



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN  
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

**POSGRADO EN GEOCIENCIAS APLICADAS**

**Estudios de la distribución, especiación y  
bioacumulación de arsénico en *Paracyclops chiltoni*,  
estimaciones filogenéticas y efectos morfológicos.**

Tesis que presenta:

**Yadira Jazmín Mendoza Chávez**

Para obtener el grado de:

**Doctora en Geociencias Aplicadas**

Directora de Tesis:

**Dra. Nadia Valentina Martínez Villegas**

San Luis Potosí, S. L. P., México, septiembre de 2021



## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Estudios de la distribución, especiación y bioacumulación de arsénico en *Paracyclops chiltoni*, estimaciones filogenéticas y efectos morfológicos.**” presentada para obtener el Grado de Doctora en Geociencias Aplicadas fue elaborada por **Yadira Jazmín Mendoza Chávez** y aprobada el **30 de septiembre de 2021** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Geociencias Aplicadas del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

---

**Dra. Nadia Valentina Martínez Villegas**  
Directora de la tesis

---

**Dra. Tania Anaid Gutiérrez García**  
Miembra del Comité Tutorial

---

**Dra. Sandra Pérez Miranda**  
Miembra del Comité Tutorial

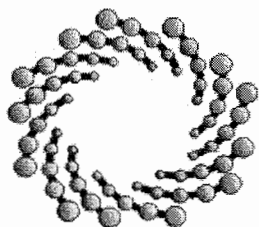


## Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Hidrogeoquímica y el Laboratorio de Petrofísica y Geología Aplicada, ambos de la División de Geociencias Aplicadas, el Laboratorio de Microbiología de Productos Naturales del CIIDZA, el Laboratorio de Análisis Instrumental de la División de Ciencias Ambientales, todos ellos en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Laboratorio de Análisis de la Biodiversidad y Genómica, el Laboratorio de Biología Molecular, ambos en el Centro Universitario de Ciencias Exactas en Ingeniería de la Universidad de Guadalajara, el Laboratorio de Geoquímica Ambiental del Centro de Geociencias-UNAM, el Laboratorio de Limnología Tropical de la Universidad de Quintana Roo, Unidad Cozumel, El Colegio de la Frontera Sur de Chetumal y el Lawrence Berkeley National Laboratory de la Universidad de California. Bajo la dirección de la Dra. Nadia Valentina Martínez Villegas. Financiada parcialmente con fondos de los proyectos Royal Society NA140182, CONACyT 7073 y Newton Fund Institutional Links 629008622.

La autora agradece el apoyo técnico de la M. en C. Ma. del Carmen Rocha Medina del Laboratorio de Análisis Instrumental (IPICYT), Dra. María Guadalupe Ortega Salazar del Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA) (IPICYT), Dra. O. Araceli Patón Soberano del Laboratorio de Biología Molecular (IPICYT), la M. en C. Diana Karime Olmos Hernández, Técnica de Laboratorios del CIIDZA (IPICYT), la M. en C. María Carolina Muñoz Torres del Centro de Geociencias-UNAM y la Dra. Sirine Fakra del Lawrence Berkeley National Laboratory, por las facilidades otorgadas para realizar los análisis experimentales de agua y organismos.

Durante la realización del trabajo la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (575862) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



**IPICYT**

# Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

## Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 022 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Geociencias Aplicadas está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 30 días del mes de septiembre del año 2021, se reunió a las 09:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

**Dra. Ana Elizabeth Marín Celestino**

**Presidenta**

**IPICYT**

**Dra. Nadia Valentina Martínez Villegas**

**Secretaria**

**IPICYT**

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

**DOCTORA EN GEOCIENCIAS APLICADAS**

sustentó la C.

**Yadira Jazmín Mendoza Chávez**

sobre la Tesis intitulada:

*Estudios de la distribución, especiación y bioacumulación de arsénico en Paracyclops chiltoni, estimaciones filogenéticas y efectos morfológicos*

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dra. Nadia Valentina Martínez Villegas**

El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLA**

Dándose por terminado el acto a las 10:46 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 30 días del mes de septiembre de 2021.

**Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento del Posgrado

**Dr. Marcial Bonilla Marín**  
Secretario Académico

## Agradecimientos

La realización de este proyecto de vida fue posible gracias a la colaboración y el apoyo de muchas personas, a las cuales quiero externar mi eterno agradecimiento.

A la Dra. Nadia, por todo el tiempo y conocimiento brindado, por la confianza depositada en mí, por siempre enseñarme el camino del trabajo honesto, por ser mi guía en lo académico y en lo personal, por siempre estar.

A la Dra. Tania, por enseñarme nuevos horizontes académicos, por ser tan gentil y paciente conmigo, por su hospitalidad y palabras de aliento para continuar en esta “carrera de resistencia”.

A la Dra. Sandra, por abrir mi mente siempre a preguntas que van un poquito más allá, por su paciencia y calidez, por todo el apoyo académico y moral brindado durante estos años.

Al Dr. René, por sus consejos, conocimiento y hospitalidad. Al Dr. Hiram por su paciencia, empuje y disposición. La presencia de ambos en esta investigación fue de vital importancia.

Al Dr. Adrián Cervantes, a la Dra. Martha Gutiérrez y al M. en C. Luis Uc, por su valioso conocimiento y aportaciones en la colecta y análisis del zooplankton. A los Dres. Roberto Rico, Isidoro Rubio y Marcelo Silva por su conocimiento y solidaridad.

A mis amigos del grupo de trabajo, con quienes compartí oficina, laboratorio, viajes de campo, alegrías, tristezas, retos y momentos que vivirán en mí para siempre: Rodrigo, Yunnuel, Felipe, Abril, Nadia, Christian, Lucero, JJ, Dalia, Pradip, Yered, Eduardo y Alejandro. Sobre todo, si me ayudaron a cargar cubetas de agua, ustedes saben quiénes son. A Gaby Pérez y Mirna Saucedo, por siempre tenderme su mano.

Al Departamento de Posgrado, Ivonne, Edith y Tere, por su eficiencia y amabilidad. A Tere en especial, por su buena onda y charlas amenas.

A mi familia, Irene, Ernesto, Dulce, Martha y César, por sus porras, confianza, oraciones y ser mi mayor motor.

A César, por ser mi hogar 🐶🐱.

# Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
<b>Créditos Institucionales</b>	iii
<b>Acta de examen</b>	iv
<b>Agradecimientos</b>	v
<b>Lista de tablas</b>	viii
<b>Lista de figuras</b>	ix
<b>Lista de anexos</b>	xiii
<b>Resumen</b>	xiv
<b>Abstract</b>	xv
1. Perspectiva, hipótesis y objetivos	1
1.1. Perspectiva	1
1.2. Hipótesis	1
1.3. Objetivo	2
2. Introducción	3
2.1. Agua	3
2.1.1. Diagrama de Stabler	3
2.1.2. Diagrama de Stiff	4
2.1.3. Diagrama de Piper	5
2.2. Especiación química	6
2.3. Índices de saturación mineral	7
2.4. Arsénico	7
2.4.1. El arsénico en la cadena trófica	9
2.4.2. Problemática del agua contaminada con arsénico a nivel internacional y nacional	15
2.5. Zooplancton	19
2.5.1. Copépodos	20
2.5.2. Organismos de zooplancton habitando agua contaminada con arsénico	23
2.6. Extremófilos	25
2.6.1. Metalotolerantes	27
2.7. Genética	28

3.	Materiales y métodos	35
3.1.	Sitio de estudio	35
3.2.	Parámetros fisicoquímicos, cationes, aniones y arsénico	36
3.3.	Clasificación del agua	38
3.4.	Estructura de la población de zooplancton	38
3.5.	Bioacumulación y distribución de arsénico en organismos de zooplancton	39
3.6.	Arsénico en sedimentos	42
3.6.1.	Especiación de arsénico en agua y sedimentos	43
3.7.	Genética	44
3.7.1.	Extracción del ADN	44
3.7.2.	Reacción en cadena de la polimerasa.	47
3.8.	Análisis de datos	47
3.8.1.	Análisis de componentes principales (PCA)	47
4.	Resultados	48
4.1.	Parámetros fisicoquímicos.	48
4.2.	Cationes y aniones	52
4.3.	Arsénico total en agua y estimación de su especiación por modelación hidrogeoquímica	57
4.4.	Identificación de <i>Paracyclops chiltoni</i>	63
4.5.	Estructura de la población de <i>Paracyclops chiltoni</i>	65
4.6.	Bioacumulación y distribución de arsénico en <i>Paracyclops chiltoni</i>	67
4.7.	Genética	71
4.8.	Análisis de Componentes Principales (PCA)	72
5.	Conclusiones	77
6.	Bibliografía	79
7.	Anexos	89

## Lista de tablas

	Página
Tabla 1. Clasificación de los extremófilos definidos por sus ambientes.....	26
Tabla 2. Condiciones estándar para un PCR (cálculos para 50 µl en cada tubo).....	33
Tabla 3. Muestras utilizadas en los análisis genéticos, incluyen copépodos ( <i>Paracyclops chiltoni</i> ) colectados en el sitio de muestreo (Club de Tiro) y crustáceos de fácil acceso, camarón (Caridea).....	44
Tabla 4. Parámetros fisicoquímicos medidos en campo.....	48
Tabla 5. Cationes, aniones y elementos traza.....	53
Tabla 6. Datos de la estructura de la población de <i>Paracyclops chiltoni</i> que habita agua contaminada con valores de arsénico entre 35.50 y 62.29 mg/L..	67
Tabla 7. Absorbancias medidas por medio de espectrofotometría para determinación de concentración de ácidos nucleicos y relaciones de pureza de la muestra 11 a 20. En negro valores obtenidos utilizando únicamente Kit de extracción, en rojo valores obtenidos después de concentrar y purificar las muestras.....	71
Tabla 8. Eigenvectores.....	75
Tabla 9. Matriz de correlación de Pearson entre parámetros biológicos y fisicoquímicos, mostrando valores >0.5 en verde y <-0.5 en azul.....	76



## Lista de figuras

	Página
Figura 1. Diagramas Stabler que ilustran la composición iónica en diferentes muestras de agua.....	4
Figura 2. Diagrama de Stiff típicos de agua de diferente naturaleza.....	5
Figura 3. Diagrama de Piper que ilustra el tipo de agua de diversas muestras de campo.....	6
Figura 4. Diagrama de Pourbaix de As en medio acuoso en un sistema As–O <sub>2</sub> –H <sub>2</sub> O a 25 °C y 1 bar de presión con valores generalizados de equilibrio, potenciales y constantes de disociación a fuerza iónica de cero.....	9
Figura 5. Ciclo biogeoquímico del arsénico. Una vez en el medio acuático, el arsénico puede ser tomado por organismos y ser incorporado a la red trófica. El arsénico total tiende a disminuir a niveles tróficos más altos a lo largo de las cadenas alimentarias de agua dulce (Chen et al., 2000; Chen y Folt, 2000; Culioli et al., 2009; Revenga et al., 2012). Los organismos pueden tomar al arsénico a través de una variedad de vías: directamente de la solución a través de toda la superficie del cuerpo, a través de estructuras respiratorias especializadas (p. Ej., Branquias) o a través del epitelio digestivo con agua o alimentos ingeridos, sedimentos o partículas en suspensión (Rahman et al., 2012).....	10
Figura 6. Especies de arsénico más comunes en muestras biológicas y medioambientales.....	12
Figura 7. Metilación de arsénico al ingresar a los organismos y propuesta de las posibles rutas de biotransformación de este.....	14
Figura 8. Mapa con datos de concentraciones reportadas de casi 80 estudios de arsénico en aguas subterráneas a nivel mundial (más de 55,000 datos de puntos de arsénico).....	16
Figura 9. Mapa de México que indica la presencia de arsénico (> 0.01 mg/L) en pozos de agua. Se considera la ubicación de grupos indígenas, depósitos de mineral y las principales áreas agrícolas. Se han reportado investigaciones en toxicología para los lugares señalados con líneas negras (por ejemplo, Chihuahua, San Luis Potosí).....	18
Figura 10. Grupos de organismos principales del zooplancton: a) copépodos, b) cladóceros y, c) rotíferos.....	20
Figura 11. Morfología general de un copépodo (vista dorsal de una hembra a la izquierda y un macho a la derecha), detalles morfológicos de un apéndice torácico y detalles del quinto pedígero y somita genital de un macho.....	22

Figura 12. Mapeo de arsénico en <i>Daphnia pulex</i> . La señal se muestra como un gradiente de concentración (a), con la imagen correspondiente de <i>Daphnia</i> (b).....	25
Figura 13. Infografía ejemplo de identificación de especies.....	29
Figura 14. Estructura del ADN.....	30
Figura 15. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta reacción permite que unos pocos fragmentos de ADN se repliquen en millones o miles de millones de copias. La amplificación del ADN nos permite estudiar la molécula del ADN en detalle en el laboratorio.....	32
Figura 16. Sitio de muestreo ubicado en Matehuala, San Luis Potosí, México. El punto de muestreo es una excavación de 2 m de profundidad y 50 m <sup>2</sup> de ancho (14N: 332784, 2617530).....	36
Figura 17. Proceso de recolección y preparación de muestras de agua hasta llegar al laboratorio.....	38
Figura 18. Proceso de colecta de zooplancton y preparación previa a los análisis.....	39
Figura 19. Procedimiento para la determinación de bioacumulación de arsénico en los organismos.....	40
Figura 20. Procedimiento para determinación de presencia de arsénico por medio de fluorescencia total de rayos x.....	41
Figura 21. Procedimiento llevado a cabo en el Lawrence Berkeley National Laboratory para determinar la distribución de arsénico en <i>Paracyclops chiltoni</i> .....	42
Figura 22. Fotografías de copépodos previo a las extracciones de ADN. Fueron obtenidas por medio de microscopía óptica y el software Leica Application Suite.....	46
Figura 23. Diagrama de cajas que muestran el primer cuartil, la mediana o el segundo cuartil, el tercer cuartil y el rango intercuartílico, así como los bigotes, que determinan el límite para la detección de valores atípicos para temperatura ambiente y temperatura del agua en °C, para datos recolectados en 8 campañas de muestreo.....	49
Figura 24. Valores de pH medidos en campo.....	49
Figura 25. Valores de conductividad eléctrica y sólidos disueltos totales medidos en campo, para 8 campañas de muestreo.....	50

Figura 26. Región de estabilidad de pe-pH (P= 1.0 atm, P= 0.21 atm, T = 25 °C, P = 1 atm, y actividad del H <sub>2</sub> O es la unidad) y las zonas redox (óxica, subóxica y anóxica) (Essington, 2004; Sposito, 2008), así como los valores encontrados en las muestras de agua recolectadas en el Club de Tiro en Matehuala.....	51
Figura 27. Concentraciones de oxígeno disuelto determinados en el Club de Tiro para 8 campañas de muestreo.....	52
Figura 28. Concentraciones de cationes medidas en laboratorio por medio de ICP-OES en mg/L, para 8 campañas de muestreo.....	53
Figura 29. Concentraciones de aniones medidas en laboratorio por medio de HPLC en mg/L, para 8 campañas de muestreo.....	54
Figura 30. Diagramas de Stiff y Stabler para el agua del Club de Tiro, con los iones calcio y sulfato como mayoritarios, obtenidos por medio del software Diagrammes.....	55
Figura 31. Diagrama de Piper para el Club de Tiro, el agrupamiento de las muestras revela poca variación temporal, confirmando al ión calcio y al ión sulfato como los iones mayoritarios. Obtenido por medio del software Diagrammes.....	56
Figura 32. Concentraciones de arsénico determinadas en 8 campañas de muestreo, estos datos están muy por encima de los límites máximos permisibles en normativa nacional e internacional para la protección de la vida acuática de 0.2 mg/L (CCME, 2001; CONAGUA, 2020; EPA, 1995) y la concentración letal reportada para zooplancton por Chen et al., 1999 (3 mg/L).....	57
Figura 33. Diagrama Eh-pH para especies inorgánicas de arsénico en el sistema As-O <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O a 25 °C y 1 atm de presión total. Los valores de Pe y pH para las muestras del Club de Tiro variaron entre 158-484.2 mV y 6.64-7.16, respectivamente. Lo que sugiere que el arsénico de las muestras de agua se encuentra como una especie del ion arseniato (HAsO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ).....	58
Figura 34. Distribución de las especies de arsénico estimadas por modelación hidrogeoquímica para datos obtenidos en 8 campañas de muestreo y con el uso del software PHREEQC. Valores en unidades de	

porcentaje. Las especies de arsénico presentes con menos de 0.5% fueron omitidas para la presentación de este gráfico.....	59
Figura 35. Concentraciones en mg/L. Distribución de las especies de arsénico estimadas por modelación hidrogeoquímica para datos obtenidos en 8 campañas de muestreo y con el uso del software PHREEQC. El arsénico total está representado con la línea negra.....	60
Figura 36. Índices de saturación (SI) estimados para el sitio de estudio (Club de Tiro), con los datos hidrogeoquímicos de 8 campañas de muestreo.....	62
Figura 37. Concentración de arsénico en muestras de sedimentos, porcentaje de arsénico móvil usando 1% de HNO <sub>3</sub> y la concentración a la cual pueden existir probables efectos negativos en la salud de sistemas acuáticos ( <i>Probable effect level</i> ) (CCME, 1999).....	63
Figura 38. Imágenes de MEB <i>Paracyclops chiltoni</i> que muestran el a) hábito (vista dorsal), b) la quinta pata, c) las ramas caudales y d) la antenula de un organismo femenino.....	64
Figura 39. Longitudes de hembras y machos medidas en organismos de <i>P. chiltoni</i> recolectados en 8 campañas de muestreo.....	66
Figura 40. a) Imagen de un organismo de <i>Paracyclops chiltoni</i> obtenido por medio de microscopía antes del análisis TXRF. b) Imagen de un organismo de <i>Paracyclops chiltoni</i> en el disco soporte. c) Espectro de arsénico obtenido por TXRF mostrando la línea K $\alpha$ 10.53 keV que confirma la presencia de arsénico en el organismo. d) Cuantificación aproximada de arsénico en TXRF.....	68
Figura 41. a) Imagen MEB de <i>Paracyclops chiltoni</i> que habita agua dulce altamente contaminada y b) Mapa elemental $\mu$ -XRF codificado en tricolor para As en rojo, Ca en verde y K en azul, que revela la presencia de As en el prosoma y el urosoma de <i>P. chiltoni</i> , según lo determinado por XFM. El punto rojo más brillante cerca del ano sugiere la presencia de As en el tracto digestivo del organismo. Adquisición realizada a -25 °C a 11966.7 eV con píxeles de 4x4 $\mu$ m y un tiempo de adquisición de 100 microsegundos.....	69
Figura 42. Mapa de distribución elemental y espectros de micro fluorescencia de Rayos x ( $\mu$ -XRF) de tres distintos puntos fuertes mostrando la línea de emisión para el arsénico K $\alpha$ = 10543.4 eV.....	70
Figura 43. Biplot del PCA, donde se observan dos componentes principales (PC1 y PC2), así como las variables de contribución para cada componente..	74

## Lista de anexos

Anexo 1. Búsqueda sistemática de información.....	89
Anexo 2. Código ingresado en PHREEQC.....	94
Anexo 3. Protocolo de extracción de ADN.....	100
Anexo 4. Protocolo de concentración y pureza de ADN.....	102
Anexo 5. Condiciones para PCR.....	104
Anexo 6. Protocolo para gel de agarosa.....	109
Anexo 7. Visualización de geles de agarosa.....	110
Anexo 8. Temperatura y precipitación promedio en Matehuala.....	111
Anexo 9. Artículo publicado.....	112

## Resumen

En “Estudios de la distribución, especiación y bioacumulación de arsénico en *Paracyclops chiltoni*, estimaciones filogenéticas y efectos morfológicos” se investigó la bioacumulación y distribución de arsénico en zooplancton que habita agua dulce altamente contaminada, así como la estructura de su población. Se recolectaron muestras de agua y zooplancton durante un período de 4 años. Se determinó la temperatura ambiental y del agua, pH, conductividad eléctrica (CE), sólidos disueltos totales (SDT), potencial de oxidación-reducción (ORP), oxígeno disuelto (OD), cationes y aniones mayoritarios y concentración total de arsénico. Se identificó la especie de zooplancton y se determinó su abundancia, longitud, proporción de sexos, bioacumulación y distribución de arsénico en organismos expuestos al agua contaminada. Los resultados mostraron que, en el sitio de estudio, se encontraron organismos de *Paracyclops chiltoni* sobreviviendo en un ambiente de agua dulce con concentraciones extremadamente altas de arsénico ( $53.64 \pm 10.58$  mg/L), sulfato ( $2287.30 \pm 890.38$  mg/L) y fluoruro ( $2.0 \pm 0.13$  mg/L), mostrando, además, su adaptación. Por lo anterior, a dichos organismos se les clasificó como metalotolerantes. Los organismos de *Paracyclops chiltoni* expuestos mostraron una acumulación del contaminante de hasta  $9.6 \pm 5.4$  mgAs/kg en su cuerpo, probablemente en el tracto digestivo. Dichos organismos mostraron abundancias y longitudes típicas, para el caso de la abundancia se encontró una correlación negativa con las condiciones óxicas del agua dulce, mientras que para el caso de las longitudes se encontró una correlación negativa con la temperatura ambiental. Los resultados de este estudio podrían ayudar a comprender mejor posibles procesos de metilación del arsénico en organismos acuáticos de agua dulce.

**PALABRAS CLAVE:** Arsénico, agua contaminada, hidrogeoquímica, metalotolerante, *Paracyclops chiltoni*, zooplancton.

## Abstract

In "Studies of the distribution, speciation and bioaccumulation of arsenic in *Paracyclops chiltoni*, phylogenetic estimates and morphological effects" the bioaccumulation and distribution of arsenic in zooplankton inhabiting highly contaminated fresh water, as well as the structure of its population, was investigated. Samples of water and zooplankton were collected over a period of 4 years. Environmental temperature, water temperature, pH, electrical conductivity (EC), total dissolved solids (TDS), oxidation-reduction potential (ORP), dissolved oxygen (DO), major cations and anions and total arsenic concentration were determined. The zooplankton species was identified and its abundance, length, sex ratio, bioaccumulation and distribution of arsenic in organisms exposed to contaminated water were determined. The results showed that, at the study site, *Paracyclops chiltoni* organisms were found surviving in a freshwater environment with extremely high concentrations of arsenic ( $53.64 \pm 10.58$  mg/L), sulfate ( $2287.30 \pm 890.38$  mg/L) and fluoride. ( $2.0 \pm 0.13$  mg/L), also showing its adaptation. Therefore, these organisms were classified as metallotolerant. Exposed organisms of *Paracyclops chiltoni* showed arsenic accumulation (up to  $9.6 \pm 5.4$  mgAs/kg) in its body, likely in the digestive tract, as well as typical abundance and length. In the case of abundance, a negative correlation was found with the oxic conditions of fresh water, while in the case of lengths a negative correlation was found with the environmental temperature. The results of this study could help to better understand possible arsenic methylation processes in freshwater aquatic organisms.

KEY WORDS: Arsenic, contaminated water, hydrogeochemistry, metallotolerant, *Paracyclops chiltoni*, zooplankton.

# 1. Perspectiva, hipótesis y objetivos

## 1.1. Perspectiva

De acuerdo con estudios realizados por Martínez-Villegas et al. (2013) y Mendoza-Chávez (2016), en una surgencia de agua ubicada en la ciudad de Matehuala, San Luis Potosí, se han encontrado concentraciones de arsénico (As) de hasta 158 mg/L y presencia de zooplancton (copépodo *Paracyclops chiltoni*). Por otro lado, se ha reportado que de entre las especies de arsénico, las orgánicas, como arsenoazúcares y arsenobetaina, son menos tóxicas que las inorgánicas, como el As(III) y As(V) (Byeon et al., 2021; Caumette et al., 2012a; Peters et al., 1996; Sharma y Sohn, 2009). En este sentido, una de las propuestas de la metilación del arsénico, para hacerlo menos tóxico, sugiere que la arsenobetaina es formada por organismos de los niveles bajos de la cadena trófica en la que el primer eslabón es el zooplancton (Caumette et al., 2012a). Sin embargo, si el medio se encuentra muy contaminado, como ocurre en este estudio, el organismo se vuelve menos eficiente en la transformación de las especies del arsénico y deja de metilar al contaminante (Caumette et al., 2012a). De hecho, se ha reportado que concentraciones de 3 mg/L son letales para el zooplancton (Chen et al., 1999). Por lo anterior, surgen entonces las siguientes preguntas para el caso de Matehuala: ¿Cuáles son las condiciones fisicoquímicas del sistema en el que vive este organismo? ¿Cuál es la especiación del arsénico en el agua y el sedimento del sitio de estudio? ¿Cuáles son las características de la población de *Paracyclops chiltoni* que habita en estas aguas altamente contaminadas? ¿El organismo es metalotolerante? ¿Cuál es la distribución del arsénico en el organismo? ¿Estos organismos presentan alguna modificación morfológica debido a la presencia de arsénico? Para responder a las preguntas anteriores se planteó lo siguiente.

## 1.2. Hipótesis

*Paracyclops chiltoni* es un organismo extremófilo metalotolerante, capaz de bioacumular arsénico en su organismo, mostrando adaptaciones



morfológicas.

### 1.3. Objetivo

Identificar la acumulación y distribución del arsénico en *Paracyclops chiltoni* así como demostrar su tolerancia al contaminante, observando características morfológicas y de su población en individuos habitando aguas naturales contaminadas con arsénico.

Objetivos particulares:

- Medir los parámetros fisicoquímicos del agua de Matehuala.
- Determinar el tipo de agua estudiada.
- Determinar la concentración de arsénico en el agua y sedimento de Matehuala.
- Estimar la especiación de arsénico en el agua utilizando modelación hidrogeoquímica.
- Demostrar la presencia de *Paracyclops chiltoni* habitando agua altamente contaminada con arsénico a través del tiempo.
- Medir la bioacumulación de arsénico en *Paracyclops chiltoni*.
- Mapear la distribución de arsénico en *Paracyclops chiltoni*.
- Comparar aspectos morfológicos, genéticos y de estructura de la población de *Paracyclops chiltoni*, con lo reportado en la literatura.

## 2. Introducción

### 2.1. Agua

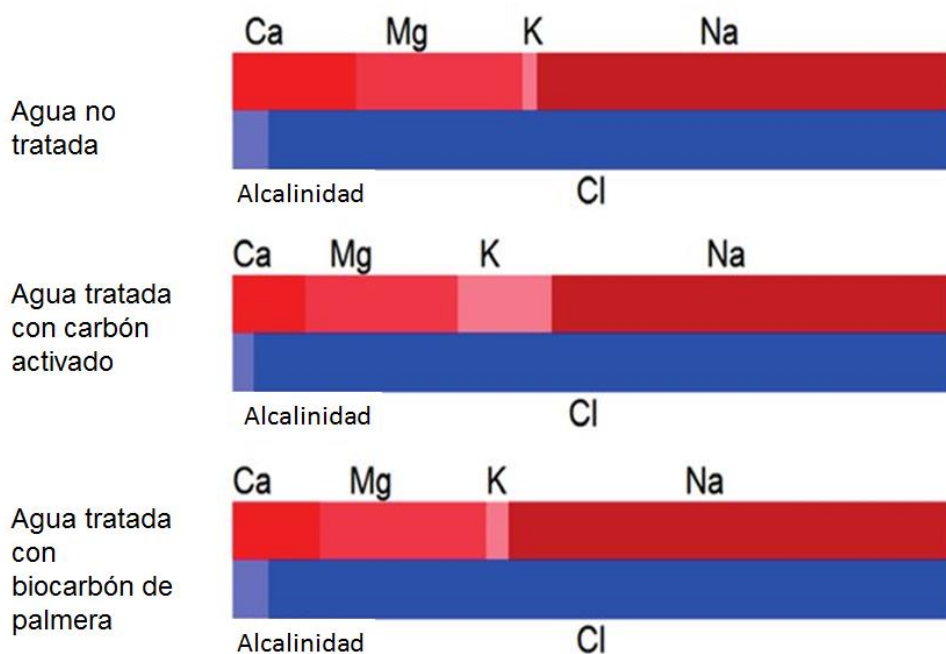
El agua se puede clasificar en diversas categorías dependiendo de las propiedades o características de la muestra que se analice (Ramírez et al., 2009). Una de estas clasificaciones utiliza las concentraciones de los iones mayoritarios, mismos que incluyen bicarbonatos ( $\text{HCO}_3^-$ ), carbonatos ( $\text{CO}_3^{2-}$ ), cloruros ( $\text{Cl}^-$ ), sulfatos ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), calcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ), magnesio ( $\text{Mg}^{+2}$ ), sodio ( $\text{Na}^+$ ) y potasio ( $\text{K}^+$ ) (Custodio y Llamas, 1996). Los iones disueltos en agua pueden guardar cierta relación con el terreno del que procede, indicar la acción de fenómenos modificadores o indicar una característica específica (Custodio y Llamas, 1996). En este método, como primer paso, se separan los aniones y cationes con sus respectivas concentraciones y se observan las más altas. Posteriormente, con dichos datos se procede a clasificar el agua analizada en función de estas concentraciones.

El manejo y estudio de análisis químicos puede simplificarse con el empleo de gráficos y diagramas, en especial cuando se trata de hacer comparaciones entre varios análisis de aguas de un mismo lugar en épocas diferentes o de lugares distintos. Estas gráficas y diagramas pueden poner en relieve variaciones temporales, variaciones espaciales o bien resaltar relaciones entre los iones de una misma muestra (Alley, 1993; Custodio y Llamas, 1996; Davis, 1967). A continuación se expone de manera simplificada el manejo y características principales de los diagramas de uso más frecuente.

#### 2.1.1. Diagrama de Stabler

Esta clase de diagrama permite observar la presencia y predominancia de los cationes y aniones representativos en el análisis hidroquímico, tales como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{HCO}_3^-$  y  $\text{CO}_3^{2-}$ . En algunas ocasiones se considera  $\text{NO}_3^-$  como anión u algún otro ion representativo. Como se observa en

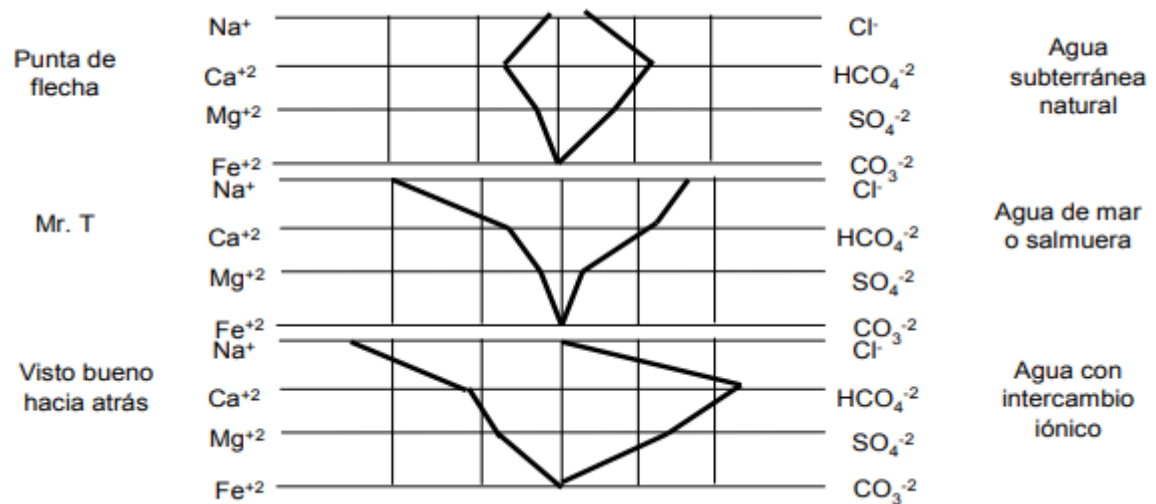
la Figura 1, en el diagrama de Stabler se disponen dos barras, una barra superior para los cationes y una barra inferior para los aniones. En dicho diagrama, el área de cada una de las barras es proporcional a la concentración de los cationes o los aniones (Iglesias-Portal, 2020).



**Figura 1.** Diagramas Stabler que ilustran la composición iónica en diferentes muestras de agua. Tomada de Remmani et al., 2021.

### 2.1.2. Diagrama de Stiff

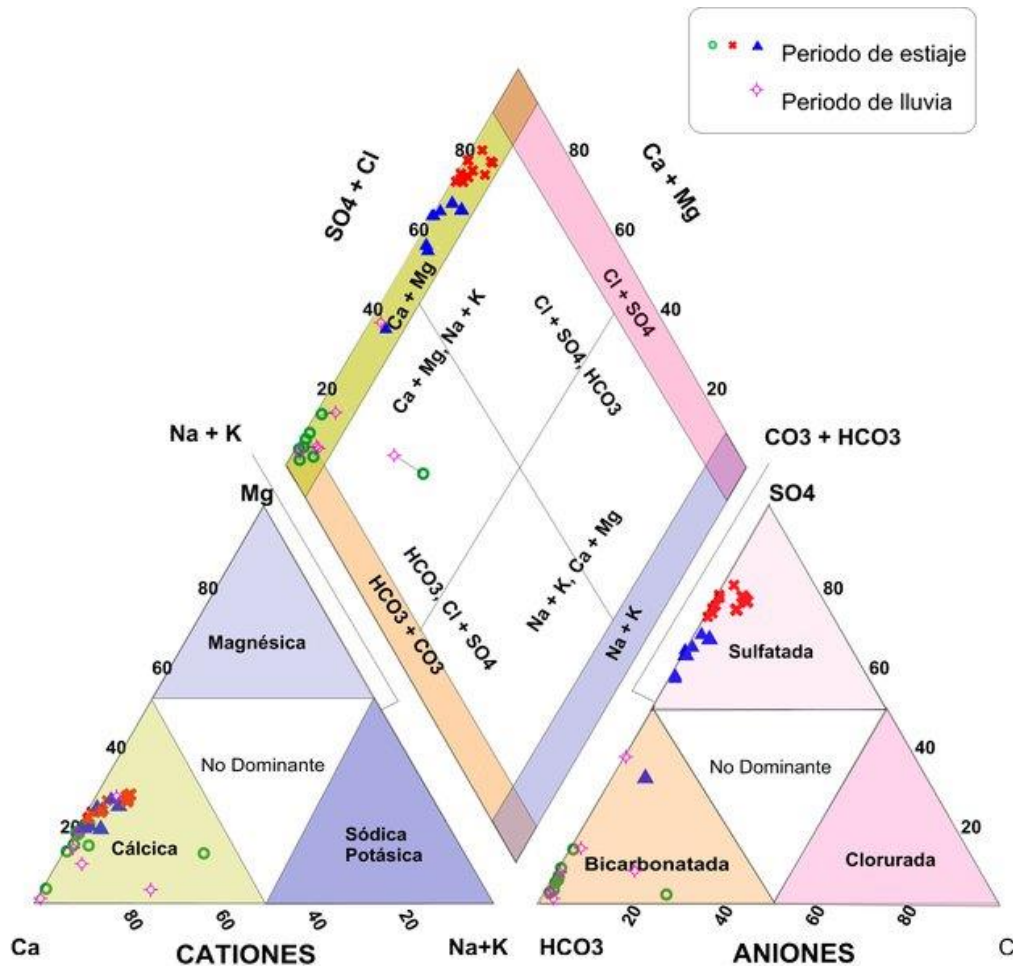
Los diagramas de Stiff o diagramas poligonales representan la concentración de cationes (hacia la derecha) y aniones (hacia la izquierda) en semirrectas paralelas en escala logarítmica. Una vez representadas las concentraciones, se unen los extremos de estas generando un polígono. Cada semirrecta representa un solo ion. La forma de las figuras resultantes da idea del tipo de agua, se presta a comparaciones y resulta fácilmente demostrativa al insertarlas en mapas hidroquímicos. En dichos diagramas, las concentraciones se grafican en miliequivalentes por litro (meq/L) (Custodio y Llamas, 1996). Para dicho efecto, las concentraciones en unidades de mg/L se dividen entre la multiplicación del peso atómico del compuesto por la valencia de este (Figura 2).



**Figura 2.** Diagrama de Stiff típicos de agua de diferente naturaleza. Tomado de Aldana et al., 2015.

### 2.1.3. Diagrama de Piper

El diagrama de Piper es un diagrama triangular o ternario, que se construye de la siguiente manera. Está formado por dos triángulos equiláteros, donde se representan los cationes y aniones mayoritarios. Los vértices del triángulo de cationes son  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  y/o  $\text{K}^+$ . Los vértices del triángulo de aniones son  $(\text{HCO}_3^- + \text{CO}_3^{2-})$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$  y/o  $\text{NO}_3^-$ . Las concentraciones de los iones dadas en meq/l se expresan como porcentaje con respecto a la suma de aniones y cationes respectivamente (porcentajes relativos). Los datos de los diagramas triangulares se proyectan en un rombo central en el que se representa la composición del agua deducida a partir de aniones y cationes. En un diagrama de Piper las aguas geoquímicamente similares se agrupan en áreas bien definidas por lo que comúnmente se utilizan para clasificarlas (Custodio y Llamas, 1996).



**Figura 3.** Diagrama de Piper que ilustra el tipo de agua de diversas muestras de campo. Tomada de Morán et al., 2013.

## 2.2. Especiación química

Es frecuente encontrar la descripción de la concentración de compuestos inorgánicos, considerados “sustancias traza” en los ambientes naturales, expresada en términos de elementos químicos. Sin embargo, éstos son parte de otras moléculas/compuestos y forman diversas especies moleculares presentes simultáneamente y en relaciones diversas en el ambiente (Castañé et al., 2003). Por ello, la especiación química se define como la distribución de un elemento químico particular entre las diferentes formas en las cuales puede existir (especies) en un medio determinado. Incluye tanto los elementos libres (en forma neutra o ionizada) como los variados complejos que pueden formarse con diferentes ligandos (Lyman, 1995). La especiación química en aguas superficiales refleja la complejidad química de ese medio (Castañé et al., 2003).

Así, el comportamiento de un elemento depende de las especies particulares en la que está presente y la mayor reactividad de una especie no necesariamente coincidirá con la mayor concentración del metal en esa forma química. De allí que el comportamiento de un elemento en el ambiente (biodisponibilidad, toxicidad, distribución, etc.) no pueda predecirse basándose en su concentración total (Bernhard et al., 1986) y sea necesario estimar la especiación química.

### 2.3. Índices de saturación mineral

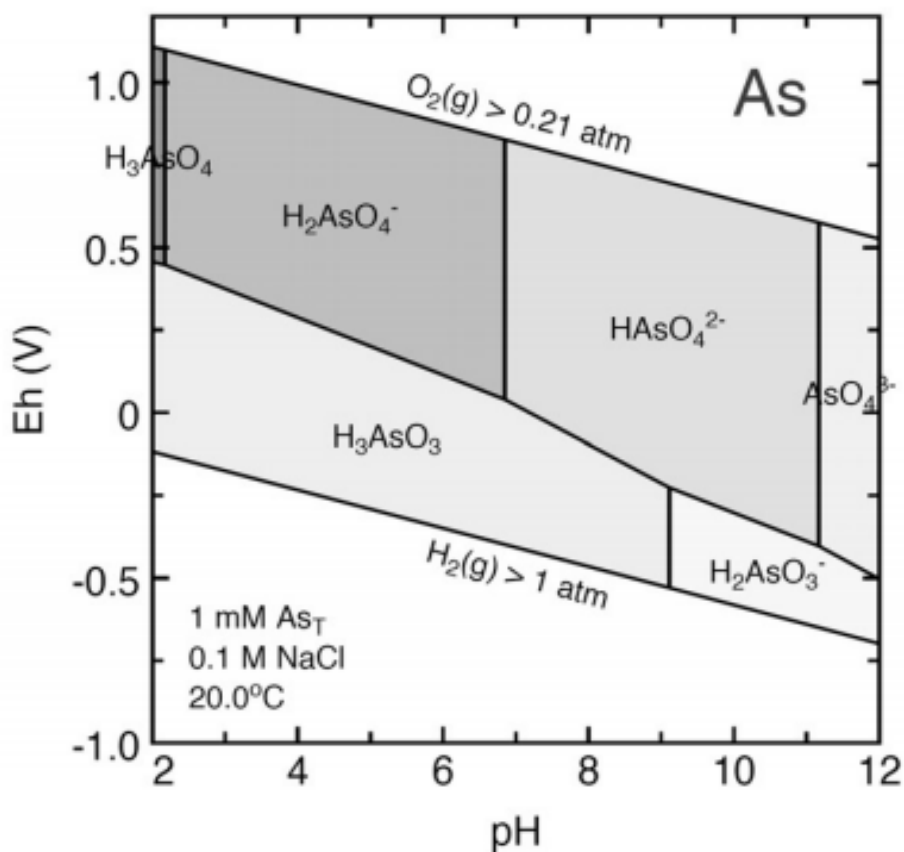
Por otro lado, los índices de saturación mineral (IS) nos dan información sobre el grado de sobresaturación, equilibrio o subsaturación de las diferentes fases minerales en la solución. El índice de saturación mineral (SI) es un índice termodinámico que nos ayudará a estimar si un agua tenderá a disolver, precipitar o mantener en el equilibrio a un mineral determinado. Se calcula con la división logarítmica de las actividades químicas de los iones disueltos del mineral (producto de la actividad iónica, PAI) entre su producto de solubilidad ( $K_{sp}$ ):  $IS = \log (PAI/K_{sp})$ . Si los minerales están en equilibrio con el medio, el IS será igual a cero. Si están sobresaturados, el IS será mayor a cero y sugeriría la precipitación de minerales. Por último, si el IS es menor a cero, el mineral tendría que estarse disolviendo (Appelo y Postma, 2005).

