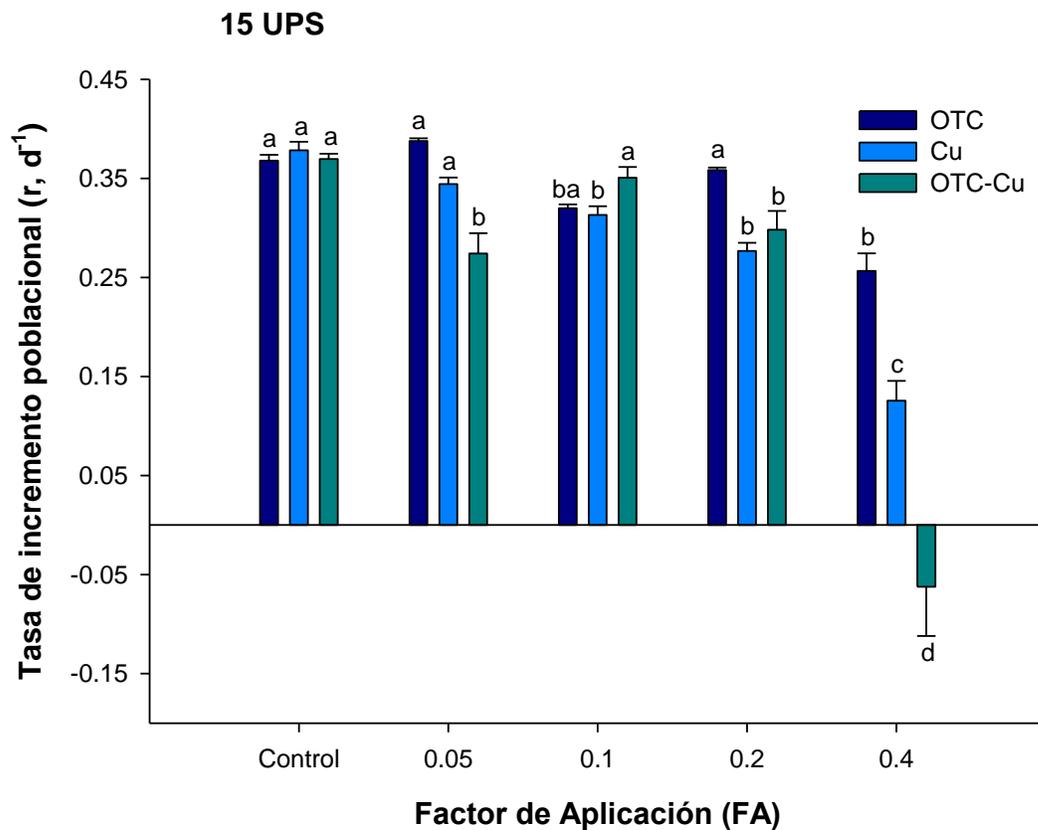


Figura 1. Tasa de incremento poblacional (r) del rotífero *Brachionus ibericus* expuesto a diferentes concentraciones individuales y combinadas de OTC y Cu a 15 UPS. Las concentraciones de OTC y Cu según el FA se muestra en la Tabla 1. Los valores que no comparten letra superíndice son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

A 35 UPS, la tasa de incremento (d^{-1}) en los controles osciló de 0.29 ± 0.1 – 0.32 ± 0.1 (Figura 2). En una exposición individual a la OTC a 0.05 – 0.4 FA, las tasas variaron de 0.22 ± 0.02 a 0.23 ± 0.01 y no fueron estadísticamente diferentes ($P > 0.05$) entre ellas, pero si ($P < 0.05$) a los controles.

En la exposición individual a Cu, las tasas oscilaron de 0.17 ± 0.1 a 0.29 ± 0.1 y fueron reduciendo estadísticamente a medida que incremento la concentración del metal en el medio. No se encontraron diferencias ($P > 0.05$) entre el control y la exposición a 0.05 FA de Cu. El resto de los tratamientos si fueron significativamente diferentes ($P < 0.05$) al control.

