



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

TESIS

**“ESTUDIO MICRO EVOLUCIONARIO DE LA ADAPTACIÓN AL PLOMO
EN EL ROTÍFERO *Brachionus calyciflorus* Pallas 1766”**

PRESENTA:

Blanca Gemma Vazquez Parra

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS ÁREA DE
TOXICOLOGÍA**

TUTORES

Dr. Roberto Rico Martínez

Dr. Mario Alberto Arzate Cárdenas

COMITÉ TUTORIAL

Dra. Elsa Marcela Ramírez López

Aguascalientes, Ags Marzo 2025

Voto aprobatorio. Comité tutorial



CARTA DE VOTO APROBATORIO COMITÉ TUTORAL

M. EN C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ
DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

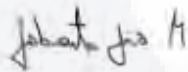
PRESENTE

Por medio del presente como **Miembros del Comité Tutorial** designado del estudiante **BLANCA GEMMA VAZQUEZ PARRA** con ID 354187 quien realizó el trabajo de tesis titulado: **ESTUDIO MICRO EVOLUCIONARIO DE LA ADAPTACIÓN AL PLOMO EN EL ROTÍFERO *Brachionus calyciflorus* Pallas 1766**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia damos nuestro consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que nos permitimos emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirlo así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Ponemos lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 13 de febrero de 2025.


Roberto Rico Martinez
Tutor de tesis


Mario Alberto Arzate Cardenas
Co-Tutor de tesis


Elsa Marcela Ramirez Lopez
Asesor de tesis

c.c.p. - Interesado
c.c.p. - Secretaria Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado

Código: DO-SC-PO-14
Actualización: 30
Fecha: 17/05/14

DICTAMEN DE LIBERACIÓN ACADÉMICO



DEC/CCBASICAS/031/2025

BLANCA GEMMA VAZQUEZ PARRA
ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA
EN CIENCIAS AREA DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL O TOXICOLOGÍA
PRESENTE.

Estimada Alumna:

Por medio de la presente me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o trabajo práctico titulado: **"ESTUDIO MICRO EVOLUCIONARIO DE LA ADAPTACIÓN AL PLOMO EN EL ROTÍFERO *Brachionus calyciflorus* Pallas 1766"**, se autoriza la impresión de la tesis y la continuidad del proceso administrativo para la obtención del grado.

Sin otro particular por el momento, me despido aprovechando la oportunidad para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
Aguascalientes, Ags., 20 de febrero del 2025
"Se lumen proferre"

M. en C. **JORGE MARTIN ALFEREZ CHAVEZ**
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS



DICTAMEN DE LIBERACIÓN ACADÉMICA PARA INICIAR LOS TRÁMITES DEL EXAMEN DE GRADO



Fecha de dictaminación dd/mm/aaaa: 20/2/2025

NOMBRE: BLANCA GEMMA VAZQUEZ PARRA **ID:** 354187

PROGRAMA: MAESTRÍA EN CIENCIAS ÁREAS BIOTECNOLOGÍA Y TOXICOLOGÍA **LGAC (del posgrado):** TOXICOLOGÍA

TIPO DE TRABAJO: () Tesis () Trabajo Práctico

TÍTULO: ESTUDIO MICRO EVOLUCIONARIO DE LA ADAPTACIÓN AL PLOMO EN EL ROTÍFERO *Brachionus calyciflorus* Pallas 1766

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado): Tiene un valor significativo en la protección del medio ambiente, la salud humana y la formulación de políticas para la gestión sostenible de los recursos acuáticos determinando pues la adaptabilidad del modelo a través de varias generaciones expuestas al plomo. También ayuda con la de la transferencia de la información ya que a partir de las certezas arrojadas podrán desarrollarse nuevos objetivos, ha de desarrollarse.

INDICAR SI NO N.A. (NO APLICA) SEGÚN CORRESPONDA:

INDICAR	SI	NO	N.A. (NO APLICA)	SEGÚN CORRESPONDA:
<i>Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:</i>				
SI				El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
SI				La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
SI				Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
SI				Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
SI				Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
SI				El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
SI				Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
SI				Generó transferencia del conocimiento o tecnológica
SI				Cumple con la ética para la investigación (reporte de la herramienta antiplagio)
<i>El egresado cumple con lo siguiente:</i>				
SI				Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
SI				Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
SI				Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
N.A.				Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
SI				Coincide con el título y objetivo registrado
SI				Tiene congruencia con cuerpos académicos
SI				Tiene el CVU del Conacyt actualizado
N.A.				Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)
<i>En caso de Tesis por artículos científicos publicados</i>				
N.A.				Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
N.A.				El estudiante es el primer autor
N.A.				El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
N.A.				En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
N.A.				Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
N.A.				La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado:

SI
 No

FIRMAS

Elaboró: ROBERTO RICO MARTÍNEZ

* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN

DR. EN CLAUDIO GERARDO VAQUÍA FLORES

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

DRA. EN C. ELSA MARCELA RAMÍREZ LÓPEZ

* En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del NAB de la LGAC correspondiente distinto al tutor o miembro del comité tutorial, asignado por el Decano

Revisó:

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:

DR. ALEJANDRO PADIÑA DÍAZ

Autorizó:

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

M. EN C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado

En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: ... Cuidar la afijación terminal del programa de posgrado y el Art. 105F las funciones del Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Benemérita Autónoma de Aguascalientes, y al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías por el apoyo para la realización de investigación de mis estudios de maestría (Apoyo No. 835337).

A los miembros de mi comité tutorial al Dr. Roberto Rico-Martínez y Dr. Mario Alberto Arzate Cárdenas por haberme guiado profesional y personalmente, por la paciencia y el invaluable apoyo, así como compartir los conocimientos de su experiencia.

A la Dra. Elsa Marcela Ramírez López por compartir su conocimiento y consejos durante mi estadía en la institución.

A la Dra. Ana Carbajal y Dr. Carlos Valerio por el apoyo, consejos, risas y estrés compartidos en desarrollo del proyecto, así como las facilidades brindadas

A los practicantes que pasaron por el laboratorio 202-L4, así como a todas las personas que me apoyaron y han hecho posible que este trabajo tenga éxito

DEDICATORIA

Alle persone che sono state parte fondamentale del processo

e a me stessa



ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	1
ÍNDICE DE TABLAS	5
RESUMEN	6
1. INTRODUCCIÓN	7
2. Marco teórico	8
2.1. Evolución	8
2.2 Microevolución y su importancia	9
2.3 Rotíferos	9
2.3.1 Características generales	10
2.3.2 Reproducción	11
2.3.3 Alimentación	13
2.4 ROTÍFERO: Género <i>Brachionus calyciflorus</i>	13
2.5 Evolución en rotíferos	14
2.6 Plomo	15
2.6.1 Plomo en sistemas acuáticos	15
2.6.2 Interacción del Pb con organismos acuáticos	17
2.6.3 Mecanismos de microadaptación al plomo	18
2.7 Importancia ecológica y evolutiva	19
2.7.1 Biomarcadores	19
2.7.2 Bioindicadores	19
2.7.3 implicaciones ecológicas y evolutivas de la microadaptación de los rotíferos expuestos.....	20

3. Justificación..... 21

4. Hipótesis de trabajo..... 21

5. Objetivo general 21

 5.1 Objetivos específicos 21

6. Incidencia, impacto social o ambiental esperado 22

7. Materiales y métodos 23

 7.1 Esquema general de trabajo 23

 7.1.1 Cultivos de rotíferos 23

 7.2 Microalgas..... 24

 7.2.1 Chlorella vulgaris 24

 7.3 Mantenimiento del cultivo..... 25

 7.3.1 Alimento 25

 7.3.2 Limpieza de organismos 26

 7.4 Pruebas de toxicidad 26

 7.5 Pruebas toxicológicas agudas 26

 7.6 Pruebas crónicas (5 días) 27

 7.7 Densidad poblacional..... 28

8 resultados..... 29

 8.1 Pruebas agudas..... 29

 8.2 Tasa de mortalidad 30

 8.2.1 Generación F0 30

 8.2.2 Generación F1 30

 8.2.3 Generación F7 32

 8.2.4 Tasa de mortalidad F15 33

 8.3 CL50 (Probits)..... 34

8.3.1 CL50 (Probits) generación F0	34
8.3.2 CL50 (Probits) generación F1	35
8.3.3 CL50 (Probits) generación F7	36
8.3.4 CL50 (Probits) generación F ₁₅	37
8.4 Tasa intrínseca de crecimiento (r).....	39
8.4.1 (r) generación F0	40
8.4.2 (r) Generación F ₁	41
8.4.3 (r) Generación F7.....	42
8.4.4 (r) Generación F ₁₅	43
8.5 Pruebas de densidad poblacional	44
8.5.1 Generación F0	44
8.5.2 Densidad poblacional de 0.02 mg L ⁻¹ de Pb en 4 generaciones	46
8.5.3 Densidad poblacional de 0.05 mg L ⁻¹ de Pb en 4 generaciones	46
8.5.4 Densidad poblacional de 0.1 mg L ⁻¹ de Pb en 4 generaciones	47
8.5.5 Densidad poblacional de 0.2 mg L ⁻¹ de Pb en 4 generaciones	48
9. Discusión.....	52
10. Conclusión	54
11. Referencias bibliográficas	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura genérica de un rotífero (Moreno, 2013).	11
Figura 2. Ciclo reproductivo del rotífero (Serra <i>et al.</i> 2019).....	12
Figura 3. Esquema general de protocolo	23
Figura 4. Crecimiento de microalga <i>Chlorella vulgaris</i>	24

Figura 5. Mantenimiento de cultivo 25

Figura 6. Placa de 24 pozos para realiza ensayos de toxicidad agudas 27

Figura 7. Placa de 24 pozos para realiza ensayos crónicos 28

Figura 8. Metodología de respuesta demográfica 29

Figura 9. Gráfica de mortalidad F_0 30

Figura 10. Tasa de mortalidad generación F1. Concentraciones a) 0.02 mg/L, b) 0.05 mg/L, c) 0.1 mg/L, d) 0.2 mg/L. 31

Figura 11. Tasa de mortalidad generación F7. Concentración a) 0.02 mg/L, b) 0.05 mg/L, c) 0.1 mg/L, d) 0.2 mg/L. 32

Figura 12. Tasa de mortalidad generación F15. Concentraciones a) 0.02 mg/L, b) 0.05 mg/L, c) 0.1 mg/L, d) 0.2 mg/L. 33

Figura 13. Prueba aguda de generación F_0 (no expuesto) evaluado a concentraciones de 0.5,1.0,2.0,4.0 y 8.0 mg L-1 34

Figura 14. . Prueba aguda de generación F_0 (no expuesto) evaluado a concentraciones de 0.5,1.0,2.0,4.0 y 8.0 mg L-1 35

Figura 15. Prueba aguda de generación F7 evaluado a concentraciones de 0.5,1.0,2.0,4.0 y 8.0 mg L-1 37

Figura 16. Prueba aguda de generación F7 evaluado a concentraciones de 0.5,1.0,2.0,4.0 y 8.0 mg L-1 38

Figura 17. Gráfica del efecto del plomo (Pb) sobre la tasa intrínseca de crecimiento poblacional (r) en la generación F_0 40

Figura 18. Gráfica del efecto del plomo (Pb) sobre la tasa intrínseca de crecimiento poblacional (r) en la generación F1 42

Figura 19. Gráfica del efecto del plomo (Pb) sobre la tasa intrínseca de crecimiento poblacional (r) en la generación F7. 43

Figura 20. Gráfica del efecto del plomo (Pb) sobre la tasa intrínseca de crecimiento poblacional (r) en la generación F15. 44

Figura 21. Densidad poblacional generación F_0 45

Figura 22. Densidad poblacional de generaciones expuestas (F_0 , F1, F7 Y F15) a 0.02 mg L-1 de Pb. 46

Figura 23. Densidad poblacional de generaciones expuestas (F0, F1, F7 Y F15) a 0.05 mg L-1 de Pb..... 47

Figura 24. Densidad poblacional de generaciones expuestas a 0.1 mg L-1 de Pb..... 48

Figura 25. Densidad poblacional de generaciones expuestas a 0.2 mg L-1 de Pb..... 49

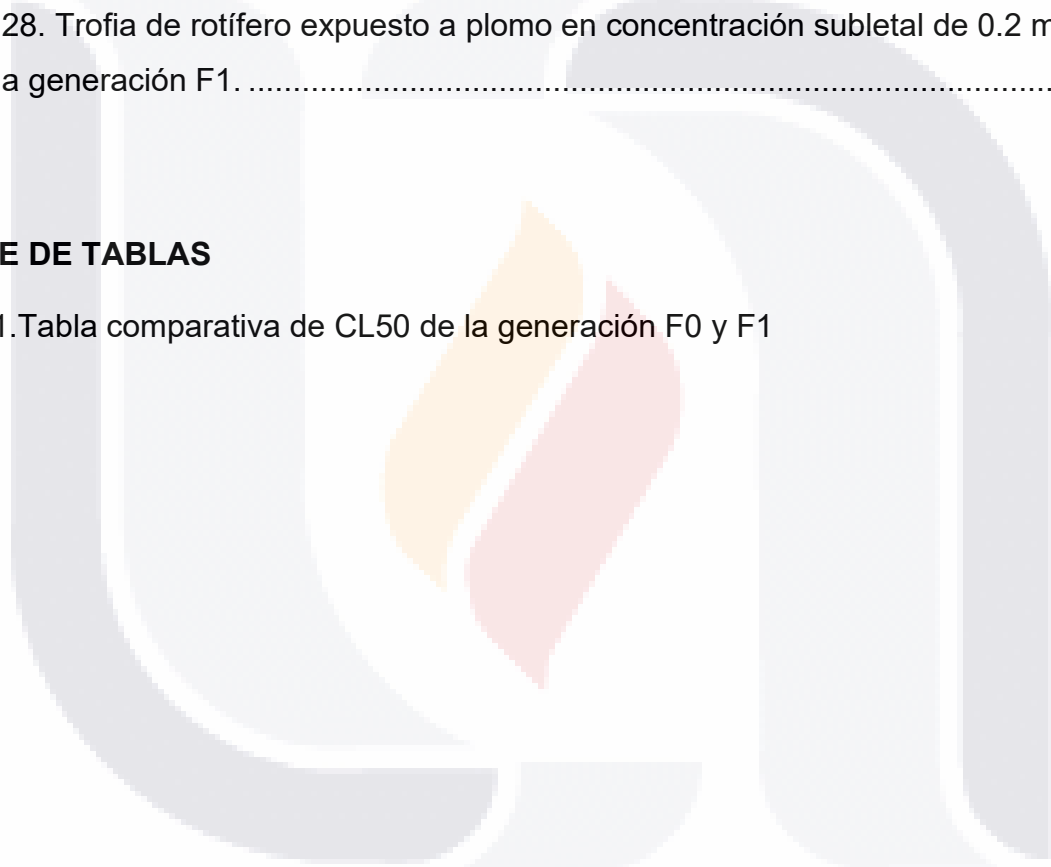
Figura 26. Rotífero *B. calyciflorus* generación F7 desarrollado en una concentración de Pb de 0.1 mg L-1..... 50

Figura 27. Huevo de resistencia de rotífero *B. calyciflorus* de la generación F7 crecido en una concentración 0.2 mg/L de Pb..... 51

Figura 28. Trofia de rotífero expuesto a plomo en concentración subletal de 0.2 mg/L de Pb de la generación F1. 51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.Tabla comparativa de CL50 de la generación F0 y F1 11



RESUMEN

Los rotíferos tienen gran relevancia ecológica, desempeñan un papel crucial en los ecosistemas de agua dulce como parte de la cadena trófica y son indicadores de la salud ambiental como parte de las implicaciones ecotoxicológicas. En el presente estudio se trabajó con la cepa del rotífero *Brachionus calyciflorus* debido a su alta sensibilidad y su capacidad para adaptarse a su entorno, en caso al plomo, el cual puede influir en la estructura y dinámica de la comunidad acuática, afectando la biodiversidad y la estabilidad del ecosistema, ya que esto tiene implicaciones directas para la evaluación del riesgo ambiental y puede influir en la formulación de políticas para la regulación de contaminantes. En el presente trabajo se realizaron pruebas generacionales (F_0, F_1, F_7 , y F_{15}) expuestas a concentraciones subletales de 0.02, 0.05, 0.1 y 0.2 mg L⁻¹ de Plomo (Pb) por medio de experimentos controlados utilizando como indicador la tasa intrínseca de crecimiento (r) y pruebas de densidad poblacional así como los cambios en la tolerancia respecto a las generaciones distintas evaluadas encontrando que la concentración letal media de dos poblaciones desarrolladas en la misma concentración (F_1 y F_{15} expuestas a 0.02 mg L⁻¹) arrojó un valor de 0.325 mg L⁻¹ en sus primeras generaciones a valores sobre el límite máximo permisible en las normas mexicanas en la última generación evaluada

1. INTRODUCCIÓN

Los *rotíferos* son invertebrados mayormente dulceacuícolas que tienen ciclos de vida muy cortos y que por tanto tienen capacidad de llevar a cabo cambios microevolutivos en períodos de tiempo cortos lo que permite su uso y análisis en laboratorios de toxicología acuática. El rotífero *Brachionus calyciflorus Pallas 1766* ha sido usado como modelo experimental desde hace mucho tiempo para la acuicultura (Rico-Martínez y Dodson, 1992). Su cultivo está bien estandarizado y su uso como modelo toxicológico es amplio y bien documentado (Rico-Martínez *et al.*, 2013).

Recientemente se han reportado en algunos artículos, la capacidad de los rotíferos de adaptarse a la exposición de sustancias tóxicas usando múltiples estrategias, entre ellas los efectos transgeneracionales (Arreguín-Rebolledo *et al.*, 2022). El presente estudio abordó el estudio generacional considerando las generaciones F_0 , F_1 , F_7 , y F_{15} , siendo el plomo el xenobiótico evaluado, el cual es un contaminante persistente que no se degrada fácilmente, acumulándose en sedimentos, suelos y cuerpos de agua (Chen *et al.*, 2021), tomando concentraciones subletales de 0.02, 0.05, 0.1 y 0.2 mgL⁻¹ considerando los parámetros de la concentración letal media, partiendo de una CL_{50} 0.325 mgL⁻¹ en F_0 , la tasa intrínseca de crecimiento “r” y ensayos de densidad poblacional, realizando un análisis integrativo con el fin de observar el comportamiento de esta especie en su proceso de adaptación a la tolerancia al plomo.

2. Marco teórico

2.1. Evolución

Dentro del marco de las ciencias biológicas, la palabra “ambiente” cobra el significado del entorno dentro del cual los seres vivos existen. A lo largo de la historia de las ciencias naturales, este concepto de alguna manera siempre estuvo presente (ya sea de forma explícita o implícita), especialmente en las sucesivas ideas que fueron forjando a la teoría de la evolución como el eje transversal de las ciencias biológicas.

La evolución se refiere al proceso por el cual los organismos vivos cambian con el tiempo a través de cambios en el genoma. Esos cambios evolutivos ocurren por mutaciones que producen variación genómica, lo que da lugar a la aparición de individuos cuyas funciones biológicas o rasgos físicos están alterados. Esos individuos que están mejor adaptados a su entorno producen, con sucesivas generaciones (que en algunos casos abarcan millones de años), producen individuos que pueden evolucionar para asumir funciones o características físicas divergentes o, incluso, puede evolucionar en una especie diferente (National Human Genome Research, 2022). Se cree que las tasas de adaptación evolutiva son extremadamente lentas, mucho más lentas que la tasa de la dinámica ecológica. Sin embargo, es solo en la última década que un número creciente de ecólogos se han dado cuenta de que la adaptación evolutiva puede ser tan rápida como los procesos ecológicos. Aunque los cambios de rasgos microevolutivos pueden parecer pequeños e insignificantes en magnitud en comparación con los grandes cambios de rasgos que están documentados para escalas de tiempo macroevolutivas, aún pueden tener una importancia considerable desde una perspectiva ecológica, ya que pueden determinar en gran medida el desempeño de los cambios contemporáneos (Declerck *et al.*, 2017).

2.2 Microevolución y su importancia

La microevolución es la evolución a pequeña escala; es decir, dentro de una única población, un cambio en la frecuencia génica a lo largo del tiempo quiere decir que la población ha evolucionado.

Los cambios microevolutivos se producen de unas pocas formas básicas. Los procesos que pueden afectar directamente las frecuencias génicas de una población son la mutación, migración, deriva genética y selección natural. Las consecuencias de los cambios evolutivos en el fenotipo de los organismos pueden llegar a afectar el funcionamiento de ecosistemas completos (Matthews *et al.*, 2011).

