



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

**EVALUACIÓN DE LOS MICROPLÁSTICOS EN LA LAGUNA ARRECIFAL DE  
PUERTO MORELOS, QUINTANA ROO, MÉXICO Y SUS EFECTOS EN LA BIOTA,  
TOMANDO COMO EJEMPLO UNA ESPECIE DE INVERTEBRADO BÉNTICO:  
*Ophiocoma echinata***

**T E S I S**  
**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**  
**MAESTRA EN CIENCIAS**  
**PRESENTA:**  
**Angélica Isabel Amaya Márquez**

**TUTOR PRINCIPAL**  
**Dra. Vivianne Solís Weiss**  
Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL**  
**Dr. Alfredo Laguarda Figueras**  
Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM  
**Dr. Martín Merino Ibarra**  
Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM  
**Dr. Francisco Alonso Solís Marín**  
Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM  
**Dra. Ruth Cecilia Vanegas Pérez**  
Facultad de Ciencias, UNAM

México, D.F. Diciembre, 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología  
Universidad Nacional Autónoma de México



**EVALUACIÓN DE LOS MICROPLÁSTICOS EN LA LAGUNA ARRECIFAL DE PUERTO MORELOS, QUINTANA ROO, MÉXICO Y SUS EFECTOS EN LA BIOTA, TOMANDO COMO EJEMPLO UNA ESPECIE DE INVERTEBRADO BÉNTICO: *Ophiocoma echinata***

# **TESIS**

que para obtener el grado académico de

**Maestra en Ciencias**

(Orientación Biología Marina)

presenta

**Angélica Isabel Amaya Márquez**

TUTOR PRINCIPAL

**Dra. Vivianne Solís Weiss**

Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL

**Dr. Alfredo Laguarda Figueras**

**Dr. Martín Merino Ibarra**

**Dr. Francisco Alonso Solís Marín**

**Dra. Ruth Cecilia Vanegas Pérez**

Asesor externo

**M. en C. Margarito Álvarez Rubio**

Ciudad de México, 2016

*"Hemos nacido de la comunidad terrestre y de su infinita creatividad, deleite y aventura. Nuestro estado natural es la intimidad con la comunidad que nos rodea, nuestra herencia genética nos permite tener lazos profundos con las especies, así como con los componentes no vivos del universo. Cualquier separación definitiva de esta gran comunidad es imposible y cualquier ideología que proponga que el universo no es sino un conjunto de materias primas y mercaderías solo puede ser mantenida a un precio espantoso."*

*Brian Swimme*

## CONTENIDO

<b>1. RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>2</b>
2.1. Los plásticos en ambientes marinos	
2.2. Degradación de plásticos en ambientes marinos	
2.3. Los microplásticos	
2.4. Microplásticos y contaminantes adheridos	
2.5. Hidrocarburos aromáticos policíclicos	
2.6. Fenantreno en ambientes marinos	
2.7. Efectos potenciales de contaminantes adheridos a los microplásticos en organismos bénticos	
2.8. Características de la especie utilizada en este estudio: <i>Ophiocoma echinata</i> (Lamarck, 1816)	
2.9. El programa GAME	
<b>3. HIPÓTESIS .....</b>	<b>8</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>8</b>
4.1. Objetivo general	
4.2. Objetivos particulares	
<b>5. AREA DE ESTUDIO.....</b>	<b>9</b>
<b>6. MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>11</b>
6.1. Diseño experimental	
6.2. Pellets microplásticos utilizados	
6.3. Selección de la especie de estudio	
6.4. Microplásticos como vectores de incorporación de elementos biológicos a la ingesta en <i>Ophiocoma echinata</i>	
6.5. Ingesta de los pellets microplásticos como vectores de incorporación de elementos biológicos en <i>Ophiocoma echinata</i>	
6.6. Microplásticos como vectores de incorporación de contaminantes a la ingesta en <i>Ophiocoma echinata</i>	

- 6.6.1. Exposición de pellets microplásticos a contaminantes del medio natural
- 6.6.2. Exposición de pellets microplásticos a un contaminante en condiciones de laboratorio
- 6.7. Efectos de la ingesta de los pellets microplásticos con exposición a contaminantes del medio natural y fenantreno en *Ophiocoma echinata*
- 6.8. Variables de respuesta
  - 6.8.1 Regeneración de brazo
  - 6.8.2 Pruebas de motilidad
  - 6.8.3. Supervivencia
- 6.9. Tratamiento estadístico de los datos
  - 6.9.1. Análisis de varianza ANOVA
  - 6.9.2. Supuestos de Normalidad y análisis post-hoc
  - 6.9.3. Supervivencia
- 6.10. Cuantificación y categorización de microplásticos en el área de estudio
- 6.11. Análisis de fenantreno
  - 6.11.1. Detección de fenantreno en microplásticos de poliestireno
  - 6.11.2. Detección de fenantreno en agua de los sitios de incubación de los microplásticos
  - 6.11.3. Detección de fenantreno en tejido de *O. echinata*

**7. RESULTADOS ..... 28**

- 7.1. Ingesta de los pellets microplásticos con elementos biológicos en *Ophiocoma echinata*
- 7.2. Ingesta de los pellets microplásticos con exposición a contaminantes del medio natural y fenantreno en *Ophiocoma echinata*
- 7.3. Regeneración del brazo de *Ophiocoma echinata*
- 7.4. Pruebas de motilidad en *Ophiocoma echinata*
  - 7.4.1. Tiempo de desplazamiento de *Ophiocoma echinata*
  - 7.4.2. Recuperación de la posición normal *Ophiocoma echinata*

7.5.	Supervivencia	
7.6.	Cuantificación y categorización de microplásticos en la Laguna Arrecifal	
7.7.	Detección de fenantreno por HPLC	
<b>8.</b>	<b>DISCUSION .....</b>	<b>40</b>
<b>9.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>44</b>
<b>10.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>46</b>

# 1. RESUMEN

En los ambientes marinos, la presencia de partículas plásticas conocidas como microplásticos, cuyo tamaño es inferior o igual a 5mm de diámetro, constituye un tema de investigación emergente, ya que su incorporación a ese medio va en constante aumento y el impacto que estos pueden tener sobre los organismos es aún poco conocido.

Se sabe que algunas especies animales son capaces de ingerir microplásticos, pero aún es poca la información sobre las consecuencias que podrían tener sobre ellas.

En esta tesis se presentan los resultados de los efectos de la ingestión de microplásticos bajo diferentes condiciones experimentales por un organismo béntico, el ofiuo *Ophiocoma echinata*, esto, como parte de un proyecto internacional llevado a cabo simultáneamente en 8 países (proyecto GAME).

Se tomó como modelo experimental a la especie antes referida, por ser una especie común y representativa del bentos en la zona de estudio donde se realizó el experimento: la Laguna Arrecifal de Puerto Morelos, Quintana Roo, y por reunir las cualidades necesarias para soportar las condiciones de experimentación.

Los microplásticos utilizados fueron previamente expuestos a diferentes niveles de contaminación: *in situ*, en dos sitios presumiblemente con diferentes niveles de contaminación antropogénica e *in vitro*, a una concentración conocida de fenantreno (2µL/L), realizándose la adhesión de este contaminante a los microplásticos.

Posteriormente, durante dos meses, en condiciones de laboratorio se expuso a los individuos a los microplásticos previamente tratados, utilizando los diferentes niveles de contaminación antes señalados y se midieron distintas variables de respuesta para evaluar los efectos dependientes de cada nivel de contaminación.

Finalmente, se expuso a todos los individuos a una condición de hipoxia para evaluar el tiempo de supervivencia y la relación-respuesta de los microplásticos ingeridos con diferentes niveles de contaminación. Aunque los experimentos evidenciaron respuestas diferenciadas de *O. echinata* en función de los niveles de contaminación, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en las variables evaluadas.

Se pone de manifiesto la necesidad de continuar con estos experimentos, posiblemente aumentando el tiempo de exposición y/o de concentraciones del contaminante para aseverar si las tendencias encontradas aquí se mantienen o no.

## 2. INTRODUCCION

### 2.1. Los plásticos en ambientes marinos

Aunque la sociedad se ha beneficiado ampliamente con el uso de los plásticos, el incremento considerable en su uso ha sido objeto de preocupación (Barnes *et al.*, 2009; Sivan, 2011), puesto que el uso exacerbado de material plástico ha llevado a un aumento importante en los desechos plásticos que llegan y se acumulan en todos los ambientes del planeta (Derraik, 2002; Ryan *et al.*, 2009; Andrady, 2011).

Andrady (2011) menciona que los tipos de plástico que se encuentran con frecuencia en el medio marino incluyen polietileno, polipropileno, poliestireno, nylon, teraftalato de polietileno (PET) y cloruro de polivinilo (PVC).

Arrastrados por los vientos, los ríos y finalmente por las corrientes oceánicas, (Barnes *et al.*, 2009; Cole *et al.*, 2011) los desechos plásticos pueden ser transportados a grandes distancias e incluso llegar a sitios prístinos (Ivar do Sul *et al.*, 2009) como los polos (Barnes *et al.*, 2010), islas muy alejadas y el océano profundo (Lozano y Mouat, 2009).

Las rutas por las cuales los plásticos pueden llegar al medio marino son de importancia ya que, con el transcurso del tiempo, se incrementa el potencial de degradación (Cole *et al.*, 2011; Andrady, 2011) y fragmentación; proliferando, migrando y acumulándose desde la superficie oceánica hasta los fondos marinos. (Andrady, 2011; Ivar do Sul y Costa, 2014).

### 2.2. Degradación de plásticos en ambientes marinos

Los desechos plásticos al encontrarse en el ambiente marino o costero, sufren algún tipo de degradación. Estos procesos se clasifican generalmente según el agente causante:

- (a) Biodegradación - acción de algunos organismos, generalmente microorganismos que metabolizan ciertos compuestos presentes en los plásticos (en particular los plásticos biodegradables).
- (b) Foto-degradación - acción de degradación por la luz (por lo general la luz solar) cuando están expuestos por largo tiempo.
- (c) Degradación termo-oxidativa - descomposición por oxidación lenta a temperaturas moderadas.
- (d) Degradación térmica - transformación del material plástico por la acción de altas temperaturas.
- (e) Hidrólisis - reacción química entre una molécula de agua y otra molécula, en este caso de los constituyentes del plástico.
- (f) Procesos físicos - Degradación mecánica que reduce el tamaño de los plásticos principalmente por la acción del oleaje (Andrady, 2011).

### **2.3. Los microplásticos**

Los plásticos degradados se vuelven lo suficientemente frágiles para desintegrarse en fragmentos cada vez más pequeños (Andrady, 2011) generando fragmentos de plástico minúsculos llamados microplásticos; estos son de composición variada, tales como fibras o gránulos con tamaños que van desde los 5mm a <1mm (Cole *et al.*, 2009).

Según su origen, los microplásticos se dividen en primarios y secundarios:

Los plásticos que son fabricados de un tamaño microscópico se denominan microplásticos primarios (Cole *et al.*, 2009); estos generalmente son pequeñas bolitas de resina (pellets), utilizados principalmente como materia prima ya sea en la industria textil, en productos cosméticos, en limpiadores faciales o como eliminadores de óxido y pintura utilizados en el proceso llamado “air-blasting” en inglés (Cole *et al.*, 2009).

Los microplásticos secundarios son fragmentos derivados del rompimiento de otros desechos plásticos de mayor tamaño (Thompson *et al.*, 2004; Browne *et al.*, 2007; Cole *et al.*, 2009). El efecto de los procesos físicos, biológicos y químicos (procesos anteriormente señalados) pueden reducir la integridad estructural de los desechos plásticos, dando lugar a su fragmentación (Browne *et al.*, 2007). Con la pérdida de la integridad estructural, los plásticos son cada vez más susceptibles a la fragmentación. Este proceso se repite una y otra vez con fragmentos cada vez más pequeños hasta convertirse en microplásticos (Cole *et al.*, 2009).

Por otra parte, el desarrollo de plásticos biodegradables a menudo es visto como un reemplazo viable para los plásticos tradicionales. Sin embargo, estos también pueden ser una fuente de microplásticos (Thompson *et al.*, 2006), ya que su descomposición es sólo parcial (Thompson *et al.*, 2004; Andrady, 2011; Roy *et al.*, 2011).

### **2.4. Microplásticos y contaminantes adheridos**

La posibilidad que los desechos plásticos, incluyendo los microplásticos, adsorban y concentren agentes contaminantes del ambiente marino circundante, ha sido ampliamente caracterizada en condiciones de laboratorio (Avio *et al.*, 2016).

Los contaminantes adheridos a los microplásticos, pueden ser transportados contaminando ecosistemas o ser ingeridos por los organismos marinos, transfiriendo así los contaminantes del medio ambiente hacia la biota. Esto puede ocasionar bio-acumulación tanto en niveles tróficos bajos como en organismos de niveles tróficos altos (Thompson *et al.*, 2005).

Diferentes polímeros, como el cloruro de polivinilo, polietileno, polipropileno, poliestireno, demostraron tener una alta capacidad de absorción de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs, por sus siglas en inglés), así como otros contaminantes orgánicos persistentes (POPs, por sus siglas en inglés) (Ríos *et al.*, 2007; Avio *et al.*, 2016).

## **2.5. Hidrocarburos aromáticos policíclicos**

Los PAHs, son contaminantes tóxicos ampliamente distribuidos en el medio ambiente producto de diferentes procesos industriales y de combustión. Se forman por pirólisis o combustión incompleta de compuestos orgánicos tales como combustibles fósiles. Otras emisiones proceden de la combustión de residuos y madera, así como de los vertidos de petróleo crudo o refinado. Algunos de estos compuestos son carcinógenos y/o mutágenos y posibles disruptores endocrinos (Mastandrea, 2005).

## **2.6. Fenantreno en ambientes marinos**

El fenantreno (C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>) PHE (por sus siglas en inglés) es un hidrocarburo policíclico aromático de amplia distribución (Reddy y Quinn, 1999; Neff 2002; Frost *et al.*, 2006). Es incoloro o amarillo, en forma de cristal sólido, utilizado para hacer tintes, plásticos, pesticidas, explosivos y drogas. (EPA, E.U.A., 2006).

Este contaminante ha sido detectado en plásticos provenientes del medio marino (Ríos *et al.*, 2007; Ríos *et al.*, 2010; Hirai *et al.*, 2011). Se ha demostrado que es tóxico para las diatomeas marinas, gasterópodos, mejillones, crustáceos y peces (EPA, E.A.U., 2006; Zhang *et al.*, 2014).

Es de importancia ambiental ya que Teuten *et al.*, (2007) registraron al fenantreno como el contaminante más abundante en diferentes polímeros de plástico, en el agua de mar y en sedimentos. Además, es de interés toxicológico debido principalmente a sus propiedades mutagénicas y carcinogénicas (Zhang *et al.*, 2014).

## **2.7. Efectos potenciales de contaminantes adheridos a los microplásticos en organismos bénticos**

Además de los efectos potenciales de la ingestión de microplásticos, las respuestas tóxicas también pueden ser del resultado de la lixiviación de aditivos en los plásticos y de los contaminantes extráneos adheridos a los microplásticos (Talsness *et al.*, 2009; Cole *et al.*, 2011). Esto puede llevar posteriormente a la bio-acumulación de sustancias tóxicas en las redes tróficas, siendo más vulnerables los niveles tróficos más bajos (tales como organismos bénticos suspensívoros y planctívoros) ya que son organismos que no discriminan entre dichas partículas y su alimento habitual (Hart 1991; Bolton y Havenhand 1998; Brilliant y MacDonald 2002; Thompson *et al.*, 2004; Browne *et al.*, 2008; Cole *et al.*, 2009; Graham y Thompson 2009; Wright *et al.*, 2013).