### 2.4. Arsénico

El arsénico (As) es un elemento químico que se encuentra comúnmente presente en la corteza terrestre y las aguas subterráneas. Se ha encontrado en el aire, la biota, el agua, el suelo y las rocas (De y Maiti, 2012). El arsénico se ha introducido en el medio ambiente a través de diversas fuentes naturales y antropogénicas (Smedley y Kinniburgh, 2002). Ejemplos típicos de fuentes naturales incluyen volcanes y rocas erosionadas que contienen arsénico, como realgar ( $As_2S_4$ ), orpimenta ( $As_4S_6$ ) y arsenopirita ( $FeAsS$ ) (Espino-Valdés et al., 2009). Es un elemento singular entre los metaloides y elementos formadores de oxianiones por su sensibilidad a movilizarse en los valores de pH entre 6.5 y 8.5,

típicos de las aguas subterráneas (Brookins, 1988; Yan et al., 2000). Por otro lado, ejemplos típicos de fuentes antropogénicas comunes incluyen la agricultura, la ganadería y la fabricación industrial de artículos como vidrio, productos químicos industriales, cobre, aleaciones de plomo y productos farmacéuticos, procesos como la fundición de minerales de hierro, la minería, la producción de pulpa y papel, la fabricación de cemento, la quema de combustibles y desechos (ATSDR, 2007; Duker et al., 2005; Espino-Valdés et al., 2009).

El arsénico coexiste en diversas especies en los medios acuosos (Figura 4). La carga eléctrica de las especies individuales depende en gran medida de la condición redox del sistema (De y Maiti, 2012). A condiciones oxidantes, el arsénico existe como arseniato ( $\text{AsO}_4^{3-}$ ), con constantes de acidez ( $pK_a$ ) de 2.2, 6.9 y 11.5 para las especies  $\text{H}_3\text{AsO}_4^0$ ,  $\text{H}_2\text{AsO}_4^-$ ,  $\text{HAsO}_4^{2-}$ ,  $\text{AsO}_4^{3-}$ . Por otro lado, como podemos ver en la Figura 4, en ambientes más reductores, el arsénico existe como arsenito ( $\text{AsO}_3^{3-}$ ) con valores de  $pK_a$  de 9.2, 12.1 y 13.4 donde el ion sin carga  $\text{H}_3\text{AsO}_3^0$  es el que prevalece a pH inferiores a 9.2 (Petrusevski et al., 2007; Ravenscroft et al., 2009; Samadzadeh-Yazdi y Khodadadi-Darban, 2010). En particular, este tipo de arsénico es el más preocupante debido a su probable impacto perjudicial en las plantas, los animales y los seres humanos (Adeloju et al., 2021).



**Figura 4.** Diagrama de Pourbaix de As en medio acuoso en un sistema As–O<sub>2</sub>–H<sub>2</sub>O a 25 °C y 1 bar de presión con valores generalizados de equilibrio, potenciales y constantes de disociación a fuerza iónica de cero. Tomado de Samadzadeh-Yazdi y Khodadadi-Darban, 2010; Smedley y Kinniburgh, 2002.

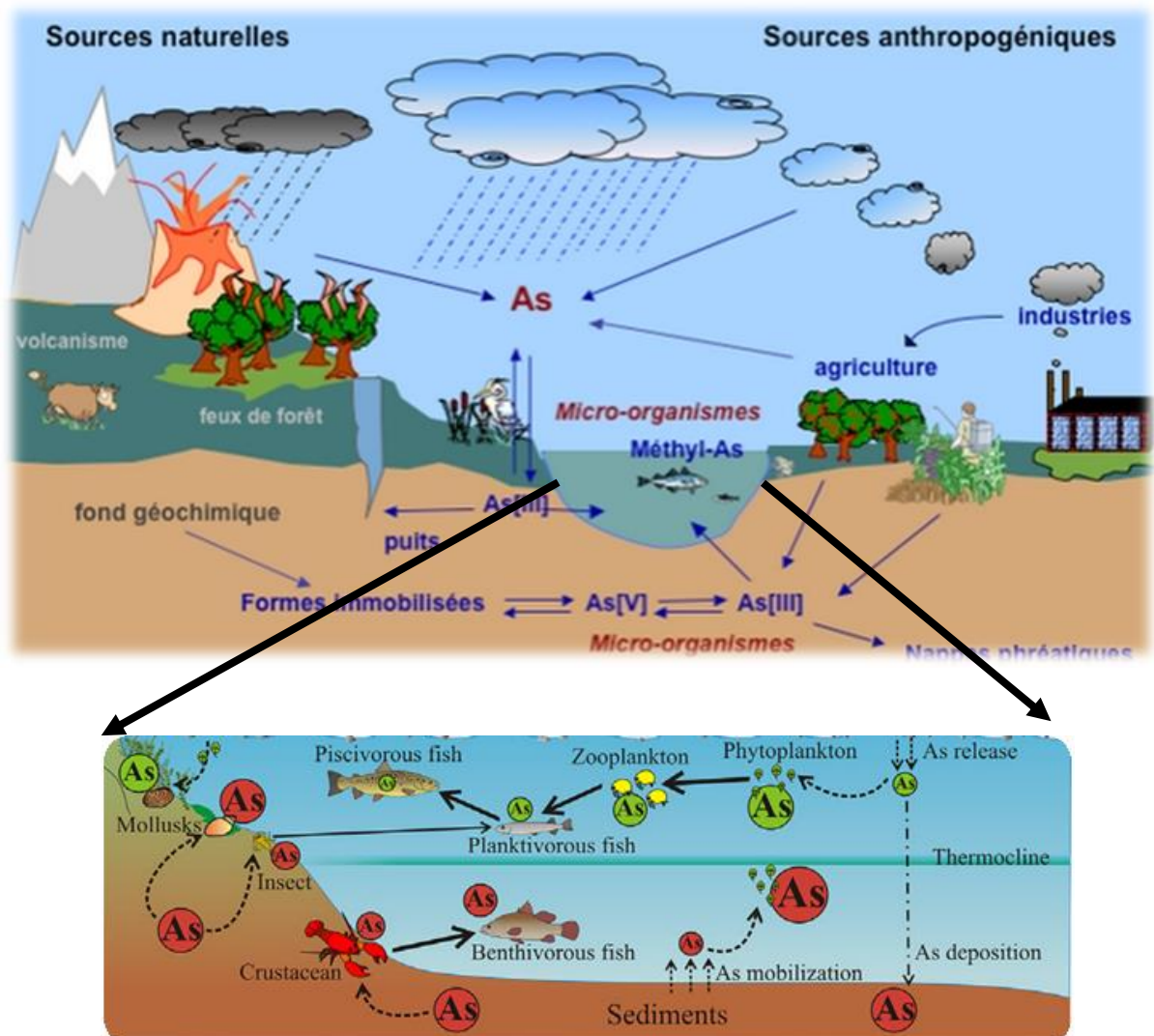
#### 2.4.1. El arsénico en la cadena trófica

Los compuestos inorgánicos son generalmente más tóxicos que los compuestos orgánicos (WHO, 2021), aunque la toxicidad de los compuestos del arsénico varía considerablemente, representa una amenaza importante para la salud pública particularmente cuando se encuentra en aguas contaminadas. Las principales rutas de exposición al arsénico para el ser humano son por ingesta, por inhalación y por vía dérmica (ATSDR, 2007; WHO, 2021). En los humanos, los efectos se producen tras una exposición mínima de aproximadamente cinco años y pueden ser precursores de cáncer de piel (ATSDR, 2007; WHO, 2021).

En la Figura 5 se muestra un diagrama simplificado del ciclo biogeoquímico del arsénico, donde quedan reflejadas las interrelaciones



existentes entre fuentes, emisiones, movimientos, distribución y depósitos de arsénico.

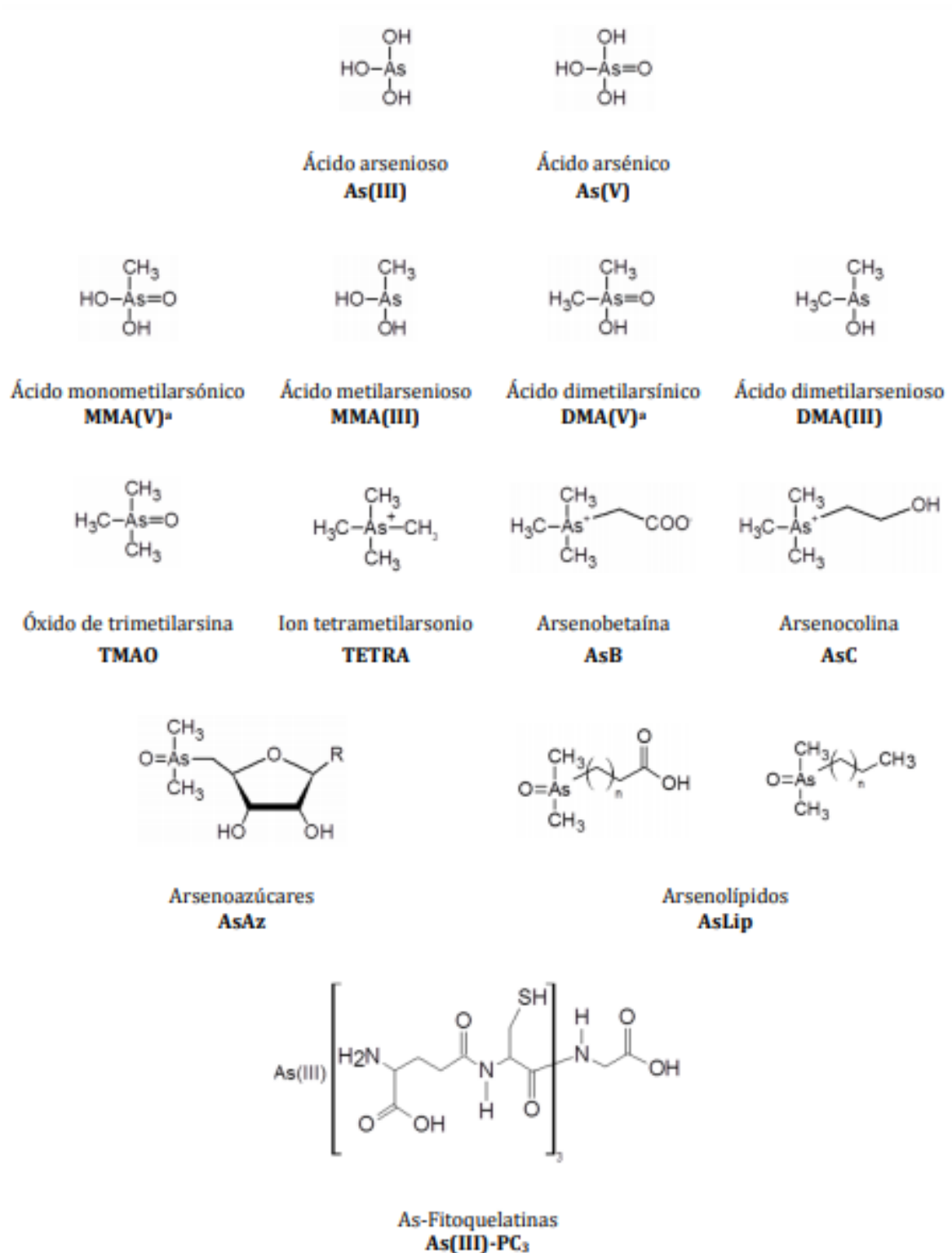


**Figura 5.** Ciclo biogeoquímico del arsénico. Una vez en el medio acuático, el arsénico puede ser incorporado a la red trófica. El arsénico total tiende a disminuir a niveles tróficos más altos a lo largo de las cadenas alimentarias de agua dulce (Chen et al., 2000; Chen y Folt, 2000; Culioli et al., 2009; Revenga et al., 2012). Los organismos pueden tomar al arsénico a través de una variedad de vías: directamente de la solución a través de toda la superficie del cuerpo, a través de estructuras respiratorias especializadas (p. ej. branquias) o a través del epitelio digestivo con agua o alimentos ingeridos, sedimentos o partículas en suspensión (Rahman et al., 2012). Modificada de: Juncos et al., 2016; MOEF, 2021.

La toxicidad del arsénico varía ampliamente con sus estados de oxidación. Como se comentó anteriormente, las especies inorgánicas generalmente son más tóxicas que las orgánicas, por ejemplo, el arsenito, que contiene  $As(III)$ , es aproximadamente 60 veces más tóxico que el arseniato, que

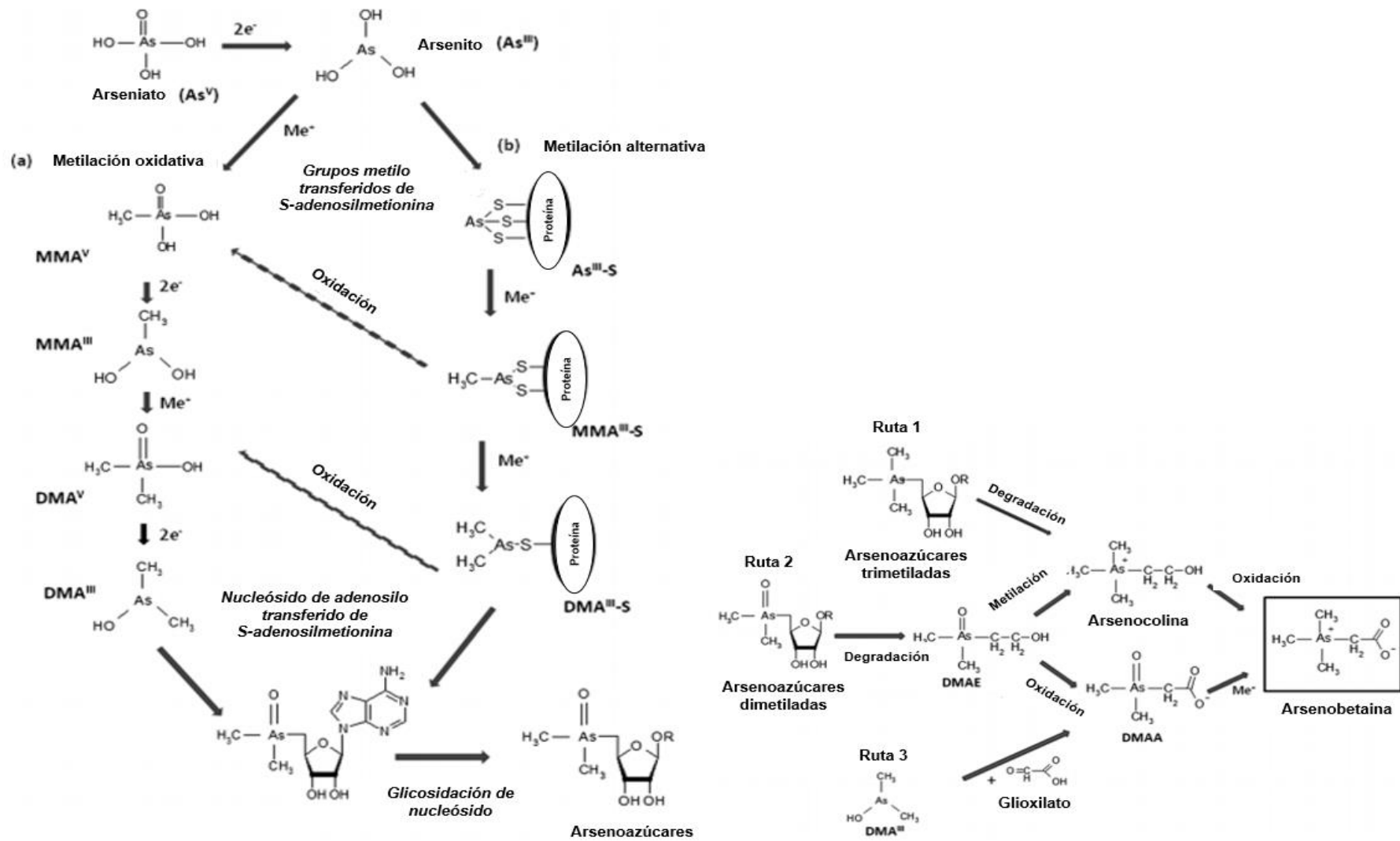
contiene As(V) (Ventura-Lima et al., 2011). Esta última especie, a su vez, es 70 veces más tóxica que las especies metiladas como el ácido monometilarsónico (MMA) y el ácido dimetilarsínico (DMA), considerándose las dos últimas formas sólo moderadamente tóxicas (Akter et al., 2005). Otras especies de arsénico, como el óxido de trimetilarsina (TMAO) y el tetrametilarsonio (TETRA) también se consideran moderadamente tóxicas, mientras que la arsenobetaína (AsB), la arsenocolina (AsC) y otros arsenosazúcares (AsS) no muestran toxicidad (Fattorini et al., 2006).

Las especies de arsénicos más comúnmente encontradas en muestras medioambientales pueden observarse en la Figura 6. Actualmente, se han identificado especies de monometilarsenato (MMA), dimetilarsenato (DMA) y arsenosazúcar (azúcar sulfato, azúcar fosfato y azúcar glicerol) en el nivel inferior de la cadena trófica de agua dulce, específicamente en el zooplancton del grupo cladóceros y copépodos (Caumette et al., 2012b; 2014; Shibata et al., 1996).



**Figura 6.** Especies de arsénico más comunes en muestras biológicas y medioambientales. Tomada de García-Salgado, 2013.

Hasta ahora, se ha propuesto que la formación de arsenosazúcar puede ocurrir por metilación oxidativa (Challenger, 1945) y por metilación alternativa (Hayakawa et al., 2005; Naranmandura et al., 2006). Como se muestra en la Figura 7, la primera vía consiste en la metilación oxidativa progresiva del arsénico con reducción alterna de arsénico según la siguiente vía:  $\text{As(V)} \rightarrow \text{As(III)} \rightarrow \text{MMA(V)} \rightarrow \text{MMA(III)} \rightarrow \text{DMA(V)} \rightarrow \text{DMA(III)} \rightarrow \text{arsenosazúcares}$ , donde la S-adenosilmetionina (SAM) es el donante de metilo más probable, mientras que los compuestos de tiol, como el glutatión, que prevalecen en los tejidos biológicos, servirían como reductores proporcionando los dos electrones necesarios para la reducción de arsénico durante reacciones catalizadas por enzimas (Caumette et al., 2012a). La segunda vía consiste en la metilación del arsénico, seguida de su oxidación para terminar con los metilarsénicos pentavalentes más simples, MMA(V) (ácido monometilarsónico) y DMA(V) (ácido dimetilarsónico) (Hayakawa et al., 2005; Naranmandura et al., 2006). Las especies de arsénico trivalente intermedio dentro de esta vía incluyen especies de tioles de arsénico, como MMA(III) (ácido metilarsenioso) y (ácido dimetilarsenioso) DMA(III) (Hayakawa et al., 2005). La abundancia de estas especies de arsénico en el medio acuático respalda la viabilidad de esta forma de biotransformación en el medio ambiente (Caumette et al., 2012a). Sin embargo, el estudio de especies inorgánicas y orgánicas de arsénico en organismos acuáticos que viven en agua dulce extremadamente contaminada con arsénico no se ha abordado, lo que podría proporcionar información sobre su biotransformación en la naturaleza. Además, se ha demostrado que la formación de compuestos de arsénico metilado es en función de la concentración de arsénico en el medio ambiente (Caumette et al., 2014) y que la acumulación potencial de arsénico en los organismos depende de la especiación de arsénico (Caumette, et al., 2012b). Por lo tanto, los cuerpos de agua con altas concentraciones de arsénico, como el de este trabajo de tesis, ofrecen excelentes oportunidades para generar nuevo conocimiento sobre los procesos de biotransformación del arsénico en zooplancton de agua dulce.

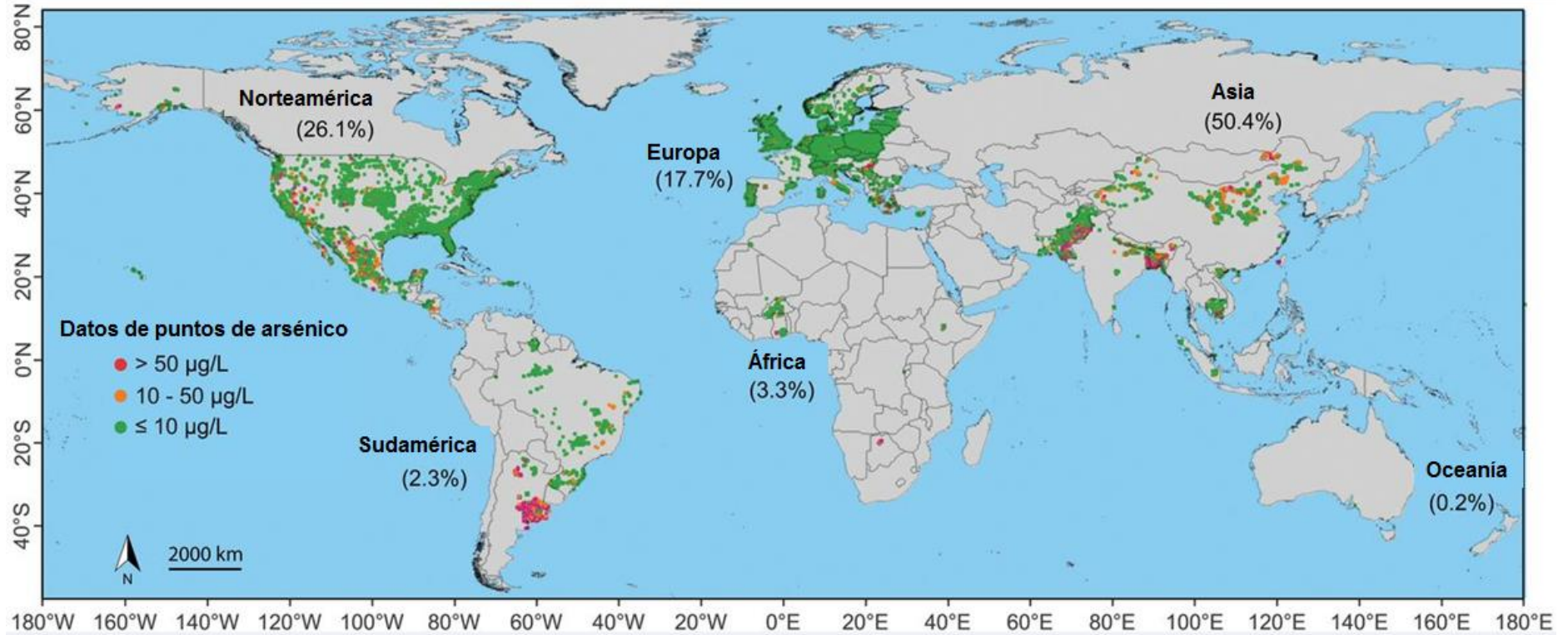


**Figura 7.** Metilación de arsénico al ingresar a los organismos y propuesta de las posibles rutas de biotransformación del mismo, tomada y traducida de Caumette et al., 2012a.

#### 2.4.2. Problemática del agua contaminada con arsénico a nivel internacional y nacional

Las personas están expuestas a niveles elevados de arsénico inorgánico al beber agua contaminada, usar agua contaminada en la preparación de alimentos y el riego de cultivos alimentarios, comer alimentos contaminados y fumar tabaco. La exposición humana a niveles bajos a moderados de exposición a arsénico (10-300 µg/L) a través del agua potable tiene efectos adversos, como lesiones cutáneas, trastornos circulatorios, complicaciones neurológicas, diabetes, complicaciones respiratorias, disfunción hepática y renal, cáncer y mortalidad por enfermedades crónicas (Hong et al., 2014; WHO, 2021).

La contaminación por arsénico de las aguas subterráneas está muy extendida y hay varias regiones en el mundo en donde la contaminación por arsénico del agua potable es significativa. Hasta el 2009 se reconocía que al menos 140 millones de personas en 50 países habían bebido agua que contenía arsénico en niveles superiores al valor de referencia provisional de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 10 µg/L (Ravenscroft et al., 2009). En Bangladesh, se estima que de 60 a 70 millones de personas corren un riesgo potencial para la salud debido a la exposición al arsénico, y varios miles ya se han visto afectados por la arsenicosis crónica (Ravenscroft et al., 2009). Se estima que éste podría ser el más grande caso de intoxicación masiva de la historia (Halim et al., 2008), en el que los autores refieren concentraciones de hasta 1.352 mg/L en el agua subterránea, valores dos órdenes de magnitud menores a los reportados en el cuerpo de agua de Matehuala, abordado en este estudio. Mundialmente (Figura 8), la población afectada por arsénico presente en aguas subterráneas se reporta entre los 94 y 220 millones de personas (Podgorski y Berg, 2020).

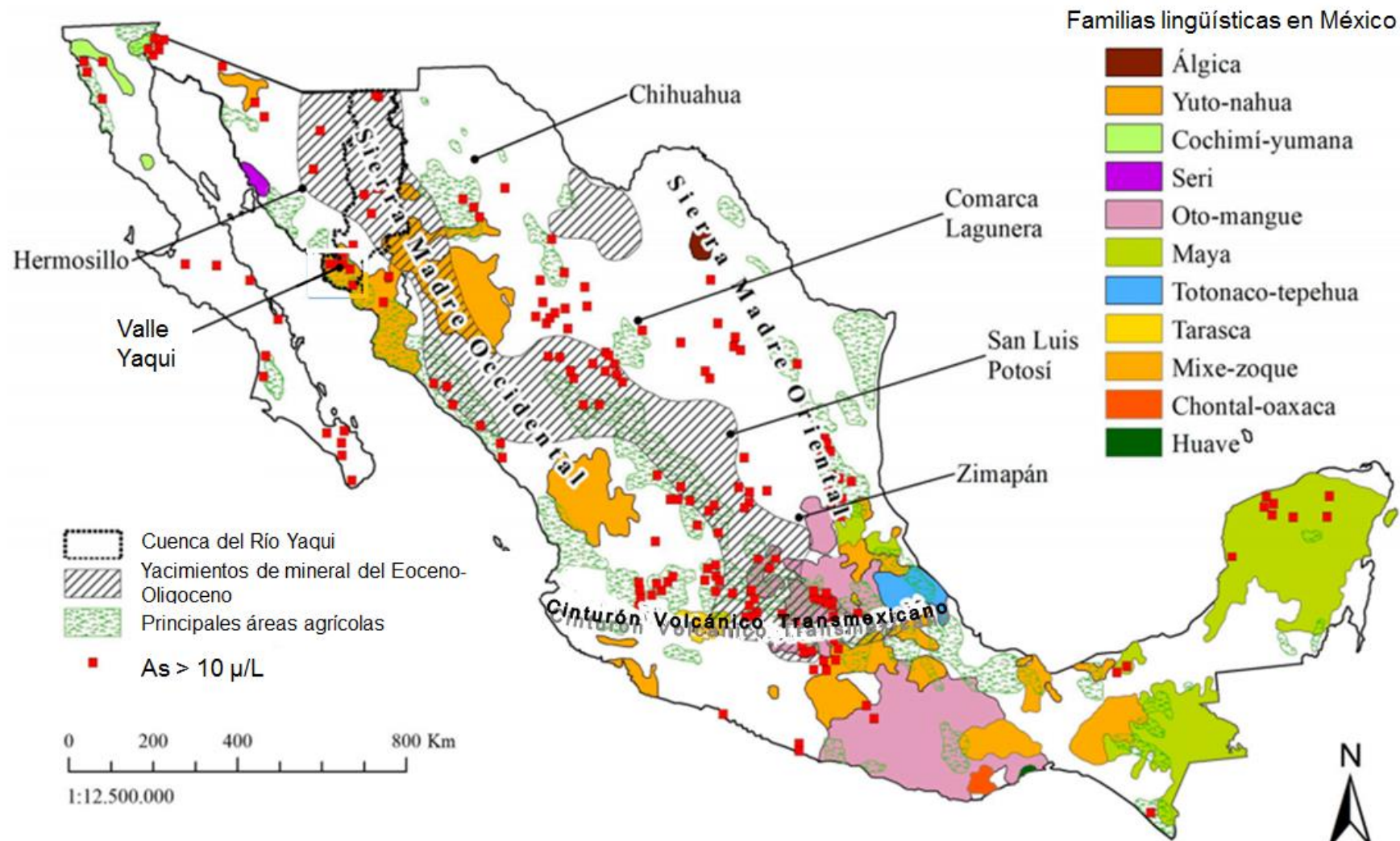


**Figura 8.** Mapa con datos de concentraciones reportadas de casi 80 estudios de arsénico en aguas subterráneas a nivel mundial (más de 55,000 datos de puntos de arsénico). Tomado y traducido de Podgorski y Berg, 2020.

Con respecto a México, según la revisión de Espino-Valdés et al., 2009, se han encontrado niveles altos de arsénico en diferentes acuíferos del país (Ortega-Guerrero, 2009) y en el agua subterránea de varias regiones: Zimapán, Hidalgo (Armienta et al., 2001), Tlamacazapa, Guerrero (Cole, 2004), Mexxicacán, Teocaltiche y San Juan de los Lagos, en el estado de Jalisco (Hurtado-Jiménez y Gardea-Torresdey, 2006), la Comarca Lagunera (Boochs et al., 2007), zonas mineras y metalúrgicas de San Antonio-El Triunfo en Baja California (Armienta y Segovia, 2008). También se ha encontrado arsénico en suelo y aguas de Matehuala y Villa de la Paz en San Luis Potosí (Martínez-Villegas et al., 2013; Razo et al., 2004), en agua subterránea de Durango (Cruz et al., 2020) así como en áreas geotermales de Michoacán y Puebla (Armienta y Segovia, 2008). Más recientemente, Osuna-Martínez et al., (2021) publicaron un análisis de 226 estudios que reportan arsénico en agua, sedimentos y biota en estos lugares de México.

La contaminación con arsénico ha sido un tema de preocupación en la salud de la población del país, incluso se han realizado estudios de la relación entre la concentración de arsénico en pozos de agua y los posibles efectos para diferentes poblaciones, p. ej. pueblos indígenas (Figura 9) (Navarro-Espinoza et al., 2021).



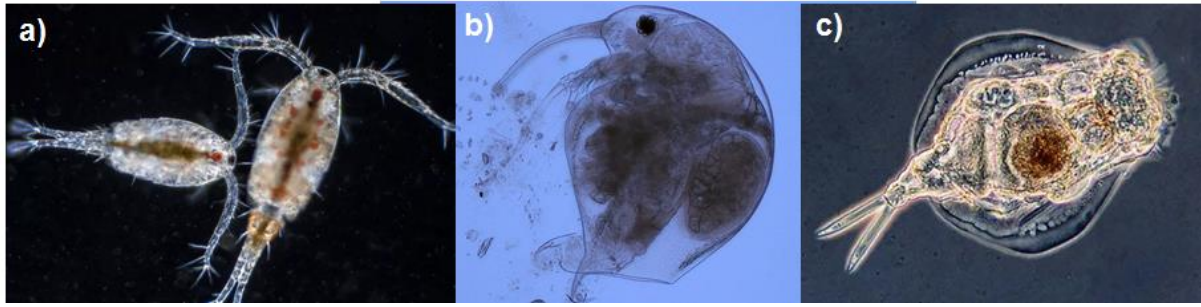


**Figura 9.** Mapa de México que indica la presencia de arsénico (> 0.01 mg/L) en pozos de agua. Se considera la ubicación de grupos indígenas, depósitos de mineral y las principales áreas agrícolas. Se han reportado investigaciones en toxicología para los lugares señalados con líneas negras (por ejemplo, Chihuahua, San Luis Potosí). Tomado y modificado de Navarro-Espinoza et al., 2021.

Como se mencionó anteriormente, para el estado de San Luis Potosí, los municipios con mayores reportes de contaminación de arsénico han sido Villa de la Paz y Matehuala (Martínez-Villegas et al., 2013; Mendoza-Chávez, 2016; Pelallo-Martínez, 2006; Razo et al., 2004) así como en el municipio de Villa de Ramos (Bocanegra-Salazar, 2006; Vite-Hernández, 2021). En los dos primeros, como resultado de la actividad minero-metalúrgica de la zona, se ubican varios depósitos de residuos de mina que están compuestos principalmente por calcita y cuarzo, así como los minerales: galena (PbS), esfalerita (ZnS), arsenopirita (FeAsS), pirita (FeS<sub>2</sub>), calcopirita (FeCuS<sub>2</sub>), bornita (Cu<sub>5</sub>FeS<sub>4</sub>) y sulfosales de Cu-Sb (Briones-Gallardo y Razo-Soto, 2008) y residuos metalúrgicos (Martínez-Villegas et al., 2013). Por otro lado, específicamente para el acuífero somero de Matehuala, se han reportado concentraciones de hasta 158 mg/L de arsénico, donde el agua fluye a través de un acuífero poco profundo y la geología de la superficie local consiste en una compleja transición geológica aluvial-yesífera que exhibe características kársticas y de paleocanal (Del Ángel-Ríos, 2020; Gómez-Hernández et al., 2020; Martínez-Villegas et al., 2013).

## 2.5. Zooplancton

“Zooplancton” es un término que se aplica a la comunidad de animales que viven a la deriva en el agua, con una capacidad limitada para contrarrestar los movimientos del agua nadando. Se considera el vínculo más importante entre los productores primarios de plancton y los grandes carnívoros, entre ellos las especies de peces sometidas a explotación humana (Alcaraz y Calbet, 2003). Los organismos del zooplancton normalmente miden menos de 2 mm de largo, e incluyen generalmente tres grupos principales: copépodos, cladóceros y rotíferos (Figura 10). Estos grupos de zooplancton viven en las columnas de agua de los lagos o arroyos de movimiento lento. Algunos son herbívoros porque pastan fitoplancton y otros son carnívoros depredadores y son una importante fuente de alimento para peces y aves acuáticas (Hendrey, 2001).



**Figura 10.** Grupos de organismos principales del zooplancton: a) copépodos, b) cladóceros y, c) rotíferos. Imágenes tomadas de Hauter & Hauter, 2020; Kipp et al., 2019; Van Egmond, 2021.

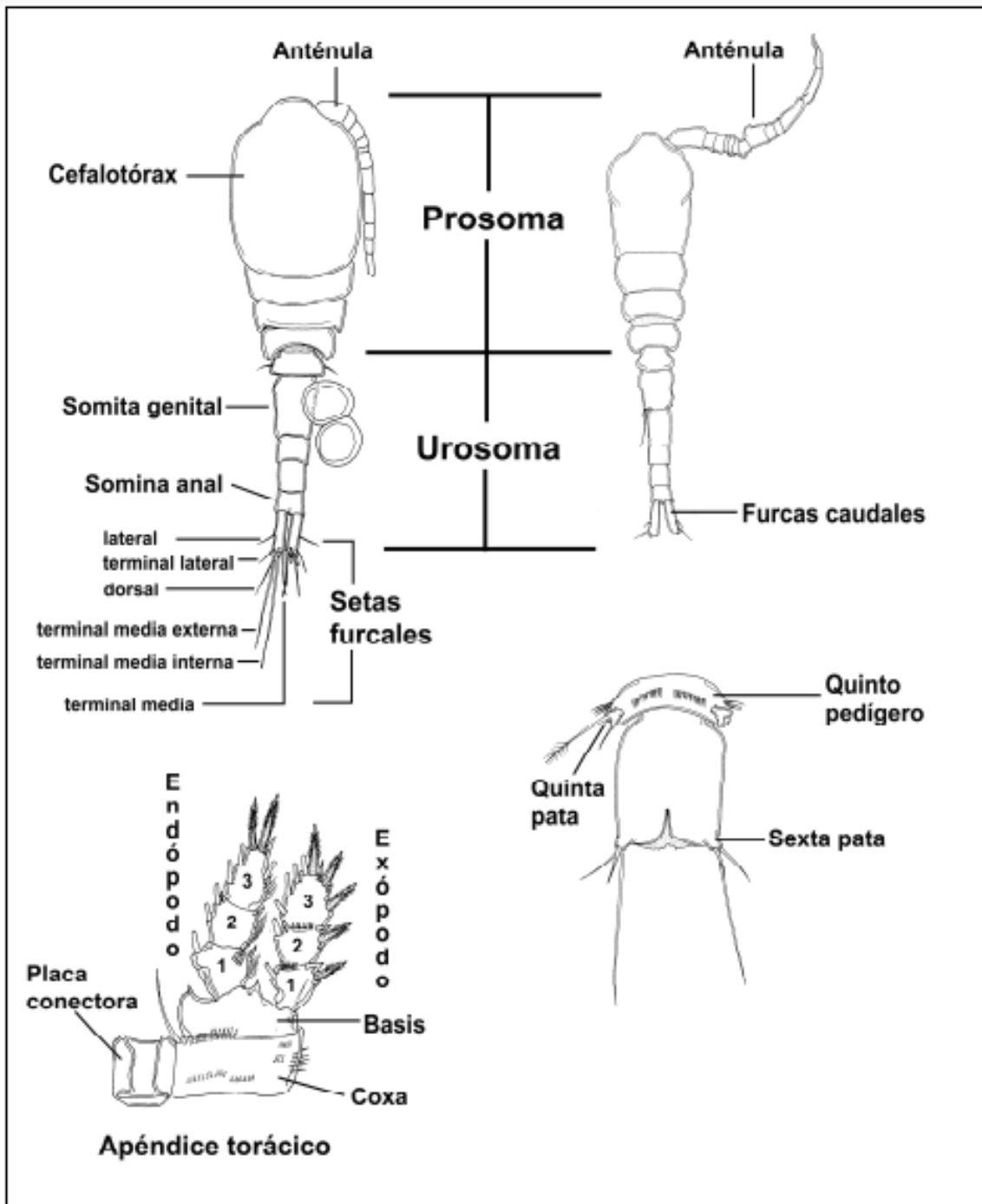
### 2.5.1. Copépodos

Para el interés de esta investigación, centraremos la atención en el grupo de los copépodos. La subclase Copepoda (Milne Edwards, 1840), es la más grande de las clases de mini-crustáceos con más de 10,000 especies conocidas. Debido en gran parte a su alta densidad en los océanos del mundo, se estima que son algunos de los metazoos más abundantes de la Tierra (Hardy, 1970). Los copépodos también son abundantes en sistemas terrestres donde pueden alcanzar densidades superiores a 150,000 individuos/m<sup>2</sup> en suelos orgánicos húmedos (Reid, 1986), aunque son de origen marino, también pueden dominar la fauna de algunos sistemas de agua dulce (Williamson y Reid, 2001).

Los copépodos, tienen categoría de Clase y se dividen en ocho órdenes: *Calanoida*, *Misophrioida*, *Harpacticoida*, *Mormonilloida*, *Monstrilloida*, *Siphonostomatoida*, *Poecilostomatoida* y *Cyclopoida* (Menéndez-Valderrey y Lorenzo-Corchón, 2021), siendo este último orden en el que se centra este estudio.

Los copépodos de agua dulce de vida libre se pueden distinguir de otros invertebrados acuáticos pequeños por una variedad de características morfológicas. Como se describe en Gutiérrez-Aguirre et al., 2012, la morfología general de los copépodos consta de un cuerpo dividido en segmentos: los cefálicos y los torácicos (prosoma), los abdominales y el somita anal (urosoma) y un par de furcas caudales (Figura 11). Mientras que las hembras portan anténulas rectas, los machos cuentan con anténulas articuladas o geniculadas, lo cual facilita la sujeción de la cuarta pata de la hembra durante la cópula. En *Cyclopoida* la quinta pata se encuentra en la región

del urosoma, por delante del quinto segmento torácico. Mientras que, en el urosoma, los copépodos portan apéndices pareados, articulados en posición ventral, en el urosoma no son encontrados. Por apéndices cefálicos se refiere a las anténulas, las antenas, las mandíbulas, las maxílulas, las macilas y los maxilípedos, estos últimos están fijados en el somita que se fusiona con la cabeza formando el cefalotórax. Cuentan con cuatro pares de apéndices torácicos/patas. Las anténulas y los apéndices cefálicos tienen funciones sensoriales y mecánicas (alimenticias), respectivamente. Morfológicamente, se puede diferenciar hasta el nivel de especie, observando los apéndices. En Cyclopoida, el número de artejos en las anténulas está entre 11 y 17 (Gutiérrez-Aguirre et al., 2012). Por otro lado, los apéndices pareados colocados sobre el tórax, conocidas como apéndices/patas torácicas son especializados para la natación (Williamson y Reid, 2001).