2.3 Rotíferos

Los *rotíferos* son un grupo inconfundible de pequeños animales acuáticos con más de 2300 especies conocidas, que se encuentran mayormente en agua dulce (80%) y agua salada (20%), ya sean planctónicos o unidos a las superficies. tienen ciclos de vida muy cortos y que por tanto tienen capacidad de llevar a cabo cambios micro evolucionarios en períodos de tiempo cortos lo que permite su manipulación y análisis en laboratorios de toxicología acuática. Estos se alimentan por el batir de los cilios dispuestos en una "corona" que rodea la boca. El patrón de "latidos" de estos cilios crea la ilusión de que la corona gira como una rueda, lo que da nombre al grupo

Los rotíferos son uno de los principales componentes del zooplancton en aguas continentales. En la mayoría de los cuerpos de agua dulce, predominan en términos de riqueza y riqueza de especies. La gran heterogeneidad de características fisiológicas y morfológicas y requisitos ecológicos desarrollados durante el curso de la evolución los ha hecho aptos para una variedad de humedales naturales y artificiales como líquenes, musgos, turberas, lentejas y semiacuáticos. Se exhiben en una amplia variedad morfológica, por lo que son frecuentes las formas de saco, esféricas y las comprimidas dorsoventral o lateralmente (Arndt, 1993).

2.3.1 Características generales

Su tamaño oscila entre 40 y 2000 micrómetros, siendo el más pequeño solo unas 6 veces el diámetro de un glóbulo rojo humano. Por su tamaño, forma y hábitat, los rotíferos pueden confundirse con los protozoos (protistas). Muy pocos rotíferos son parásitos; casi todos son depredadores rapaces o comedores de suspensión micrófagos o herbívoros (filtradores). En conjunto, este filo está muy disperso y se encuentra en todo tipo de hábitats de agua dulce en densidades de hasta aproximadamente 1000 individuos por litro. Con suficiente alimento, las poblaciones pueden superar los 5000 individuos por litro (Stephen, 2022).

Se observa en la figura 1 como se divide el cuerpo de un rotífero ubicado típicamente en 3 regiones, pies, troco y cabeza, teniendo dos características distintivas, el mastax (una faringe muscular) y una corona ciliada- Dentro del mastax se consideran dos partes las cuales se encuentra en un complejo duro o mandíbulas que son llamadas trofia o trofos, los cuales son esenciales y ayudan en el proceso de alimentación, esta es un rasgo para la identificación taxonómica , que ayuda no solo con la identificación de la familia sino también a nivel de géneros.

La segunda se encuentra en el área anterior a la cabeza y su función primaria es locomotora y alimentaria, en la cuestión motora generan un movimiento giratorio (de ahí su nombre y el de su grupo). La corona puede ser bastante variable esto dependerá de a la disposición de la región anterior y la distribución de cilios que este tenga, de las cuales se han descrito al menos siete.

El tronco es de naturaleza proteica identificada como una cutícula intracitoplasmática, estas pueden ser grandes extensiones las cuales son llamadas formas lorigadas y son más o menos desarrolladas dependiendo de la especie.

La loriga como se describió en el párrafo anterior son capas proteicas, que pueden identificarse como proyecciones o espinas, descritas como ornamentaciones o tubérculos, las cuales poseen funciones de defensa contra sus depredadores, así como funciones de locomoción. En las formas ilorigadas (sin loriga) esta cutícula (película proteica) es delgada, lo cual le permite una gran flexibilidad al cuerpo, en la figura 1

también se observa que en el tronco se encuentran las antenas laterales y dorsales, las cuales son exclusivas del Phylum (Brusca y Brusca 1990).

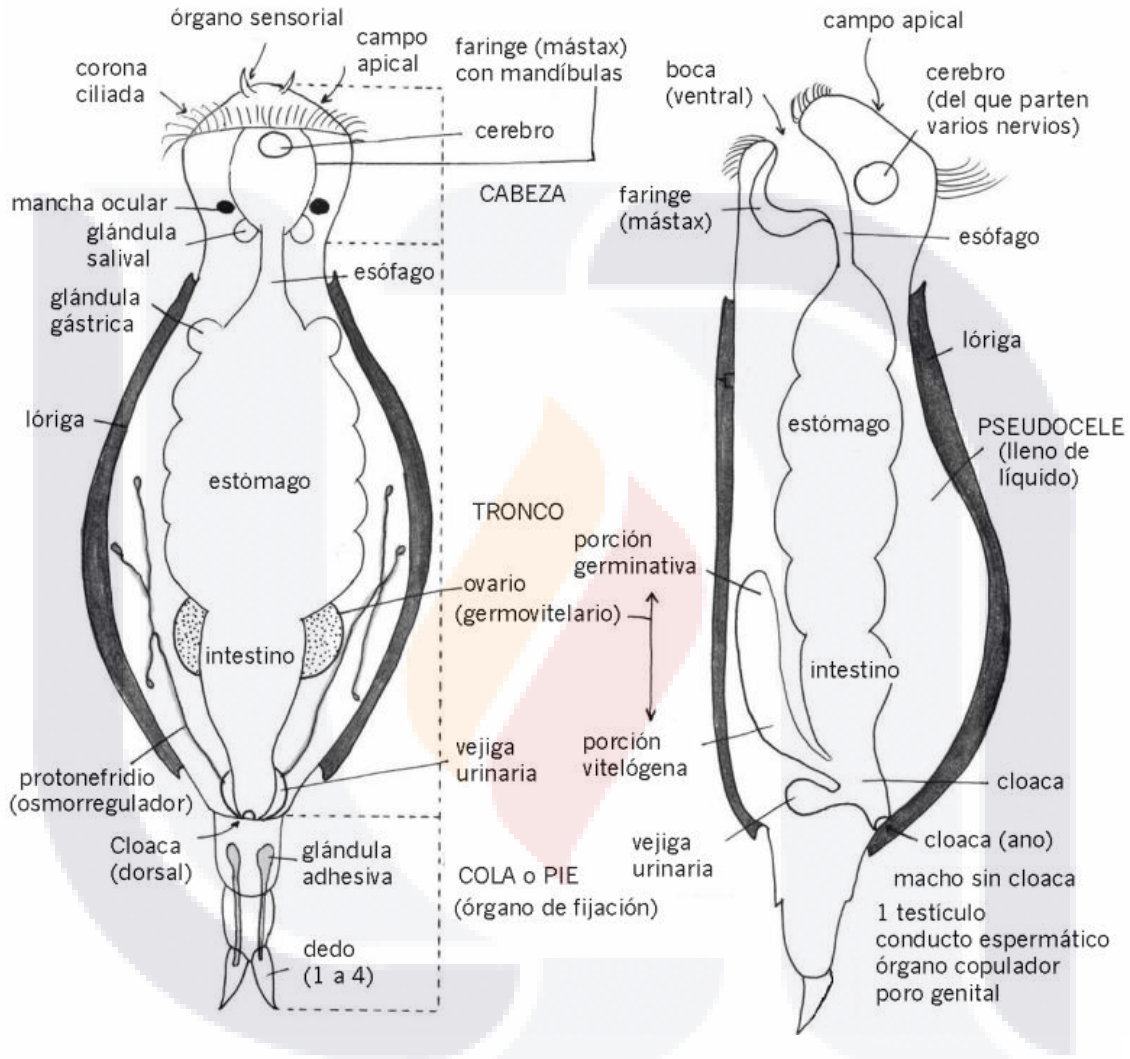


Figura 1. Estructura genérica de un rotífero (Moreno, 2013).

2.3.2 Reproducción

Las hembras producen 3 clases distintas de huevos, los grandes (diploides amicticos) y pequeños (Haploides micticos), donde los huevos pequeños no se fecundan,

se desarrolla partenogénicamente (Pray, 1995). Por lo tanto, un recién nacido (neonato) crecerá como una hembra asexual que produce óvulos diploides (con dos juegos de cromosomas) y, en ausencia de mutaciones, se convierte en una hija genéticamente idéntica a la madre. Esta reproducción exclusivamente asexual se repite indefinidamente (propagación clonal) (Figura 2).

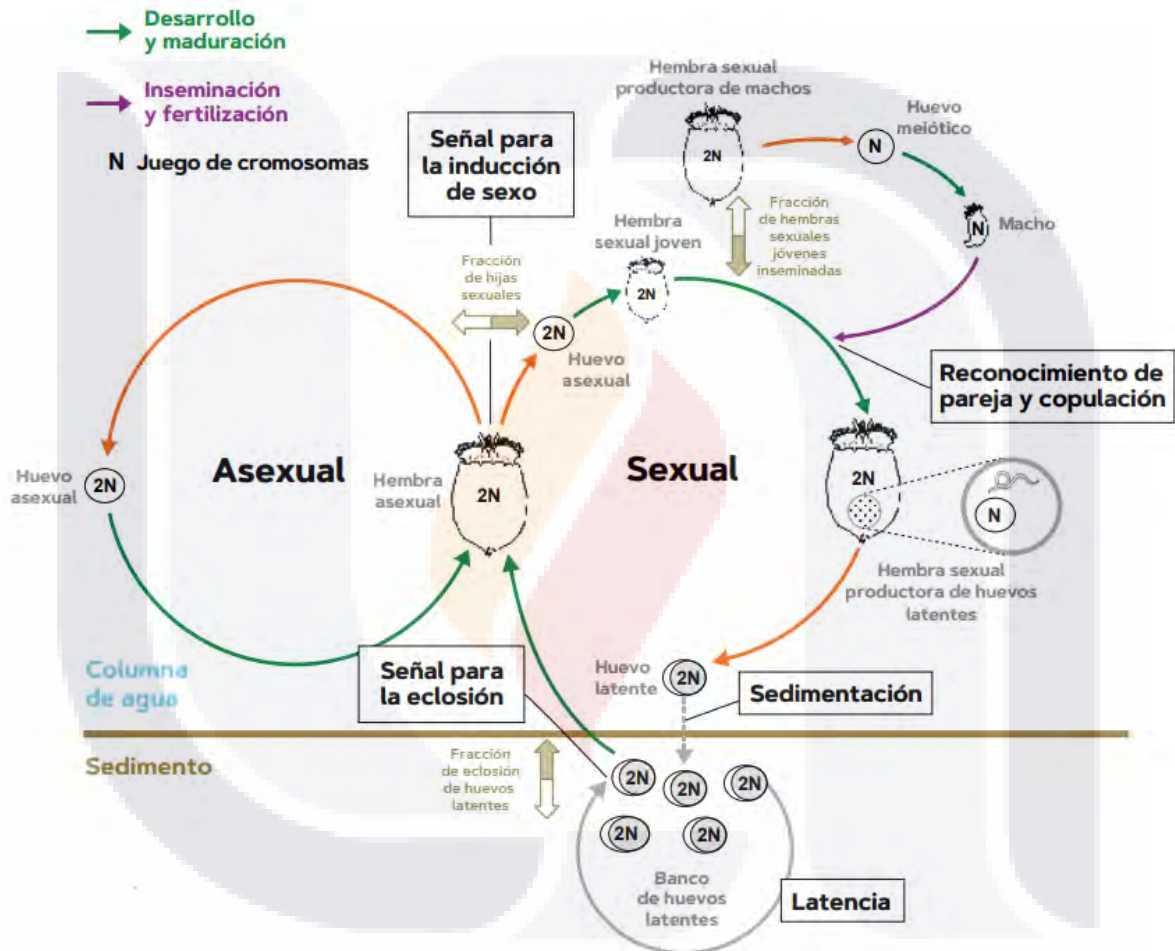


Figura 2. Ciclo reproductivo del rotífero (Serra et al. 2019)

La fase sexual, que no detiene por completo la reproducción asexual, comienza cuando la madre asexual produce a sus hijas sexuales como parte de su descendencia, en respuesta al desencadenamiento de factores ambientales.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Las hembras sexuales ponen huevos con un solo conjunto de cromosomas (haploides), los cuales se desarrollan mediante meiosis (división celular en la que el complemento genético se reduce a la mitad) y se convierten en machos haploides mediante partenogénesis. Cuando las hembras sexuales jóvenes se aparean, los huevos haploides son fertilizados y se convierten en huevos diploides en reposo.

Estos huevos se depositan en sedimentos y pueden sobrevivir en condiciones adversas, lo que permite a la población colonizar la columna de agua o extenderse a otros hábitats cuando las condiciones adecuadas regresan al hábitat. Después de recibir la estimulación adecuada, la hembra asexual eclosiona de algunos de los huevos inactivos y comienza una nueva fase de crecimiento. Las partes de los huevos latentes que no eclosionan se depositan y forman bancos de huevos en el sedimento (Serra *et al.*, 2019).

2.3.3 Alimentación

Los rotíferos obtienen su alimento mediante pastoreo, depredación o suspensión (Herzig, 1987). Las distintas formas de la alimentación de rotíferos y sus dietas consisten en pastoreo activo y colección simultánea, donde un pastoreo activo consta en una captura de alimento que es absorbido o ingerida y la colección simultánea consta en distintos alimentos ingeridos dependiendo del tamaño de la boca según la especie en cuestión (Obertegger *et al.*, 2011). Considerando lo antes mencionado, la especie del rotífero dará condiciones específicas para su cultivo, manejo y alimentación, específicamente el *Brachionus calyciflorus* para el desarrollo de este proyecto.

2.4 ROTÍFERO: Género *Brachionus calyciflorus*

Los rotíferos del género *Brachionus* constituyen el alimento vivo de suma importancia para la primera alimentación larvaria de muchas especies de interés acuícola, debido al tamaño, velocidad de natación y capacidad para permanecer suspendido en la columna de agua, por lo que han sido ampliamente estudiados por su trascendencia para el desarrollo acuícola (Stottrup *et al.*, 2008). Dentro del género *Brachionus* se encuentran muchas especies crípticas con una morfología muy semejante que han sido clasificados como “complejos de especies” (species complexes). Tal es el

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

caso de dos especies de gran importancia en medios marinos y eurihalinos como *Brachionus plicatilis* y una en medio dulceacuícola *Brachionus calyciflorus*. En estos complejos de especies la determinación del nivel específico se logra en base a estudios genéticos que usualmente implican la determinación de la secuencia del citocromo oxidasa complejo I (CoxI) mitocondrial y algunas secuencias nucleares como la ITS1 y la 28S ribosomal, también en estudios previos se ha demostrado que *Brachionus calyciflorus* presenta una mayor sensibilidad al Pb respecto a otras especies (Santos-Medrano *et al.*, 2013).

2.5 Evolución en rotíferos

El corto tiempo de generación y una alta tasa de renovación poblacional, convierte a los rotíferos en componentes críticos en el flujo de energía y reciclaje de nutrientes en los sistemas acuáticos. Adicionalmente, estos organismos poseen altas tasas de ingestión y de eficiencias de asimilación por lo que transforman eficientemente una buena cantidad de su alimento en biomasa animal que es aprovechada rápidamente por el siguiente nivel trófico (Starkweather 1980).

Las contribuciones de los rotíferos a la dinámica trófica de los lagos se pasaban por alto con frecuencia. Sin embargo, aunque la biomasa individual es diminuta, el gran tamaño de la población, junto con las altas tasas de rotación, hacen de los rotíferos un componente importante de las redes alimentarias (Herzig, 1987) por lo cual en la actualidad son altamente seleccionados en distintas pruebas de toxicidad para una respuesta de acción rápida en distintos ámbitos.

Es importante considerar que, en estado estacionario, el tamaño y la estructura demográfica de una población son constantes porque la mortalidad y las pérdidas por dilución se compensan precisamente con el crecimiento demográfico limitado por alimentos de manera continua.

La forma más directa de estudiar la adaptación microevolutiva a las condiciones de selección locales es comparando poblaciones evolucionadas con sus poblaciones ancestrales. Idealmente, la aptitud de los genotipos de ambos tipos de población puede compararse experimentalmente en condiciones ambientales contemporáneas idénticas,

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

también puede permitir un estudio detallado de la trayectoria evolutiva y una evaluación de las tasas de cambios de rasgos microevolutivos dependiendo del gradiente a evaluar. Es importante considerar la sensibilidad ambiental ya que los rotíferos son muy sensibles a los cambios en su entorno, lo que los convierte en indicadores útiles de la contaminación y otros factores estresantes ecológicos (Snell *et al.*, 2007).

2.6 Plomo

El plomo es un elemento natural que se encuentra en pequeñas cantidades en la corteza terrestre. Si bien tiene algunos usos benéficos, puede ser tóxico para los humanos y los animales, lo que causa efectos perjudiciales en la salud, este se puede encontrar en todas partes en el medio ambiente: el aire, el suelo, el agua e incluso dentro de las casas. Gran parte de la exposición proviene de actividades humanas, como el uso de combustibles fósiles, incluido el uso que anteriormente se le daba a la gasolina con plomo, algunos tipos de instalaciones. Su símbolo es Pb, su número atómico es 82 y su masa atómica es 207.2 g/mol. El plomo es un metal de color gris azulado que pierde su brillo cuando se expone al aire. Es muy suave y maleable con gran facilidad para ser fundido, para generar alambres y para extruirlo. Existen diferentes isótopos de este elemento con número de masa de: 204 (1.5 %), 206 (23.6%), 207 (22.6 %) y 208 (52.3 %). El plomo puede ingresar al medioambiente a partir de estos usos que se le daba en el pasado y en la actualidad, también se puede emitir al ambiente a partir de fuentes industriales y sitios contaminados, como antiguas fundiciones de plomo. Si bien los niveles naturales de plomo en el suelo oscilan entre 50 y 400 partes por millón (ppm), las actividades de minería, fundición y refinación han producido aumentos considerables en los niveles de plomo disperso en el ambiente, especialmente cerca de sitios de minería y fundición (EPA, 2021).

2.6.1 Plomo en sistemas acuáticos

El plomo puede ingresar a un cuerpo de agua de una variedad de rutas acuáticas, atmosféricas y terrestres. Aproximadamente el 50% del plomo atmosférico en el medio ambiente proviene de fuentes naturales. Las fuentes naturales de plomo incluyen la erosión del suelo, los incendios forestales y volcanes. Las fuentes de plomo que

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

proviene de la actividad humana incluyen la descarga de municiones, combustible con plomo en aeronaves ligeras y la combustión de carbón y madera, así como diversos procesos en producción y fabricación de metales. Además, los problemas heredados como pintura con plomo, tuberías de agua con plomo y combustible con plomo, el plomo también puede ingresar directamente a los ambientes acuáticos desde las zonas urbanas (EPA, 2023).

Una gran proporción del plomo que entra en aguas superficiales se deposita finalmente en los sedimentos de ríos, estuarios y zonas costeras. Las columnas de agua son reservorios transitorios con tiempos de residencia de plomo en lagos típicamente de varios meses de duración, siendo los “reservorios” de aguas turbulentas los que tienen tiempos más cortos en presencia del tóxico. También se establece que las concentraciones del tóxico son más altas en las áreas superficiales, debido a las fuentes de ingreso (ingreso de contaminantes) al medio, como lo sería el plomo por lavado, y evaporación, sin olvidar el que se sedimenta, siendo así 3 puntos del depósito de Pb en agua:

1. Depósito del plomo en sedimentos: Una gran parte del plomo presente en aguas superficiales termina depositándose en los sedimentos de ríos, estuarios y zonas costeras. Esto ocurre debido a procesos como la sedimentación de partículas finas que contienen plomo adsorbido. Los sedimentos actúan como un sumidero importante de este metal pesado, reteniéndolo a largo plazo y reduciendo su concentración en la columna de agua (EPA, 2020).
2. Columna de agua como reservorio transitorio: El agua superficial no suele retener el plomo de manera permanente, ya que actúa como un reservorio transitorio. Los tiempos de residencia del plomo en las columnas de agua, especialmente en lagos, suelen durar solo varios meses antes de que el plomo sea eliminado a través de la sedimentación o, en menor medida, transporte fuera del sistema. (Alloway, 2013).
3. Implicaciones ecológicas y toxicológicas: El plomo se acumula en sedimentos, pero este, puede volver a la columna de agua mediante procesos de resuspensión, cambios en el pH, o condiciones de reducción en el sedimento (como zonas anóxicas). Esto puede tener efectos adversos para los organismos

acuáticos, especialmente los que viven en contacto directo con los sedimentos (Chapman *et al.*, 2003).

El destino del plomo en la columna de agua está determinado por la química y las propiedades físicas del agua, como la acidez o la alcalinidad (pH), salinidad, estado de oxidación, caudal, sedimento en suspensión y materia orgánica e inorgánica. El pH del agua es de primaria importancia para determinar el probable destino químico del plomo en términos de solubilidad, precipitación o complejización orgánica. La influencia de la química del agua es muy importante ya que no sólo afecta la forma química (especiación) del plomo, sino también su disponibilidad y toxicidad para los organismos acuáticos (Moreno-Rivas *et al.*, 2018)

En el agua, el plomo puede presentarse en cuatro formas diferentes: muy móvil y biodisponible (forma iónica), en forma unida con limitada movilidad y biodisponibilidad (complejos orgánicos con disueltos materiales de humus), fuertemente ligados con movilidad limitada (adjuntos partículas coloidales como el óxido de hierro), o movilidad muy limitada y disponibilidad (adheridos a partículas sólidas de arcilla o restos muertos de organismos). La toxicidad del metal puede variar ampliamente en la superficie, debido a la influencia de 'agua química' (por ejemplo, la dureza o el pH del agua) y sus impactos en las formas metálicas que interactúan con los organismos acuáticos (USEPA, 2020) (International Lead Association, 2022).