Los organismos bénticos de niveles tróficos inferiores son particularmente propensos a ingerir microplásticos ya que muchos de ellos se alimentan indiscriminadamente, es decir

con capacidad limitada para diferenciar entre partículas de plástico y alimento (Moore, 2008).

Estos organismos son buenos indicadores de perturbaciones locales, por su movilidad limitada y debido a que presentan un vínculo estrecho con el sedimento (Solís-Weiss *et al.*, 2002); a menudo participan activamente en la cadena alimenticia, por lo que pueden transferir los contaminantes hacia los niveles tróficos superiores, como los peces y eventualmente el hombre

Para los experimentos del presente proyecto, se necesitaba a una especie béntica, debido a que estos organismos se encuentran estrechamente asociados al sedimento donde se acumula gran parte de los microplásticos que entran al medio marino.

## **2.8. Características de la especie utilizada en este estudio:**

### ***Ophiocoma echinata* (Lamarck, 1816)**

*Ophiocoma echinata* (Fig. 1), es un equinodermo comúnmente conocido como “estrella serpiente” u ofiuo, cuya ficha de clasificación taxonómica es la siguiente:

Phylum Echinodermata de Bruguière, 1791  
Clase Ophiuroidea Gray, 1840  
Orden Ophiurida Müller & Troschel, 1840  
Familia Ophiocomidae Ljungman, 1867  
Género *Ophiocoma* L. Agassiz, 1835

*Ophiocoma echinata* (Lamarck, 1816) se distribuye a lo largo del Mar Caribe, desde el sur de Florida, E.U.A., hasta las costas de norte de América del Sur. Se distribuye en aguas poco profundas (<5 m) y es uno de los ofiuos más abundantes y característicos de los arrecifes de la zona. El diámetro máximo del disco puede alcanzar 25 mm con brazos de 150 mm de longitud. Al sufrir algún disturbio, *O. echinata* puede desprender alguno(s) de sus brazos, que posteriormente será regenerado. Los sexos son separados, sin dimorfismo sexual (Pomory y Lawrence, 1999; Laguarda-Figueras *et al.*, 2009).



**Figura 1.** Individuo de *Ophiocoma echinata* (Lamarck, 1816). Parte dorsal.

## **2.9. El programa GAME**

El programa GAME, (Global Approach by Modular Experiments) es un programa de capacitación internacional a nivel Maestría, que combina la investigación aplicada, con la formación de científicos.

Fue fundado en el año 2002, con sede en GEOMAR Helmholtz Centre for Ocean Research en Kiel Alemania, es uno de los institutos líder a nivel mundial en ciencias marinas. Los programas y formación de recursos humanos se especializan en todas las ramas de las ciencias del mar.

Anualmente, se realizan proyectos de investigación protocolizados que se llevan a cabo simultáneamente en diferentes lugares del mundo sobre temas ecológicos de interés actual realizándose todos ellos en regiones costeras (<http://www.geomar.de/en/research/fb3/fb3-eoe/fb3-eoe-b/game/game-about-game/>).

En 2013, año correspondiente al desarrollo del "GAME XI", por primera vez, México formó parte de dicho proyecto. En todos los países participantes (México, Chile, Brasil, Portugal, Reino Unido, Finlandia, Indonesia y Japón) se realizaron experimentos planeados con el propósito de aportar información sobre el efecto de ingestión de microplásticos contaminados, por organismos bénticos marinos.

En cada localidad se integraron equipos de dos personas, una de origen local y otra de nacionalidad alemana. Los proyectos fueron realizados simultáneamente en las siguientes localidades (Fig. 2).

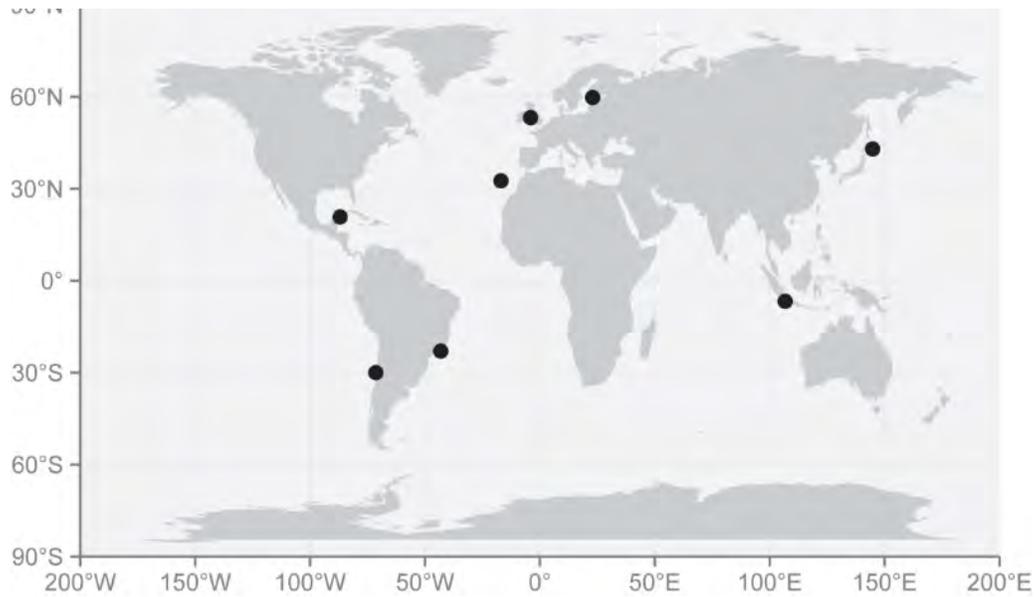
México, Puerto Morelos Q Roo.

Chile, Bahía La herradura

Portugal, Isla de Madeira

Reino Unido, Norte de Wales

Finlandia, Sur de Finlandia  
Indonesia Pari  
Japón, Hokkaido  
Brasil, Lagoa de Itaipu



**Figura 2.** Mapa de las localidades de estudio del proyecto GAME XI (2013).

Uno de los propósitos del programa es conjuntar los resultados de todos los equipos para tener una idea global del efecto del fenómeno estudiado.

En México, la localidad elegida fue la Laguna Arrecifal de Puerto Morelos Q. Roo, que corresponde a un ambiente tropical arrecifal de bajo impacto antropogénico que complementa satisfactoriamente a los demás sitios elegidos a nivel internacional.

### **3. HIPÓTESIS**

Se espera que la ingesta de microplásticos con contaminantes adheridos afectará la buena salud e inclusive la supervivencia del ofiuero *Ophiocoma echinata*.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1. OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto de los microplásticos contaminados sobre el ofiuero *Ophiocoma echinata*, especie béntica proveniente de la Laguna Arrecifal de Puerto Morelos Quintana Roo, México.

#### **4.2. OBJETIVOS PARTICULARES**

- a) Identificar la mejor estrategia de alimentación para el organismo béntico, proporcionando microplásticos con diferentes elementos biológicos bajo condiciones experimentales.
- b) Suministrar microplásticos con contaminantes adheridos a la ingesta del organismo béntico bajo condiciones experimentales.
- c) Determinar si la ingesta de los microplásticos con los vectores contaminantes adheridos, ocasiona alteraciones en el organismo béntico realizando diferentes pruebas fisiológicas.
- d) Evaluar la tolerancia de los organismos a condiciones de hipoxia midiendo el tiempo de supervivencia relacionado con la ingesta de los microplásticos con contaminantes adheridos.
- e) Cuantificar y categorizar los microplásticos de un intervalo de 500  $\mu\text{m}$  a 5 mm de diámetro, presentes en el sedimento de la Laguna Arrecifal de Puerto Morelos, tanto en la zona intermareal como en la zona submareal.

## 5. AREA DE ESTUDIO

La Laguna Arrecifal (Fig. 3), se encuentra en la costa caribeña de la Península de Yucatán frente al poblado de Puerto Morelos, a 32 km al sur de la ciudad de Cancún en el estado de Quintana Roo (21° 00' 00 " - 20° 48' 33" N y 86° 53' 14.40 " - 86 ° 46' 38.94" O) (Dreckmann *et al.*, 1996; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010). Está delimitada por dos bocas una al Norte y una al Sur que la comunican con el mar abierto (Ruíz-Rentería *et al.*, 1998).

El fondo de la Laguna Arrecifal está compuesto principalmente por arena calcárea estabilizada por amplias praderas de pastos marinos, donde domina *Thalassia testudinum*, aunque en algunas partes aflora el pavimento calcáreo. La temperatura del agua es típicamente más alta de julio a septiembre (29.4-29.5 °C), y baja durante enero a marzo (25.1-25.8 °C) (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010).

La circulación es paralela a la costa, con cambios bruscos de velocidad y dirección debido particularmente a los vientos dominantes (en mayoría del Sureste y en invierno del Norte). Se estima que el recambio total del agua de la laguna ocurre varias veces al día (Ruíz-Rentería *et al.*, 1998).

La laguna se extiende desde la línea de costa hasta la barrera arrecifal que corre ligeramente en diagonal a una distancia de 400 a 800 m de la línea costa. La profundidad máxima en la Laguna Arrecifal es de 4 m. El arrecife coralino (Arrecife de Puerto Morelos) se encuentra integrado al Gran Cinturón de Arrecifes del Atlántico Tropical, conocido como la segunda Barrera Arrecifal más grande del mundo (Canul, 2004).

Es una Área Natural Protegida desde 1998 y declarado sitio Ramsar en 2004 por su importancia como humedal, ya que la zona presenta manglares, además de una zona arrecifal con presencia importante de pastos marinos.

La fase de experimentación del presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Ecología y Biodiversidad de Invertebrados Marinos en la Unidad Académica de Sistemas Arrecifales (UASA) del ICML de la UNAM, ubicada en la parte Norte del poblado de Puerto Morelos.



**Figura 3.** Mapas de localización del área de estudio y sitios de incubación de los pellets microplásticos. Izquierda: Localización de Puerto Morelos entre las ciudades de Cancún y Playa del Carmen. Derecha: Laguna Arrecifal de Puerto Morelos y ubicación de la UASA, ICM.L, UNAM (sitio con contaminación antropogénica baja), la Marina “El Cid” (sitio con contaminación antropogénica alta) y Punta Brava (sitio de muestreo para microplásticos). Imágenes tomadas de Google Maps.

## 6. MATERIALES Y METODOS

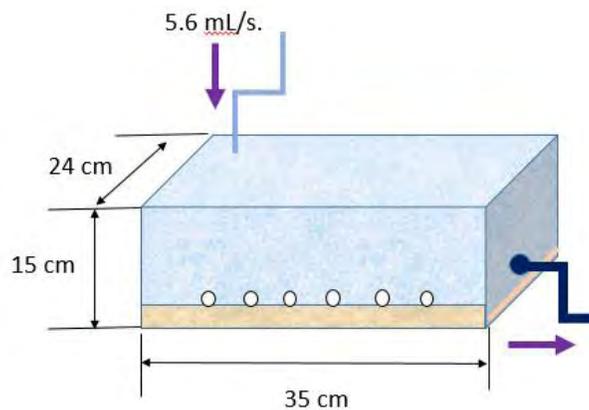
### 6.1. Diseño experimental

El diseño experimental se deriva del protocolo acordado entre todos los integrantes del proyecto internacional GAME XI (2013), en el que los experimentos se debían llevar a cabo simultáneamente en los 8 países participantes, con el mismo objetivo e intentando ser lo más similares posibles entre sí.

Para la realización de los experimentos, se establecieron condiciones experimentales necesarias para el proyecto, que consistieron en el diseño, instalación y operación de los acuarios.

En el espacio de experimentación se instaló un sistema de recirculación constante de agua marina proveniente de la Laguna Arrecifal para alimentar a 80 acuarios requeridos para los experimentos.

Simultáneamente, se diseñaron e instalaron las tuberías y todo el sistema de recirculación de agua para los 80 acuarios individuales consistentes en recipientes de 35 cm x 24 cm x 15 cm, con capacidad de 12 L y sometidos a un flujo de 5.6 mL/s (Fig. 4).



**Figura 4.** Esquema de los acuarios utilizados. Las flechas indican el flujo de entrada y salida del agua.

### 6.2. Pellets microplásticos utilizados

En el presente trabajo se eligió utilizar el término pellets microplásticos, para describir adecuadamente a los gránulos plásticos empleados en el experimento.

Los pellets microplásticos utilizados para todos los experimentos fueron de poliestireno industrial virgen (BASF, Styropor P 326) estandarizados de entre 0.7mm a 0.9 mm de

diámetro (Fig. 5) se eligió este material ya que Teuten *et al.*, (2009) reportan que adsorbe más contaminantes orgánicos que el PVC o el polipropileno, Brien (2007) señala que es uno de los cinco tipos de polímeros de mayor producción (cerca del 90% de la demanda total de plásticos) y finalmente Andrady (2011) menciona que es comúnmente encontrado en ambientes marinos. Además, su alta densidad, 1.05 kg/L, (Andrady 2011), favorece que se hunda este tipo de material y por lo tanto aumenta su disponibilidad para los organismos bénticos.

Lee *et al.*, (2014) recomiendan utilizar de preferencia poliestireno por tener una alta capacidad de adsorción para muchos POP's (incluyendo al fenantreno) comparado con el polietileno y polipropileno; por lo tanto, los microplásticos utilizados para el presente experimento podrían ser considerados un material adecuado para el propósito de adsorción de contaminantes.

Su forma esférica los hizo de fácil identificación en los organismos analizados, ya fuese en su contenido estomacal o en heces. Sin embargo, al momento de agregar los pellets microplásticos al agua, sólo entre el 50% y 60% permanecieron en el fondo mientras que el resto flotaba. Con observaciones más detalladas al microscopio se pudo distinguir que algunos pellets microplásticos eran defectuosos ya que contenían pequeñas burbujas de fabricación.

Para conseguir una separación por densidad de los pellets microplásticos y utilizar solo aquellos que tuvieran tendencia a hundirse, se preparó una solución de agua de mar artificial (35mg NaCl/L) con el fin de sumergirlos en ella y conservar solo aquellos que se mantuvieran en el fondo.



**Figura 5.** Fotografía de los pellets microplásticos utilizados.

### **6.3. Selección de la especie de estudio**

Como antecedente, se realizó la búsqueda de la especie apta para llevar a cabo la fase de experimentación del proyecto. Se recorrió la zona intermareal y la zona submareal de la Laguna Arrecifal para recolectar organismos susceptibles de ser utilizados en el experimento.

Las características principales para la selección fueron: organismos robustos, numerosos en el ambiente de estudio, bénticos, que pudieran estar en contacto con microplásticos en su

ambiente natural, adaptables a la vida en acuarios y que fueran representativos de la fauna de la zona de estudio.

Se encontraron cinco especies (Tabla1) que cumplieron con los criterios estipulados.

**Tabla 1.** Potencial de ingestión de pellets microplásticos por diferentes especies de organismos bénticos.

<b>Especie</b>	<b>n</b>	<b>Ingestión de pellets microplásticos</b>
- <i>Eupolyornia rullieri</i> (Polychaeta)	10	No
- <i>Ophiocoma echinata</i> (Echinodermata)	4	Si
- <i>Ophioderma</i> sp. (Echinodermata)	3	No
- <i>Ophiocoma wendtii</i> (Echinodermata)	4	Si
- <i>Ocypode quadrata</i> (Crustacea)	4	No

Todos los organismos fueron recolectados en la Laguna Arrecifal (20° 50' 66" N 86° 52' 21" O), utilizando buceo SCUBA, a excepción de los cangrejos de la especie *Ocypode quadrata* que fueron atrapados sobre la línea de playa. Los organismos se aclimataron en tinas de 200 L durante siete días, con agua de mar proveniente de la Laguna Arrecifal con una temperatura de 26.3°C, una salinidad de 35.7 PSU y 8.2 ‰ O<sub>2</sub> (sin alimentación adicional).