Bajo una exposición a la mezcla OTC-Cu a 0.05 – 0.4 FA, las tasas variaron de 0.14 ± 0.01 a 0.20 ± 0.02 y no fueron estadísticamente diferentes ($P > 0.05$) entre ellas.

En todos los casos, los valores de r registrados en las mezclas fueron estadísticamente ($P < 0.05$) más bajo que el que se alcanzó en la exposición individual a OTC o Cu.

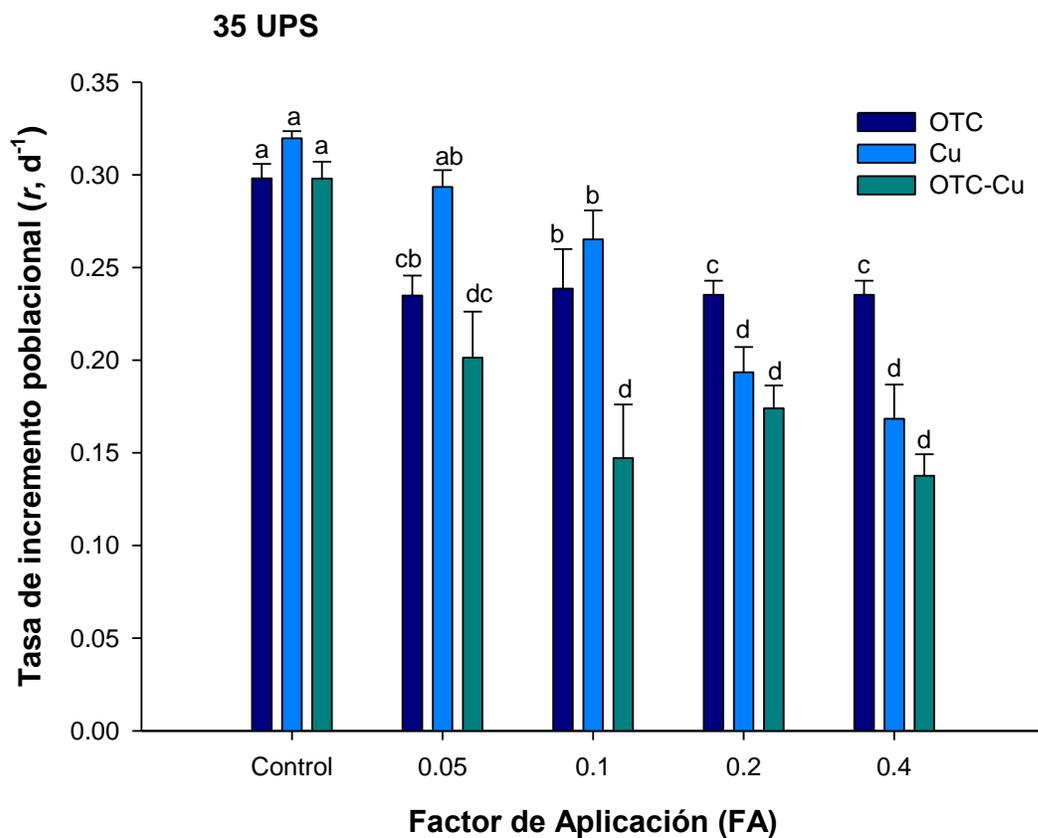


Figura 1. Tasa de incremento poblacional (r) del rotífero *Brachionus ibericus* expuesto a diferentes concentraciones individuales y combinadas de OTC y Cu a 35 UPS. Las concentraciones de OTC y Cu según el FA se muestra en la Tabla 1. Los valores que no comparten letra superíndice son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

VIII. Discusión

La oxitetraciclina es un antibiótico usado ampliamente en la acuicultura marina del noroeste de México, de allí su interés en la ecotoxicología. El cobre es un metal omnipresente en los ambientes costeros en donde al combinarse con otras sustancias suele inducir efectos sinérgicos en concentraciones ambientalmente relevantes (Bao et al., 2013; Rebolledo et al., 2022). En este trabajo se acepta la hipótesis de que la combinación de OTC y Cu aumenta la sensibilidad del rotífero *B. ibericus* a la contaminación originada por la acuicultura del camarón blanco.