Estudios previos han demostrado que los factores intrínsecos tales como sexo, edad y estado fisiológico del organismo tiene una afectación directa y pueden influir en los efectos resultantes ya que los factores antes mencionados tendrán un impacto directo en los niveles de acumulación y distribución interna de los contaminantes (Bervoets, *et al.*, 2009).

2.6.2 Interacción del Pb con organismos acuáticos

La toxicidad del plomo para especies acuáticas como los peces, plantas e invertebrados (como los caracoles) no es el mismo en todos los ecosistemas acuáticos debido a la influencia de la química del agua sobre la biodisponibilidad de los tóxicos ion de plomo (ILA, 2022). La presencia de materia orgánica en el agua en forma de carbono

orgánico disuelto (DOC, por sus siglas en inglés) reduce fuertemente la toxicidad del plomo. De hecho, DOC es más importante que la dureza del agua en aguas dulces a pesar de que algunas regulaciones existentes estándares de calidad del agua, en entornos marinos por ejemplo, debido al alto contenido de sal (alta salinidad) ese es el factor predominante, el cual determinara la biodisponibilidad de plomo, lo que indica que dependerá del tipo de cuerpo acuático así como las características específicas del cuerpo de agua para determinar el factor más influyente. Concretando que los organismos acuáticos pueden absorber plomo del agua en sus dietas, se ha demostrado en diversas investigaciones que el plomo disminuye la tasa de crecimiento y retrasa la maduración sexual, genera efectos secundarios como inanición, daño histopatológico, deformidades etc. (Coenen *et al.* ,1992). Determinando pues que el mecanismo tóxico del plomo consta en la suplantación de los cationes polivalentes (calcio y zinc principalmente) que al ser requeridos por el organismo comienzan a expresar funcionamientos atípicos debido a la asociación generada al plomo afectando canales iónicos, y generando blancos moleculares, lo cual se ve reflejado en problemas, nerviosos, endocrinos, digestivos, musculares por mencionar algunos. Otra vía que se contempla es la absorción las cuales dependen de la variación que presente el tóxico, siendo las vías pulmonares y digestivas las de mayor afectación (Garza, *et al.*, 2005).

Se sabe que neurotoxicidad que genera el plomo sobre los segundos mensajeros es devastador lo cual entabla repercusiones directas en la señalización celular, dañando los canales de voltaje dependientes con efectos intra y extracelular, también es de suma importancia tener en cuenta que el plomo es un carcinógeno que en compañía de otros metales como el cadmio, cobre, zinc y mercurio genera efectos sinérgicos (Hernández, 2006)

La microadaptación al plomo implica varios cambios fisiológicos y bioquímicos en los rotíferos, entre ellos:

2.6.3 Mecanismos de microadaptación al plomo

Los rotíferos pueden desarrollar mecanismos de desintoxicación siendo así vías mejoradas del mismo, considerando 3 principales vías 1: generando una mayor producción de metalotioneínas y otras proteínas que secuestran y neutralizan los iones

de plomo (Martínez *et al.*, 2006). 2: generando vías de respuesta al estrés, esto en la expresión de genes relacionados con el estrés, incluidos los implicados en las defensas antioxidantes, que pueden regularse positivamente para mitigar el daño oxidativo causado por la exposición al plomo (Campos *et al.*, 2008). 3: desarrollando adaptaciones de comportamiento, los cuales se ha demostrado en cambios como la alteración de las conductas de alimentación y apareamiento principalmente, y que estas pueden reducir el consumo y la exposición al plomo, contribuyendo a una mayor supervivencia y reproducción en condiciones contaminadas (Pourriot y Snell, 1983).

2.7 Importancia ecológica y evolutiva

2.7.1 Biomarcadores

Los biomarcadores son moléculas biológicas que se encuentran en la sangre, otros líquidos o tejidos del cuerpo, y cuya presencia es un signo de un proceso normal o anormal, de una afección o de una enfermedad. Un biomarcador se utiliza a veces para determinar la respuesta del cuerpo a un tratamiento para una enfermedad o afección. También se llama marcador biológico, marcador molecular y molécula distintiva, ayudan a establecer los monitoreos biológicos o biomonitoreos, los cuales se basan en el uso sistemático de respuestas biológicas de los organismos.

2.7.2 Bioindicadores

Bioindicador se refiere a aquellos organismos o comunidades en los que su existencia, sus características estructurales, su funcionamiento y sus reacciones dependen del medio en que se desarrollan y que cambian al modificar las condiciones ambientales (Capó, 2002), así pues, se utiliza el término bioindicador para denotar las respuestas de los organismos en los niveles de organizaciones inferiores al individuo átomos, moléculas, células etc.

Las dos características más importantes de los biomarcadores son: 1) la identificación de las interacciones entre el contaminante y el organismo, y 2) medición de efectos subletales. Por análisis químicos solo se puede medir una fracción de los contaminantes presentes sin evidenciar los efectos adversos (Bozo *et al.*, 2007). Las características

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

deseables en un bioindicador incluyen una amplia distribución geográfica, fácil recolección, estilo de vida sésil o de territorialidad restringida, y buena comprensión de los procesos bioquímicos del organismo (Moore *et al.*, 2004) Una de las metas de los estudios de respuestas biológicas a los contaminantes es predecir cambios en la población y la comunidad, a partir de las alteraciones en los biomarcadores.

2.7.3 implicaciones ecológicas y evolutivas de la microadaptación de los rotíferos expuestos

La rápida adaptación de los rotíferos al plomo los convierte en bioindicadores valiosos para monitorear la contaminación por plomo en ambientes acuático siendo considerados especies indicadoras, los cambios en las poblaciones de rotíferos pueden proporcionar alertas tempranas de contaminación e informar los esfuerzos de remediación (Bielanska-Grajner *et al.*, 2014).

Diversidad genética: la microadaptación puede conducir a una mayor diversidad genética dentro de las poblaciones de rotíferos. Esta diversidad mejora la resiliencia de las poblaciones a los cambios y factores estresantes ambientales, contribuyendo a la estabilidad de los ecosistemas acuáticos (Montero-Pau *et al.*, 2016).

Dinámica evolutiva: el estudio de la microadaptación en rotíferos proporciona información sobre los procesos evolutivos que dan forma a las poblaciones en escalas de tiempo cortas. Destaca el papel de las presiones ambientales a la hora de impulsar cambios evolutivos rápidos y el potencial de los organismos para hacer frente a factores estresantes antropogénicos (Walsh *et al.*, 2014).

3. Justificación

Los metales en los ecosistemas acuáticos se encuentran documentados desde la década de los 1950s, los grados de contaminación que se presenta en cuerpos de agua dulce son dependientes de los depósitos de estos en sedimentos y diversas actividades humanas dejando su huella con el paso del tiempo (Rai, 2008). Se han establecido distintos límites máximos permisibles de la presencia del metal en los sistemas acuáticos, específicamente el Plomo (Pb) el cual no debería encontrarse en cuerpos de agua (EPA, 1992), sin embargo, las normas mexicanas tienen un límite máximo permisible de 1 mg/L (NOM-127-SSA1-2021).

El presente estudio permitió observar los valores de exposición crónica del rotífero *Brachionus calyciflorus* Pallas 1766, seleccionado por su importancia y nivel en la cadena trófica, así como confirmar que existe su microevolución, identificando los valores de tolerancia al plomo en distintas generaciones, considerando que la microevolución se puede definir como el cambio en las frecuencias alélicas que ocurre con el tiempo dentro de una población y puede deberse a cuatro procesos diferentes: selección natural, mutación, flujo de genes y deriva genética (Hartl y Clark, 1980).

4. Hipótesis de trabajo

El rotífero *Brachionus calyciflorus* Pallas 1766, presenta micro adaptación evolutiva en distintas generaciones evaluadas (F₀, F₁, F₇ y F₁₅), a partir de una exposición crónica al Plomo (con leadmium) introducido por ingesta

5. Objetivo general

Determinar la existencia de la micro adaptación en rotíferos *Brachionus calyciflorus* Pallas 1766 expuestos a Plomo utilizando Leadmium a partir de su exposición crónica en distintas generaciones definiendo los parámetros LC50

5.1 Objetivos específicos

- 1.- Realizar pruebas agudas y crónicas en el rotífero *Brachionus calyciflorus* Pallas 1766 para obtener datos de toxicidad para las generaciones F₀, F₁, F₇ y F₁₅.
- 2.- Estudiar las rutas de ingreso y acumulación del plomo en los organismos.

3.- Mediante un análisis integrativo comparar la microevolución que se ha llevado a cabo para ver su potencial adaptación a la tolerancia al plomo.

6. Incidencia, impacto social o ambiental esperado

La importancia de la transferencia de la información conducen a una mejora en la sociedad, el presente proyecto de manera directa tiene un vital impacto en el área ambiental, ya que debido al nivel tráfico que se aborda arroja como hecho si existe las adaptación plomo, siendo este un metal innecesario y tóxico comprobado para la salud humana, en relación con los objetivos acordados y priorizados por la sociedad (como los objetivos del desarrollo sostenible de la ONU 2030 y la agenda estratégica) se observan los objetivos específicos participes en el desarrollo de la investigación, específicamente hace aportaciones en el área de la toxicología y a la generación de conocimiento.



Objetivo 3 inciso 3.9 Para 2030, reducir sustancialmente el número de muertes y enfermedades producidas por productos químicos peligrosos y la contaminación del aire, el agua y el suelo



Objetivo 6 inciso 6.3 De aquí a 2030, mejorar la calidad del agua reduciendo la contaminación, eliminando el vertimiento y minimizando la emisión de productos químicos y materiales peligrosos, reduciendo a la mitad el porcentaje de aguas residuales sin tratar y aumentando considerablemente el reciclado y la reutilización sin riesgos a nivel mundial.

7. Materiales y métodos

7.1 Esquema general de trabajo

El mantenimiento del cultivo tal y como se explicó más detalladamente en el punto 7.3, es necesario para realizar la extracción de huevos amícticos que posteriormente permitió la extracción para las generaciones y la realización del protocolo, la exposición al xenobiótico se detalló en los incisos 7.4 y 7.5 respectivamente para las pruebas realizadas, en la figura 3 se observa el esquema general de trabajo para la obtención de las generaciones analizadas.

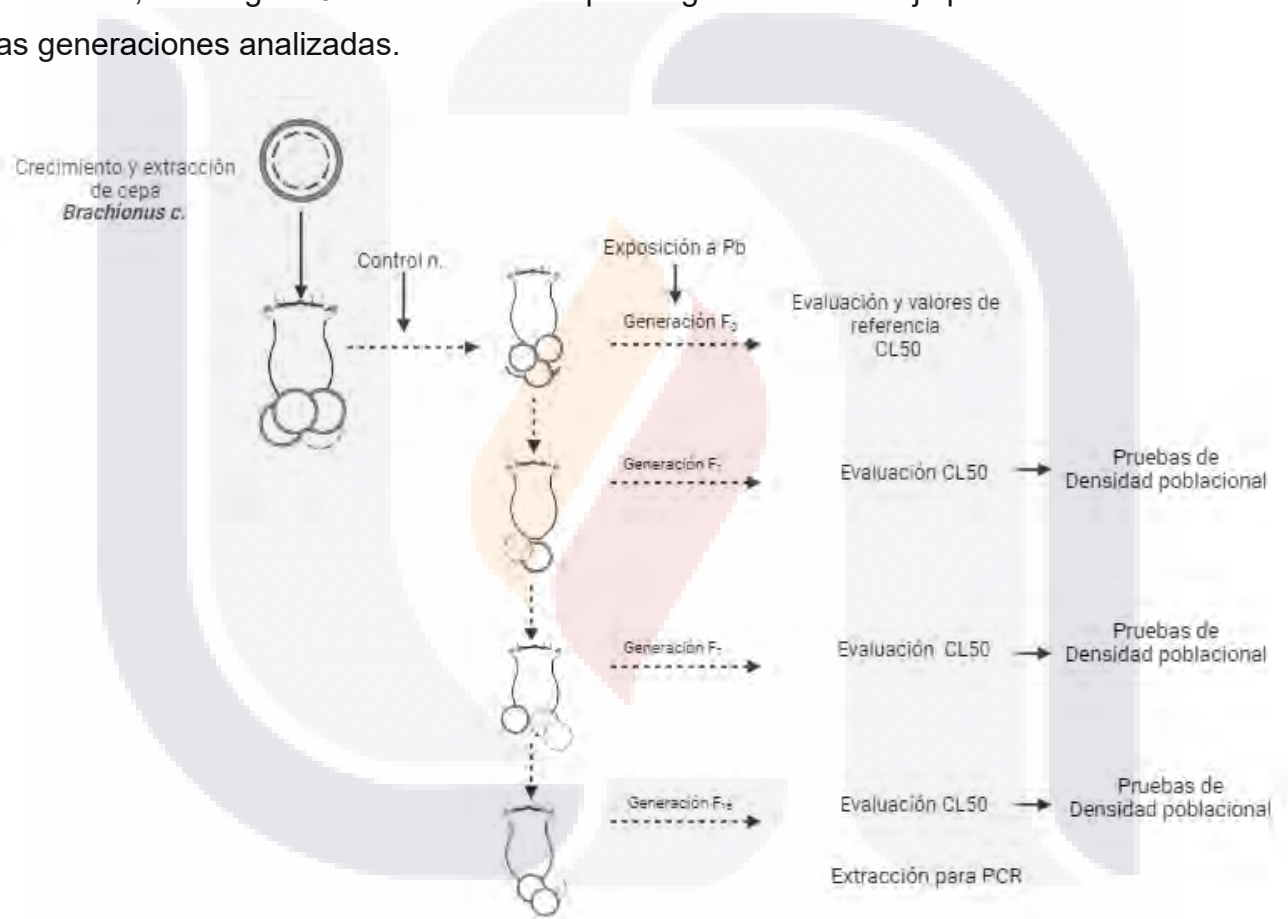


Figura 3. Esquema general de protocolo

7.1.1 Cultivos de rotíferos

El rotífero *Brachionus calyciflorus*, se mantuvo en condiciones de laboratorio antes de realizar los experimentos, en cámara bioclimática con un ciclo de fotoperiodo de luz

oscuridad 16:8 horas (respectivamente). Los rotíferos se cultivaron en frascos de 250 ml con agua artificial. El estudio se hizo en el Laboratorio 202 L-4 de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

7.2 Microalgas

Las microalgas se caracterizan por presentar altas tasas de reproducción, gran adaptabilidad a diferentes condiciones ambientales (Shelef *et al.*, 1980). Tienen ciclo biológico relativamente breve y una alta eficiencia fotosintética. poseen la suficiencia de hacer fotosíntesis y crecer con una gran diversidad de nutrientes como lo son las sales minerales, con sustancias orgánicas como aguas residuales, en condiciones autotróficas y mixotróficas (Chinnasamy, 2010).

7.2.1 *Chlorella vulgaris*

El género *Chlorella* es una microalga con alto potencial biotecnológico por su capacidad de sintetizar ácidos grasos, es interés industrial, rápido crecimiento y capacidad de adaptación a diferentes fuentes de nutrientes. Las especies del género *Chlorella* han sido ampliamente estudiadas en su uso de procesos biotecnológicos, de los cuales se obtiene productos para su aplicación en las industrias alimenticias farmacéuticas, de saneamiento ambiental entre otras (Chisti, 2007). Debido a las características antes mencionadas se seleccionó esta microalga como parte de la dieta del rotífero *Brachionus calyciflorus* Pallas 1766 para el desarrollo del presente proyecto, en la figura 4 se observa un lote de alga en proceso para alimento.



Figura 4. Crecimiento de microalga *Chlorella vulgaris*

7.3 Mantenimiento del cultivo

Para el mantenimiento se optó por un cultivo continuo el cual consistió en cambiar una porción del medio regular, con el fin de mantener la calidad de medio, de tal manera que los residuos producidos en este sistema se reduzcan al mínimo y este pueda mantenerse y cosecharse con regularidad (Yoshimatsu *et al.*, 2014). Los cultivos se mantuvieron a 25 °C con un fotoperiodo claro: oscuro en la figura 5 se observa una charola de trabajo previamente rotulada lista para mantenimiento.



Figura 5. Mantenimiento de cultivo

7.3.1 Alimento

Se cultivó por lotes utilizando un medio estándar (basal de Bold, Borowitzka y Borowitzka, 1988) inoculado con *Chlorella vulgaris*. Las algas en fase logarítmica (13-15 días posterior a la siembra) se recolectaron y se concentraron mediante centrifugación a 3000 rpm durante 5 min. Luego, las algas concentradas se resuspendieron en 5 ml de agua destilada, la cual se utilizó para alimentar a los cultivos y pruebas desarrollados.

7.3.2 Limpieza de organismos

Antes de su preservación los organismos pasaron 24 horas sin recibir alimento, esto con el fin de eliminar su contenido estomacal. En caso de haber presencia de residuos de alimento se realizó un lavado de los organismos, que consistió en agregar medio de cultivo en una placa de cristal de nueve pozos y cambiar a los organismos

7.4 Pruebas de toxicidad

Para obtener neonatos de edad conocida, se separaron varias hembras adultas, 10 h el día antes del inicio del experimento y se les colocó en cajas Petri con 20 mL de medio para incubación. Posteriormente, se introdujeron diez recién nacidos (<12 h) por poza en una caja para cultivo de poliestireno esto en 1 ml de medio de prueba que contiene el compuesto químico deseado (plomo).

Para todas las pruebas realizadas las placas se incubaron a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ en la oscuridad para prevenir la fotólisis de los químicos durante 24 h.

7.5 Pruebas toxicológicas agudas

Para las pruebas de toxicidad agudas y crónicas con plomo, se empleó el protocolo de Hernández-Flores *et al.*, (2020) con ligeras modificaciones. En este caso en vez de usar *Euchlanis dilatata*, se utilizó la especie *Brachionus calyciflorus*. Para esta prueba se colocaron 10 neonatos por poza (caja de poliestireno de 24 pozos, figura 6) con una concentración de 0.5,1.0,2.0,2.0,8.0 mg L⁻¹ en medio EPA (Weber, 1993), se colocaron en una incubadora con un fotoperiodo 16:8. Después de la incubación, se cuantificó el número de rotíferos vivos y muertos bajo el estereoscopio, esto con el fin de calcular los valores de LC50 y sus límites de confianza (al 95 %) el cual ayudo a determinar las 3 concentraciones de trabajo.

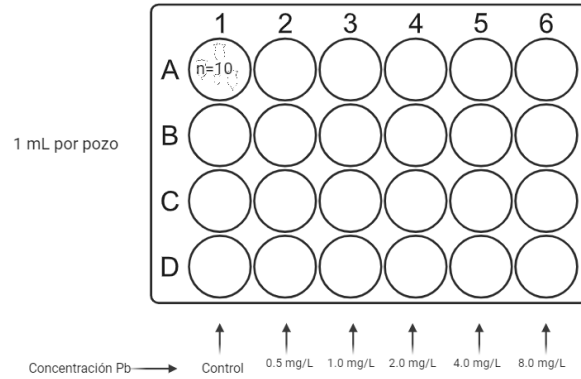


Figura 6. Placa de 24 pozos para realiza ensayos de toxicidad agudas

Posterior a la selección de las concentraciones de trabajo subletales (0.02,0.05, 0.1 y 0.2 mg L⁻¹) se repitió la prueba para saber la concentración letal media de los rotíferos crecidos en esas concentraciones en las generaciones 0, 1, 7 y 15.

