



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

**EFFECTO DE LOS MICROPLÁSTICOS DE POLIVINIL CLORURO (PVC) Y
DEL FLUORANTENO EN *Eupolyornia rullieri* E *Isognomon alatus*, DOS
ESPECIES DEL MACROBENTOS DEL CARIBE MEXICANO**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

IZCHEL ROMANA GÓMEZ HERNÁNDEZ

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Vivianne Solís Weiss

Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL

Dr. Alejandro Granados Barba

Instituto de Ciencias Marinas Y Pesquerías, UV

Dra. Laura Elena Sanvicente Añorve

Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM

Dra. María Nuria Méndez Ubach

Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM

Dr. Martín Merino Ibarra

Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM

M en C Margarito Álvarez Rubio

Asesor externo

MÉXICO, D. F. JULIO 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



**EFFECTO DE LOS MICROPLÁSTICOS DE POLIVINIL CLORURO (PVC) Y
DEL FLUORANTENO EN *Eupolyornia rullieri* E *Isognomon alatus*, DOS
ESPECIES DEL MACROBENTOS DEL CARIBE MEXICANO**

T E S I S

que para obtener el grado académico de

Maestra en Ciencias

(Orientación Biología Marina)

presenta

IZCHEL ROMANA GÓMEZ HERNÁNDEZ

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Vivianne Solís Weiss

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL

Dr. Alejandro Granados Barba

Dra. Laura Sanvicente Añorve

Dra. María Nuria Méndez Ubach

Dr. Martín Merino Ibarra

ASESOR EXTERNO

M en C Margarito Álvarez Rubio

Ciudad de México, 2016

AGRADECIMIENTOS

Institucionales

Esta tesis fue posible gracias a la ayuda de muchas personas que de diferentes formas aportaron a su realización.

A la Dra. Vivianne Solís por el tiempo, la dedicación y todo el apoyo que me brindo para sacar adelante este proyecto de vida.

Al Dr. Alejandro Granados, la Dra. Laura Sanvicente, el Dr. Martín Merino y la Dra. Nuria Méndez, por el tiempo, esfuerzo y comentarios que brindaron a mi tesis.

Al M en C. Margarito Alvares por brindarme su enorme conocimiento, tanto tiempo para resolver mis dudas y motivarme a seguir estudiando estadística.

Al Dr. Mark Lenz por su apoyo continuo durante la realización del proyecto de tesis.

A la M en C Lena Heel por su colaboración y aportes a este proyecto.

A la Dra. Brigitta van Tussenbroek y a la Dra. Patricia Thomé por brindarme las facilidades de sus laboratorios.

A la M en C Guadalupe Barba, al M en C Pepe Estrada, al M en C Luis Parmenio, y al M en C Arturo Toledano por su apoyo en el trabajo de laboratorio.

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

A la M en C Iveth Gabriela Palomino Ibarra, técnico responsable del área de alimento vivo, y a Patricia M. Balam Uc, técnico auxiliar del área de alimento vivo de la UMDI Sisal, Facultad de Ciencias UNAM, por la donación de las especies de microalga *Isochrysis sp.* y *Nannochloropsis sp.*

A la M en C Melinda Soto del CRIP de Puerto Morelos por la donación de la especie *Tetraselmis chuii*

A la empresa Mexichem por donarnos el microplástico para realizar esta investigación.

AGRADECIMIENTOS

Personales

A mis padres y a mi hermana por estar conmigo incondicionalmente siempre que lo necesite, por darme su cariño, apoyo y confianza.

A Estefania, Laura, Jacquelin, Jesus, y Tonatiuh por brindarme su amistad incondicional tantos años.

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 Tipos de plásticos	2
1.2 Introducción de los desechos plásticos al ambiente marino	3
1.3 Evaluación de los microplásticos en sedimento marino	3
1.4 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAHs).	7
1.5 Propiedades químicas del Fluoranteno	7
1.6 Amenazas de los PAHs asociados a los desechos plásticos en fauna marina	8
1.7 <i>Eupolyornia rullieri</i> Londoño-Mesa 2005	9
1.8 Características de <i>Eupolyornia rullieri</i>	9
1.9 Localidad tipo y distribución de <i>Eupolyornia rullieri</i>	10
1.10 Estudios previos de efectos de microplásticos y PAHs en <i>Eupolyornia rullieri</i>	10
1.11 <i>Isognomon alatus</i> Gmelin 1791	10
1.12 Características de <i>Isognomon alatus</i>	10
1.13 Distribución de <i>Isognomon alatus</i>	11
1.14 Estudios previos de efectos de microplásticos y PAHs en <i>Isognomon alatus</i>	12
1.15 Proyecto GAME y su marco internacional de colaboración	12
2. OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo principal:	13
2.2 Objetivos particulares:	13
3. ÁREA DE ESTUDIO	14
4. METODOLOGÍA	16
4.1 PREPARACIÓN DE LOS MP/F y MP	19
4.1.1 Preparación de los MP/F	19
4.1.2 Preparación de los MP	20
4.2 EXPOSICIÓN DE LOS ORGANISMOS A LOS TRATAMIENTOS	20
4.2.1 Exposición de <i>Eupolyornia rullieri</i> a los MP y MP/F y medición de las variables de respuesta	21
4.2.1.1 Tasa de crecimiento	21
4.2.1.2 Procesamiento de arena	21
4.2.1.3 Tasa de respiración	22
4.2.2 Exposición de <i>Isognomon alatus</i> a los MP y MP/F y medición de las variables de respuesta	22
4.2.2.1 Tasa de crecimiento	23
4.2.2.2 Producción de heces	23
4.2.2.3 Tasa de consumo de algas	23
4.2.2.4 Tasa de respiración	23
4.2.2.5 Experimento de hipoxia	24
4.2.3 Modelos estadísticos aplicados para el análisis de las variables de respuesta	24
4.2.3.1 ANOVA de dos vías cruzado con interacción, para efectos fijos	24
4.2.3.2 Modelo Cox de riesgos proporcionales	25

4.2.3.3 Gráficas de supervivencia Kaplan Meier	26
4.3 MONITOREO Y CUANTIFICACIÓN DE MICROPLÁSTICOS Y FLUORANTENO <i>in situ</i>	26
4.3.1 Monitoreo de microplásticos <i>in-situ</i>	26
4.3.1.1 Estadística aplicada para el análisis de microplásticos <i>in-situ</i>	28
4.3.2 Monitoreo de fluoranteno <i>in-situ</i>	28
4.4 DETECCIÓN DE FLUORANTENO EN CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC, por su siglas en inglés)	28
4.4.1 Determinación de fluoranteno en el Tejido Animal	29
4.4.2 Determinación de fluoranteno en muestras de MP incubado <i>in situ</i>	30
4.4.3 Determinación de fluoranteno en muestras de MP preparadas en el laboratorio	30
5. RESULTADOS	31
5.1 PREPARACIÓN DE LOS MP/F y MP	31
5.2 EXPOSICIÓN DE LOS ORGANISMOS A LOS TRATAMIENTOS	31
5.2.1 Exposición de <i>Eupolyornia rullieri</i> a los MP y MP/F y medición de las variables de respuesta	31
5.2.1.1 Tasa de crecimiento	31
5.2.1.2 Procesamiento de arena	33
5.2.1.3 Tasa de respiración	34
5.2.2 Exposición de <i>Isognomon alatus</i> a los MP y MP/F y medición de las variables de respuesta	36
5.2.2.1 Tasa de crecimiento	36
5.2.2.2 Producción de heces	37
5.2.2.3 Tasa de consumo de algas	36
5.2.2.4 Tasa de respiración	39
5.2.2.5 Experimento de hipoxia	43
5.3 MONITOREO Y CUANTIFICACIÓN DE MICROPLÁSTICOS Y FLUORANTENO <i>in situ</i>	44
5.3.1 Monitoreo de microplásticos <i>in-situ</i>	44
5.3.2 Monitoreo de fluoranteno <i>in-situ</i>	46
5.4 DETECCIÓN DE FLUORANTENO EN CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC, por su siglas en inglés)	47
5.4.1 Determinación de fluoranteno en el Tejido Animal	47
5.4.2 Determinación de fluoranteno en muestras de MP incubado <i>in situ</i>	47
5.4.3 Determinación de fluoranteno en muestras de MP preparadas en el laboratorio	47
6. DISCUSIÓN	48
6.1 CUANTIFICACIÓN DE FLUORANTENO EN LOS MICROPLÁSTICOS PREPARADOS EN EL LABORATORIO	48
6.2 EXPOSICIÓN DE LOS ORGANISMOS A LOS TRATAMIENTOS	48
6.2.1 Exposición de <i>Eupolyornia rullieri</i> a los microplásticos y microplásticos con fluoranteno y medición de las variables de respuesta	48
6.2.2 Exposición de <i>Isognomon alatus</i> a los microplásticos y microplásticos con fluoranteno y medición de las variables de respuesta	51
6.2.3 Crítica al diseño experimental	55
6.3 MONITOREO Y CUANTIFICACIÓN DE MICROPLÁSTICOS Y FLUORANTENO <i>in situ</i>	56
6.3.1 Monitoreo de microplásticos <i>in-situ</i>	56

6.3.2 Monitoreo de fluoranteno <i>in-situ</i>	59
6.4 IMPLICACIONES ECOLÓGICAS	60
7. CONCLUSIONES	62
REFERENCIAS	63
A1. ANEXO 1. ESTUDIOS PILOTOS	72
A1. 1 Determinación del modelo experimental	72
A1. 2 Ensayos de resuspensión de los MP	73
A1. 3 Proporción peso húmedo vs peso seco de los MP	74
A1. 4 Proporción peso seco vs volumen de la arena	74
A1. 5 Proporción peso húmedo vs peso seco de <i>Eupolymnia rullieri</i>	75
A1. 6 Proporción peso húmedo vs peso seco de <i>Isognomon alatus</i>	75
A1. 7 Determinación del sustrato preferencial de <i>Eupolymnia rullieri</i>	75
A1. 8 Estudios pilotos de respiración	76
A1. 8.1 Estudio piloto de respiración de <i>Eupolymnia rullieri</i>	76
A1. 8.2 Estudio piloto de respiración de <i>Isognomon alatus</i>	77
A1. 9 Estudios pilotos de consumo de algas para <i>Isognomon alatus</i>	78
A1. 10 Estudios pilotos de motilidad para <i>Eupolymnia rullieri</i>	79
A1. 11 Relación entre sustrato-arena y la supervivencia de <i>Eupolymnia rullieri</i>	80
A1. 12 Estudios pilotos de hipoxia para <i>Isognomon alatus</i>	81
A1. 13 Estudios pilotos de hipoxia para <i>Eupolymnia rullieri</i>	82
A1. 14 Estudios pilotos de mortalidad en <i>Eupolymnia rullieri</i>	83
A1. 15 Diversidad de algas dentro de los acuarios	85
A1. 16 Densidad de algas en los acuarios de <i>Isognomon alatus</i>	86
A1. 17 Densidad de los MP en los acuarios de <i>Isognomon alatus</i>	86
A.2 ANEXO 2. Características de los microplásticos de PVC utilizados	87
A.2 Datos del producto	87

RESUMEN

Los microplásticos constituyen un problema de contaminación a nivel global, cuyo estudio se ha intensificado en estos últimos años en todo el mundo. Este trabajo, que forma parte de un proyecto internacional (GAME) con experimentos simultáneos en diferentes países del mundo, tuvo como objetivo evaluar la influencia de microplásticos de polivinil cloruro (pvc) y fluoranteno en dos especies comunes del Caribe Mexicano: *Eupolyornia rullieri* (Annelida, Polychaeta), *Isognomon alatus* (Mollusca, Bivalvia). Los resultados mostraron que en *E. rullieri* el fluoranteno disminuye la cantidad de arena que pueden procesar. En *I. alatus* se observó una relación positiva entre la cantidad de microplásticos en el medio y el aumento de consumo de alimento. En esta misma especie, tanto los microplásticos como la presencia de fluoranteno, provocaron un aumento en su respiración. En cambio, en el crecimiento y la tasa de mortalidad no se observó efecto medible en ninguna de las dos especies bajo estudio. Asimismo, se efectuaron conteos de microplásticos en el sedimento de la zona costera de Puerto Morelos, obteniéndose valores relativamente altos (55.67 partículas / kg de arena). No se tiene registro de la evaluación de microplásticos ni de fluoranteno en sedimentos de playas para la zona del Caribe y Centro América, ni de sus repercusiones en especies caribeñas, por lo que este estudio se considera pionero en el tema y ayuda a sentar las bases para futuros estudios.

1. INTRODUCCIÓN

Los microplásticos son partículas cuyo diámetro es inferior a 5 mm. (NOAA, 2015). Para diferenciar entre varios tamaños de plástico “the European Marine Strategy Framework Directive” ha propuesto la clasificación que se muestra en la figura 1 (Galvani *et al.*, 2013; Van Cauwenberghe *et al.*, 2015a).