De acuerdo al esquema de clasificación de la toxicidad acuática aguda (GESAMP, 2013), la OTC es ligeramente tóxica para *B. ibericus* a 15 y 35 UPS. Los valores de CL₅₀ de OTC para este rotífero están muy por arriba de aquellas concentraciones que se han detectado en sedimentos de estuarios (Liu et al., 2016). No se encontró literatura sobre los niveles de OTC en el agua de ambientes marinos. Es importante contar con esta información para valorar si las concentraciones ambientales de OTC son o no una amenaza para los rotíferos cuando se compara con su valor de CL₅₀. *Brachionus ibericus* es más sensible a la OTC que el crustáceo *A. ceoparthenogenetica* (Ferreira et al., 2007), la pulga de agua *D. magna* (Isidori et al., 2005) y el rotífero *B. rotundiformis* (Park et al., 2018), pero más tolerante que el crustáceo *T. platyurus*, el cladóceros *C. dubia* y el rotífero de agua dulce *B. calyciflorus* (Isidori et al., 2005). A pesar de pertenecer al mismo género o incluso al mismo tipo de hábitat, la sensibilidad de los rotíferos varía según la especie o las cepas, no existe una generalidad sobre la respuesta

de este grupo de animales a los contaminantes (Snell et al., 2019). Por tal razón, es muy importante explorar la sensibilidad de los organismos nativos de las zonas con alto potencial de riesgo ambiental. De esta forma, *B. ibericus* es un buen modelo representativo de los ambientes costeros del noroeste de México contaminados por la acuicultura del camarón.

La toxicidad del Cu en *B. ibericus* se clasifica como altamente muy tóxica según la GESAMP (2013). *Brachionus ibericus* tiene una sensibilidad al Cu similar a la de *B. plicatilis* y *P. similis* (Snell et al., 1991; Rebolledo et al., 2021). Y es altamente sensible (94 veces) cuando se compara con otra cepa de *B. plicatilis* y *B. koreanus* (Snell & Persoone, 1989; Han et al., 2013). También *B. ibericus* es mucho más sensible (2.3 – 520 veces) al Cu que algunas especies de copépodos marinos (Barka et al. 2001; Park et al., 2014). Como *P. similis*, el rotífero *B. ibericus* es una especie vulnerable a las concentraciones ambientales de Cu que se han detectado en ambientes marinos de México (Rebolledo et al., 2021). El límite permisible de Cu (5.0 mg/L) para áreas marinas de México (NOM-001-SEMARNAT-2021) es 96 veces más alto que la CL₅₀ de *B. ibericus*, en este sentido, el rotífero queda fuera de las consideraciones ambientales en México.

La UT₅₀ indica un fuerte sinergismo de la mezcla OTC-Cu. Se encontró que, en combinación, una concentración equivalente al 20 o 30% de la CL₅₀ de cada químico es suficiente para inducir los efectos sinérgicos en la supervivencia de *B. ibericus*. Esto respalda que el Cu aún en bajas concentraciones y en combinación con otras sustancias químicas potencializa la sensibilidad de los organismos a la contaminación (Bao et al., 2013; Rebolledo et al., 2021; 2022). En un escenario,

en donde las concentraciones ambientales de OTC están por debajo del valor de CL_{50} que se reporta en esta investigación, es de suponer que la presión del antibiótico para ejercer efectos sinérgicos es menos preocupante que la que ejerce el Cu.