7.6 Pruebas crónicas (5 días)

Las pruebas de toxicidad crónica miden la inhibición de la tasa intrínseca de crecimiento (r). Se inicia colocando 10 microorganismos de *B. Calyciflorus* en pozas de una placa de poliestireno, considerando las concentraciones a evaluar (0.02,0.05,0.1 y 0.2 mg/L) y el control negativo, se agrega alimento en una concentración de 1x10⁶ células/mL de alga *Chlorella vulgaris* (conteo realizado y estandarizado durante el proceso de cada prueba), ya colocados los organismos en medio con xenobiótico se resguardaron las placas en una cámara bioclimática con un ciclo programado de luz-oscuridad 16:8, a una temperatura 25 C +/- 2C por cinco días. Cada poza contenía un volumen final de 1ml (Figura 7), se contó con un control negativo con 4 réplicas, al concluir los 5 días de incubación se realizó el conteo de organismos (vivos/muertos) en cada poza y calculó el valor de r, utilizando la siguiente fórmula

$$r = \frac{\ln Nt - \ln No}{t}$$

Donde:

N_t = Número de rotíferos vivos en la poza

N_0 = Número inicial de rotíferos por poza

\ln = Logaritmo natural

T = Tiempo (5 días)

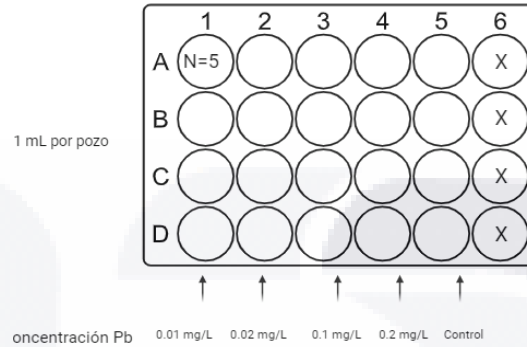


Figura 7. Placa de 24 pozos para realiza ensayos crónicos

7.7 Densidad poblacional

Los rotíferos se cultivaron utilizando un medio sintético, agua moderadamente dura (en adelante medio EPA (Weber, 1993). Como alimento se utilizó *Chlorella vulgaris*, la cual se cultivó por lotes utilizando medio estándar (basal de Bold). Para los rotíferos, en los cultivos madre y en los experimentos, la temperatura se fijó en 25 ± 2 -C, pH 7.0 - 7.4, y la iluminación fluorescente fue continua pero difusa en un periodo de luz oscuridad 16:8 respectivamente.

Para obtener recién nacidos de una edad conocida (neonatos <24 h), se separó una gran cantidad de individuos con huevos de los cultivos masivos en la fase exponencial de crecimiento, el medio donde se colocaron los microorganismos la solución presentó una composición de: EPA + xenobiótico + alimento (a excepción del control negativo que solo contenía EPA + alimento) posteriormente en un vaso de precipitado de 50 mL se añadieron 20 mL del medio preparado y se colocaron 20 microorganismos. La prueba tuvo una duración de 20 días donde se realizó conteo diario de la población (Figura 8). El diseño experimental consistió en 15 vasos de precipitado transparentes, para cada tratamiento se realizaron 3 réplicas incluido el control.

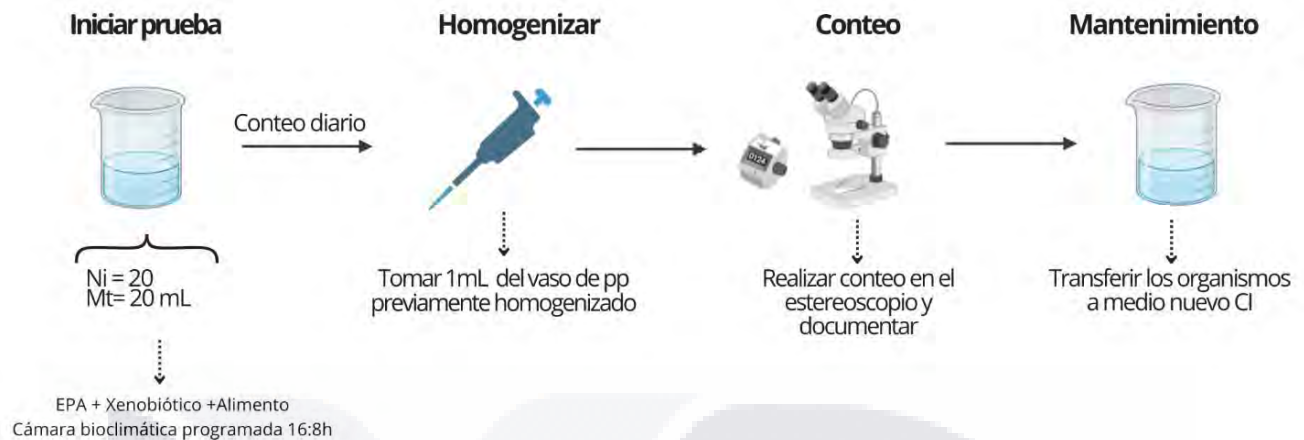


Figura 8. Metodología de respuesta demográfica

Se utilizó una pipeta Pasteur de punta fina bajo un estereoscopio, en el cual se introdujo de forma individual 20 neonatos (es decir, densidad inicial 1 ind. mL^{-1}), posteriormente al conteo se realizó el mantenimiento de la muestra, el cual consistió en realizar el cambio los 20 mL de medio en las mismas condiciones (xenobiótico-medio + alimento + microorganismos), esta prueba se realizó en las generaciones F_0 , F_1 , F_7 , F_{15} respectivamente en las concentraciones de trabajo establecidas al inicio ($0.02, 0.05, 0.1, 0.2 \text{ mg L}^{-1}$ de Pb).

8 resultados

8.1 Pruebas agudas

Se realizaron pruebas agudas para obtener la estimación de la concentración letal media (CL_{50}), de la población expuesta durante 48 horas, tal y como se desarrolló en el inciso 7.4, obteniendo los resultados a partir de una regresión con el logaritmo de la concentración de las generaciones F_0 , F_1 , F_7 , F_{15} con los tratamientos 0.02 , 0.05 , 0.1 y 0.2 mg L^{-1} .

8.2 Tasa de mortalidad

La tasa de mortalidad en rotíferos expuestos a plomo (Pb) varía según la concentración y la duración de la exposición las pruebas de mortalidad realizadas muestran cómo se ve afectada la viabilidad y reproducción, la primera generación muestra la tendencia inicial dosis-respuesta de este trabajo de investigación (figura 9)

8.2.1 Generación F0

La gráfica en la figura 9 presentó el porcentaje de mortalidad sobre el rotífero *B. calyciflorus* expuesto a cuatro concentraciones de plomo (Pb). Dónde letras diferentes indican diferencia significativa según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0,05$) en la generación F₀, se observa también que en el tratamiento b hay un efecto adverso en la mortalidad de la especie, presentando el tratamiento f (concentración de 0.2 mg L⁻¹ de Pb) una tasa de mortalidad del 100%.

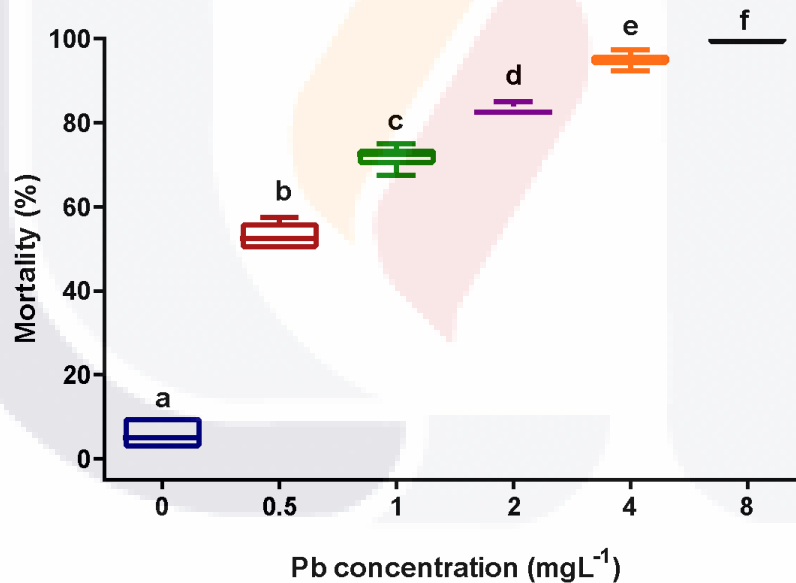


Figura 9. Gráfica de mortalidad F₀

8.2.2 Generación F1

Presentó un 100% de tasa de mortalidad en todas las pruebas realizadas a la generación, la concentración de 4 mg L⁻¹ presentó una tasa de mortalidad de 85-95% en

todos sus tratamientos. Se observó también que la concentración 0.5 mg^{-1} del primer tratamiento arrojó una tasa de mortalidad superior al 50%, mientras que el cuarto tratamiento (d) de la misma generación arrojó un dato por debajo del 50% de mortalidad. Se observó la tendencia típica de tasa de mortalidad, a mayor concentración del tóxico (Pb) mayor tasa de mortalidad.

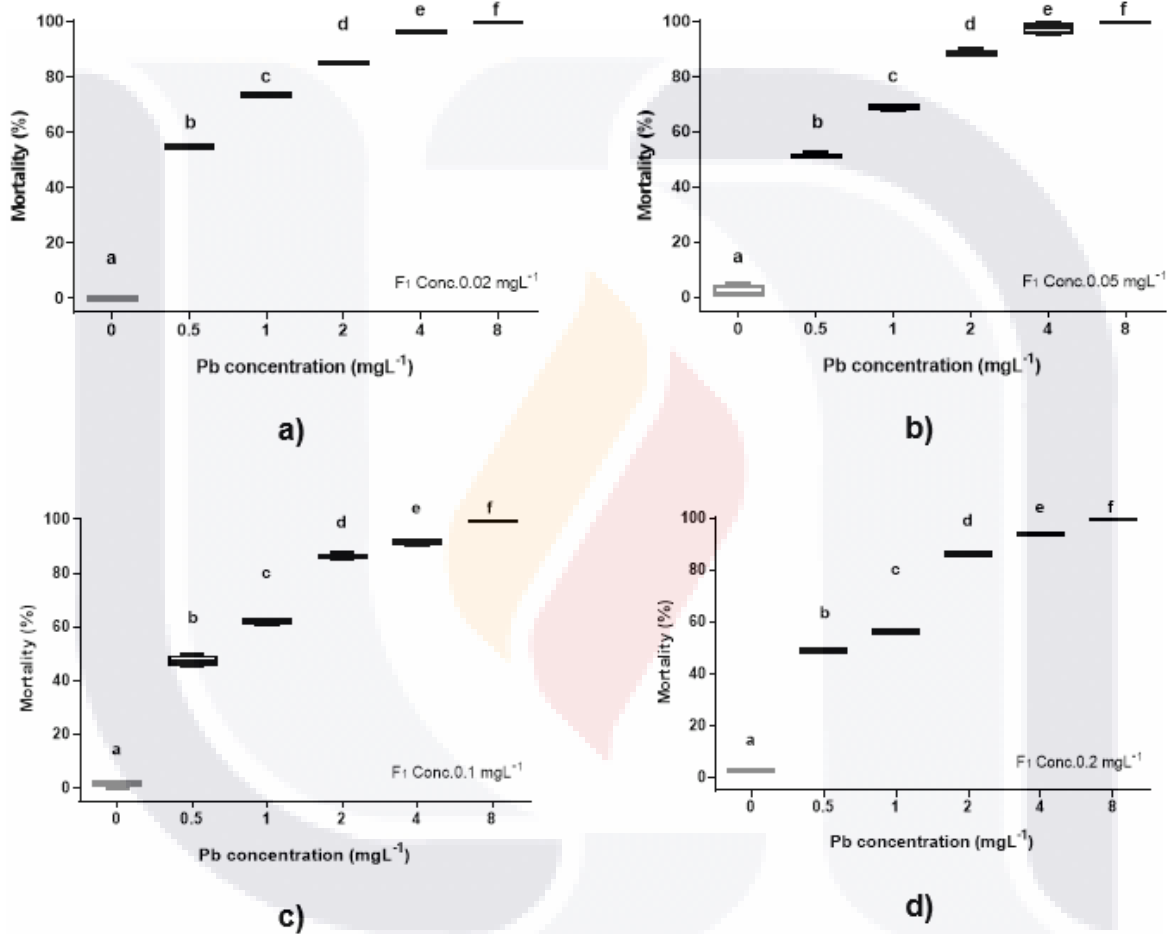


Figura 10. Tasa de mortalidad generación F₁. Concentraciones a) 0.02 mg/L, b) 0.05 mg/L, c) 0.1 mg/L, d) 0.2 mg/L.

Se observó que en la generación F₁ en sus distintas concentraciones de crecimiento a) 0.02, b) 0.05, c) 0.1, d) 0.2 mg L⁻¹ de Pb.

8.2.3 Generación F7

Se observó que en la generación F7 (figura 11) en sus distintas concentraciones de crecimiento a) 0.02, b) 0.05, c) 0.1, d) 0.2 mg/L de Pb, la concentración de 8 mg/L presentó un 100% de tasa de mortalidad, la concentración de 4 mg L⁻¹ presentó una tasa de mortalidad de 85-95% en todos sus tratamientos lo que indica un efecto de saturación.

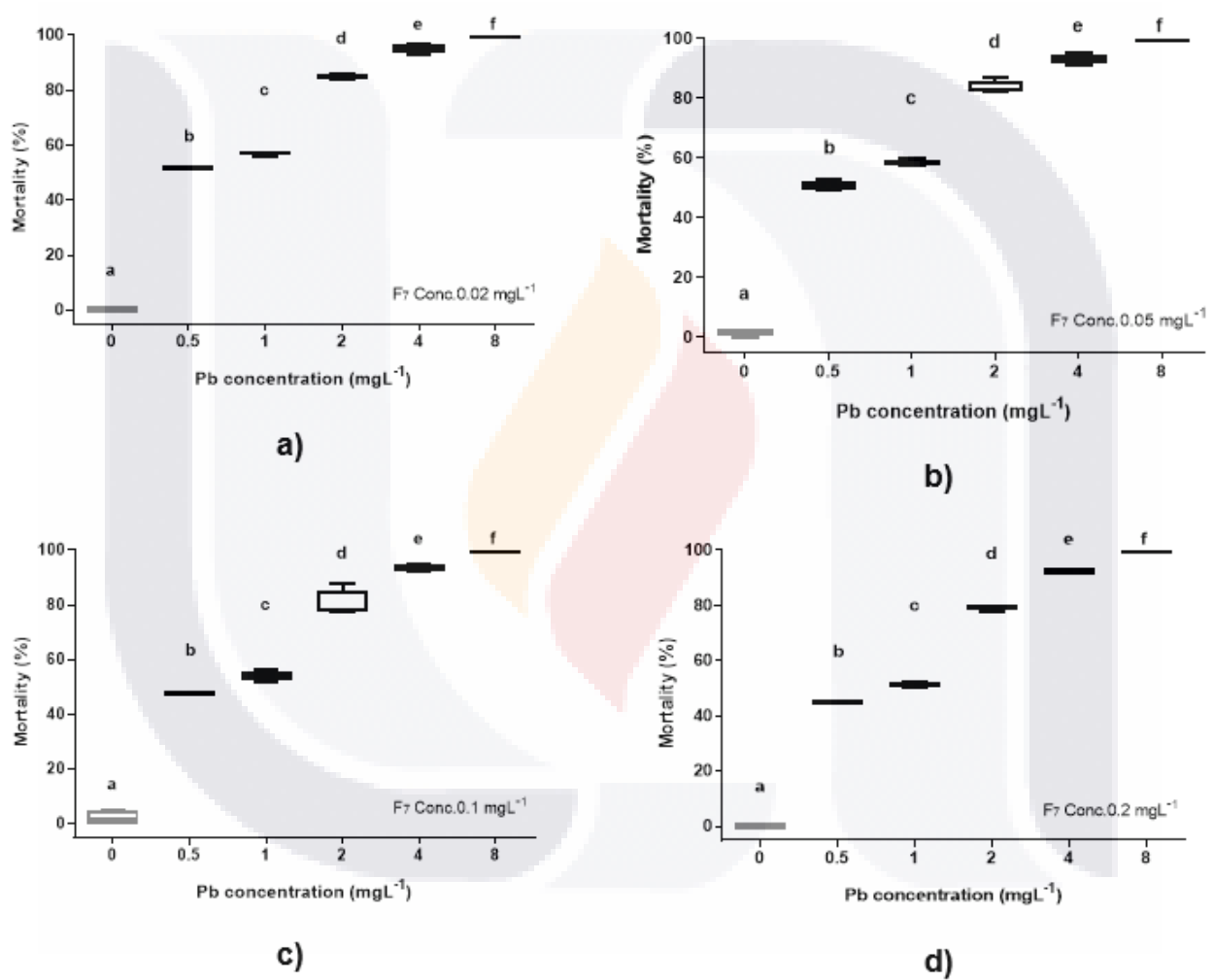


Figura 11. Tasa de mortalidad generación F7. Concentración a) 0.02 mg/L, b) 0.05 mg/L, c) 0.1 mg/L, d) 0.2 mg/L.

8.2.4 Tasa de mortalidad F15

Se observó que los tratamientos expuestos con 0.5 y 1.0 mg/L (figura 12 c y d) presentaron una tasa de mortalidad menor al 50%, se visualiza en los gráficos que el mayor porcentaje de la población de la generación F₁₅ expuesta a los tratamientos subletales de 0.002,0.05,0.1 y 0.2 mg/L respectivamente sobreviven en sus dos concentraciones más bajas recordando que las pruebas letales arrojaron un CL₅₀ 0.863 y 0.869 mg/L respectivamente en la generación F₁₅

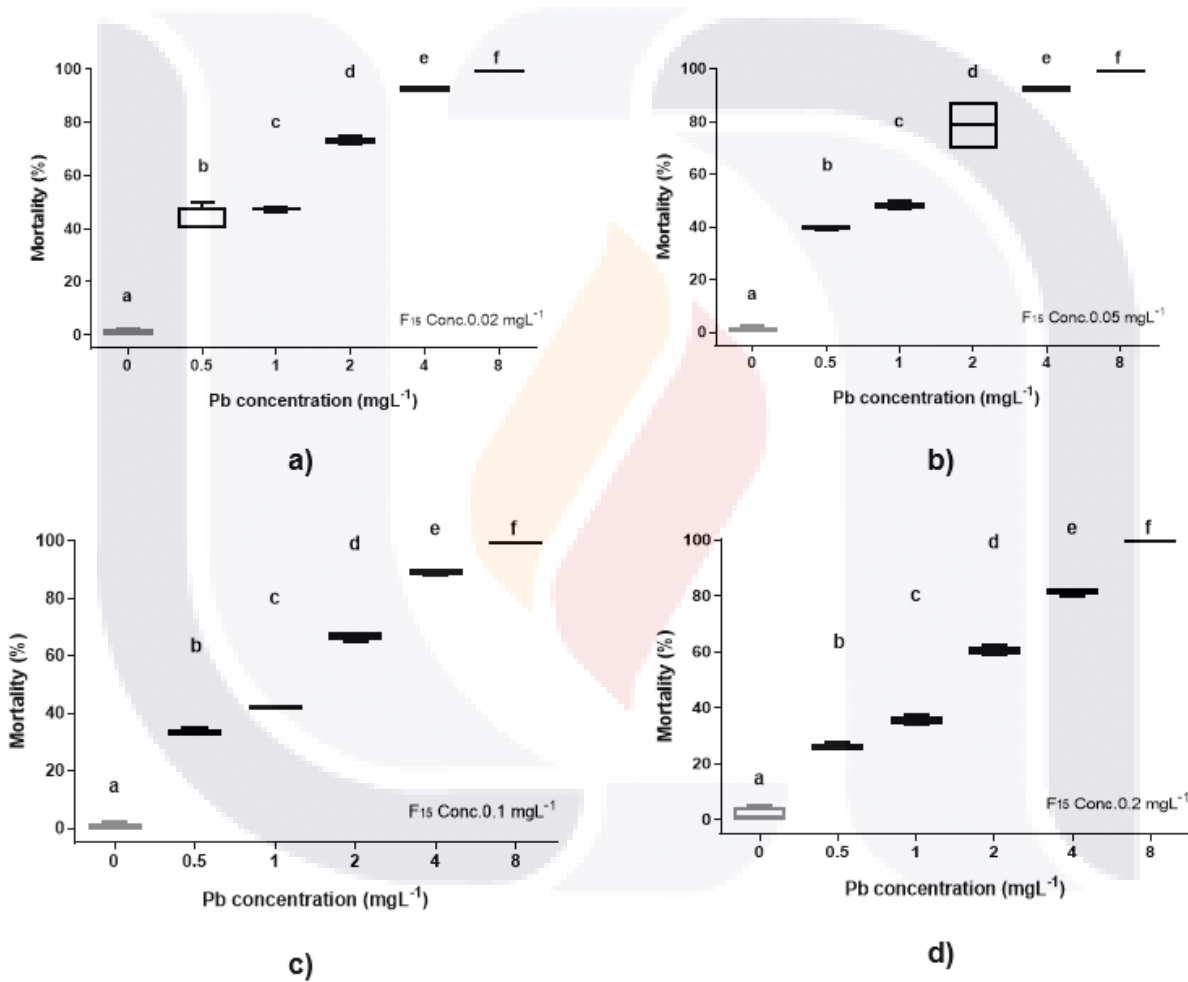


Figura 12. Tasa de mortalidad generación F₁₅. Concentraciones a) 0.02 mg/L, b) 0.05 mg/L, c) 0.1 mg/L, d) 0.2 mg/L.