**Figura 11.** Morfología general de un copépodo (vista dorsal de una hembra a la izquierda y un macho a la derecha), detalles morfológicos de un apéndice torácico y detalles del quinto pedígero y somita genital de un macho. Tomada de Gutiérrez-Aguirre et al., 2012.

Los copépodos de agua dulce generalmente varían en tamaño de 0.5 a 2.0 mm de longitud, aunque algunas especies como los cyclopoideos *Macrocylops fuscus* y *Megacyclops gigas*, y calanoides en varios géneros, incluidos *Heterocope*, *Epischura*, *Limnocalanus* y *Hesperodiaptomus* pueden alcanzar longitudes de 3-5 mm. Si bien la

gran mayoría de estos organismos son transparentes o de un gris pálido o marrón, los colores pueden variar del negro al rojo, naranja, rosa, violeta, verde y azul. Los colores más brillantes a menudo se deben a pigmentos vegetales como los carotenoides en gotas de aceite del cuerpo del copépodo (Williamson y Reid, 2001).

Los copépodos son comunes en una variedad de hábitats acuáticos y semiacuáticos que van desde suelos húmedos, paquetes de hojas, aguas subterráneas, humedales y fitotelmas, hasta lagos, estuarios y océanos abiertos (Williamson y Reid, 2001). Este grupo de organismos ha sido capaz de desarrollar modificaciones estructurales, fisiológicas y de comportamiento, que les ha permitido ser el grupo más diverso del planeta (Gutiérrez-Aguirre et al., 2012). La mayoría de las especies son omnívoras, con alimentos que van desde detritus y polen hasta fitoplancton, otros invertebrados e incluso larvas de peces. Los copépodos constituyen con frecuencia una parte importante de la biomasa de consumo en estos hábitats. Desempeñan un papel fundamental en las redes alimentarias acuáticas como consumidores primarios y secundarios, y como fuente principal de alimento para muchos invertebrados y vertebrados más grandes (Williamson y Reid, 2001).

#### 2.5.2. Organismos de zooplancton habitando agua contaminada con arsénico

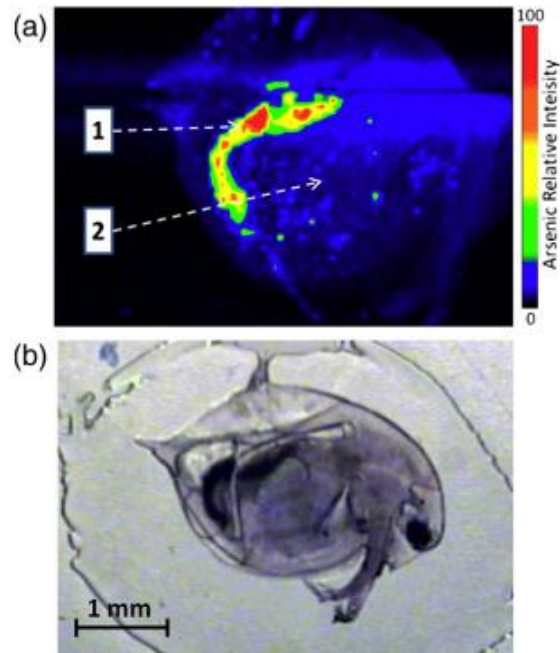
Debido a su toxicidad, instancias nacionales e internacionales consideran al arsénico dentro de sus regulaciones cómo un parámetro para la protección de la vida acuática. En México, entre los criterios ecológicos marcan el límite máximo permisible de arsénico en agua para la protección de la vida acuática en 0.2 mg/L (Acuerdo por el que se establecen los criterios ecológicos de calidad del agua, 1989), con respecto a los sedimentos la normativa internacional señala concentraciones de arsénico de hasta 17 mg/kg (CCME, 1999; EPA, 2002) como un nivel probable de efecto sobre los organismos acuáticos de agua dulce, mientras que en México no existe regulación para la calidad de los sedimentos.

Se ha encontrado que los organismos vivos reaccionan de diferente forma a la exposición al arsénico, algunos de ellos lo pueden bioacumular (Gutiérrez y Gagneten, 2011), que es el proceso mediante el cual, el organismo toma sustancias

del medio y lo almacena en sus tejidos a través del tiempo. Además, tiene efectos adversos en organismos de zooplancton como cladóceros, ostrácodos, copépodos, rotíferos y oligoquetos (Alvarado-Flores et al., 2019). Dichos efectos pueden impactar la ecología y morfología de la población de dichos organismos, así como su abundancia, tamaño, sexo y proporción de sexos (hembra: macho), entre otros parámetros (Conde-Porcuna et al., 2004; De la Lanza-Espino et al., 2011; Dinh et al., 2020; Karlsson y Winder, 2020; Zhao et al., 2018; Zhu et al., 2020).

Se han reportado ensayos de laboratorio en los cuáles, concentraciones de arsénico de hasta 3 mg/L son letales para el zooplancton (Chen et al., 1999). Sin embargo, es bastante conocido que los grupos principales de agua dulce, cladóceros, rotíferos y copépodos, bioacumulan arsénico (Alvarado-Flores et al., 2019; Byeon et al., 2020; Caldwell et al., 2011; Caumette, et al., 2012b; Caumette et al., 2014; Rubio Franchini et al., 2015). Esto, probablemente debido a la biotransformación de especies de arsénico inorgánico más tóxicas en especies de arsenobetaína y arsenosazúcares menos tóxicas, como se ha demostrado para organismos marinos y de agua dulce, respectivamente (Caumette et al., 2012a; Caumette et al., 2014).

En el caso de aguas naturales contaminadas con arsénico, se ha encontrado presencia de zooplancton. Por ejemplo, en Barrett et al., 2018, encontraron copépodos y cladóceros habitando en aguas con concentraciones de hasta 56 µg/L, mientras que en Caumette et al., 2011, 2012b, encontraron a estos mismos grupos del zooplancton pero en concentraciones de hasta 250 µg/L, además, estos últimos midieron bioconcentraciones de arsénico (11 mg/kg) y la distribución de arsénico en un cladóceros (Figura 12).



**Figura 12.** Mapeo de arsénico en *Daphnia pulex*. La señal se muestra como un gradiente de concentración (a), con la imagen correspondiente de *Daphnia* (b). Tomada de Caumette et al., 2012b.

## 2.6. Extremófilos

Los extremófilos son organismos que pueden sobrevivir a condiciones fuera de lo convencional, es decir, con la capacidad de prosperar en ambientes extremos como los que se muestran en la Tabla 1. Dado que viven en “ambientes extremos”, pueden indicar bajo qué rango de condiciones es posible la vida (NOAA, 2021).

Las enzimas únicas que utilizan estos organismos, llamadas "extremoenzimas", son muy resistentes a condiciones extremas debido a su gran solidez, y plantean nuevas oportunidades para la biocatálisis y biotransformaciones, así como para el desarrollo de la economía y de una nueva línea de investigación, a través de su aplicación (Dumorné et al., 2017; Oliart-Ros et al., 2016).

Es importante tener en cuenta que estos organismos son 'extremos' solo desde una perspectiva humana. Si bien el oxígeno, por ejemplo, es una necesidad para la vida tal como la conocemos, algunos organismos prosperan en ambientes sin oxígeno en absoluto (NOAA, 2021).



**Tabla 1.** Clasificación de los extremófilos definidos por sus ambientes. Tomada y traducido de Souza et al., 2020.

<b>Parámetro ambiental</b>	<b>Tipo de extremófilo</b>	<b>Condición de crecimiento definida</b>	<b>Entorno extremo representativo</b>
Temperatura	Psicrófilo	< -15 °C	Hielo nieve
	Termófilo	60 to 80 °C	Aguas termales
	Hipertermófilo	110 - 121 °C	Respiraderos hidrotermales oceánicos, aguas termales
pH	Acidófilo	pH < 3.0	Drenaje minero, manantiales volcánicos
	Alcalófilo	pH > 9.0	Lagos alcalinos
Presión	Piezófilo	> 10 MPa	Océano profundo, p. ej. fosa de las Marianas
Salinidad	Halófilo	> 10% (w/v) NaCl	Lagos de sal, desiertos, minas de sal, alimentos salados, evaporitas
Radiación ionizante	Radorresistente	1500 to 6000 Gy	Núcleo de agua del reactor nuclear
Desecación	Xerófilo	a < 0.6	Desiertos, superficies rocosas, ambientes hipersalinos
Metales pesados	Tolerantes a los metales	Altas concentraciones de Cu, Cd, As, Zn	Aguas, suelos contaminados
Nutrientes	Ambientes nutricionalmente limitados	Oligotrófico	Océano pelágico y profundo
Reside en roca	Endolito	Residente dentro de rocas	Ubicación del subsuelo superior al subterráneo profundo

### 2.6.1. Metalotolerantes

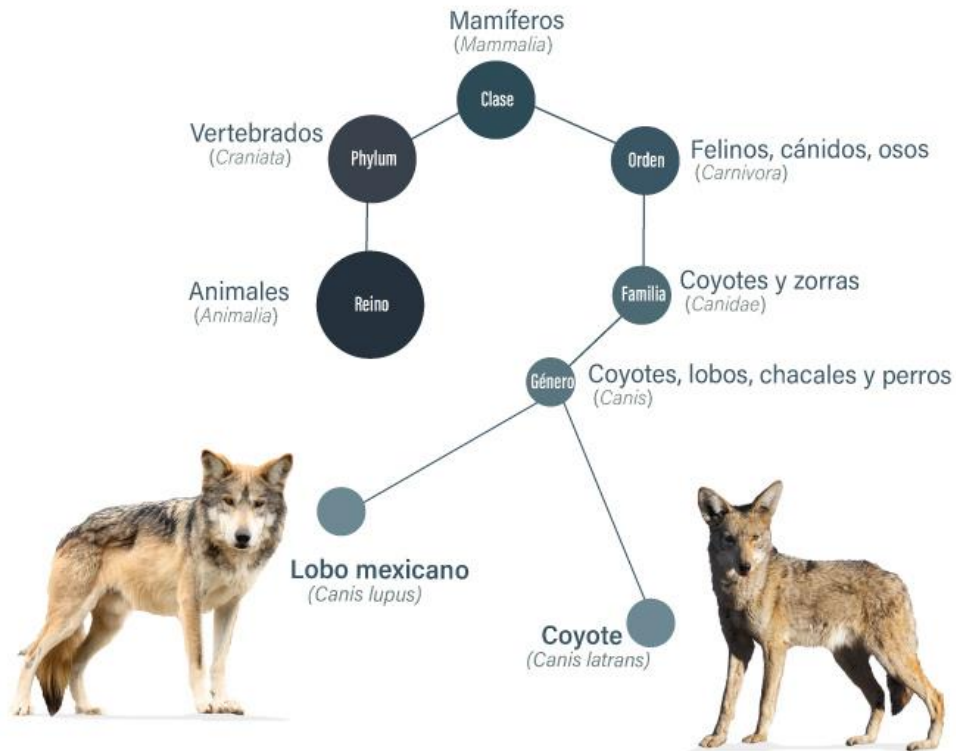
Como se observa en la Tabla 1, uno de estos grupos de extremófilos es el de los metalotolerantes, microorganismos capaces de tolerar y desintoxicar altos niveles de metales pesados disueltos (Margaryan et al., 2010). Los microorganismos utilizan metales como componentes estructurales de biomoléculas, como cofactores en reacciones reversibles de oxidación/reducción y en cadenas de transferencia de electrones durante la conservación de energía (Dopson et al., 2014). Sin embargo, los metales pueden volverse tóxicos si sus concentraciones intracelulares son demasiado altas. La mayoría de los microorganismos metalotolerantes tienden a ser acidófilos ya que las actividades fisiológicas de tales microorganismos permiten la tolerancia frente a concentraciones elevadas de metales (Dopson et al., 2014). Como muchos metales son más solubles a pH ácido, los acidófilos suelen estar expuestos a altas concentraciones de metales y pueden sobrevivir en cantidades 1000 veces más altas que los microorganismos neutrófilos (Dopson et al., 2003). La mayoría de los organismos reportados como metalotolerantes son microbios metalotolerantes que pertenecen a todos los grupos bacterianos, principalmente entre los microorganismos quimioheterótrofos aeróbicos y aeróbicos facultativos (Margaryan et al., 2010). Los suelos y aguas contaminadas con desechos industriales y urbanos no tratados y muestras del medio natural con una alta concentración de metales son hábitats importantes de microorganismos metalotolerantes. En general, poco se ha reportado acerca de extremófilos metalotolerantes del reino animal habitando aguas contaminadas con altas concentraciones de arsénico y valores de pH entre neutros y ligeramente alcalinos.

Se ha visto que estos organismos tienen diferentes mecanismos que apoyan su supervivencia en concentraciones de metales muy altas. Uno de estos son las membranas de los microorganismos metalotolerantes que están equipadas con varios canales que evitan la entrada de iones metálicos en el citoplasma. Un proceso denominado “sorción de metales” es común en microorganismos metalotolerantes donde los iones metálicos se unen a la membrana, pero no pueden ingresar a la célula. Además, los diferentes canales de transporte tienen reguladores, como el de captación férrica, que regula la entrada de iones de hierro en la célula. Otro mecanismo de adaptación es la mineralización, que es el proceso de conversión de

compuestos orgánicos en formas inorgánicas para que puedan excretarse fuera de la célula. El proceso es común en muchos metalotolerantes, que tienen diferentes enzimas que catalizan el proceso de mineralización (Margaryan et al., 2010). En estos organismos también se estudian otros procesos metabólicos que convierten formas tóxicas de metales en formas menos tóxicas a través de la oxidación y reducción enzimática. Algunos de los ejemplos comunes de especies metalotolerantes incluyen *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus caldus*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Acidiphilium rubrum*, *Acidiphilium multivorum*, etc. Muchos metalotolerantes son monitores biológicos de la contaminación ambiental (Chen et al., 2012; Jibaja et al., 2019; Margaryan et al., 2010; Wakao et al., 1994). En cuanto al arsénico y las bacterias se ha reportado que para hacer frente a la toxicidad del arsénico, se pueden encontrar genes de resistencia al arsénico en el genoma de casi todas las especies bacterianas secuenciadas hasta la fecha, y se sabe que las bacterias llevan a cabo la reducción organoarsénica, los arsenicales metilados y aromáticos reducidos son tóxicos, sin embargo tienen resistencia en el proceso, gracias al gen ArsH (Yang y Rosen, 2016).

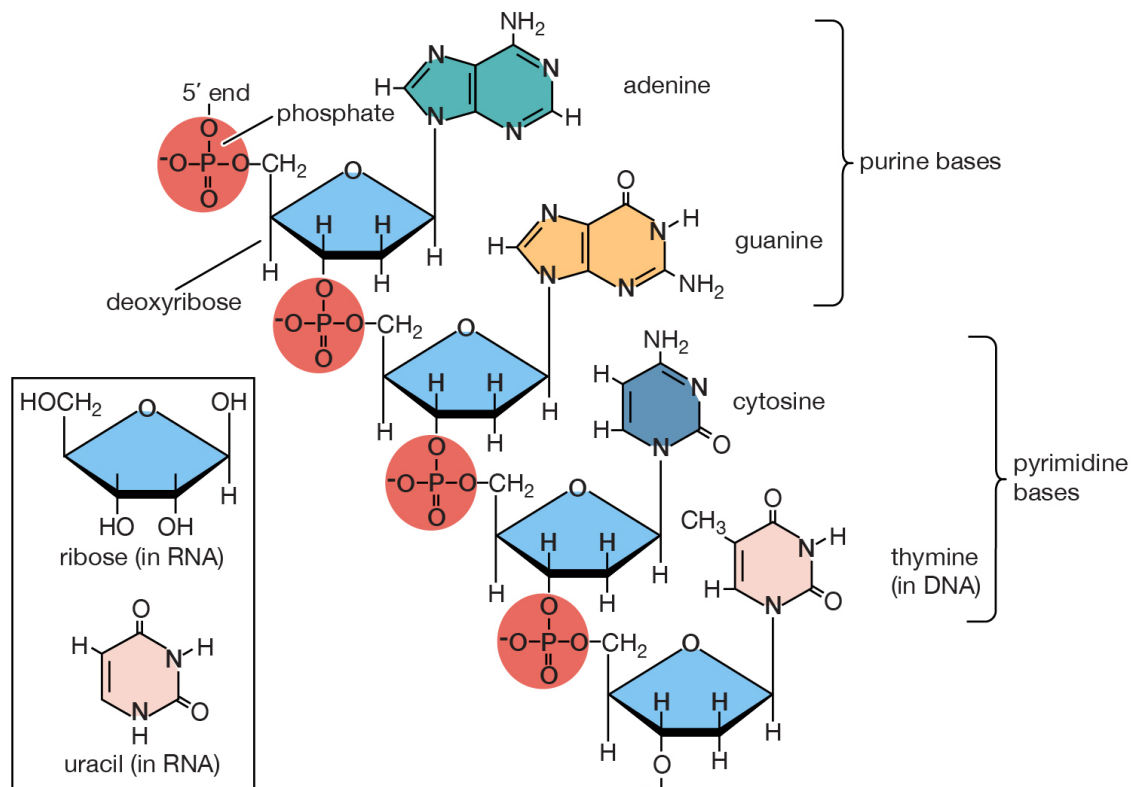
## 2.7. Genética

Para describir, conocer y clasificar a un organismo es importante entender el concepto de especie. La especie es el grupo de organismos que pueden reproducirse y producir descendencia fértil (CONABIO, 2021). Se puede definir morfológicamente a una especie como un grupo de individuos morfológica, fisiológica y bioquímicamente diferentes de otros grupos en ciertas características, definición mayormente utilizada por los taxónomos para identificar especies desconocidas y clasificar especies. Por otro lado, entre los biólogos evolutivos es común utilizar la definición biológica de especie, que la define como un grupo de individuos que potencialmente pueden reproducirse entre sí, pero no con individuos de otras especies, y se basa más en relaciones genéticas medibles que en rasgos físicos subjetivos (Primack, 2002). En el sistema de clasificación conocido como “sistema binominal”, se asigna a cada especie un par de nombres, el primero, la relación con otras especies, conocido como el nombre del género, y el segundo, el nombre único de la especie (CONABIO, 2021). Ver ejemplo de la Figura 13.



**Figura 13.** Infografía ejemplo de identificación de especies, “el lobo (*Canis lupus*) y el coyote (*Canis latrans*), comparten el nombre genérico *Canis* ya que son parientes cercanos, pero cada uno tiene su nombre específico único”. Tomada de CONABIO, 2021.

De esta manera son necesarias algunas ramas de la biología para el estudio de las especies, como lo son: la morfología, que estudia la forma y estructura de animales y plantas; la ecología, que trata las respuestas de los organismos a su entorno y por último, la genética, que estudia la constitución genómica y el comportamiento hereditario, entre otras (Perea-Dallos et al., 2007). En la actualidad, las innovadoras técnicas de análisis genéticos de ADN (ácido desoxirribonucleico) (Figura 14) permiten conocer la identidad y la relación de parentesco entre las especies, esta molécula se encuentra en el núcleo de las células y en menor medida en las mitocondrias.



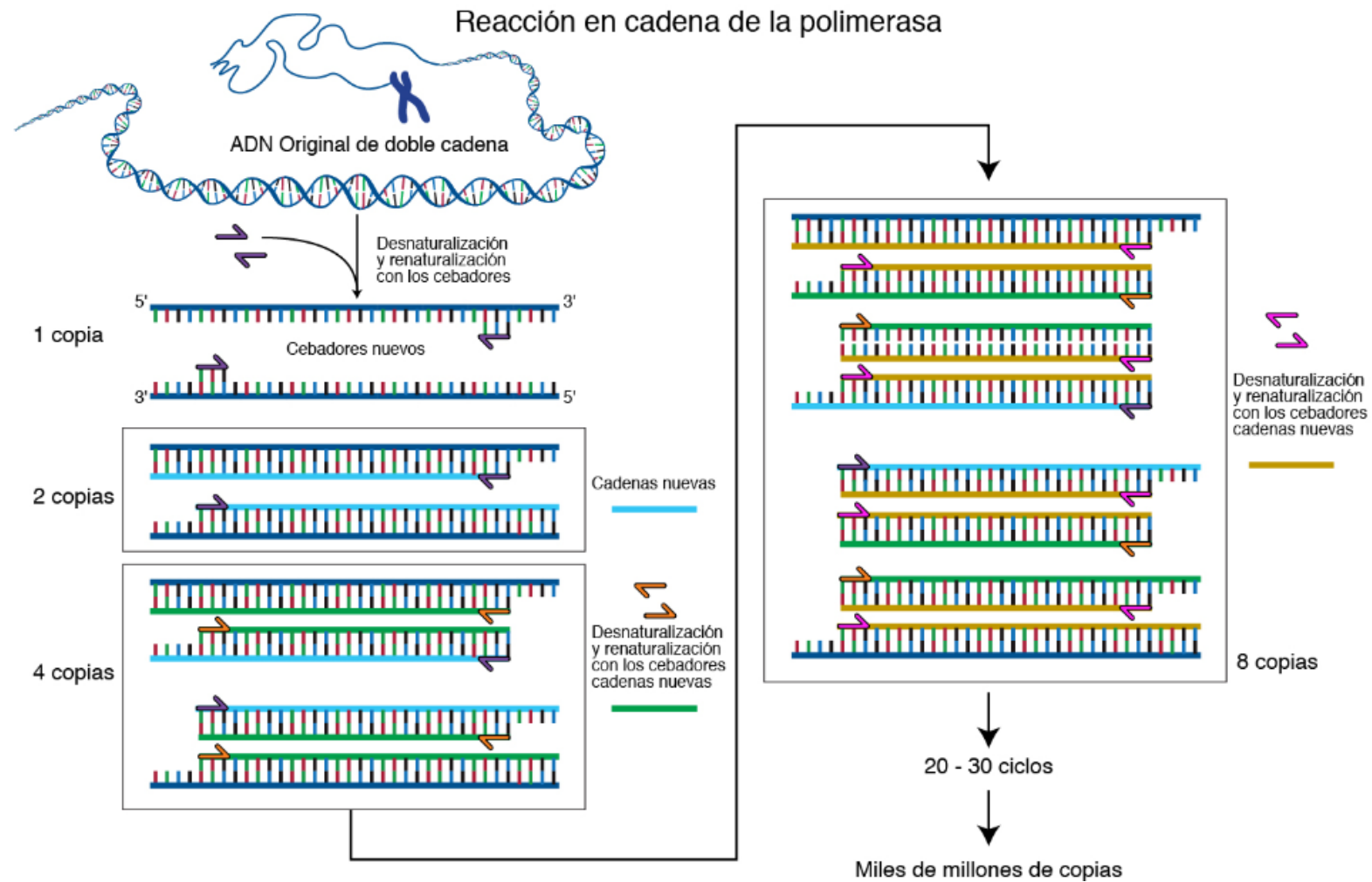
**Figura 14.** Estructura del ADN. Tomada de Britannica, 2020.

El gen es la unidad básica de la herencia. Los genes se transmiten de los padres a la descendencia y contienen la información necesaria para precisar sus rasgos, estos fragmentos de ADN constituyen una parte esencial de los cromosomas (Collins, 2021). Se ha utilizado al gen mitocondrial citocromo oxidasa I (COI) para identificar especies animales debido a su alto nivel de diversidad, por lo tanto, ha sido útil para estudiar a las especies estrechamente relacionadas o incluso para estudiar agrupaciones filogeográficas dentro de las especies (Hebert et al., 2003; Luo et al., 2011). Las técnicas en las que se apoya la biología molecular para estudiar al ADN son: la extracción, la amplificación por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la secuenciación del ADN.

La aplicación de estas técnicas moleculares inicia con la extracción del ADN, que es un método para purificar el ADN mediante el uso de métodos físicos y/o químicos de una muestra, separando el ADN de las proteínas, membranas y otros componentes celulares (Gupta, 2019). Entre los métodos para realizar esta extracción, se encuentran los que se basan en la hidrólisis con proteinasa K, la cual digiere proteínas, remueve contaminación de los ácidos nucleicos e inactiva

nucleasas que degradan el ADN o el ARN (ácido ribonucleico) durante la extracción (González et al., 2011), el procedimiento puede llevarse a cabo con la ayuda de kits comerciales (Dundas et al., 2008; Guinn, 1966).

Una vez que el ADN es extraído se puede llevar a cabo la técnica de PCR (Figura 15). En esta técnica se sintetiza muchas veces un fragmento de ADN utilizando una polimerasa que puede trabajar a temperaturas muy elevadas, ya que proviene de la bacteria *Thermus aquaticus* que vive a altas temperaturas (79°C a 85°C). En un tubo se mezclan todos los reactivos: la polimerasa, el ADN del organismo que queremos estudiar, los oligonucleótidos necesarios para que se inicie la transcripción (primers, iniciadores, cebadores, “oligos”, etc.), dinucleótidos (dNTPs), y las condiciones para que la enzima trabaje adecuadamente (pH, MgCl<sub>2</sub>, KCl u otros reactivos) (Espinosa-Asuar, 2007). La PCR simula lo que sucede en una célula cuando se sintetiza el ADN.



**Figura 15.** Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta reacción permite que unos pocos fragmentos de ADN se repliquen en millones o miles de millones de copias. La amplificación del ADN nos permite estudiar la molécula del ADN en detalle en el laboratorio. Tomada de Biesecker, 2021.

Las condiciones de la PCR dependen de lo reportado para el oligonucleótido utilizado, las condiciones estándar son las presentadas en la Tabla 2, y dependiendo de los resultados se pueden modificar.

**Tabla 2.** Condiciones estándar para una PCR (cálculos para 50  $\mu$ l por tubo). Tomada de Espinosa-Asuar, 2007.

	Concentración inicial	Concentración final en la reacción	Cantidad para un tubo	Cantidad para 10 tubos
dNTPs	10 mM (todos)	200 $\mu$ M varía de acuerdo al magnesio	1 $\mu$ l	10 $\mu$ l
Magnesio	25 mM	1.5 mM puede probarse de 1 a 4mM	3 $\mu$ l	30 $\mu$ l
Oligo forward	10 $\mu$ M	1 $\mu$ M puede probarse de 0.1 a 1 $\mu$ M	5 $\mu$ l	50 $\mu$ l
Oligo reverse	10 $\mu$ M	1 $\mu$ M puede probarse de 0.1 a 1 $\mu$ M	5 $\mu$ l	50 $\mu$ l
Enzima	5 U/ $\mu$ l	1 U	0.2 $\mu$ l	2 $\mu$ l
Buffer	10x	1x	5 $\mu$ l	50 $\mu$ l
Agua	--	--	29.8 $\mu$ l	298 $\mu$ l
ADN (agregar después de dividir el mix)	0.1 mg/ml	0.1 mg genómico (máximo 500 ng; de bacteria de 1 a 10 ng y si es plásmido de 0.1 a 1 ng)	11 $\mu$ l	---

Para el caso de las temperaturas y los ciclos se recomienda buscar reportes acerca del organismo o fragmento de ADN a amplificar. Sin embargo, las condiciones estándar, reportadas por (Espinosa-Asuar, 2007) se presentan a continuación :

- Desnaturalización inicial: 95°C por 5 a 10 min;
- 30 ciclos con desnaturalización a 95°C por 30 s, alineamiento a 50°C por 30 s y extensión a 72°C por tiempo variable;
- Extensión final a 72°C por 10 min (aunque no es estrictamente necesario este último paso, es sólo para asegurar que los fragmentos incompletos se terminen de sintetizar);
- Al final se programa la máquina para que conserve los tubos a 4°C.



Para comprobar y visualizar el fragmento de ADN amplificado por la técnica de PCR, se utiliza la electroforesis en gel. La electroforesis en gel es una técnica utilizada para separar fragmentos de ADN por su tamaño y carga y consiste en aplicar una corriente a través de un gel que contiene las moléculas de interés. Con base en su tamaño y carga, las moléculas se desplazan por el gel en diferentes direcciones o a distintas velocidades, con lo que se separan unas de otras (Reddy y Raju, 2012). Finalmente se pueden observar las bandas del ADN en el gel con ayuda de un transiluminador de luz UV y una vez obtenidos los fragmentos amplificados de ADN, llevar a cabo la secuenciación de este, que es una tecnología que permite conocer y descifrar el código genético del ser vivo de interés.

Para el caso de la identificación de especies de copépodos se ha reportado la extracción del gen citocromo oxidasa I (COI) por medio de materiales quelantes directamente sobre el tejido (p. ej. chelex) o el uso de kits comerciales para extracción de ADN en sangre y tejido, siguiendo los protocolos de fabricante, con ligeras modificaciones (como extender el tiempo de lisis) y utilizando los iniciadores LCO1490 y HCO2198 en combinación con Cop-COI-2189 (Folmer et al., 1994; Laakmann et al., 2013). En el Anexo 1 se presentan las condiciones reportadas para amplificación de ADN, producto de una búsqueda sistemática de información realizada para este estudio.

## 3. Materiales y métodos

### 3.1. Sitio de estudio

El sitio de estudio denominado “Club de Tiro” se encuentra en la parte norte del estado de San Luis Potosí, en el municipio de Matehuala. La geología local superficial consiste en una compleja transición geológica aluvial-yeso que exhibe características de paleocanal y karst (Gómez-Hernández et al., 2020). Es una excavación que cubre un área de 50 m<sup>2</sup>, tiene bordes difusos, sirve como un vertedero privado de basura y se encuentra al costado de una pequeña granja de subsistencia. Dicha excavación tiene una profundidad de casi 2 m, mientras que el tirante de agua es de 30 cm, aproximadamente (Figura 16). Estudios previos en el lugar de muestreo mostraron concentraciones extremadamente altas de arsénico en el agua (hasta 158 mg/L) (Martínez-Villegas et al., 2013; Pelallo-Martínez, 2006; Razo et al., 2004), debido a la disolución de desechos metalúrgicos de una fundición inactiva ubicada 200 m al norte del punto de muestreo (Martínez-Villegas et al., 2013). Además, Mendoza-Chávez, (2016), reportó la presencia de organismos de zooplancton en la zona de estudio, lo que sugiere que el zooplancton que habita este cuerpo de agua podría ser una especie metalotolerante que acumula arsénico. Para este estudio se midieron parámetros fisicoquímicos del agua y se recolectaron muestras de agua, sedimento y zooplancton.



**Figura 16.** Sitio de muestreo ubicado en Matehuala, San Luis Potosí, México. El punto de muestreo es una excavación de 2 m de profundidad y 50 m<sup>2</sup> de ancho (14N: 332784, 2617530).

### 3.2. Parámetros fisicoquímicos, cationes, aniones y arsénico

La temperatura ambiente, la temperatura del agua, el pH, la conductividad eléctrica (CE), el total de sólidos disueltos (TDS), el potencial de oxidación-reducción (ORP) y el oxígeno disuelto (OD) se midieron *in situ* utilizando una sonda multiparamétrica (HANNA Instruments, Modelo 9829). Además, la alcalinidad se determinó mediante titulación utilizando un kit de titulación automática de la marca HACH modelo AL-DT.

En el sitio de muestreo se recolectaron muestras de agua para determinar arsénico, así como los principales cationes y aniones, a lo largo de 8 campañas de muestreo realizadas durante los meses y años siguientes: abril 2015, marzo 2016, agosto 2017, octubre 2017, diciembre 2017, febrero 2018, mayo 2018 y agosto 2018. Las muestras de agua se recolectaron en botes de polipropileno de 60 ml previamente

lavados y enjuagados con agua desionizada. Los frascos para determinaciones de arsénico y cationes se lavaron con Extran® al 2% y solución de HNO<sub>3</sub> al 10%, mientras que los frascos para determinaciones de aniones se lavaron solo con Extran® al 2%. Todas las muestras de agua se pasaron a través de filtros de 0.45 µm, se acidificaron a pH <2 usando HNO<sub>3</sub> concentrado (solo para cationes y arsénico) y se almacenaron a 4 °C hasta su análisis (Figura 17). Para el control y aseguramiento de la calidad, se recolectaron un blanco de laboratorio, un blanco de campo y un duplicado en cada campaña de muestreo.

El arsénico y los cationes principales (calcio, magnesio, sodio y potasio) se determinaron en las instalaciones del Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA) del IPICYT, mediante espectroscopía de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES), utilizando un espectrómetro Varian 730 ES (EPA, 1994). Debido a la salinidad relativamente alta, derivada del entorno geológico gípsico y kárstico, las muestras se diluyeron (1:5) para el análisis ICP-OES. Para dichos análisis se llevaron a cabo calibraciones con muestras de referencia y blancos, así como replicados para control de calidad para asegurar la confiabilidad de los datos analíticos. La curva de calibración estuvo en el rango de 0.05 a 20 mg/L, mientras que el límite de detección fue de 0.001 mg/L.

Los aniones (sulfato, cloruro, nitrato y fluoruro) se determinaron en las instalaciones del Laboratorio de Geoquímica Ambiental del Centro de Geociencias (UNAM), mediante cromatografía líquida de alto rendimiento/cromatografía iónica (HPLC-IC), utilizando un Thermo-Dionex 1100 con supresor ASRS-Ultra 300 de 4 mm, columna IonPac AS14A y detector electroquímico ED50 (EPA, 1997). Se realizaron calibraciones con muestras de referencia, blancos y replicados para control de calidad para asegurar la confiabilidad de los datos analíticos. Los coeficientes de correlación en las curvas analíticas fueron superiores a 0.9993, mientras que los porcentajes de recuperación fueron superiores al 90%.



**Figura 17.** Proceso de recolección y preparación de muestras de agua hasta llegar al laboratorio.

### 3.3. Clasificación del agua

Para la construcción de los diagramas hidrogeoquímicos, se utilizó el software libre Diagrammes versión 6.73, distribuido por Laboratoire d'Hydrogéologie d'Avignon, alimentando dicho programa con los resultados obtenidos para las determinaciones de cationes y aniones en las muestras de agua analizadas para todas las campañas de muestreo. Adicionalmente se realizó una interpretación de los diagramas obtenidos con ayuda de literatura especializada en clasificación y tipo de agua (Custodio y Llamas, 1996).

### 3.4. Estructura de la población de zooplancton

Las muestras de zooplancton se recolectaron tomando y filtrando diferentes volúmenes de agua (de 12 a 100 L) en cada campaña de muestreo. El muestreo se realizó en función de la disponibilidad de agua, asegurando el menor impacto posible en el ecosistema, teniendo en cuenta el pequeño tamaño y la poca profundidad del cuerpo de agua. Después de la recolección, todas las muestras se filtraron inmediatamente a través de una red de 45 µm para zooplancton (Figura 18). Para el control y aseguramiento de la calidad, se pretendía recolectar un duplicado en cada campaña de muestreo. Sin embargo, debido a la baja disponibilidad de agua, solo se pudieron recolectar 5 de 8 muestras duplicadas. Después de la recolección, los organismos se fijaron en alcohol etílico al 99% en tubos Eppendorf de 15 ml y se mantuvieron a 4 °C hasta el aislamiento, limpieza, recuento y medición utilizando un microscopio estereoscópico Nikon SMZ 800N. Luego, se seleccionaron un total de 180 organismos para el análisis de bioacumulación de arsénico. Se recogió una

muestra adicional de zooplancton para fijar organismos en agua desionizada y realizar el análisis de distribución de arsénico.



**Figura 18.** Proceso de colecta de zooplancton y preparación previa a los análisis.

La abundancia de zooplancton se determinó cuantitativamente contando individuos adultos, copepoditos y nauplios utilizando un microscopio óptico Olympus CX21. Los conteos se normalizaron al volumen de agua filtrada en el campo para informar la abundancia en individuos por litro (ind/L). Se midió la distancia longitudinal del zooplancton para los organismos usando un microscopio estereoscópico Nikon SMZ 800N.

Adicionalmente, se llevaron a cabo observaciones de zooplancton en 10 organismos secados a temperatura ambiente y montados en un pin de aluminio. Para ello se utilizó Microscopía Electrónica de Barrido (JEOL-SM-6010, ubicado en El Colegio de la Frontera Sur y FEI Quanta 200 ubicado en el Laboratorio Nacional de Investigaciones en Nanociencias y Nanotecnología) y las imágenes obtenidas se compararon con literatura especializada sobre claves morfológicas de la Subclase Copépoda, Orden Cyclopoida (Karaytuğ y Boxshall, 1998, 1999; Mercado-Salas y Suárez-Morales, 2009; Suárez-Morales, 1996).

### 3.5. Bioacumulación y distribución de arsénico en organismos de zooplancton

Se determinó la bioacumulación de arsénico en organismos fijados en alcohol etílico al 99% como se muestra en la figura 19. Para esta determinación, se digirieron 5 réplicas de 30 organismos cada una a temperatura ambiente usando 500 µL de

HNO<sub>3</sub> en tubos Eppendorf de 3 mL, previo enjuague de las muestras con agua desionizada tres veces. El arsénico se determinó en el producto de las digestiones mediante Espectroscopía de Absorción Atómica en Horno de Grafito (GFAAS) utilizando un modelo Varian AA2042, ubicado en el Laboratorio de Análisis Instrumental de la División de Ciencias Ambientales (IPICYT), con un límite de detección de 0.24 µg/L y un límite práctico de cuantificación de 2.80 µg/L, (Alvarado-Flores et al., 2019; DOF, 1994; Rubio-Franchini et al., 2015). Para determinar el peso seco del zooplancton adulto, 5 réplicas de 30 organismos cada una se llevaron a peso constante en 5 microtubos Eppendorf a 60 °C en el horno y se pesaron. El peso promedio por organismo fue de 7.77±1.9 µg. Este peso fue utilizado para determinar la concentración de arsénico por kilogramo de zooplancton.



**Figura 19.** Procedimiento para la determinación de bioacumulación de arsénico en los organismos (Caumette et al., 2011; Rubio-Franchini et al., 2015).

Por otro lado, para corroborar la presencia de arsénico en los organismos estudiados se realizaron análisis elemental de los organismos utilizando un espectrofotómetro de fluorescencia de rayos X Bruker S2 PICOFOX ubicado en la Facultad de Ciencias Químicas (UACH) y la técnica de fluorescencia total de rayos x (TXRF). Para ello, el disco de zafiro utilizado en el proceso de deposición elemental se configuró utilizando el protocolo descrito en el manual del equipo. Así, los discos de zafiro se sumergieron en una solución de HNO<sub>3</sub> al 10% (Sigma-Aldrich), a 40 °C

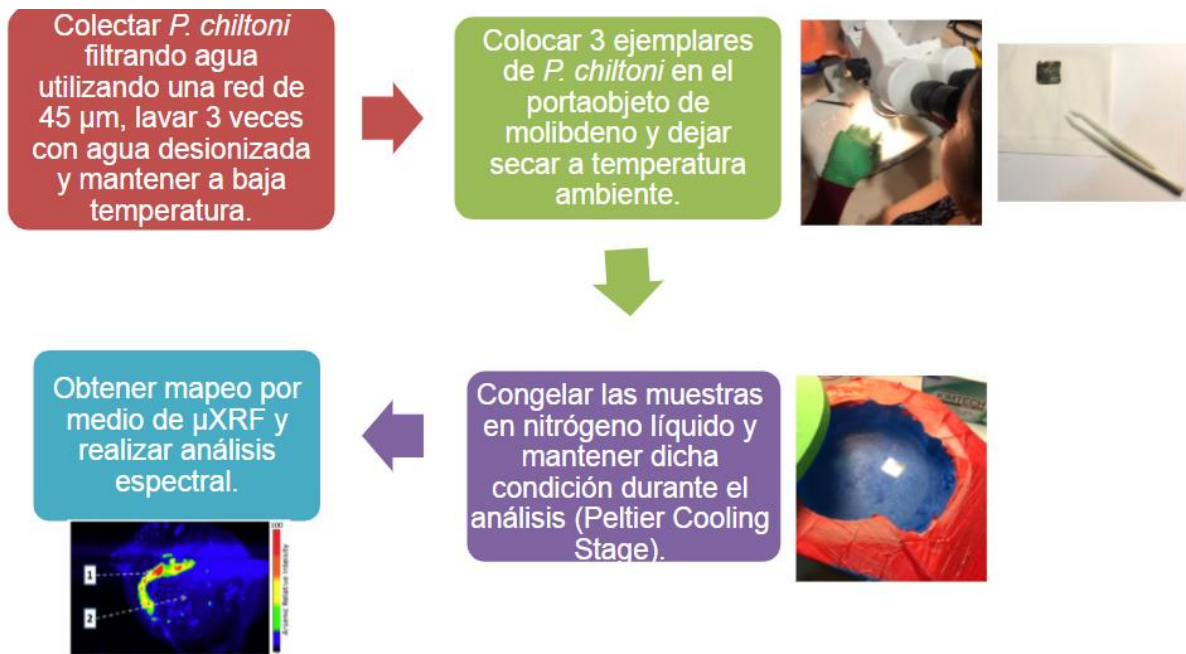
durante 30 min. Posteriormente, estos se lavaron con agua destilada y acetona (Sigma-Aldrich), para ser secados con aire fresco. En dicho instrumento, 15 organismos liofilizados a 19 °C, 6 Pa, -65°C fueron analizados directamente (Figura 20).