Posteriormente las cinco especies pre-seleccionadas se expusieron durante 10 días a las siguientes condiciones experimentales:

Acuarios individuales equipados con 1 kg de sedimento seco, 20 000 pellets microplásticos prístinos (equivalente a 4.616 g de pellets por cada kg de sedimento seco) colocando un individuo de cada especie.

Se corroboró la ingestión de los microplásticos (Fig. 6) con la disección de los organismos. Para esto se narcotizaron con MgCl<sub>2</sub> al 7.5% (Wollerman *et al.*, 2010) y así se evitó que liberaran su contenido estomacal por causas de estrés.



**Figura 6.** Fotografías de los microplásticos ingeridos por *Ophiocoma echinata*.

Con base en los resultados observados (Tabla 1.), se seleccionó a la especie *Ophiocoma echinata* ya que reunía todas las condiciones requeridas para el experimento.

#### **6.4. Microplásticos como vectores de incorporación de elementos biológicos a la ingesta en *Ophiocoma echinata***

Ya que los microplásticos actúan como vectores para la colonización de bacterias en su superficie además que se han demostrado procesos de interacción con algas (Long *et al.*, 2015) y con material orgánico (Van Cauwenberghe *et al.*, 2015), se realizó un experimento piloto para investigar si las adiciones de algún elemento biológico en los microplásticos los hacían más atractivos para su ingestión por *Ophiocoma echinata*.

#### **6.5. Ingesta de los pellets microplásticos como vectores de incorporación de elementos biológicos en *Ophiocoma echinata***

Se seleccionaron 40 individuos de *Ophiocoma echinata* de tamaño corporal similar (de 1.5 a 2.1 cm) sin brazos automatizados ni incompletos.

A continuación, durante veinte días, se administraron pellets microplásticos adicionando los elementos biológicos (materia orgánica, algas filamentosas, *Artemia salina* y microplásticos prístinos) para determinar si éstos influían en la ingestión de microplásticos; se especifica que sólo los pellets microplásticos del tratamiento de materia orgánica se mantuvieron en incubación en condiciones de laboratorio durante siete días (Tabla 2).

Todos los acuarios individuales fueron equipados con 1 kg de sedimento seco, adicionando al sedimento 400 pellets microplásticos correspondientes a cada tratamiento y una teja para su protección contra la luz, simulando su ambiente natural.

La cantidad de microplásticos fue seleccionada ya que Claessens *et al.*, (2011) publican que la concentración de microplásticos encontrada en el sedimento de un ambiente marino, corresponde a 390 partículas  $\text{kg}^{-1}$  correspondiente a la cantidad similar utilizada en los experimentos.

**Tabla 2.** Tratamientos de los pellets microplásticos correspondientes a cada elemento biológico suministrado.

Tratamiento de pellets microplásticos	Procedencia del vector (elemento orgánico)	Tiempo de incubación del vector	n	Duración del experimento (ingestión de microplásticos por <i>O. echinata</i> )
Control, microplásticos prístinos.			10	20 días
Incubados con algas y pastos marinos para formación de materia orgánica sobre éstos.	Medio natural	7 días	10	20 días
Pellets con 20 g de algas filamentosas.	Medio natural	Sin incubación	10	20 días
Pellets con 2 ml de <i>Artemia salina</i> .	Medio natural	Sin incubación	10	20 días

Ya que los ofiuros son animales de actividad nocturna (Wollerman *et al.*, 2010), cada segundo día a la medianoche, cada individuo fue transferido de su acuario equipado a un recipiente con sólo agua del sistema de flujo (agua marina) para monitorear la ingestión de pellets microplásticos. Para el traspaso de cada individuo, se tomó a cada individuo con el dedo índice y el dedo pulgar, presionando suavemente la cavidad bucal y disco para impedir pérdidas del contenido estomacal. Asimismo, se enjuagó al individuo en un recipiente con agua de mar asegurando que no hubiera transporte de pellets microplásticos que no estuvieran en la cavidad estomacal.

Durante la mañana siguiente, cada individuo fue traspasado de regreso a su acuario original, y el agua contenida del recipiente fue filtrada con un tamiz de 500 µm reteniendo los pellets que cada individuo descargó durante la noche de su cavidad estomacal y posteriormente los pellets fueron contados.

Una vez a la semana el sedimento fue renovado junto con los pellets microplásticos y su elemento biológico correspondiente. Asimismo, todos los individuos fueron alimentados con 2 mL de *Artemia salina* para evitar muertes por inanición.

## 6.6. Microplásticos como vectores de incorporación de contaminantes a la ingesta en *Ophiocoma echinata*

En la literatura, se ha demostrado ampliamente que los microplásticos tienen la capacidad de adsorción de contaminantes del medio (Van Cauwenberghe *et al.*, 2015); por tal motivo, se expusieron (*in situ*) pellets microplásticos a contaminantes que estuvieran presentes en dos sitios con presuntos diferentes niveles de contaminación.

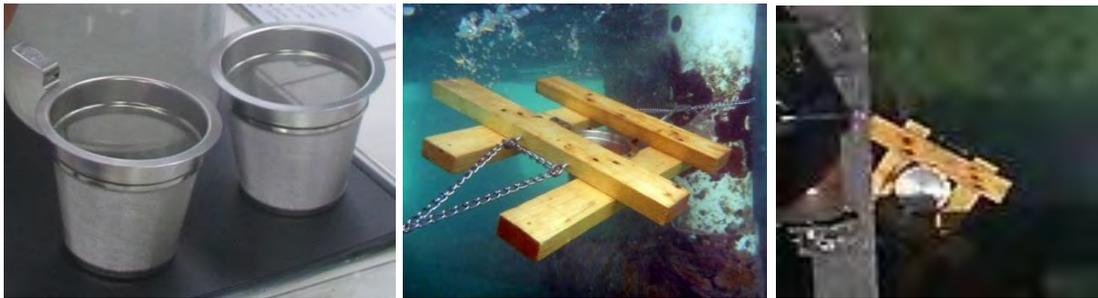
### 6.6.1. Exposición de pellets microplásticos a contaminantes del medio natural

Para obtener la adsorción de los contaminantes por los pellets microplásticos, se depositaron 20 g de pellets microplásticos en filtros de té adaptados a una base de madera flotante (Fig. 7) y se colocaron en dos sitios diferentes con presuntos niveles de contaminación antropogénica, uno de baja y uno de alta contaminación (Fig. 3).

La Marina "El Cid" (20° 82' 99" N, 86° 88' 89" O) fue elegida como un ambiente marino con presuntos niveles de contaminación altos.

El muelle de la UASA, al norte del pueblo de Puerto Morelos (20° 86' 81" N, 86° 86' 68" O) fue escogido como el ambiente con presuntos niveles de contaminación bajos.

Transcurridas dos semanas, tiempo establecido por el protocolo de investigación como suficiente para la adsorción de los contaminantes, se extrajeron los microplásticos y fueron conservados en frascos ámbar a -2 °C.



**Figura 7.** Filtros para té y balsa construida para sostenerlos y protegerlos. Fueron los utilizados en la incubación de microplásticos en los diferentes sitios presuntamente contaminados.

### 6.6.2. Exposición de pellets microplásticos a un contaminante en condiciones de laboratorio

Se simuló una situación de contaminación de los microplásticos, bajo condiciones controladas en laboratorio como referencia para examinar la cantidad de contaminante que es captada por los microplásticos y es posiblemente transferida a los tejidos de *Ophiocoma echinata*.

Se utilizó en el experimento fenantreno como contaminante referencial en concentraciones controladas ya que, como se mencionó, ha sido identificado como contaminante prioritario para una gama de polímeros de plástico en el agua de mar y sedimentos naturales (Teuten *et al.*, 2007).

Se preparó una solución “stock” de fenantreno adicionando 1mg de fenantreno en 10 ml de CH<sub>3</sub>OH. Se adicionaron 2μL de esta solución en 1 L de agua salina artificial (35grs NaCl /L agua purificada) poniéndose en un matraz.

Posteriormente se adicionaron 20 g de microplásticos, se agitaron y se conservaron en refrigeración a -2°C. Cada 24 horas el agua salina artificial con los 2 L de la solución preparada fue reemplazada para simular un recambio del agua en una situación natural. Este procedimiento se realizó durante dos semanas.

Esta concentración de fenantreno fue elegida con base en la publicación de Jensen *et al.*, (2012), quienes indican que 2μL/L constituyen una concentración realista que puede encontrarse cerca de derrames de petróleo o como agua proveniente de pozos de extracción de petróleo.

### **6.7. Efectos de la ingesta de los pellets microplásticos con exposición a contaminantes del medio natural y fenantreno en *Ophiocoma echinata***

Para este experimento, que es el experimento principal, se utilizaron 80 individuos en total para los diferentes tratamientos (Tabla 3). Los organismos se mantuvieron separados uno del otro, es decir, cada unidad experimental se colocó en un acuario individual conectado al sistema de recirculación.

**Tabla 3.** Tratamiento de microplásticos dependiente del vector de contaminación para la ingestión en *Ophiocoma echinata*.

Tratamiento previo de microplásticos	Procedencia del vector (contaminante)	Tiempo de incubación del vector	n	Duración del experimento (ingestión de microplásticos por <i>O. echinata</i> )	Lugar del experimento	Condición de estrés adicional
Sin microplásticos			20	2 meses	Laboratorio	Hipoxia
Microplásticos alta contaminación	Medio natural	2 semanas	20	2 meses	Laboratorio	Hipoxia
Microplásticos baja contaminación	Medio natural	2 semanas	20	2 meses	Laboratorio	Hipoxia
Microplásticos PHE	Laboratorio	2 semanas	20	2 meses	Laboratorio	Hipoxia

Cada acuario fue equipado con:

Un individuo de *O. echinata*.

Una teja para la protección de los individuos de la luz.

Sedimento, el cual se pesó usando el factor de conversión 1 kg de sedimento húmedo = 0.835 ml de sedimento húmedo.

Cuatrocientos microplásticos correspondientes al tipo de exposición de contaminante con el que estuvieron en contacto previamente. El número de microplásticos fue determinado con base en Claessens *et al.*, (2011), quienes refieren que se han encontrado dentro de los sedimentos hasta 391 microplásticos / kg de sedimento seco (Fig. 8).



**Figura 8.** Acuarios equipados correspondientes a cada tratamiento previo de contaminación.

El experimento tuvo una duración de dos meses, monitoreándose cada día el flujo constante de agua.

Cada dos semanas, se alimentaba a todos los individuos con 0.1 g de alimento en hojuelas para peces como sugieren Pomory y Lawrence (1999) para evitar muertes por inanición.

El procedimiento para alimentar a todos los individuos se llevaba a cabo de la siguiente manera: se tomaba 0.1g del alimento para peces utilizando unas pinzas largas. Las pinzas con el alimento se acercaban por debajo de la teja permitiendo que cada organismo usara sus brazos para tomar el alimento y así evitar pérdidas.

Al día siguiente se limpiaban cada una de las mangueras que proveían el flujo de agua a cada acuario ya que se observó la formación de algas en estas.

También se reemplazaba en cada acuario el sedimento, los microplásticos correspondientes para cada tratamiento y se limpiaba la teja utilizando un cepillo para quitar las algas, cada dos semanas.

## **6.8. Variables de respuesta**

### **6.8.1. Regeneración de brazo**

Transcurrido un mes del experimento de ingestión, se cortó un segmento de un brazo de algunos individuos de los tratamientos, para observar si la ingesta de los microplásticos asociados a diferentes niveles de contaminación tenía algún efecto sobre la regeneración del segmento.

Se seleccionaron algunos individuos (Tabla 4), correspondientes a cada tratamiento de pellets microplásticos mismos que fueron amputados entre el 8° y el 7° segmento; este fue el procedimiento utilizado por Nilsson (1999) para medir el crecimiento en el transcurso de un mes, ya que los equinodermos, en particular los ofiuros, tienen la capacidad de regeneración de brazos.

Adicionalmente, a cinco individuos que estuvieron en contacto con microplásticos pero sin contaminante también se les cortó un fragmento de brazo.

**Tabla 4.** Número de individuos y tratamiento al que fueron expuestos para medir la regeneración de brazo en el lapso de un mes.

Tratamiento	Número de individuos
Sin microplásticos	3
Alta contaminación	5
Baja contaminación	4
Contaminación artificial	4
Microplásticos prístinos	5
Total	21

### 6.8.2. Pruebas de motilidad

Se realizaron dos pruebas de motilidad para evaluar si la ingesta de microplásticos relacionados con su nivel de contaminación tenía consecuencias en la salud de los individuos.

Para esto se realizaron dos pruebas:

- a) En la primera prueba, se midió el tiempo de desplazamiento individual de *Ophiocoma echinata*.

Se colocó a un individuo de *O. echinata* en un recipiente rectangular (40 cm por 30 cm) expuesto directamente a la luz solar, y en el extremo opuesto a una distancia de 18 cm, se colocó una teja; esto con el fin de que cada organismo recorriera dicha distancia para encontrar protección de la luz, ya que instintivamente tienden a protegerse de la luz (organismos fotofóbicos). La prueba se repitió cinco veces con cada individuo y se tomó el tiempo en el que recorrieron esta distancia.

- b) En la segunda prueba se midió el tiempo en el que cada individuo se reincorporaba a su posición normal.

Se colocó a cada individuo de *O. echinata* sobre un recipiente sin agua y expuesto directamente a la luz solar con la parte ventral hacia arriba; se midió el tiempo en el que cada uno volvió a la posición normal (con la parte ventral hacia abajo) con la ayuda del movimiento de sus brazos. También la prueba se repitió cinco veces con cada individuo y se tomó el tiempo en el que cada uno realizó la prueba.

### 6.8.3. Supervivencia

Se realizó un experimento de supervivencia para determinar si el nivel de contaminación asociado a los microplásticos a los que estuvieron expuestos los individuos de *Ophiocoma echinata* tenía efecto sobre su mortandad.

El evento de interés fue la muerte de los individuos después de someterlos a una condición de hipoxia en el agua.

Nilsson (1999) se refiere a esta prueba como un factor de mortalidad en masa por el agotamiento de oxígeno.

La desoxigenación del agua se llevó a cabo a través del burbujeo de gas Nitrógeno y se monitoreó la concentración de oxígeno con un oxímetro de mano (WTW Oxi 340, sensor Cellox 325).

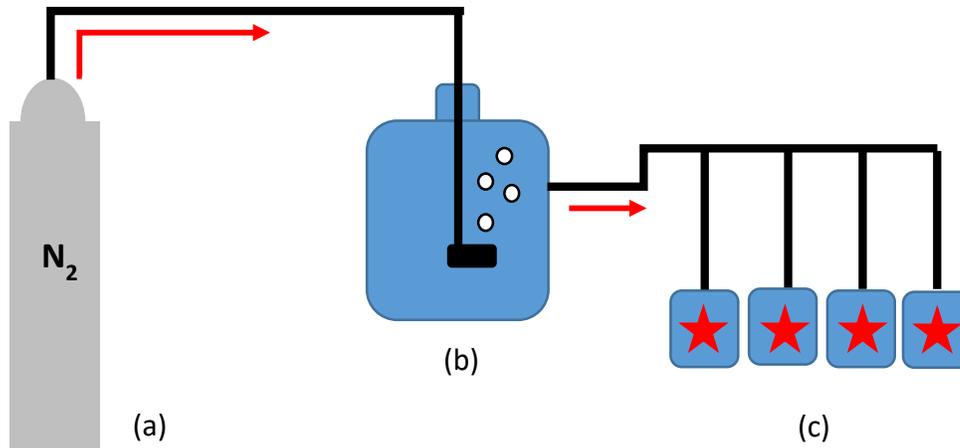
Se diseñó un sistema de flujo para la desoxigenación de agua. Para esto, se conectó con mangueras un tanque de nitrógeno a un garrafón de plástico de 20 L y se hizo pasar el gas al agua contenida en el garrafón. Posteriormente este garrafón se conectó a varios recipientes herméticos para colocar dentro a cada individuo proveniente del experimento de exposición a contaminantes del medio natural y fenantreno (Fig. 9).