También haciendo un recuento de las mortalidades de las generaciones trabajadas (figura 10-12) se expresa que las dos concentraciones más altas de exposición en las pruebas agudas (4 y 8 mg/L de Pb), presentan de un 90-100% de

mortalidad lo que confirma que la concentración de Pb tuvo un fuerte efecto altamente positivo sobre mortalidad en concentraciones altas. Cada concentración produce una mortalidad significativamente diferente (como lo indican las letras del grupo), no se observaron bigotes extensos en las pruebas realizadas en la generación F15 lo cual indicó datos bastantes consistentes teniendo una variabilidad reducida por exposición y teniendo ausencia de datos atípicos en las pruebas realizadas.

8.3 CL50 (Probits)

Se utilizó la regresión probit como parte de la metodología con el fin de obtener una estadística robusta para analizar la relación entre la concentración de plomo y la respuesta biológica observada, específicamente a las poblaciones desarrolladas en concentraciones subletales del tóxico.

8.3.1 CL50 (Probits) generación F0

En la gráfica probit de F₀ (figura 13) se observa una respuesta plana lo que indicó una variabilidad de datos en respuesta a los organismos expuestos, se observa un R² de 0.9846 lo que indica que los datos experimentales están bien distribuidos y ajustan adecuadamente a la curva estimada por el modelo.

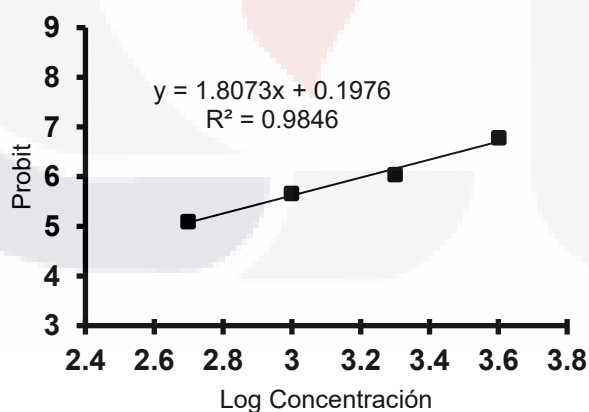


Figura 13. Prueba aguda de generación F₀ (no expuesto) evaluado a concentraciones de 0.5,1.0,2.0,4.0 y 8.0 mg L⁻¹.

8.3.2 CL50 (Probits) generación F1

En la figura 14 inciso a) se observó la relación lineal entre el logaritmo de la concentración y los probits, teniendo como resultado la tendencia de respuesta al plomo, se observó que el ajuste del modelo es bueno, ya que se observó un $R^2 > 90$, siendo la gráfica del inciso d) (concentración F₁ expuesta a 0.2 mg L⁻¹) la más baja con un R^2 de 94, esto debido a que los valores iniciales del tratamiento d) presentaron datos iniciales ligeramente más bajos de los "Probits" a concentraciones menores, La gráfica del inciso b) mostró la pendiente más pronunciada, lo que indica una respuesta más intensa a cambios pequeños en la concentración. Por otro lado, a) y c) tienen pendientes más moderadas, y d) presenta un comportamiento intermedio.

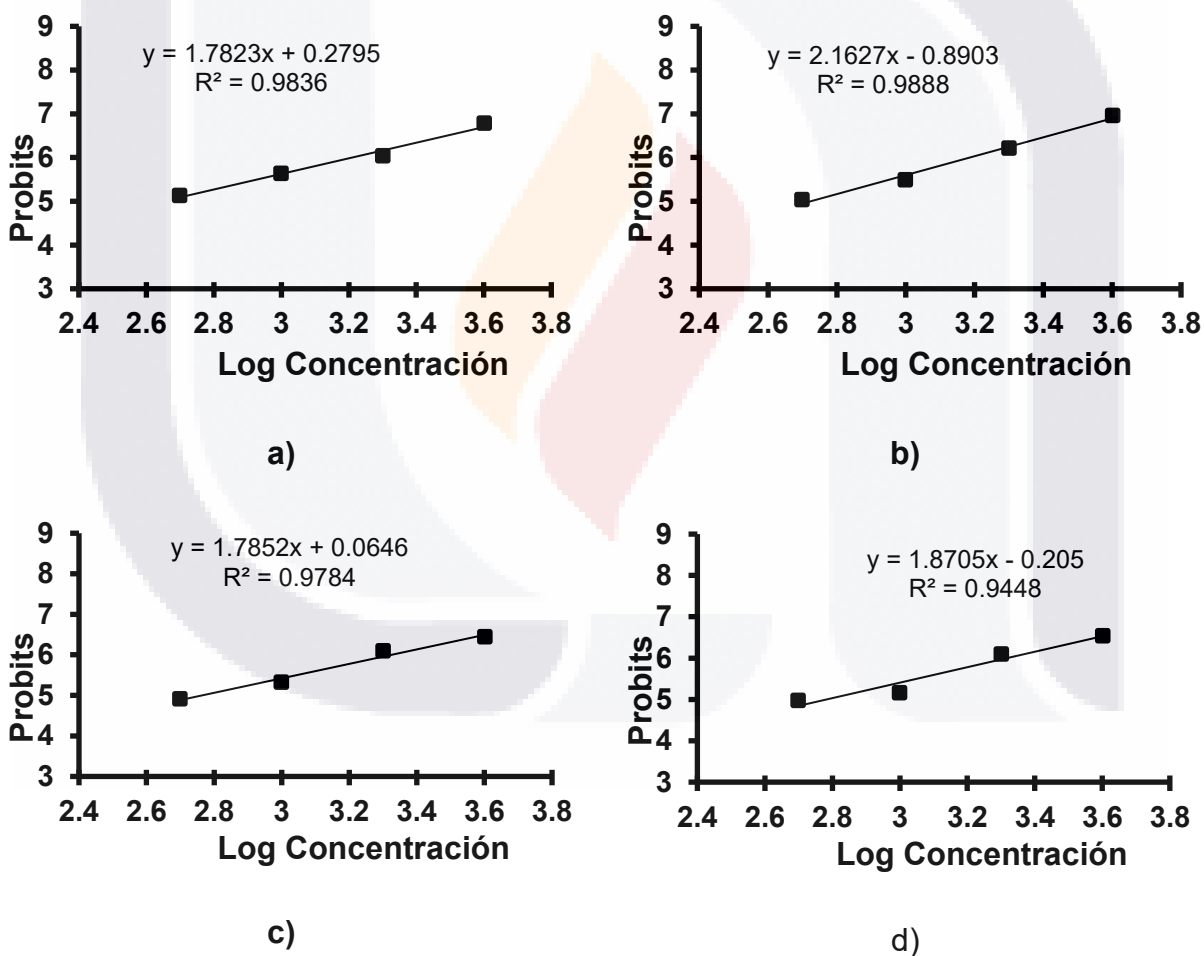


Figura 14. . Prueba aguda de generación F0 (no expuesto) evaluado a concentraciones de 0.5,1.0,2.0,4.0 y 8.0 mg L⁻¹.

En la figura 15 observó un incremento constante del efecto tóxico (Probits) al aumentar la Log Concentración, no se observó gran diferencia en los tratamientos c y d de la generación F1, lo que mostró una consistencia en los efectos del plomo al rotífero expuesto a las mismas condiciones desarrollado en distintas concentraciones de plomo (0.02 (a). 0.05 (b), 0.1 (c), 0.2 (d) mg/L respectivamente).

8.3.3 CL50 (Probits) generación F7

Se observó en las pruebas realizadas a generación F7 en las distintas concentraciones que el tratamiento correspondiente a la figura 16 inciso a es la que presentó una correlación de datos más fuerte, se observa una pendiente ligeramente mayor en el inciso b) (concentración desarrollada en 0.05 mg L⁻¹) lo que indica una mayor sensibilidad al plomo.

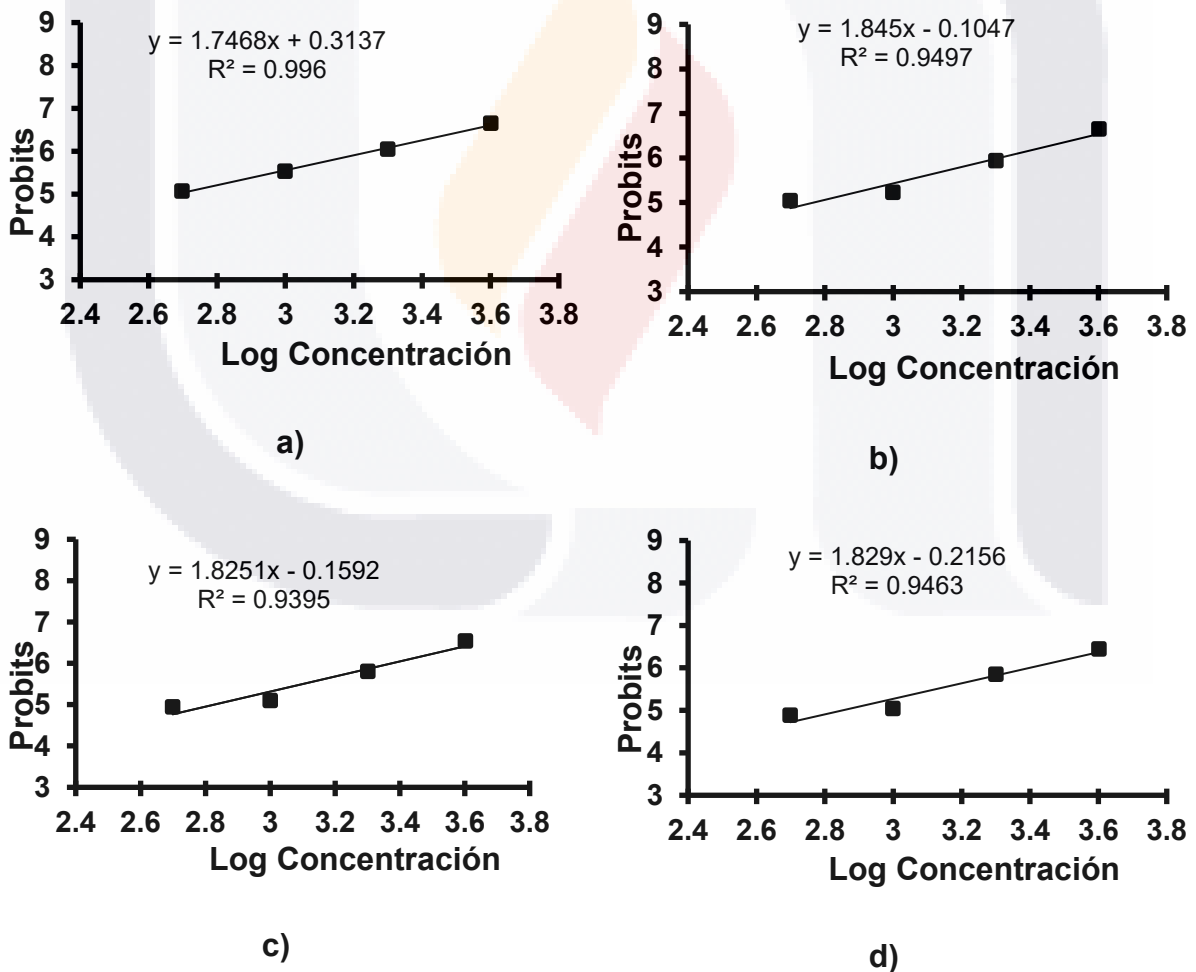


Figura 15. Prueba aguda de generación F7 evaluado a concentraciones de 0.5,1.0,2.0,4.0 y 8.0 mg L-1.

Prueba aguda de generación F₁ cultivadas en una concentración de Pb de 0.02 (a). 0.05 (b), 0.1 (c), 0.2 (d) mg/L.

Respecto a el inciso a), los efectos iniciales de cada concentración diferencias, principalmente los incisos c y d (0.1 y 0.2 mg L-1 respectivamente), presentando una mayor mortalidad lo cual es una tendencia esperada en concentraciones más altas

8.3.4 CL50 (Probits) generación F₁₅

La relación entre el logaritmo de la concentración (x) del plomo y la respuesta en escala probit (y) en pruebas agudas realizadas en el rotífero *Brachiounus c.* de la generación F₁₅, cada gráfica (figura 16) muestra una línea recta que se ajustó a los puntos de datos experimentales , el tratamiento a) (concentración de exposición de 0.02 mg/L de Pb) presentó la pendiente más alta (1.9191), mostrando un mayor efecto tóxico de las concentraciones de plomo, mientras que el tratamiento de d) (concentración de exposición de 0.2 mg/L de Pb la cual es diez veces mayor que el tratamiento a) muestra una pendiente más baja (7.7767), indicando una menor toxicidad percibida, lo cual indica que entre más se desarrollan las generaciones en el tóxico se volvieron menos sensibles al tóxico.

Todos los tratamientos arrojaron buenos ajustes de R² (≥ 0.92), indicando que los datos experimentales tienen buena relación dosis-respuesta. La disminución en la pendiente de a) con respecto al tratamiento d) se estima es causado debido a la micro adaptación del rotífero al plomo en la generación 15, reflejando ligeras diferencias de susceptibilidad al plomo, cambiando su tolerancia esto sugerido a partir de la disminución de la pendiente

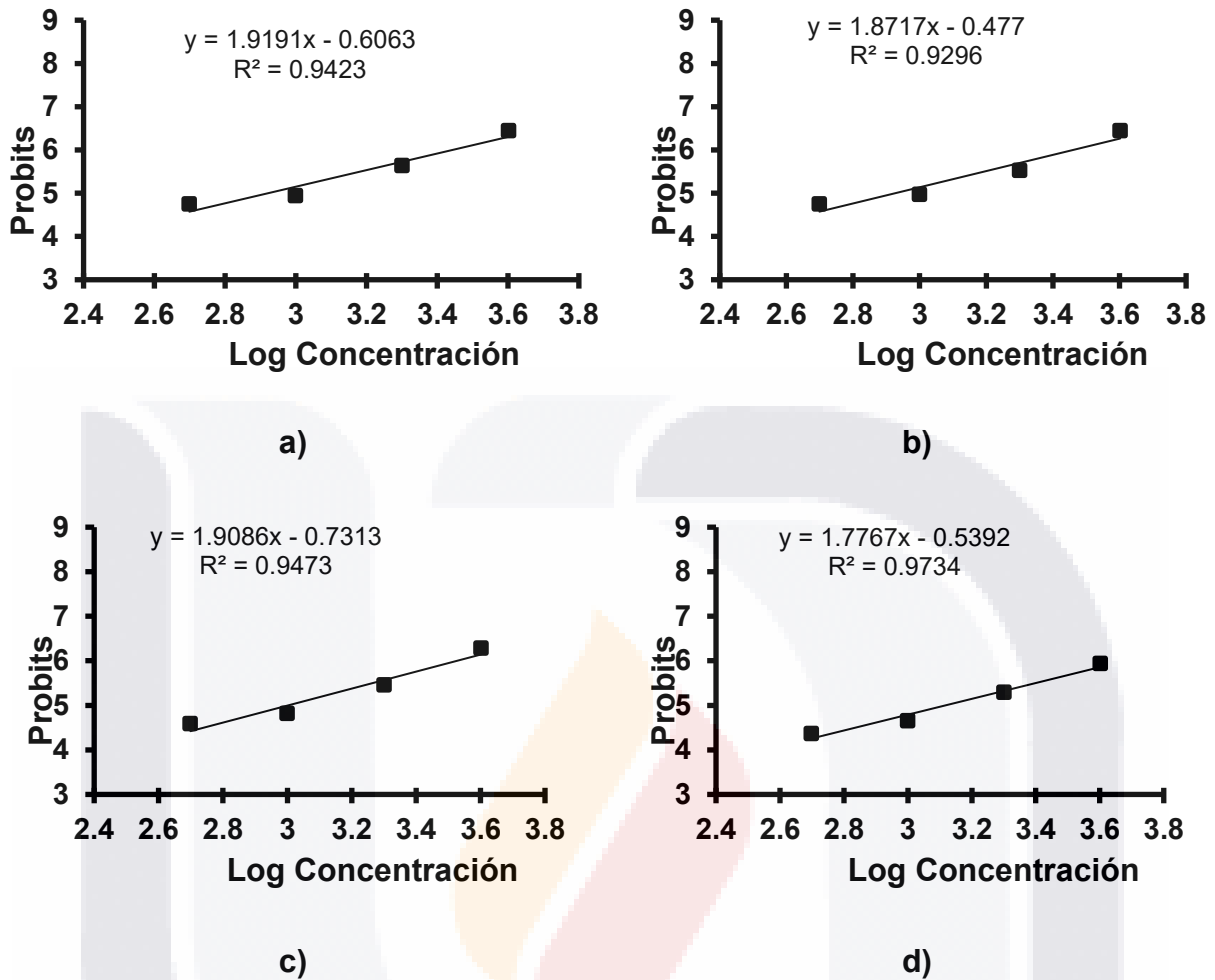


Figura 16. Prueba aguda de generación F15 evaluado a concentraciones de 0.5,1.0,2.0,4.0 y 8.0 mg L-1

Prueba aguda de generación F₁ cultivadas en una concentración de Pb de 0.02 (a), 0.05 (b), 0.1 (c), 0.2 (d) mg/L.

A nivel generaciones se observó que los rotíferos mantuvieron una fuerte relación dosis-respuesta en cada tratamiento, sin embargo se observaron también ligeras diferencias en la sensibilidad al plomo entre las generaciones siendo la generación 1 la que presentó una mayor sensibilidad a las concentraciones del tóxico y la generación F₁₅ la de menor sensibilidad, esto debido a que se observó en las gráficas como fue disminuyendo la pendiente entre las generaciones, lo cual habla sobre el comportamiento habitual de las adaptaciones biológicas y la disminución de la mortalidad de los organismos, se observó, especialmente comparando los tratamientos realizados

en las generaciones expuestas en la generación F1 contra las de F15, patrones de resistencia al plomo debido a su exposición crónica

El coeficiente de determinación (R^2) fue consistentemente alto (mayor a 0.92 en todas las gráficas), indicando relaciones lineales fuertes en los tres casos. Las pendientes tienden a variar levemente entre generaciones y gráficas, sugiriendo posibles adaptaciones o variaciones en la sensibilidad de las diferentes generaciones de rotíferos al plomo.

Finalmente, como resultado de las pruebas agudas generacionales realizadas, se compilaron en la tabla 1, la cual muestra los CL50 de cada concentración por generación.

Tabla 1. CL50 generacional (F1, F7 Y F15).

La tabla 1, es una comparativa de CL50 de las generaciones 0,1,7 y 15 (F0,F1,F7 y F15) expuestas a 4 concentraciones de plomo (0.02,0.05,0.1,0.2 mg/L de Pb) en cada una de ellas.

Conc de Pb (mg/L)	CL ₅₀ F1	CL ₅₀ F7	CL ₅₀ F15
0.02	0.307	0.371	0.863
0.05	0.411	0.514	0.869
0.1	0.542	0.671	1.0665
0.2	0.528	0.712	1.3443

Se observó que en la diferencia entre la concentración de F₀ y la primera concentración de F₁ no presentó mucha variación a diferencia de las generaciones posteriores (F₇ y F₁₅). Entre más se incrementó la concentración de exposición se observó que los organismos generaron resistencia, ya que se vio el incremento de la concentración letal media respecto a las generaciones y su concentración de exposición.

8.4 Tasa intrínseca de crecimiento (r)

Para las pruebas crónicas un valor alto de “r” implica una capacidad rápida de colonización y expansión en ambientes favorables, para la generación F₀ siendo esta la

primera interacción de las poblaciones evaluadas con el tóxico (figura 17), se observa que el control presenta el valor más alto con el tratamiento a) y el resultado de la tasa intrínseca más baja está presentada por la concentración 0.2 mg L⁻¹ de Pb rotulada con el tratamiento b.