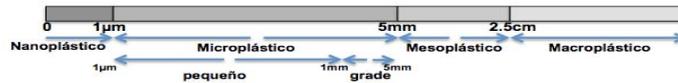


Figura 1. Nomenclatura propuesta por “the European Marine Strategy Framework Directive” para los diferentes tamaños de plástico (modificado de Van Cauwenberghe *et al.*, 2015a)

Dependiendo de su origen, los microplásticos pueden ser primarios o secundarios. Los microplásticos primarios son manufacturados con la intención de tener un tamaño microscópico: se utilizan como exfoliantes de cremas, jabones y otros cosméticos (Wright *et al.*, 2013). Los microplásticos secundarios son derivados de la fragmentación de los macroplásticos (Wright *et al.*, 2013).

1.1 Tipos de plásticos

El uso de los plásticos es popular debido a que tienen un conjunto de propiedades únicas que facilitan la manufactura de diferentes productos (Andrady y Neal, 2009). Entre los plásticos comúnmente utilizados en la industria se encuentran el polietileno (PE), el polipropileno (PP), el poliestireno (PS), el poliéster termoplástico (PA), el teraftalato de polietileno (PET), el cloruro de polivinilo (PVC) y el acetato de celulosa (CA) (Tabla 1; Andrady, 2011).

Tabla 1. Tipos de plásticos, porcentaje de producción y ejemplos de productos que se elaboran con estos, tomando como referencia la producción anual mundial de 245 millones de toneladas estimadas por Andrady en 2011. (modificado de Andrady, 2011).

Tipo de plástico y código de identificación	Porcentaje de producción	Ejemplos
 Polipropileno (PP)	24%	Cuerdas, tapas de botellas, redes
 Polietileno de baja densidad (LDPE)	21%	Bolsas de plástico, anillos de six-pack, botellas, redes, popotes
 Cloruro de polivinilo (PVC)	19%	Botellas, tubería, películas plásticas
 Polietileno de alta densidad (HDPE)	17%	Contenedores de leche y jugo
 Teraflato de polietileno (PET)	7%	Botellas de bebidas
 Poliestireno (PS)	6%	Utensilios de plástico y contenedores de comida
 Nilón (PA)	<3%	Redes y trampas
 Acetato de celulosa (CA)	-	Filtros de cigarros
 Espuma de poliestireno (unicel)	-	Flotadores, vasos, anzuelos

1.2 Introducción de los desechos plásticos al ambiente marino

El plástico es ubicuo en nuestra vida diaria y, por tanto, en nuestros desechos (Andrady, 2011). Engler (2012) señala que las cantidades de plásticos que se producen, así como las que desechamos, reflejan un aproximado de los plásticos que vertimos en el mar (Fig. 2). Jambeck *et al.* (2015) apuntan a la vía terrestre como la principal fuente de los desechos plásticos marinos.



Figura 2. Flujo de cantidades de desechos plásticos de la tierra al mar (modificado de Jambeck *et al.*, 2015)

Una vez en el ambiente marino, la persistencia de los plásticos varía dependiendo de los compuestos que lo conforman. No se sabe con exactitud cuánto tiempo persisten los plásticos; sin embargo, se estima que las tasas pueden ser lentas debido al bajo porcentaje de carbón perdido a través de las décadas (Andrady, 2011).

Los objetos plásticos típicamente se fragmentan en objetos progresivamente más y más pequeños sin degradación química substancial (Cooper y Corcoran, 2010). La degradación de los plásticos es causada por factores físicos, químicos y biológicos (Andrady, 1994; Feldman, 2002, Law *et al.*, 2010).

1.3 Evaluación de los microplásticos en sedimento marino

La fragmentación sin degradación química de los plásticos ocasiona una alta persistencia de los microplásticos en el sedimento marino. Los microplásticos han sido examinados en sedimentos de playa de diferentes partes del mundo, correspondientes principalmente a la zona submareal y a lo largo de la costa (Tabla 2). También se ha observado la presencia de microplásticos en otras zonas como la intermareal y la litoral, entre otras (Tabla 2). En sedimentos de océano profundo, se ha detectado la presencia de microplásticos en cantidades

que van desde muy pocas piezas hasta alrededor de 2000 piezas por m² (Van Cauwenberghe *et al.*, 2013; Fisher *et al.*, 2015).

Tabla 2. Abundancia de microplásticos en sedimentos de diferentes localidades en el mundo. (modificado de Van Cauwenberghe *et al.*, 2015a)

Continente	País	Locación específica	Tamaño de la partícula	Abundancia medida de plástico en sedimento	Referencia
África	Islas Canarias	Playa	1mm – 5mm	100 g plástico / L	Baztan <i>et al.</i> , 2014
América	Hawái	Playa	1mm – 15mm	541 - 18559 Items /260 L	McDermid y McMullen, 2004
	US	Florida-Submareal	250µm – 4mm	116 - 215 Items/L	Graham y Thompson, 2009
		Maine-Submareal		105 Items/L	Graham y Thompson, 2009
	Brasil	Playa	2mm – 5mm	60 Items/m ²	Ivar do Sul <i>et al.</i> , 2009
	Brasil	Playa	0.5mm – 1mm	200 Items/0.01 m ²	Costa <i>et al.</i> , 2010
			1mm – 20mm	100 Items/0.01 m ²	Costa <i>et al.</i> , 2010
	Hawái	Playa	250µm – 10mm	0.12% - 3.3% plástico por peso	Carson <i>et al.</i> , 2011
	Brasil	Planicie de inundación	1mm – 10cm	6.36 - 15.89 Items/m ²	Costa <i>et al.</i> , 2011
	Chile	Playa	1mm – 475mm	<1 - 805 Items/m ²	Hidalgo-Ruz y Thiel, 2013
	Quebec	Sedimento de río	400µm- 2.16mm	52 – 13832 beads/m ²	Castañeda <i>et al.</i> , 2014
	Nueva Escocia	Playa	0.8µm – 5mm	20 - 80 fibras/10 g	Mathalon y Hill, 2014
Asia	Singapur	Playa	1.6µm – 5mm	0 - 4 Items/250 g seco	Ng y Obbard, 2006
	India	Zona de desagüe de buques	1.6µm – 5mm	81.4 mg/kg	Reddy <i>et al.</i> , 2006
	Corea del Sur	Línea de marea alta	2mm - 10mm	913 Items/m ²	Heo <i>et al.</i> , 2013
	India	Playa	1mm – 5mm	10 - 180 Items/m ²	Jayasiri <i>et al.</i> , 2013
	Corea del Sur	Playa temporada seca	1mm – 5mm	8205 Items/m ²	Lee <i>et al.</i> , 2013
		Playa temporada de lluvias		27606 Items/m ²	Lee <i>et al.</i> , 2013
	Singapur	Manglar	1.6µm – 5mm	36.8 Items/kg seco	Nor y Obbard, 2014
	NW Pacífica	Fosa en mar profundo	300µm – 5mm	60 - 2020 Items/m ²	Fisher <i>et al.</i> , 2015
	Corea del Sur	Playa	50µm – 5mm	56 – 285673 Items/m ²	Kim <i>et al.</i> , 2015
Europa	Reino Unido	Playa	1.6µm – 5mm	0.4 fibras/50 mL	Thompson <i>et al.</i> , 2004
		Estuario		2.4 fibras/50 mL	Thompson <i>et al.</i> , 2004
		Submareal		5.6 fibras/50 mL	Thompson <i>et al.</i> , 2004
	Suecia	Submareal	2mm – 5mm	2 - 332 Items/100 mL	Norén, 2008
	Reino Unido	Playa	1.6µm - 1mm	<1 - 8 Items/50 mL	Browne <i>et al.</i> , 2010
	Reino Unido	Mar del Norte-playa	38µm – 1mm	0.2 - 0.8 fibras/50 mL	Browne <i>et al.</i> , 2011
		Canal de la Mancha-playa		0.4 - 1 fibras/50 mL	Browne <i>et al.</i> , 2011
	Bélgica	Puerto	38µm – 1mm	166.7 Items/kg seco	Claessens <i>et al.</i> , 2011
		Escudo Continental		97.2 Items/kg seco	Claessens <i>et al.</i> , 2011
		Playa		92.8 Items/kg seco	Claessens <i>et al.</i> , 2011
	Portugal	Playa	1.2µm – 5mm	133.3 Items/m ²	Martins y Sobral, 2011
	Alemania	Playa urbana	1mm – 15mm	5000 - 7000 Items/m ³	Bailent <i>et al.</i> , 2012
		Playa rural		150 - 700 Items/m ³	Bailent <i>et al.</i> , 2012
	Alemania	Planicie de inundación	1.2µm – 5mm	0 - 621 Items/10 g	Liebezeit y Dubaish, 2012
	Italia	Logo sub-alpino	9µm – 5mm	1108 Items/m ²	Imhof <i>et al.</i> , 2013
	Grecia	Playa	1mm – 2mm	57 - 602 Items/m ²	Kaberi <i>et al.</i> , 2013
			2mm – 4mm	10 - 575 Items/m ²	Kaberi <i>et al.</i> , 2013
	Bélgica	Línea de marea alta	38mm – 1mm	9.2 Items/kg seco	Van Cauwenberghe <i>et al.</i> , 2013
		Línea de marea baja		17.7 Items/kg seco	Van Cauwenberghe <i>et al.</i> , 2013
	Italia	Submareal	0.7µm – 1mm	672 - 2175 Items/kg seco	Vianello <i>et al.</i> , 2013
	Alemania	Playa	<1mm	1.3 - 2.3 Items/kg seco	Dekiff <i>et al.</i> , 2014
	Eslovenia	Playa	0.25mm – 5mm	177.8 Items/kg seco	Laglbauer <i>et al.</i> , 2014
		Litoral		170.4 Items/kg seco	Laglbauer <i>et al.</i> , 2014
Internacional		Mar Profundo	5µm – 1mm	0.5 Items/cm ²	Van Cauwenberghe <i>et al.</i> , 2013

Los microplásticos son categorizados usando características simples de su apariencia como forma y color; sin embargo, dependiendo del criterio de cada autor se pueden encontrar diferentes categorías a lo largo de la literatura. Los tipos recurrentes son: pellets, fragmentos, gránulos, fibras, películas (film) y espumas (styrofoam) (Van Cauwenberghe *et al.*, 2015a).

La biodisponibilidad de los plásticos está dada por varios factores (eg. forma, color, carga, agregación, abundancia, etc.); sin embargo, primordialmente se atribuye a dos propiedades claves: su medida y su densidad (Kach y Ward, 2008; Wright *et al.*, 2013). La medida de los granos de arena puede llegar a ser similar a la de los microplásticos, lo que favorece su biodisponibilidad para los organismos que se encuentran en la base de la cadena alimenticia (Moore, 2008; Wright *et al.*, 2013).

El consumo de los microplásticos por la biota marina ha sido investigado y documentado en diferentes trabajos, tanto en organismos que viven en condiciones naturales (Tabla 3), como en organismos en condiciones de laboratorio (Tabla 4).

Tabla 3. Ingesta de microplásticos documentada en condiciones naturales de diferentes especímenes en diferentes partes del mundo (modificado de Van Cauwenberghe *et al.*, 2015a).

Biota	Origen	Ensayo	Carga del microplástico	Tamaño de la partícula	Referencia	
Polychaeta	<i>Arenicola marina</i>	BE	Digestión del HNO ₃ en todo el organismo	1.2 ± 2.8 MP/g peso húmedo	>5 µm	Van Cauwenberghe <i>et al.</i> , 2015b
		PB	Análisis de heces	0.3 ± 0.6 MP/g peso húmedo		Van Cauwenberghe <i>et al.</i> , 2015b
		FR				Van Cauwenberghe <i>et al.</i> , 2015b
Crustaceae	<i>Nephrops norvegicus</i>	RU	Análisis de intestino	83% de los animales muestreados contienen MP	<5 mm	Murray y Cowie, 2011
	<i>Crangon crangon</i>	BE	Digestión del organismo completo con HNO ₃	0.64 ± 0.53 MP/g peso húmedo	>20 µm	Devriese <i>et al.</i> , 2015
	<i>Lepas spp.</i>	GSPN	Análisis de intestino	33.5% de los animales muestreados contienen MP	>0.5 mm	Goldstein y Goodwin, 2013
Bivalvia	<i>Mytilus edulis</i>	BE	Digestión del organismo completo con HNO ₃	0.38 ± 0.07 MP/g peso húmedo	>5 µm	Van Cauwenberghe y Janssen, 2014
		BE	Digestión del organismo completo con HNO ₃	0.2 ± 0.3 MP/g peso húmedo	>5 µm	Van Cauwenberghe <i>et al.</i> , 2015b
		FR	Análisis de heces	0.1 ± 0.2 MP/g peso húmedo		Van Cauwenberghe <i>et al.</i> , 2015b
		PB				Van Cauwenberghe <i>et al.</i> , 2015b
		PB	Digestión del organismo completo con HNO ₃ :HCL ₄ (4:1 v.v)	3.5 fibras/10 g peso húmedo	>20 µm	De Witte <i>et al.</i> , 2014
		BE zona de rompeolas	Digestión del organismo completo con HNO ₃ :HCL ₄ (4:1 v.v)	2.6 fibras/10 g peso húmedo	>20 µm	De Witte <i>et al.</i> , 2014
		BE Zona de muelle	Digestión del organismo completo con HNO ₃ :HCL ₄ (4:1 v.v)	5.1 fibras/10 g peso húmedo	>20 µm	De Witte <i>et al.</i> , 2014
	CA	Digestión del H ₂ O ₂ en todo el organismo	34 - 178 MP/ind	>0.8 µm	Mathalon y Hill, 2014	
	<i>Crassostrea gigas</i>	FR	Digestión del HNO ₃ en todo el organismo	0.47 ± 0.16 MP/g peso húmedo	>5 µm	Van Cauwenberghe y Janssen, 2014
Actinopteri	pez demersal	RU	Análisis de intestino	1.90 ± 0.10 MP/ind	No es claro	Lusher <i>et al.</i> , 2013
		AL	Análisis de intestino	3.4% de los animales muestreados contienen MP	No es claro	Rummel, 2014
	<i>Gobio gobio</i>	FR	Análisis de intestino	12% de los animales muestreados contienen MP	No es claro	Sanchez <i>et al.</i> , 2014

Origen de las especies estudiadas: AL= Alemania; BE= Bélgica; CA= Cánada; FR= Francia; GSPN= giro subtropical del Pacífico Norte; PB= Países Bajos; RU= Reino Unido; MP= microplásticos

Tabla 4. Efectos directos causados por la ingesta de microplásticos en condiciones de laboratorio de diferentes especímenes (modificado de Van Cauwenberghe *et al.*, 2015a).