La concentración de oxígeno a la cual la supervivencia de los individuos oscilaba alrededor de siete días fue de 3.0 mg/L de O<sub>2</sub> en el agua.

El agua se reemplazó cada 6 horas, para tener una concentración constante de oxígeno.

Se determinó la concentración de amonio total (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) con el equipo "JBL Ammonium Test Set NH<sub>4</sub>" ya que el amonio es uno de los factores toxicológicos ambientales más importantes debido a su toxicidad para el sistema respiratorio de organismos acuáticos: Además, es perjudicial para muchas funciones fisiológicas (Wang *et al.*, 2014).

Los resultados indicaron una concentración de amonio NH<sub>4</sub><sup>+</sup> <0.5 mg/L presente en 800mL de agua, indicando un nivel adecuado de amonio. El experimento finalizó conforme los individuos iban muriendo.



**Figura 9.** Conjunto experimental. Las flechas indican el flujo tanto de nitrógeno como de agua. a) Tanque de nitrógeno; se conectó con mangueras flexibles permitiendo el flujo de nitrógeno al recipiente con agua hasta una piedra difusora instalada en el fondo. b) Garrafón con agua; fue llenado manualmente con agua proveniente del mar, luego fue abierta la válvula del tanque de nitrógeno para burbujear el gas por la piedra difusora, obteniéndose así la concentración de 3.0 mg/L de  $O_2$ . c) Recipientes con cada uno de los individuos y agua a una concentración de 3.0 mg/L de  $O_2$ .



**Figura 10.** Fotos del experimento de la prueba de hipoxia. De izquierda a derecha: la imagen 1 muestra el garrafón con agua y el tanque de nitrógeno para obtener agua hipóxica. La imagen 2 muestra la conexión de instalación para el flujo de agua hipóxica. La imagen 3 muestra todos los individuos de *Ophiocoma echinata* conectados al flujo hipóxico. La imagen 4 muestra el detalle del recipiente utilizado para el experimento de hipoxia.

## 6.9. Tratamiento estadístico de los datos

Se utilizó el paquete estadístico STATISTICA para los análisis estadísticos relacionados con los experimentos realizados en este estudio.

### 6.9.1. Análisis de varianza ANOVA

El modelo matemático utilizado se basó en un Análisis de varianza, con una sola fuente de variación o factor que en este caso fueron los tratamientos, con este modelo se verificó la hipótesis nula de que el efecto de cada uno de los tratamientos es estadísticamente igual.

El Análisis de varianza se describe a continuación:

$$X_{ij} = \mu + \tau_j + \varepsilon_{ij} \quad i=1,2,\dots,n_j \quad j=1,2,\dots,k$$

Los términos en este modelo se definen de la siguiente forma:

$X_{ij}$  representa la observación del  $i$ -ésimo sujeto en el  $j$ -ésimo tratamiento.

$\mu$  representa la media general de todas las  $k$  medias poblacionales.

$\tau_j$  representa el efecto del  $j$ -ésimo tratamiento.

$\varepsilon_{ij}$  representa el error no explicable por el modelo.

**Tabla 5.** Tabla para el Análisis de la varianza para el diseño completamente aleatorizado.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F calculada
Tratamientos	$SCT$ $= \sum_{j=1}^k n_j (\bar{x}_{.j} - \bar{x}_{..})^2$	$k - 1$	$CMT = \frac{\sum_{j=1}^k n_j (\bar{x}_{.j} - \bar{x}_{..})^2}{k - 1}$	$\frac{CMT}{CME}$
Error	$SCE$ $= \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (x_{ij} - \bar{x}_{.j})^2$	$N - k$	$CME = \frac{\sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (x_{ij} - \bar{x}_{.j})^2}{N - k}$	
Total	$SCT$ $= \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (x_{ij} - \bar{x}_{..})^2$	$N - 1$		

El nivel de significancia empleado fue:  $\alpha = 0.05$

Si  $F_{calculada} > F(1 - \alpha / 2)$ , se rechaza  $H_0$

Si  $F_{calculada} \leq F(1 - \alpha / 2)$ , no se rechaza la  $H_0$  (Wayne, 2002).

### 6.9.2. Análisis de Normalidad

Antes de la prueba estadística, se comprobaron los supuestos de normalidad utilizando la prueba Q-Q plot de normalidad y se corroboraron los resultados con la prueba de Shapiro-Wilk empleando un nivel de significancia de  $\alpha = 0.05$  (Wayne, 2002).

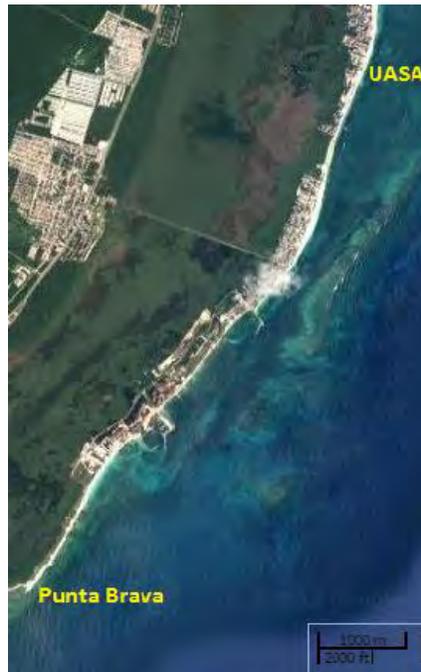
### 6.9.3. Supervivencia

El método estadístico empleado para comparar las curvas de supervivencia por tratamiento fue el procedimiento de Kaplan Meier en donde se compararon los tiempos de supervivencia empleando la prueba Logrank para verificar si existen diferencias significativas entre tratamientos, considerando un nivel de significancia de  $\alpha = 0.05$  (Wayne, 2002).

## 6.10. Cuantificación y categorización de microplásticos en el área de estudio

Se examinaron los sedimentos para determinar presencia y categoría de microplásticos presentes en el medio natural del área de estudio.

Se tomaron dos muestras, una en la zona intermareal: “Punta Brava”, 23°48’46.44”N 86°54’15.95”O, un sitio con presencia de desechos plásticos abundantes para compararlo con una muestra de la zona submareal tomada del sitio donde se recolectaron los organismos de *Ophiocoma echinata* (Fig. 11).



**Figura 11.** Sitios de muestreo para cuantificar y categorizar los microplásticos presentes.

En ambas zonas, se utilizó un nucleador de 10x10 cm de diámetro por 10 cm de alto. Se seleccionaron tres zonas, tomándose cinco réplicas de sedimento en cada una.

El sedimento recolectado se cernió a través de un tamiz de 5 mm de abertura de malla, para enseguida descartar las partículas plásticas de diámetro aproximado superior a 5 mm, posteriormente, utilizando otro tamiz de 500  $\mu\text{m}$ , se descartaron las partículas plásticas inferiores a 500 $\mu\text{m}$ .

Andrady (2011) y Thompson *et al.*, (2004) sugieren que para separar cualquier plástico del material bentónico, agua salina o sales minerales pueden ser añadidos a las muestras de sedimento para aumentar la densidad del agua, permitiendo que los microplásticos de menor densidad se separen por flotación y puedan ser identificados utilizando técnicas microscópicas.

Por lo tanto, se recuperó la fracción de entre 5 mm y 500 $\mu\text{m}$ ; esta se adicionó a una solución hipersalina (1.2gr NaCl/cm<sup>3</sup>), se agitó por 1 hora y se dejó reposar por 24 horas, con la intención de obtener una separación por densidad de los microplásticos.

Transcurridas 24 horas, se filtró únicamente el sobrenadante de la solución con la ayuda de un matraz Kitasato y una bomba de vacío. Posteriormente los microplásticos fueron observados al microscopio y separados por categorías para a continuación poder calcular su densidad (partículas/kg de sedimento seco).

Las categorías que se utilizaron para la descripción de microplásticos siguiendo los criterios de Hidalgo-Ruz (2012) fueron: fibras, películas plásticas, fragmentos, pellets, esferas y unicel.

### **6.11. Análisis de fenantreno**

El análisis del contaminante referencial fenantreno (PHE) fue realizado en el Departamento de Ecotoxicología de la Universidad Christian Albrechts, en Kiel, Alemania.

Para la detección de fenantreno se utilizó la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, por sus siglas en inglés), con un detector de fluorescencia equipado con una columna Supelcosil™ LC-PAH (15 cm 4,6 mm, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) y se utilizó como eluyente agua: acetonitrilo (40 % : 60 %) como una fase móvil de 1.5 ml / min. Los procedimientos fueron adoptados de los métodos desarrollados por Agilent Technologies (<http://www.chem.agilent.com>). Todos los disolventes utilizados para las extracciones fueron grado HPLC o equivalente.

Se determinó la concentración de fenantreno presente en microplásticos que estuvieron en incubación en los sitios con diferentes niveles de contaminación, en muestras de agua de los sitios donde se incubaron los microplásticos y en tejido de la cavidad celómica recolectado de los individuos al finalizar la prueba de hipoxia.

La curva estándar, se realizó utilizando fenantreno (Sigma-Aldrich) 5000 µg de fenantreno por/ml de metanol.

#### **6.11.1. Detección de fenantreno en microplásticos de poliestireno**

Al finalizar todos los experimentos se recolectaron 10 g de los microplásticos incubados en los sitios con diferentes niveles de contaminación, así como aquellos que estuvieron incubados artificialmente en fenantreno, los cuales se mantuvieron en refrigeración por 2 meses y 2 semanas.

A continuación, fueron trasladados a Kiel Alemania, en frascos de vidrio ámbar, por lo que no estuvieron en refrigeración de 15 a 20 horas.

El procedimiento para la detección de fenantreno fue el siguiente: un gramo de microplásticos proveniente de cada nivel de contaminación se colocó sobre un papel filtro para eliminar exceso de líquidos.

Ya sin exceso de líquido, se transfirieron a un vaso de precipitado y se agregó 6mL de hexano por cada gramo de microplásticos; se agitaron vigorosamente por cinco minutos. Se tomó el sobrenadante y se transfirió a un tubo donde se evaporó el solvente utilizando flujo de nitrógeno. Se disolvió el residuo con 500µL. de acetonitrilo y se recolectaron 200µL en un vial de HPLC, inyectando 20µL para su detección.

#### **6.11.2. Detección de fenantreno en agua de los sitios de incubación de los microplásticos**

Se recolectaron 500 mL de agua proveniente de los diferentes sitios donde se incubaron los microplásticos, el muelle de la UASA, ICML, UNAM y la “Marina el Cid”. Las muestras de agua fueron trasladadas a Kiel, Alemania en frascos de vidrio transparente y se mantuvieron sin refrigeración de 15 a 20 horas.

El procedimiento para la detección de fenantreno fue el siguiente: Ya que la concentración de fenantreno en agua es muy baja para ser detectada directamente, tiene que ser concentrada en una fase sólida (SPE solid phase extraction) utilizando las columnas del método Agilent Technologies (<http://www.chem.agilent.com>), las cuales son cartuchos hidrófobos que retienen el analito.

Las condiciones para activar cada columna (SPE-column) fueron las siguientes: se agregaron 4mL de cada uno de los solventes en el orden siguiente: diclorometano-etil acetato, metanol y agua.

De cada muestra de agua obtenida en los sitios donde se incubaron los microplásticos, se completaron 95mL del agua de cada muestra con 5 mL de 2-propanol, para obtener una concentración del agua al 5% de 2-propanol. Se vertió el agua al 5% de 2-propanol a la columna y se filtró; se dejó reposar por 30 min.

Se preparó una solución 1:1 de diclorometano-etil acetato, se tomaron 8mL de dicha solución y se agregaron a la columna recuperando el extracto y posteriormente se aforó a 10mL con diclorometano-etil acetato.

Se transfirieron 4 mL de la elución a un tubo para evaporar el solvente utilizando un flujo de nitrógeno. El residuo fue disuelto en 500  $\mu$ L de acetonitrilo y se colectaron 200  $\mu$ L en un vial de HPLC, inyectando 20  $\mu$ L para su detección.

### **6.11.3. Detección de fenantreno en tejido de *Ophiocoma echinata***

En el experimento de supervivencia, al momento que moría un individuo, rápidamente se recolectaba tejido, se hizo una disección longitudinal al disco recuperando cuidadosamente el tejido celómico que se encontraba entre cada brazo, evitando tomar tejido de la cavidad estomacal.

A medida que se iba recolectando el tejido, se mantenía en refrigeración a  $-2^{\circ}\text{C}$  (sin solventes ni ningún tratamiento especial). Las muestras fueron trasladadas a Kiel, Alemania y estuvieron de 15 a 20 horas sin refrigeración.

El procedimiento para la detección de fenantreno fue el siguiente: se realizó por el método QuEChERS “Quick, Easy, Cheap Effective, Rugged and Safe) el cual es un método de extracción en fase sólida que utiliza sales (<http://www.chem.agilent.com>).

Se pesaron 5 g de la muestra de tejido previamente homogeneizado en un tubo. Se le adicionaron 8 mL de acetonitrilo agitando vigorosamente y se agregaron sales del equipo QuEChERS, se agitó por un minuto y se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos.

Se transfirieron 6 mL de la alícuota al tubo “bond elute” que es el tubo que retiene el analito en fase sólida; se agitó por un minuto y se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos. Se filtró el contenido utilizando un filtro de 0.45  $\mu$ L; se transfirió 0.2 mL del extracto a un vial para su detección.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Ingesta de los pellets microplásticos con elementos biológicos en *Ophiocoma echinata*

En este experimento se suministraron los pellets microplásticos con tres elementos orgánicos y un control: 1. Materia orgánica. 2. Algas 3. *Artemia salina*. 4. Prístinos (control).

El experimento se llevó a cabo durante 20 días, en ese lapso, se contabilizaron los microplásticos en el interior de la cavidad estomacal de los 40 individuos (10 por tratamiento) de *Ophiocoma echinata* cada segundo día, es decir un total 10 mediciones por organismo. Esto fue realizado con la finalidad de identificar si algún elemento biológico suministrado con los microplásticos, pudiera ser más atractivo para su ingesta. Las mediciones de ingesta, así como el promedio para cada individuo y tratamiento se muestran en la tabla 6.

**Tabla 6.** Microplásticos contabilizados por individuo (numerados del 1 al 10) de *Ophiocoma echinata* para cada tratamiento. T1= Tratamiento con Materia Orgánica. T2= Tratamiento con Algas T3. = Tratamiento con *Artemia salina*. T4. = Tratamiento con Prístinos (control). D= Día.