8.4.1 (r) generación F0

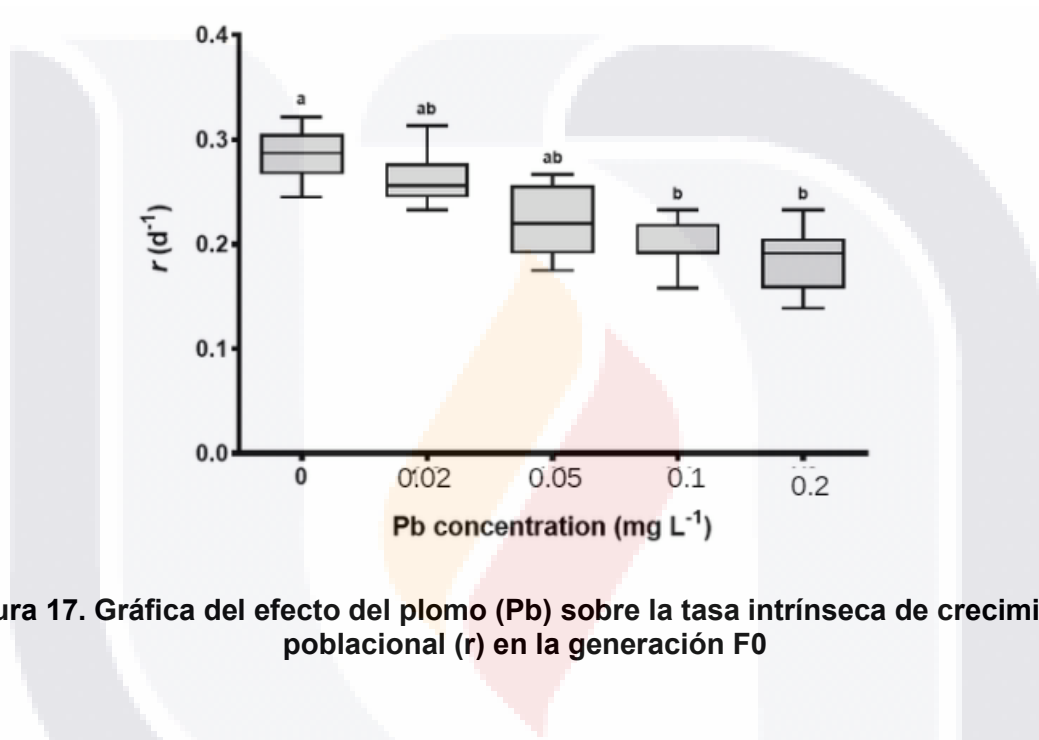


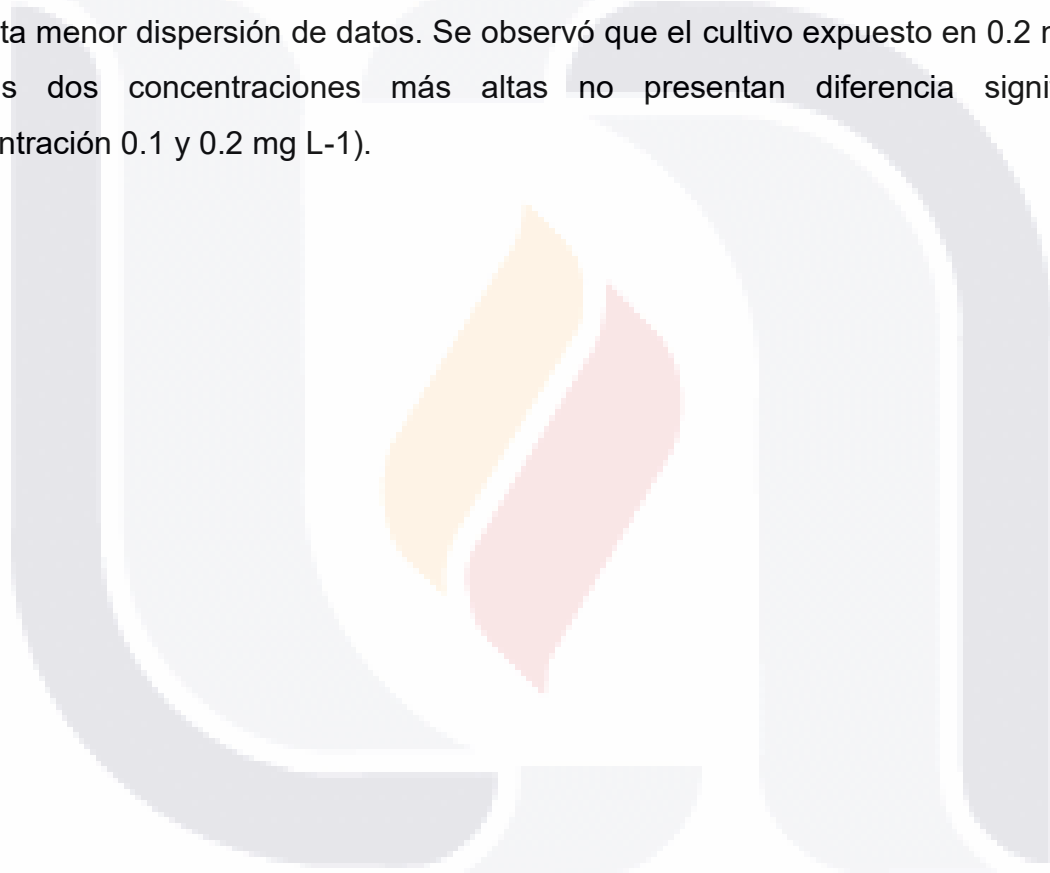
Figura 17. Gráfica del efecto del plomo (Pb) sobre la tasa intrínseca de crecimiento poblacional (r) en la generación F0

En la figura 17 se observa el efecto del plomo (Pb) sobre la tasa intrínseca de crecimiento poblacional (*r*) de *B. calyciflorus* en la generación F₀, donde las letras diferentes indican diferencia significativa según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0,05$). Los organismos de una población pueden modificar su natalidad, mortalidad, o ambas, con el fin de adaptarse a las condiciones a las que estén expuestos, en la gráfica de barras y bigotes de la generación F₀ se observó que los tratamientos correspondientes a 0.1 y 0.2 mg L⁻¹ presentaron diferencia en comparación a los otros dos tratamientos, lo que indica que a mayor concentración del tóxico disminuye la densidad de la población. El efecto del plomo (Pb) sobre la tasa intrínseca de crecimiento

poblacional (r) se ve afectado, encontrando diferencia significativa entre las concentraciones, principalmente en 0.1 y 0.2 mg L⁻¹.

8.4.2 (r) Generación F₁

Posteriormente se analizaron las pruebas de tasa intrínseca de crecimiento, de la generación F₁, donde se observó que las concentraciones 0.02 y 0.05 mg L⁻¹ expuestas en todos los tratamientos, no mostró diferencia significativa con una $p < 0,05$ (figura 18) respecto al control, siendo el tratamiento de la F₁ a 0.2 mg L⁻¹ (figura 18 d) la que presenta menor dispersión de datos. Se observó que el cultivo expuesto en 0.2 mg L⁻¹ en sus dos concentraciones más altas no presentan diferencia significativa (concentración 0.1 y 0.2 mg L⁻¹).



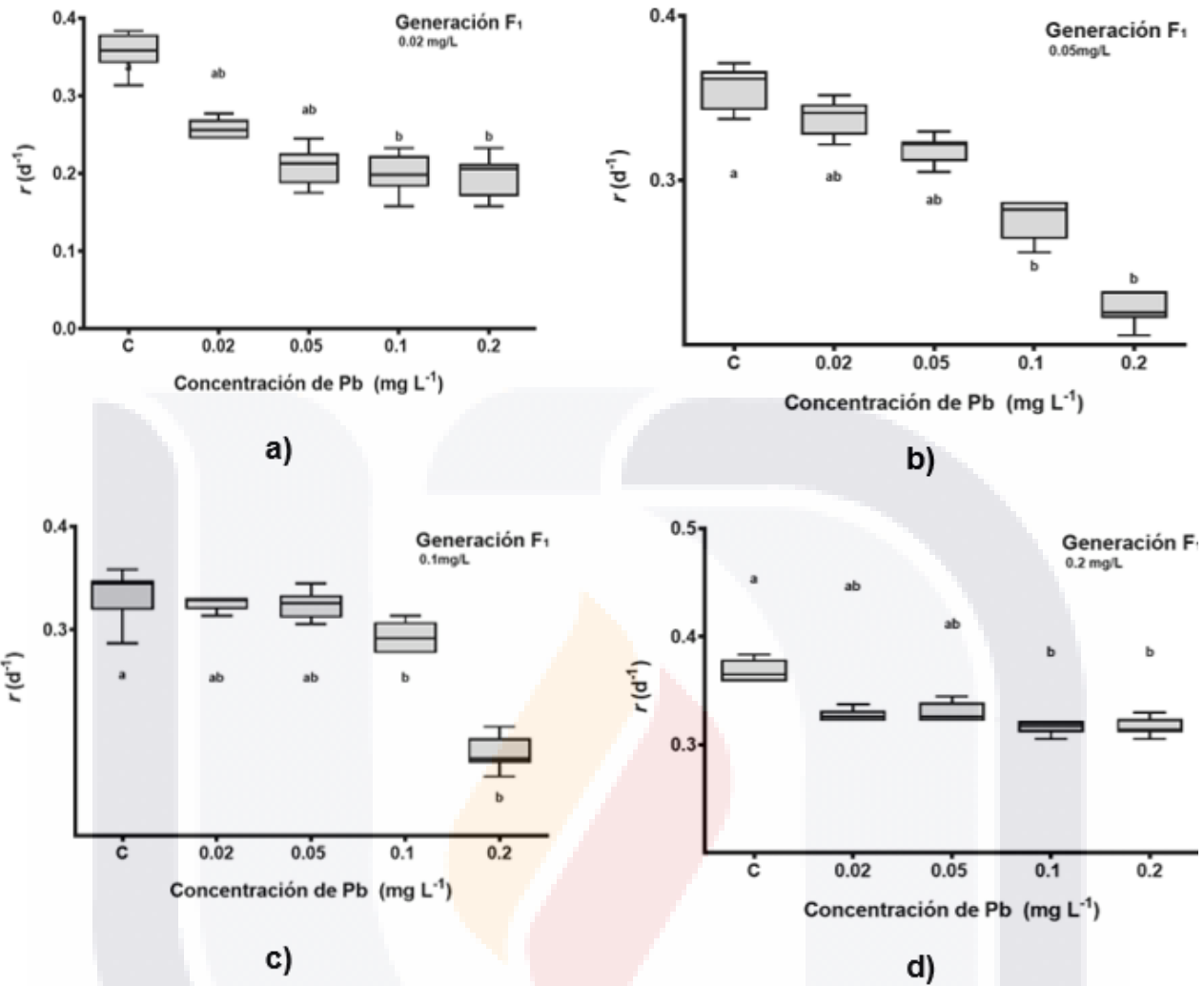


Figura 18. Gráfica del efecto del plomo (Pb) sobre la tasa intrínseca de crecimiento poblacional (r) en la generación F1

8.4.3 (r) Generación F7

En las pruebas crónicas realizadas a la generación F7 en las distintas concentraciones, se observó que el cultivo desarrollado en una concentración de 0.2 $mg L^{-1}$ se ve altamente afectado en los primeros dos tratamientos (figura 19 a y b) obteniendo valores negativos en su tasa de crecimiento, para el inciso c se observó que la concentración de 0.02 y 0.05 no presentó diferencia significativa respecto al control, lo que es caso contrario en las concentraciones de 0.2 y 0.2 $mg L^{-1}$ de Pb respectivamente.

Para la generación F7 crecida a 0.2 y expuesto a 0.2 mg L⁻¹ (figura 19 d) se observa que ha alcanzado valores positivos de crecimiento lo que indica que la tasa de reproducción a esa concentración se adaptó a las condiciones de exposición.

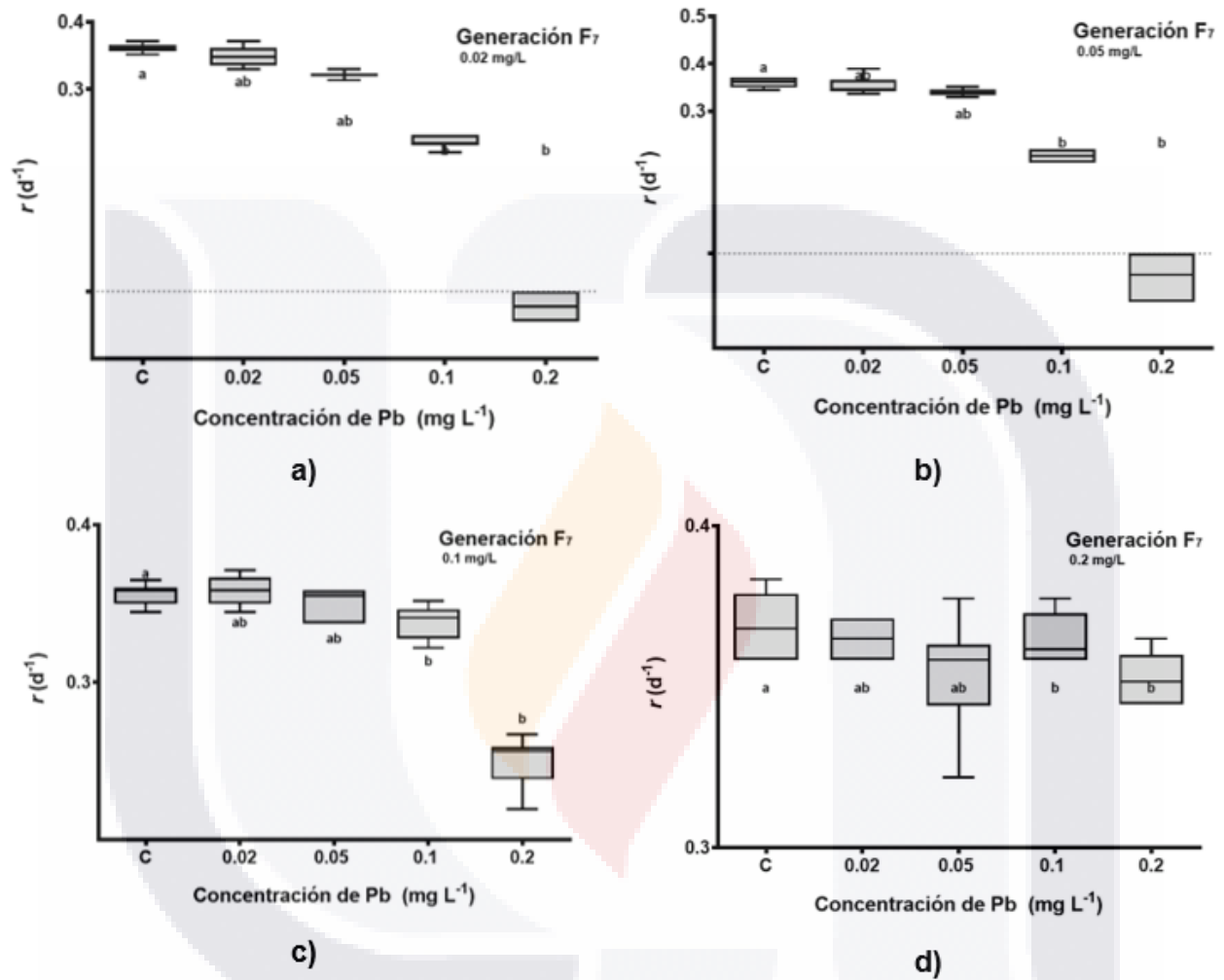


Figura 19. Gráfica del efecto del plomo (Pb) sobre la tasa intrínseca de crecimiento poblacional (r) en la generación F7.

8.4.4 (r) Generación F15

En la figura 16 se observó las pruebas realizadas a la generación F₁₅, mostrando en que la concentración 0.02 y 0.05 mg L⁻¹ de Pb en todas sus exposiciones no expresaron diferencia significativa respecto al control (figura 20), incluso en el inciso C se observa una mayor dispersión de datos en lo que respecta a la concentración 0.05

mg L⁻¹, también se observó que la generación expuesta a concentraciones más altas se ve afectada resultando un valor de “r” bajo., en el inciso d se observó un aumento en la tasa intrínseca alcanzando un valor alto en la concentración más alta (0.2 mg/L) lo que arrojó como resultado que exponer al rotífero a 0.2 mg L⁻¹ después de crecer en esa misma concentración por 15 generaciones, no generó diferencias significativas respecto al control.

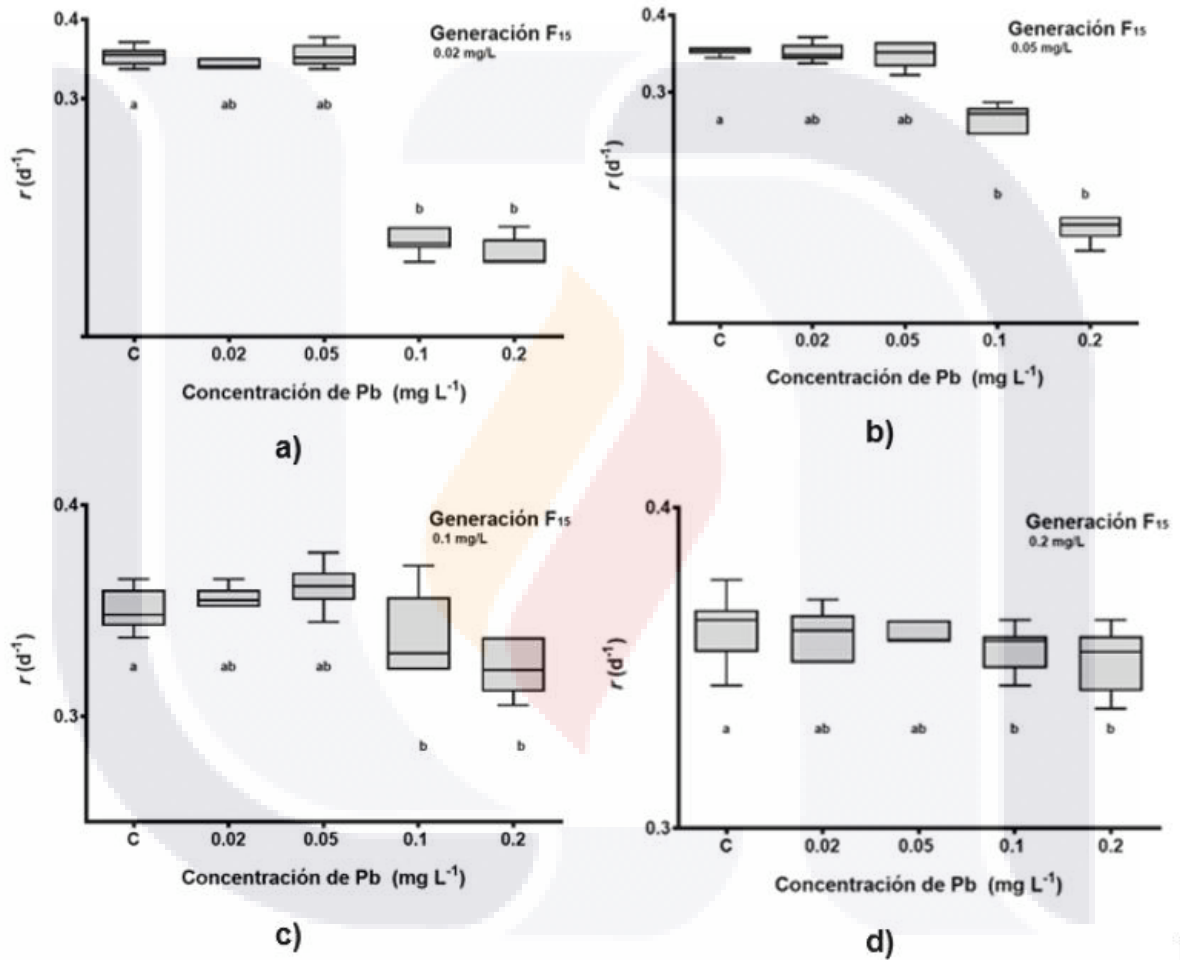


Figura 20. Gráfica del efecto del plomo (Pb) sobre la tasa intrínseca de crecimiento poblacional (r) en la generación F15.

8.5 Pruebas de densidad poblacional

8.5.1 Generación F0

Se realizó la prueba de densidad poblacional a 20 días (figura 21), con cuatro tratamientos a concentraciones subletales distintas 0.02,0.05,0.1 y 0.2 mg L⁻¹ de Pb

evaluando el crecimiento de 1 mL de cultivo respecto al tiempo. La línea de tendencia con icono circular refiere al control negativo (no expuesto).

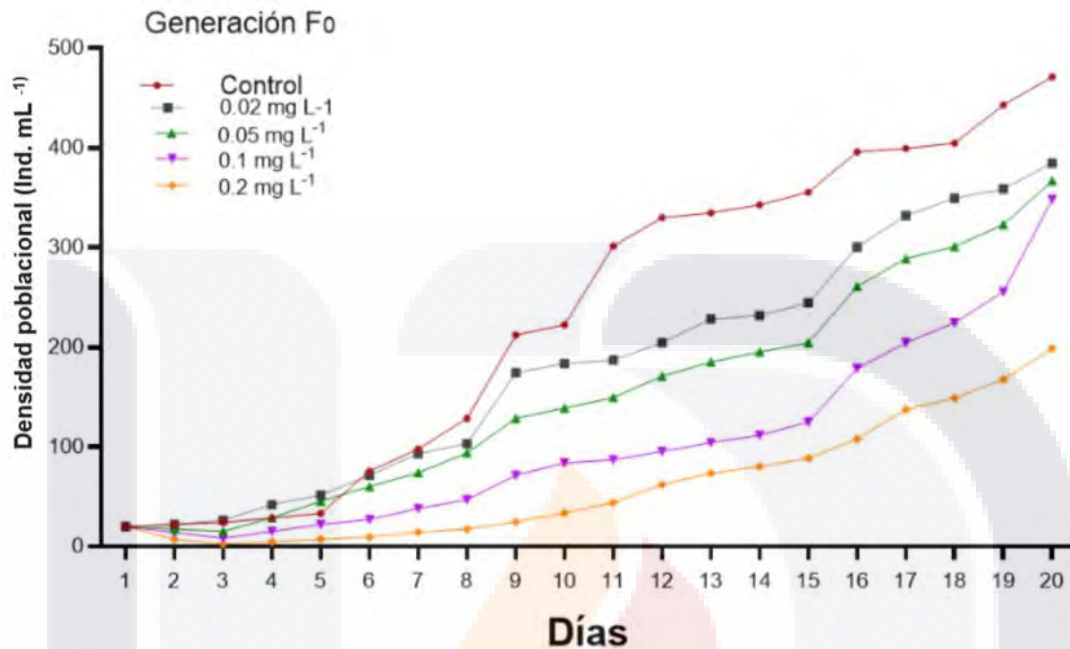


Figura 21. Densidad poblacional generación F0.