Biota	Ruta de exposición	Tipo de partícula	Concentración	Ensayo	Efecto	Referencia	
Polychaeta	<i>Arenicola marina</i>	Sedimento enriquecido	125 – 150 µm UPVC	5% por peso	Balance de energía Actividad de alimentación	Disminución en el balance de energía y la alimentación	Wright <i>et al.</i> , 2013
		Sedimento enriquecido	20 – 2000 µm	1.5 g MP/L	Análisis de heces	Alimentación	Thompson <i>et al.</i> , 2004
		Sedimento enriquecido	10 µm PS	50 MP/ml	Balance de energía	Efecto no significativo	Van Cauwenberghe <i>et al.</i> , 2015b
		Sedimento enriquecido	30 µm PS				Van Cauwenberghe <i>et al.</i> , 2015b
		Sedimento enriquecido	90 µm PS	10 MP/ml			Van Cauwenberghe <i>et al.</i> , 2015b
Crustaceae	<i>Mysis sp.</i>	Sedimento enriquecido	10 µm PS	1000 MP/ml	Alimentación	Alimentación	Setälä <i>et al.</i> , 2014
				2000 MP/ml		Sin acumulación	Setälä <i>et al.</i> , 2014
		Pre expuesto		10000 MP/ml		Transferencia trófica	Setälä <i>et al.</i> , 2014
		Zooplancton					Setälä <i>et al.</i> , 2014
	<i>Carcinus maenas</i>	Sedimento enriquecido	8 – 10 µm PS	9.4 * 10 ⁵ MP/L	Análisis del tejido	Retención	Watts <i>et al.</i> , 2014
				4.0 * 10 ⁴ MP/L	Análisis de heces		Watts <i>et al.</i> , 2014
		Mejillones enriquecidos		4.0 * 10 ³ MP/g			Watts <i>et al.</i> , 2014
		Mejillones pre expuestos	0.5 µm PS		Análisis del Tejido	Translocación	Farrell y Nelson, 2013
	<i>Semibalanus balanoides</i>	Agua de mar enriquecida	20 – 2000 µm	1 g/L	Análisis del intestino	Alimentación	Thompson <i>et al.</i> , 2004
	<i>Nephrops norvegicus</i>	Peces enriquecidos	5 mm PP	10 fibras/cm ³	Análisis del estomago	Retención y Acumulación	Murray y Cowie, 2011
Bivalvia	<i>Mytilus edulis</i>	Agua de mar enriquecida	3.0 µm PS 9.6 µm PS	15,000 MP/400 ml	Análisis de intestino y hemolinfa	Translocación al sistema circulatorio	Browne <i>et al.</i> , 2008
		Agua de mar enriquecida	10 µm PS 30 µm PS	50 MP/ml	Balance energético	Efecto no significativo	Van Cauwenberghe <i>et al.</i> , 2015b
		Agua de mar enriquecida	90 µm PS	10 MP/ml	Balance energético	Efecto no significativo	Van Cauwenberghe <i>et al.</i> , 2015b
		Agua de mar enriquecida	>0-80 µm HDPE	2.5 g/L	Ensayos histológicos e histoquímicos	Acumulación en lisosomas y células digestivas Respuesta inflamatoria	von Moos <i>et al.</i> , 2012
		Agua de mar enriquecida	30 nm PS	0.1 g/L 0.2 g/L 0.3 g/L	Actividad de alimentación	Producción de pseudoheces Reducción en la alimentación	Wegner <i>et al.</i> , 2012
		Agua de mar enriquecida	0.5 µm 1 µm	12,000 MP/ml	Tasa de alimentación	Alimentación	Kach y Ward, 2008
		Agua de mar enriquecida	100 nm	13,000 MP/ml	Tasa de alimentación	Alimentación	Ward y Kach, 2009
	<i>Crassostrea virginica</i>	Agua de mar enriquecida	100 nm	13,000 MP/ml	Tasa de alimentación	Alimentación	Ward y Kach, 2009
Echinodermata	<i>Holothuria sp.</i>	Sedimento enriquecido	0.25 - 15 mm PVC	10 g 65 g	Tasa de alimentación	Alimentación selectiva	Graham y Thompson, 2009
			0.25 - 1.5 mm Nylon	2 g			Graham y Thompson, 2009

HDPE: Polietileno de alta densidad; PS: Poliestireno; PVC: Cloruro de polivinilo; UPVC: Cloruro de polivinilo no plastificado

Los microplásticos representan una amenaza indirecta a los organismos, ya que actúan como vectores de químicos tóxicos (Andrady, 2011).

1.4 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAHs).

Los PAHs son un grupo ubicuo de más de 100 compuestos químicos que ocurren naturalmente como un componente del petróleo (Rios *et al.*, 2007). Estos compuestos se generan a partir de fuentes tanto antropogénicas como naturales. Los PAHs pueden separarse en 3 categorías no excluyentes basadas en su fuente: 1. Biogénica; 2. Petrogénica; 3. Pirogénica (Zeng y Visa, 1997; Rios *et al.*, 2007).

Los PAHs están compuestos de 2 anillos de benceno fusionados. La estructura química de algunos de los PAHs comúnmente estudiados, entre ellos el fluoranteno, se muestran en la figura 3.

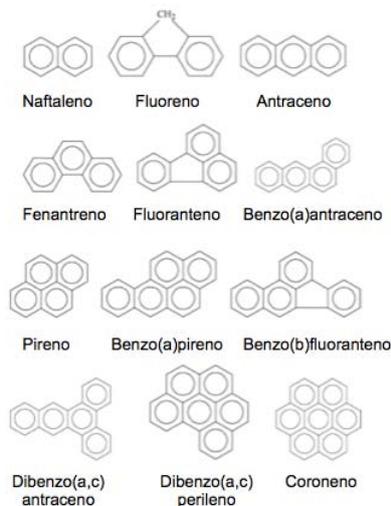


Figura 3. Estructuras química de algunos PAHs comúnmente estudiados (tomado de Haritash y Kaushik, 2009)

Debido a su importancia especialmente relacionada con su potencial carcinogénico y mutagénico, 16 PAHs fueron listados por la EPA (Agencia de Protección ambiental) de EU y su monitoreo ambiental se considera prioritario (ATSDR, 2007). Estos compuestos son: naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fenantreno, antraceno, fluoreno, fluoranteno, benzo[a]antraceno, criseno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, pireno, benzo[a]pireno, indeno[1,2,3 cd]pireno, dibenzo[ah]antraceno, y benzo[ghi]perileno (Fisher *et al.*, 2013).

1.5 Propiedades químicas del fluoranteno

Fluoranteno es el nombre utilizado por la IUPAC; sin embargo, puede ser encontrado con otros sinónimos como Bezo[j,k]fluoreno, Idryl, 1,2-Benzacenafteno, entre otros. Su fórmula molecular es C₁₆H₁₀ y su peso molecular 202.25 g/mol. Físicamente el fluoranteno es un cristal fino de color

amarillo claro. Su punto de ebullición es a los 384°C y su punto de fusión a los 111°C. Es mayormente soluble en alcohol etílico, éter etílico y benceno. Debido a su alto peso molecular y su no polaridad es un compuesto prácticamente insoluble en agua. La solubilidad del fluoranteno (99% puro) en agua de mar (a 24°C) cercana a 0.120 mg/L (pubchem.ncbi, 2015).

Es resistente a la foto-descomposición. No sufre foto-oxidación en disolventes orgánicos bajo luz fluorescente o luz solar. Propiedades espectrales, información farmacológica, bioquímica, manejo, cuidados, así como las propiedades químicas citadas con anterioridad pueden consultarse en la página del “National Center for Biotechnology Information” (pubchem.ncbi, 2015).

1.6 Amenazas de los PAHs asociados a los desechos plásticos en fauna marina

Algunos estudios sugieren que los microplásticos juegan sólo un papel menor en comparación con los contaminantes ambientales que absorben los microplásticos y se transfieren a los organismos marinos (Van Cauwenberghe *et al.*, 2015a).

De acuerdo con Engler (2012), los depredadores en los niveles tróficos más altos tienen una mayor exposición a los contaminantes, sea directamente cuando viven en ambientes contaminados; o indirectamente, mediante la ingesta de comida contaminada. Especies que viven en aguas contaminadas tienden a concentrar los tóxicos en sus tejidos, un proceso llamado bioconcentración. Si los tóxicos se acumulan en los organismos más rápido de lo que se pueden eliminar, se dice que estas sustancias se bioacumulan. Si los tóxicos se encuentran en concentraciones cada vez más altas en niveles tróficos progresivamente más altos de la cadena alimenticia, entonces se dice que están biomagnificados, por lo que, la ingesta de plásticos contaminados en cualquier nivel trófico puede aumentar significativamente la cantidad de PAHs disponibles en la cadena alimenticia conforme aumenta el nivel trófico.

Los microplásticos en el océano contribuyen a la acumulación de PAHs en la dieta de los animales dado que estos pueden desabsorberse en el intestino de los organismos (Engler, 2012). Aunque no se ha podido cuantificar la cantidad de contaminantes contenidos en los plásticos, es un hecho que los estos desechos son sólo un sumidero temporal de sustancias tóxicas (Engler, 2012).

Con base en lo antes expuesto, es necesario fomentar una mayor investigación en este tema, para entender completamente el impacto de los contaminantes absorbidos en los plásticos y la entrada de estos en la cadena alimenticia marina entera y por ende en la dieta los humanos (Van Cauwenberghe *et al.*, 2015a).

Es por ello que en esta tesis se estudia el efecto de los microplásticos sobre los organismos marinos, considerando a dos especies de invertebrados, el

poliqueto *Eupolymnia rullieri* y el molusco *Isognomon alatus*, ambos con la característica de ingerir microplásticos como se explica más adelante.

1.7 *Eupolymnia rullieri* Londoño-Mesa 2005

Eupolymnia rullieri pertenece a la clase Polychaeta, orden Terebellida, familia Terebellidae. Esta familia incluye 72 géneros y 550 especies reconocidas como válidas, la mayoría pobremente estudiadas en cuanto a su biología reproductiva y su ontogenia (Garraffoni y Lana, 2010).

1.8 Características de *Eupolymnia rullieri*

Las características que la identifican son que presenta 5 unciníferos con uncinos con hileras simples y 20 segmentos torácicos. Además posee uncinos aviculares, con pocos dientes dispuestos horizontalmente sobre el diente principal y las alas laterales están ausentes (Fig. 4).