OBSERVACIONES DE INGESTA POR DIA										
Tratamiento 1. Individuos	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10
1	22	0	4	50	17	2	0	1	45	18
2	0	78	43	17	0	0	0	17	2	27
3	2	5	2	14	0	4	31	57	2	26
4	153	2	248	4	8	4	82	14	63	65
5	21	26	6	28	17	4	12	0	3	2
6	19	7	3	1	2	0	13	37	84	0
7	0	1	78	16	8	37	9	0	3	5
8	5	7	30	0	3	1	0	0	9	0
9	3	40	2	1	0	8	0	0	5	3
10	11	1	22	10	7	4	31	0	0	2
Promedio	23.6	16.7	43.8	14.1	6.2	6.4	17.8	12.6	21.6	14.8
Tratamiento 2 Individuos										
1	4	1	1	5	3	1	4	2	32	7
2	20	25	8	3	2	62	2	8	15	0
3	6	2	4	3	6	5	1	0	31	14
4	6	6	6	2	0	0	8	0	5	0
5	17	26	37	7	52	5	22	14	103	48
6	5	0	16	0	0	41	1	6	0	205
7	7	8	7	0	43	26	0	89	154	18
8	0	11	0	1	5	0	3	2	67	16
9	5	33	21	1	1	1	3	10	16	2

10	4	3	0	2	0	3	4	0	11	2
Promedio	7.4	11.5	10	2.4	11.2	14.4	4.8	13.1	43.4	31.2
Tratamiento 3 Individuos										
1	2	3	8	16	0	20	1	18	13	2
2	3	2	7	1	2	1	0	12	45	11
3	31	28	132	1	0	0	1	1	33	22
4	66	3	12	23	0	0	26	113	26	41
5	34	1	17	4	0	0	1	2	8	1
6	52	2	1	5	2	15	6	26	1	1
7	15	5	18	3	3	7	4	1	52	26
8	10	6	2	2	1	2	40	5	11	3
9	20	0	39	0	11	19	1	0	7	7
10	13	0	0	1	0	0	9	0	2	3
Promedio	24.6	5	23.6	5.6	1.9	6.4	8.9	17.8	19.8	11.7
Tratamiento 4 Individuos										
1	0	139	5	0	1	0	2	25	19	14
2	26	116	66	0	23	14	7	141	77	136
3	12	2	0	2	0	4	7	0	31	35
4	7	1	67	1	1	4	1	1	57	12
5	19	2	7	1	0	5	2	9	0	3
6	3	11	26	4	0	30	1	1	12	2
7	14	70	112	0	1	8	0	1	11	10
8	3	1	13	3	0	8	0	14	6	9
9	108	93	68	2	10	1	3	12	0	61
10	7	1	5	1	0	5	2	0	4	8
Promedio	19.9	43.6	36.9	1.4	3.6	7.9	2.5	20.4	21.7	29

A continuación, se presentan los resultados del análisis de varianza de los promedios por día para la ingesta de pellets microplásticos con elementos biológicos.

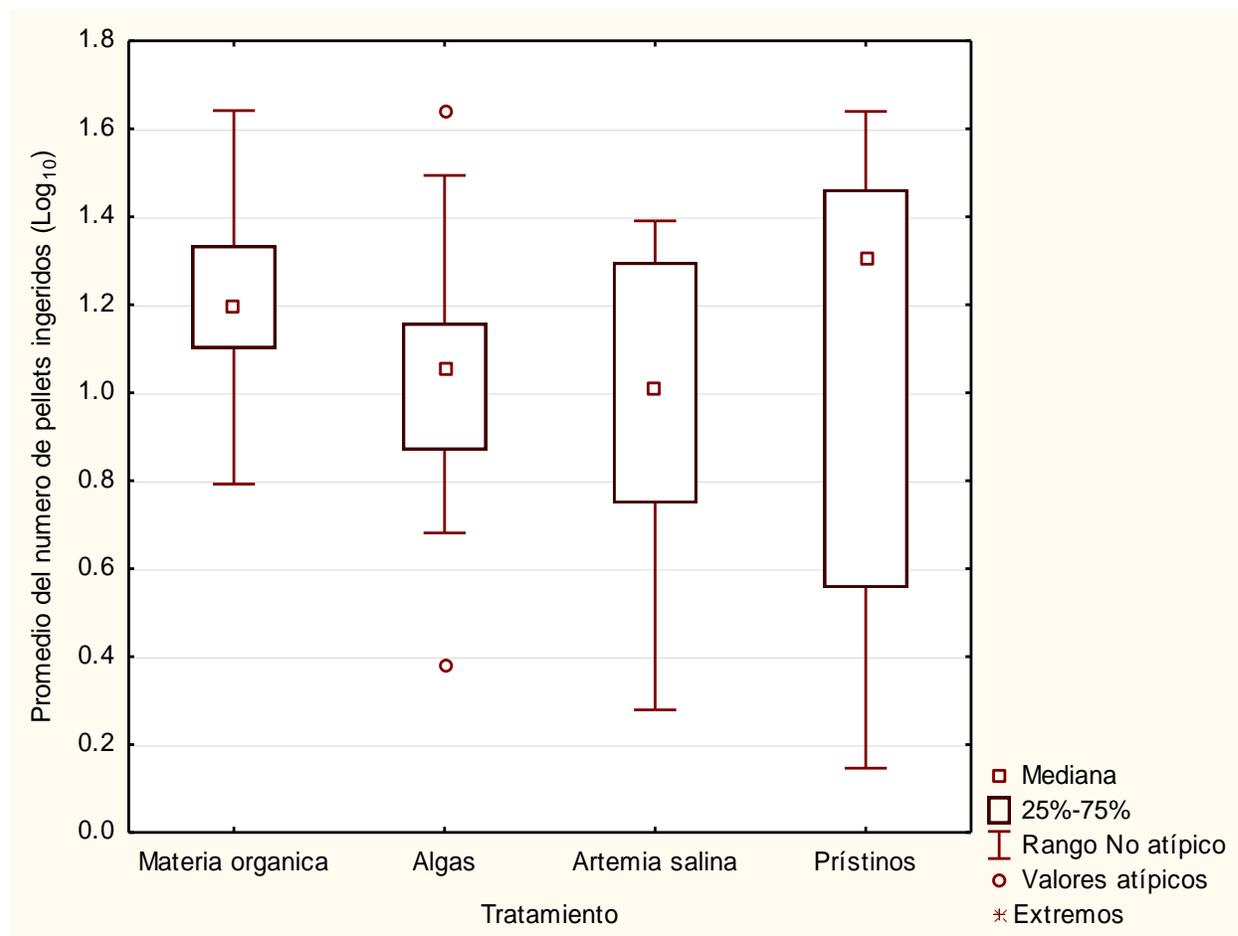
**Tabla 7.** Análisis de varianza para la ingestión de pellets microplásticos con diferentes tratamientos de elementos biológicos durante 20 días,  $F(3, 27)=.78381$ ,  $p=.51339$ .

Efecto	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Suma de cuadrados medios	F	p
Tratamientos	0.20206	3	0.06735	0.7838	0.513392
Error	2.32012	27	0.08593		

Los datos del promedio de ingesta por día (la variable dependiente); se transformaron a Log<sub>(10)</sub> con el propósito de eliminar el efecto multiplicativo debido a que los organismos

ingieren microplásticos de manera variable, lo cual puede provocar sesgo que no cumpla con los supuestos estadísticos de Normalidad.

La figura 12, muestra que a pesar de que los resultados no son estadísticamente significativos para determinar si algún elemento biológico tuvo efectos sobre la ingesta de pellets, sin embargo, numéricamente, los datos de la mediana mostraron un menor consumo de pellets en presencia de *Artemia salina* y mayor consumo de pellets prístinos.



**Fig. 12.** Comparación del consumo de pellets microplásticos con los diferentes tratamientos de elementos biológicos administrados: Materia orgánica, Algas, *A. salina* y Prístinos correspondiente al control, los valores se transformaron a Log<sub>10</sub> para cumplir con la normalidad de los datos. Las barras verticales denotan el 95% de confianza de los intervalos.

## 7.2. Ingesta de los pellets microplásticos con exposición a contaminantes del medio natural y fenantreno en *Ophiocoma echinata*

En este experimento, que tuvo una duración de dos meses, se midieron los efectos de la ingestión de pellets microplásticos con diferentes niveles de contaminación posiblemente adsorbidos (Tabla 8).

Las respuestas biológicas evaluadas fueron: la velocidad de regeneración del brazo, la motilidad, la recuperación de la posición normal y la resistencia a condiciones de hipoxia.

**Tabla 8.** Tratamientos utilizados para los experimentos relacionados con las variables de respuesta biológicas.

Tratamiento	Lugar de incubación de los microplásticos	Concentración de microplásticos	Número de individuos
Sin microplásticos		Sin microplásticos únicamente con sedimento	20 individuos
Baja contaminación	Microplásticos incubados en el muelle de la UASA, ICM.L, UNAM.	400 microplásticos por Kg de sedimento seco.	20 individuos
Alta contaminación	Microplásticos incubados en "La Marina El Cid".	400 microplásticos por Kg de sedimento seco.	20 individuos
Contaminación artificial	Microplásticos incubados en solución de fenantreno.	400 microplásticos por Kg de sedimento seco.	20 individuos

### 7.3. Regeneración del brazo de *Ophiocoma echinata*.

Se seleccionaron aleatoriamente individuos de cada nivel de contaminación (Sin microplásticos, Alta contaminación, Baja contaminación, Contaminación artificial) para cortar un fragmento de un brazo y medir el crecimiento efectuado en el transcurso de un mes.

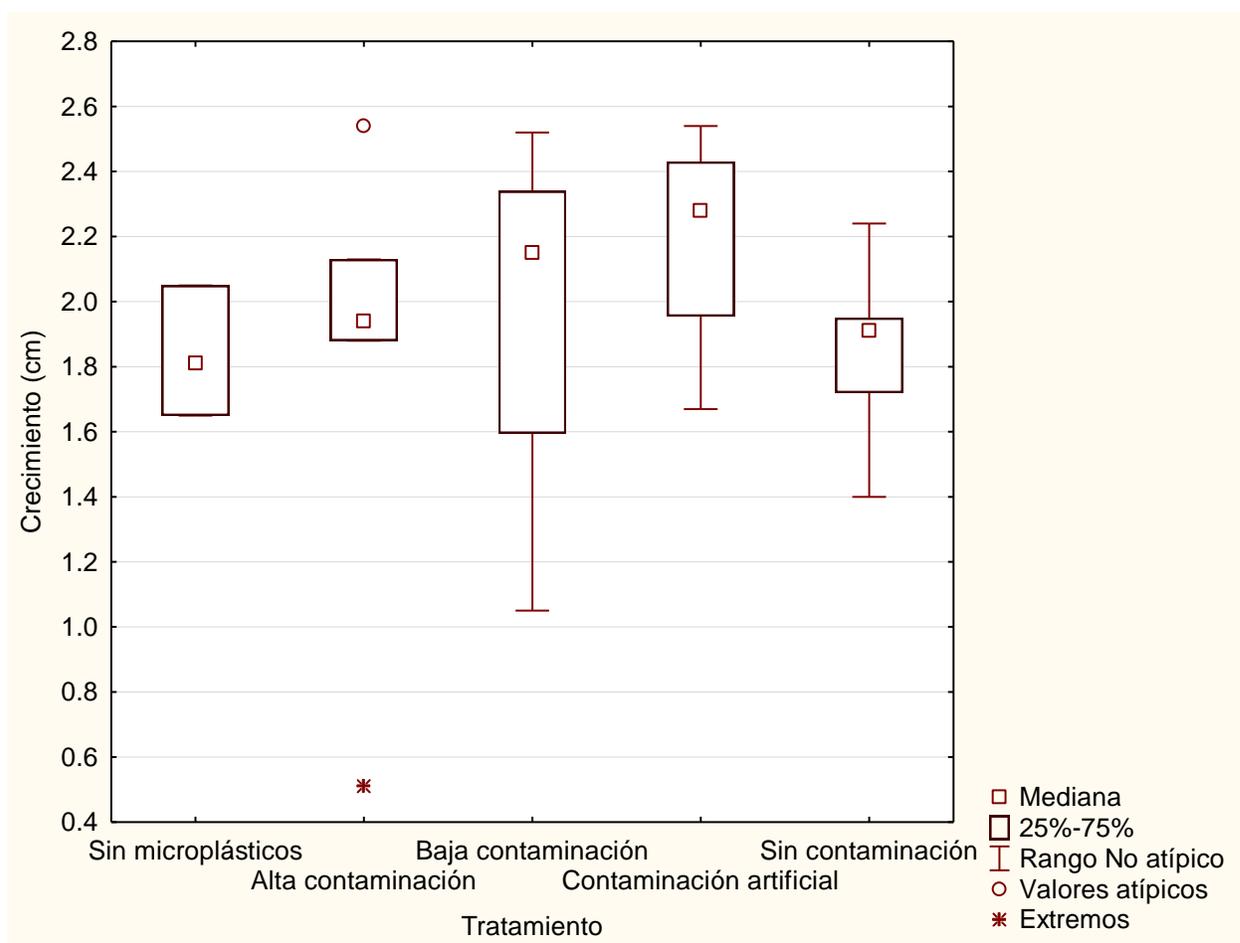
Además, se llevó a cabo un experimento con 5 individuos adicionales que solo estuvieron en contacto con microplásticos prístinos sin contaminación, a los cuales también se les cortó un fragmento de brazo.

En la tabla 9, se puede observar que no hay diferencias significativas en el crecimiento de brazo de los individuos que estuvieron expuestos a cada tratamiento de pellets microplásticos.

**Tabla 9.** Análisis de varianza para el crecimiento de brazo de los individuos seleccionados entre cada tratamiento.  $F(4, 16)=.38537$ ,  $p=.81592$ .

Efecto	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Suma de cuadrados medios	F	p
Tratamiento	0.42764	4	0.10691	0.3854	0.815916
Error	4.43874	16	0.27742		

La figura 13, muestra el crecimiento de brazo correspondiente a cada tratamiento. Se observa que, no hay diferencias significativas, pero numéricamente, conforme la mediana se presentó un mayor crecimiento de regeneración de los organismos que estuvieron expuestos a pellets con contaminación artificial (fenantreno) y un menor crecimiento fueron aquellos individuos que estuvieron en condiciones sin microplásticos.



**Fig. 13.** Comparación del crecimiento de brazo de los individuos que estuvieron expuestos a los pellets microplásticos de cada tratamiento. Las barras verticales denotan el 95% de confianza de los intervalos.

## 7.4. Pruebas de motilidad en *Ophiocoma echinata*

A continuación, se muestran los resultados para las dos pruebas de motilidad realizadas en *O. echinata* finalizado el experimento de ingestión de pellets microplásticos comparando cada nivel de contaminación.

### 7.4.1. Tiempo de desplazamiento de *Ophiocoma echinata*

Se seleccionaron 77 individuos en total (18 sin microplásticos, 19 expuestos a baja contaminación, 20 expuestos a alta contaminación y 20 expuestos a contaminación artificial) y se registró el tiempo que tardaban en recorrer una distancia de 18 cm.