**Figura 20.** Procedimiento para determinación de presencia de arsénico por medio de fluorescencia total de rayos x (Woelfl et al., 2004).

Para determinar la distribución de arsénico en *Paracyclops chiltoni* se realizaron análisis de fluorescencia de rayos X ( $\mu$ -XRF) en la línea de luz 10.3.2 micro X-Ray Fluorescence Microprobe (XFM) en las instalaciones del Advanced Light Source en el Lawrence Berkeley National Laboratory. Para dicho efecto, tres organismos fueron colocados en un portaobjetos de molibdeno utilizando un estereomicroscopio. Los organismos se dejaron secar en el portaobjetos a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se congelaron con nitrógeno líquido (Figura 21). A continuación, las muestras se analizaron al vacío utilizando una etapa de enfriamiento Peltier (-22 °C) para mantener las condiciones criogénicas durante el análisis. Los mapas elementales se recolectaron a 11 966.7 eV, utilizando un tamaño de punto de haz de 7x7 µm, 4x4 µm píxeles y un tiempo de permanencia de 100 ms. Se realizó un mapeo de  $\mu$ XRF bidimensional usando el software LabVIEW y, posteriormente, los mapas fueron descontaminados y corregidos. El software LabVIEW se distribuye libremente y está disponible en el sitio web de ALS: <https://sites.google.com/lbl.gov/lbnl-als-1032/software-download>.





**Figura 21.** Procedimiento llevado a cabo en el Lawrence Berkeley National Laboratory para determinar la distribución de arsénico en *Paracyclops chiltoni*.

### 3.6. Arsénico en sedimentos

Adicionalmente, para determinar la concentración de arsénico en el sedimento, se recolectaron muestras de sedimentos en el sitio, en la campaña de muestreo de agosto 2017, para lo cual se recolectó aproximadamente 1 kg de sedimento del fondo del cuerpo de agua, utilizando una pala de polipropileno y eliminando manualmente impurezas como rocas y vegetación. Estas muestras se mantuvieron en bolsas metálicas a baja temperatura (4 °C) durante el transporte para su conservación. Las muestras de sedimento se secaron en horno a 60 °C durante 24 h, posteriormente se pesaron 0.25 g de muestra homogénea por triplicado, se agregaron 4 ml de HNO<sub>3</sub> concentrado al 65% y se dejó reposar una noche a temperatura ambiente. La muestra se agitó gentilmente y se digirió en microondas (MARS) con el programa BASIC OPEN con una rampa de 5 min hasta 55 °C y se mantuvo así durante 10 min para diluirla en 50 ml de una solución de HNO<sub>3</sub> al 1%. Se centrifugó durante 5 min a 2500 rpm. La concentración de arsénico en el sobrenadante se determinó utilizando un plasma de acoplamiento inductivo con un espectrofotómetro de masas (ICP-MS) ubicado en el Institute of Geography, University of Bern (Hossain et al., 2012; Mestrot et al., 2011).

### 3.6.1. Especiación de arsénico en agua y sedimentos

Para conocer la especiación del arsénico en las matrices de agua y de sedimento, se llevaron a cabo tanto modelaciones hidrogeoquímicas como análisis experimentales.

La primera estimación de la especiación del arsénico en el agua del Club de Tiro fue la construcción de un diagrama de especiación, para lo cual se tomaron los valores obtenidos de ORP y pH medidos *in situ* de todos los muestreos y las especies de arsénico reportadas para aguas naturales en diversas condiciones de estos parámetros. Posteriormente, para estimar la distribución de especies de arsénico en la fase acuosa con una mayor cantidad de variables, se utilizó el software libre PHREEQC versión 3, del U.S. Geological Survey (USGS), en el cual se ingresó un código de entrada con los datos de la composición química del agua analizados en el laboratorio, así como parámetros fisicoquímicos medidos en campo (Anexo 2). Y, finalmente, se llevó a cabo un análisis experimental de especiación de arsénico en el agua del Club de Tiro, se realizó por triplicado, únicamente para la campaña de muestreo: agosto 17. Las muestras de agua se recolectaron en botes de polipropileno de 60 mL previamente lavados con Extran® al 2% y solución de HNO<sub>3</sub> al 10% y enjuagados con agua desionizada, las muestras de agua se filtraron a través de filtros de 0.45 µm, se acidificaron a pH <2 usando HNO<sub>3</sub> (1%) y se almacenaron a 4 °C hasta su análisis. La especiación de arsénico en agua se determinó mediante cromatografía líquida de alto rendimiento de intercambio aniónico acoplada a plasma con espectrometría de masas (HPLC-ICP-MS) ubicado en el Institute of Geography, University of Bern (Hossain et al., 2012; Mestrot et al., 2011). Los resultados obtenidos tanto en las estimaciones hidrogeoquímicas como en los análisis de laboratorio, fueron comparados.

En el caso de los sedimentos del Club de Tiro, los análisis experimentales de especiación también fueron realizados únicamente para el muestreo de agosto 17. Las muestras de sedimento se secaron en horno a 60 °C durante 24 h, se trituraron con un mortero de ágata, se pesaron 0.25 g de muestra homogénea por duplicado, se agregaron 4.8 ml de HNO<sub>3</sub> al 1%, posteriormente se realizó una digestión en microondas (MARS) usando el programa BASIC OPEN, con una rampa de 5 min

hasta 55 °C y manteniendo esta temperatura durante 10 min. El sobrenadante se centrifugó durante 5 minutos a 2500 rpm. La especiación de arsénico en sedimentos se determinó mediante cromatografía líquida de alto rendimiento de intercambio aniónico acoplada a plasma con espectrometría de masas (HPLC-ICP-MS) ubicado en el Institute of Geography, University of Bern (Hossain et al., 2012; Mestrot et al., 2011). Además, para estimar los índices de saturación se utilizó el mismo código de entrada descrito en el párrafo anterior (Anexo 2), en el software libre PHREEQC versión 3, del U.S. Geological Survey (USGS). Los resultados obtenidos tanto en los análisis de laboratorio como en la modelación hidrogeoquímica fueron comparados entre sí y con la información reportada de la geología del sitio.

### 3.7. Genética

#### 3.7.1. Extracción del ADN

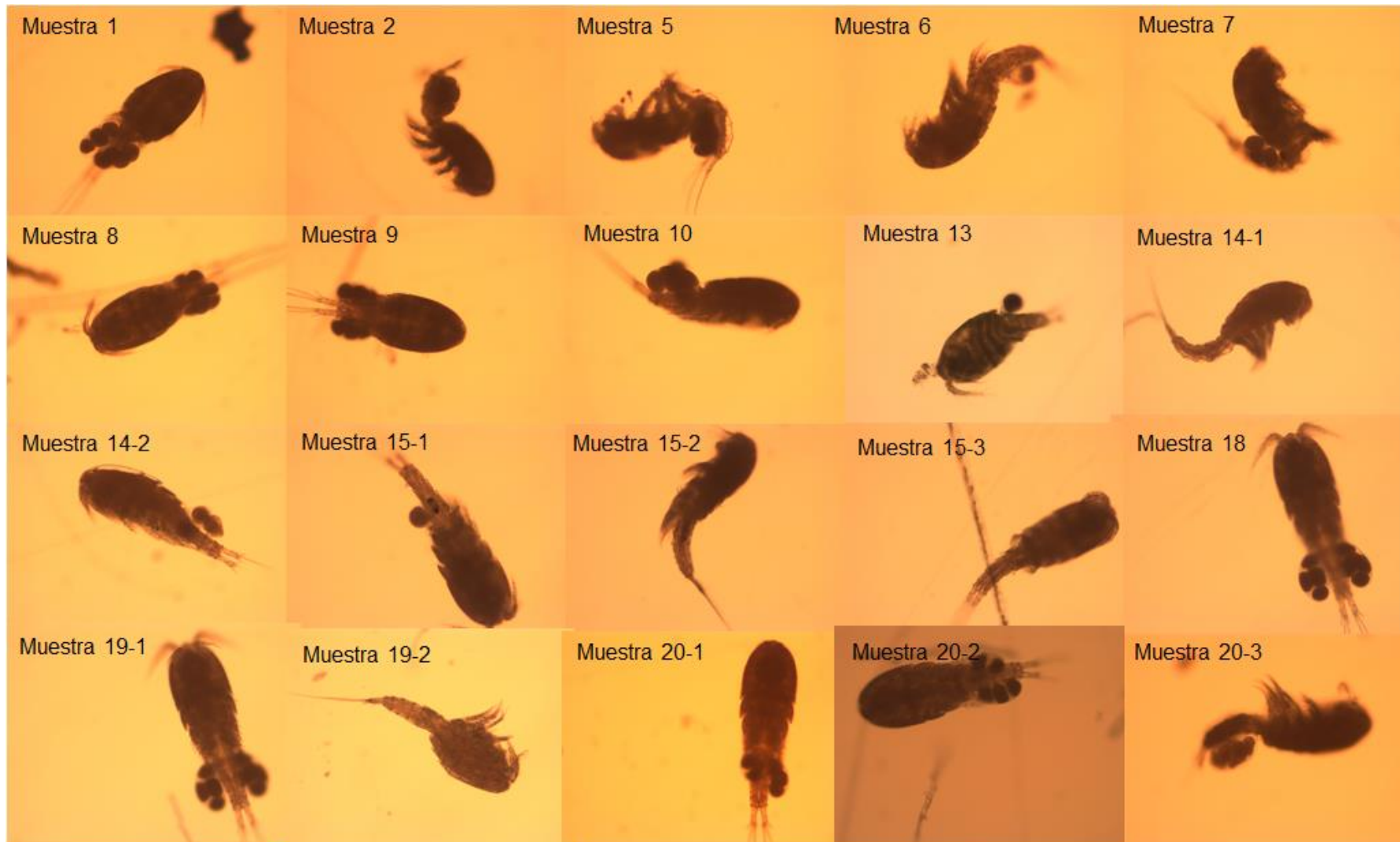
De las muestras de zooplancton recolectadas en las diversas campañas de muestreo, se recuperaron algunos de los organismos fijados en alcohol para realizar análisis genéticos. Se llevó a cabo la extracción de ADN de 20 muestras (Tabla 3), incluyendo copépodos individuales, grupos de 2 o 3 individuos de copépodos, así como 25 mg de organismos de la familia de crustáceos de fácil acceso como lo eran los camarones, para usarse como control positivo.

**Tabla 3.** Muestras utilizadas en los análisis genéticos, incluyen copépodos (*Paracyclops chiltoni*) colectados en el sitio de muestreo (Club de Tiro) y crustáceos de fácil acceso, camarón (Caridea).

No. de muestra	Tipo de muestra
1	1 copépodo (~7.77 µg)
2	1 copépodo (~7.77 µg)
3	camarón (25 mg)
4	camarón (25 mg)
5	1 copépodo (~7.77 µg)
6	1 copépodo (~7.77 µg)

7	1 copépodo (~7.77 µg)
8	1 copépodo (~7.77 µg)
9	1 copépodo (~7.77 µg)
10	1 copépodo (~7.77 µg)
11	camarón (25 mg)
12	camarón (25 mg)
13	1 copépodo (~7.77 µg)
14	2 copépodos (~15.5 µg)
15	3 copépodos (~23.3 µg)
16	camarón (25 mg)
17	camarón (25 mg)
18	1 copépodo (~7.77 µg)
19	2 copépodos (~15.5 µg)
20	3 copépodos (~23.3 µg)

Los copépodos fueron fotografiados previo a su análisis (Figura 22).



**Figura 22.** Fotografías de copépodos previo a las extracciones de ADN. Fueron obtenidas por medio de microscopía óptica y el software Leica Application Suite.

La extracción de ADN se realizó utilizando el kit comercial DNEasy Blood and Tissue (QIAGEN Inc.), siguiendo el procedimiento del Anexo 3. Una vez extraído, el ADN de las muestras 11 a la 20 fue cuantificado por medio del Nanodrop 2000 Thermo scientific. Se realizó la concentración y purificación usando el kit comercial DNA Clean and Concentrator (Zymo Research Inc.) siguiendo el protocolo del Anexo 4. Una vez extraído y cuantificado el ADN de las muestras, se procedió a realizar la amplificación de estos fragmentos de ADN, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa.

### 3.7.2. Reacción en cadena de la polimerasa.

Una vez obtenido el ADN tanto de muestras purificadas y concentradas, como de las que no tuvieron ese tratamiento, se llevó a cabo la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para las 20 muestras y un total de 13 distintas condiciones de PCR utilizando un termociclador Applied Biosystems™ Veriti™. Las condiciones de amplificación fueron las descritas para el gen COI de copépodos, microcrustáceos y organismos similares por Folmer et al., 1994 y Mercado-Salas et al., 2018 (Anexo 5).

Para comprobar si la amplificación se llevó a cabo de manera correcta, se utilizó la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (ver protocolo en el Anexo 6).

## 3.8. Análisis de datos

### 3.8.1. Análisis de componentes principales (PCA)

Primeramente, se llevaron a cabo pruebas de normalidad a los datos utilizando el método Shapiro-Wilk. Posteriormente, las relaciones entre los parámetros abióticos y bióticos se determinaron mediante el análisis de componentes principales (PCA) con datos fisicoquímicos (temperatura ambiente, temperatura de la muestra, pH, CE, TDS, ORP, OD, cationes, aniones y As) y de la estructura de la población (abundancia y longitud del zooplancton) utilizando el software Origin (Pro), versión 2016, (OriginLab Co.), cabe mencionar que no se llevó a cabo ningún pretratamiento de datos.

## 4. Resultados

### 4.1. Parámetros fisicoquímicos.

La Tabla 4 muestra los resultados de los parámetros fisicoquímicos medidos en el sitio de estudio (Club de Tiro), consta de 6 muestreos realizados entre los años 2017 y 2018, así como 2 muestreos adicionales reportados en el 2016 por Mendoza-Chávez, con el fin de ampliar el estudio del comportamiento de este sistema acuático.

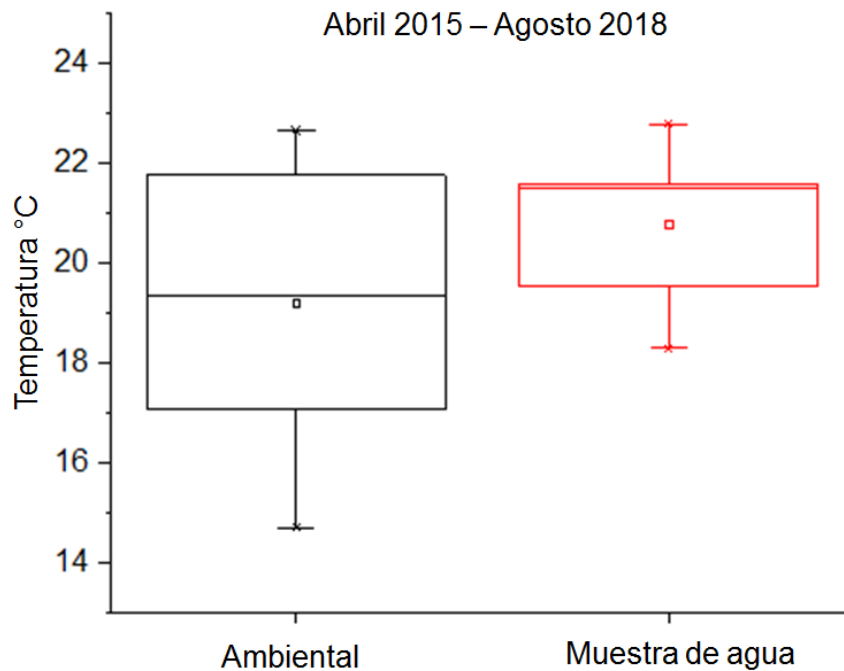
**Tabla 4.** Parámetros fisicoquímicos medidos en campo.

	Tambiente (°C)	Tmuestra (°C)	pH	CE (mS/cm)	SDT (g/L)	ORP (mV)	OD (mg/L)
<b>Abril15*</b>	20.33	22.50	6.70	2.76	1.86	295.24	1.26
<b>Marzo16*</b>	18.40	21.50	6.77	3.21	1.10	158.00	0.60
<b>Agosto17</b>	22.12	22.75	6.85	3.40	1.70	249.65	3.90
<b>Octubre17</b>	15.83	18.30	6.98	3.39	1.71	223.00	4.20
<b>Diciembre17</b>	14.71	18.60	7.16	3.28	1.64	384.80	2.58
<b>Febrero18</b>	18.33	20.48	7.05	3.39	1.69	356.00	4.33
<b>Mayo18</b>	22.66	21.50	7.12	6.61	3.30	400.00	2.24
<b>Agosto18</b>	21.40	21.50	6.64	2.74	1.46	484.20	4.54
<b>Prom.</b>	19.22	20.89	6.91	3.59	1.80	322.24	2.95
<b>DE</b>	2.91	1.65	0.19	1.24	0.69	115.00	1.51
<b>Min.</b>	14.71	18.30	6.64	2.74	1.10	158.00	0.60
<b>Max.</b>	22.66	22.75	7.16	6.61	3.30	484.20	4.54

Prom. = Promedio, DE = Desviación estándar, Min. = Mínimo, Max. = Máximo.

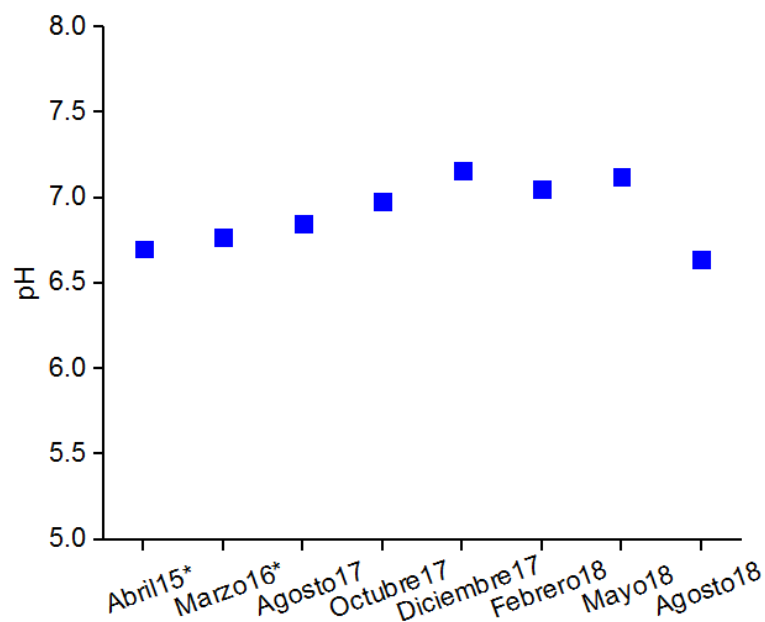
\* Tomados de Mendoza-Chávez, 2016.

En el área de estudio, la temperatura ambiente varió entre 14.71 °C y 22.66 °C durante el período de muestreo. La temperatura del agua varió entre 18.30 °C y 22.75 °C. Adicionalmente, no se encontró diferencia significativa entre las temperaturas del ambiente y la temperatura del agua del Club de Tiro (Figura 23). Se ha reportado que temperaturas de entre 13.5 °C y 32 °C en aguas dulces son adecuadas para el desarrollo de los organismos planctónicos (Gaikwad et al., 2008; Kamat, 2000), por lo que podemos considerar que el sitio de estudio tiene valores de temperatura adecuados para el desarrollo de dichos organismos.



**Figura 23.** Diagrama de cajas que muestran el primer cuartil, la mediana o el segundo cuartil, el tercer cuartil y el rango intercuartílico, así como los bigotes, que determinan el límite para la detección de valores atípicos para temperatura ambiente y temperatura del agua en °C, para datos recolectados en las 8 campañas de muestreo.

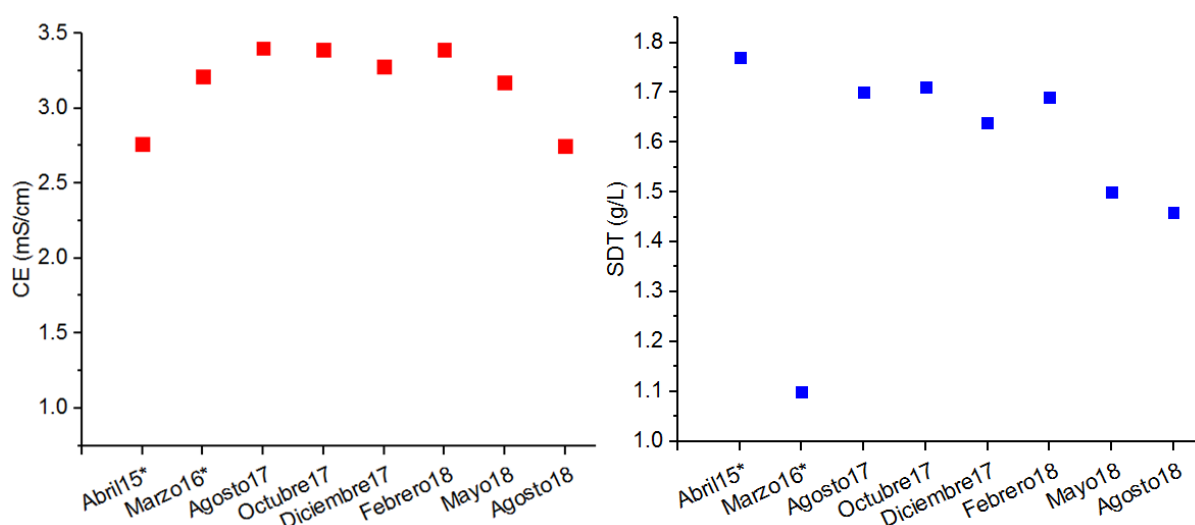
Como se muestra en la Figura 24, los valores del pH variaron entre 6.64 y 7.16. Generalmente, en ecosistemas de agua dulce el valor de pH varía entre 6 y 9 (Quiroz-Martínez et al., 2006). Según Kurbatova, (2005) y Tanner et al., (2005), el rango de pH entre 6.0 y 8.5 indica una productividad media de un reservorio.



**Figura 24.** Valores de pH medidos en campo. \* Tomados de Mendoza-Chávez, 2016.



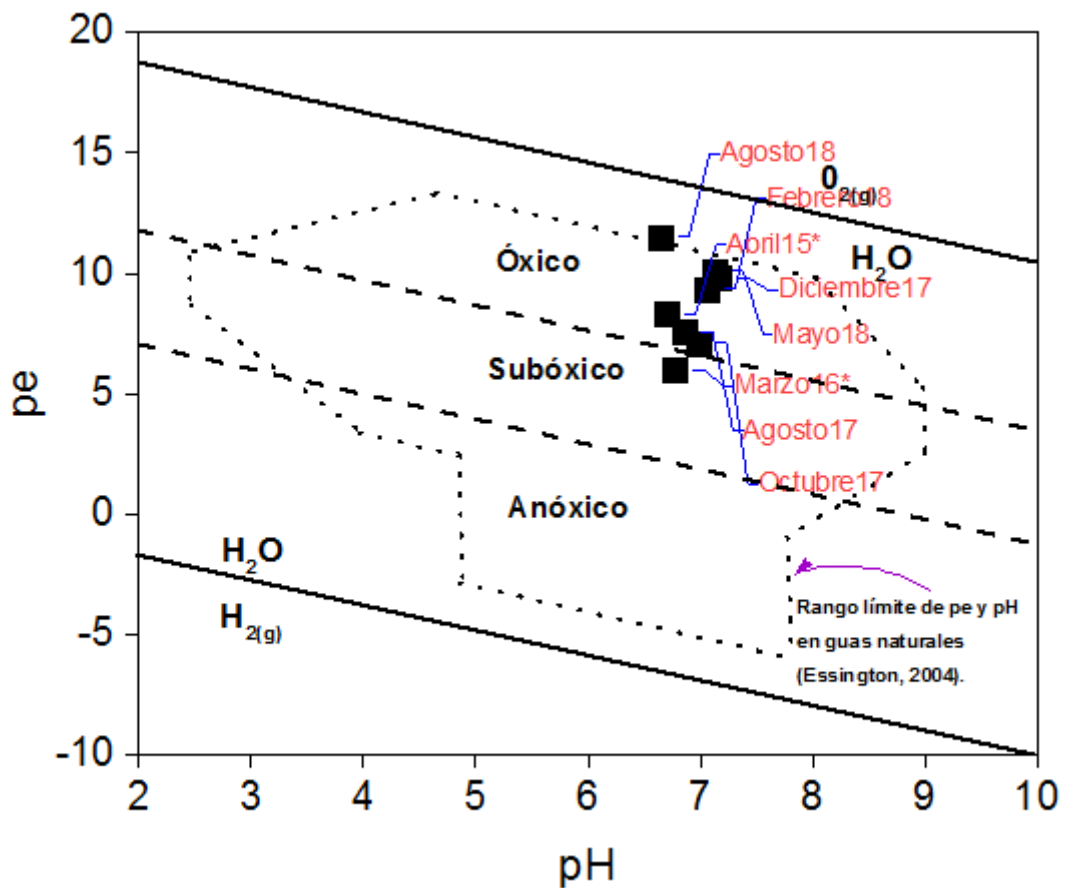
En el caso de la conductividad eléctrica los valores estuvieron entre 2.74 y 6.61 mS/cm, mientras que los sólidos disueltos totales variaron entre 1.10 g/L y 3.30 g/L (Figura 25). Tanto los valores de conductividad eléctrica como los de sólidos disueltos totales fueron ligeramente altos para los valores típicos del agua dulce, 0 a 1 mS/cm y 0.5 g/L, respectivamente (Moran, 2018), encontrándose dentro del rango de agua salobre, que va desde los 1 mS/cm hasta los 46 mS/cm (Prajapati, 2018; USGS, 2016), destacando la naturaleza evaporítica del sitio de muestreo. Estudios en lagos con diferentes valores de sólidos disueltos totales muestran que el número de especies en el zooplancton disminuye en presencia de valores mayores a 1 g/L (Ivanova y Kazantseva, 2006).



**Figura 25.** Valores de conductividad eléctrica y sólidos disueltos totales medidos en campo, para 8 campañas de muestreo. \* Tomados de Mendoza-Chávez, 2016.

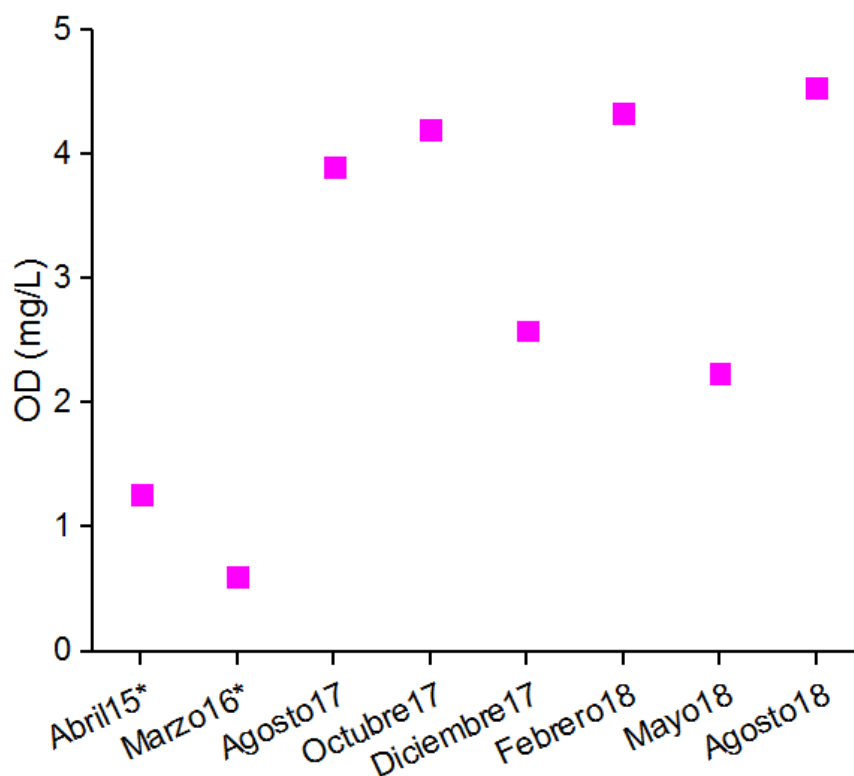
Los valores de las temperaturas ambiente y del agua, el pH, la conductividad eléctrica y los sólidos disueltos totales fueron similares a los valores reportados previamente para el mismo sitio de estudio (Gómez-Hernández et al., 2020; Martínez-Villegas et al., 2013; Pelallo-Martínez, 2006).

Como se observa en la Tabla 4, el rango del potencial de óxido-reducción varió entre 158 mV y 484.2 mV, equivalentes a valores de pe que variaron de 6.00 a 10.09, con un promedio de  $8.32 \pm 1.67$ , denotando que las muestras se encuentran en un sistema subóxico-óxico (Figura 26) (Essington, 2004).



**Figura 26.** Región de estabilidad de pe-pH ( $P = 1.0 \text{ atm}$ ,  $P = 0.21 \text{ atm}$ ,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $P = 1 \text{ atm}$ , y actividad del  $\text{H}_2\text{O}$  es la unidad) y las zonas redox (óxica, subóxica y anóxica) (Essington, 2004; Sposito, 2008), así como los valores encontrados en las muestras de agua recolectadas en el Club de Tiro en Matehuala. \* Tomados de Mendoza-Chávez, 2016.

Los valores de oxígeno disuelto variaron entre 0.6 mg/L y 4.54 mg/L (Tabla 4 y Figura 27). Los niveles de oxígeno disuelto en sistemas de agua dulce como lagos, ríos y arroyos pueden alcanzar hasta los 14.6 mg/L, dependiendo de las estaciones, la ubicación y la profundidad del agua (Patel y Vashi, 2015).



**Figura 27.** Concentraciones de oxígeno disuelto determinados en el Club de Tiro para 8 campañas de muestreo. \* Datos tomados de Mendoza-Chávez, 2016.

Así como el potencial de óxido-reducción, la temperatura, el pH y el oxígeno disuelto también están de acuerdo con los valores de agua dulce natural que presenta condiciones subóxicas-óxicas (Essington, 2004; Ongley, 1997; Quiroz-Martínez et al., 2006).

## 4.2. Cationes y aniones

Las concentraciones para cationes y aniones medidos en las muestras de agua recolectadas en el Club de Tiro se reportan en la Tabla 5.

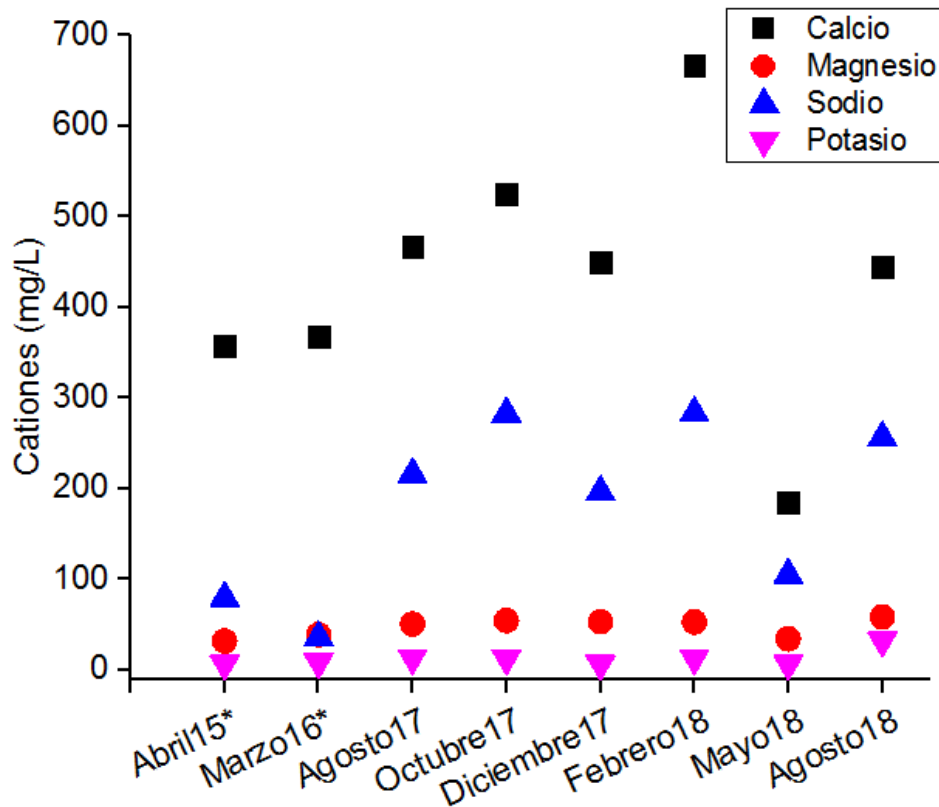
**Tabla 5.** Estadísticos descriptivos de cationes, aniones y elementos traza

	Ca <sup>2+</sup> (mg/L)	Mg <sup>2+</sup> (mg/L)	Na <sup>+</sup> (mg/L)	K <sup>+</sup> (mg/L)	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (mg/L)	Cl <sup>-</sup> (mg/L)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	F <sup>-</sup> (mg/L)	As (mg/L)
<b>Abril15*</b>	356.80	31.78	79.40	6.53	219.00	1065.00	189.13	32.79	2.00	40.17
<b>Marzo16*</b>	367.36	38.81	35.63	8.58	296.00	3655.67	189.13	32.79	2.00	53.23
<b>Agosto17</b>	466.05	50.57	215.61	13.01	264.00	2010.77	203.44	61.93	2.11	55.11
<b>Octubre17</b>	524.36	54.29	282.31	12.53	240.00	2051.00	188.50	32.93	2.10	60.91
<b>Diciembre17</b>	449.09	53.03	196.17	6.47	318.00	1875.84	178.66	25.93	2.07	62.29
<b>Febrero18</b>	666.66	52.74	283.20	12.67	410.00	1921.21	182.33	27.88	1.98	56.65
<b>Mayo18</b>	185.36	34.16	104.79	6.41	250.00	3598.63	188.90	12.67	1.75	35.50
<b>Agosto18</b>	483.98	58.11	256.33	32.28	220.00	2120.50	193.00	35.40	1.99	65.27
<b>Prom.</b>	437.45	46.68	181.68	12.31	277.13	2287.30	189.13	32.79	2.00	53.64
<b>DE</b>	140.49	10.15	96.41	8.50	63.93	890.38	8.67	16.32	0.13	10.58
<b>Min.</b>	185.36	31.78	35.63	6.41	219.00	1065.00	182.33	12.67	1.75	35.50
<b>Max.</b>	666.66	58.11	283.20	32.28	410.00	3655.67	203.44	61.93	2.11	62.29

Prom. = Promedio, DE = Desviación estándar, Min. = Mínimo, Max. = Máximo.

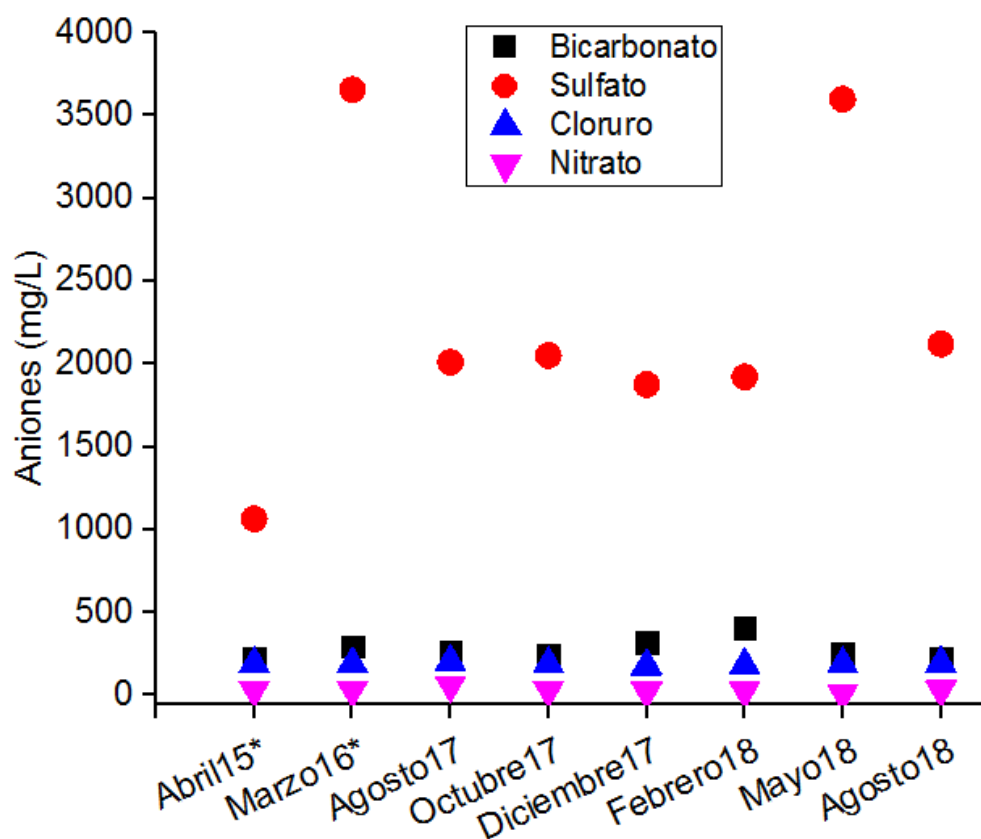
\* = Datos reportados por Mendoza-Chávez, 2016.

Las concentraciones promedio de cationes fueron 437.45±140.49 mg/L, 46.68±10.15 mg/L, 181.68±96.41 mg/L y 9.46±3.16 mg/L para calcio, magnesio, sodio y potasio, respectivamente (Tabla 5 y Figura 28). Estos valores estuvieron dentro de los rangos reportados para cationes en aguas naturales (Appelo y Postma, 2005).



**Figura 28.** Concentraciones de cationes medidas en laboratorio por medio de ICP-OES en mg/L, para 8 campañas de muestreo. \* Datos tomados de Mendoza-Chávez, 2016.