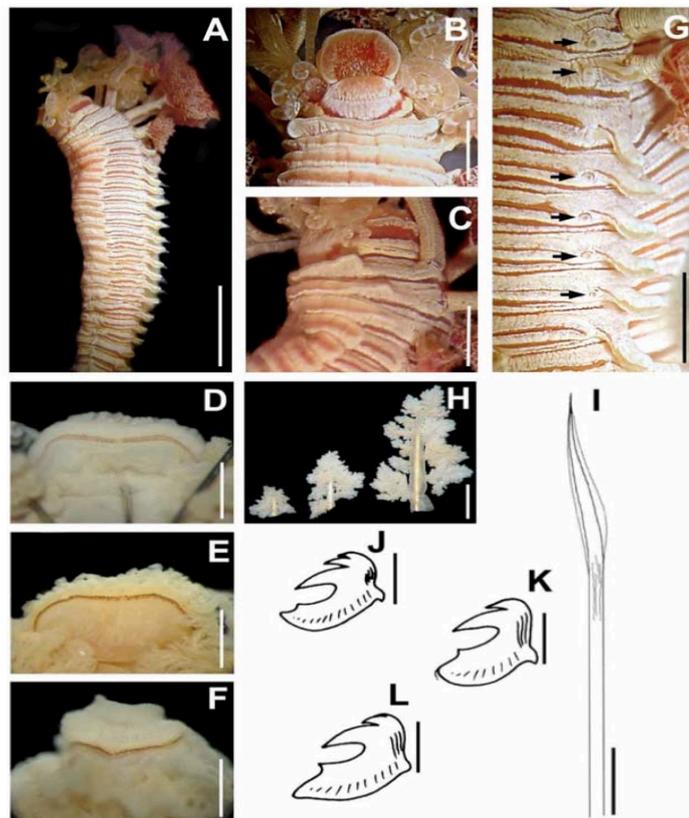


Figura 4. Morfología de *Eupolymnia rullieri*; A. Vista lateral de la región torácica; B. Vista ventral y extremo anterior; C. Vista lateral y extremo anterior; D-F. Vista dorsal y extremo anterior; G. Región torácica anterior en vista lateral, papilas nefridiales (señaladas por las flechas); H. Branquias: la más larga (a la derecha) del segmento 2, la más corta (a la izquierda) del segmento 4; I. Notoqueta bilimbada del segmento 10; J. Uncino del segmento 5; K. Uncino del segmento 11; L. Uncino del segmento 25; Barra de escala A: 7.5mm; B,C: 1.6mm; D-F: 2.3mm; G: 1.9mm; H: 2.1mm; K-L: 0.02mm (tomado de Londoño-Mesa, 2009)

1.9 Localidad tipo y distribución de *Eupolymnia rullieri*

La especie tipo descrita por Londoño-Mesa en 2005 pertenece a la zona del Caribe mexicano (Londoño-Mesa, 2009). Este mismo autor considera que su distribución es más amplia que el Golfo de México y el Gran Caribe, puesto que registra su existencia en la zona insular de Colombia, cerca de la frontera marítima de Nicaragua (Londoño-Mesa, 2011)

1.10 Estudios previos de efectos de microplásticos y PAHs en *Eupolymnia rullieri*

No se han realizado estudios para determinar impacto de la ingesta de microplásticos y de PAHs en *Eupolymnia rullieri*. La especie más cercana en la que se han estudiado estos tipos de interacciones es en *Arenicola marina* (Polychaeta, Arenicolidae). En la Tabla 3 se observan los resultados de los estudios de *A. marina* y la ingesta de microplásticos registrados en el campo, mientras que en la Tabla 4 se muestran los estudios realizados en laboratorio.

1.11 *Isognomon alatus* Gmelin 1791

Isognomon alatus pertenece a la phylum Mollusca, clase Bivalvia, orden Pterioidea, familia Isognomonidae, la cual incluye 7 géneros y aproximadamente 80 especies (ITIS, 2016).

1.12 Características de *Isognomon alatus*

El género presenta una concha delgada y comprimida con un interior de color nacarado. El margen anterior de la concha exhibe una acanaladura bisal cerca del margen dorsal. El ligamento está dividido y alojado en una serie de hoyos o surcos. La charnela tiene numerosas acanaladuras perpendiculares al margen dorsal de las valvas, las cuales son desiguales (heterovalvas), normalmente más altas que largas (García-Cubas y Reguero, 2007).

Esta especie presenta conchas de tamaño medio a grande (aprox. 75 mm), color gris-púrpura, café o negro y con una superficie lisa o escamosa. Las valvas son ovales en forma de abanico, aplanadas, la valva derecha plana y la valva izquierda moderadamente obesa. La charnela cuenta con 8 a 12 canales alargados paralelos entre sí y perpendiculares al margen dorsal, en cuyo interior se aloja el resilium de color café. La línea paleal es discontinua. La línea bisal en el margen anterior está cerca de la parte dorsal. (Fig. 5; García-Cubas y Reguero, 2007). En la figura 6 se presentan las características de *I. bicolor* una especie cercana a *I. alatus*.

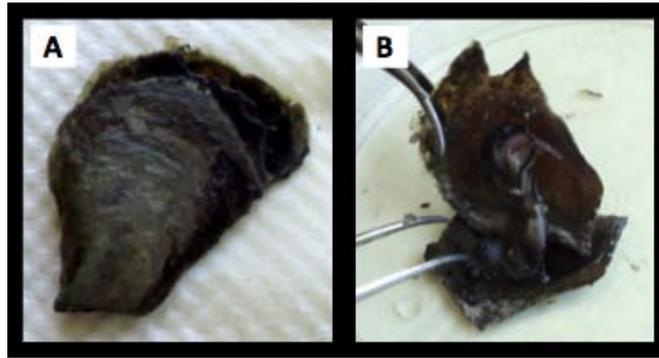


Figura 5. Morfología de *Isognomon alatus*; A. vista externa; B vista interna de las valvas

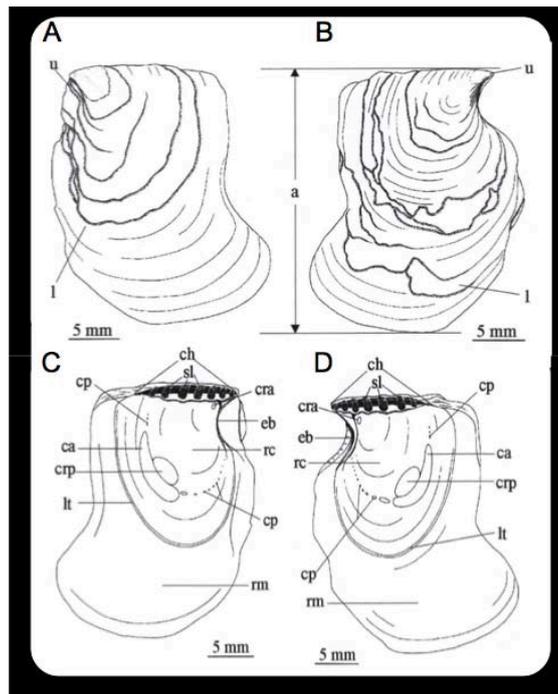


Figura 6. Morfología de *Isognomon bicolor*; A,B. vista externa; C,D. vista interna de las valvas izquierda y derecha, respectivamente; a: altura, ca: cicatriz del músculo aductor, ch: charnela, cp: cicatrices de los músculos paleales, cra: cicatriz del músculo retractor anterior del pie y del biso, crp: cicatriz del músculo retractor posterior del pie y del biso, eb: muesca bisal, l: ornamentación lamelar, lt: línea de transición entre la región corporal y la región marginal, rc: región del cuerpo nacarada, rm: región marginal no nacarada, sl: surcos de los ligamentos, u: umbo (tomado de Domaneschi y Martins, 2002)

1.13 Distribución de *Isognomon alatus*

La especie se distribuye desde las costas y lagunas de Tamaulipas a Yucatán y hasta el Mar Caribe (García-Cubas y Reguero, 2007), aunque, se ha documentado su existencia en otras partes del mundo, en Centroamérica y Asia (Discover Life, 2016). Habita sobre raíces de manglar y rocas formando agrupaciones (García-Cubas y Reguero, 2007).

1.14 Estudios previos de efectos de microplásticos y PAHs en *Isognomon alatus*

No se han realizado estudios para determinar el impacto de la ingesta de microplásticos y de PAHs en *I. alatus*. La especies más cercanas en la que se han estudiado este tipo de interacción es en *Mytilus edulis* (Bivalvia, Mytilidae) y *Crassostrea virginica* (Bivalvia, Ostreidae). En la Tabla 3 se pueden observar los estudios de estas especies y la ingesta de microplásticos registrados en campo, mientras que en la Tabla 4 se muestran los estudios realizados en laboratorio.

1.15 Proyecto GAME y su marco internacional de colaboración

Este estudio forma parte del proyecto internacional GAME (Global Approach by Modular Experiments) cuya sede es en el "Research Center for Marine Geoscience" (GEOMAR), en Kiel Alemania. GAME tiene el objetivo de realizar experimentos simultáneos en diferentes países del mundo, con fines de investigación y formación de recursos humanos a nivel Maestría de alto nivel. En el programa del año 2014, "GAME 2014", fueron siete países participantes: Brasil, Chile, Indonesia, Inglaterra, Japón, México y Portugal. El desarrollo de los experimentos se llevó a cabo en los países mencionados, con la participación de un alumno de este país y un alumno alemán.

La presente tesis se desarrolló bajo el marco común de trabajo establecido en la edición GAME 2014, cuya finalidad fue investigar los efectos potenciales de las partículas de PVC y el fluoranteno que son ingeridos por macrofauna marina.

La suma de esfuerzos en la investigación simultánea sobre el impacto ecológico de los microplásticos, como se logra con este proyecto multinacional, genera un mayor conocimiento, el cual puede ser comparable en diferentes ecosistemas marinos. El objetivo es que este conocimiento cree una mayor conciencia del problema que representan los microplásticos. Con ello, se podrán plantear mejores métodos de manejo y políticas para el control de la producción y desecho de los plásticos que ocupamos día con día.

La experimentación en medios controlados como son acuarios, es la que nos puede dar los mejores resultados a corto plazo sobre el efecto que pueden tener dichos compuestos sobre la fauna marina.

Siendo que en el experimento de GAME 2013 se había investigado el efecto de los microplásticos de poliéster de tamaño de 0.7 a 0.9 mm de diámetro y del fenantreno adherido a estos, en esta ocasión se decidió experimentar con microplásticos de PVC de tamaño de 150 a 250 μm y el contaminante escogido fue el fluoranteno. Con este trabajo se busca ampliar el conocimiento sobre el efecto de los microplásticos y los contaminantes orgánicos persistentes más comunes en el ambiente marino, que afectan a diferentes organismos marinos invertebrados.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal:

Determinar el efecto de los microplásticos sobre la macrofauna del Caribe Mexicano, en especial sobre su fisiología (incluyendo su supervivencia) y comportamiento, tomando como ejemplo a dos organismos muy comunes en este hábitat: la especie detritívora *Eupolyornia rullieri* y la filtradora *Isognomon alatus*.

2.2 Objetivos particulares:

Determinar si la ingesta de diferentes concentraciones de microplásticos de PVC (MP; tamaño de 150 – 250µm) y microplásticos de PVC con fluoranteno (MP/F) causan alteraciones en la fisiología de *Isognomon alatus* y de *Eupolyornia rullieri*.

Determinar si la ingestión de partículas de MP y de MP/F por *Eupolyornia rullieri* afecta:

La tasa de crecimiento.

La tasa de procesamiento de arena.

La tasa de respiración.

Determinar si la ingestión de partículas de MP y de MP/F por *Isognomon alatus* afecta:

La tasa de crecimiento.

La tasa de filtración.

La producción de heces.

La tasa de respiración.

La tolerancia al estrés (hipoxia).

Analizar la cantidad de MP y fluoranteno *in-situ*

3. ÁREA DE ESTUDIO

El proyecto se realizó en el Parque Nacional Arrecifes de Puerto Morelos que forma parte de la barrera arrecifal denominada "Gran Cinturón de Arrecifes del Atlántico Occidental", la segunda barrera arrecifal más grande del mundo. Sus coordenadas geográficas son 21°00'00" y 20°48'33" latitud norte y 86°53'14.40" y 86°46'38.94" longitud oeste (Fig. 7; CONANP, 2000).

Esta región presenta un clima cálido subhúmedo, con lluvias todo el año siendo más abundantes de mayo a octubre. Los valores de humedad relativa oscilan entre 81 y 88% (promedio anual = 84%). Los valores más altos de humedad corresponden a los meses de julio a octubre, lo cual coincide con la época de lluvias (Merino y Otero, 1991).

El promedio anual de lluvia es de 1 060.6 mm (\pm 171.4). Los valores promedio anuales mínimos de precipitaciones se presentan en abril (21.1mm) y los máximos en octubre (161.4 mm). Las estaciones de secas y de lluvias no están claramente definidas; sin embargo, se presentan dos picos de lluvias, uno en junio y otro de septiembre a noviembre. La temporada de huracanes se extiende de junio a noviembre, con mayor probabilidad entre los meses de agosto y septiembre (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010).

Los vientos alisios, que invaden la península de Yucatán tienen velocidades promedio de 5 m/s y son interrumpidos por "nortes", durante los meses de noviembre a abril. Los "nortes" (o frentes fríos) producen una caída en la temperatura y enfrían la superficie del océano (CONANP, 2010).

La temperatura mensual promedio del aire durante el año oscila desde los 20.7 hasta los 30.4°C, con máximas en verano de 32.5°C y mínimas en invierno de hasta 13.0°C. Rodríguez-Martínez *et al.* (2010) señalan que de mayo a octubre la temperatura tiende hacia valores de 29.0 a 29.7°C, presentándose una reducción de 4.1°C durante el resto del año.