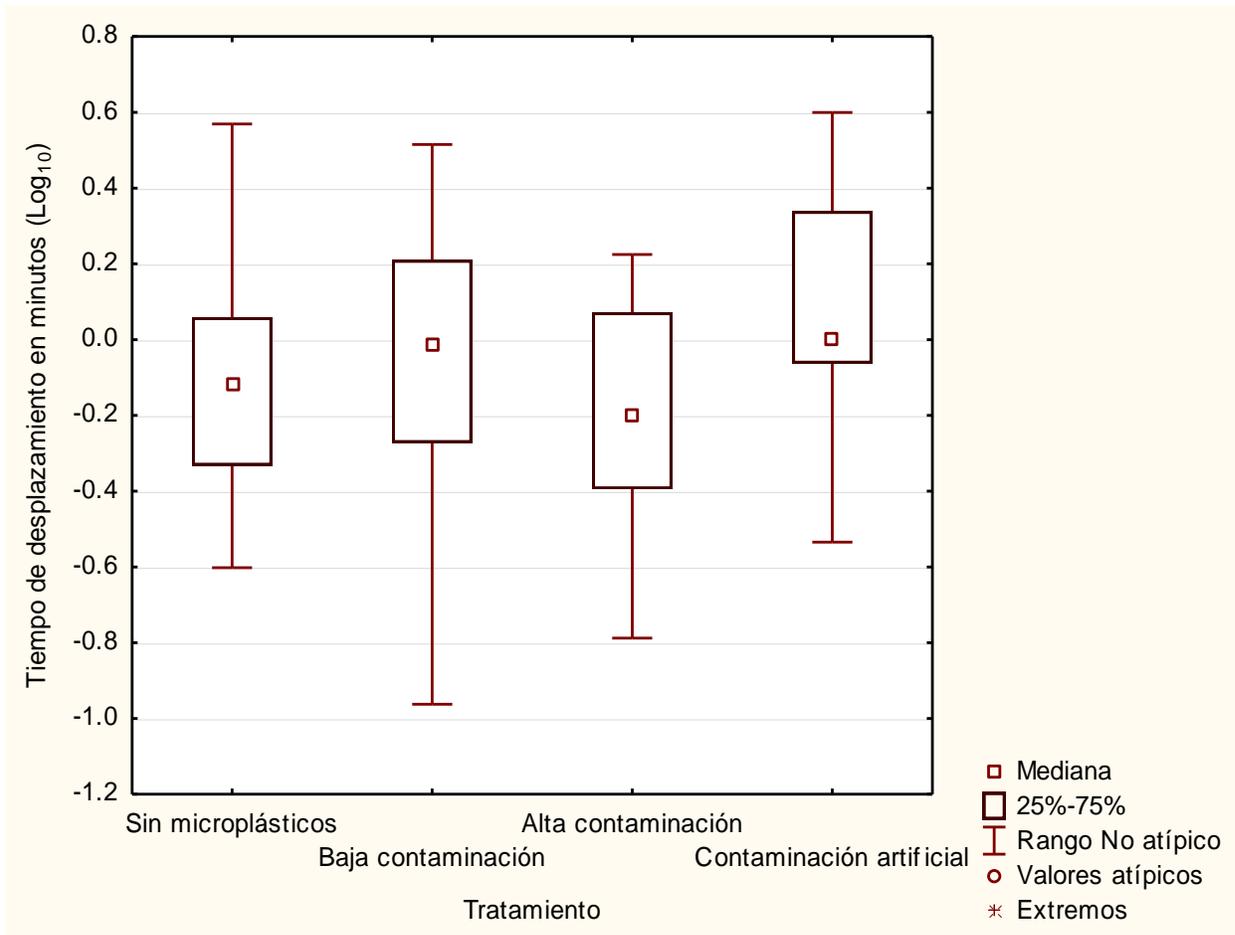
En la tabla 10, se puede observar que no hay diferencias significativas en el tiempo de desplazamiento de una distancia de 18 cm de los individuos que estuvieron expuestos a cada tratamiento de pellets microplásticos.

**Tabla 10.** Análisis de varianza para el tiempo de desplazamiento de los individuos expuestos a pellets microplásticos de los diferentes tratamientos.  $F(3, 73)=2.1673$ ,  $p=.09917$ .

Efecto	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Suma de cuadrados medios	F	P
Tratamiento	0.664733	3	0.221578	2.167265	0.099167
Error	7.463403	73	0.102238		

Los datos del tiempo de desplazamiento (la variable dependiente); se transformaron a  $\text{Log}_{(10)}$  con el propósito de eliminar el efecto multiplicativo de los datos, lo cual puede provocar sesgo que no cumpla con los supuestos estadísticos de Normalidad.

En la figura 13, se observa que, al igual que en la prueba anterior, aunque no hay diferencias significativas, numéricamente los valores de la mediana, presentan un mayor tiempo de desplazamiento de los organismos que estuvieron expuestos a pellets con contaminación artificial y un menor tiempo de desplazamiento fueron aquellos expuestos a pellets en alta contaminación.



**Fig. 13.** Comparación del tiempo de desplazamiento de una distancia de 18 cm de los individuos expuestos a pellets microplásticos con los diferentes tratamientos, los valores se transformaron a Log<sub>10</sub> para cumplir con la normalidad de los datos. Las barras verticales denotan el 95% de confianza de los intervalos.

#### 7.4.2. Recuperación de la posición normal en *Ophiocoma echinata*

Con los mismos 77 individuos utilizados en el experimento anterior, se realizó esta prueba consistente en medir el tiempo en que cada individuo recuperaba su posición normal (dorso expuesto) a partir de la posición opuesta (parte ventral expuesta).

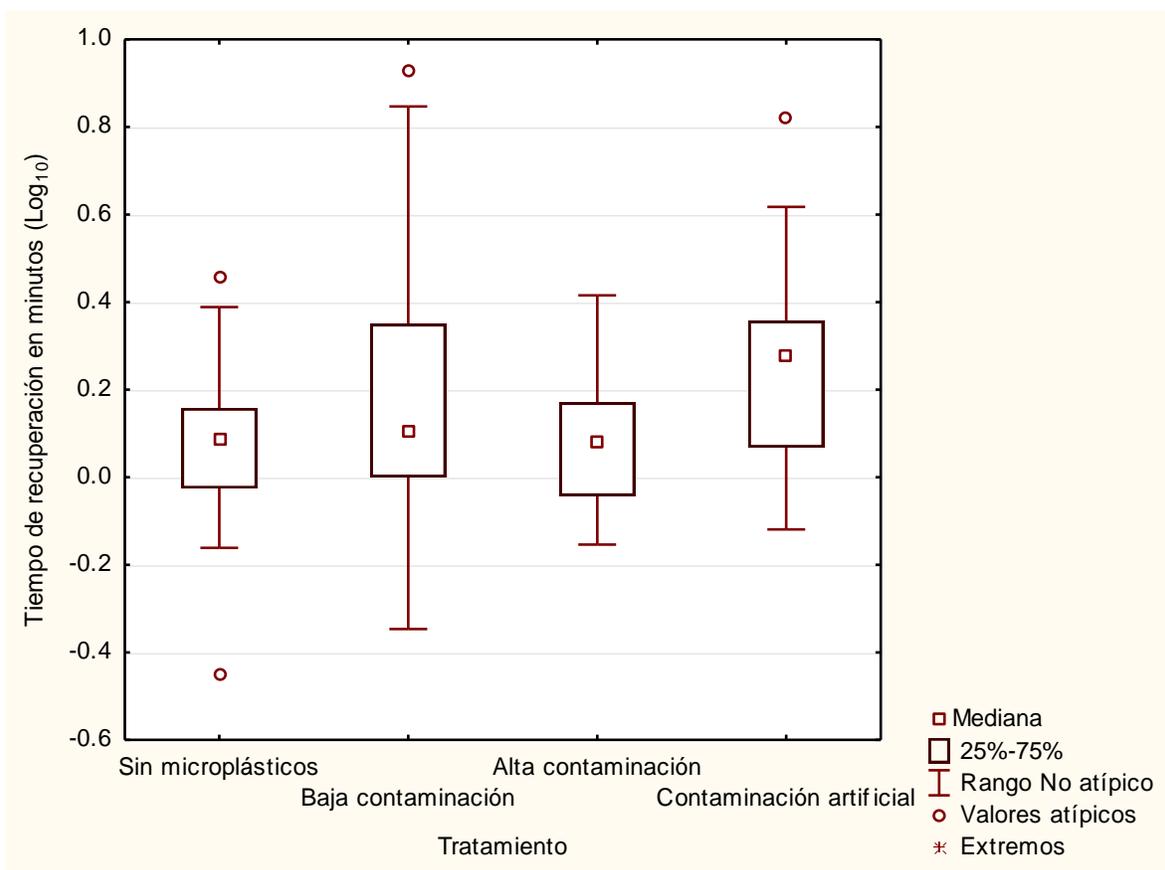
En la tabla 11, se puede observar que no hay diferencias significativas en el tiempo de recuperación de la posición normal de los individuos que estuvieron expuestos a cada tratamiento de pellets microplásticos.

**Tabla 11.** Análisis de varianza para el tiempo de recuperación de la posición normal de los individuos expuestos a pellets microplásticos de los diferentes tratamientos.  $F(3, 71)=2.4214$ ,  $p=.07305$ .

Efecto	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Suma de cuadrados medios	F	p
Tratamiento	0.418109	3	0.139370	2.42138	0.073051
Error	4.086619	71	0.057558		

Los datos del tiempo de desplazamiento (la variable dependiente); se transformaron a  $\text{Log}_{10}$  con el propósito de eliminar el efecto multiplicativo de los datos, lo cual puede provocar sesgo que no cumpla con los supuestos estadísticos de Normalidad.

En la figura 14, se observa que, al igual que en la prueba anterior, aunque no hay diferencias significativas, numéricamente en la mediana, existe un mayor tiempo de recuperación de los organismos que estuvieron expuestos a pellets con contaminación artificial y los individuos que mostraron un menor tiempo de recuperación fueron aquellos que estuvieron sin pellets microplásticos.



**Fig. 14.** Comparación del tiempo de recuperación de la posición normal de los individuos expuestos a pellets microplásticos con los diferentes tratamientos, los valores se transformaron a  $\text{Log}_{10}$  para cumplir con la normalidad de los datos. Las barras verticales denotan el 95% de confianza de los intervalos.

## 7.5. Supervivencia

Para la etapa final del experimento, se sometieron a condiciones de hipoxia a todos los individuos provenientes de los diferentes tratamientos después de someterlos a las pruebas de motilidad.

Sin embargo, para este análisis sólo se tomaron en cuenta a los 36 individuos que murieron en un máximo de 168 horas (7 días) una vez implementado el ambiente de hipoxia, para cumplir con el protocolo de investigación acordado entre todos los grupos participantes y poder realizar posteriormente comparaciones.

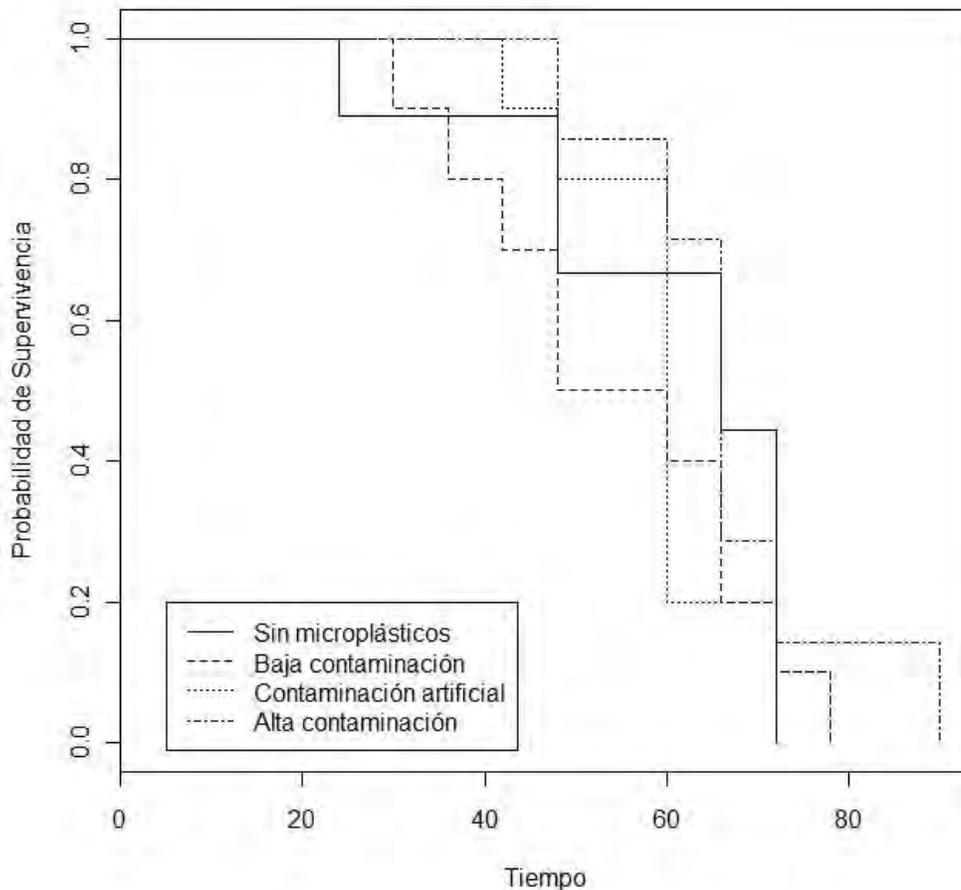
**Tabla 11.** Número de individuos por tratamiento que murieron en un máximo de 168 horas.

Tratamiento	Núm. Total indiv.	Núm. Indiv. muertos	% supervivencia
Sin microplásticos	18	9	50
Baja contaminación	19	10	47.37
Contaminación artificial	19	10	47.37
Alta contaminación	20	7	65
Total	77	36	53.75

Una vez realizado el análisis por el método de Kaplan-Meier se obtuvo de la prueba Log-rank un valor de  $p=0.516$  lo que indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las curvas de supervivencia.

Es importante mencionar que de manera numérica se encontraron diferencias entre tratamientos, sin embargo no son significativas estadísticamente.

Las curvas del análisis de supervivencia empleando el método de Kaplan-Meier se muestran a continuación.



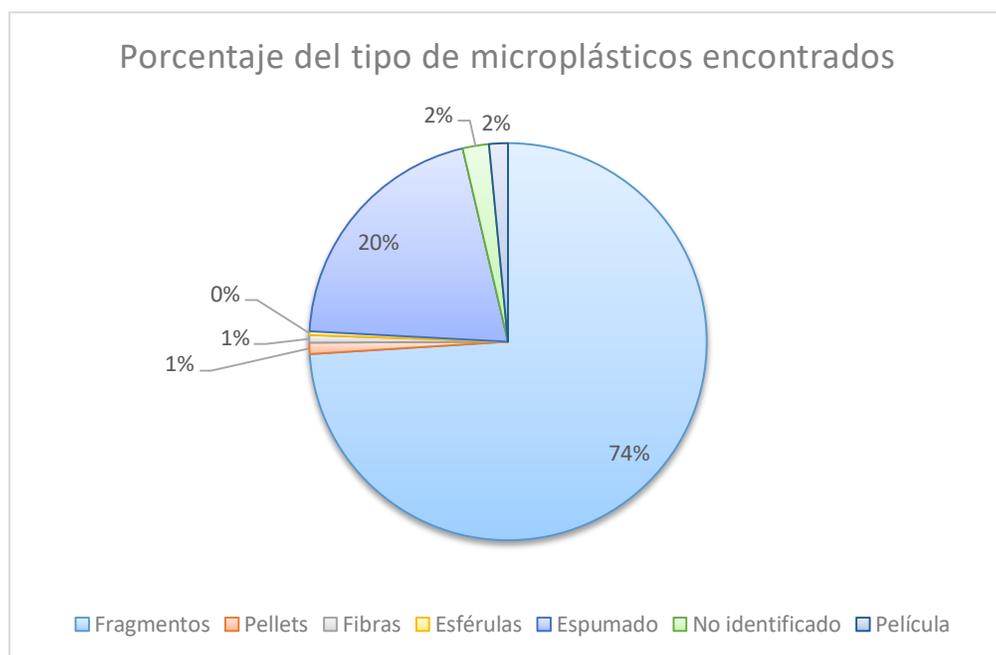
**Figura 15.** Análisis de supervivencia por estimador de Kaplan-Meier. El eje x muestra el tiempo de inicio en el día 0, el cual representa el inicio del estrés por hipoxia y el tiempo final a las 100 horas. El eje y muestra la probabilidad de supervivencia en cada grupo.