Los efectos crónicos de la OTC han sido poco estudiados en invertebrados marinos (Ferreira et al., 2007). Las concentraciones de OTC analizadas en las pruebas crónicas de este estudio, son considerablemente superiores a las que se han detectado en el ambiente acuático usando como referencia aguas superficiales ($0.34 \mu\text{g/L}$) impactadas por desechos municipales (Kolpin et al., 2002). Como ya se ha mencionado anteriormente, no existe un antecedente para los niveles ambientales de OTC en aguas marinas, sin embargo, la detección de OTC en sedimentos de un estuario ($\sim 5000 \mu\text{g/L}$) podría confirmar la presencia de OTC en el agua (Liu et al., 2016). Ferreira et al. (2007), encontraron que una concentración de 12 mg/L de OTC inhibe más del 50% del crecimiento de la microalga marina *Tetraselmis chuii*. En el rotífero *B. ibericus* una inhibición del $\sim 30\%$ en sus tasas de crecimiento se observa cuando se expone a 22.8 mg/L de OTC a 15 UPS. En concentraciones de ~ 3.0 a 11.5 mg/L , se presenta una inhibición menor al 20% en las tasas de incremento. A 35 UPS, la toxicidad de la OTC se presenta de la misma forma en concentraciones de 3.8 a 30.5 mg/L . Los datos de crecimiento poblacional indican que el incremento de la salinidad a 35 UPS, reduce ligeramente la toxicidad de la OTC teniendo en cuenta que no se observó una inhibición significativa a 0.4 FA como se presentó a 15 UPS. *Brachionus ibericus* es más sensible a la toxicidad de la OTC que *B. rotundiformis*,

considerando que este último puede crecer y reproducirse en una concentración de 1000 µg/L (Park et al., 2018), que incluso rebasa la CL₅₀ de *B. ibericus* a cualquier salinidad.

La toxicidad crónica del Cu es una de las más estudiadas en invertebrados marinos dado sus antecedentes tóxicos (Bao et al., 2013; Kefford et al., 2019). Aquí se acepta la hipótesis de que la toxicidad del Cu es mayor a menor salinidad donde existe mayor disponibilidad de iones libres del metal para el rotífero (Piazza et al., 2016). En comparación con otras especies de rotíferos de ambiente salobres, *B. ibericus* crece bien en las dos salinidades probadas (15 y 35 UPS), por lo tanto, se descarta que para esta especie la respuesta de osmorregulación haya influido en la toxicidad del metal como se observó en *B. rotundiformis* (Gama-Flores et al., 2005). Independientemente de la salinidad, la mayoría de las concentraciones de Cu probadas causaron mayor inhibición en las tasas de incremento de *B. ibericus* que las concentraciones de OTC. La respuesta a la toxicidad crónica del Cu en *B. ibericus* es muy cercana a la de *P. similis* expuesto a condiciones similares (Rebolledo et al., 2021). Estas respuestas sugieren que las concentraciones ambientales de Cu en sistemas costeros de México (Vazquez et al., 1991; Jonathan et al., 2011), presentan una seria amenaza en la dinámica poblacional de rotíferos marinos que son esenciales en la alimentación de muchos peces y crustáceos. Cuando especies claves se ven afectadas por la contaminación ambiental, existe una perturbación en los sistemas tróficos y se ve amenazada la biodiversidad (Rebolledo et al., 2021).

De manera individual, el Cu y la OTC causan estrés oxidativo en los organismos acuáticos, produciendo una alteración de la funcionalidad celular (Park et al., 2018; Frías-Espéricueta et al., 2022). Las pruebas crónicas indican que las mezclas de OTC-Cu indujeron efectos sinérgicos en la tasa de incremento poblacional de *B. ibericus*, lo cual que podría ser un producto de la suma de los efectos individuales de cada químico. En general, usando el mismo FA para ambos químicos, la toxicidad individual fue mayor en Cu que OTC. De esta forma el Cu ejerció mayor presión en la mezcla y se desencadenó el efecto sinérgico. Interesantemente, se observó que en la mezcla OTC-Cu a 0.4 FA y en 15 UPS, ambos químicos ejercieron presión sobre el otro, pues la tasa de incremento fue negativa, contrario a lo que se registro en la toxicidad individual. Estos resultados respaldan que el Cu contribuye considerablemente a inducir respuestas biológicas del tipo sinérgico cuando interactúa con productos fármacos, biocidas y compuestos orgánicos (Bao et al., 2013; Aronzon et al., 2020; Rebolledo et al., 2020). La mayoría de estos efectos se presentan cuando las proporciones de los químicos son elevadas, en esta investigación las concentraciones de Cu siempre fueron inferiores a 30 µg/L, una concentración ambiental (Jonathan et al., 2011). Futuros trabajos deberán de analizar si los efectos sinérgicos también se observan en concentraciones de OTC inferiores a 3.0 mg/L.