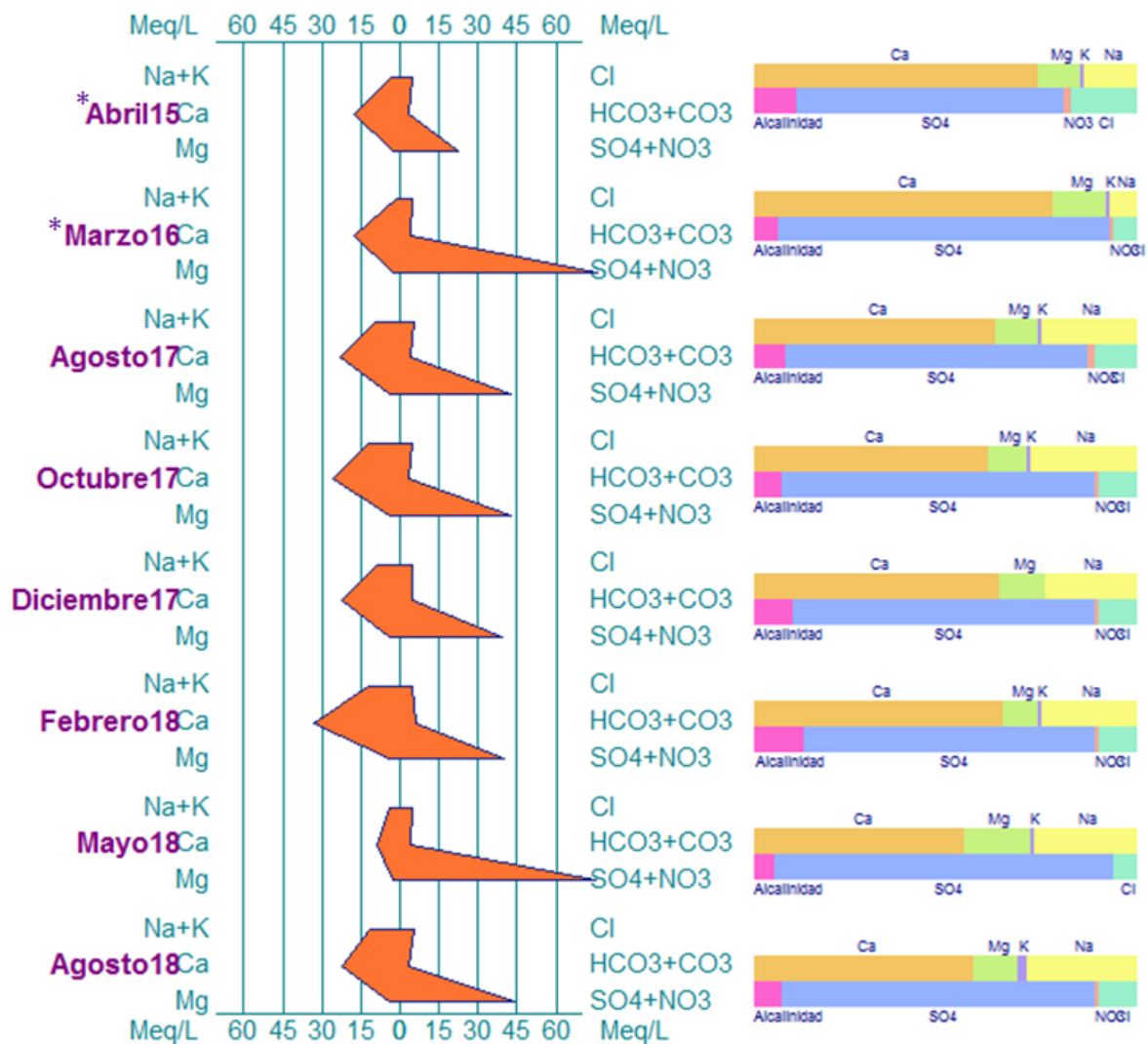
En el caso de los aniones (Figura 29), las concentraciones promedio fueron  $277.13 \pm 63.93$  mg/L,  $2287.3 \pm 890.38$  mg/L,  $189.13 \pm 8.67$  mg/L,  $32.79 \pm 6.32$  mg/L  $2.00 \pm 0.13$  mg/L para bicarbonato, sulfato, cloruro, nitrato y fluoruro, respectivamente. Si bien las concentraciones de bicarbonato, cloruro y nitrato estuvieron dentro de los rangos reportados para estos aniones en aguas naturales (Appelo y Postma, 2005; Oram, 2020), las concentraciones de sulfato y fluoruro excedieron los valores más comúnmente encontrados en aguas naturales (900 mg/L y 1 mg/L, respectivamente) (Appelo y Postma, 2005; O’Riordan, 1990). Las concentraciones relativamente altas de calcio y sulfato explican la alta conductividad eléctrica que se encuentra en el agua dulce, lo que es consistente con la transición geológica aluvión-yeso reportada para el sitio de estudio (Gómez-Hernández et al., 2020).



**Figura 29.** Concentraciones de aniones medidas en laboratorio por medio de HPLC en mg/L, para 8 campañas de muestreo. \* Datos tomados de Mendoza-Chávez, 2016.

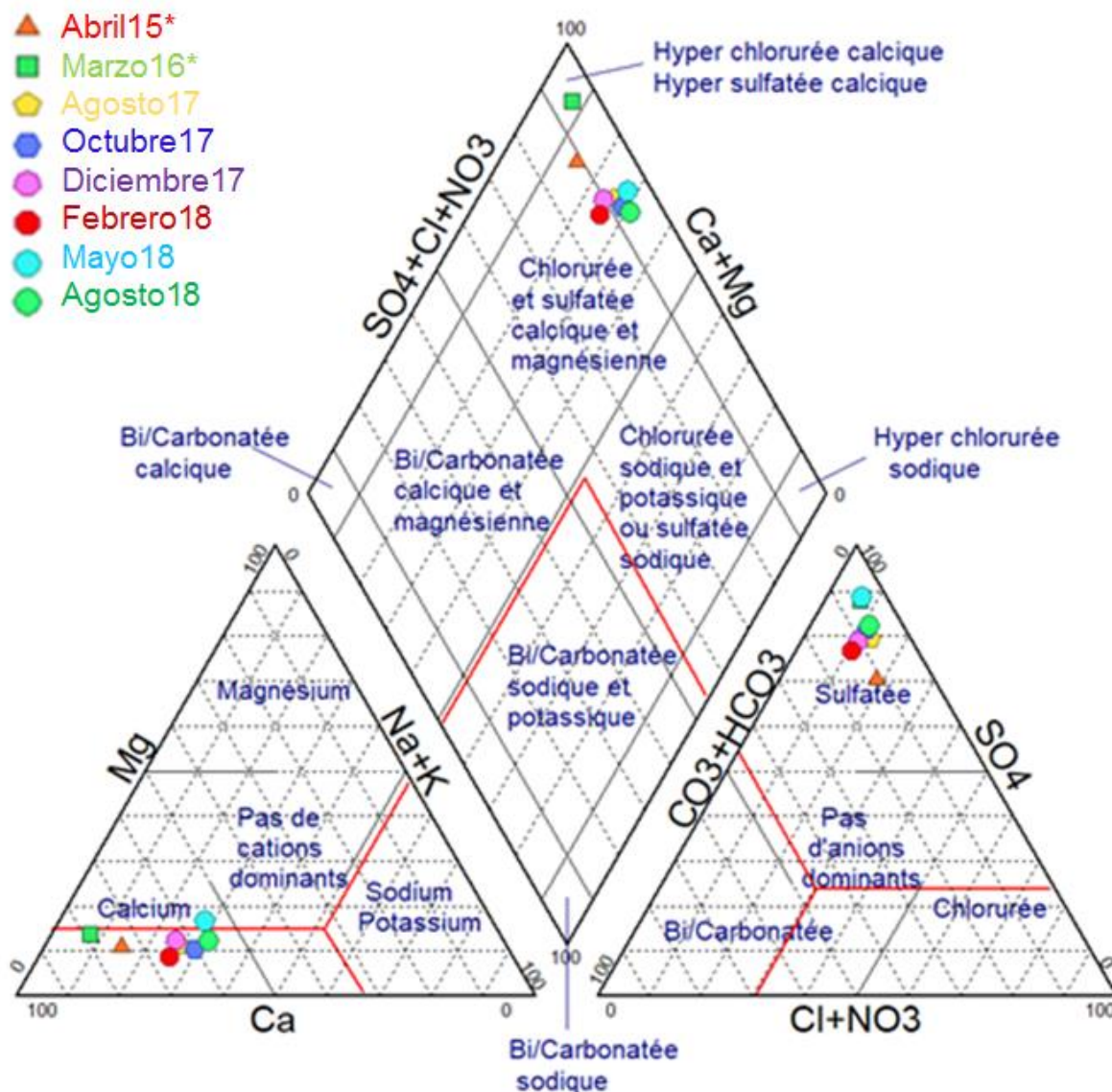
De acuerdo con los resultados de la composición química de las aguas del Club de Tiro, éstas se clasificaron como sulfatadas-cálcicas. Como se muestra en los diagramas de Stiff y Stabler (Figura 30), por el lado de los cationes se encontró que el calcio fue el más abundante, seguido por el sodio, el magnesio y en menores proporciones el potasio. Mientras que por el lado de los aniones la concentración

mayor la tuvieron los sulfatos, seguidos del nitrógeno, los bicarbonatos y en menores concentraciones, los cloruros.



**Figura 30.** Diagramas de Stiff y Stabler para el agua del Club de Tiro, con los iones calcio y sulfato como mayoritarios, obtenidos por medio del software Diagrammes. \* Datos tomados de Mendoza-Chávez, 2016.

La Figura 31 muestra el diagrama de Piper y la clasificación del agua, en dicho diagrama se pudo observar la ligera variación temporal de la composición química del agua, mismo que dio cuenta de que el calcio y el sulfato fueron los iones mayoritarios.

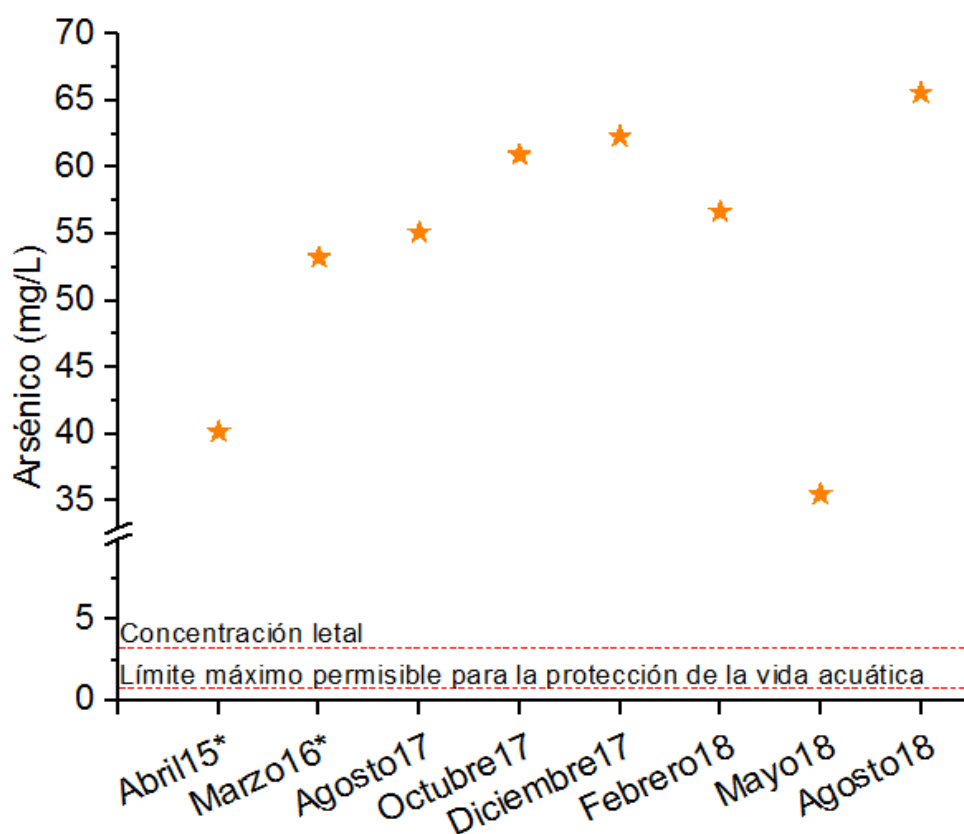


**Figura 31.** Diagrama de Piper para el Club de Tiro, el agrupamiento de las muestras revela poca variación temporal, confirmando al ion calcio y al ion sulfato como los iones mayoritarios. Obtenido por medio del software Diagrammes. \* Datos reportados por Mendoza-Chávez, 2016.

La construcción de los tres diagramas permitió visualizar el tipo de agua. Una agua sulfatada-cálcica puede proceder de una zona de yesos, y debido a lo reportado anteriormente para el sitio de estudio (Del Ángel-Ríos, 2020; Gómez-Hernández et al., 2020; Martínez-Montoya, 2005; Romo-Ramírez y Cruz-Márquez, 2012), se pudo corroborar dicha deducción.

### 4.3. Arsénico total en agua y estimación de su especiación por modelación hidrogeoquímica

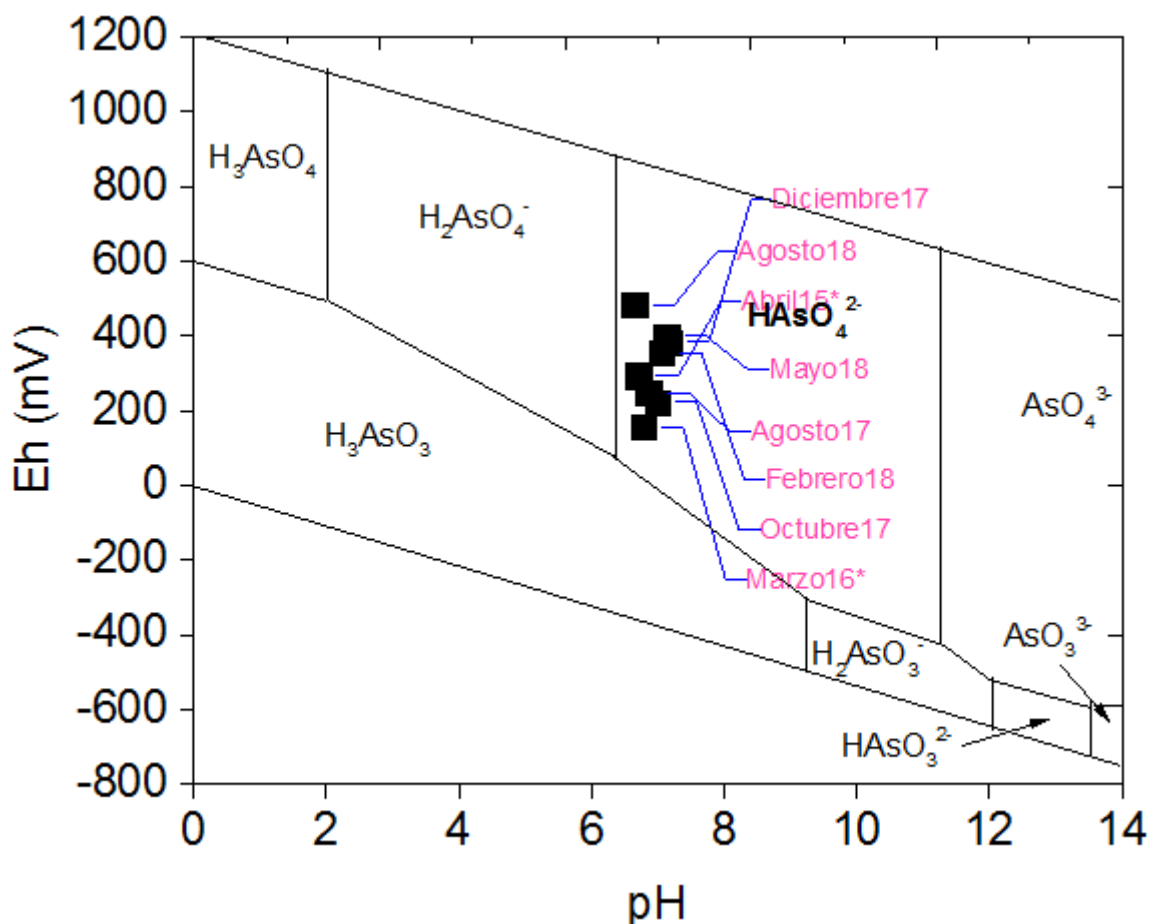
Las concentraciones de arsénico en el agua del Club de Tiro estuvieron entre 35.50 mg/L y 62.29 mg/L con una concentración promedio de  $53.64 \pm 10.58$  mg/L (Tabla 5, Figura 32). Dichos valores fueron superiores a los que se registran comúnmente en aguas naturales y que oscilan entre  $5 \times 10^{-5}$  mg/L y 5 mg/L (Smedley y Kinniburgh, 2002). También, fueron mayores a la concentración considerada como letal para el zooplancton (3 mg/L) (Chen et al., 1999) y a los lineamientos para la protección de la vida acuática y aguas naturales en México y otros países (CCME, 2001; CONAGUA, 2020; EPA, 1995). Estos resultados revelan que el punto de muestreo está constante y altamente contaminado con arsénico, conclusión que se respalda también por reportes previos (Gómez-Hernández et al., 2020; Martínez-Villegas et al., 2013; Pelallo-Martínez, 2006).



**Figura 32.** Concentraciones de arsénico determinadas en 8 campañas de muestreo, estos datos están muy por encima de los límites máximos permisibles en normativa nacional e internacional para la protección de la vida acuática de 0.2 mg/L (CCME, 2001; CONAGUA, 2020; EPA, 1995) y la concentración letal reportada para zooplancton por Chen et al., 1999 (3 mg/L). \* Datos tomados de Mendoza-Chávez, 2016.

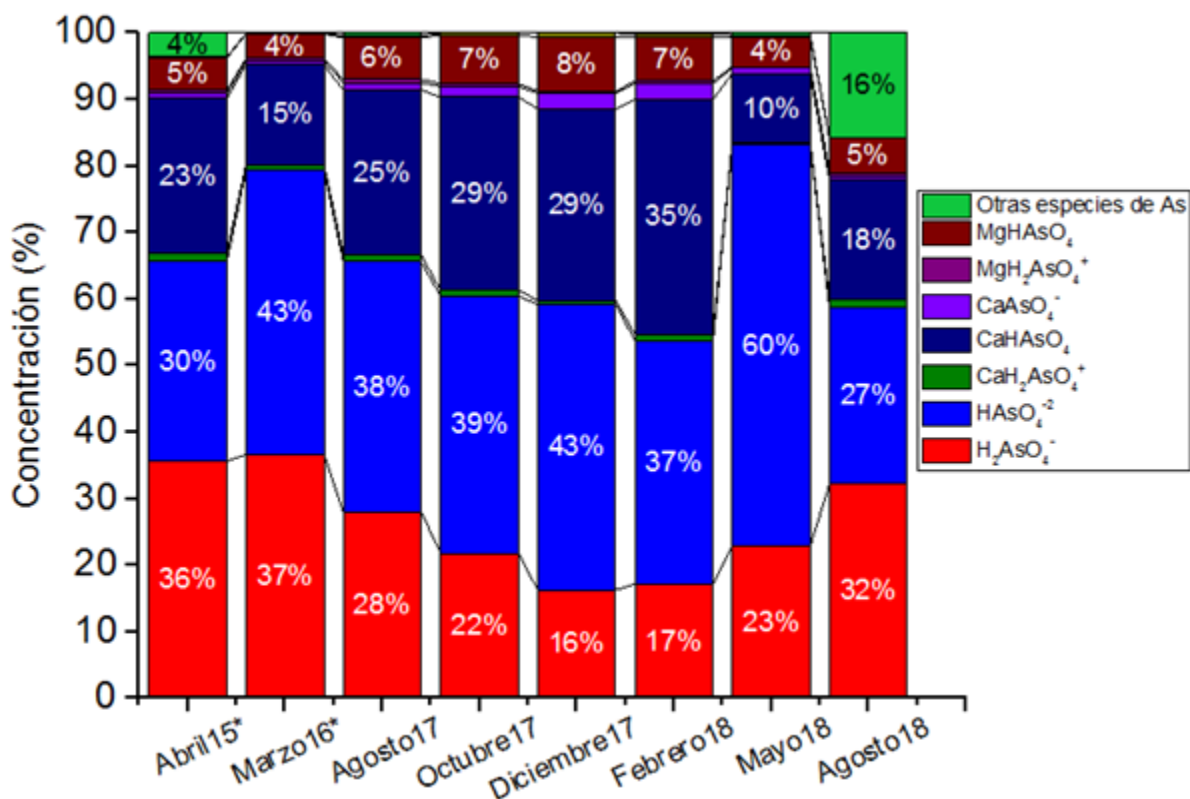


Los datos obtenidos en campo de potencial eléctrico y pH se sobrepusieron en un diagrama de especiación de arsénico (Figura 33), que sugirió que la especie que podría estar predominando en el agua del Club de Tiro, para todas las campañas de muestreo, sería el ion arseniato monoprotonado ( $\text{HAsO}_4^{2-}$ ).



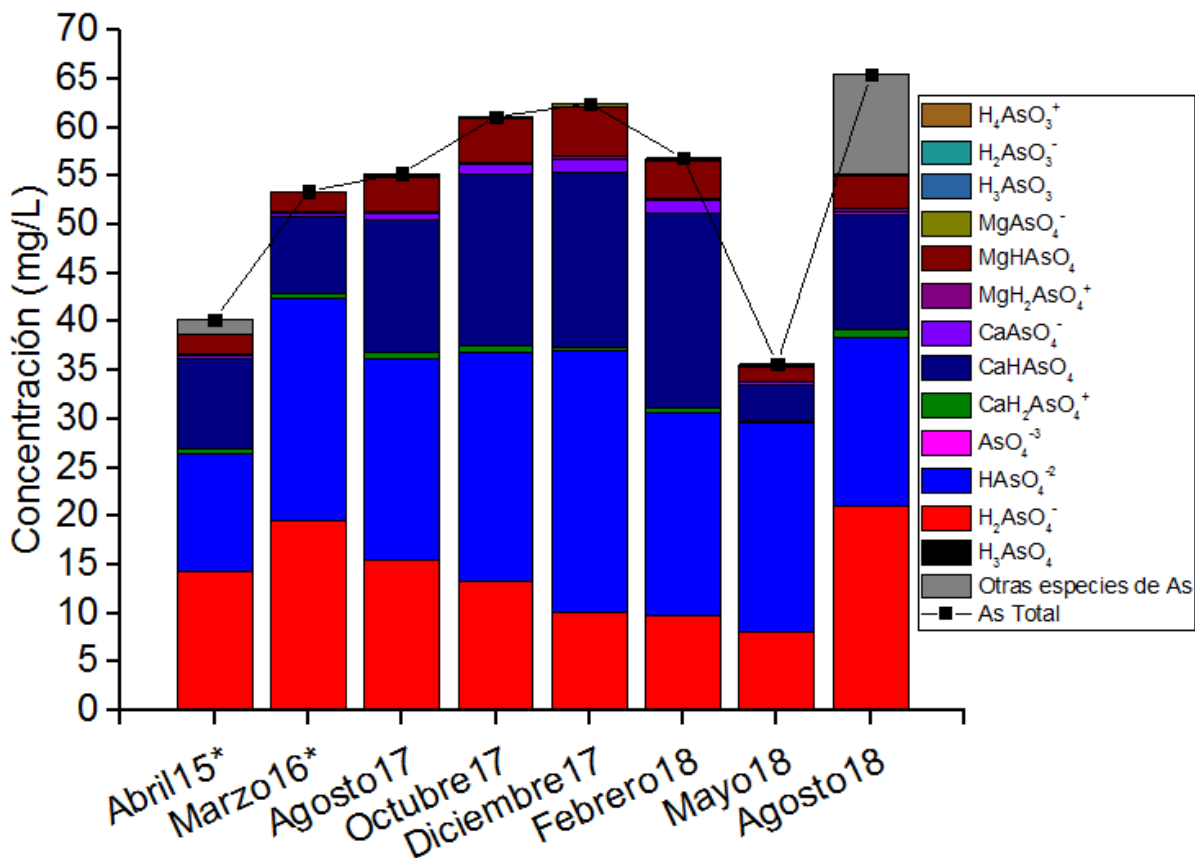
**Figura 33.** Diagrama Eh-pH para especies inorgánicas de arsénico en el sistema As-O<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O a 25 °C y 1 atm de presión total. Los valores de Pe y pH para las muestras del Club de Tiro variaron entre 158-484.2 mV y 6.64-7.16, respectivamente. Lo que sugiere que el arsénico de las muestras de agua se encuentra como una especie del ion arseniato ( $\text{HAsO}_4^{2-}$ ). \* Datos reportados por Mendoza-Chávez, 2016.

Adicionalmente, por medio de la modelación hidrogeoquímica se estimó la especiación del arsénico en el agua del Club de Tiro, cuyos resultados sugirieron que el arsénico se encuentra mayormente (84.25 % - 99.98 %) en especies que lo contienen como As(V) (Figura 34).



**Figura 34.** Distribución de las especies de arsénico estimadas por modelación hidrogeoquímica para datos obtenidos en 8 campañas de muestreo y con el uso del software PHREEQC. Valores en unidades de porcentaje. Especies de arsénico presentes con menos de 0.5% fueron omitidas para la presentación de este gráfico. \* Construcción a partir de datos reportados por Mendoza-Chávez, 2016.

En la Figura 35 podemos observar la concentración de las especies de arsénico estimadas. Las especies predominantes de As(V) fueron H<sub>2</sub>AsO<sub>4</sub><sup>-</sup>, HAsO<sub>4</sub><sup>-2</sup>, CaHAsO<sub>4</sub>, CaAsO<sub>4</sub><sup>-</sup> y MgHAsO<sub>4</sub>, mientras que para las especies de As(III) fueron H<sub>3</sub>AsO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>AsO<sub>3</sub><sup>-</sup> y H<sub>4</sub>AsO<sub>3</sub><sup>+</sup>, las concentraciones son mínimas y no se alcanzan a visualizar.

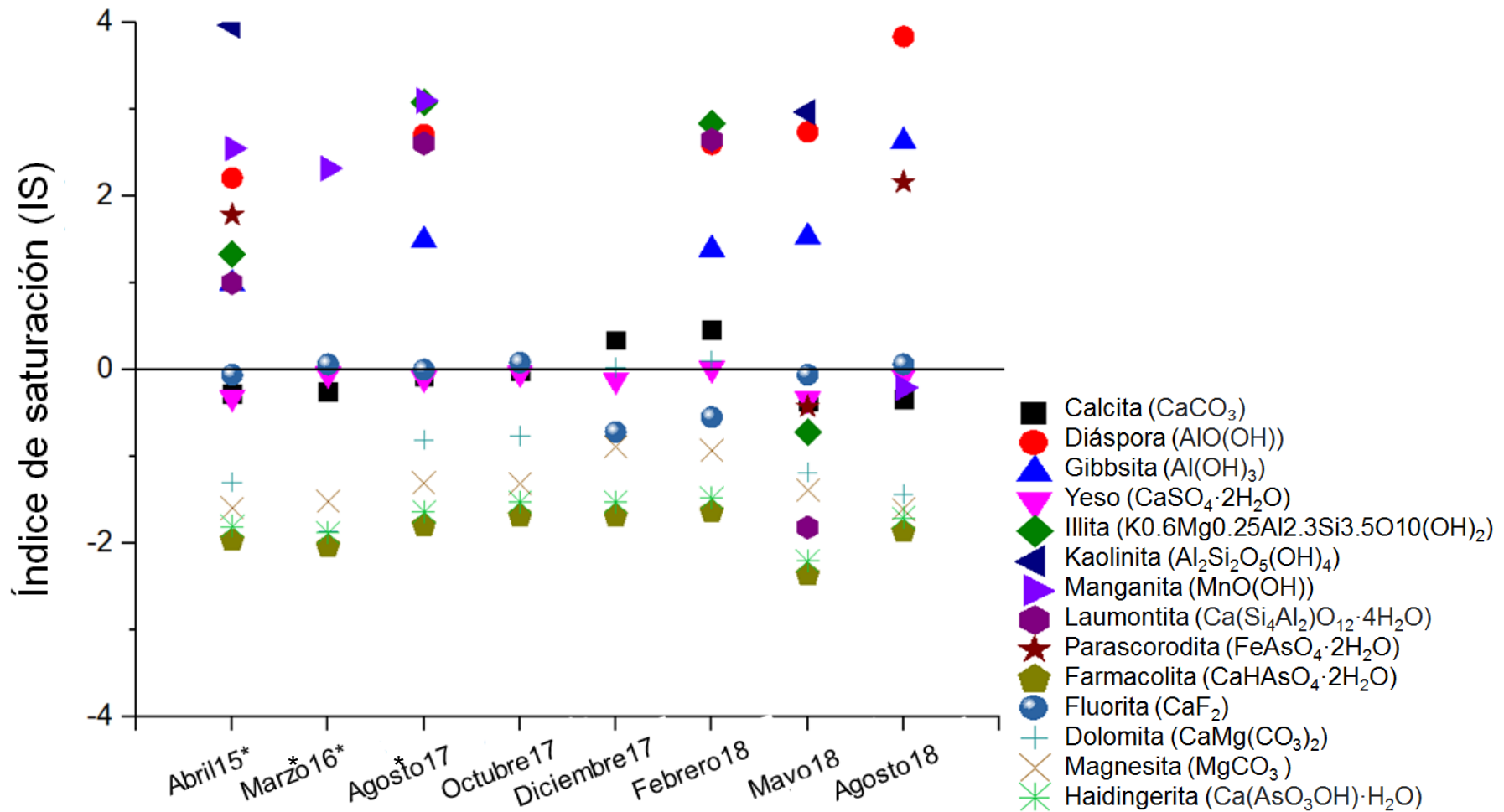


**Figura 35.** Concentraciones en mg/L. Distribución de las especies de arsénico estimadas por modelación hidrogeoquímica para datos obtenidos en 8 campañas de muestreo y con el uso del software PHREEQC. El arsénico total está representado con la línea negra. \* Construcción a partir de datos reportados por Mendoza-Chávez, 2016.

La información estimada por medio del diagrama de especiación y la modelación hidrogeoquímica fue confirmada con los resultados experimentales obtenidos por medio de HPLC, que arrojaron que el arsénico se encontró como As(V) en las muestras de agua analizadas.

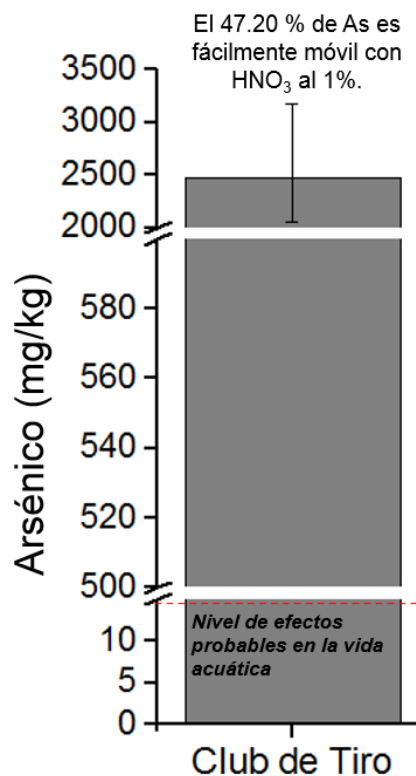
Por otro lado, los índices de saturación estimados por medio de la modelación hidrogeoquímica, sugirieron cuales pudieran estar controlando el contenido de los iones en el agua (Figura 36). Los probables minerales que se encontraron en equilibrio en el sistema son: el yeso ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), la calcita ( $\text{CaCO}_3$ ) y la fluorita ( $\text{CaF}_2$ ). Según lo reportado por el servicio geológico mexicano y estudios regionales (Del Ángel-Ríos, 2020; Gómez-Hernández et al., 2020; Martínez-Montoya, 2005; Romo-Ramírez y Cruz-Márquez, 2012), esta zona contiene sedimentos arcillosos cuya composición es de yeso, así como presencia de caliza (que puede contener

calcita o magnesita), lo cual explicaría las concentraciones de calcio, magnesio, carbonatos y sulfatos en el agua del Club de Tiro. Por otro lado, como se observa en la Figura 36, de los tres minerales de arsénico estimados que pudieran controlar la concentración del mismo en el agua del Club de Tiro (parascorodita, farmacolita y haidingerita), la farmacolita y haidingerita (arseniato de calcio) se estimaron subsaturadas, sin embargo, no hay reportes de que en el sitio de estudio se encuentren yacimientos de arsénico, de hecho la fuente de la contaminación está bien identificada (residuos de fuente antropogénica), por lo que, aunque termodinámicamente haya las condiciones para que estos minerales pudieran estar presentes y disolviéndose, no hay reporte de su existencia. Por otro lado, la parascorodita (arseniato de hierro), es el único mineral que se estimó sobresaturado, es decir, con probabilidades de precipitar. Lo reportado para el sitio de estudio, indica que los suelos de la fundición abandonada contienen hasta 4.4 % (p/p) de concentración de arsénico, y al contacto con el agua superficial y de lluvia liberan fácilmente concentraciones significativas de arsénico acuoso, esta agua altamente contaminada descarga en el Club de Tiro (Martínez-Villegas et al., 2013).



**Figura 36.** Índices de saturación (SI) estimados para el sitio de estudio (Club de Tiro), con los datos hidrogeoquímicos de 8 campañas de muestreo. \* Datos reportados por Mendoza-Chávez, 2016.

Los minerales estimados por medio de la modelación hidrogeoquímica, contienen al arsénico en forma de As(V), información que se pudo confirmar experimentalmente, en dónde el arsénico en los sedimentos del Club de Tiro fue identificado como As(V). La concentración promedio de arsénico en estos sedimentos fue de  $2472.84 \pm 611.48$  mg/kg (Figura 37), lo cual se encuentra muy por encima de la concentración a la cual se esperaría encontrar posibles efectos negativos en la vida acuática (17 mg/kg), según lo recomendado por instancias internacionales (CCME, 1999). Adicionalmente, se encontró que el 47.20 % del arsénico total era fácilmente movible con una solución de ácido nítrico al 1% como As(V).

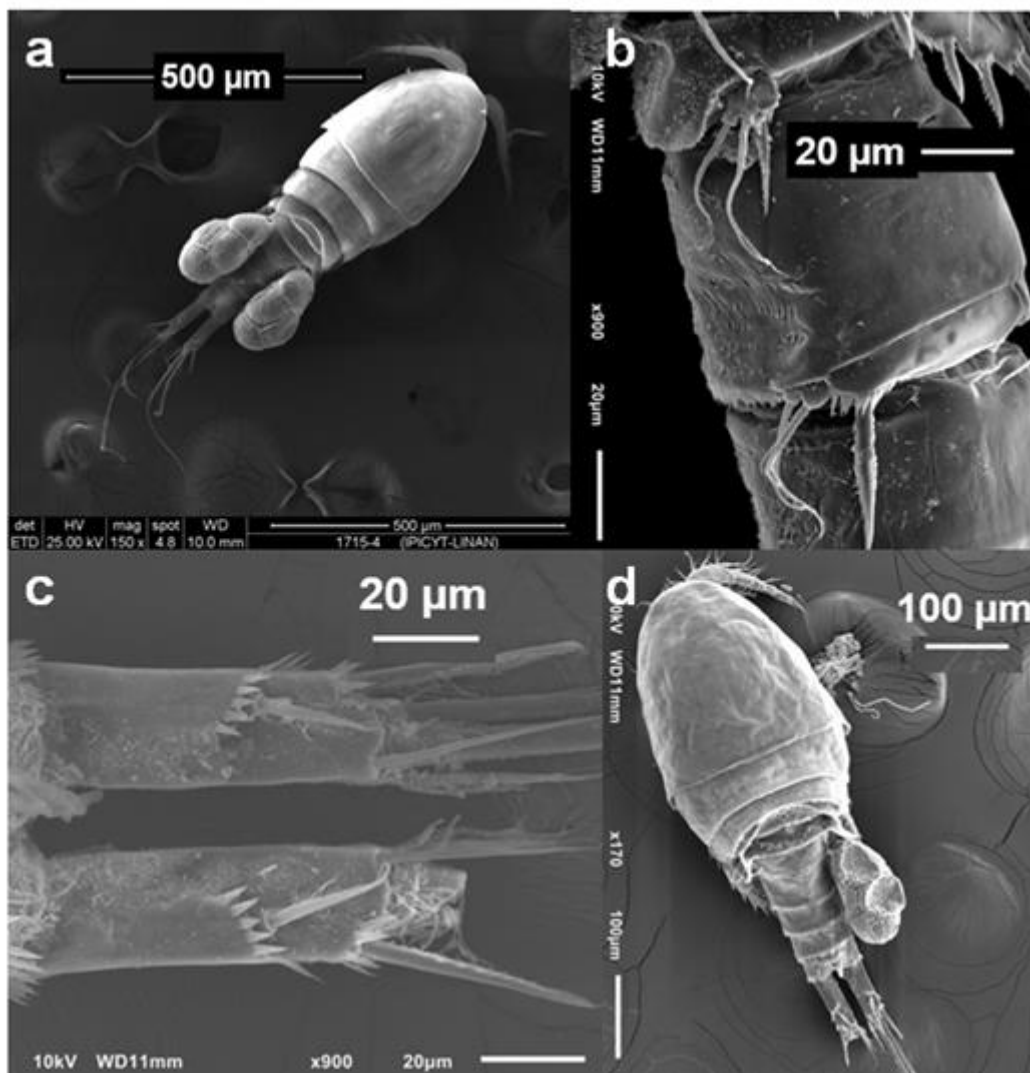


**Figura 37.** Concentración de arsénico en muestras de sedimentos, porcentaje de arsénico móvil usando HNO<sub>3</sub> al 1% de y la concentración a la cual pueden existir probables efectos negativos en la salud de la vida acuática (CCME, 1999).

#### 4.4. Identificación de *Paracyclops chiltoni*

La Figura 38 muestra las imágenes MEB de la única especie de microcrustáceo que habita en el agua del sitio de muestreo. Los organismos recolectados fueron comparados con las claves de *Paracyclops chiltoni* (Thomson, 1882) reportadas por Karaytuğ y Boxshall, 1998, 1999; Mercado-Salas y Suárez-Morales, 2009; Suárez-Morales, 1996 (Figura 38a). Según las observaciones y comparaciones, todos los

organismos mostraron un solo segmento bien diferenciado de la quinta pata, con dos setas apicales de tamaño similar y una espina apical (Figura 38b), así como un rami caudal de 3.5 a 4 veces más largo que ancho, ornamentado con una hilera corta transversal, al nivel de la seta lateral caudal y separados entre sí de la base, por una longitud menor que el ancho de una de las ramas, así como una seta externa de la quinta pata que tenía la misma longitud que la media (Figura 38c) y una anténula con 8 segmentos (Figura 38d). Todas las características morfológicas coincidieron con las reportadas para la misma especie en la literatura (Karaytuğ y Boxshall, 1998, 1999; Mercado-Salas y Suárez-Morales, 2009; Suárez-Morales, 1996). Estudios genéticos adicionales ayudarían a comprender mejor y aumentar el conocimiento sobre las características biológicas de esta especie de zooplancton metalotolerante que habita en aguas contaminadas con arsénico.



**Figura 38.** Imágenes de MEB *Paracyclops chiltoni* que muestran el a) hábito (vista dorsal), b) la quinta pata, c) las ramas caudales y d) la anténula de un organismo femenino.

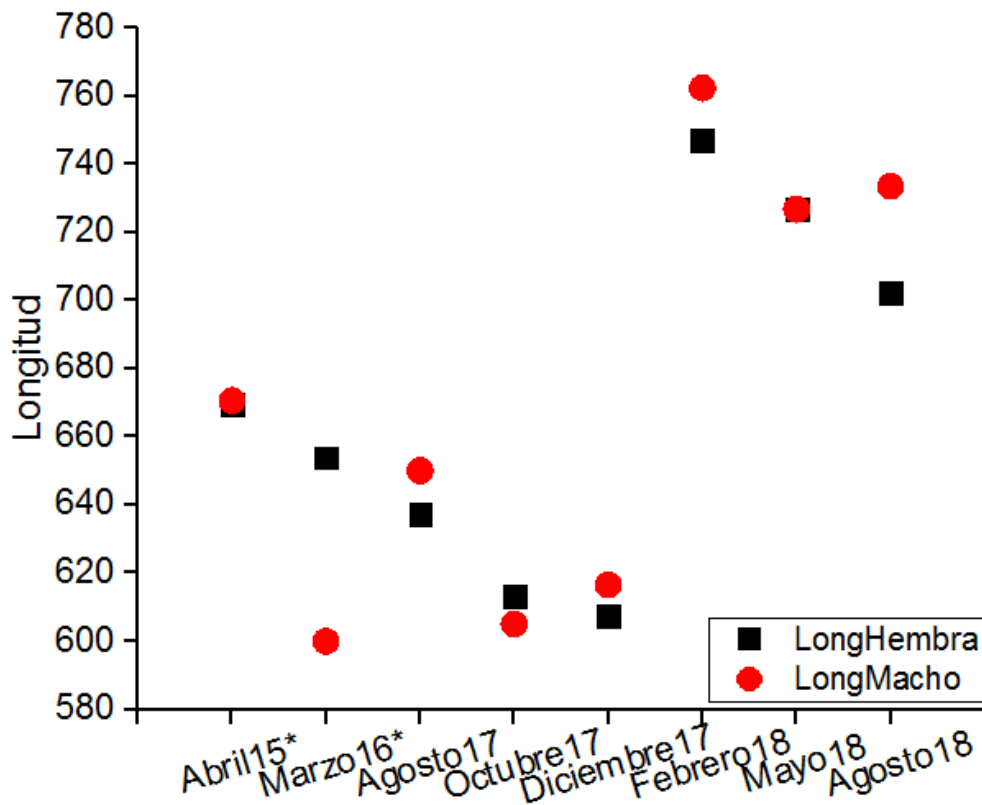
#### 4.5. Estructura de la población de *Paracyclops chiltoni*

La Tabla 6 muestra la abundancia total, la abundancia de hembras y machos, la abundancia de copepoditos y nauplios, la longitud de hembras y machos, así como la proporción de sexos.