Se observó que a mayor concentración de Pb disminuye la densidad de la población, se observa como la línea de tendencia de la concentración 0.2 mg L⁻¹ decrece en los primeros días y es la que presentó menor crecimiento en su densidad, todos los tratamientos en la figura 21 presentaron diferencia significativa respecto al control, encontrando en este último mayor dispersión de datos en los días 11-15

Se realizaron las pruebas de densidad poblacional a cada uno de los tratamientos establecidos al inicio de la investigación (0.02, 0.05, 0.1, 0.2 mg L⁻¹ de Pb) en las generaciones F₀, F₁, F₇, F₁₅, se utilizó el programa de office EXCEL y para graficar el software GraphPad Prism, las gráficas de densidad poblacional mostraron a más detalle en cada tratamiento (figura 22-25) el comportamiento que desarrollaron los microorganismos durante el periodo de la prueba.

Prueba de densidad poblacional, por concentración en las generaciones F₀, F₁, F₇, y F₁₅

8.5.2 Densidad poblacional de 0.02 mg L⁻¹ de Pb en 4 generaciones

En los datos de densidad poblacional expuestos a 0.02 mg L⁻¹ de Pb (figura 22) se observó una gran dispersión de datos principalmente del día 10 al 15, siendo la generación F0 la más sensible y la F15 la que se adaptó o mostró una menor sensibilidad al tóxico respecto al tiempo, presentando una menor dispersión de datos a partir del día 18 respecto al control (no expuesto).

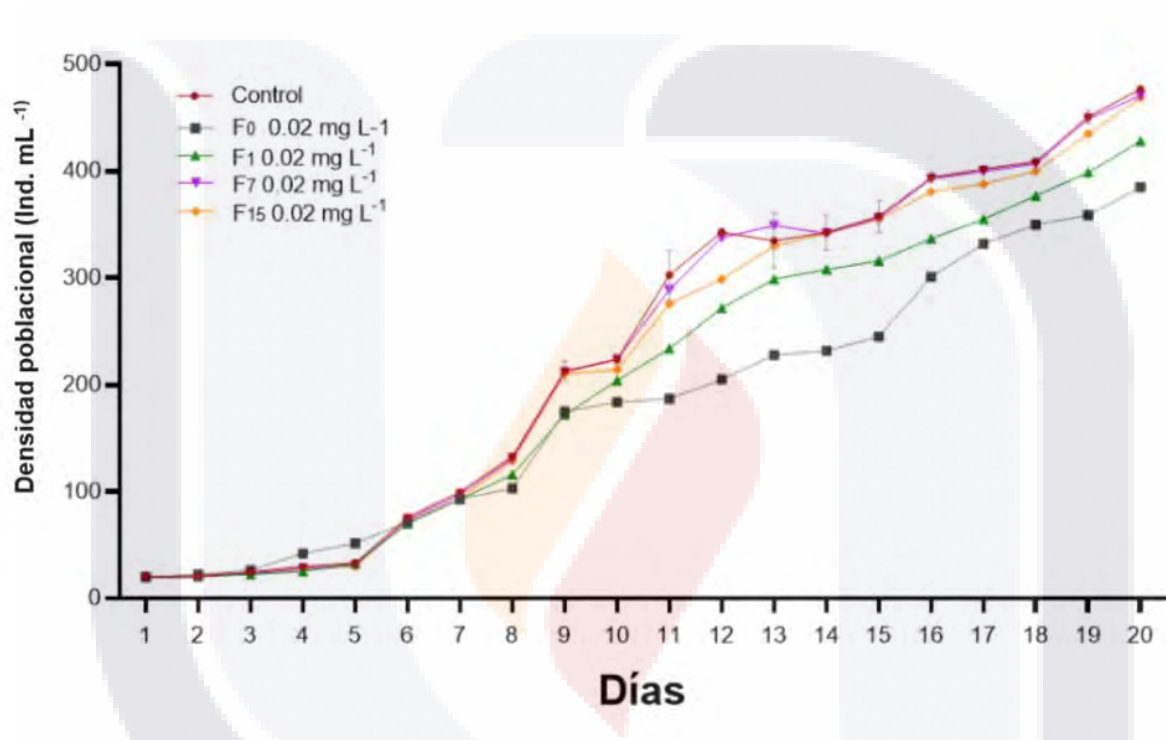


Figura 22. Densidad poblacional de generaciones expuestas (F0, F1, F7 Y F15) a 0.02 mg L⁻¹ de Pb.

8.5.3 Densidad poblacional de 0.05 mg L⁻¹ de Pb en 4 generaciones

La figura 23 muestra una tendencia de aumento en el desarrollo de la población conforme pasan las generaciones, lo cual indica que van perdiendo sensibilidad al tóxico respecto al tiempo, alcanzando una estabilidad de crecimiento en la generación 7 respecto al control.

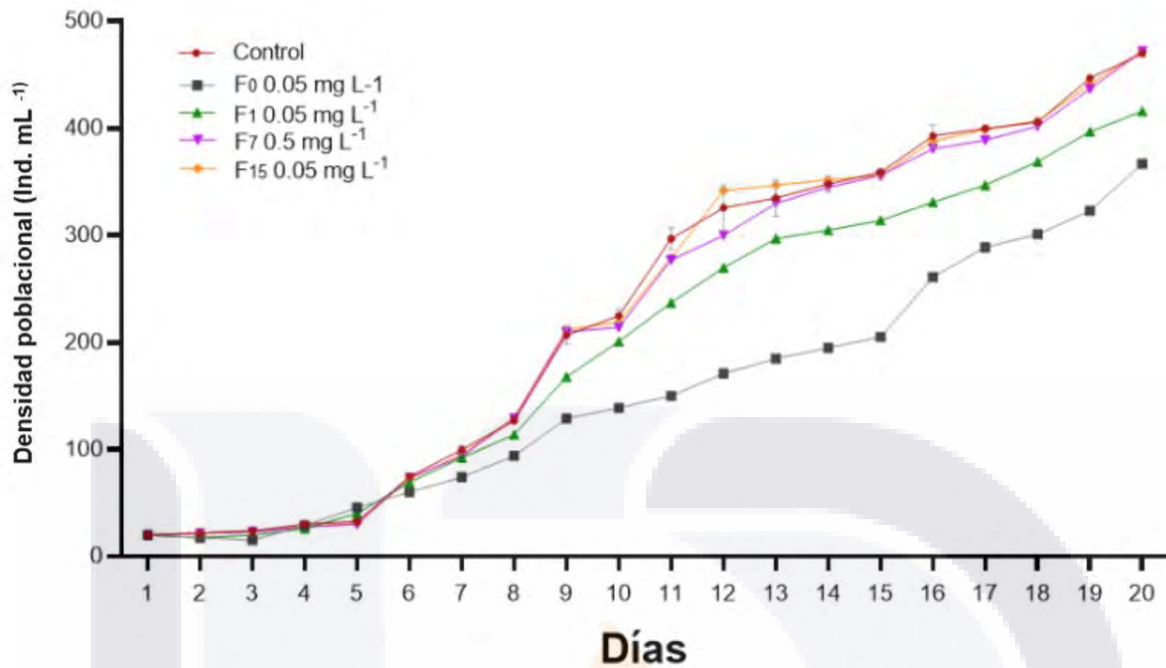


Figura 23. Densidad poblacional de generaciones expuestas (F0, F1, F7 Y F15) a 0.05 mg L⁻¹ de Pb.

8.5.4 Densidad poblacional de 0.1 mg L⁻¹ de Pb en 4 generaciones

La figura 24 presenta una gran diferencia significativa entre la generación F0 y F1 expuestas a una misma concentración, lo que indica un cambio de sensibilidad al tóxico,

se observa también que conforme aumentaron las generaciones disminuyó la dispersión de datos y aumentó la densidad poblacional respecto al control.

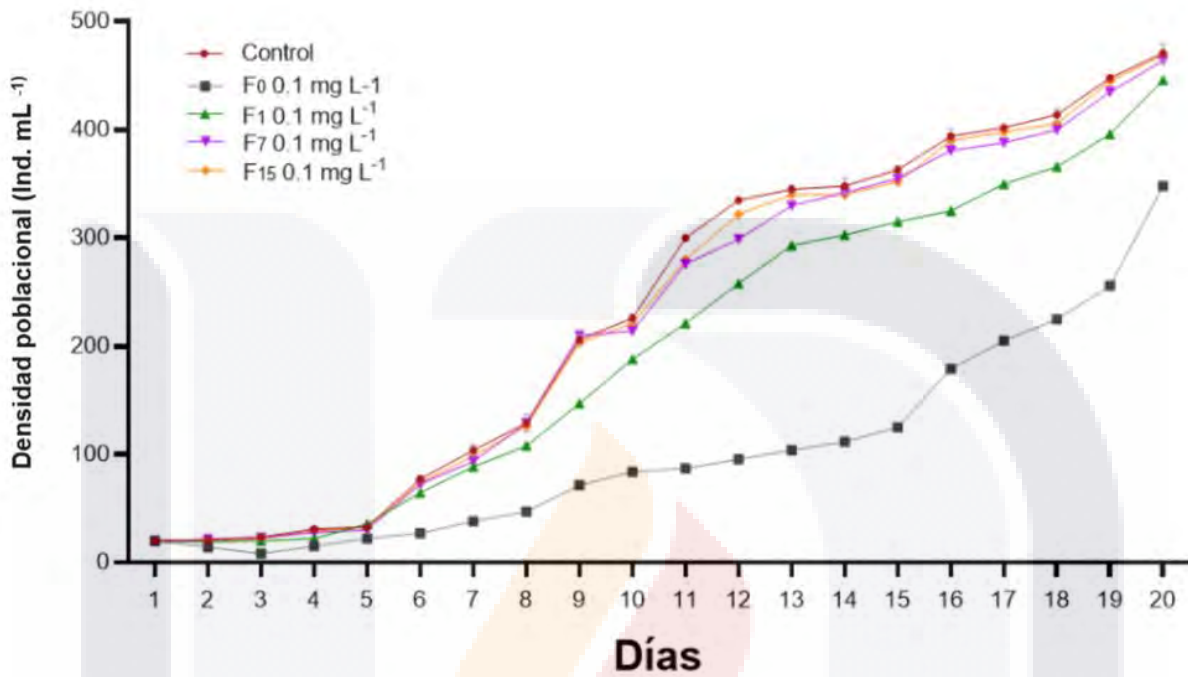


Figura 24. Densidad poblacional de generaciones expuestas a 0.1 mg L⁻¹ de Pb.

8.5.5 Densidad poblacional de 0.2 mg L⁻¹ de Pb en 4 generaciones

En la figura 25 se observa que la generación expuesta en F₀ a 0.2 mg L⁻¹ mostró una mayor sensibilidad a la exposición de la misma concentración que sus predecesoras.

Se observa que en el día 11 la generación F7 presenta una homogeneidad de datos, mostrando las interacciones de densidad respecto al control, lo que indica una pérdida de sensibilidad al tóxico en esta generación. La generación F15 expuesta no presenta diferencias significativas respecto al control posterior al día de prueba 18.

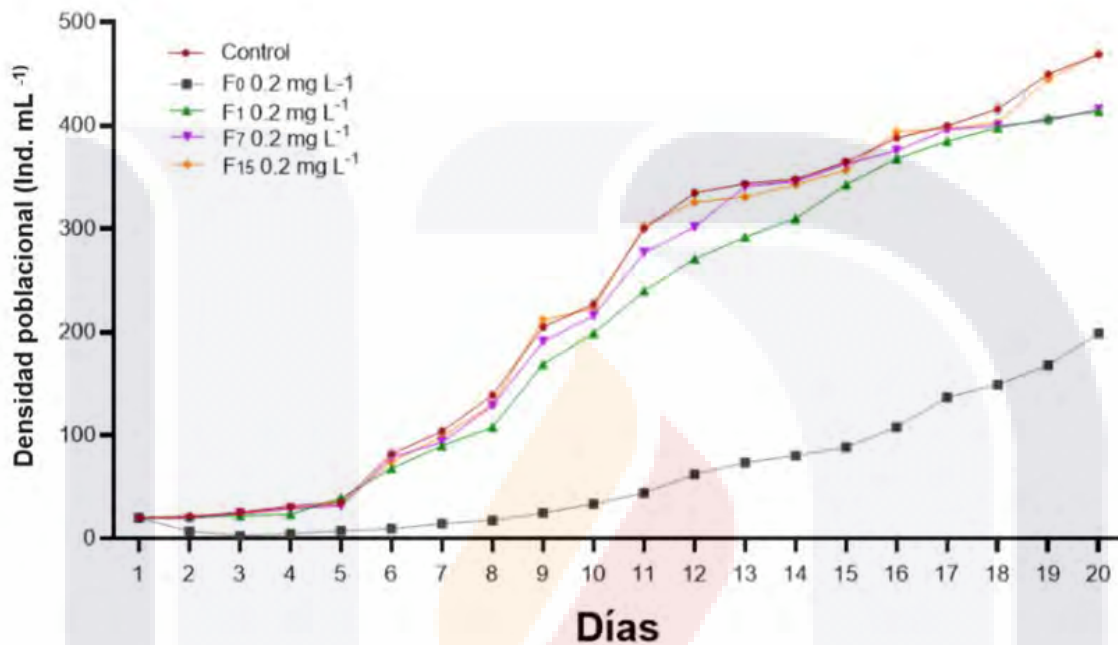


Figura 25. Densidad poblacional de generaciones expuestas a 0.2 mg L⁻¹ de Pb.

En la figura 26 se observó un rotífero de la especie *B. calyciflorus* desarrollado en un medio con tóxico de aparentes características morfológicas normales, llevando a cabo su ciclo de reproducción, durante las primeras generaciones la densidad del cultivo fue baja, debido a que se generaron y observaron una gran producción de huevos de resistencia, por lo que se en el proceso de sacar las generaciones se hacía retiro de ellos, los huevos llevaron un proceso de disposición correspondiente ya que estos fueron generados bajo las condiciones subletales del plomo (xenobiótico utilizado).

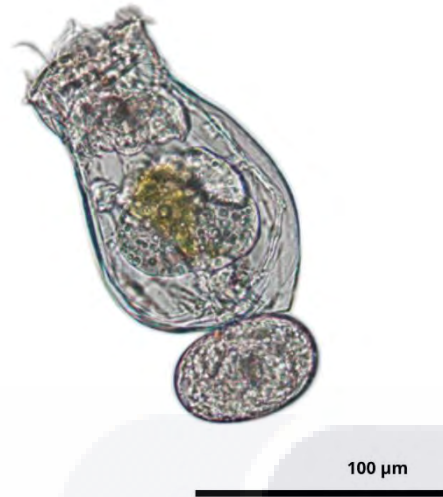


Figura 26. Rotífero *B. calyciflorus* generación F7 desarrollado en una concentración de Pb de 0.1 mg L-1.

La capacidad de producir múltiples huevos en respuesta a condiciones adversas es una estrategia adaptativa que permite a la especie aumentar las probabilidades de sobrevivir y repoblar el ambiente una vez que las condiciones sean más favorables la cual se observó de forma muy escasa en las primeras dos generaciones, lo cual es importante ya que esta es la capacidad que permite a los rotíferos sobrevivir a la contaminación ambiental.

En la figura 27 se observó un huevo de resistencia el cual se extrajo de la generación F7 expuesta a una concentración de 0.2 mg/L, se observó también que entre más creció la generación en el medio con tóxico, la presencia de los huevos amícticos disminuyó, lo que sugirió la asimilación del medio en su séptima generación, con respecto a la figura 28, se realizaron las tomas fotográficas de la trofia de un rotífero expuesto a las mismas condiciones de donde se obtuvo el huevo de resistencia pero de una generación distinta, recordando que la trofia es la protección calcárea del rotífero, esta toma se realizó con el fin de observar cambios visibles en la trofia, los cuales no se observaron en la generación F1.



Figura 27. Huevo de resistencia de rotífero *B. calyciflorus* de la generación F7 crecido en una concentración 0.2 mg/L de Pb.



Figura 28. Trofia de rotífero expuesto a plomo en concentración subletal de 0.2 mg/L de Pb de la generación F1.

Según la NOM-001-SEMARNAT-2021 y la USEPA el límite máximo permisible para la presencia de Pb en agua es de 1mg L⁻¹ lo cual indica que en las generaciones F₀ y F₁ se encuentran dentro de los límites máximos permitidos en las normas, aunque se han reportado valores de tolerancia al plomo más altos en otras especies de rotíferos (Medrano, 2012)

9. Discusión

El contenido del agua varía significativamente dependiendo de su fuente, ya que el agua actúa como un solvente universal, disolviendo minerales, gases y otros compuestos presentes en su entorno, la composición química del agua es un reflejo directo de su interacción con el entorno físico y las actividades humanas que la rodean es por ello que los estudios de microadaptación en *B. calyciflorus* son tan importantes y contribuyen al desarrollo de modelos que predicen cómo las especie responderán a cambios ambientales futuros. Ya que los rotíferos tienen gran relevancia ecológica, y desempeñan un papel crucial en los ecosistemas de agua dulce como parte de la cadena trófica y son indicadores de la salud ambiental (Schröder & Walsh, 2007).

Previo a la realización de la fase experimental se colocaron los organismos en las concentraciones adecuadas para proceder a la separación de generaciones, a pesar de sus tiempos de generación cortos el proceso de ingreso del rotífero a la concentración de plomo donde se desarrolló la población, hasta obtener la densidad necesaria para realizar las pruebas llevo tiempo, esto debido a como indican investigaciones previas, los individuos pueden ajustar su fisiología y comportamiento en función de la concentración de metales en el medio, lo que les permite sobrevivir a corto plazo (Carmona *et al.*, 1995) por lo que llegar a la cantidad requerida y más aún el mantenimiento diario del cultivo requirió de una revisión exhaustiva diaria.

A partir del cuadro comparativo entre las generaciones (F_0 , F_1 , F_7 y F_{15}) expuestas en distintas concentraciones, se observó un aumento significativo del CL_{50} , el cual indicó que el rotífero está aumentando su tolerancia al xenobiótico (Pb) alcanzando hasta 1.34 mg L⁻¹ en la generación 15 en su concentración de crecimiento de 0.2 mg L⁻¹, otros estudios han reportado tolerancias mayores en exposición a otros metales (Santos-Medrano 2013).

Por otro lado, se han reportado distintas tolerancias de CL_{50} diferentes entre especies, como *Brachionus plicatilis* y *Brachionus rubens* han mostrado diferentes grados de tolerancia, lo cual se relaciona con factores genéticos y ambientales dentro de las mismas especies (Obertegger *et al.* 2003), como se sabe la loriga de cada especie está conformada por proteína y material calcáreo que les ayuda con el soporte estructural y les brinda distintas características según su entorno (Segers, 2008). Por ello que la

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

sensibilidad de la especie y por ende sus tolerancias varían, en el presente caso se ha determinado en investigaciones previas que dentro de la familia Brachionidae, *B. calyciflorus* es el de mayor sensibilidad.

Se han presentado estudios en las generaciones F0 y F1 donde la actividad de enzimas antioxidantes, como el superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa son estudiadas, lo que habla un mecanismo adaptativo frente a la toxicidad (Barata *et al.*, 2001) una de las prospectivas a abordar es el análisis de estos mecanismos en las generaciones avanzadas para tener un conocimiento más complejo de la adaptación que el rotífero en estado desarrollado en el xenobiótico.

Importante no olvidar qué rotíferos alternan entre reproducción sexual y asexual, los estudios generacionales permiten investigar cómo estas estrategias afectan la diversidad genética y la resiliencia poblacional frente a condiciones adversas si bien no se realizó un enfoque en la producción de huevos, una situación definitivamente presente y visible fue que durante las primeras 4 generaciones el tiempo para obtener las densidades necesarias para trabajar fue más grande esto debido a la gran producción de huevos de resistencia.