El régimen de mareas es semidiurno, con una corta variación de aproximadamente 0.24 m. El sedimento se compone en su mayoría de arena calcárea, estabilizada por las praderas marinas y en parte colonizado por las comunidades de arrecifes de coral.

La barrera arrecifal y la línea de costa forman y limitan la laguna arrecifal. La profundidad de ésta llega hasta los 8 m en las bocas, aunque en promedio es de entre 3 y 4 m como máximo. La temperatura superficial del mar anual en promedio mensual oscila de los 25.1 a los 29.9°C. En los meses de agosto y septiembre se presentan las temperaturas más altas del agua de mar, las cuales están en el intervalo de los 31 a los 32°C. Las temperaturas más bajas del agua se presentan en los meses de diciembre y enero y van de los 24 a los 25° C (Coronado *et al.*, 2007). La salinidad promedio es de 35.7 unidades prácticas de salinidad y la concentración promedio de oxígeno disuelto es de 4.99 mg / L (Merino y Otero, 1991).

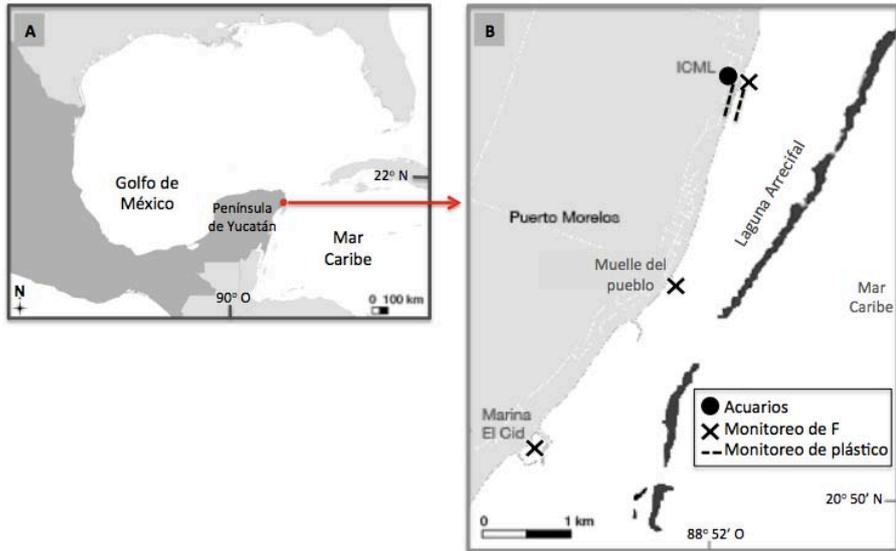


Figura 7. A. Mapa de ubicación de Puerto Morelos; B. Detalle de las zonas de muestreo del fluoranteno (F), el plástico y ubicación del ICML donde se montaron los acuarios (Realizados por Heel)

4. METODOLOGÍA

El diseño de los experimentos a llevar a cabo se realizó en conjunto con otros investigadores y estudiantes que participaron en el proyecto GAME (2014), por lo que se intentó, en lo posible, seguir un marco común. Las actividades realizadas durante los experimentos se sintetizan en el esquema de la figura 8.

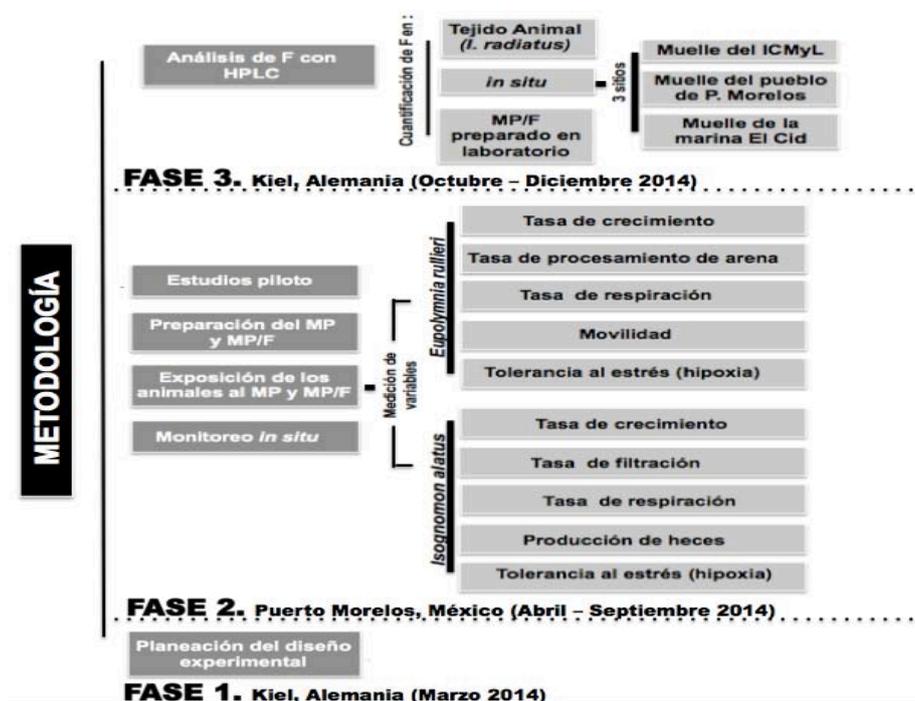


Figura 8. Diagrama de metodología realizada para los experimentos

La metodología que a continuación se detalla, está dividida en 4 ejes principales para su mejor entendimiento: Primero. Se explica la preparación de los microplásticos con fluoranteno (MP/F) y los microplásticos sin fluoranteno (MP) previa al experimento principal; Segundo. Se describe el experimento principal donde los organismos fueron expuestos a los MP/F y MP, la medición de las variables de respuesta y el experimento de hipoxia; Tercero. Se describe el monitoreo y cuantificación de plásticos y fluoranteno *in situ*; Cuarto. Por último se detalla el procedimiento de análisis de fluoranteno por HPLC.

El resumen de la metodología así como de las técnicas de análisis empleadas se muestran en la figura 9.

Los estudios pilotos, así como sus resultados, en los que se basa parte de la metodología empleada se describen en el Anexo 1.

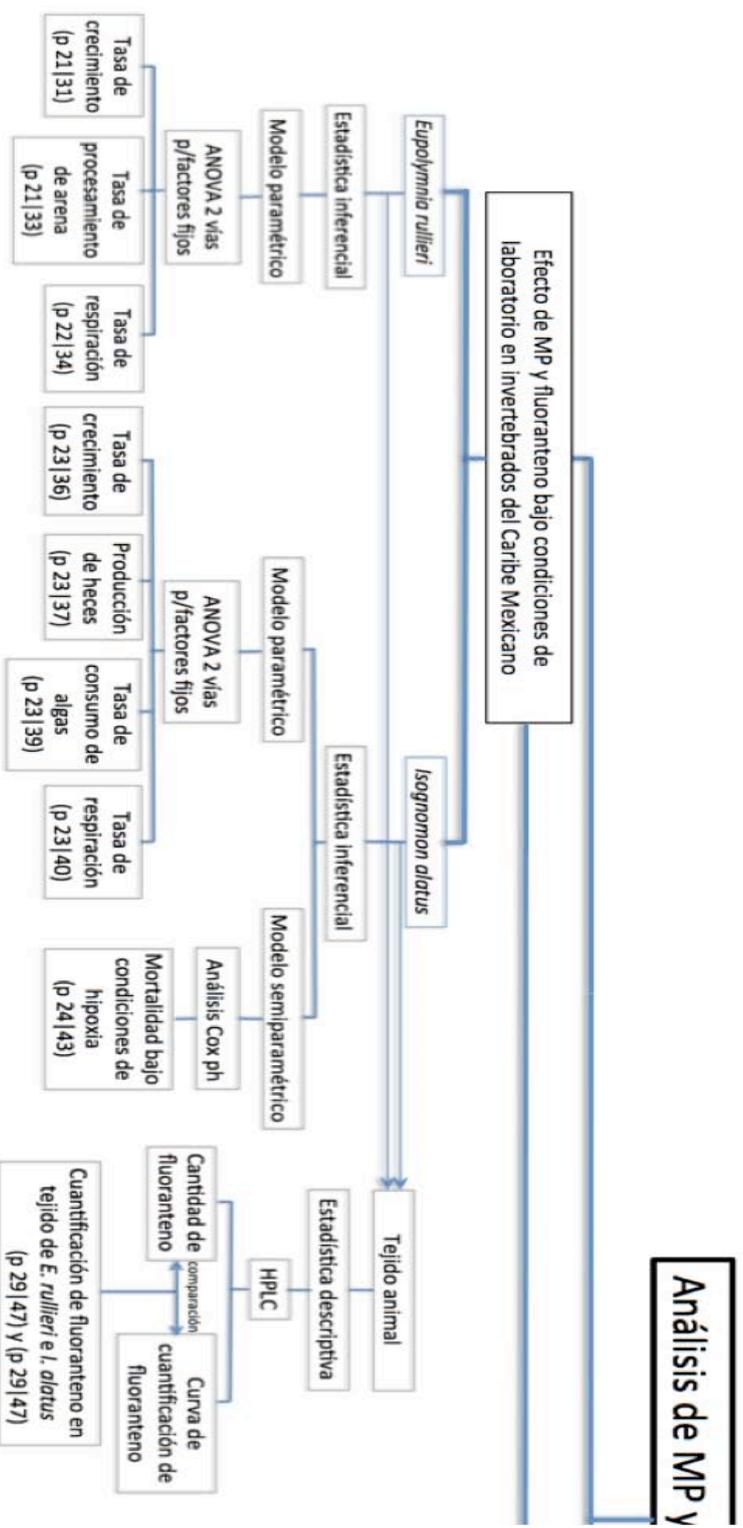


Figura 9. Resumen de las diferentes pruebas realizadas en este trabajo. Se muestra el número de página donde se explica la metodología de cada prueba, antes de la línea vertical, y el número de página de sus resultados, después de la línea vertical

y fluoranteno

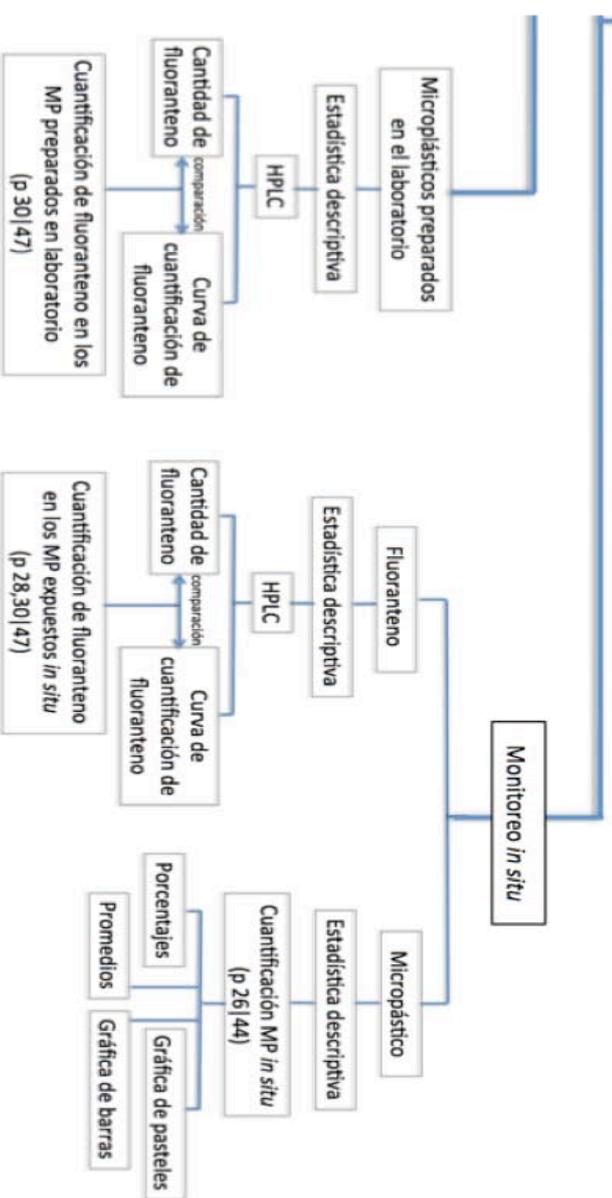


Figura 9 Continuación. Resumen de las diferentes pruebas realizadas en este trabajo. Se muestra el número de página donde se explica la metodología de cada prueba, antes de la línea vertical, y el número de página de sus resultados, después de la línea vertical. La cuantificación de fluoranteno *in situ* se obtuvo mediante dos procedimientos por lo que se referencian dos números de páginas.

4.1 PREPARACIÓN DE LOS MP/F y MP

4.1.1 Preparación de los MP/F

Con el propósito de que el fluoranteno se adhiriera a las partículas de MP, se diluyó fluoranteno puro hasta una concentración de 4 µg/l y se dejó reposar con los MP por 3 semanas.