La abundancia promedio total ( $8.25 \pm 10.77$  ind/L) estuvo generalmente dentro de los valores de abundancia reportados para copépodos que habitan agua contaminada con metales pesados (0.2 a 20 ind/L) (Gagneten y Paggi, 2008) y agua epicontinental (0.5 y 1182 ind/L) (Cervantes y Gutiérrez-Aguirre, 2014; Gómez-Márquez et al., 2013; Torres-Orozco y Zanatta, 1998; Villalba et al., 2017), a excepción de la muestra de octubre 2017 que mostró una baja abundancia, probablemente debido a una baja temperatura del agua (18.3 °C) en comparación con otras muestras. Haberman y Haldna, (2017) informaron que la abundancia de zooplancton puede disminuir hasta 3 veces al bajar un grado la temperatura. Por otro lado, la abundancia de *P. chiltoni* fue menor a los valores de abundancia reportados para cyclopoides que habitan niveles de agua mesotróficos (21.3 ind/L) (Cervantes y Gutiérrez-Aguirre, 2014).

Las longitudes de hembras y machos adultos estuvieron dentro de las longitudes reportadas para cyclopoides, 556-857  $\mu\text{m}$  en hembras y 531-751  $\mu\text{m}$  en machos (Karaytuğ y Boxshall, 1998), lo que sugiere que el *P. chiltoni* que habita en aguas altamente contaminadas no mostró cambios de longitud con respecto a lo reportado en literatura (Figura 39).





**Figura 39.** Longitudes de hembras y machos medidas en organismos de *P. chiltoni* recolectados en 8 campañas de muestreo. \* Datos reportados por Mendoza-Chávez, 2016.

La proporción de sexos (hembra:macho) varió de 0.5:1 a 21:1 (Tabla 6). Esta proporción estuvo de acuerdo con la proporción de sexos de los adultos, típicamente sesgada hacia una mayor población de hembras en las poblaciones de copéodos en campo (Kjørboe, 2006), a excepción del muestreo del 18 de mayo (Tabla 6), donde la proporción de sexos presentó una población mayor de machos que de hembras (0.5:1). Durante este muestreo, la temperatura ambiente fue la más alta (22.66 °C). La proporción de sexos en los copéodos parece mostrar una variabilidad estacional, el número de machos aumenta con el aumento de la temperatura (Krupa, 2005). En este estudio, se observó una alta variabilidad en la estructura de la población, quizás debido al ambiente que rodea al cuerpo de agua. Como se mencionó anteriormente, se encuentra a un costado de una granja de subsistencia que puede influir en la hidrogeoquímica del agua y la estructura de la población del zooplancton.

**Tabla 6.** Datos de la estructura de la población de *Paracyclops chiltoni* que habita agua contaminada con valores de arsénico entre 35.50 y 62.29 mg/L.

	Total Ab (ind/L)	Hembra (ind/L)	Macho (ind/L)	Copepodito	Nauplio	Longitud hembra (µm)	Longitud macho (µm)	Relación sexo (hembra:macho)
<b>Abril15*</b>	25.00	10.00	15.00	6.60	0.00	669.64	670.58	4:1
<b>Marzo16*</b>	25.17	24.00	1.17	9.25	7.17	653.84	600.00	20:1
<b>Agosto17</b>	0.70	0.62	0.08	0.75	0.64	637.19	650.00	14:1
<b>Octubre17</b>	0.22	0.17	0.05	0.09	0.71	613.13	605.00	4:1
<b>Diciembre17</b>	4.67	4.46	0.21	1.46	1.51	607.33	616.50	21:1
<b>Febrero18</b>	8.65	4.80	3.85	1.18	2.01	747.00	762.33	1:1
<b>Mayo18</b>	0.70	0.40	0.30	0.05	0.05	726.90	726.75	0.5:1
<b>Agosto18</b>	0.90	0.50	0.40	0.10	0.10	702.10	733.50	1.25:1
<b>Prom.</b>	8.25	5.62	2.63	2.44	1.52	669.64	670.58	8:1
<b>DE</b>	10.77	8.17	5.16	3.50	2.40	51.67	63.42	8.9:1
<b>Min.</b>	0.22	0.17	0.05	0.05	0.00	607.33	600.00	0.5:1
<b>Max.</b>	25.17	24.00	15.00	9.25	7.17	747.00	762.33	21:1

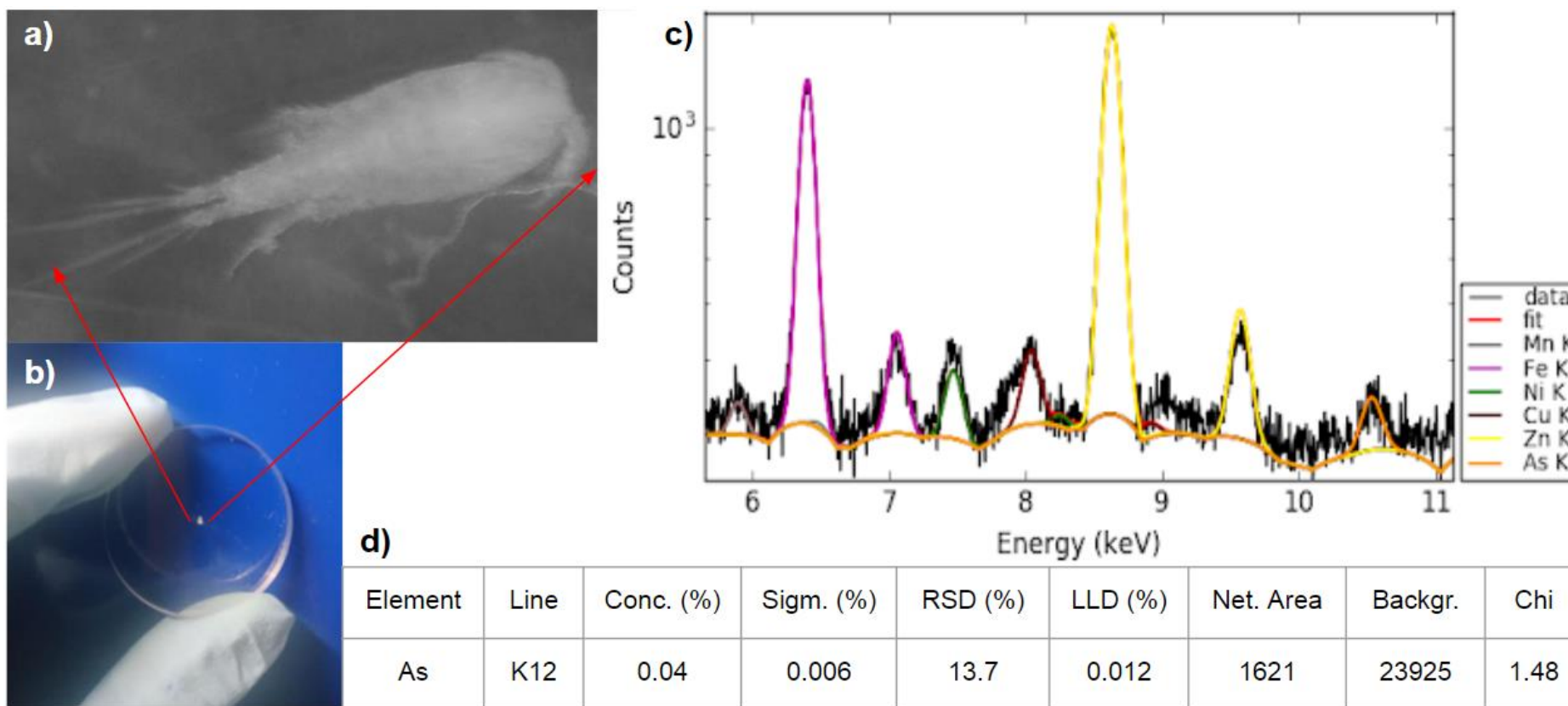
Prom. = Promedio, DE = Desviación estándar, Min. = Mínimo, Max. = Máximo.

\* = Datos tomados de Mendoza-Chávez, 2016.

#### 4.6. Bioacumulación y distribución de arsénico en *Paracyclops chiltoni*

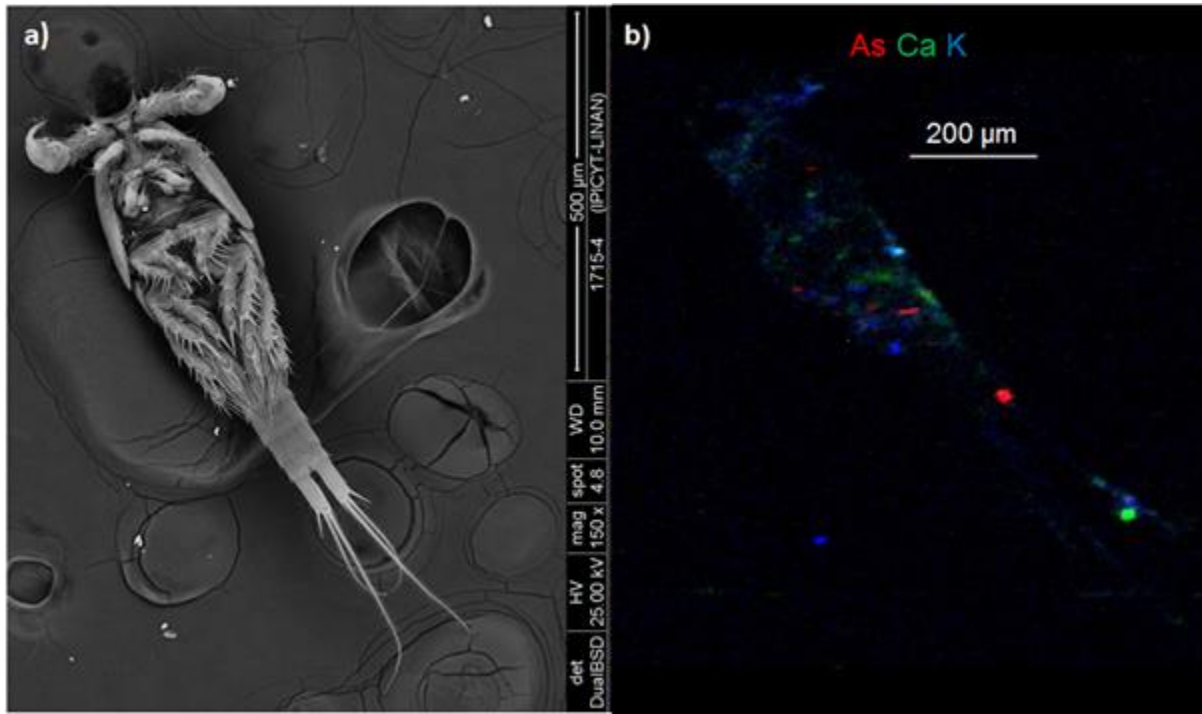
La concentración de arsénico en *Paracyclops chiltoni* fue de  $9.6 \pm 5.4$  mg/kg, lo que indica que *P. chiltoni* incorpora arsénico del agua en su cuerpo. Estos valores estuvieron de acuerdo con los reportados, entre 0.2 mg/kg y 11 mg/kg, para copépodos y cladóceros que habitan en un ambiente 249 veces menos contaminado (Caumette et al., 2011). Surge entonces aquí una nueva pregunta sobre si éste podría ser un rango (máximo) de concentración de arsénico en organismos expuestos a arsénico.

Resultados adicionales de la presencia de arsénico en el cuerpo de *P. chiltoni* fueron obtenidos por análisis de espectroscopía de Fluorescencia de Rayos-X por reflexión Total (TXRF), mismos que mostraron la línea característica para la  $K\alpha$  del arsénico a los 10.53 keV (Figura 40).



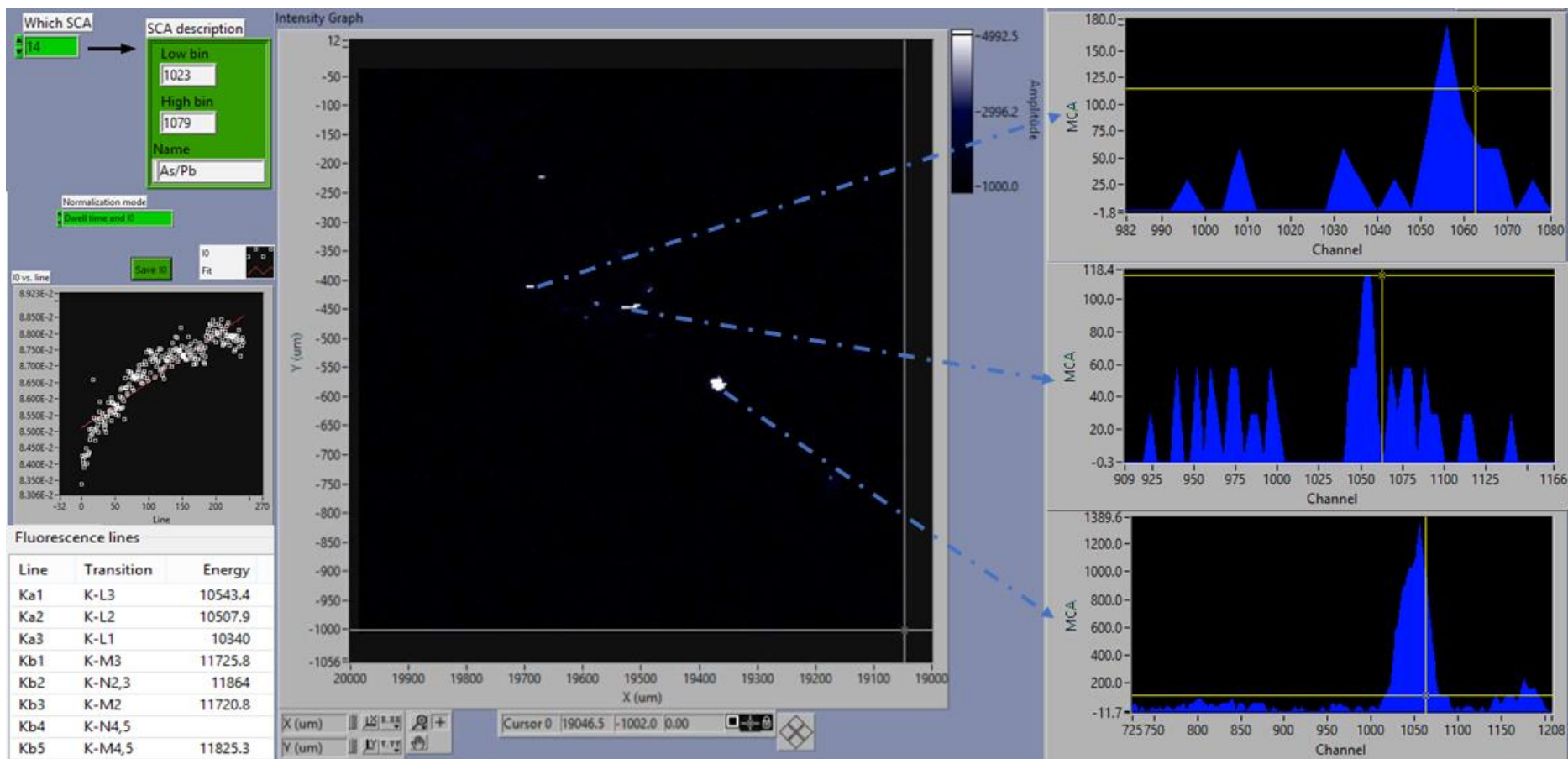
**Figura 40.** a) Imagen de un organismo de *Paracyclops chiltoni* obtenido por medio de microscopía antes del análisis TXRF. b) Imagen de un organismo de *Paracyclops chiltoni* en el disco soporte. c) Espectro de arsénico obtenido por TXRF mostrando la línea K $\alpha$  10.53 keV que confirma la presencia de arsénico en el organismo. d) Cuantificación aproximada de arsénico en TXRF.

Por otro lado, la Figura 41 muestra el mapeo elemental  $\mu$ -XRF de la distribución de arsénico en *P. chiltoni*. A partir de esta evidencia, encontramos que el arsénico se está acumulando en el prosoma y el urosoma del organismo.



**Figura 41.** a) Imagen MEB de *Paracyclops chiltoni* que habita agua dulce altamente contaminada y b) Mapa elemental  $\mu$ -XRF codificado en tricolor para As en rojo, Ca en verde y K en azul, que revela la presencia de As en el prosoma y el urosoma de *P. chiltoni*, según lo determinado por XFM. El punto rojo más brillante cerca del ano sugiere la presencia de As en el tracto digestivo del organismo. Adquisición realizada a  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $11966.7\text{ eV}$  con píxeles de  $4\times 4\text{ }\mu\text{m}$  y un tiempo de adquisición de  $100\text{ }\mu\text{s}$ .

La presencia de arsénico en *P. chiltoni* fue confirmada por el pico característico de fluorescencia de  $\text{K}\alpha$  a  $10543.4\text{ eV}$  en los puntos más altos (Figura 42), principalmente en el área torácica y cerca de la furca o el ano, lo que sugiere, como se mencionó anteriormente, que el As puede estar acumulándose en el tracto digestivo de *P. chiltoni*. Nuestros resultados fueron similares a los reportados para organismos del grupo de zooplancton cladocera (Caumette, et al., 2012b; Wang et al., 2018) que sugieren que el As puede acumularse en el tracto digestivo en diferentes grupos de zooplancton. Por primera vez, en esta tesis, reportamos un copépodo metalotolerante que habita agua dulce con concentraciones extremadamente altas de arsénico ( $57.47\text{ mg/L}$ ), lo que podría ayudar a comprender mejor la biotransformación y la toxicidad en copépodos y zooplancton.



**Figura 42.** Mapa de distribución elemental y espectros de micro fluorescencia de Rayos x ( $\mu$ -XRF) de tres distintos puntos fuertes mostrando la línea de emisión para el arsénico  $K\alpha = 10543.4$  eV.

## 4.7. Genética

La Tabla 7 muestra las concentraciones de ADN extraído de los individuos de *P. chiltoni*, así como controles positivos (camarón) para las muestras de la 11 a la 20. Las concentraciones de ácidos nucleicos obtenidos de las extracciones de ADN de las muestras 13, 14, 15, 18, 19 y 20 (*P. chiltoni*) estuvieron entre 1.96 ng/μl y 4.10 ng/μl. Después de purificar y concentrar las muestras, dichos valores aumentaron a concentraciones entre 3.02 ng/μl y 8.20 ng/μl. Por otro lado, las relaciones de pureza A260/280 y A260/230, tanto en las primeras mediciones, como después del uso del kit purificador, indicaron valores fuera del rango óptimo que es 1.8 a 2.2, lo que sugirió la presencia de ARN, sales, fenoles, hidratos de carbono o proteínas como contaminantes.

La extracción de ADN de un individuo tan pequeño (< 1mm) como lo es un copépodo, tiene complicaciones ya que el objetivo de ADN es mucho menor al de especímenes mayores, y es recomendado utilizar únicamente un organismo por análisis para evitar contaminaciones o mezclas de especies, a pesar de que por la mínima cantidad de ADN que se extrae pudiera no dar señal en la medición de ácidos nucleicos por medio de espectrofotometría, se recomienda llevar a cabo la PCR (Fazhan et al., 2016), por otro lado, se ha reportado que muestras en presencia de concentraciones de arsénico, pueden inhibir el rendimiento de las PCR (Töpfer et al., 2011).

**Tabla 7.** Absorbancias medidas por medio de espectrofotometría para determinación de concentración de ácidos nucleicos y relaciones de pureza de la muestra 11 a 20.

Tipo de muestra	# muestra	ácidos nucleicos (ng/μl)	A260	A280	260/280	260/230
Camarón (25 mg)	11	4.34-7.72	0.087-0.154	0.076-0.135	1.15-1.15	0.18-2.74
Camarón (25 mg)	12	2.85-7.08	0.057-0.142	0.044-0.151	1.29-0.93	0.12-0.98

<b>1 copépodo</b> (~7.77 µg)	13	3.63-3.02	0.073-0.060	0.048-0.082	1.50-0.74	0.16-0.61
<b>2 copépodos</b> (~15.5 µg)	14	1.96-4.20	0.039-0.083	0.014-0.094	2.86-0.89	0.10-0.57
<b>3 copépodos</b> (~23.3 µg)	15	4.10-8.20	0.082-0.163	0.080-0.145	1.03-1.13	0.18-0.39
<b>Camarón</b> (25 mg)	16	116.88-57.6	2.338-1.151	1.179-0.640	1.98-1.80	0.84-1.29
<b>Camarón</b> (25 mg)	17	64.65-8.2	1.293-0.164	0.701-0.126	1.84-1.30	0.57-0.99
<b>1 copépodo</b> (~7.77 µg)	18	3.80-6.6	0.076-0.132	0.006-0.129	12.98-1.02	0.13-0.31
<b>2 copépodos</b> (~15.5 µg)	19	2.57-4.3	0.051-0.085	0.021-0.076	2.42-1.13	0.12-0.34
<b>3 copépodos</b> (~23.3 µg)	20	2.05-4.4	0.041-0.087	0.016-0.088	2.63-0.99	0.09-0.42

En negro valores obtenidos utilizando únicamente el kit de extracción, en rojo valores obtenidos después de concentrar y purificar las muestras.

Las 20 muestras de ADN fueron utilizadas para la amplificación de COI, en el Anexo X se muestran algunos de los geles de agarosa resultantes. Se obtuvieron amplificaciones de COI únicamente de los positivos (camarón) y solo de las reacciones 8, 9 y 10, usando los primers COP-COI (R-F) (Anexo 7). En cuanto a las muestras de *P. chiltoni* no se pudieron realizar más experimentos debido a la pandemia, por lo que el proceso de secuenciación no se llevó a cabo. Se recomiendan más pruebas con cambios en condiciones de equipos y reactivos para lograr amplificar.

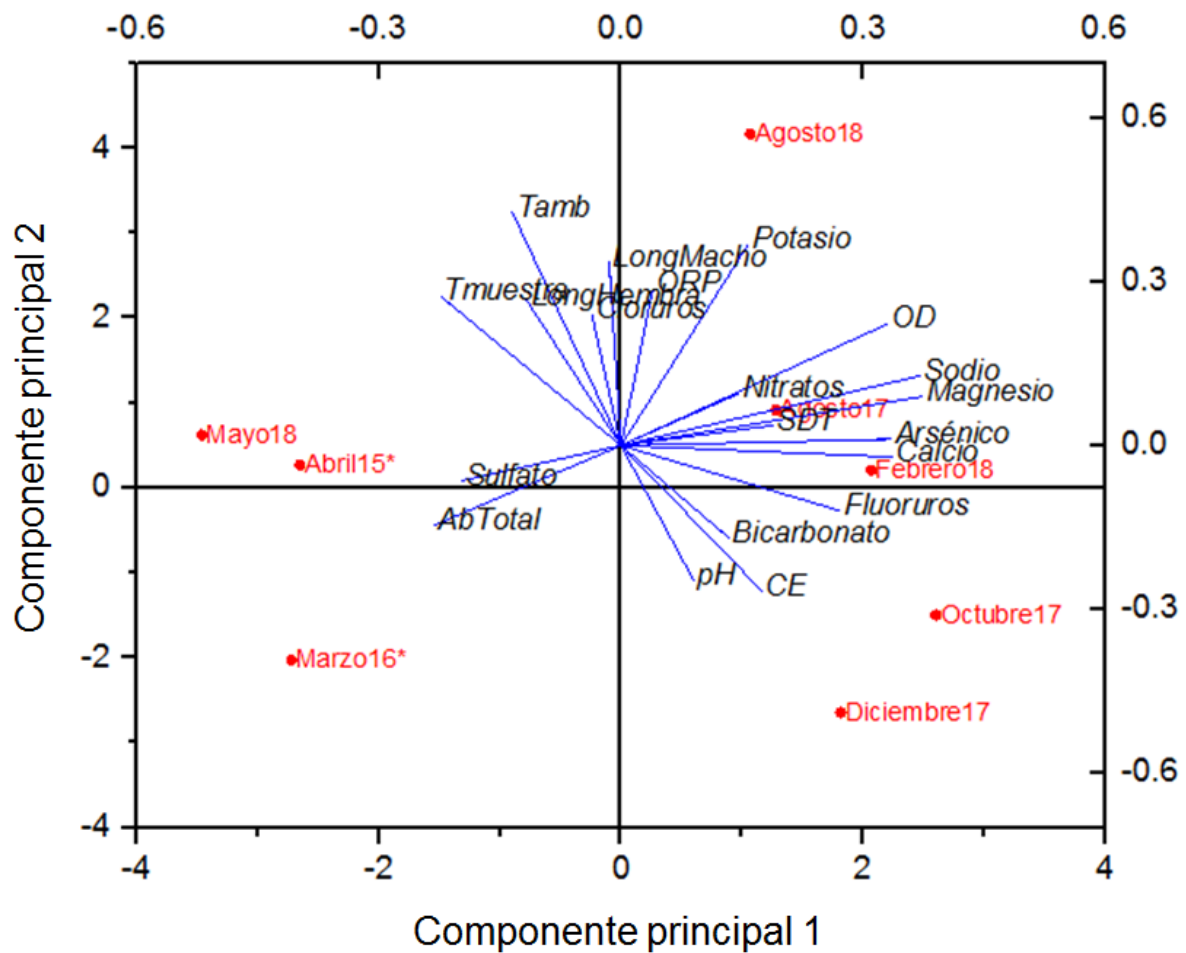
#### 4.8. Análisis de Componentes Principales (PCA)

La prueba de normalidad aplicada a los datos arrojó que, la temperatura ambiente, la temperatura de la muestra, el pH, la conductividad eléctrica, los sólidos disueltos totales, el ORP, el oxígeno disuelto, el calcio, el magnesio, el sodio, el

bicarbonato, el sulfato, el cloruro, el nitrato, el fluoruro, el arsénico y la longitud de hembra y macho, sugieren una distribución normal (significancia es  $>0.05$ ), mientras que el potasio y la abundancia total, no cuentan con una distribución normal (significancia es  $<0.05$ ). Para las variables con distribución normal se recomienda utilizar el coeficiente de correlación de Pearson, mientras que para las variables que no sugieren distribución normal se recomienda el coeficiente de correlación de Spearson.

Para examinar cualquier posible relación entre la hidrogeoquímica del medio ambiente y los organismos se llevó a cabo un análisis de componentes principales (PCA), utilizando el coeficiente de correlación de Pearson, ya que, si bien un par de variables no sugirió una distribución normal, al realizar el análisis con y sin las variables, los resultados arrojados solo tuvieron 1.5% de diferencia en el total acumulado, por lo que se optó por realizar el análisis con todas las variables. El PC1 (30.19%) combinó oxígeno disuelto, cationes principales de origen evaporítico (sodio, magnesio, calcio) y arsénico, mientras que el PC2 (23.70%) combinó la temperatura ambiental, la longitud del macho y el ORP (Figura 43). De izquierda a derecha, el PCA mostró una clara separación entre las muestras recolectadas en los meses más cálidos (marzo, abril y mayo) y los meses más fríos (agosto, octubre, diciembre y febrero) (Figura 43). Esto, a su vez, mostró las concentraciones más bajas y más altas de OD, respectivamente, así como las temperaturas ambientales más bajas y más altas, respectivamente. Esta información estuvo de acuerdo con las temperaturas medias mensuales históricas en Matehuala de los últimos 22 años para esos meses (Anexo 8) (SMN, 2020).





**Figura 43.** Biplot del PCA, donde se observan dos componentes principales (PC1 y PC2), así como las variables de contribución para cada componente.

Un tercer componente principal (PC3; 18.32%) combinó pH, bicarbonato, ORP y longitudes de hembras y machos. Estos tres componentes principales explicaron el 72.21% de la variabilidad total de los datos. La Tabla 8 muestra los coeficientes de cada parámetro.

**Tabla 8.** Eigenvectores y eigenvalores

	<b>Coefficientes del PC1</b> Eigenvalor 6.22	<b>Coefficientes del PC2</b> Eigenvalor 4.58	<b>Coefficientes del PC3</b> Eigenvalor 3.72
<b>Tambiental</b>	-0.139	<b>0.417</b>	-0.052
<b>Tmuestra</b>	-0.220	0.265	-0.187
<b>pH</b>	0.073	-0.240	<b>0.355</b>
<b>CE</b>	0.164	-0.271	0.065
<b>SDT</b>	0.200	0.065	0.077
<b>ORP</b>	0.033	<b>0.286</b>	<b>0.312</b>
<b>OD</b>	<b>0.329</b>	0.218	0.104
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	<b>0.346</b>	-0.033	0.025
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	<b>0.374</b>	0.078	0.019
<b>Na<sup>+</sup></b>	<b>0.372</b>	0.125	0.122
<b>K<sup>+</sup></b>	0.159	<b>0.350</b>	-0.058
<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	0.125	-0.191	<b>0.265</b>
<b>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>	-0.221	-0.085	0.072
<b>Cl<sup>-</sup></b>	-0.031	0.241	-0.355
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	0.160	0.095	-0.409
<b>F<sup>-</sup></b>	0.291	-0.114	-0.323
<b>As</b>	<b>0.339</b>	-0.003	-0.084
<b>AbTotal</b>	-0.142	-0.246	-0.088
<b>LongHembra</b>	-0.128	0.244	<b>0.321</b>
<b>LongMacho</b>	-0.023	<b>0.321</b>	<b>0.329</b>

Tambiental = temperatura ambiental, Tmuestra = temperatura de la muestra, CE = conductividad eléctrica, SDT = sólidos disueltos totales, OD= oxígeno disuelto, AbTotal = abundancia total, LongHembra = longitud de hembras, LongMacho = longitud de machos.

La Figura 43 y la Tabla 8 sugieren que el PC1 es un factor abiótico relacionado con la solubilidad de los minerales y el nivel óxico del sistema, lo que se sustenta en una correlación positiva entre media (0.639) y alta (0.965), entre el nivel de oxígeno disuelto y las concentraciones de sodio, magnesio, calcio y arsénico (Tabla 9). Se encontró una correlación negativa media (-0.659) entre el oxígeno disuelto y la abundancia total de zooplancton (Tabla 9).

Por otro lado, el PC2 es un factor que combina aspectos abióticos y bióticos del sistema, relacionados con la temperatura ambiente, el ORP y las longitudes de hembras y machos (Figura 43, Tabla 8). Esto está respaldado por una correlación positiva media entre el ORP y las longitudes de machos y hembras (0.716, 0.493) así como entre la temperatura ambiente y las longitudes de machos y hembras (0.603, 0.552) (Tabla 9). El PC3 es un factor relacionado con el pH y los bicarbonatos (Tabla 8), que se correlacionaron positivamente media (0.526) (Tabla 9).

**Tabla 9.** Matriz de correlación de Pearson entre parámetros biológicos y fisicoquímicos, mostrando valores >0.5 en verde y <-0.5 en azul.

	Tamb																			
Tamb	1	Tmue																		
Tmue	0.782	1	pH																	
pH	-0.548	-0.636	1	CE																
CE	-0.566	-0.411	0.684	1	SDT															
SDT	-0.152	-0.166	0.250	0.098	1	ORP														
ORP	0.453	-0.052	0.091	-0.492	0.240	1	OD													
OD	0.167	-0.205	0.114	0.242	0.468	0.372	1	Ca <sup>2+</sup>												
Ca <sup>2+</sup>	-0.371	-0.331	0.059	0.399	0.366	-0.089	0.639	1	Mg <sup>2+</sup>											
Mg <sup>2+</sup>	-0.117	-0.480	0.086	0.287	0.197	0.232	0.840	0.728	1	Na <sup>+</sup>										
Na <sup>+</sup>	-0.081	-0.411	0.215	0.323	0.523	0.305	0.965	0.761	0.889	1	K <sup>+</sup>									
K <sup>+</sup>	0.587	0.161	-0.535	-0.402	-0.109	0.463	0.641	0.288	0.639	0.531	1	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>								
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-0.459	-0.301	0.526	0.590	-0.004	-0.058	0.136	0.596	0.247	0.253	-0.240	1	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>							
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0.142	0.108	0.189	0.229	-0.810	-0.217	-0.347	-0.514	-0.293	-0.440	-0.132	0.045	1	Cl <sup>-</sup>						
Cl <sup>-</sup>	0.649	0.708	-0.551	-0.081	-0.017	-0.229	0.175	-0.174	-0.018	-0.024	0.334	-0.522	0.045	1	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>					
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0.190	0.369	-0.477	0.146	0.183	-0.376	0.289	0.352	0.329	0.231	0.277	-0.150	-0.352	0.759	1	F <sup>-</sup>				
F <sup>-</sup>	-0.433	-0.295	-0.222	0.256	0.285	-0.417	0.282	0.642	0.560	0.409	0.141	0.047	-0.568	0.160	0.716	1	As			
As	-0.244	-0.509	-0.078	0.202	-0.023	0.051	0.597	0.698	0.928	0.687	0.591	0.221	-0.251	-0.081	0.356	0.693	1	AbT		
AbT	-0.341	0.096	-0.187	0.042	-0.600	-0.521	-0.659	0.059	-0.350	-0.563	-0.343	0.433	0.282	-0.296	-0.078	0.063	-0.058	1	LH	
LH	0.552	0.460	-0.018	-0.246	-0.093	0.493	0.140	-0.038	-0.190	0.014	0.234	0.283	0.210	-0.072	-0.395	-0.726	-0.367	0.000	1	LM
LM	0.603	0.368	0.008	-0.286	0.182	0.716	0.405	0.086	0.048	0.278	0.396	0.220	-0.060	-0.025	-0.270	-0.578	-0.199	-0.295	0.925	1

Tamb = Temperatura ambiental; Tmue = Temperatura de la muestra; AbT = Abundancia total; LH = Longitud hembra; LM = Longitud macho.

## 5. Conclusiones

Se determinó que el agua del Club de Tiro es de tipo sulfatada-cálcica, debido al contenido de iones presentes en ésta y en relación con el tipo de suelo con el que está en contacto. Además, los valores obtenidos para los parámetros fisicoquímicos, se encuentran dentro de lo esperado para agua dulce y valores de protección para la vida acuática, excepto por los sulfatos, los fluoruros y el arsénico.

Se determinó que el agua del sitio de muestreo tiene concentraciones de arsénico entre los 35.50 y 62.29 mg/L, concentraciones dos órdenes de magnitud más altas que las guías nacionales e internacionales para la protección de la vida acuática (0.2 mg/L) y un orden de magnitud más alta que la concentración letal reportada para organismos de zooplancton (3 mg/L). Además, se encontró que el arsénico en el agua se encuentra como As(V), distribuido en las especies  $\text{H}_2\text{AsO}_4^-$ ,  $\text{HAsO}_4^{2-}$ ,  $\text{CaHAsO}_4$ ,  $\text{CaAsO}_4^-$  y  $\text{MgHAsO}_4$ , de acuerdo con modelaciones hidrogeoquímicas.

Para el caso del sedimento se encontró un promedio de  $2472.84 \pm 611.48$  mg/kg como As(V) en las muestras colectadas en el Club de Tiro. Dicho valor fue 145 veces superior al valor en el cual se espera ocurran efectos negativos probables en organismos acuáticos, según la normativa internacional. Además, el arsénico de los sedimentos fue fácilmente movable.

Se demostró la presencia y por tanto, la tolerancia de *Paracyclops chiltoni* habitando agua extremadamente contaminada con arsénico en al menos 4 años de estudios. La bioacumulación de arsénico en dichos organismos fue de  $9.6 \pm 5.4$  mg/kg y se identificó la distribución del metaloide en el cuerpo de *P. chiltoni*, proponiendo el sistema digestivo como probable canal de incorporación de éste.

*P. chiltoni* no muestra valores anormales en la ecología de su población, en su abundancia, longitud, proporción hembra:macho, ni en algunas de las características morfológicas que se analizaron, todo esto comparado con lo reportado en literatura para copépodos de agua dulce.

A pesar de que no se obtuvieron resultados de secuenciación genética que nos llevaran a confirmar la especie o construir un árbol filogenético, la información acerca de extracciones y amplificaciones de ADN para este organismo es muy útil para intereses de científicos trabajando en el campo de la genética del zooplancton.

Con lo anterior, se puede proponer al copépodo *Paracyclops chiltoni*, como un organismo extremófilo metalotolerante al arsénico, ya que es un organismo bien adaptado a este ambiente, determinado mayormente por la ecología de su población y no directamente por su morfología.

Se recomienda estudiar más a fondo la morfología del organismo, así como la obtención de información genética y la especiación del arsénico dentro del organismo, que en conjunto permita vislumbrar cuál es la ruta metabólica que sigue el arsénico al ingresar al organismo y observar si existe una reducción de toxicidad. Así como, en la medida de lo posible, conservar el cuerpo de agua del Club de Tiro por su importancia ecológica y hábitat de *Paracyclops chiltoni*.

## 6. Bibliografía

- Adeloju, S. B., Khan, S., y Patti, A. F. (2021). Arsenic Contamination of Groundwater and Its Implications for Drinking Water Quality and Human Health in Under-Developed Countries and Remote Communities-A Review. En *Applied Sciences-Basel* (Vol. 11, Número 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/app11041926>
- Akter, K. F., Owens, G., Davey, D. E., y Naidu, R. (2005). Arsenic Speciation and Toxicity in Biological Systems. En G. W. Ware, L. A. Albert, D. G. Crosby, P. de Voogt, O. Hutzinger, J. B. Knaak, F. L. Mayer, D. P. Morgan, D. L. Park, R. S. Tjeerdema, D. M. Whitacre, R. S. H. Yang, y F. A. Gunther (Eds.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* (pp. 97–149). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/0-387-27565-7\\_3](https://doi.org/10.1007/0-387-27565-7_3)
- Alcaraz, M., y Calbet, A. (2003). *Zooplankton Ecology* (p. 16).
- Aldana, G., Chourio, A., y Zambrano, O. (2015). Hydro geochemical data on oil field water statistic validation. *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia*, 38, 257–265.
- Alley, W. M. (1993). *Regional ground-water quality*. Van Nostrand Reinhold.
- Alvarado-Flores, J., Rubio-Franchini, I., Sofia Sanchez-Avila, A., de Jesus Ramirez-Tlalolin, G., y Rico-Martinez, R. (2019). Arsenic toxicity, bioaccumulation and risk assessment: A case study in Tolimique Dam, Aguascalientes, Mexico. En *Cogent Environmental Science* (Vol. 5, Número 1). Taylor & Francis As. <https://doi.org/10.1080/23311843.2019.1650630>
- Appelo, C. A. J., y Postma, D. (2005). *Geochemistry, Groundwater and Pollution* (2nd Edition). CRC Press.
- Armienta, M. A., y Segovia, N. (2008). Arsenic and fluoride in the groundwater of Mexico. *Environmental Geochemistry and Health*, 30(4), 345–353. <https://doi.org/10.1007/s10653-008-9167-8>
- Armienta, M. A., Villaseñor, G., Rodriguez, R., Ongley, L. K., y Mango, H. (2001). The role of arsenic-bearing rocks in groundwater pollution at Zimapán Valley, México. *Environmental Geology*, 40(4), 571–581. <https://doi.org/10.1007/s002540000220>
- ATSDR. (2007). *Toxicological profile for arsenic* (p. 559). Agency for Toxic Substances and Disease Registry. <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp2.pdf>
- Barrett, P. M., Hull, E. A., King, C. E., Burkart, K., Ott, K. A., Ryan, J. N., Gawel, J. E., y Neumann, R. B. (2018). Increased exposure of plankton to arsenic in contaminated weakly-stratified lakes. En *Science Of The Total Environment* (Vol. 625, pp. 1606–1614). Elsevier Science BV. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.336>
- Bernhard, M., Brinckman, F. E., & Irgolic, K. J. (1986). *Why “Speciation”?* (Núm. 33; The Importance of Chemical “Speciation” in Environmental Processes). Dahlem Workshop Reports (Life Sciences Research Report). [https://doi.org/10.1007/978-3-642-70441-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-70441-3_2)
- Biesecker, L. G. (2021). Polymerase Chain Reaction (PCR). *National Human Genome Research Institute*. <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Polymerase-Chain-Reaction>
- Bocanegra Salazar, M. (2006). *Evaluación de riesgo en salud por la exposición a Fluoruro y Arsénico en agua de pozo para consumo de las zonas Altiplano, Centro y Media del Estado de San Luis Potosí* [Tesis de Maestría]. Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
- Boochs, P. W., Billib, M., Aparicio, J., y Gutiérrez, C. (2007). Management of the Arsenic Groundwater System Lagunera—MEXICO. *AGU Spring Meeting Abstracts, 2007*, H42A-05.
- Briones-Gallardo, R., y Razo Soto, I. (2008). *Contaminación de aguas naturales por arsénico asociado a la actividad minero-metalúrgica: Caso de estudio en San Luis Potosí, México*.
- Britannica. (2020). DNA. En *Encyclopedia Britannica*.