## 7.6. Cuantificación y categoría de microplásticos en la Laguna Arrecifal

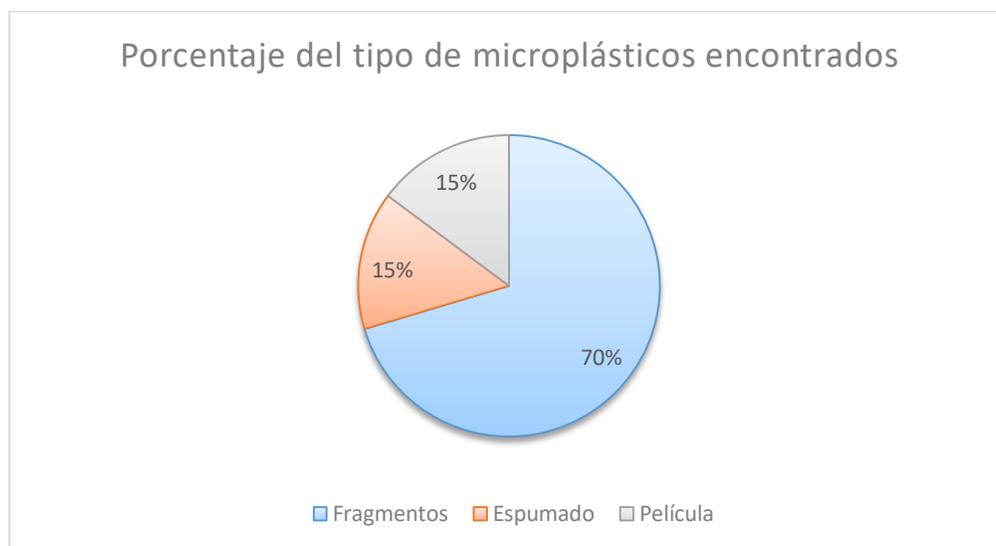
En la zona submareal, no se encontraron microplásticos a diferencia de la zona intermareal donde sí se registraron microplásticos. El total de los microplásticos en las muestras de sedimento recolectado fue de 354 partículas /kg de sedimento.

El 92 % del total de los microplásticos se encontró en la capa superficial (de 0 a 5 cm), mientras que en la capa profunda (de los 5 a 10 cm) los microplásticos representan el 7%. En la zona submareal, correspondiente a la capa superficial (de 0 a 5 cm), el 74 % del total de los microplásticos estuvo constituido por fragmentos, mientras que los microplásticos espumados representaron el 20 %, siendo despreciables los porcentajes de las demás categorías (Fig. 16).

En la fracción profunda, también los fragmentos muestran dominancia con el 70 %, y en segundo lugar los espumados y las películas con el 15 % (Fig 17).



**Fig. 16.** Porcentaje y clasificación de microplásticos presentes en la porción superficial de la zona intermareal.



**Figura 17.** Porcentaje y clasificación de microplásticos presentes en la porción profunda de la zona intermareal.

### **7.7. Resultados de la detección de fenantreno por HPLC**

Las muestras de agua de mar provenientes del sitio con alta contaminación correspondiente a la "Marina el Cid" presentaron  $(84.24 \pm 49.80 \text{ ng. de fenantreno L}^{-1}, n=2)$  mientras que en las muestras de agua de mar correspondientes al sitio con baja contaminación no se detectó fenantreno. Los microplásticos que fueron expuestos a  $2 \mu\text{g}$  de fenantreno  $\text{L}^{-1}$  presentaron  $3.03 \text{ ng fenantreno / g pellets microplásticos}$ ,  $(n=1)$ . No se detectó fenantreno en las muestras de tejido de *Ophiocoma echinata*.

## 8. DISCUSION

Se determinó que la especie *Ophiocoma echinata* ingiere pellets microplásticos de 0.7 a 0.9 mm de diámetro cuando estos se encuentran en un escenario *in vitro* mimetizados en el sedimento.

Los resultados del presente proyecto demostraron que la exposición a concentraciones realistas de pellets microplásticos como vectores de incorporación de agentes biológicos y contaminantes adheridos, no mostraron diferencias significativas en las variables de respuesta.

En el caso de la ingesta de pellets microplásticos con elementos biológicos se observó un consumo de pellets microplásticos muy variable, se presentaron días donde el consumo de pellets microplásticos por individuo, por día, fue de cero pellets, así como se presentaron consumos por individuo, por día, donde el consumo fue mayor a 200 pellets microplásticos, en particular un individuo con un consumo de hasta 248 pellets. No se observó alguna situación externa particular que determinara una tendencia al consumo regular del número de pellets plásticos. Los resultados no muestran diferencias significativas pero numéricamente se observó un menor consumo en presencia de *Artemia salina* y un mayor consumo de pellets microplásticos prístinos.

En el caso de la ingesta de pellets microplásticos con contaminantes adheridos y las variables de respuesta evaluadas en *O. echinata* (regeneración del brazo, tiempo de desplazamiento, recuperación de la posición normal), se observaron tratamientos con valores numéricos mayores y menores conforme la mediana, que aunque no se presentan diferencias significativas se presentan a continuación (Tabla 12).

**Tabla 12.** Valores numéricos de la mediana de la respuesta del consumo de pellets microplásticos bajo los diferentes tratamientos

Variable de respuesta	Tratamiento con mayor valor numérico	Tratamiento con menor valor numérico
Ingesta de pellets con elementos biológicos	Mayor consumo de pellets prístinos	Menor consumo con <i>Artemia salina</i>
Velocidad de regeneración del brazo	Mayor crecimiento en contaminación artificial (fenantreno)	Menor crecimiento sin pellets microplásticos
Tiempo de desplazamiento	Mayor tiempo en contaminación artificial (fenantreno)	Menor tiempo en alta contaminación.
Recuperación de la posición normal	Mayor tiempo en contaminación artificial (fenantreno)	Menor tiempo sin pellets microplásticos

En el caso de la regeneración de brazo, es importante observar que en todos los casos, los brazos se regeneraron activamente, más de la mitad de los organismos presentaron crecimiento muy cercano a 2 o más cm en el periodo de tiempo evaluado (un mes). Se presentó un mayor crecimiento de regeneración de brazo en aquellos individuos que estuvieron en el tratamiento con contaminación artificial (fenantreno) y una menor regeneración de los individuos en el tratamiento sin pellets microplásticos.

Las pruebas de motilidad tampoco presentaron diferencias significativas en ninguno de los casos; para la prueba del tiempo de desplazamiento, el tratamiento que presentó mayor tiempo, numéricamente conforme la mediana, fue el de los organismos que estuvieron expuestos a pellets con contaminación artificial (fenantreno) y el tratamiento que mostró menor tiempo fue el tratamiento de alta contaminación. En el caso de la prueba de recuperación de la posición normal se observó que el mayor tiempo de recuperación lo tuvo el tratamiento con contaminación artificial (fenantreno) y el tratamiento sin pellets microplásticos presentaron un menor tiempo para recuperar la posición normal.

Las pruebas de motilidad (tiempo de desplazamiento y recuperación de la posición normal) en cuanto a los valores numéricos conforme la mediana, ambas muestran un mayor tiempo para el tratamiento de contaminación artificial (fenantreno) que se menciona nuevamente que aunque no existen diferencias significativas podría ser un antecedente para futuras investigaciones.

En la prueba de hipoxia por el método Kaplan-Meier y posteriormente por la prueba Log-rank, no se muestran diferencias significativas entre las curvas de supervivencia de los diferentes tratamientos.

No se encontraron microplásticos en la zona submareal, a diferencia de la zona intermareal donde se contabilizaron 354 partículas de microplásticos /kg de sedimento. La capa superficial de esta zona presentó el 92% del total de los microplásticos donde el tipo de microplásticos de mayor abundancia fue la categoría perteneciente a los fragmentos, se piensa que los fragmentos son resultado de la basura plástica proveniente de la actividad turística de los habitantes de la zona ya que principalmente se encontraron fragmentos de artefactos plásticos tales como cubiertos desechables, botellas y tapas de refresco.

La escasez de efectos estadísticamente significativos en este estudio, sobre los efectos de los microplásticos ingeridos por *Ophiocoma echinata*, puede interpretarse de diferentes maneras. Una de ellas podría ser que se eligieron para el experimento individuos del mismo tamaño (de entre 1.5cm a 2.1 cm) excluyendo individuos de la población que salieran de este tamaño establecido.

Por otro lado, el tamaño, forma y el tipo de plástico utilizado en el experimento podrían ser relevantes ya que la densidad del material determina su disponibilidad para los organismos. En el experimento se utilizaron microplásticos de poliestireno con una densidad de 1.05kg/L que es muy cercana a la densidad del agua de mar (1.027kg/L). Estudios posteriores para organismos bénticos podrían llevarse a cabo con materiales plásticos de densidades mayores tales como PVC o PET.

Otro aspecto importante fue que elegimos intencionalmente la forma y tamaño de los microplásticos, los cuales fueron esférulas de 0.7 a 0.9 mm de diámetro en promedio. Estos no contenían ningún aditivo tóxico (de acuerdo con la información de la marca: BASF) que causara daño químico y por su forma esférica no son físicamente perjudiciales para la cavidad estomacal de los organismos sujetos del experimento, como podría ser el caso de un fragmento o película cortante.

El tamaño de los microplásticos empleados, fue el adecuado únicamente para la ingestión de los microplásticos por los organismos seleccionados, ya que si hubieran sido más pequeños podría haber resultado un evento de translocación a tejidos como se ha reportado en *Mytilus edulis* con microplásticos <80  $\mu\text{m}$  (Browne *et al.*, 2008) y en *Uca rapax* con microplásticos >100  $\mu\text{m}$  (Brennecke *et al.*, 2015).

El proceso de adsorción de contaminantes del ambiente es un proceso gradual (Mato *et al.*, 2001) y, por tanto, el tiempo de exposición juega un papel importante. Por ello, el tiempo de exposición a contaminantes de los experimentos del presente estudio (dictados por los protocolos de un experimento de carácter internacional simultáneo), podría ser un tiempo insuficiente para la adsorción total. En particular, se tienen resultados de Lee *et al.*, (2014) quienes encontraron que las concentraciones de PHA's en microplásticos expuestos a una mezcla de contaminantes en solución se encuentra alrededor de 90 días.

La superficie de los microplásticos es un sustrato adecuado para el asentamiento de microorganismos tales como bacterias (Cole *et al.*, 2011); la actividad bacteriana presenta procesos de biodegradación de contaminantes orgánicos pudiendo intervenir en la concentración de los contaminantes adsorbidos por los microplásticos tales como el fenantreno y otros PHAs (Tian *et al.*, 2008), lo cual también pudo haber influido en los resultados.

En los resultados del experimento de supervivencia en condiciones de hipoxia, los individuos tardaron en morir más del tiempo calculado en el protocolo, nuevamente demostrando la robustez de los individuos de la especie, así como la corta duración del experimento.

Otro factor importante fue el tiempo de exposición de los microplásticos a *Ophiocoma echinata* (dos meses). Hasta ahora sólo Pomory y Lawrence, (1999) han llevado a cabo un experimento con en este lapso de tiempo.

Sería importante llevar a cabo experimentos en un lapso de tiempo mayor, por ejemplo, McGovern, (2001) menciona que una especie de ofiuo generalmente es sexualmente madura alrededor de los dos o tres años; así se podría observar si existen efectos en otros aspectos que ahora están fuera de los objetivos de este estudio, como alteraciones en la reproducción, pseudosociedad, o efectos a nivel molecular, pero que sería importante investigar.

Es importante mencionar que el tamaño de muestra pudo haber sido un factor importante para no encontrar diferencias significativas entre tratamientos, ya que para algunas

variables (regeneración de brazo) los tamaños de muestra empleados para su comparación, no fueron los adecuados.

Los experimentos realizados en los demás países participantes, cuyos resultados oficiales aún no están disponibles, es que sus resultados fueron similares a los de este estudio, es decir que no se detectaron efectos negativos significativos en ninguno de los ambientes estudiados ni con ninguna de las especies sometidas a estos experimentos, con los mismos microplásticos y en el mismo lapso de tiempo.

En el programa GAME XII (2013) se realizaron experimentos también sobre efectos de microplásticos en organismos bénticos marinos, utilizándose microplásticos de menor tamaño y de forma irregular (Gómez-Hernández, 2016). También en esos estudios, se observó poca significancia estadística en el efecto de los microplásticos aun cuando se les agregaba un contaminante, en ese caso fluoranteno. Hay que señalar que, Gómez-Hernández (2016) también considera importante, entre otros, aumentar los tiempos de experimentación en proyectos posteriores.

## 9. CONCLUSIONES

1. En el desarrollo de este trabajo, se pudo observar el potencial para ingerir pellets microplásticos de algunas de las principales especies de invertebrados bénticos presentes en la Laguna arrecifal de Puerto Morelos. Particularmente, *Eupolyornia rullieri* (Polychaeta) utilizó los pellets microplásticos para la construcción de su tubo, en el caso de los equinodermos, *Ophiocoma wendtii* y *Ophiocoma echinata*, mostraron ingerir los pellets microplásticos.
2. Se eligió a *Ophiocoma echinata* como modelo de investigación para los experimentos realizados como la especie más adecuada por ser representativa de la zona ya que es común en los ambientes coralinos del Caribe mexicano; se demostró que los individuos ingirieron los pellets microplásticos administrados y resultó ser un organismo robusto que resistió a las condiciones de experimentación y a la vida en acuarios.
3. No se observaron diferencias significativas en la ingestión de pellets microplásticos como vectores de incorporación de elementos biológicos cuando se administraron con: algas, *Artemia salina*, materia orgánica y prístinos (control). Los resultados mostraron que la tasa de ingestión es muy variable ya que la retención de microplásticos varió entre 0 y 248 microplásticos en el intervalo utilizado de 48 horas, por lo que se podría concluir que estos ofiuos ingieren microplásticos indiscriminadamente.
4. No se observaron diferencias significativas para las variables de respuesta evaluadas en *Ophiocoma echinata* (regeneración del brazo, tiempo de desplazamiento, recuperación de la posición normal) después de la ingesta de pellets microplásticos con exposición a contaminantes del medio natural y fenantreno.
5. No obstante, aunque no se presentaron diferencias significativas para las variables de respuesta evaluadas, en cada variable, se presentaron tratamientos con valores numéricos mayores y menores conforme la mediana, que podrían ser antecedentes o tendencias para futuras investigaciones.
6. Particularmente en el caso de la regeneración de brazo, todos los individuos de *Ophiocoma echinata* presentaron una regeneración activa del brazo presentando un crecimiento cercano a 2 cm o más en el periodo evaluado de un mes. Se presentó un mayor crecimiento de la regeneración de brazo en aquellos individuos que estuvieron en el tratamiento con contaminación artificial (fenantreno) y una menor regeneración de los individuos en el tratamiento sin pellets microplásticos.
7. En el caso de las pruebas de motilidad, para la prueba del tiempo de desplazamiento, el tratamiento que presentó mayor tiempo, numéricamente, fue el de los organismos que estuvieron expuestos a pellets con contaminación artificial (fenantreno) y el tratamiento que mostró menor tiempo fue el tratamiento de alta contaminación. En el caso de la prueba de recuperación de la posición normal se

observó que el mayor tiempo de recuperación lo tuvo el tratamiento con contaminación artificial (fenantreno) y el tratamiento sin pellets microplásticos presentaron un menor tiempo para recuperar la posición normal.

8. Las pruebas de motilidad (tiempo de desplazamiento y recuperación de la posición normal) en cuanto a los valores numéricos conforme la mediana, ambas muestran un mayor tiempo para el tratamiento de contaminación artificial (fenantreno).
9. No se encontraron microplásticos en la zona submareal, el cual corresponde al sitio donde se recolectaron los individuos *Ophiocoma echinata*.
10. De los microplásticos encontrados en la zona intermareal, el 74% fueron catalogados como fragmentos.
11. Se detectó por cromatografía (HPLC), la presencia de fenantreno en las muestras de agua de mar provenientes del sitio con alta contaminación correspondiente a la "Marina el Cid" esto indica que el sitio elegido fue idóneo por la presencia del contaminante.
12. En el caso de la detección de fenantreno en los microplásticos que fueron previamente expuestos a  $2 \mu\text{g L}^{-1}$  del contaminante, se observó mostraron la presencia de este, por lo que se puede aseverar que los pellets microplásticos si adsorbieron el contaminante exitosamente.
13. Se considera que los experimentos realizados en este estudio constituyen fundamentos básicos para investigaciones futuras ya que son muy escasos los conocimientos sobre el tema. Sería recomendable continuar con este tipo de investigaciones y ampliar sus objetivos, profundizando en aspectos a largo plazo, con otros organismos marinos y con diferentes tamaños y formas de los microplásticos por ejemplo. Es fundamental adquirir conocimientos más completos sobre su influencia en la biota marina, ya que se observa que la contaminación por microplásticos está en aumento constante y quizás hasta alarmante en el medio marino.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

Andrady, A. L. (2011). Microplastics in the marine environment. *Marine pollution bulletin*, 62: 1596–605.