Esta concentración fue elegida en base al estudio de Rochman *et al.* (2013) donde determinan que el PCV, expuesto durante 12 meses en 5 sitios de la Bahía de San Diego EUA, presenta una saturación de 4 ng (nanogramos) de fluoranteno por g de PVC, por lo que dicha concentración representa un escenario realista de un área portuaria.

La concentración deseada del fluoranteno en agua de mar se obtuvo mediante una serie de diluciones de la siguiente manera: 80 mg de fluoranteno puro se combinaron con 20 ml de acetona para la primera disolución (A). Posteriormente se colocaron 2 ml de la primera disolución (A) y 18 ml de acetona para la segunda disolución (B). Este último procedimiento se realizó 2 veces consecutivamente (disoluciones C y D), como se muestra en la figura 10.

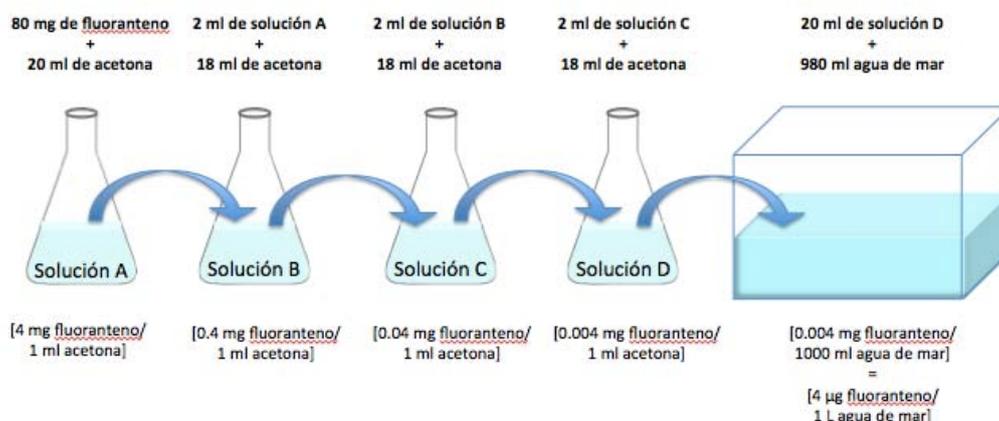


Figura 10. Procedimiento de disolución del fluoranteno

Si se prepara 1 kg (1000g) de PVC en 4 µg (= 4000ng) fluoranteno por litro de agua de mar, entonces teóricamente se alcanza una carga de 4 ng fluoranteno por gramo de MP, la cual es la concentración descrita Rochman *et al.* (2013) en la Bahía de California.

Cabe señalar que esta concentración fue teórica, pues las interacciones entre tipo de plástico, contaminante, grado de saturación y tiempo de exposición aún no están completamente entendidas. El análisis de HPLC realizado en los MP (sección 4.3) muestra la concentración real obtenida tras este procedimiento.

Una vez transcurridas las 3 semanas del fluoranteno con los MP, éstos se colocaron en los acuarios correspondientes. En los acuarios de *E. rullieri* se

colocaron 6 L de agua de mar, 300 ml de arena y, dependiendo del tratamiento (0.03%, 0.3%, 3%), la concentración de MP que se muestra en la Tabla 5. En los acuarios de *I. alatus* se colocaron 2 L de agua de mar, 20 ml de arena y, dependiendo del tratamiento (0.03%, 0.3%, 3%), la concentración de MP que se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Cantidad de microplásticos agregada a cada acuario para cada uno de los tratamientos en ambas especies: *Eupolyornia rullieri* e *Isognomon alatus*

Tratamientos		<i>E. rullieri</i> cantidad de microplásticos (g en peso húmedo)	<i>I. alatus</i> cantidad de microplásticos (g en peso húmedo)
Control	0	0	0
Microplásticos sin fluoranteno	0.03%	0.208	0.069
	0.3%	2.078	0.693
	3%	20.784	6.928
Microplásticos con fluoranteno	0.03%	0.208	0.069
	0.3%	2.078	0.693
	3%	20.784	6.928

4.1.2 Preparación de los MP

MP se dejaron reposar en agua de mar sin fluoranteno durante 3 semanas, con la intención de imitar el procedimiento de los MP preparados con fluoranteno.

4.2 EXPOSICIÓN DE LOS ORGANISMOS A LOS TRATAMIENTOS

Isognomon alatus y *Eupolyornia rullieri* fueron seleccionados como modelos de estudio por ingerir los MP y presentar las cualidades que se describen en el Anexo 1 (apartado A1. 01).

Esta fase del experimento se llevó a cabo durante 2 meses, del 4 julio al 5 de septiembre de 2014, con *E. rullieri* e *I. alatus*. Los tratamientos elegidos fueron: control; 0.03% MP (porcentaje en relación con la cantidad de sedimento); 0.3% MP; 3% MP; 0.03% MP/F (microplásticos contaminados con fluoranteno de la sección anterior); 0.3% MP/F; y 3% MP/F.

Los tratamientos fueron elegidos con base en diferentes estudios de monitoreo de lugares con diferentes niveles de contaminación. La concentración de 0.03% constituye un escenario realista de un lugar ligeramente contaminado (Norén, 2008). La concentración de 0.3% constituye un escenario de contaminación por MP media (Vianello *et al.*, 2013). Por último, la concentración de 3% constituye un escenario considerablemente contaminado por MP (Carson *et al.*, 2011).

4.2.1 Exposición de *Eupolyornia rullieri* a los MP y MP/F y medición de las variables de respuesta

El área de recolección fue enfrente del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (ICML) de Puerto Morelos, a una distancia de entre 5 y 10 m de la línea de costa, mar adentro. Para la captura de los organismos se utilizó equipo SCUBA. Se recolectaron 84 individuos, de los cuales se destinaron 12 para cada uno de los 6 tratamientos más 12 para el control.

Los organismos se pesaron (Balanza modelo adventure pro precision de Ohaus, precisión 0.01 g) y se tomó su volumen corporal, midiendo el volumen de agua de mar desplazada en una probeta. Posteriormente, cada uno de estos fue puesto en un acuario de un volumen de 6 L con 300 ml de arena y una teja para proporcionarles sombra y como sustrato para que adhirieran su tubo. Dependiendo del tratamiento se agregó en cada acuario la cantidad de MP que se muestra en la Tabla 5. La colocación de los organismos en los acuarios fue aleatoria para que no interfirieran en los resultados factores como: exposición mayor al aire, al sol, al viento u otros.

Para evitar la acumulación de desechos en el agua, los acuarios se limpiaron una vez por semana. Esta limpieza consistió en eliminar la acumulación de algas de las mangueras que transportaban el agua a los acuarios, y eliminar la acumulación de materia orgánica de las paredes de los acuarios. Además, cada 2 semanas, después de la limpieza, se agregaron 24 ml de arena y microplásticos para mantener la concentración deseada (dependiendo del tratamiento, ver Tabla 5). Asimismo, para garantizar la calidad del agua se midió semanalmente la concentración de oxígeno, el pH, la temperatura en los acuarios (Multisonda oxígeno-pH-salinidad-temperatura marca WTW modelo 3430) y la concentración de amonio (Kit de amonio-amoniaco marca JBL).

Las variables de respuesta que se midieron en *E. rullieri* fueron: tasa de crecimiento, procesamiento de arena y tasa de respiración.

4.2.1.1 Tasa de crecimiento

Todos los organismos se pesaron al inicio, a la mitad y al final del experimento (Balanza modelo adventure pro precision de Ohaus, precisión 0.01 g). Se calculó la diferencia del peso húmedo final con respecto al peso húmedo inicial para obtener la tasa de crecimiento.

4.2.1.2 Procesamiento de arena

De cada tratamiento, 3 organismos fueron escogidos al azar para medir la cantidad de arena que procesaban. Esto se midió al inicio, a la mitad y al final del experimento. La arena situada debajo de los organismos fue aplanada, se esperó un periodo de 20 h y posteriormente la arena procesada por los organismos se succionó con ayuda de una manguera. Esta arena fue secada en horno (Thermo Scientific™ Lab-Line™ Imperial III estandar) a 60° C por 2 días y posteriormente se registró su peso (Balanza modelo explorer pro analítica de Ohaus, precisión 0.0001 g).

4.2.1.3 Tasa de respiración

En todos los organismos se midió la tasa de respiración al inicio, a la mitad y al final del experimento. Cada organismo fue colocado en un contenedor de plástico (de 250 ml) y éste se llenó hasta el tope con agua de mar. Dentro de cada contenedor se colocó un agitador magnético para asegurar una mezcla homogénea del agua. En cada contenedor se colocó una malla a la mitad para que los organismos no chocaran con el agitador magnético. En la tapa de los contenedores se hizo un agujero para colocar la sonda del oxímetro (Multisonda oxígeno-pH-salinidad-temperatura marca WTW modelo 3430) y se colocó parafilm en los bordes para sellarlos.

La concentración de oxígeno en el agua dentro de los contenedores fue medida por 20 minutos cada 15 segundos.

4.2.2 Exposición de *Isognomon alatus* a los MP y MP/F y medición de las variables de respuesta

Los organismos se recolectaron en el canal de desagüe de los acuarios del ICML de Puerto Morelos. Se obtuvieron 84 individuos, de los cuales se destinaron 12 para cada uno de los 6 tratamientos más 12 para el control.

Los organismos se limpiaron, se pesaron (Balanza modelo adventure pro precisión de Ohaus, precisión 0.01 g) y se midió su volumen. Cada organismo fue puesto en un acuario de un volumen de 2 L, 20 ml de arena y, dependiendo del tratamiento, la cantidad de MP que se muestra en la Tabla 5. Dentro de cada acuario se colocaron 2 piedras de aeración para resuspender los MP. Todas las piedras de aeración se conectaron a un sistema de bombas (Resun modelo AC-9602 con 2 salida de 6 L*min) y éstas, a su vez, se conectaron a un temporizador. El temporizador se programó para funcionar 2 veces al día, de 9:00 a 11:00 horas y de 16:00 a 18:00. La colocación de los organismos en los acuarios fue aleatoria para que no interfirieran en los resultados factores como: exposición mayor al aire, al sol, al viento u otros.

Para evitar la acumulación de desechos en el agua, los acuarios se limpiaron una vez por semana. Esta limpieza consistió en eliminar la acumulación de algas de las mangueras que transportaban el agua a los acuarios, y eliminar la acumulación de materia orgánica de las paredes de los acuarios. Además, cada 2 semanas, después de la limpieza se hizo un recambio, se agregaron 20 ml de arena y microplásticos para mantener la concentración deseada (dependiendo del tratamiento, ver Tabla 5). Asimismo, para garantizar la calidad del agua se midió semanalmente la concentración de oxígeno, el pH, la temperatura en los acuarios (Multisonda oxígeno-pH-salinidad-temperatura marca WTW modelo 3430) y la concentración de amonio (Kit de amonio-amoniaco marca JBL).

Las variables de respuesta que se midieron en *I. alatus* fueron: tasa de crecimiento, producción de heces, tasa de consumo de algas y tasa de

respiración. Al final de los 2 meses que duró este experimento los organismos se sometieron a estrés mediante hipoxia (1.5 mg/l de O₂).

4.2.2.1 Tasa de crecimiento

Todos los organismos se pesaron al inicio, a la mitad y al final del experimento (Balanza modelo adventure pro precision de Ohaus, precisión 0.01 g). Se calculó la diferencia del peso húmedo final con respecto al peso húmedo inicial para obtener la tasa de crecimiento.

4.2.2.2 Producción de heces

De cada tratamiento, 3 organismos fueron escogidos al azar para medir la producción de heces. Cada organismo se colocó en un contenedor limpio (de 500 ml) y se mantuvieron en estos por un periodo de 19 h (de 14:30 a 9:30). Posteriormente, se filtraron las heces de los contenedores y se secaron en horno (Thermo Scientific™ Lab-Line™ Imperial III estandar) a 60° C por una hora. Por último, se midió el peso seco de las heces (Balanza modelo explorer pro analítica de Ohaus, precisión 0.0001 g).

4.2.2.3 Tasa de consumo de algas

De cada tratamiento, 3 organismos fueron escogidos al azar para medir la tasa de consumo de algas. Esta variable se midió al inicio, a la mitad y al final del experimento. Cada organismo fue colocado en un vaso de precipitados (de 250 ml) con 180 ml de agua de mar, 50 ml de cultivo de algas (*Tetraselmis chuii*) y un agitador magnético. La concentración de algas en el agua dentro de los vasos de precipitados fue medida al inicio y transcurridos 20 minutos. Las mediciones se hicieron mediante la técnica de conteo de algas unicelulares utilizando una cámara de Neubauer (marca Brand con cuadrícula doble, sin pinzas). Finalmente, se registró la diferencia de algas entre el inicio y el final para obtener la tasa de consumo de algas.