Para una mejor comprensión sobre los mecanismos de toxicidad que producen la mezcla OTC-Cu, lo cual estuvo fuera del alcance de este trabajo, futuras investigaciones deben de prestar más atención a este aspecto toxicológico. Otro factor importante que no se consideró es la temperatura, que usualmente

fluctúa constantemente en los escenarios costeros. El factor temperatura puede alterar significativamente la vulnerabilidad de los rotíferos a la contaminación porque incrementa el metabolismo biológico (Gama-Flores et al., 2005), particularmente, este hecho puede reflejar otro tipo de respuesta a la toxicidad de la OTC, que hipotéticamente cambiaría su clasificación de toxicidad según la GESAMP (2013).

IX. Conclusiones

- La contaminación por antibióticos y metales pesados prevalece en los ambientes costeros cercanos a las zonas de alta actividad acuícola, por lo tanto, la formación de mezclas entre estos potencializa el riesgo ambiental.
- La toxicidad del Cu y OTC para *B. ibericus* se clasifica como altamente muy tóxica y ligeramente tóxica, respectivamente.
- La CL₅₀ y UT₅₀ de la toxicidad individual o combinada de OTC y Cu para *B. ibericus* vario según la salinidad. A 15 UPS, la toxicidad fue más pronunciada.
- Independientemente de la salinidad, las diferentes proporciones de la mezcla OTC-Cu indujeron efectos sinérgicos sobre las tasas de incremento poblacional de *B. ibericus*.
- El cobre es un contaminante típico en los ambientes costeros que debe de considerarse en la evaluación del riesgo ambiental de las mezclas de sustancias químicas, a fin de mostrar un escenario más realista, en donde la contaminación por una sola sustancia, no existe.

X. Referencias

- Ali, H., & Khan, E. (2019). Trophic transfer, bioaccumulation, and biomagnification of non-essential hazardous heavy metals and metalloids in food chains/webs—Concepts and implications for wildlife and human health. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 25(6), 1353-1376.
- Almeida, Â., Calisto, V., Esteves, V.I., Schneider, R. J., Soares, A.M., Figueira, E., & Freitas, R. (2018). Effects of single and combined exposure of pharmaceutical drugs (carbamazepine and cetirizine) and a metal (cadmium) on the biochemical responses of *R. philippinarum*. *Aquatic Toxicology*, 198, 10-19.
- Alsop, D., & Wood, C.M. (2013). Metal and pharmaceutical mixtures: is ion loss the mechanism underlying acute toxicity and widespread additive toxicity in zebrafish?. *Aquatic Toxicology*, 140, 257-267.
- Ansari, T.M., Marr, I.L., & Tariq, N. (2004). Heavy metals in marine pollution perspective—a mini review. *Journal of Applied Sciences*, 4(1), 1-20.
- Aronzon, C.M., Peluso, J., & Coll, C.P. (2020). Mixture toxicity of copper and nonylphenol on the embryo-larval development of *Rhinella arenarum*. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(12), 13985-13994.
- Bao, V.W., Leung, K.M., Lui, G.C., & Lam, M.H. (2013). Acute and chronic toxicities of Irgarol alone and in combination with copper to the marine copepod *Tigriopus japonicus*. *Chemosphere*, 90(3), 1140-1148.
- Barka, S., Pavillon, J.F., & Amiard, J.C. (2001). Influence of different essential and non-essential metals on MTLP levels in the copepod *Tigriopus brevicornis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 128(4), 479-493.
- Broderius, S.J., Kahl, M.D., Elonen, G.E., Hammermeister, D.E., & Hoglund, M.D. (2005). A comparison of the lethal and sublethal toxicity of organic chemical mixtures to the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 24(12), 3117-3127.
- Daghrir, R., & Drogui, P. (2013). Tetracycline antibiotics in the environment: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 11(3), 209-227.
- Dahms, H.U., Hagiwara, A., & Lee, J.S. (2011). Ecotoxicology, ecophysiology, and mechanistic studies with rotifers. *Aquatic Toxicology*, 101(1), 1-12.
- Damasceno, É.P., de Figuerêdo, L.P., Pimentel, M.F., Loureiro, S., & Costa-Lotufo, L.V. (2017). Prediction of toxicity of zinc and nickel mixtures to *Artemia* sp. at various salinities: from additivity to antagonism. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 142, 322-329.
- Farrell, A.P., Wood, C.M., & Brauner, C.J. (2012). Homeostasis and toxicology of non-essential metals.
- Ferreira, C.S.G., Nunes, B.A., de Melo Henriques-Almeida, J.M., & Guilhermino, L. (2007). Acute toxicity of oxytetracycline and florfenicol to the microalgae *Tetraselmis chuii*

and to the crustacean *Artemia parthenogenetica*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67(3), 452-458.