Este estudio permitió entender el mecanismo que esta especie desarrolla frente al estrés ambiental y como parte de las implicaciones ecotoxicológicas es importante conocer los impactos subletales, como alteraciones en el crecimiento, ya que esto tiene implicaciones directas para la evaluación del riesgo ambiental y las de políticas para la regulación de contaminantes, como parte importante de este trabajo se obtuvo que en generaciones posteriores a la 7ma se encuentran valores de CL50 mayores a los límites máximos permisibles en México y en otros organismos internacionales como la US. EPA que es de 1.0 mg L⁻¹.

Otros estudios también han presentado tolerancias a otros metales tales como el zinc y el cobre, así como a varias de las mezclas de ellos (Santos-Medrano *et al.*, 2013). La importancia de seguir estudiando el plomo y al rotífero en su adaptación, es debido a la versatilidad que estos tienen de permanecer en el ambiente.

Finalmente se observó en las generaciones de mayores concentraciones evaluadas, el rotífero puede desarrollarse en cuestiones a densidad poblacional, a 0.2

mg L⁻¹ perfectamente respecto al control (no estimulado), caso contrario de sus primeras generaciones en donde se llegó a visualizar un solo organismos en el cultivo.

10. Conclusión

La presente investigación contribuye en un estudio transgeneracional en el rotífero *Brachionus calyciflorus* en un medio contaminado a distintas concentraciones subletales (0.02, 0.05, 0.1, 0.2 mg L⁻¹ de Pb), con el fin de determinar por densidades poblacionales la adaptación de la especie al xenobiótico, se observó que el plomo disminuyó sustancialmente la tasa intrínseca de crecimiento r , al igual que la obtención de huevos partenogénéticos principalmente en las primeras generaciones.

Se observó también que en las primeras generaciones a mayor toxico expuesto mayor mortalidad, matando más del 50% de la población, lo cual presentó un cambio en la generación F15 en donde más del 60% de la población sobrevivió a la concentración más alta, demostrando en pruebas de densidad poblacional que perdió sensibilidad respecto a las primeras generaciones.

Como prospectiva aún falta comprender más a detalle los mecanismos moleculares (genes que se están afectando) para tener información complementaria, observando en este trabajo el comportamiento poblacional de la especie. Es de suma importancia saber los valores de concentración a los que el rotífero puede estar expuesto y seguir desarrollando en esto debido al grado de la especie en la cadena trófica aunado al potencial de bioconcentración que tiene el plomo y lo importante que estos son en la transferencia de energía, los presentes resultados validan y ratifican la importancia de rotífero como modelo óptimo de biorremediador utilizado como detoxificante ya que podría tolerar y procesar ambientes contaminados.

Se observó que las variables relacionadas con la supervivencia como con la reproducción se vieron afectadas negativamente con el aumento de las concentraciones del tóxico esto se sugiere a la presión selectiva del entorno. Finalmente, este estudio generacional ayuda a comprender la capacidad de las poblaciones para adaptarse a cambios ambientales rápidos como su capacidad para adaptarse al plomo puede influir en la estructura y dinámica de la comunidad acuática, afectando la biodiversidad y la estabilidad del ecosistema.

Es importante continuar con estudios generacionales ya que estos nos brindan información importante sobre la adaptabilidad a las condiciones actuales y venideras considerando cambios pueden ser transmitidos a las generaciones posteriores, lo que sugiere una adaptación a largo plazo a ambientes contaminados lo que puede verse reflejado un cambio en la expresión génica y potencialmente en la estructura genética poblacional en las generaciones venideras.



11. Referencias bibliográficas

- Alloway, B. J. (2013). *Heavy Metals in Soils: Trace Metals and Metalloids in Soils and Their Bioavailability* (3rd ed.). Springer
- Alvarado-Flores, J., Rico-Martínez, J. Ventura-Juárez, & M. Silva-Briano. 2012. Bioconcentration and localization of lead in the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus* Pallas 1677 (Rotifera: Monogononta). *Aquatic toxicology* 109, 127-132
- Alvarado-Flores, J., Rico-Martínez, R., Adabache-Ortíz, A., & Silva-Briano, M. (2015). Morphological alterations in the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus* Pallas 1766 (Rotifera: Monogononta) caused by vinclozolin chronic exposure. *Ecotoxicology*, 24(4), 915–925. <https://doi.org/10.1007/s10646-015-1434-8>
- Arreguin-Rebolledo U., Páez-Osuna F., Betancourt-Lozano M., Rico-Martínez R. Multi- and transgenerational synergistic effects of glyphosate and chlorpyrifos at environmentally relevant concentrations to the estuarine rotifer *Proales similis*. *Environmental Pollution*. (2022). 120708. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120708>.
- Arndt, H. 1993. Rotifers as predators on components of the microbial web (bacteria, heterotrophic flagellates, ciliates). *Hydrobiologia* 255/256:231-246
- Bozo, Lorelei, Fernández, Milagro, López, Mariela, Reyes, Rosa, & Suárez, Paula. (2007). Biomarcadores de contaminación química en comunidades microbianas.. *Interciencia*, 32(1), 8-13. Recuperado en 27 de mayo de 2023, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442007000100004&lng=es&tlng=es.
- Barata, C., Baird, D. J., & Soares, A. M. V. M. (2001). Genetic and environmental factors influencing the tolerance of *Daphnia magna* Straus to toxic stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 48(3), 297–305. <https://doi.org/10.1006/eesa.2000.2016>
- Bervoets, L., K. Van Campenhout., H. Reynders., D. Knapen., A. Covaci., and Blust R. 2009. Bioaccumulation of micropollutants and biomarker responses in caged carp (*Ciprinus carpio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 72:720-728.
- Bielanska-Grajner, I., & Cudak, A. (2014). Rotifers as bioindicators of water quality in fish ponds. *Polish Journal of Environmental Studies*, 23(6), 1715-1723.
- Brusca, R.C. y Brusca, G.H. 1990. *Invertebrates*. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts
- Campos, B., Garcia-Reyero, N., Rivetti, C., Escalon, L., Habib, T., Tauler, R., ... & Barata, C. (2008). Disruption of host–parasite interactions in contaminated environments: The case of the rotifer *Brachionus calyciflorus* and its cyanobacteria food, *Microcystis aeruginosa*. *Environmental Pollution*, 155(1), 108-116.
- Capó M (2002) *Principios de Ecotoxicología* . Colina McGraw. Madrid, España. 314 págs.

- Céspedes Miranda, Ela M, Hernández Lantigua, Ingrid, & Llópiz Janer, Niurka. (1996). Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: II. Catalasa. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 15(2) Recuperado en 31 de octubre de 2023, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03001996000200001&lng=es&tlng=es
- Chapman, P. M., Wang, F., Janssen, C., Goulet, R. R., & Kamunde, C. N. (2003). Ecotoxicology of metals in aquatic sediments: binding and release, bioavailability, risk assessment, and remediation. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 60(3), 439-451. <https://doi.org/10.1139/f03-032>
- Chen, H., Wang, Q., & Wang, S. (2021). Effects of lead on aquatic organisms: A review. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(5), 5423–5437. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11234-x>
- Chinnasamy S, Bhatnagar A, Hunt RW, Das KC., Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications, *Bioresource Technology* 2010; 101: 3097-3105.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 2007, 25(3), pp.294- 306.
- Coenen, R., Fritsh, W., Goetzman, S., Piotrowsky, H., Schaladitz, R., 1992. Alternativen zur Umweltmisere-Raubbauoder partnerchaft? Munchen: Carl Hansen
- Contreras Pérez, J., Mendoza Gómez C., Gómez, A. 2004. Determinacion de metales pesados en aguas y sedimentos del rio Haina. *Ciencia y soiedad*. 29(1): 38-71. DOI:10.22206/cys.2004.v29il.pp 38-71
- Cory-Slechta, D. A. (2003). Behavioral and neurochemical consequences of lead exposure. *Current Opinion in Neurology*, 16(3), 347-357. doi:10.1097/01.wco.0000073928.51846.c0
- Cruz-Rivera J., Mueñoz-Carrillo M., Rico-Martinez R., Arzate-Cárdenas M., (Marzo, 2022). “*In silico caracterizacion of the Krebs cycle enzymes in six Brachionus species*” Póster presentado al “Mini Proyectos de Investigación UAA”, Aguascalientes, México
- Dinkel, H., Van Roey, K., Michael, S., Kumar, M., Uyar, B., Altenberg, B., ... y Gibson, TJ (2016). ELM 2016: actualización de datos y nueva funcionalidad del recurso de motivos lineales eucarióticos. *Investigación de ácidos nucleicos* , 44 (D1), D294-D300.
- Declerck, SAJ, Papakostas, S. Monogonot rotíferos como sistemas modelo para el estudio de la adaptación microevolutiva y sus implicaciones eco evolutivas. *Hidrobiología* 796, 131-144 (2017). <https://doi.org/10.1007/s10750-016-2782-y>

- Environmental Protection Agency (EPA). (2020). *Lead In Drinking Water Outreach Resources*. <https://www.epa.gov/ground-water-and-drinking-water/lead-drinking-water-outreach-resources>
- Environmental Protection Agency (EPA). (2022). *Drinking water regulations and contaminants*. <https://www.epa.gov/dwregdev/drinking-water-regulations>
- Environmental Protection Agency (EPA). (2023). *Basic Information about Lead in Drinking Water, California*. <https://www.epa.gov/ground-water-and-drinking-water/basic-information-about-lead-drinking-water>
- Fellermann H, Shirt-Ediss B, Kozyra JW, Linsley M, Lendrem DW, Howard T. (2018). The PCR Simulator: an on-line application for teaching Design of Experiments and the polymerase chain reaction (<http://virtual-pcr.ico2s.org/pcr/>)
- Fridovich, I (1974). Superoxide dismutases. In: *Advances in Enzymology* (Meister, A, ed.), 35-97. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, USA.
- Gallardo W.G., A. Hagiwara, K. Hara & K. Soyano. 2006. Growth hormone-like substance in the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Fisheries Science* 72(4): 781–786.
- Hayes, J.D., McLellan, L.I., 1999. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Rad. Res.* 321, 273-300
- Garza, A., H. Chavez., R. Vega., y Soto E. 2005. Mecanismos celulares y moleculares de la neurotoxicidad por plomo. *Salud Mental* 28 (2): 47:59
- González-Pérez, B. K., Sarma, S., & Nandini, S. (2016). Effects of selected pharmaceuticals (ibuprofen and amoxicillin) on the demography of *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus havanaensis* (Rotifera). *Egyptian Journal of Aquatic Research/Egyptian Journal of Aquatic Research*, 42(3), 341–347. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2016.09.003>
- Gorelick, R. J., & Halder, D. (2011). The role of epigenetics in shaping the genetic architecture of life history traits in response to environmental stress. *Heredity*, 107(5), 447-456.
- Herzig, A. 1987 . El análisis de las poblaciones de rotíferos planctónicos: una súplica para investigaciones a largo plazo. *Hidrobiología*,147:63-180.
- Horton, P., Park, K. J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C. J., & Nakai, K. (2007). WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Research*, 35(suppl_2), W585-W587
- Hu, Y., Zhang, D., Ye, J., Li, X. y He, X. (2012). Completación de matriz rápida y precisa a través de la regularización de normas nucleares truncadas. *Transacciones IEEE sobre análisis de patrones e inteligencia artificial*, 35 (9), 2117-2130.
- Hua, J., Relyea, R., 2014. Cócteles químicos en sistemas acuáticos: 189, 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.02.007>.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- International Lead Association (ILA). (2020) *Lead Metal Harmonised Environmental CLP Classification Lead in Aquatic Environments* file:///C:/Users/blanc/Downloads/ILA-Position-Paper-Lead-Metal-CLH-Final_2032022.pdf
 - Kumar S., Stecher G., and Tamura K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874.
 - Landrigan, P. J., Schechter, C. B., Lipton, J. M., Fahs, M. C., & Schwartz, J. (2000). Environmental pollutants and disease in American children: Estimates of morbidity, mortality, and costs for lead poisoning, asthma, cancer, and developmental disabilities. *Environmental Health Perspectives*, 110(7), 721-728. doi:10.1289/ehp.02110721
 - Pérez-Legaspi, I. A., Rico-Martínez, R., & Santos-Medrano, G. E. (2003). Acute toxicity tests on three species of the genus *Brachionus* (Rotifera) undergoing arsenic and lead exposure. *Hydrobiologia*, 500(1-3), 231-234. doi:10.1023/A:1024630805903
 - Leung, K.M.Y., Wheeler, J.R., Morrith D., Crane, M., 2001. Endocrine disruption in fishes and invertebrates: issues for saltwater ecological risk assessment. In: Roberts M.H., Newman, M.C., Hale, RC. (Eds.), *Coastal and Estuarine Risk Assessment*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 190-208
 - Lynch, M & Kuramitsu, H (2000). Expression and role of superoxide dismutases (SOD) in pathogenic bacteria. *Microbes & Infection* 2, 1245-1255.
 - Martínez, M., Torres, B., Castillejo, P., Martínez, C. B., & García, J. (2006). Cadmium and lead bioaccumulation in the earthworm *Eisenia fetida*: Metal regulation and biomarker response. *Environmental Research*, 100(2), 218-226.
 - Matthews, B., L. De Meester, CG Jones, BW Ibelings, T. J. Bouma, V. Nuutinen, J. van de Koppel & J. Odling-Smee, 2014. En construcción de nichos: un puente operativo entre la ecología, la evolución y la ciencia de los ecosistemas. *Monografías ecológicas* 84: 245–263
 - Matthieu Terwagne. (2022). Reparación del ADN durante la meiosis no reductiva en el rotífero asexual *Adineta vaga*. *ciencia Adv.* 8 , eadc8829 . DOI: 10.1126/sciadv.adc8829
 - Montero-Pau, J., Gómez, A., & Muñoz, J. (2016). Application of genomic data to improve rotifer community ecology. *Hydrobiologia*, 796(1), 113-128.
 - Moore M, Depledge M, Readman J, Leonard D (2004) Una estrategia integrada basada en biomarcadores para la evaluación ecotoxicológica del riesgo en la gestión ambiental. *Mutat. Res.* 552 : 247-268.
 - Moreno. Ana.G (2013). Rotíferos “Apuntes de zoología”
 - Moreno-Rivas, Silvia Carolina, & Ramos-Clamont Montfort, Gabriela. (2018). Descontaminación de arsénico, cadmio y plomo en agua por biosorción con *Saccharomyces cerevisiae*. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-*

biológicas, 21(Supl. 2), e20180155. Epub 02 de diciembre de 2020. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2018.0.155>

- NORMA OFICIAL MEXICANA nom-127-ssa1-1994, salud ambiental. agua para uso y consumo humano. limites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilizacion.
- Serra, M., Carmona, M. T. P., García-Roger, E. M., & Ortells, R. (2019). Adaptación incertidumbre ambiental. *Mètode Science Studies Journal: Annual Review*. <https://doi.org/10.7203/metode.10.14398>
- Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL). (2018). *La Agenda 2030 y los Objetivos de Desarrollo Sostenible Una oportunidad para América Latina y el Caribe* <https://repositorio.cepal.org/server/api/core/bitstreams/cb30a4de-7d874e798e7aad5279038718/conten>
- Obtegger, U., H.A Smith, G. Flaim y R.L Wallace, (2011). Using the guild ratio to characterize pelagic rotifer communities. *Hydrobiologia*, 662: 157-162
- Obertegger, U., & Wallace, R. L. (2023). Trait-Based Research on Rotifera: The Holy Grail or Just Messy? *Water*, 15(8), 1459. <https://doi.org/10.3390/w15081459>
- O'Leary NA, Wright MW, Brister JR, Ciuffo S, Haddad D, McVeigh R, Rajput B, Robbertse B, Smith-White B, Ako-Adjei D, Astashyn A, Badretdin A, Bao Y, Blinkova O, Brover V, Chetvernin V, Choi J, Cox E, Ermolaeva O, Farrell CM, Goldfarb T, Gupta T, Haft D, Hatcher E, Hlavina W, Joardar VS, Kodali VK, Li W, Maglott D, Masterson P, McGarvey KM, Murphy MR, O'Neill K, Pujar S, Rangwala SH, Rausch D, Riddick LD, Schoch C, Shkeda A, Storz SS, Sun H, Thibaud-Nissen F, Tolstoy I, Tully RE, Vatsan AR, Wallin C, Webb D, Wu W, Landrum MJ, Kimchi A, Tatusova T, DiCuccio M, Kitts P, Murphy TD, Pruitt KD. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Res.* 2016 Jan 4;44(D1):D733-45
- Papakostas, S., Michaloudi, E., Triantafyllidis, A. *et al.* Allochronic divergence and clonal succession: two microevolutionary processes sculpturing population structure of *Brachionus* rotifers. *Hydrobiologia* **700**, 33–45 (2013). <https://doi.org/10.1007/s10750-012-1217-7..>
- Pray, F. A. 1995. Studies of the early development of the rotifer *monostyla cornuta* muller. *Transaction of the American Microscopical Society* 84: 210-217
- Rico-Martínez, R., & S. I., Dodson. 1992. "Culture of the Rotifer *Brachionus calyciflorus* Pallas". *Aquaculture*, 105: 191-199.
- Rico-Martínez, R., I. A. Pérez-Legaspi, J. C. Arias-Almeida, & G. E. Santos-Medrano. 2013. Rotifers in ecotoxicology. *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*, Springer, London, pp. 973-996.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Santos-Medrano, Gustavo Emilio, & Rico-Martínez, Roberto. (2013). Lethal effects of five metals on the freshwater rotifers *Asplanchna brighwellii* and *Brachionus calyciflorus*. *Hidrobiológica*, 23(1), 82-86. Recuperado en 04 de diciembre de 2023, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-88972013000100008&lng=es&tlng=en.
 - Segers H. 2008. Global diversity of rotifers (Rotifera) in freshwater. In: E.V. Balian, C. Lévêque, H. Segers & K. Martens, (eds.) *Freshwater Animal Diversity Assessment. Developments in Hydrobiology*. Springer Netherlands. Pp. 49–59.
 - Segers, H. (2007). Lista comentada de los rotíferos (Phylum Rotifera), con notas sobre nomenclatura, taxonomía y distribución. *Zootaxa*, 1564, 1-104, *disponible en línea en* <http://www.mapress.com/zootaxa/2007f/zt01564p104.pdf>
 - SHELEF, G., C.J. SOEDER. *Algae Biomass: production and use*. 1980. Elsevier Sci. Ltd. 870 pp. ISBN: 978-0444802422
 - Solovyev V.V. (2007) Statistical approaches in Eukaryotic gene prediction. In *Handbook of Statistical genetics* (eds. Balding D., Cannings C., Bishop M.), Wiley-Interscience; 3d edition, 1616 p.
 - Smith, H. A. & T. W. Snell, 2012. Rapid evolution of sex frequency and dormancy as hydroperiod adaptations. *Journal of Evolutionary Biology* 25: 2501–2510.
 - Snell, T. W., & Joaquim-Justo, C. (2007). Workshop on rotifers in ecotoxicology. *Hydrobiologia*, 593(1), 227-234.
 - Snell, T. W., & Joaquim-Justo, C. (2019). Rotifer studies in ecotoxicology. *Hydrobiologia*, 796(1), 1-13.
 - Snell TW. Rotifers as models for the biology of aging. *Int Rev Hydrobiol*. 2014 Mar;99(1-2):84-95. doi: 10.1002/iroh.201301707. PMID: 24791148; PMCID: PMC4004354.
 - Stephen J. Thackeray, en *Enciclopedia de aguas continentales (segunda edición)*, 2022
 - Stottrup J, McEvoy L. 2008. Live feeds in marine aquaculture. Vol. 1st ed. Oxford, Oxford: John Wiley & Sons. Blackwell Science. p. 17-52.
 - USEPA (1994) *Normas primarias nacionales de agua potable: EPA 810-F-94-001A*. Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos. Washington, DC, EEUU. 198 págs.
 - U. S. EPA, 2022(December 20) . Lead In Drinking Water Outreach Resources
 - U. S. EPA, 2023. Basic Information about Lead in Drinking Water, California Department of Public Health
 - Wallace R. L. 2002. Rotifers: exquisite Metazoans. *Integrative and Comparative Biology* 42(3): 660–667.
 - Walsh, M. R., Whittington, D., & Walsh, C. J. (2014). Rotifers. In D. H. Evans (Ed.), *Marine Physiology Down East: The Story of the Mt. Desert Island Biological Laboratory* (pp. 123-136). Springer.

- Xue, Y., Yang, X., Zhang, G. y Xi, Y. (2017). Diferenciación morfológica de *Brachionus calyciflorus* causada por depredación y contaminación por cenizas de carbón. *Informes científicos*, 7 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16192-w>.
- Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden T (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 13:134.