4.2.2.4 Tasa de respiración

Debido al tiempo limitado del que se disponía para realizar esta prueba, se decidió colocar 6 organismos de un mismo tratamiento en cada medición. Los 6 organismos se pusieron dentro de un contenedor de plástico (de 250 ml) y este se llenó hasta el tope con agua de mar. Dentro de cada contenedor se colocó un agitador magnético para asegurar una mezcla homogénea del agua. En cada contenedor se colocaron 6 mallas, una para cada organismo, para que estos no chocaran entre sí o intervinieran con el agitador. En la tapa de los contenedores se hizo un agujero para colocar la sonda del oxímetro (Multisonda oxígeno-pH-salinidad-temperatura marca WTW modelo 3430) y se colocó parafilm en los bordes para sellarlos.

La concentración de oxígeno en el agua dentro de los contenedores fue medida por 20 minutos cada 15 segundos. Posteriormente se obtuvo la respiración promedio por tratamiento.

4.2.2.5 Experimento de hipoxia

Este experimento se llevó a cabo durante 4 semanas, después de los 2 meses de exposición a los MP y a los MP/F. Los organismos fueron sometidos a hipoxia (concentración de oxígeno de 1.5 µg/l). Para alcanzar esta concentración de oxígeno se llenó un garrafón de 20 L con agua de mar y se le inyectó nitrógeno hasta la concentración deseada. Con esta agua se llenaron recipientes (de 250 ml), en cada uno se colocó un organismo y se cerraron herméticamente.

Cada día se hizo un recambio de agua para evitar la contaminación por amonio, antes de cada recambio se midió la concentración de oxígeno en el agua. Asimismo, se revisó diariamente si los organismos seguían vivos o no y se hicieron las anotaciones correspondientes. Con estos datos se obtuvo la tasa de mortalidad.

4.2.3 Modelos estadísticos aplicados para el análisis de las variables de respuesta

Todos los análisis estadísticos y las gráficas se realizaron utilizando el software estadístico R (3.0.2 GUI) y el paquete de gráficas ggplot2 (Wickham, 2009).

4.2.3.1 ANOVA de dos vías cruzado con interacción, para efectos fijos

Para analizar las todas las variables de respuesta, excepto los experimentos de hipoxia, se utilizó el modelo estadístico de 2 vías con interacción para factores fijos (Faraway, 2014).

Modelo matemático:

$$Y_{ij} = \mu + A_i + \delta_j + (A_i * \delta_j) + \varepsilon_{ij}$$

Donde: μ es la media; A_i es el efecto fijo de categoría de contaminación; δ_j es el efecto fijo de la concentración de microplástico; $i = 1, 2$; $j = 1, \dots, 3$; ε_{ij} es la cantidad en la que cualquier valor difiere de la media de su grupo.

Prueba de hipótesis para el tratamiento de categoría de contaminación:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

$$H_a: \mu_1 \neq \mu_2$$

Prueba de hipótesis para el tratamiento de concentración de microplástico:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$$

$$H_a: \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3$$

Prueba de hipótesis para la interacción de los factores de concentración de microplástico*categoría de contaminación:

H₀: No existe interacción entre ambas variables independientes

H_a: Si existe interacción entre ambas variables independientes

Tabla 6. Tabla de análisis de varianza:

FV	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Suma de Cuadrados Medios	Fo
Factor A	a - 1	SS _A	MC _A = SS _A / (a - 1)	F _A = MC _A / MC _E
Factor B	b - 1	SS _B	MC _B = SS _B / (b - 1)	F _B = MC _B / MC _E
Interacción	(a-1)(b-1)	SS _{A*B}	MC _{A*B} = SS _{A*B} / ((a-1)(b-1))	
Error	ab(n-1)	SSE	MC _E = SSE/(ab(n-1))	
Totales	abn - 1	SSt		

El error de criterio empleado: $\alpha = 0.05$

Si $F_o > F(1 - \alpha / 2)$ se rechaza la H₀ y se acepta H_a

Si $F_o \leq F(1 - \alpha / 2)$ no hay suficientes evidencias para rechazar H₀

El diagnóstico del modelo se realizó mediante las pruebas de Shapiro-Wilk, para probar la normalidad de los datos, y la prueba de Bartlett, para probar la homocedasticidad.

Para las variables de producción de heces y respiración, ambas en *I. alatus*, los datos no presentaron normalidad por lo que los valores fueron transformados logarítmicamente para corregir este supuesto.

4.2.3.2 Modelo Cox de riesgos proporcionales

Para el análisis de los experimentos de hipoxia, se utilizó el modelo estadístico de Cox ph (“proportional hazard”) (Boj del Val, 2015).

El modelo de Cox ph es un modelo semiparamétrico que expresa la función de riesgo $h(t)$ en función del tiempo t y las variables explicativas $\mathbf{X} = (X_1 \dots X_p)$, las cuales definen al sujeto de estudio del siguiente modo:

$$h(t, \mathbf{X}) = h(t, X_1, \dots, X_p) = h_0(t) \exp\left(\sum_{j=1}^p \beta_j X_j\right).$$

Para cada sujeto i para $i = 1, \dots, n$ conoceremos su tiempo de muerte/fallo t_i su estado de fallo o censura d_i y las variables fijas $\mathbf{X} = (X_{i1} \dots X_{ip})$.

En el modelo de Cox ph busca la relación entre los riesgos de muerte de los individuos expuestos a diferentes factores de riesgo, partiendo de la hipótesis fundamental de que los riesgos son proporcionales.

Las hipótesis de riesgos proporcionales significan explícitamente que la razón de riesgo es constante en el tiempo.

Prueba de hipótesis para el tratamiento de categoría de contaminación:

t= 30 días $H_0: \mu_1 = \mu_2$
t= 30 días $H_a: \mu_1 \neq \mu_2$

Prueba de hipótesis para el tratamiento de concentración de microplástico:

t= 30 días $H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$
t= 30 días $H_a: \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3$

4.2.3.3 Gráficas de supervivencia Kaplan Meier

Para mostrar las diferencias en la supervivencia de los individuos en el tiempo se utilizaron las gráficas de Kaplan Meier. En la gráfica el eje de las x muestra el tiempo de inicio en el día 0, el cual representa el inicio del estrés por hipoxia y el tiempo final en el día 30, el cual representa el final del experimento. En el eje de las y se muestra el porcentaje de supervivencia en cada grupo (Fleming y Harrington, 1984).

4.3 MONITOREO Y CUANTIFICACIÓN DE MICROPLÁSTICOS Y FLUORANTENO *in situ*

4.3.1 Monitoreo de microplásticos *in-situ*

Las muestras para el monitoreo fueron tomadas en la misma área de muestreo de *E. rullieri*, es decir frente del ICML. Para elegir los sitios se obtuvo una foto satelital del área. La foto se dividió en tramos de aproximadamente 50 m, tanto en la zona intermareal como en la zona submareal. De estos puntos, se seleccionaron aleatoriamente tres puntos de cada zona (zona intermareal: A, B y C; zona submareal: D, E y F; Fig. 11).



Figura 11. Área de recolección de *Eupolymnia rullieri* y puntos elegidos para el muestreo de sedimento (A a F)

Las muestras se obtuvieron con núcleos de PVC de 10 cm de diámetro por 10 cm de alto. En la zona intermareal, después de colocar el núcleo en el sedimento se puso una lámina en su parte inferior para evitar que se saliera el sedimento. En la zona submareal, una vez fijado el núcleo en el sedimento se colocó una lámina de metal en la parte inferior y una tapa de PVC, que cerró herméticamente la parte superior, para evitar que se saliera el sedimento por la acción del agua. Asimismo, para la zona submareal se utilizó equipo SCUBA para realizar el trabajo de campo. De cada punto se obtuvieron 5 réplicas.

Cada núcleo se dividió en capa superficial (de 0 a 5 cm de profundidad) y capa inferior (de 5 a 10 cm de profundidad). Con una cuchara de metal se sacó el sedimento de la capa superficial, se colocó en una bolsa ziploc y se etiquetó debidamente. El sedimento de la capa inferior también se sacó, colocó en bolsa ziploc y se etiquetó. Se obtuvieron 60 muestras con las siguientes etiquetas:

A1S	B1S	C1S	D1S	E1S	F1S
A1P	B1P	C1P	D1P	E1P	F1P
A2S	B2S	C2S	D2S	E2S	F2S
A2P	B2P	C2P	D2P	E2P	F2P
A3S	B3S	C3S	D3S	E3S	F3S
A3P	B3P	C3P	D3P	E3P	F3P
A4S	B4S	C4S	D4S	E4S	F4S
A4P	B4P	C4P	D4P	E4P	F4P
A5S	B5S	C5S	D5S	E5S	F5S
A5P	B5P	C5P	D5P	E5P	F5P

La primera letra corresponde al sitio de recolecta, el número a la réplica en cuestión y la segunda letra a la capa a la que pertenece (S=superficial, P=profundo).

Cada una de las muestras se pesó y se secó en horno a 60 °C por 48 h. Una vez seco el sedimento, se pesó nuevamente y se separaron con tamiz las partículas de microplásticos de entre 5 mm y 0.5 mm (500 µm).

En un matraz Erlenmeyer de capacidad de 1 L se colocó 1 L de agua destilada a 60 °C y 700 g de sal de mesa, ambos se mezclaron por 3 h con agitador magnético para obtener una solución hipersalina (70 g/100 ml).

Las partículas separadas con el tamiz se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 250 ml de capacidad con 200 ml de la solución hipersalina (70 g/100 ml). El matraz se colocó sobre una mesa de agitación (New Brunswick, modelo G2) por 2 h. Posteriormente, se dejó reposar sobre una superficie plana por 8 h.

Con el objetivo de separar los plásticos, que por densidad flotan, la parte superior del agua en el matraz se filtró utilizando un filtro para café. Los filtros fueron observados al microscopio para cuantificar la cantidad y forma de las partículas de plásticos encontradas.

4.3.1.1 Estadística aplicada para el análisis de microplásticos *in-situ*

El monitoreo de microplástico *in-situ* fue analizado utilizando estadística descriptiva. Se obtuvieron totales de partículas plásticas, medias y porcentajes de partículas por kg de arena en cada una de las zonas (mareal e intermareal) y en cada una de las capas (superficial y profunda). Los valores fueron representados con gráficas de pastel y de barras.

4.3.2 Monitoreo de fluoranteno *in-situ*

El monitoreo se realizó en 3 sitios: La marina "El Cid" (20° 49' 47"N, 86° 53' 20.5"); El muelle de Puerto Morelos (20° 50' 51" N, 86° 52' 29" O) y el muelle frente al ICML (20° 52' 05" N, 86° 52' 01"). Dentro de una malla de acero inoxidable (de 100 µm de abertura) se colocaron 4 g de MP, se cerró la malla con cinchos para que el MP no saliera. Se colocaron 3 mallas con MP dentro de un infusor de metal para té, el cual se adhirió a una estructura de madera para ser amarrada a los muelles.

Cada 7 días se revisaron las estructuras para asegurar que se mantuvieran en su posición y limpiar posibles obstrucciones que afectarían la exposición de los MP con el agua.

Los MP se dejaron 3 semanas en el agua, posteriormente se sacaron y se colocaron en frascos de vidrio con un poco de agua del sitio para su posterior análisis con HPLC.

4.4 DETECCIÓN DE FLUORANTENO CON CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC, por su siglas en inglés)

Todas las muestras fueron analizadas con HPLC en donde la cuantificación de fluoranteno se basa en la relación de la curva estándar (control) y las áreas de los picos de las muestras. Para obtener la curva estándar una muestra del fluoranteno puro se diluyó 10 veces en metanol hasta una concentración de 500 ng/µl.

A continuación, se hizo una serie de diluciones y en cada disolución se diluyó la muestra 20 veces (Tabla 7). Utilizando una jeringa Hamilton se colocaron 0.5 µl de la muestra por 10 µl de metanol dentro de un matraz aforado.

Tabla 7. Concentración de la muestra en cada factor de dilución

Paso	Factor de dilución	Concentración [ng/μl]
1	10	500
2	200	25
3	4 000	1.25
4	80 000	0.0625
5	1 600 000	0.00313

Para generar la curva estándar se variaron los volúmenes de las disoluciones arriba mencionadas y se inyectaron en la HPLC empezando con la menor cantidad como se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Relación entre el volumen inyectado y la cantidad de fluoranteno para una misma disolución

# de disolución	Volumen inyectado [μl]	Cantidad de Fluoranteno [ng]
5	0.5	0.00156
5	3.0	0.00938
5	6.0	0.0188
4	1.0	0.0625
4	2.0	0.125
4	3.5	0.219
4	5.0	0.313

El área bajo la curva que arroja el software determina la cantidad de fluoranteno en la muestra.

Todas las muestras para HPLC fueron analizadas con el software “Clarity” (Dataapex, 2015), las condiciones para la HPLC se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9 Características y Condiciones de la HPLC

Columna	Supelcosil™ LC-PAH
Tasa de flujo	1.5 mL
Volumen de inyección	20 μL
Fase móvil	agua : acetonitrilo = 40 : 60 (v/v)
Detección de las ondas de longitud	excitación: 480 nm; emisión 560 nm.