- <https://www.britannica.com/science/DNA>
- Brookins, D. G. (1988). *Eh-pH diagrams for geochemistry*. Springer.  
[http://inis.iaea.org/search/search.aspx?orig\\_q=RN:20029173](http://inis.iaea.org/search/search.aspx?orig_q=RN:20029173)
- Byeon, E., Kang, H.-M., Yoon, C., y Lee, J.-S. (2021). Toxicity mechanisms of arsenic compounds in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology*, 237, 105901.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.105901>
- Byeon, E., Yoon, C., Lee, J.-S., Lee, Y. H., Jeong, C.-B., Lee, J.-S., y Kang, H.-M. (2020). Interspecific biotransformation and detoxification of arsenic compounds in marine rotifer and copepod. *Journal of Hazardous Materials*, 391, 122196.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122196>
- Caldwell, G. S., Koch, I., Estrada, E., y Reimer, K. J. (2011). Arsenic Speciation in Plankton Organisms from Contaminated Lakes: Transformations at the Base of the Freshwater Food Chain. En *Environmental Science & Technology* (Vol. 45, Número 23, pp. 9917–9923). AMER CHEMICAL SOC. <https://doi.org/10.1021/es2025092>
- Castañé, P. M., Topalián, M. L., Cordero, R. R., y Salibián, A. (2003). Influencia de la especiación de los metales pesados en medio acuático como determinante de su toxicidad. *Revista de Toxicología*, 20(1), 13–18. Redalyc.
- Caumette, G., Falnoga, I., Moriarty, M., y Reimer, K. J. (2012)b. Arsenic distribution and speciation in *Daphnia pulex*. *Science Of The Total Environment*, 432, 243–250.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.05.050>
- Caumette, G., Koch, I., Estrada, E., y Reimer, K. J. (2011). Arsenic Speciation in Plankton Organisms from Contaminated Lakes: Transformations at the Base of the Freshwater Food Chain. *Environmental science & technology*, 45, 9917–9923.  
<https://doi.org/10.1021/es2025092>
- Caumette, G., Koch, I., House, K., y Reimer, K. J. (2014). Arsenic cycling in freshwater phytoplankton and zooplankton cultures. *ENVIRONMENTAL CHEMISTRY*, 11(5), 496–505. <https://doi.org/10.1071/EN14039>
- Caumette, G., Koch, I., y Reimer, K. J. (2012)a. Arsenobetaine formation in plankton: A review of studies at the base of the aquatic food chain. *JOURNAL OF ENVIRONMENTAL MONITORING*, 14(11), 2841–2853.  
<https://doi.org/10.1039/c2em30572k>
- CCME. (1999). *Canadian Sediment Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life* (pp. 1–4). Canadian Council of Ministers of the Environment.  
<https://ccme.ca/en/res/arsenic-canadian-sediment-quality-guidelines-for-the-protection-of-aquatic-life-en.pdf>
- CCME. (2001). *Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life* (pp. 1–4). Canadian Council of Ministers of the Environment. <http://ceqg-rcqe.ccme.ca/download/en/143/?redir=1596490097>
- Cervantes, A., y Gutiérrez-Aguirre, M. (2014). Physicochemistry and zooplankton of two karstic sinkholes in the Yucatan Peninsula, Mexico. *Journal of Limnology*, 73.  
<https://doi.org/10.4081/jlimnol.2014.976>
- Challenger, Frederick. (1945). Biological Methylation. *Chemical Reviews*, 36(3), 315–361.  
<https://doi.org/10.1021/cr60115a003>
- Chen, C. Y., y Folt, C. L. (2000). Bioaccumulation and Diminution of Arsenic and Lead in a Freshwater Food Web. *Environmental Science & Technology*, 34(18), 3878–3884.  
<https://doi.org/10.1021/es991070c>
- Chen, C. Y., Sillett, K. B., Folt, C. L., Whitemore, S. L., y Barchowsky, A. (1999). Molecular and demographic measures of arsenic stress in *Daphnia pulex*. *Hydrobiologia*, 401(0), 229–238. <https://doi.org/10.1023/A:1003738427354>
- Chen, C. Y., Stemberger, R. S., Klaue, B., Blum, J. D., Pickhardt, P. C., y Folt, C. L. (2000). Accumulation of heavy metals in food web components across a gradient of lakes. *Limnology and Oceanography*, 45(7), 1525–1536.  
<https://doi.org/10.4319/lo.2000.45.7.1525>
- Chen, L., Ren, Y., Lin, J., Liu, X., Pang, X., y Lin, J. (2012). Acidithiobacillus caldus sulfur oxidation model based on transcriptome analysis between the wild type and sulfur

- oxygenase reductase defective mutant. *PloS One*, 7(9), e39470–e39470. PubMed. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039470>
- Cole, J. M. (2004). *Arsenic in a village drinking water supply, Mexico*. PRISM. <https://doi.org/10.11575/PRISM/17320>
- Collins, F. S. (2021). Gene. *National Human Genome Research Institute*. <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Gene>
- CONABIO. (2021). *¿Qué son las especies?* Biodiversidad mexicana. <https://www.biodiversidad.gob.mx/especies/queson>
- CONAGUA. (2020). *Ley Federal de Derechos Disposiciones Aplicables en Materia de Aguas Nacionales 2020* (p. 77).
- Conde-Porcuna, J., Ramos-Rodríguez, E., y Baquero, R. (2004). El zooplancton como integrante de la estructura trófica de los ecosistemas lénticos. *Ecosistemas*, 2. <http://www.aeet.org/ecosistemas/042/investigacion3.htm>
- Cruz, D., Alarcón-Herrera, M., Reynoso-Cuevas, L., y Torres-Castañón, L. (2020). Variación espacio-temporal de arsénico y flúor en el agua subterránea de la ciudad de Durango, México. *Tecnología y ciencias del agua*, 11. <https://doi.org/10.24850/j-tyca-2020-02-10>
- Culioli, J.-L., Fouquoire, A., Calendini, S., Mori, C., y Orsini, A. (2009). Trophic transfer of arsenic and antimony in a freshwater ecosystem: A field study. *Aquatic Toxicology*, 94(4), 286–293. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.07.016>
- Custodio, E., y Llamas, M. R. (1996). *Hidrología subterránea. Tomo I*. (2da.). Omega.
- Davis, S. N., De Wiest, Roger J. M., . (1967). *Hydrogeology*. John Wiley & Sons; /z-wcorg/.
- De la Lanza-Espino, G., Hernández-Pulido, S., y Carbajal-Pérez, J. L. (2011). *Organismos indicadores de la calidad del agua y de la contaminación (bioindicadores)* (2da.). Plaza y Valdés Editores.
- De, S., y Maiti, A. (2012). *Arsenic Removal from Contaminated Groundwater*. The Energy and Resources Institute (TERI).
- Del Ángel-Ríos, A. (2020). *Caracterización geofísica del subsuelo al norte del municipio de Matehuala, San Luis Potosí* [Tesis de Maestría]. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.
- Dinh, K. V., Dinh, H. T., Pham, H. T., Selck, H., y Truong, K. N. (2020). Development of metal adaptation in a tropical marine zooplankton. En *Scientific Reports* (Vol. 10, Número 1). NATURE PUBLISHING GROUP. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67096-1>
- Acuerdo por el que se establecen los criterios ecológicos de calidad del agua, CE-CCA-001/89 (1989).
- DOF. (1994). *NOM-117-SSA1-1994* [Norma Oficial Mexicana]. Secretaria de Salud.
- Dopson, M., Baker-Austin, C., Koppineedi, P., y Bond, P. (2003). Growth in sulfidic mineral environments: Metal resistance mechanisms in acidophilic micro-organisms. *Microbiology (Reading, England)*, 149, 1959–1970.
- Dopson, M., Ossandon, F. J., Lövgren, L., y Holmes, D. S. (2014). Metal resistance or tolerance? Acidophiles confront high metal loads via both abiotic and biotic mechanisms. *Frontiers in Microbiology*, 5, 157. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00157>
- Duker, A. A., Carranza, E. J. M., y Hale, M. (2005). Arsenic geochemistry and health. *Environment International*, 31(5), 631–641. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2004.10.020>
- Dumorné, K., Córdova, D. C., Astorga-Eló, M., y Renganathan, P. (2017). Extremozymes: A Potential Source for Industrial Applications. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(4), 649–659. <https://doi.org/10.4014/jmb.1611.11006>
- Dundas, N., Leos, N. K., Mitui, M., Revell, P., y Rogers, B. B. (2008). Comparison of automated nucleic acid extraction methods with manual extraction. *The Journal of Molecular Diagnostics : JMD*, 10(4), 311–316. <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2008.070149>
- EPA. (1994). *Method 200.7, Revision 4.4: Determination of Metals and Trace Elements in*



- Water and Wastes by Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry* (Revision 4.4). U. S. Environmental Protection Agency. [https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-08/documents/method\\_200-7\\_rev\\_4-4\\_1994.pdf](https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-08/documents/method_200-7_rev_4-4_1994.pdf)
- EPA. (1995). *Office of Water Policy and Technical Guidance on Interpretation and Implementation of Aquatic Life Metals Criteria* (pp. 2–6). <https://www.epa.gov/sites/production/files/2019-03/documents/metals-criteria-interpret-aqlife-memo.pdf>
- EPA. (1997). *EPA Method 300.1, Revision 1.0: Determination of Inorganic Anions in Drinking Water by Ion Chromatography* (Revision 1.0). U. S. Environmental Protection Agency. <https://www.epa.gov/esam/epa-method-3001-revision-10-determination-inorganic-anions-drinking-water-ion-chromatography>
- EPA. (2002). *A Guidance Manual to Support the Assessment of Contaminated Sediments in Freshwater Ecosystems* (Volume III - Interpretation of the Results of Sediment Quality Investigations, p. 232). United States Environmental Protection Agency.
- Espino-Valdés, M., Barrera-Prieto, Y., y Peraza, E. (2009). Presencia de arsénico en la sección norte del acuífero Meoqui-Delicias del estado de Chihuahua, México. *Tecnociencia Chihuahua*, 3, 8–18.
- Espinosa-Asuar, L. (2007). Guía práctica sobre la técnica de PCR. En *Ecología molecular* (1era.). SEMARNAT, CONABIO.
- Essington, M. (2004). *Soil and water chemistry: An integrative approach*. CRC Press.
- Fattorini, D., Notti, A., y Regoli, F. (2006). Characterization of arsenic content in marine organisms from temperate, tropical, and polar environments. *Chemistry and Ecology*, 22(5), 405–414. <https://doi.org/10.1080/02757540600917328>
- Fazhan, H., Waiho, K., y Shahreza, M. S. (2016). A simple and efficient total genomic DNA extraction method for individual zooplankton. *SpringerPlus*, 5(1), 2049–2049. PubMed. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-3724-x>
- Folmer, O., Black, M., Wr, H., Lutz, R., y Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial Cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular marine biology and biotechnology*, 3, 294–299.
- Gagneten, A. M., y Paggi, J. (2008). Effects of Heavy Metal Contamination (Cr, Cu, Pb, Cd) and Eutrophication on Zooplankton in the Lower Basin of the Salado River (Argentina). *Water Air and Soil Pollution*, 198, 317–334. <https://doi.org/10.1007/s11270-008-9848-z>
- Gaikwad, S. R., Ingle, K. N., y Thorat, S. R. (2008). Study of zooplankton emergence pattern and resting egg diversity of recently dried waterbodies in North Maharashtra Region. *Journal of Environmental Biology*, 29(3), 353–356.
- García-Salgado, S. (2013). *Estudios de especiación de arsénico y acumulación de metales en muestras de interés medioambiental: Arsenic speciation and metal accumulation studies in environmental samples* [Phd, E.U.I.T. Obras Públicas (UPM)]. <http://oa.upm.es/15311/>
- Gómez-Hernández, A., Rodríguez, R., Lara del Río, A., Aurora Ruiz-Huerta, E., Aurora Armienta, M., Dávila-Harris, P., Sen-Gupta, B., Delgado-Rodríguez, O., Del Angel Rios, A., y Martínez-Villegas, N. (2020). Alluvial and gypsum karst geological transition favors spreading arsenic contamination in Matehuala, Mexico. En *Science Of The Total Environment* (Vol. 707). ELSEVIER. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135340>
- Gómez-Márquez, J. L., Peña-Mendoza, B., Guzmán-Santiago, J. L., y Gallardo-Pineda, V. (2013). Composición, abundancia del zooplancton y calidad de agua en un microreservorio en el estado de Morelos. *Hidrobiológica*, 23, 227–240.
- González, N., Rodríguez, N., Torres, W., y O'Callaghan, J. (2011). Protocolo sencillo para la extracción de ADN genómico de tejido de oreja del ratón y la rata, usando la enzima bromelina. *Revista Científica*, XXI(3), 233–238. Redalyc.
- Guinn, G. (1966). Extraction of nucleic acids from lyophilized plant material. *Plant Physiology*, 41(4), 689–695. PubMed. <https://doi.org/10.1104/pp.41.4.689>

- Gupta, N. (2019). DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction. *Journal of Cytology*, 36(2), 116–117. PubMed. [https://doi.org/10.4103/JOC.JOC\\_110\\_18](https://doi.org/10.4103/JOC.JOC_110_18)
- Gutiérrez, M. F., y Gagneten, A. M. (2011). Efecto de los metales sobre microcrustáceos de agua dulce. Avances metodológicos y potencialidad de cladóceros y copépodos como organismos test. *Revista Peruana de Biología*, 18(3), 389–396. <https://doi.org/10.15381/rpb.v18i3.460>
- Gutiérrez-Aguirre, M., Cervantes, A., Delgado-Blas, V. H., y Ruíz-Ramírez, J. D. (2012). *Especies de zooplankton dulceacuícola de Cozumel (1era.)*. Desarrollo Gráfico Editorial S. A. de C. V.
- Haberman, J., y Haldna, M. (2017). How are spring zooplankton and autumn zooplankton influenced by water temperature in a polymictic lake? *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences*, 66, 264. <https://doi.org/10.3176/proc.2017.3.03>
- Halim, M., Majumder, R., Nessa, S. A., Hiroshiro, Y., Uddin, M., Shimada, J., y Jinno, K. (2008). Hydrogeochemistry and arsenic contamination of groundwater in the Ganges Delta Plain, Bangladesh. *Journal of hazardous materials*, 164, 1335–1345. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.09.046>
- Hardy, A. (1970). *No cover image available The Open Sea: Its Natural History (Part One: The World Of Plankton) (2nd.)*. Black Cat Hill Books.
- Hauter, S., y Hauter, D. (2020). How to Culture Amphipods and Copepods for Your Saltwater Aquarium. *The spruce pets*. <https://www.thesprucepets.com/culturing-amphipods-and-copepods-2924613>
- Hayakawa, T., Kobayashi, Y., Cui, X., y Hirano, S. (2005). A new metabolic pathway of arsenite: Arsenic-glutathione complexes are substrates for human arsenic methyltransferase Cyt19. *Archives of toxicology*, 79, 183–191. <https://doi.org/10.1007/s00204-004-0620-x>
- Hebert, P., Cywinska, A., Ball, S. L., y Dewaard, J. (2003). Biological identification through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270, 313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Hendrey, G. R. (2001). Acid Rain and Deposition. En S. A. Levin (Ed.), *Encyclopedia of Biodiversity* (pp. 1–15). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-226865-2/00001-8>
- Hong, Y.-S., Song, K.-H., y Chung, J.-Y. (2014). Health effects of chronic arsenic exposure. *Journal of Preventive Medicine and Public Health = Yebang Uihakhoe Chi*, 47(5), 245–252. <https://doi.org/10.3961/jpmph.14.035>
- Hossain, M., Williams, P., Mestrot, A., Norton, G., Deacon, C., y Meharg, A. (2012). Spatial Heterogeneity and Kinetic Regulation of Arsenic Dynamics in Mangrove Sediments: The Sundarbans, Bangladesh. *Environmental science & technology*, 46, 8645–8652. <https://doi.org/10.1021/es301328r>
- Hurtado-Jiménez, R., y Gardea-Torresdey, J. L. (2006). Arsenic in drinking water in the Los Altos de Jalisco region of Mexico. *Revista Panamericana de Salud Pública = Pan American Journal of Public Health*, 20(4), 236–247. <https://doi.org/10.1590/s1020-49892006000900004>
- Iglesias-Portal, G. A. (2020). *Influencia de la calidad del agua superficial del Río Huacaná sobre el Río Coscore y el Río Tumilaca Moquegua—Perú* [Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Agraria La Molina]. <https://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/4421/iglesias-portal-gino-armando.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Ivanova, M. B., y Kazantseva, T. I. (2006). Effect of water pH and total dissolved solids on the species diversity of pelagic zooplankton in lakes: A statistical analysis. *Russian Journal of Ecology*, 37(4), 264–270.
- Jibaja, S., Oyola, V., Berastain, A., Ramos, D., Roncal, E., Medina, J. C., Untiveros, G., Sheen, P., y Hurtado, J. (2019). Producción de electricidad empleando *Acidithiobacillus ferrooxidans* a partir de iones tiosulfato y férrico. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 85, 3–13.
- Juncos, R., Arcagni, M., Rizzo, A., Campbell, L., Arribére, M., y Guevara, S. R. (2016). Natural origin arsenic in aquatic organisms from a deep oligotrophic lake under the

- influence of volcanic eruptions. *Chemosphere*, 144, 2277–2289. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.10.092>
- Kamat, S. V. (2000). *Hydrobiological studies of two temple ponds in Ponda Taluka, Goa*. 6, 361–362.
- Karaytuğ, S., y Boxshall, G. (1998). The Paracyclops fimbriatus-complex (Copepoda, Cyclopoida): A revision. *Zoosystema*, 20(4), 563–602.
- Karaytuğ, S., y Boxshall, G. (1999). Antennules of the Male of Paracyclops (Copepoda): Functional Significance and Their Importance in Systematics. *Journal of Crustacean Biology*, 19, 86–92. <https://doi.org/10.2307/1549244>
- Karlsson, K., y Winder, M. (2020). Adaptation potential of the copepod Eurytemora affinis to a future warmer Baltic Sea. En *Ecology And Evolution* (Vol. 10, Número 11, pp. 5135–5151). WILEY. <https://doi.org/10.1002/ece3.6267>
- Kjørboe, T. (2006). Sex, sex-ratios, and the dynamics of pelagic copepod populations. *Oecologia*, 148, 40–50. <https://doi.org/10.1007/s00442-005-0346-3>
- Kipp, R. M., Larson, J., Makled, T. H., y Fusaro, A. (2019). *Eubosmina maritima* P. E. Müller, 1867: U.S. Geological Survey, Nonindigenous Aquatic Species Database. <https://nas.er.usgs.gov/queries/factsheet.aspx?SpeciesID=2370>
- Krupa, E. (2005). Population Densities, Sex Ratios Of Adults, And Occurrence Of Malformations In Three Species Of Cyclopoid Copepods In Waterbodies With Different Degrees Of Eutrophy And Toxic Pollution. *Journal of Marine Science and Technology*, 13, 1–12.
- Kurbatova, S. A. (2005). Response of microcosm zooplankton to acidification. *Hydrobiology*, 32, 85–92.
- Laakmann, S., Gerdt, G., Erler, R., Knebelberger, T., Arbizu, P. M., y Raupach, M. (2013). Comparison of molecular species identification for North Sea calanoid copepods (Crustacea) using proteome fingerprints and DNA sequences. *Molecular Ecology Resources*, 13.
- Luo, A., Zhang, A., Ho, S. Y., Xu, W., Zhang, Y., Shi, W., Cameron, S. L., y Zhu, C. (2011). Potential efficacy of mitochondrial genes for animal DNA barcoding: A case study using eutherian mammals. *BMC Genomics*, 12(1), 84. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-84>
- Margaryan, A., Panosyan, H., y Popov, Yu. (2010). Isolation and Characterization of New Metallotolerant Bacilli Strains. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 24(sup1), 450–454. <https://doi.org/10.1080/13102818.2010.10817881>
- Martínez-Montoya, J. F. (2005). *Un enfoque multiescala en la cartografía y génesis de suelos yesosos de San Luis Potosí, México* [Tesis Doctoral]. Universitat de Lleida.
- Martínez-Villegas, N., Briones-Gallardo, R., Ramos-Leal, J. A., Avalos-Borja, M., Castañón-Sandoval, A. D., Razo-Flores, E., y Villalobos, M. (2013). Arsenic mobility controlled by solid calcium arsenates: A case study in Mexico showcasing a potentially widespread environmental problem. En *Environmental Pollution* (Vol. 176, pp. 114–122). Elsevier Sci LTD. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.12.025>
- Mendoza-Chávez, Y. J. (2016). *Especies de zooplancton presentes en agua contaminada con arsénico en Matehuala, San Luis Potosí, México*. [Tesis de maestría]. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.
- Menéndez-Valderrey, J. L., y Lorenzo-Corchón, A. (2021). *Crustáceos. Los Copépodos (Copepoda)*. asturnatura. [www.asturnatura.com/articulos/artropodos/copepod.php](http://www.asturnatura.com/articulos/artropodos/copepod.php)
- Mercado-Salas, N., Khodami, S., Kihara, T., Elias-Gutierrez, M., y Martínez Arbizu, P. (2018). Genetic structure and distributional patterns of the genus Mastigodiatomus (Copepoda) in Mexico, with the description of a new species from the Yucatan Peninsula. *Arthropod Systematics and Phylogeny*, 76, 487–507.
- Mercado-Salas, N., y Suárez-Morales, E. (2009). A new species and illustrated records of Paracyclops Claus, 1893 (Copepoda: Cyclopoida: Cyclopinae) from Mexico. *Journal of Natural History*, 43, 2789–2808. <https://doi.org/10.1080/00222930903108462>
- Mestrot, A., Feldmann, J., Krupp, E., Hossain, M., Román-Ross, G., y Meharg, A. (2011). Field Fluxes and Speciation of Arsenic Emanating from Soils. *Environmental science*

- & *technology*, 45, 1798–1804. <https://doi.org/10.1021/es103463d>
- Milne Edwards, H. (1840). *Ordre des Copepodes*. In: *Histoire naturelle des Crustacés, comprenant l'anatomie, la physiologie et la classification de ces animaux* (Vol. 3, pp. 411–529). <https://www.biodiversitylibrary.org/page/16103940>
- MOEF. (2021). *Arsenic*. ENVIS Centre on Plants and Pollution. [nbrienvic.nic.in/Database/1\\_2035.aspx](http://nbrienvic.nic.in/Database/1_2035.aspx)
- Morán, J., Ramos-Leal, J., López-Álvarez, B., Lozada, S., y Santacruz, G. (2013). Comportamiento hidrogeoquímico de flujos subterráneos en acuíferos cársticos fracturados, aplicando modelación inversa: Caso Huasteca Potosina. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*, 65, 71–82. <https://doi.org/10.18268/BSGM2013v65n1a6>
- Moran, S. (2018). Chapter 6—Clean water characterization and treatment objectives. En S. Moran (Ed.), *An Applied Guide to Water and Effluent Treatment Plant Design* (pp. 61–67). Butterworth-Heinemann. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811309-7.00006-0>
- Naranmandura, H., Suzuki, N., y Suzuki, K. (2006). Trivalent Arsenicals Are Bound to Proteins during Reductive Methylation. *Chemical research in toxicology*, 19, 1010–1018. <https://doi.org/10.1021/tx060053f>
- Navarro-Espinoza, S., Angulo-Molina, A., Meza-Figueroa, D., López-Cervantes, J. G., Meza-Montenegro, M., Soto-Puebla, D., Silva-campa, E., Burgara-Estrella, A., Álvarez-Bajo, O., y Pedroza-Montero, M. (2021). Effects of Untreated Drinking Water at Three Indigenous Yaqui Towns in Mexico: Insights from a Murine Model. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18, 805. <https://doi.org/10.3390/ijerph18020805>
- NOAA. (2021). *What is an extremophile?* [Government]. National Ocean Service. [oceanservice.noaa.gov/facts/extremophile.html](http://oceanservice.noaa.gov/facts/extremophile.html)
- Oliart-Ros, R. M., Manresa-Presas, Á., y Sánchez-Otero, M. G. (2016). Utilización de microorganismos de ambientes extremos y sus productos en el desarrollo biotecnológico. *CienciaUAT*, 11, 79–90.
- Ongley, E. D. (1997). *Lucha Contra la Contaminación Agrícola de los Recursos Hídricos*. FAO.
- Oram, B. (2020). Nitrates in the Environment [Environmental Consultants Inc.]. *Water Research Center*. <https://water-research.net/index.php/nitrates-in-the-environment>
- O'Riordan, J. (1990). *Water Quality: Ambient Water Quality Criteria for Fluoride*. Ministry of Environment. <https://www2.gov.bc.ca/gov/content/environment/air-land-water/water/water-quality/water-quality-guidelines/approved-water-quality-guidelines>
- Ortega-Guerrero, M. A. (2009). Presencia, distribución, hidrogeoquímica y origen de arsénico, fluoruro y otros elementos traza disueltos en agua subterránea, a escala de cuenca hidrológica tributaria de Lerma-Chapala, México. *Revista mexicana de ciencias geológicas*, 26, 143–161.
- Osuna-Martínez, C. C., Armienta, M. A., Bergés-Tiznado, M. E., y Páez-Osuna, F. (2021). Arsenic in waters, soils, sediments, and biota from Mexico: An environmental review. *Science of The Total Environment*, 752, 142062. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142062>
- Patel, H., y Vashi, R. T. (2015). Chapter 2—Characterization of Textile Wastewater. En H. Patel & R. T. Vashi (Eds.), *Characterization and Treatment of Textile Wastewater* (pp. 21–71). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802326-6.00002-2>
- Pelallo-Martínez, N. A. (2006). *Comportamiento químico de arsénico en sedimentos de sistemas acuáticos contaminados* [Tesis Doctoral]. UASLP.
- Perea-Dallos, M., González, T., Campos-Mosos, H., Guillot-Monroy, G., y Cogua-Suárez, J. E. (2007). *Los seres vivos: Morfología, fisiología, genética, ecología y biotecnología*. Universidad Nacional de Colombia.
- Peters, G. R., McCurdy, R. F., y Hindmarsh, J. T. (1996). Environmental Aspects of Arsenic Toxicity. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 33(6), 457–493. <https://doi.org/10.3109/10408369609080055>

- Petrusevski, B., Sharma, S., Schipper, J. C., y Shordt, K. (2007). *Arsenic in drinking water* [Miscellaneous]. IRC International Water and Sanitation Centre.
- Podgorski, J., y Berg, M. (2020). Global threat of arsenic in groundwater. *Science*, 368(6493), 845. <https://doi.org/10.1126/science.aba1510>
- Prajapati, S. (2018). Making Sense of Conductivity, TDS, and Concentration in Water Treatment. *Sensorex*.
- Primack, R. B. (2002). *Introducción a la biología de la conservación* (J. Ros, Trad.; 1ra.). Editorial Ariel.
- Quiroz-Martínez, H., Rodríguez-Castro, V. A., Universidad Autónoma de Nuevo León., & Dirección de Publicaciones. (2006). *Bioindicadores de contaminación en sistemas acuáticos: Insectos acuáticos*. Universidad Autónoma de Nuevo León, Dirección de Publicaciones.
- Rahman, M. A., Hasegawa, H., y Lim, R. P. (2012). Bioaccumulation, biotransformation and trophic transfer of arsenic in the aquatic food chain. *Environmental Research*, 116, 118–135. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2012.03.014>
- Ramírez, M., Carlos, E., y Rodríguez, D. (2009). *Sistema para la Identificación de Aguas en Pozos Petroleros (SIAPP)*. Universidad de las Ciencias Informáticas.
- Ravenscroft, P., Brammer, H., y Richards, K. (2009). Arsenic Pollution: A Global Synthesis. *RGS-IBG Book Series*, 1. <https://doi.org/10.1002/9781444308785>
- Razo, I., Carrizales, L., Castro, J., Díaz-Barriga, F., y Monroy, M. (2004). Arsenic and Heavy Metal Pollution of Soil, Water and Sediments in a Semi-Arid Climate Mining Area in Mexico. *Water, Air, and Soil Pollution*, 152(1), 129–152. <https://doi.org/10.1023/B:WATE.0000015350.14520.c1>
- Reddy, P., y Raju, N. (2012). *Gel-Electrophoresis and Its Applications*. <https://doi.org/10.5772/38479>
- Reid, J. W. (1986). Some usually overlooked cryptic copepod habitats. *Sylogus*, 58, 594–598.
- Remmani, R., Makhloufi, R., Miladi, M., Ouakouak, A., Canales, A., y Núñez-Gómez, D. (2021). Development of Low-Cost Activated Carbon towards an Eco-Efficient Removal of Organic Pollutants from Oily Wastewater. *Polish Journal of Environmental Studies*, 30, 1801–1808. <https://doi.org/10.15244/pjoes/125765>
- Revenga, J. E., Campbell, L. M., Arribere, M. A., y Guevara, S. R. (2012). Arsenic, cobalt and chromium food web biodilution in a Patagonia mountain lake. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 81, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.03.014>
- Romo-Ramírez, J. R., y Cruz-Márquez, J. (2012). *Carta geológico-minera y geoquímica* (Matehuala, Clave F14-A25). Servicio Geológico Mexicano.
- Rubio Franchini, I., López-Hernández, M., Ramos-Espinosa, M., y Rico-Martínez, R. (2015). Bioaccumulation of Metals Arsenic, Cadmium, and Lead in Zooplankton and Fishes from the Tula River Watershed, Mexico. *Water, Air, & Soil Pollution*, 227. <https://doi.org/10.1007/s11270-015-2702-1>
- Samadzadeh Yazdi, M. R., y Khodadadi Darban, A. (2010). *Effect of arsenic speciation on remediation of arsenic-contaminated soils and waters*. 1071. [http://inis.iaea.org/search/search.aspx?orig\\_q=RN:41131222](http://inis.iaea.org/search/search.aspx?orig_q=RN:41131222)
- Sharma, V. K., y Sohn, M. (2009). Aquatic arsenic: Toxicity, speciation, transformations, and remediation. *Environment International*, 35(4), 743–759. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.01.005>
- Shibata, Y., Sekiguchi, M., Otsuki, A., y Morita, M. (1996). Arsenic Compounds in Zoo- and Phyto-plankton of Marine Origin. *Applied Organometallic Chemistry*, 10(9), 713–719. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0739\(199611\)10:9<713::AID-AOC536>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0739(199611)10:9<713::AID-AOC536>3.0.CO;2-U)
- Smedley, P. L., y Kinniburgh, D. G. (2002). A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Applied Geochemistry*, 17(5), 517–568. [https://doi.org/10.1016/S0883-2927\(02\)00018-5](https://doi.org/10.1016/S0883-2927(02)00018-5)
- SMN. (2020). *Estación 24021*. CONAGUA.
- Souza, V., Segura, A., y Foster, J. (2020). *Astrobiology and Cuatro Ciénegas Basin as an*

- Analog of Early Earth*. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-46087-7>
- Sposito, G. (2008). *The Chemistry of Soils* (2nd.). Oxford University Press, Inc. <http://base.dnsgb.com.ua/files/book/Agriculture/Soil/The-Chemistry-of-Soils.pdf>
- Suárez-Morales, E. (1996). *Clave de identificación ilustrada de los copépodos pláncnicos (Crustacea) de la Bahía de la Ascensión, Chetumal, Q. Roo*. 17, 25–39.
- Tanner, C. C., Craggs, R. J., Sukias, J., y Park, J. (2005). Comparison of maturation ponds and constructed wetlands as the final stage of an advanced pond system. *Water Science & Technology*, 51(12), 307–314. <https://doi.org/10.2166/wst.2005.0489>
- Töpfer, T., Gamauf, A., y Haring, E. (2011). Utility of arsenic-treated bird skins for DNA extraction. *BMC Research Notes*, 4(1), 197. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-197>
- Torres-Orozco, R. E., y Zanatta, S. A. (1998). Species composition, abundance and distribution of zooplankton in a tropical eutrophic lake: Lake Catemaco, México. *Revista de Biología Tropical*, 46(2), 285–296.
- USGS. (2016). Saline water. *The USGS water science school*. <https://water.usgs.gov/edu/saline.html>
- Van Egmond, W. (2021). Rotifers. *Microscopy-UK*. <http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/indexmag.html?http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/wimsmall/rotidr.html>
- Ventura-Lima, J., Bogó, M. R., y Monserrat, J. M. (2011). Arsenic toxicity in mammals and aquatic animals: A comparative biochemical approach. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(3), 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.11.002>
- Villalba, W., Márquez, B., Troccoli, L., Alzolar, M., y López, J. (2017). Composición y abundancia del zooplancton en la laguna El Morro, Isla de Margarita, Venezuela. *Revista Peruana de Biología*, 24, 343. <https://doi.org/10.15381/rpb.v24i4.14062>
- Vite-Hernández, N. L. (2021). “Guía para la implementación de un prototipo de remediación de arsénico en agua subterránea en función de la innovación social: Caso El Salitral, San Luis Potosí [Tesis de maestría]. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.
- Wakao, N., Nagasawa, N., Matsuura, T., Matsukura, H., Matsumoto, T., Hiraishi, A., Sakurai, Y., y Shiota, H. (1994). Acidiphilium multivorum sp. Nov., an acidophilic chemoorganotrophic bacterium from pyritic acid mine drainage. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 40, 143–159. <https://doi.org/10.2323/jgam.40.143>
- Wang, N.-X., Liu, Y.-Y., Wei, Z.-B., Yang, L.-Y., y Miao, A.-J. (2018). Waterborne and Dietborne Toxicity of Inorganic Arsenic to the Freshwater Zooplankton Daphnia magna. *Environmental Science & Technology*, 52(15), 8912–8919. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b02600>
- WHO. (2021). *Arsenic*. World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/arsenic>
- Williamson, C. E., y Reid, J. W. (2001). 22—Copepoda. En J. H. Thorp & A. P. Covich (Eds.), *Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates (Second Edition)* (Second Edi, pp. 915–954). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012690647-9/50023-5>
- Woelfl, S., Mages, M., Mercado, S., Villalobos, L., Óvári, M., y Encina, F. (2004). Determination of trace elements in planktonic microcrustaceans using total reflection X-ray fluorescence (TXRF): First results from two Chilean lakes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378(4), 1088–1094. <https://doi.org/10.1007/s00216-003-2273-7>
- Yan, X.-P., Kerrich, R., y Hendry, M. J. (2000). Distribution of arsenic(III), arsenic(V) and total inorganic arsenic in porewaters from a thick till and clay-rich aquitard sequence, Saskatchewan, Canada. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 64(15), 2637–2648. [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(00\)00380-X](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(00)00380-X)
- Yang, H.-C., y Rosen, B. P. (2016). New mechanisms of bacterial arsenic resistance. *Biomedical Journal*, 39(1), 5–13. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2015.08.003>
- Zhao, K., Wang, L., Riseng, C., Wehrly, K., Pan, Y., Song, K., Da, L., Pang, W., You, Q., Tian, H., Liu, S., y Wang, Q. (2018). Factors determining zooplankton assemblage

difference among a man-made lake, connecting canals, and the water-origin river. *Ecological Indicators*, 84, 488–496. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.07.052>

Zhu, G., Noman, M. A., Narale, D. D., Feng, W., Pujari, L., y Sun, J. (2020). Evaluation of ecosystem health and potential human health hazards in the Hangzhou Bay and Qiantang Estuary region through multiple assessment approaches. *Environmental Pollution*, 264, 114791. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114791>

## 7. Anexos

### Anexo 1 Búsqueda sistemática de información.

En el gestor de búsqueda Web of Science se introdujeron las palabras clave: DNA + zooplankton + copepod + PCR, para una ventana de tiempo entre 1911 y 2020, para todo tipo de publicaciones.

Los resultados arrojaron: 35 documentos, siendo el primero de estos publicado en 1999. Se realizó la recolección de los archivos, lectura y filtrado de los artículos que contenían: métodos de extracción de ADN y condiciones de amplificación de ADN (PCR) para copépodos u organismos del zooplancton. Los 14 artículos con dichas características se presentan en la tabla a continuación.

General						PCR conditions							Amplification conditions	
#	Author	Year	Title	DNA (organism)	Gene	DNA extract	Taq polyme- rase	lox bu- ffer	MgCl2	Primers	C, T, A, G (nucleotide mix)	H <sub>2</sub> O	Total volu- me	Parameters
1	O. Folmer, M. Blak, W. Hoeh, R. Lutz and R. Vrijenhoek	1994	DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates	Metazoan invertebrates (acoelomates, pseudocoelomates and coelomate protostomes and deuterostomes), COI gene	COI	1 µl	4 units	5 p.l	5 µl (0.025 mol/l)	2 µl of each of the two primer stock solutions (10 µmol/l). LCO1490 and HC02198	5 p.l (2 µmol/l for each nucleotide)	n/d	29 µl	35 cycles one minute at 40 °C, and one and a half minutes at 72 °C, followed by a final extension step at 72°C for seven minutes.
2	Nancy F. Mercado Salas, Sahar Khodami, Terue C. Kihara, Manuel Elías Gutiérrez & Pedro Martínez Arbizu	2018	Genetic structure and distributional patterns of the genus Mastigodiatomus (Copepoda) in Mexico, with the description of a new species from the Yucatan Peninsula	Mastigodiatomus (Copepoda)	COI	2 µl	n/d	n/d	n/d	0.5 µl of each primer (10 pmol/µl). LCO1490, Cop-COI-2198R.	n/d	n/d	25 µl	94°C for 5 min, 94°C for 45 s, 45°C for 45 s, and 72°C for 50 s, during 38 cycles and as final elongation 72°C for 3 min.