- Finney, D.J. (1971). *Probit analysis*. 1971. New York, Ny, 10022, 32.
- Fitridge, I., Dempster, T., Guenther, J., & De Nys, R. (2012). The impact and control of biofouling in marine aquaculture: a review. *Biofouling*, 28(7), 649-669.
- Foulkes, E.C. (2000). Transport of toxic heavy metals across cell membranes (44486). *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 223(3), 234-240.
- Frías-Espéricueta, M.G., Bautista-Covarrubias, J.C., Osuna-Martínez, C.C., Delgado-Alvarez, C., Bojórquez, C., Aguilar-Juárez, M., ... & Páez-Osuna, F. (2022). Metals and oxidative stress in aquatic decapod crustaceans: A review with special reference to shrimp and crabs. *Aquatic Toxicology*, 242, 106024.
- Gama-Flores, J. L., Sarma, S.S.S., & Nandini, S. (2005). Interaction among copper toxicity, temperature and salinity on the population dynamics of *Brachionus rotundiformis* (Rotifera). *Hydrobiologia*, 546(1), 559-568.
- Gao, M., Zhou, Q., Song, W., & Ma, X. (2014). Combined effects of oxytetracycline and Pb on earthworm *Eisenia fetida*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 37(2), 689-696.
- García-Hernández, J., Glenn, E.P., & Flessa, K. (2013). Identification of chemicals of potential concern (COPECs) in anthropogenic wetlands of the Colorado River delta. *Ecological Engineering*, 59, 52-60.
- GESAMP (2002). IMO/FAO/UNESCO-IOC/WMO/WHO/IAEA/UN/UNEP Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection. *The revised GESAMP hazard evaluation procedure for chemical substances carried by ships* (No. 64). International Maritime Organization.
- Gomiero, A., & Viarengo, A. (2014). Effects of elevated temperature on the toxicity of copper and oxytetracycline in the marine model, *Euplotes crassus*: a climate change perspective. *Environmental Pollution*, 194, 262-271.
- Halbach, U., Siebert, M., Westermayer, M., & Wissel, C. (1983). Population ecology of rotifers as a bioassay tool for ecotoxicological tests in aquatic environments. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 7(5), 484-513.
- Han, J., Won, E.J., Hwang, D S., Rhee, J.S., Kim, I.C., & Lee, J.S. (2013). Effect of copper exposure on GST activity and on the expression of four GSTs under oxidative stress condition in the monogonont rotifer, *Brachionus koreanus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 158(2), 91-100.
- He, Y., Tian, Z., Yi, Q., Zhang, Y., & Yang, M. (2020). Impact of oxytetracycline on anaerobic wastewater treatment and mitigation using enhanced hydrolysis pretreatment. *Water Research*, 187, 116408.
- Heugens, E.H., Hendriks, A. J., Dekker, T., Straalen, N.M.V., & Admiraal, W. (2001). A review of the effects of multiple stressors on aquatic organisms and analysis of