Avio, C. G., Gorbi, S., Regoli, F. (2016). Plastics and microplastics in the oceans: From emerging pollutants to emerged threat. *Marine Environmental Research*.

Barnes, D. K. A., Galgani, F., Thompson, R. C., Barlaz, M. (2009). Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364: 1985–1998

Barnes, D. K. A., Walters, A., Gonçalves, L. (2010). Macroplastics at sea around Antarctica. *Marine Environmental Research*, 70: 250–252.

Bolton, T. F., Havenhand, J. N. (1998). Physiological versus viscosity-induced effects of an acute reduction in water temperature on microsphere ingestion by trochophore larvae of the serpulid polychaete *Galeolaria caespitosa*. *Journal of Plankton Research* 20: 2153–2164.

Brennecke, D., Ferreira, E. C., Costa, T. M. M., Appel, D., da Gama, B. a. P., Lenz, M. (2015). Ingested microplastics (>100µm) are translocated to organs of the tropical fiddler crab *Uca rapax*. *Marine Pollution Bulletin*, 96: 491–495.

Brien S. (2007) Vinyl Industry Update Presentation at the World Vinyl Forum 2007. Retrieved. <http://vinyl-institute.com/Publication/WorldVinylForumIII/%20VinylIndustry>

Browne, M. A, Dissanayake, A., Galloway, T. S., Lowe, D. M., Thompson, R. C. (2008). Ingested microscopic plastic translocates to the circulatory system of the mussel, *Mytilus edulis* (L). *Environmental science & technology*, 42: 5026–5031.

Browne, M. A., Galloway, T., Thompson, R., Chapman, P. M. (2007). *Learned Discourses*, 3: 2004–2006.

Browne, M.A., Galloway, T.S., Thompson, R.C., (2010). Spatial patterns of plastic debris along estuarine shorelines. *Environmental Science & Technology*, 44: 3404– 3409.

Canul-González, O. R. (2004). Ficha Informativa de los Humedales de Ramsar (FIR).

Carson, H. S., Colbert, S. L., Kaylor, M. J., McDermid, K. J. (2011). Small plastic debris changes water movement and heat transfer through beach sediments. *Marine Pollution Bulletin*, 62 : 1708–1713.

Claessens, M., De Meester, S., Van Landuyt, L., De Clerck, K., Janssen, C. R. (2011). Occurrence and distribution of microplastics in marine sediments along the Belgian coast. *Marine Pollution Bulletin*, 62: 2199–2204.

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

Comisión Nacional de Areas Naturales Protegidas. Página en red: [www.conanp.gob.mx/sig/decretos/parques/Puertomorelos.pdf](http://www.conanp.gob.mx/sig/decretos/parques/Puertomorelos.pdf)

Derraik, J. G. (2002). The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. *Marine Pollution Bulletin*, 44: 842–852.

Dreckmann Kurt M., I. Stout., A. Sentías Granados. (1996). Lista actualizada de las especies marinas bentónicas de Puerto Morelos, Quintana roo, caribe mexicano. Polibotánica. Depto. de Hidrobiología, UAM-Iztapalapa. México.1-17.

Ficha Informativa de los Humedales de Ramsar (FIR). Página en red: <http://www.citeulike.org/user/LNCScatalogo/article/10673836>

Frost, T. K., Neff, J. M., Røe, T. I., Durell, G. S. (2006). Oil well produced water discharges to the North Sea. Part II: Comparison of deployed mussels (*Mytilus edulis*) and the DREAM model to predict ecological risk. *Marine Environmental Research*, 62: 224–246.

Gómez Hernandez I. (2016) Efecto de los microplásticos de polivinil cloruro (pvc) y del fluoranteno en *Eupolyornia rullieri* e *Isognomon alatus*, dos especies del macrobentos del caribe mexicano. Tesis de Maestría, UNAM, Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología.

Gregory, M.R. (2009). Environmental implications of plastic debris in marine settings: entanglement, ingestion, smothering, hangers-on, hitch-hiking and alien invasions. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364: 2013–2025

Hidalgo-Ruz, V., Gutow, L., Thompson, R. C., Thiel, M. (2012). Microplastics in the Marine Environment: A Review of the Methods Used for Identification and Quantification. *Environmental Science & Technology* 46: 3060-3075.

Hirai, H., Takada, H., Ogata, Y., Yamashita, R., Mizukawa, K., Saha, M., Ward, M. W. (2011). Organic micropollutants in marine plastics debris from the open ocean and remote and urban beaches. *Marine Pollution Bulletin*, 62: 1683–1692.

INEGI (Mapa Digital de México V6. Página en red: <http://gaia.inegi.org.mx/mdm6/>)

Ivar do Sul, J. A., Costa, M. F. (2014). The present and future of microplastic pollution in the marine environment. *Environmental Pollution*, 185: 352–64.

Jensen, L. K., Honkanen, J. O., Jæger, I., Carroll, J. (2012). Bioaccumulation of phenanthrene and benzo[a]pyrene in *Calanus finmarchicus*. *Ecotoxicology & Environmental Safety*, 78: 225–231.

Laguarda Figueras, Alfredo. Hernández-Herrejón. L. A., Solís-Marín, F. A., Durán González, A. (2009). Ofiuroideos del Caribe Mexicano y Golfo de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología UNAM, México.

Lee, C. W., Lemieux, P. M., Gullett, B. K., Ryan, J. V., Kilgroe, J. D. (1998). Research on emissions and mitigation of POP's from combustion sources. *Studies in Environmental Science*, 72: 361–378.

Lee, H., Shim, W. J., Kwon, J. H. (2014). Sorption capacity of plastic debris for hydrophobic organic chemicals. *The Science of the Total Environment*, 470-471: 1545–52.

Long, M., Moriceau, B., Gallinari, M., Lambert, C., Huvet, A., Raffray, J., Soudant, P., (2015). Interaction between microplastics and phytoplankton aggregates: Impacts on their respective fates. *Marine Chemistry*, 175: 39-46.

Lozano, R.L., Mouat, J., (2009). Marine Litter in the North-East Atlantic Region, Assessment and Priorities for Response OSPAR/KIMO/UNEP. *Biological Diversity and Ecosystems*, 127.

Mastandrea, C., Chichizola, C., Ludueña, B., Héctor, S., Álvarez, H., Gutiérrez, A. (2005). Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Riesgos para la salud y marcadores biológicos. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 39: 27–36.

McGovern, Tamara M. (2002). Patterns of sexual and asexual reproduction in the brittle star *Ophiactis savignyi* in the Florida Keys. *Marine Ecology Progress Series*. 230: 119–126.

Mato, Y., Isobe, T., Takada, H., Kanehiro, H., Ohtake, C., Kaminuma, T. (2001). Plastic resin pellets as a transport medium for toxic chemicals in the marine environment. *Environmental Science & Technology* 35: 318–324.

Moore, C. J. (2008). Synthetic polymers in the marine environment: A rapidly increasing, long-term threat. *Environmental Research*, 108: 131–139.

Neff, J. M. (2002). Bioaccumulation in marine organisms: Effect of contaminants from oil well produced water. Elsevier, Oxford, UK, 452.

Nilsson, H. C. (1999). Effects of hypoxia and organic enrichment on growth of the brittle stars *Amphiura filiformis* (O.F. Müller) and *Amphiura chiajei* Forbes. *Journal of Experimental Marine Biology & Ecology*, 237: 11–30.

OSPAR, 2007. OSPAR Pilot Project on Monitoring Marine Beach Litter

Pomory, C. M., Lawrence, J. M. (1999). Effect of arm regeneration on energy storage and gonad production in *Ophiocoma echinata* (Echinodermata: Ophiuroidea). *Marine Biology*, 135: 57–63.

Pomory, C. M., Lawrence, J. M. (2001). Arm regeneration in the field in *Ophiocoma echinata* (Echinodermata: Ophiuroidea): effects on body composition and its potential role in a reef food web. *Marine Biology*, 139: 661–670.

Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente 2013, traducción al español por Valeria Hidalgo Ruz. Página en red: [http://www.unep.org/yearbook/2013/pdf/Microplastic\\_spanish.pdf](http://www.unep.org/yearbook/2013/pdf/Microplastic_spanish.pdf)

Reddy, C. M., Quinn, J. G. (1999). GC-MS Analysis of Total Petroleum Hydrocarbons and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Seawater Samples After the North Cape Oil Spill. *Marine Pollution Bulletin*, 38: 126–135.

Rios, L. M., Moore, C. J., Jones, P. R. (2007). Persistent organic pollutants carried by synthetic polymers in the ocean environment. *Marine Pollution Bulletin*, 54: 1230–1237.

Rios, L. M., Jones, P. R., Moore, C. J., Narayan, U. V. (2010). Quantitation of persistent organic pollutants adsorbed on plastic debris from the Northern Pacific Gyre's "eastern garbage patch. *Journal of Environmental Monitoring*, 12: 2226–2236.

Rodríguez-Martínez R.E., F. Ruíz-Rentería, B. Van Tussenbroek, G. Barba-Santos, E. Escalante-Mancera, G. Jordán-Garza, E. Jordán-Dahlgren. (2010). Environmental state and tendencies of the Puerto Morelos CARICOMP site, Mexico. *Revista de Biología Tropical*, 58: 23–43

Roy, P.K., Hakkarainen, M., Varma, I.K., Albertsson, A. C. (2011). Degradable polyethylene: fantasy or reality. *Environmental Science & Technology*, 45: 4217–4227.

Ryan, P.G., Moore, C.J., van Franeker, J.A., Moloney, C.L. (2009). Monitoring the abundance of plastic debris in the marine environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364, 1999–2012

Sivan, A. (2011). New perspectives in plastic biodegradation. *Current Opinion in Biotechnology* 22: 422–426

Talsness, C.E., Andrade, A.J.M., Kuriyama, S.N., Taylor, J.A., vom Saal, F.S. (2009). Components of plastic: experimental studies in animals and relevance for human health. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364: 2079–2096.

Teuten, E.L., Rowland, S.J., Galloway, T.S., Thompson, R.C. (2007). Potential for plastics to transport hydrophobic contaminants. *Environmental Science & Technology*, 41: 7759–7764.

Teuten, E.L., Saquing, J.M., Knappe, D.R.U., Barlaz, M.A., Jonsson, S., Björn, A., Rowland, S.J., Thompson, R.C., Galloway, T.S., Yamashita, R., Ochi, D., Watanuki, Y., Moore, C., Viet, P.H., Tana, T.S., Prudente, M., Boonyatumanond, R., Zakaria, M.P., Akkavong, K., Ogata, Y., Hirai, H., Iwasa, S., Mizukawa, K., Hagino, Y., Imamura, A., Saha, M., Takada, H. (2009). Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364: 2027–2045

Thompson, R.C., Olsen, Y., Mitchell, R.P., Davis, A., Rowland, S.J., John, A.W.G., McGonigle, D., Russell, A.E. (2004). Lost at sea: where is all the plastic? *Science*, 838.

Thompson, R.C., Moore, C., Andrady, A., Gregory, M., Takada, H., Weisberg, S. (2005). New directions in plastic debris. *Science*, 1117b.

Thompson, R.C. (2006). Plastic debris in the marine environment: consequences and solutions. *Marine Nature Conservation in Europe*, 107–115.

Thompson, R.C., Moore, C.J., vom Saal, F.S., Swan, S.H. (2009a). Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364: 2153–2166.

Thompson, R.C., Swan, S.H., Moore, C.J., vom Saal, F.S. (2009b). Our plastic age. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364, 1973–1976.

Tian, Y., Luo, Y., Zheng, T., Cai, L., Cao, X., Yan, C. (2008). Contamination and potential biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in mangrove sediments of Xiamen, China. *Marine Pollution Bulletin*, 56: 1184–91.

Tovilla C., G. Velazquez Solimán. (2011). Estudio para la Caracterización y Diagnóstico de Humedales en Puerto Morelos. Contrato Num. CONANP/DRPYyCM./062-2011. Jardín Botánico de ECOSUR “Dr. Alfredo Barrera Marín”

US EPA, 2006. Toxic release inventory public data release. Office of Environmental Information. United States Environmental Protection Agency, Washington, DC.

Van Cauwenberghe, L., Devriese, L., Galgani, F., Robbens, J., Janssen, C. R. (2015). Microplastics in sediments: A review of techniques, occurrence and effects. *Marine Environmental Research*, 111: 5–17.

Van Franeker, J.A., Blaize, C., Danielsen, J., Fairclough, K., Gollan, J., Guse, N., Hansen, P.-L., Heubeck, M., Jensen, J.-K., Le Guillou, G., Olsen, B., Olsen, K.-O., Pedersen, J., Stienen, E.W.M., Turner, D.M. (2011). Monitoring plastic ingestion by the northern fulmar *Fulmarus glacialis* in the North Sea. *Environmental Pollution*, 159 : 2609–2615.

Wang, G., Pan, L., Ding, Y. (2014). Defensive strategies in response to environmental ammonia exposure of the sea cucumber *Apostichopus japonicus*: Glutamine and urea formation. *Aquaculture*, 432: 278–285.

Wayne W. Daniel. (2002). *Bioestadística: Base Para El Analisis De Las Ciencias De La Salud* (4° ED). Limusa.

Wollerman, L., Ferrier, M. D., Dyda, R., Brenner, J., Lindstrom, D. (2010). Activity pattern of the brittlestar *Ophiocoma echinata* (Echinodermata: Ophiuroidea) and its relationship to foraging and predation potential. *Occasional Publications of the Society for Ocean Sciences*, 1–6.

Wright, S. L., Thompson, R. C., Galloway, T. S. (2013). The physical impacts of microplastics on marine organisms: A review. *Environmental pollution*, 178:483–92.

Zhang, H., Pan, L., Tao, Y. (2014). Toxicity assessment of environmental pollutant phenanthrene in clam *Venerupis philippinarum* using oxidative stress biomarkers. *Environmental Toxicology & Pharmacology*, 37: 697–704.

<http://www.geomar.de/en/research/fb3/fb3-eoe/fb3-eoe-b/game/game-about-game/http://eol.org/pages/598333/data>

## AGRADECIMIENTOS

A mi querida Tutora: Dra. Vivianne Solís-Weiss quién me ha apoyado pese a las adversidades, agradezco su tiempo dedicado y su cariño entregado.

A todos los integrantes de mi Jurado: Dr. Martin Merino, Dr. Francisco Solís, Dra. Cecilia Vanegas, M. en C. Margarito Álvarez y Dr. Alfredo Laguarda quienes me apoyaron extraoficialmente para finalizar este Proyecto.

A Mark Lenz, un gran maestro, quien me permitió formar parte del GAME XI.

A todos los GAMERS grandes compañeros del Proyecto, en especial a Filippa, Dennis, Ericka y Valeria.

Al Dr. Hans-Jörg Martin y al Dr. Daniel Appel del departamento de toxicología por la ayuda en los análisis de HPLC.

A la Dra. Brigitta van Tussenbroek por las facilidades en su laboratorio.

Mis padres, quienes amo con todo mi corazón y me han apoyado incondicionalmente en mi vida.

Mi amada Elena, mi niña hermosa que ha cambiado mi vida cada día con el verdadero amor incondicional.

Mis amigas: Anaité, Antonia y Daniela las amo y siempre las amaré a pesar de la distancia, el tiempo, y la dirección del viento.

Mi amigo Christian, quién siempre está y estará en mi vida.

Al M. en C. Lázaro Morales Reyes quien me apoyó con mucha paciencia en los análisis estadísticos.

And I really hope one day you could read this lines: to my German partner Jonas Martin, always you gonna be into my heart.