3	Ann Bucklin, Brian D. Ortman, Robert M. Jennings, Lisa M. Nigro, Christopher J. Sweetman, Nancy J. Copley, Tracey Sutton, Peter H. Wiebe	2010	A "Rosetta Stone" for metazoan zooplankton: DNA barcode analysis of species diversity of the Sargasso Sea (Northwest Atlantic Ocean)	Cnidaria, (Hydromedusae, Siphonophora); Arthropoda (Amphipoda, Copepoda, Decapoda, Euphausiacea, Mysidacea, Ostracoda); and Mollusca (Cephalopoda, Heteropoda, Pteropoda and Chaetognatha).	COI	n/d	n/d	n/d	n/d	Cop-COI-1498F, Cop-COI-2105R, Cop-COI-2189R, Crus-COI-2198R, Crus-COI-2428R, Eup-COI-2000R, Ost-COI-1535F, LCO-1490F, HCO 2198R, Con-COI-2607R, Med-COI-2414R.	n/d	n/d	n/d	#1) 94 °C for 1 min, 45 °C for 2 min, and 72 °C for 3 min, for 40 cycles; #2) 95 °C for 3 min; then 94 °C for 45 sec, 45 °C for 1 min, and 72 °C for 1.5 min, for 35 cycles; 72 °C for 3 min.
4	Anni Djurhuus, Kathleen Pitz, Natalie A. Sawaya, Jaimie Rojas Marquez, Brianna Michaud, Enrique Montes, Frank Muller Karger, Mya Breitbart	2018	Evaluation of marine zooplankton community structure through environmental DNA metabarcoding	Maxillopoda (Copepoda)	COI and 18S rRNA	1 µl	10 µl	n/d	n/d	1 µL each of forward and reverse primers (5 µM). mlCOLintF, HCO2198.	n/d	n/d	25 µl	18S rRNA cycling parameters were 94°C for 3 min; 35 cycles at 94°C for 45 s; 65°C for 15 s; 57°C for 30 s; and 72°C for 90 s; <b>COI</b> cycling parameters were 95°C for 10 min; 16 cycles at 94°C for 10 s; 62°C for 30 s (decreasing by 1°C per cycle); 68°C for 60 s; 25 cycles at 94°C for 10 s; 46°C for 30 s; 68°C for 60 s; and 72°C for 10 min.
5	Donggu Jeon, Donghyun Lim, Wonchoel Lee and Ho Young Soh	2016	First use of molecular evidence to match sexes in the Monstrilloida (Crustacea: Copepoda), and taxonomic implications of the newly recognized and described, partly Maemonstrilla-like females of Monstrillopsis longilobata Lee, Kim &	Planktonic copepods	COI, (ITS1) – 5.8S–ITS2, and partial 28S rRNA	2 µl	n/d	n/d	n/d	1 ml each of forward and reverse primers. XcoiF, HCO2198, ITS5, ITS4, 28S-F1a, 28S-R1a.	n/d	n/d	16 µl	94 °C, 5 min + [94 °C, 40 s; 50 °C, 45 s; 72 °C, 45 s]40 + 72 °C, 7 min

			Chang,											
6	Manuel Elías Gutiérrez, Martha Valdez Moreno, Janet Topan, Monica R. Young, José Angel Cohuo Colli	2017	Improved protocols to accelerate the assembly of DNA barcode reference libraries for freshwater zooplankton	Freshwater zooplankton	COI, 28S	2 µl	0.06 µl of PlatinumTaq buffer	1.25 µl of 10X Platinum Taq buffer	0.625 µl of 50 µmol/L MgCl2	0.125 µl of each 10 µmol/L primer. M13F, M13R.	0.0625 µl of 10 µmol/L dNTP	2 µl		95°C for 1 min, followed by five cycles of (94°C for 40 s, 45°C for 40 s, 72°C for 1 min), then 35 cycles of (94°C for 40 s, 51°C for 40 s, 72°C for 1 min), and a final extension of 72°C for 5 min.
7	Javier Montero Pau, Africa Gómez and Joaquín Muñoz	2008	Application of an inexpensive and high-throughput genomic DNA extraction method for the molecular ecology of zooplanktonic diapausing eggs	Diapausing eggs	COI	2 µl	0.4-0.6 U	1 x PCR buffer	1.5-2.0 mM MgCl2	0.5 µM of each primer. LCO1490, HCO2198.	0.2 mM dNTPs		20 µl	3 min initial cycle at 94°C, followed by 35 cycles of 94°C for 45 s, 45-55°C for 1 min, and 72°C for 1 min, with a final extension of 72°C for 5 min.
8	Aideé Montiel Martínez, Jorge Ciro Pérez, Elizabeth Ortega Mayagoitia And Manuel Elías Gutiérrez	2008	Morphological, ecological, reproductive and molecular evidence for <i>Leptodiptomus garciai</i> (Osorio-Tafall 1942) as a valid endemic species	<i>Leptodiptomus novamexicanus</i> (copepod)	COI	2 µl	0.625 µl	1.25 µl	0.625 of MgCl2 (50 mM)	0.125 µl of each primer (0.01 mM). LCO1490 and HCO2198.	0.0625 µL of each dNTP (0.05 mM)	2 µL	12.5 µl	n/d

9	Sean Prosser, Arelly Martínez Arce And Manuel Elias Gutiérrez	2013	A new set of primers for COI amplification from freshwater microcrustaceans	Cladocera, Copepoda.	COI	2 µl	0.3 U	1XP latin umT aq buffer	50 mM MgCl2	10 µM of each primer. LCO1490/HCO2198, M13F and M13R, ZplankF1_t1 and ZplankR1_t1.	10 mM dNTP	10% D-(+)-trehalose dihydrate	12.5 µl	95 °C for 1 min, followed by five cycles of [94 °C for 40 s, 45 °C for 40 s, 72 °C for 1 min], then 35 cycles of [94 °C for 40 s, 51 °C for 40 s, 72 °C for 1 min] and a final extension of 72 °C for 5 min.
10	Guang K. Zhang, Frédéric J. J. Chain, Cathryn L. Abbott, Melania E. Cristescu	2018	Metabarcoding using multiplexed markers increases species detection in complex zooplankton communities	Crustacea, mollusca	COI and 18S rRNA	2 µl	1.25 U	n/d	2 mM Mg2+	0.2 µM of each forward and reverse primers. LCO1490 and HCO2198, mICOLintF and HCO2198, LCO1490 and Ill_C_R, Uni18S and Uni18SR.	0.2 µM dNTP		12.5 µl	Initial denaturation step at 95°C for 5 min, followed by 25 amplification cycles of 95°C for 30 s, 50°C for 30 s, 72°C for 90 s, and a final elongation step at 72°C for 10 min.
11	Sahar Khodami, J. Vaun McArthur, Leocadio Blanco-Bercial & Pedro Martinez Arbizu	2017	Molecular Phylogeny and Revision of Copepod Orders (Crustacea:Copepoda)	Crustacea: Copepoda	28S 18S rRNA, H3 and COI mtDNA.	2 µl	n/d	n/d	n/d	0.5 µL of each primer (10 pmol µL <sup>-1</sup> ). LCO 1490, HCO 2198 and Cop-COI-2189R (43°C). 18SE, 18SL, F1, CF2, CR1, R2. (52 °C). 28S-F1a, 28S-R1a (51°C). H3F and H3R (45 °C)	n/d	22 µL	25 µL	n/d

12	S. Laakmann, G. Gerdts, R. Erler, T. Knebelberger, P. Martinez Arbizu And M.J. Raupach	2013	Comparison of molecular species identification for North Sea calanoid copepods (Crustacea) using proteome fingerprints and DNA sequences	Calanoid copepods (Crustacea)	COI and 18S rDNA.	4 µl	n/d	n/d	n/d	n/d. F1, CF2, CR1 and R2.	n/d	n/d	25 µL	45 °C for 38–40 cycle
13	Sahar Khodami, Nancy F. Mercado Salas, Danny Tang y Pedro Martinez Arbizu	2019	Molecular evidence for the retention of the <i>Thaumatosyllidae</i> in the order Cyclopoida (Copepoda) and establishment of four suborders and two families within the Cyclopoid	Cyclopoida (Copepoda)	18S and 28S rRNA COI mtDNA	2 µL	n/d	n/d	n/d	0.5 µL of each primer (10 pmol µL <sup>-1</sup> ). LCO1490 Y Cop-COI-2189R. LCO1490 and HCO2198	n/d	9.5 µL	25 µL	18S rRNA annealing 51°C. COI mtDNA annealing 44°C
14	Su Youn Baek, Kuem Hee Jang, Eun Hwa Choi, Shi Hyun Ryu, Sang Ki Kim, Jin Hee Lee, Young Jin Lim, Jimin Lee, Jumin Jun, Myounghai Kwak, Young Sup Lee, Jae Sam Hwang, Balu Alagar Venmathi Maran, Cheon Young Chang, Il Hoi Kim, Ui Wook Hwang	2016	DNA Barcoding of Metazoan Zooplankton Copepods from South Korea	Copepods	COI	10-45 ng	0.25 U	1 x PCR buffer	3 mM MgCl <sub>2</sub>	0.25 mM of each forward and reverse primer: LCO1490, HCO2198, LCO1384, cop-COI-1498F, cop-COI-2198R, cop-COX1+20, HCO2612, Cox1, Coxr1, Coxr2.	0.75 mM of each deoxynucleotide	n/d	20µL	2 min at 95°C, 34 cycles of 20 sec at 95°C, 40 sec at 42–48°C (Table 1) and 40 sec at 72°C, and 5 min at 72°C.

## Anexo 2 Código ingresado en PHREEQC.

DATABASE c:\phreeqc\database\As\_wateq4f\_Nadia.dat  
TITLE "Especiación de Arsénico CT"

SOLUTION CT 24/04/2015

temp 22.50  
pH 6.70  
units mg/L  
density 1.03  
redox O(0)/O(-2)  
Ca 356.8  
Mg 31.78  
Na 79.40  
K 6.53  
Alkalinity 219 as HCO3-  
S(6) 1065  
As 40.17  
O(0) 1.26  
Li 0.140  
Si 22.57  
Al 0.034  
B 0.0  
Ba 0.0  
Cd 0.286  
Cu 0.0  
Fe 1.003  
Mn 0.141  
Ni 0.031  
Pb 0.0  
Se 0.499

SELECTED\_OUTPUT

-reset false  
-file Yadira-As en Club de Tiro.out  
-solution true  
-totals As  
-activities H+ H3AsO4 H2AsO4- HAsO4-2 AsO4-3 CaHAsO4 CaAsO4-  
MgHAsO4 Ca+2  
-saturation\_indices calcite gypsum ferrihydrite goethite hematite gibbsite  
diaspore haidingerite pharmacolite parascorodite scorodite ferrarisite guerinite  
# -calculate\_values (-la("H+")+0.5\*(-la("HAsO4-2"))) (-la("H+")-0.5\*(-  
la("Ca+2")))

# USER\_GRAPH 1 Activity ratio diagram

# -headings "Sampling points"  
# -axis\_titles "pH+0.5pHAsO4-2" "pH-0.5pCa+2"  
# -chart\_title "Activity ratio diagram"  
# -axis\_scale x\_axis 6 13 1 1  
# -axis\_scale y\_axis 4 10 1  
# -initial\_solutions true  
# -connect\_simulations true  
# -start  
# 10 PLOT\_XY (-la("H+")+0.5\*(-la("HAsO4-2"))), (-la("H+")-0.5\*(-

```

la("Ca+2"))
# 20 PLOT_XY -la("H+"), -la("H3AsO4")/tot("As")*100
# Generar todos los demas para las otras especies: H2AsO4- HAsO4-
2 AsO4-3 CaHAsO4 CaAsO4- MgHAsO4 Ca+2
# -end

```

```

# USER_GRAPH 1 Plot As concentrations against pH
# -headings "H3AsO4" "H2AsO4-" "HAsO4-2" "AsO4-3" "CaHAsO4"
"CaAsO4-" "MgHAsO4"
# -axis_titles "pH" "log conc"
# -chart_title "Arsenic concentrations in Gun Club"
# -axis_scale x_axis auto auto
# -axis_scale y_axis auto auto
# -initial_solutions true
# -connect_simulations true
# -start
# # Especies de As(5)
# 10 PLOT_XY -la("H+"), lm("H3AsO4")
# 20 PLOT_XY -la("H+"), lm("H2AsO4-")
# 30 PLOT_XY -la("H+"), lm("HAsO4-2")
# 40 PLOT_XY -la("H+"), lm("AsO4-3")
# 50 PLOT_XY -la("H+"), lm("CaHAsO4")
# 60 PLOT_XY -la("H+"), lm("CaAsO4-")
# 70 PLOT_XY -la("H+"), lm("MgHAsO4")
# # Especies de As(3)
# #50 PLOT_XY -la("H+"), lm("H4AsO3+")
# #60 PLOT_XY -la("H+"), lm("H3AsO3")
# #70 PLOT_XY -la("H+"), lm("H2AsO3-")
# #80 PLOT_XY -la("H+"), lm("HAsO3-2")
# #90 PLOT_XY -la("H+"), lm("AsO3-3")

# -end

```

END

```

SOLUTION CT 15/03/2016
temp 21.50
pH 6.77
pe 6.000676132
redox O(0)/O(-2)
units mg/L
density 1.03
Ca 367.36
Mg 38.81
Na 35.63
K 8.58
Alkalinity 296 as CaCO3
S(6) 3655.67
Cl 0.0
N(5) 0.0
F 0.0
As 53.23
O(0) 0.60
Li 0.166
Si 22.08

```

Al 0.0  
B 3.228  
Ba 0.0  
Cd 0.0  
Cu 0.0  
Fe 0.0  
Mn 0.1003  
Ni 0.0  
Pb 0.0  
Se 0.0

END

SOLUTION CT 09/08/2017

temp 22.75  
pH 6.85  
pe 7.549864773  
redox O(0)/O(-2)  
units mg/L  
density 1.03  
Ca 466.05  
Mg 50.57  
Na 215.61  
K 13.01  
Alkalinity 264 as HCO3-  
S(6) 2010.77  
Cl 203.44  
N(5) 61.93  
F 2.11  
As 55.11  
O(0) 3.90  
Li 0.263  
Si 26.93  
Al 0.114  
B 1.351  
Ba 0.0  
Cd 0.0  
Cu 0.0  
Fe 0.0  
Mn 0.260  
Ni 0.0  
Pb 0.0  
Se 0.0

END

SOLUTION CT 27/10/2017

temp 18.30  
pH 6.98  
pe 7.099391480  
redox O(0)/O(-2)  
units mg/L  
density 1.03

Ca	524.36
Mg	54.29
Na	282.31
K	12.53
Alkalinity 240 as HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	
S(6)	2051
Cl	188.50
N(5)	32.93
F	2.10
As	60.91
O(0)	4.20
Li	0.0
Si	16.5
Al	0.0
B	0.0
Ba	0.0
Cd	0.0
Cu	0.0
Fe	0.0
Mn	0.0
Ni	0.0
Pb	0.0
Se	0.0

END

SOLUTION CT 19/12/2017

temp	18.60
pH	7.16
pe	9.834347532
redox	O(0)/O(-2)
units	mg/L
density	1.03
Ca	449.09
Mg	53.03
Na	196.17
K	6.47
Alkalinity 318 as CaCO <sub>3</sub>	
S(6)	1875.84
Cl	178.66
N(5)	25.93
F	2.07
As	62.29
O(0)	2.58
Li	0.0
Si	22.13
Al	0.0
B	0.737
Ba	0.0
Cd	0.0
Cu	0.0
Fe	0.0
Mn	0.0
Ni	0.0



Pb 0.0  
Se 0.0

END

SOLUTION CT 20/02/2018

temp 20.48  
pH 7.05  
pe 9.347532116  
redox O(0)/O(-2)  
units mg/L  
density 1.03  
Ca 666.66  
Mg 52.74  
Na 283.20  
K 12.67  
Alkalinity 410 as HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>  
S(6) 1921.21  
Cl 182.33  
N(5) 27.88  
F 1.98  
As 56.65  
O(0) 4.33  
Li 0.81  
Si 22.13  
Al 0.05  
B 2.41  
Ba 0.0  
Cd 0.0  
Cu 0.0  
Fe 0.0  
Mn 0.0  
Ni 0.0  
Pb 0.0  
Se 0.0

END

SOLUTION CT 01/05/2018

temp 21.50  
pH 7.12  
pe 10.091277904  
redox O(0)/O(-2)  
units mg/L  
density 1.03  
Ca 185.36  
Mg 34.16  
Na 104.79  
K 6.41  
Alkalinity 250 as HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>  
S(6) 3598.63  
Cl 188.90  
N(5) 12.67

F	1.75
As	35.50
O(0)	2.24
Li	0.0
Si	2.01
Al	0.057
B	0.647
Ba	0.000525
Cd	0.0009
Cu	0.104
Fe	0.00625
Mn	0.169
Ni	0.0
Pb	0.0
Se	0.754

END

SOLUTION CT 29/08/2018

temp	21.50
pH	6.64
pe	11.514536
redox	O(0)/O(-2)
units	mg/L
density	1.03
Ca	483.98
Mg	58.11
Na	256.33
K	32.23
Alkalinity	220 as HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
S(6)	2120.5
Cl	193.0
N(5)	35.40
F	1.99
As	65.27
O(0)	4.54
Li	0.0
Si	55.87
Al	2.975
B	6.675
Ba	0.0
Cd	0.0
Cu	3.2
Fe	2.4
Mn	3.2
Ni	0.0
Pb	0.0
Se	0.0

END

### Anexo 3 Protocolo para extracción de ADN.

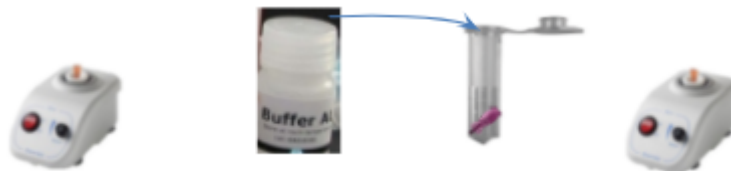
1.- La muestra se colocó en un tubo Eppendorf y se añadieron 180 µl de buffer ATL.



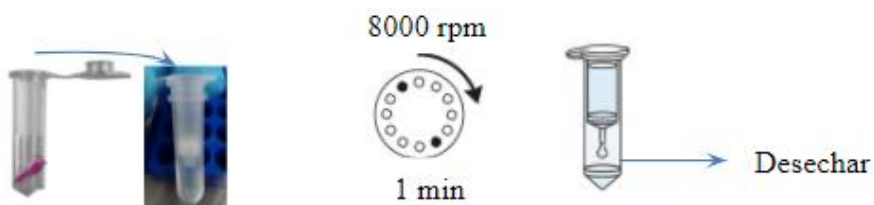
2.- Se agregaron 20 µl de proteinasa K y se agitó en el vortex. Posteriormente se llevó a 56° C en el termoblock durante 1 noche.



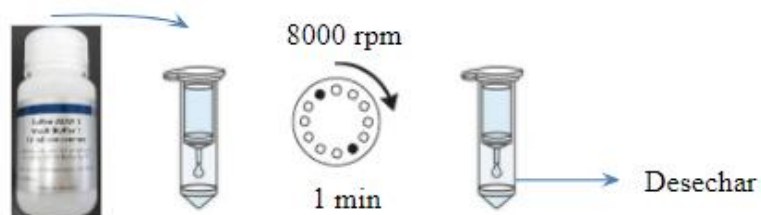
3.- Pasada la noche se agitó en el vortex. Se agregaron 200 µl del buffer AL y se agitó en vortex.



4.- El contenido del tubo Eppendorf se pasó al tubo con filtro (mini spin column) y se centrifugó a 8000 rpm x 1 min. Al terminar, el residuo en el tubo se desechó.

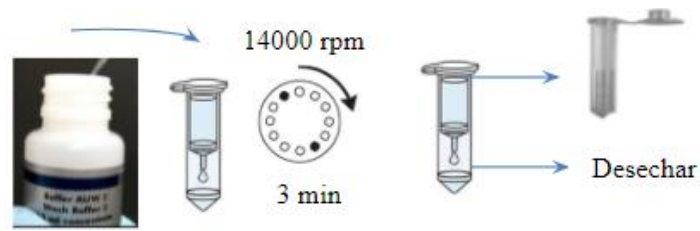


5.- (Lavado) 500 µl del buffer AW1 fueron agregados y se centrifugó a 8000 rpm x 1 min, el residuo colectado en el tubo se desechó.

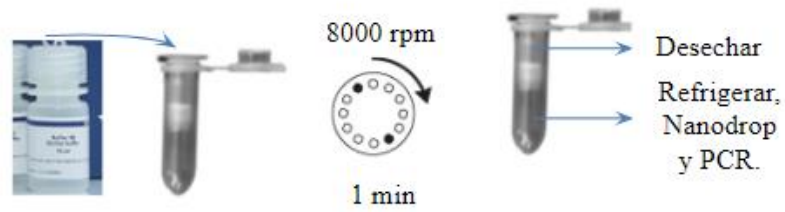


6.- (Lavado) 500 µl del buffer AW2 fueron agregados y se centrifugó a 14000 rpm x 3 min, el residuo colectado en el tubo se desechó. El mini spin column fue retirado y se

colocó en un tubo eppendorf.



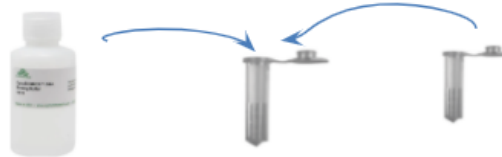
7.- 50  $\mu$ l del buffer AE fueron agregados muy cuidadosamente en el centro del filtro y se centrifugó a 8000 rpm x 1 min. Este paso se repitió una vez más.



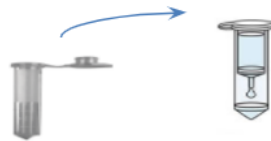
## Anexo 4 Protocolo para concentración y pureza de ADN.

Al obtener relaciones de A260/A280 fuera del rango de la pureza ideal, se decidió utilizar el kit de concentración y pureza.

1.- 500  $\mu$ l del Buffer DNA Binding y 100  $\mu$ l de muestra de ADN fueron agregados en un tubo para microcentrífuga de 1.5 ml.



2.- La mezcla se transfirió a la columna Zymo-Spin en un tubo colector.



3.- Se centrifugó por 30 segundos a 13000 xg. el flujo que se filtró fue desechado.



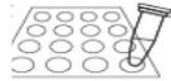
4.- 200  $\mu$ l del Buffer DNA Wash fueron agregados en la columna. Se centrifugó durante 30 segundos a 13000 xg. Este paso de lavado fue repetido.



5.- 25  $\mu$ l del Buffer DNA Elution se agregaron directamente en la columna y se incubó a temperatura ambiente por un minuto. Se transfirió la columna a un microtubo de 1.5 ml y se centrifugó por 30 segundos para eluir el ADN (13000 xg).



1 minuto



13000 xg  
30 s



Desechar  
Refrigerar,  
Nanodrop  
y PCR.



## Anexo 5 Condiciones para PCR.

Primeramente, se preparó una mezcla, llamada master mix, con los siguientes reactivos y volúmenes:

MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1.25 µl
Buffer (10x)	2.50 µl
Primer COP-COI F (10 mM)	1.25 µl
Primer COP-COI R (10 mM)	1.25 µl
dNTP (2 mM)	2.50 µl
Taq Polimerasa (5 u/µl)	0.25 µl
H <sub>2</sub> O (grado molecular)	15.00 µl, 14 µl o 11 µl

Se agregó a la master mix el ADN a amplificar para obtener volúmenes de 25 µl en total :

Master Mix	24.00 µl, 23.00 µl, 20 µl
ADN a amplificar	1.00µl, 2.00 µl o 5 µl
Total	25 µl

### PCR 1

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
1	95	60
2	40	60
3	72	90

Primers: HCO2198, LCO1490.

ADN: 1 µl de muestra 1 y 2.

Único ciclo inicial de 94 °C, durante 5 min.

30 ciclos.

Tiempo total de 2 h.

Ciclo final de elongación de 72 °C, durante 3 min.

### PCR 2

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
1	94	45
2	45	45
3	72	50

Primers: HCO2198, LCO1490.

ADN: Ensayo 1: 1 µl de muestra 1 y 2. Ensayo 2: 1 µl diluido de muestra 1 y 2.

Único ciclo inicial de 94 °C, durante 5 min.

38 ciclos.

Tiempo total de 2.5 h.  
Ciclo final de elongación de 72 °C, durante 3 min.

### PCR 3

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
1	94	45
2	45	45
3	72	50

Primers: HCO2198, LCO1490.  
ADN: 5 µl de muestra 1 y 2.  
Único ciclo inicial de 94 °C, durante 5 min.  
38 ciclos.  
Tiempo total de 2.5 h.  
Ciclo final de elongación de 72 °C, durante 3 min.

### PCR 4

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
1	95	60
2	40	60
3	72	90

Primers: COP-COIF, COP-COIR.  
ADN: 1 µl de muestra 1 y 2.  
Único ciclo inicial de 94 °C, durante 5 min.  
30 ciclos.  
Tiempo total de 2 h.  
Ciclo final de elongación de 72 °C, durante 3 min.

### PCR 5

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	94	1
2	45	1
3	72	3

Primers: HCO2198, LCO1490.  
ADN: 2 µl de muestra 1 y 2.  
Único ciclo inicial de 94 °C, durante 3 min.  
40 ciclos.  
Tiempo total de 4 h.



Ciclo final de elongación de 72 °C, durante 3 min.

### PCR 6

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	94	1
2	45	1
3	72	3

Primers: COP-COIF, COP-COIR.

ADN: 2 µl de muestra 1 y 2.

Único ciclo inicial de 94 °C, durante 3 min.

40 ciclos.

Tiempo total de 4 h

Ciclo final de elongación de 72 °C, durante 3 min

### PCR 7

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	94	1
2	45	2
3	72	3

Primers: HCO2198, LCO1490.

ADN: Ensayo 1: 1 µl de muestra 3 y 4. Ensayo 2: 2 µl de muestra 5 y 6.

Único ciclo inicial de 94 °C, durante 3 min.

40 ciclos.

Tiempo total de 5 h.

Ciclo final de elongación de 72 °C, durante 3 min.

### PCR 8

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	94	1
2	45	2
3	72	3

Primers: COP-COIF, COP-COIR.

ADN: Ensayo 1: 1 µl de muestra 3 y 4. Ensayo 2: 2 µl de muestra 1, 5 y 6.

Único ciclo inicial de 94 °C, durante 3 min.

40 ciclos.

Tiempo total de 5 h.

Ciclo final de elongación de 72 °C, durante 3 min.

## PCR 9

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	94	1
2	45	2
3	72	3

Primers: COP-COIF, COP-COIR.

ADN: Ensayo 1: 1 µl de muestra 3 y 4. Ensayo 2: 5 µl de muestra 5 y 6.

Único ciclo inicial de 94 °C, durante 3 min.

40 ciclos.

Tiempo total de 5 h.

Ciclo final de elongación de 72 °C, durante 3 min.

## PCR 10

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	94	1
2	45	2
3	72	3

Primers: COP-COIF, COP-COIR.

ADN: Ensayo 1: 1 µl de muestra 3 y 4. Ensayo 2: 2 µl de muestra 7, 8, 9 y 10.

Único ciclo inicial de 94 °C, durante 3 min.

40 ciclos.

Tiempo total de 5 h.

Ciclo final de elongación de 72 °C, durante 3 min.

## PCR 11

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
1	93	60
2	45	60
3	72	50

Primers: HCO2198, LCO1490.

ADN: Ensayo 1: 1 µl de muestra 3 y 4. Ensayo 2: 2 µl de muestra 6, 7, 8, 9 y 10.

Único ciclo inicial de 94 °C, durante 5 min.

38 ciclos.

Tiempo total de 4 h.

Ciclo final de elongación de 72 °C, durante 3 min.

## PCR 12

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	94	1
2	45	2
3	72	3

Primers: COP-COIF, COP-COIR.

ADN: 2 µl de muestra 11 a 21.

Único ciclo inicial de 94 °C, durante 5 min.

40 ciclos.

Tiempo total de 4.5 h.

Ciclo final de elongación de 72 °C, durante 3 min.

## PCR 13

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	94	1
2	45	2
3	72	3

Primers: COP-COIF, COP-COIR.

ADN: 5 µl de muestra 11 a 21.

Único ciclo inicial de 94 °C, durante 5 min.

40 ciclos.

Tiempo total de 4.5 h.

Ciclo final de elongación de 72 °C, durante 3 min.

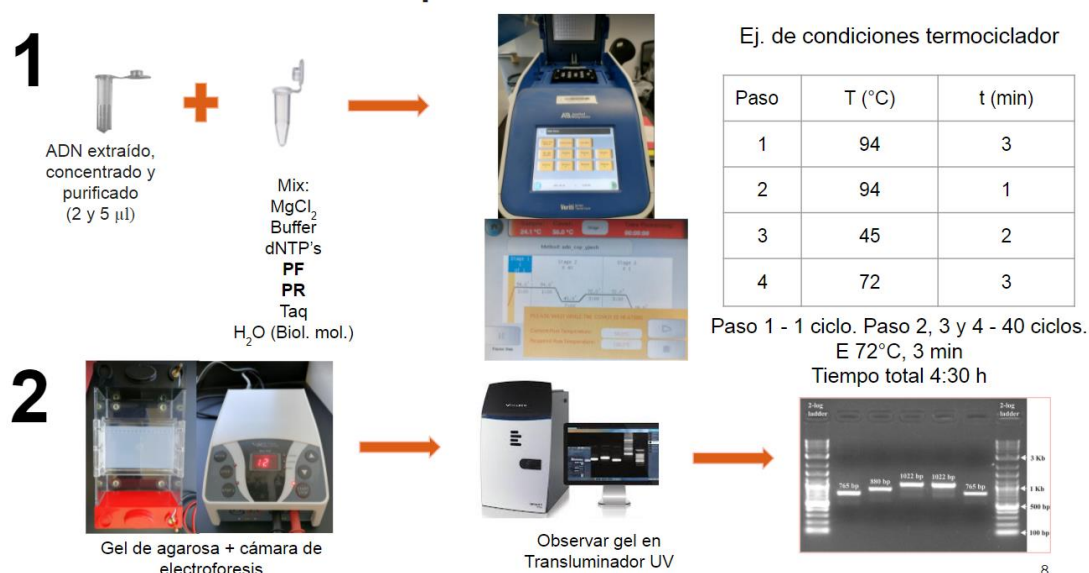
## Anexo 6 Protocolo para gel de agarosa.

Se preparó el buffer TBE 5x que consiste en mezclar 54 g de Tris-base, 27.5 g de ácido bórico y 20 ml de solución de EDTA 0.5 M (pH 8). A partir de esta solución obtuvimos TBE 0.5 %, que consiste en tomar 100 ml de TBE 5x y aforar a 1 L con agua destilada.

Posteriormente, se preparó el gel de agarosa al 1.5 %, para lo cual se necesitaron 0.60 g de agarosa y 40 ml de TBE 0.5 %, dicha mezcla se calentó en horno de microondas convencional durante 1 minuto, agitando cada 30 segundos. Una vez terminado este tiempo y bien disuelto se vació el contenido en el molde con rejillas para obtener el gel de agarosa firme.

Finalmente, con una pipeta, 5 µl de cada muestra resultado de la PCR se vertió en un pozo, mezclada previamente con 3 µl de colorante de corrida (Dye), en pozos adicionales se colocaron una escalera indicadora de bandas de pares de bases de ADN y en otro un negativo, en este caso, agua grado biología molecular.

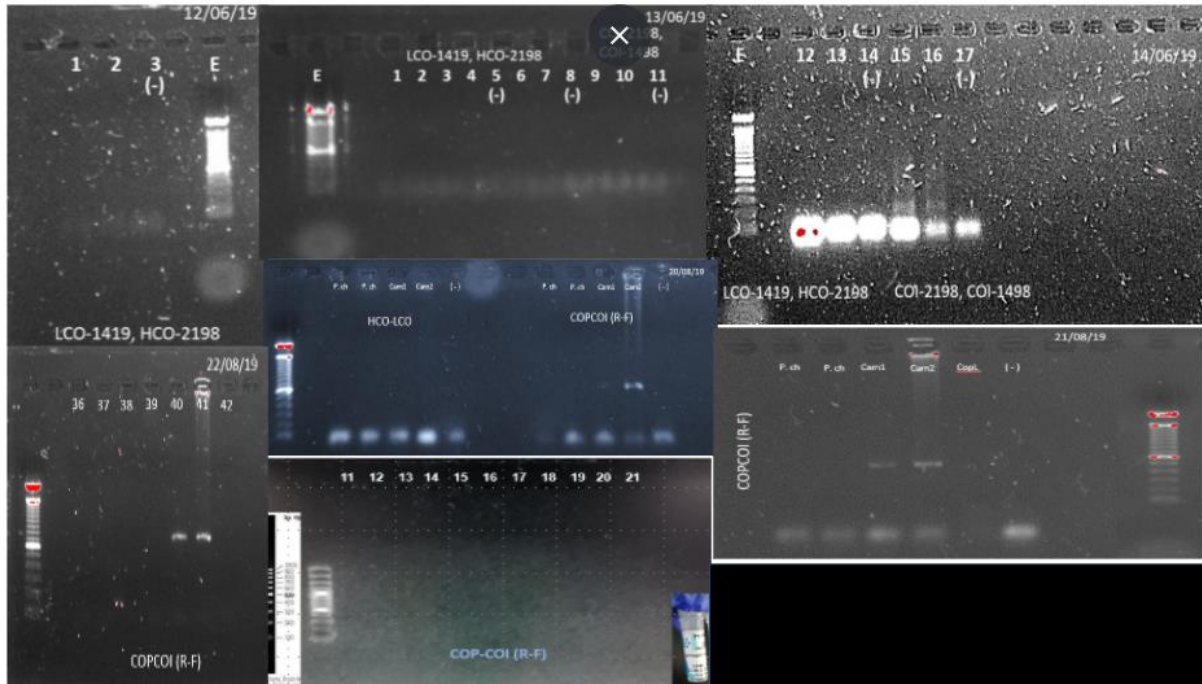
Como se muestra en la figura, cuando el gel estuvo listo se colocó en la cámara de electroforesis, conectando los cables, el cable rojo se conectó al polo positivo y el cable negro en el negativo. La fuente de energía se programó a 120 V por 45 min. Una vez transcurrido este tiempo se colocó el gel en el Transiluminador UV Modelo MacroVue UV-20 de la marca Hoefer y se conservaron las imágenes resultantes para evidencia de los resultados de estas amplificaciones.



**Figura. 1)** Síntesis del proceso de PCR, 2) Síntesis del proceso de gel de agarosa.

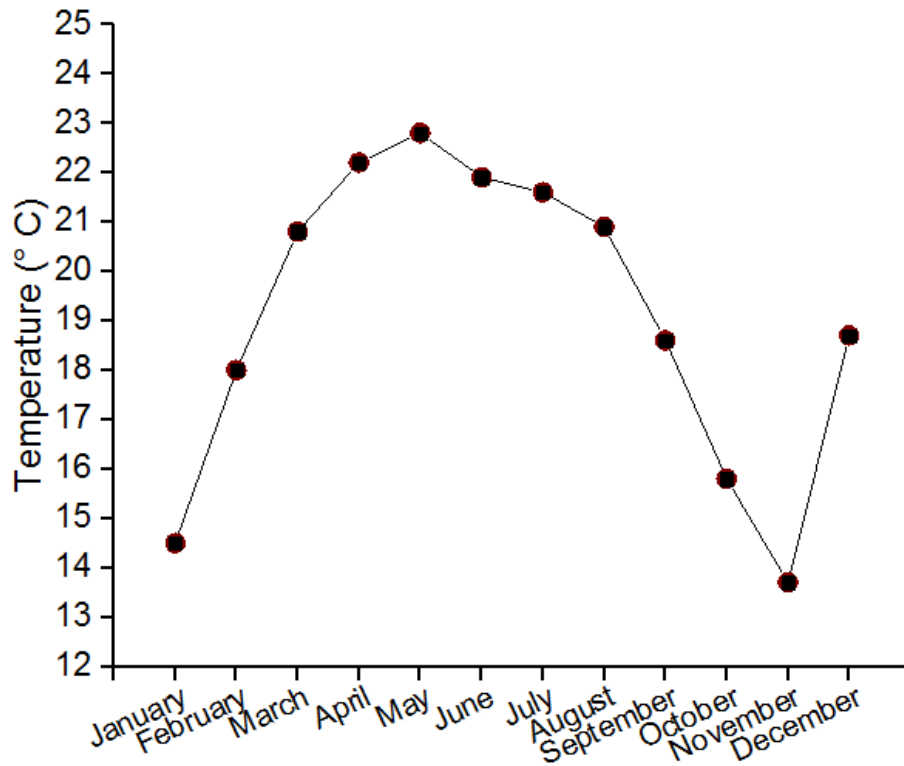
## Anexo 7 Visualización de geles de agarosa.

Después de los experimentos de amplificación para las 20 muestras, estas fueron las imágenes obtenidas en los geles de agarosa expuestos a luz UV en un transiluminador.

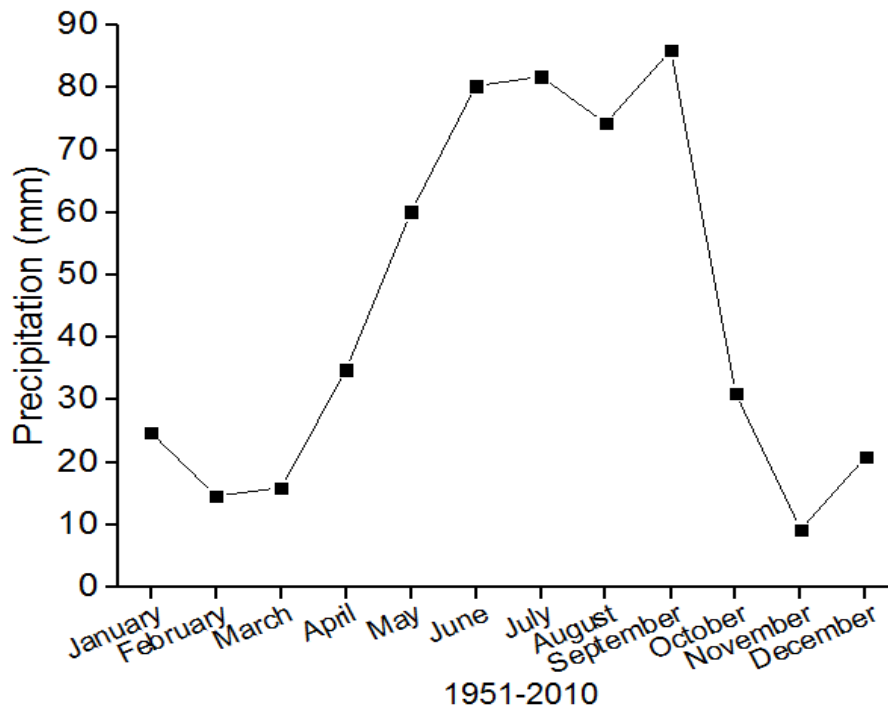


Amplificación de 20 muestras de ADN, visualizadas en electroforesis en gel de agarosa al 2 % en TBE. Marcador molecular, controles negativos, positivos y muestras de *P. chiltoni*. Se observó que únicamente las muestras de ADN de camarón amplificaron en presencia de los primers COP-COI (R-F).

## Anexo 8 Temperatura y precipitación promedio en Matehuala.



## Temperatura mensual promedio en Matehuala 22-24 años de datos



## Precipitación de lluvia mensual promedio en Matehuala 1951-2010



Contents lists available at ScienceDirect

Environmental Pollution

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/envpol](http://www.elsevier.com/locate/envpol)



## *Paracyclops chiltoni* inhabiting water highly contaminated with arsenic: Water chemistry, population structure, and arsenic distribution within the organism\*



Yadira J. Mendoza-Chávez <sup>a</sup>, José L. Uc-Castillo <sup>a</sup>, Adrián Cervantes-Martínez <sup>b</sup>, Martha A. Gutiérrez-Aguirre <sup>b</sup>, Hiram Castillo-Michel <sup>c</sup>, René Loredo-Portales <sup>d</sup>, Bhaskar SenGupta <sup>e</sup>, Nadia Martínez-Villegas <sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup> IPICYT, Applied Geosciences Department, Camino a la Presa San José 2055, Lomas 4a Secc, San Luis Potosí, 78216, Mexico

<sup>b</sup> Universidad de Quintana Roo, Unidad Cozumel, Av. Andrés Quintana Roo s/n, Cozumel, Quintana Roo, 77600, Mexico

<sup>c</sup> European Synchrotron Radiat Facil, Xray & Infrared Microspectroscopy Beamline ID21, 71 Ave Martyrs, Grenoble, F-38000, France

<sup>d</sup> CONACYT-Estación Regional del Noroeste, Instituto de Geología, Universidad Nacional Autónoma de México, Colosio y Madrid s/n, Hermosillo, Sonora, 83000, Mexico

<sup>e</sup> School of Energy, Geoscience, Infrastructure & Society, Heriot-Watt University, Water Academy, EGIS 2.02A William Arrol Building, EH14 4AS, Scotland, United Kingdom

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 10 April 2021

Accepted 12 April 2021

Available online 15 April 2021

#### Keywords:

Hydrogeochemistry

*Paracyclops chiltoni*

Water pollution

Zooplankton

Metallotolerant

### ABSTRACT

We investigated population structure and arsenic bioaccumulation and distribution in zooplankton inhabiting highly contaminated freshwater with arsenic. We collected water and zooplankton samples over a 4 year period, determined environmental temperature as well as water temperature, pH, electrical conductivity (EC), total dissolved solids (TDS), oxidation-reduction potential (ORP), dissolved oxygen (DO), major cations and anions and total arsenic concentration. We identified zooplankton species and determined their abundance, length, sex ratios, and arsenic bioaccumulation and distribution in exposed organisms. At the study site, an extremophile, *Paracyclops chiltoni*, was found to survive in an environment with high concentration of arsenic, sulfate and fluoride in freshwater as a well-adapted organism. Results showed that the average arsenic concentration in freshwater was  $53.64 \pm 10.58$  mg/L. Exposed organisms of *Paracyclops chiltoni* showed arsenic accumulation (up to  $9.6 \pm 5.4$  mgAs/kg) in its body, likely in the digestive tract as well as typical abundance and length, which showed a relationship to environmental temperature and oxic conditions in freshwater. Metallotolerant copepods might help to better understand if arsenic methylation processes occur in freshwater aquatic organisms.

© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Due to natural and anthropogenic processes and activities, arsenic (As) can be found in freshwater at concentrations that can cause stress to zooplankton, impacting their population ecology and morphology as well as their abundance, size, sex, and sex ratio (female:male), among other parameters (Conde-Porcuna et al., 2004; De la Lanza-Espino et al., 2011; Dinh et al., 2020; Karlsson

and Winder, 2020; Zhao et al., 2018; Zhu et al., 2020). Concentrations of As as high as 3 mg/L have been reported to be lethal to zooplankton experimentally (Chen et al., 1999). However, it is fairly well known that all main groups of freshwater zooplankton, cladocerans, rotifers and copepods, bioaccumulate As (Alvarado-Flores et al., 2019; Byeon et al., 2020; Caldwell et al., 2011; Caumette et al., 2012; 2014 Rubio Franchini et al., 2015). This is likely due to the biotransformation of more toxic inorganic As species to less toxic arsenobetaine and arsenosugars species, as it has been demonstrated for marine and freshwater organisms, respectively (Caumette et al., 2012, 2014).

X-ray Fluorescence (XRF) studies on cladocerans, *Daphnia pulex* inhabiting in lakes with 0.25 mg/L of As and *Daphnia magna* exposed to As in laboratory cultures, indicate arsenic accumulation

\* This paper has been recommended for acceptance by Philip N. Smith.

\* Corresponding author. IPICYT, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, Camino a la Presa San José No. 2055, Col. Lomas 4a Sec., 78216, San Luis Potosí, SLP, Mexico.

E-mail address: [nadia.martinez@ipicyt.edu.mx](mailto:nadia.martinez@ipicyt.edu.mx) (N. Martínez-Villegas).