- uncertainty factors for use in risk assessment. *Critical Reviews in Toxicology*, 31(3), 247-284.
- Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Pascarella, L., & Parrella, A. (2005). Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. *Science of The Total Environment*, 346(1-3), 87-98.
- Jonathan, M.P., Roy, P.D., Thangadurai, N., Srinivasalu, S., Rodríguez-Espinosa, P.F., Sarkar, S.K., ... & Muñoz-Sevilla, N.P. (2011). Metal concentrations in water and sediments from tourist beaches of Acapulco, Mexico. *Marine Pollution Bulletin*, 62(4), 845-850.
- Kefford, B. J., King, C.K., Wasley, J., Riddle, M.J., & Nuggeoda, D. (2019). Sensitivity of a large and representative sample of Antarctic marine invertebrates to metals. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 38(7), 1560-1568.
- Kolar, B., Arnuš, L., Jeretin, B., Gutmaher, A., Drobne, D., & Durjava, M. K. (2014). The toxic effect of oxytetracycline and trimethoprim in the aquatic environment. *Chemosphere*, 115, 75-80.
- Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., & Buxton, H.T. (2002). Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999– 2000: A national reconnaissance. *Environmental Science & Technology*, 36(6), 1202-1211.
- Kovalakova, P., Cizmas, L., McDonald, T. J., Marsalek, B., Feng, M., & Sharma, V. K. (2020). Occurrence and toxicity of antibiotics in the aquatic environment: A review. *Chemosphere*, 251, 126351.
- Li, Z.J., Qi, W.N., Yao, F.E.N.G., LIU, Y.W., Ebrahim, S., & Jian, L.O.N.G. (2019). Degradation mechanisms of oxytetracycline in the environment. *Journal of Integrative Agriculture*, 18(9), 1953-1960.
- Liu, X., Zhang, H., Li, L., Fu, C., Tu, C., Huang, Y., ... & Christie, P. (2016). Levels, distributions and sources of veterinary antibiotics in the sediments of the Bohai Sea in China and surrounding estuaries. *Marine Pollution Bulletin*, 109(1), 597-602.
- Lyle-Fritch, L.P., Romero-Beltrán, E., & Páez-Osuna, F. (2006). A survey on use of the chemical and biological products for shrimp farming in Sinaloa (NW Mexico). *Aquacultural Engineering*, 35(2), 135-146.
- McIntosh, A., & Pontius, J. (2016). *Science and the global environment: case studies for integrating science and the global environment*. Elsevier.
- Mills, S., Alcántara-Rodríguez, J. A., Ciroso-Pérez, J., Gómez, A., Hagiwara, A., Galindo, K. H., ... & Walsh, E. J. (2017). Fifteen species in one: deciphering the *Brachionus plicatilis* species complex (Rotifera, Monogononta) through DNA taxonomy. *Hydrobiologia*, 796(1), 39-58.
- SEMARNAT (2022). Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-2021. Que establece los límites permisibles de contaminantes en las descargas residuales en cuerpos receptores propiedad de la Nación. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Diario Oficial de la Federación, México, 11 de marzo de 2022.

- Oliveira, R., McDonough, S., Ladewig, J.C., Soares, A.M., Nogueira, A.J., & Domingues, I. (2013). Effects of oxytetracycline and amoxicillin on development and biomarkers activities of zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 36(3), 903-912.
- Páez-Osuna, F., Álvarez-Borrego, S., Ruiz-Fernández, A.C., García-Hernández, J., Jara-Marini, M. E., Bergés-Tiznado, M. E., ... & Sanchez-Cabeza, J.A. (2017). Environmental status of the Gulf of California: a pollution review. *Earth-Science Reviews*, 166, 181-205.
- Park, J.C., Yoon, D.S., Byeon, E., Seo, J.S., Hwang, U.K., Han, J., & Lee, J. S. (2018). Adverse effects of two pharmaceuticals acetaminophen and oxytetracycline on life cycle parameters, oxidative stress, and defensome system in the marine rotifer *Brachionus rotundiformis*. *Aquatic Toxicology*, 204, 70-79.
- Piazza, V., Gambardella, C., Canepa, S., Costa, E., Faimali, M., & Garaventa, F. (2016). Temperature and salinity effects on cadmium toxicity on lethal and sublethal responses of *Amphibalanus amphitrite* nauplii. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 123, 8-17.
- Porchas-Cornejo, M.A., Álvarez-Ruiz, P., Álvarez-Tello, F.J., Martínez-Porchas, M., Martínez-Córdova, L.R., López-Martínez, J., & García-Morales, R. (2018). Detection of the white spot syndrome virus in zooplankton samples collected off the coast of Sonora, Mexico. *Aquaculture Research*, 49(1), 48-56.
- Preston, S., Coad, N., Townend, J., Killham, K., & Paton, G.I. (2000). Biosensing the acute toxicity of metal interactions: are they additive, synergistic, or antagonistic?. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 19(3), 775-780.
- Rebolledo, U.A., Nandini, S., Sarma, S.S.S., Reyes, J.C R., & Montes de Oca, G.A.R. (2018). Demographic and competition studies on *Brachionus ibericus* and *Proales similis* in relation to salinity and algal (*Nannochloropsis oculata*) density. *Aquaculture International*, 26(2), 629-644.
- Rebolledo, U.A., Nandini, S., Sarma, S.S.S., & Escobar-Sánchez, O. (2020). Effect of salinity and temperature on the acute and chronic toxicity of arsenic to the marine rotifers *Proales similis* and *Brachionus ibericus*. *Marine Pollution Bulletin*, 157, 111341.
- Rebolledo, U.A., Páez-Osuna, F., & Fernández, R. (2021). Single and mixture toxicity of As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Ni, Pb, and Zn to the rotifer *Proales similis* under different salinities. *Environmental Pollution*, 271, 116357.
- Rebolledo, U.A., Rico-Martínez, R., Fernández, R. (2022). Synergistic effect of chloroquine and copper to the euryhaline rotifer *Proales similis*. *Ecotoxicology* 31, 1035–1043.
- Rico-Martínez, R., Arzate-Cárdenas, M., Alvarado-Flores, J., Pérez-Legaspi, A., & Santos-Medrano, E. (2017). Rotifers as model for ecotoxicology and genotoxicology. *Ecotoxicology and Genotoxicology: nontraditional aquatic models*. United Kingdom, Royal Society of Chemistry. cap, 3, 48-69.
- Sarma, S.S.S., Jiménez-Santos, M.A., & Nandini, S. (2021). Rotifer species diversity in Mexico: an updated checklist. *Diversity*, 13(7), 291.

- Snell, T.W., Moffat, B. D., Janssen, C., & Persoone, G. (1991). Acute toxicity tests using rotifers. III. Effects of temperature, strain, and exposure time on the sensitivity of *Brachionus plicatilis*. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 6(1), 63-75.
- Snell, T.W., & Persoone, G. (1989). Acute toxicity bioassays using rotifers. I. A test for brackish and marine environments with *Brachionus plicatilis*. *Aquatic Toxicology*, 14(1), 65-80.
- Snell, T.W., Johnston, R.K., Matthews, A.B., Park, N., Berry, S., & Brashear, J. (2019). Using *Proales similis* (Rotifera) for toxicity assessment in marine waters. *Environmental Toxicology*, 34(5), 634-644.
- Telesh, I., Schubert, H., & Skarlato, S. (2013). Life in the salinity gradient: discovering mechanisms behind a new biodiversity pattern. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 135, 317-327.
- Traas, T.P., & Van Leeuwen, C.J. (2007). Ecotoxicological effects. In *Risk Assessment of Chemicals* (pp. 281-356). Springer, Dordrecht.
- Vazquez, G.F., Sharma, V.K., Magallanes, V.R., & Marmolejo, A.J. (1999). Heavy metals in a coastal lagoon of the Gulf of Mexico. *Marine Pollution Bulletin*, 38(6), 479-485.
- Wang, L., Wang, J., Zhu, L., & Wang, J. (2018). Toxic effects of oxytetracycline and copper, separately or combined, on soil microbial biomasses. *Environmental Geochemistry and Health*, 40(2), 763-776.
- 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.
- Wood, C.M., Farrell, A.P., & Brauner, C.J. (Eds.). (2012). *Homeostasis and toxicology of essential metals* (Vol. 1). Academic press.
- Wood, C.M., Farrell, A.P., & Brauner, C.J. (Eds.). (2012). *Homeostasis and toxicology of essential metals* (Vol. 1). Academic press.
- Zhang, Y., Cai, X., Lang, X., Qiao, X., Li, X., & Chen, J. (2012). Insights into aquatic toxicities of the antibiotics oxytetracycline and ciprofloxacin in the presence of metal: complexation versus mixture. *Environmental Pollution*, 166, 48-56.