4.4.1 Determinación de fluoranteno en el Tejido Animal

En *I. alatus* se retiró la concha y sólo se utilizó el tejido blando. En *E. rullieri* se utilizó todo el cuerpo del organismo. Para cada análisis se utilizaron 5 gramos (peso seco) de tejido, por lo que se utilizó más de un organismos, todos del mismo tratamiento, para alcanzar esta cantidad.

Se obtuvieron 6 muestras, 2 de cada tratamiento (0.03 %MP/F, 0.3 %MP/F y 3 %MP/F), para el análisis de fluoranteno en tejidos. Cada muestra se colocó en un tubo para centrifuga de 50 ml y se homogenizó el tejido con un dispersador

batch. Se agitó por 1 min utilizando un agitador vórtex. Se agregaron 8 ml de acetonitrilo y se agitó por 1 min nuevamente.

Posteriormente se realizó la extracción de la fase sólida utilizando el kit Bond Elut QueChERS (“Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe”; de la marca Agilent). Se agregó el sobre de sal del paquete AOAC (Association of Official Analytical Chemists), se agitó por 1 min y se centrifugó a 4000 rpm por 5 min. Se transfirió una alícuota de 6 ml a un tubo para centrifuga de 15 ml y nuevamente se agitó por 1 min y se centrifugó a 4000 rpm por 5 min. La muestra se filtró a través de un filtro de jeringa PVDF de 0.45 μm . De esta solución se sacaron 0.2 ml y se colocaron en el vial de muestra del HPLC para su análisis. La cantidad de fluoranteno se calculó usando la curva estándar y las áreas de los picos de las muestras obtenidas con el software. Los valores obtenidos se multiplicaron por 400, ya que sólo se inyectó de 0.02 ml de los 8 ml preparados (Pule *et al.*, 2012).

4.4.2 Determinación de fluoranteno en muestras de MP incubado *in situ*

Se tomó un gramo (peso seco) de cada una de las 9 muestras de MP (3 de la marina el Cid, 3 del muelle de Puerto Morelos y 3 del muelle del ICML) y se colocó en un vaso de precipitados (50 ml). En cada muestra se agregaron 6 ml de hexano y se agitó vigorosamente por un minuto. Se transfirieron 4 ml de la solución a un tubo de ensayo, evitando tomar MP. Se les inyectó gas de nitrógeno para evaporar el hexano. Una vez seca la muestra se agregaron 500 μl de acetonitrilo para disolver residuos de hexano. De esta solución se sacaron 20 μl y se colocaron en el vial de muestra del HPLC. Las muestras se analizaron con HPLC. La cantidad de fluoranteno se calculó usando la curva estándar y las áreas de los picos de las muestras obtenidas con el software. Los valores obtenidos se multiplicaron por 25, ya que sólo se inyectaron 20 μl de los 500 μl preparados.

4.4.3 Determinación de fluoranteno en muestras de MP preparadas en el laboratorio

Para determinar si los MP que preparamos con fluoranteno en el laboratorio absorbieron realmente el fluoranteno se analizaron 2 muestras de MP/F. El procedimiento utilizado fue el mismo que el apartado anterior.

5. RESULTADOS

5.1 PREPARACIÓN DE LOS MP/F y MP

La Tabla 10 muestra los tratamientos utilizados en los experimentos y a que factor pertenecen, asimismo, se muestran las cantidades de MP o MP/F utilizadas en cada uno de ellos. El porcentaje referido en cada tratamiento, es el porcentaje de MP o MP/F, según sea el caso, con respecto a la cantidad de arena colocada en cada acuario. El tratamiento control no fue evaluado en ANOVA por lo que no se muestra en la tabla; sin embargo, se utilizó como valor de referencia y se representa con las líneas negras en las gráficas de caja de los siguientes apartados.

Tabla 10. Cantidad de microplásticos agregada a cada acuario para cada uno de los tratamiento tomando en cuenta los 2 factores evaluados en ANOVA en ambas especies: *Eupolyornia rullieri* e *Isognomon alatus*.

		Factor 2. Concentración de MP	<i>E. rullieri</i> cantidad de microplásticos (g en peso húmedo)	<i>I. alatus</i> cantidad de microplásticos (g en peso húmedo)
Factor 1. Presencia- ausencia de fluoranteno	Microplásticos sin fluoranteno	0.03%	0.208	0.069
		0.3%	2.078	0.693
		3%	20.784	6.928
	Microplásticos con fluoranteno	0.03%	0.208	0.069
		0.3%	2.078	0.693
		3%	20.784	6.928

5.2 EXPOSICIÓN DE LOS ORGANISMOS A LOS TRATAMIENTOS

5.2.1 Exposición de *Eupolyornia rullieri* a los MP y MP/F y medición de las variables de respuesta

5.2.1.1 Tasa de crecimiento

Para la tasa de crecimiento, no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos de los 2 factores (presencia/ausencia de fluoranteno y concentración de MP), ni en su interacción (Tabla 11). El peso húmedo de los organismos varió desde una pérdida de peso de 1.80 g (-1.80) hasta una ganancia de peso de 0.69 g. El promedio de la tasa de crecimiento de todos los organismos fue de -0.70 g (± 0.62 DS, n= 24), lo que indica que, en general, los organismos perdieron peso.

Tabla 11. Comparación entre los tratamientos de las diferentes concentraciones de MP y la presencia/ausencia de fluoranteno para la variable tasa de crecimiento. Resultados de ANOVA (gl= grados de libertad, SC= suma de cuadrados, SCM= suma de cuadrados medios)

Fuente de variación	gl	SC	SCM	F	P
Presencia/Ausencia del fluoranteno	1	0.004	0.004	0.010	0.921
Concentración de MP	2	1.653	0.826	2.152	0.145
Interacción	2	0.258	0.129	0.335	0.720
Residuales	18	6.912	0.384		

$\alpha = 0.05$
 $R^2 = 0.217$

El tratamiento de 3 % MP/F fue en el que los organismos perdieron la mayor cantidad de peso (Fig. 12). Los tratamiento de 0.3 % MP/F y 0.03 % MP fueron en los que los organismos perdieron una menor cantidad de peso, en primer y segundo lugar respectivamente (Fig. 12). Sin embargo, no se observa tendencia alguna entre la tasa de crecimiento y la cantidad de MP suministrado, ni entre tasa de crecimiento y la presencia/ausencia de fluoranteno, como lo demuestran los resultados de ANOVA.

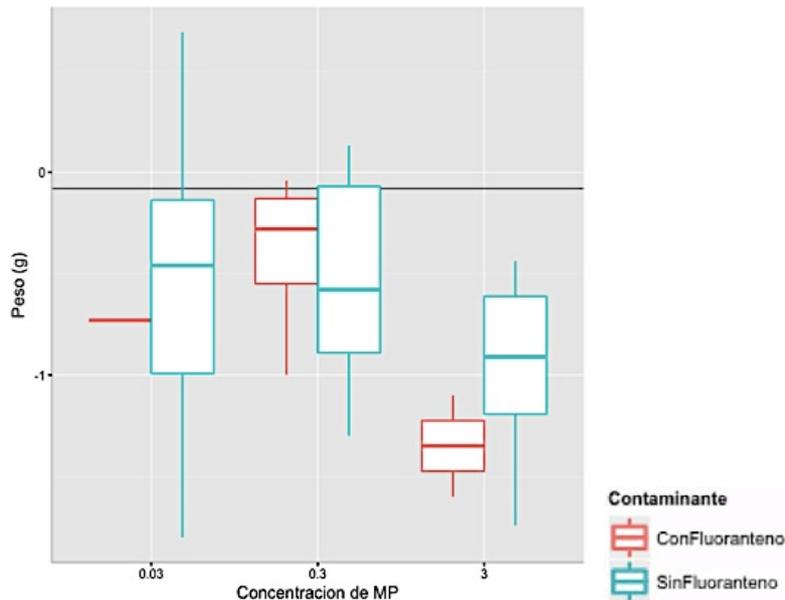


Figura 12. Diferencia del peso húmedo al final del experimento de *E. rullieri* en los diferentes tratamientos. Se muestran los parámetros de localización (mínimo, 1er cuartil, mediana, 3er cuartil y máximo).

5.2.1.2 Procesamiento de arena

No se presentaron diferencias significativas para la tasa de procesamiento de arena entre los tratamientos de los 2 factores, ni en su interacción (Tabla 12). La arena procesada por los organismos en promedio fue de 2.66 g (\pm 1.15 DS, n= 17) y varía desde 0.72 g hasta una 5.07 g.

Tabla 12. Comparación entre los tratamientos de las diferentes concentraciones de MP y la presencia/ausencia de fluoranteno para la variable procesamiento de arena. Resultados de ANOVA (gl= grados de libertad, SC= suma de cuadrados, SCM= suma de cuadrados medios)

Fuente de variación	gl	SC	SCM	F	P
Presencia/Ausencia del fluoranteno	1	4.590	4.590	4.564	0.056
Concentración de MP	2	3.358	1.679	1.669	0.233
Interacción	2	2.068	1.034	1.028	0.390
Residuales	11	11.064	1.006		

α =0.05
 R^2 =0.475

La prueba de ANOVA no muestra diferencias significativas en la arena procesada entre los tratamientos de MP sin fluoranteno y los tratamientos de MP con fluoranteno; sin embargo, en la gráfica de la figura 12 se observa una tendencia, los organismos que fueron expuestos al MP/F procesan una mayor cantidad de arena que aquellos que no. En esta misma gráfica también se observa que los organismos a los que sólo se les dio MP sin fluoranteno procesan en general casi la misma cantidad de arena que los organismos control (representados por la línea horizontal negra).

Con respecto a las diferentes concentraciones de MP, tanto en ANOVA como en la gráfica de cajas no se observa algún patrón que pudiera sugerir una tendencia (Fig. 13).

Observando cada uno de los 6 tratamientos más a detalle, existe una relación inversa entre la cantidad de arena procesada y la cantidad de MP con fluoranteno suministrada (Fig. 13). Cuando el MP no tiene fluoranteno esta relación no se presenta.

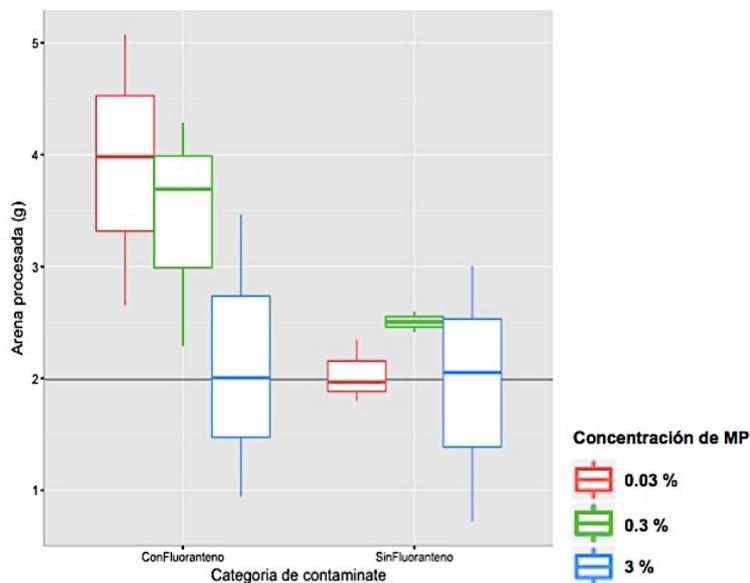


Figura 13. Cantidad de arena procesada durante 20 h por *E. rullieri* en los diferentes tratamientos. Se muestran los parámetros de localización (mínimo, 1er cuartil, mediana, 3er cuartil y máximo).

5.2.1.3 Tasa de respiración

No se presentaron diferencias significativas para la tasa de respiración entre los tratamientos de los 2 factores, ni en su interacción (Tabla 13). La tasa de respiración de los organismos en promedio es de 1.07 mg/l (± 0.41 DS, $n=23$) y varía desde 0.53 mg/l hasta una 1.91 mg/l.

Tabla 13. Comparación entre los tratamientos de las diferentes concentraciones de MP y la presencia/ausencia de fluoranteno. Resultados de ANOVA (gl= grados de libertad, SC= suma de cuadrados, SCM= suma de cuadrados medios)

Fuente de variación	gl	SC	SCM	F	P
Presencia/Ausencia del fluoranteno	1	0.127	0.127	0.707	0.412
Concentración de MP	2	0.425	0.213	1.188	0.329
Interacción	2	0.098	0.049	0.273	0.764
Residuales	17	3.042	0.179		

$\alpha=0.05$
 $R^2=0.176$

Los tratamientos de 0.03 % MP/F y 3% MP/F fueron en los que los organismos tuvieron un menor consumo de oxígeno, en primer y segundo lugar

respectivamente (Fig. 14). En el tratamiento 0.03 % MP, los organismos tuvieron un mayor consumo de oxígeno (Fig. 14); sin embargo, no se observa ninguna tendencia entre consumo de oxígeno y cantidad de MP suministrado, ni entre consumo de oxígeno y la presencia/ausencia de fluoranteno.

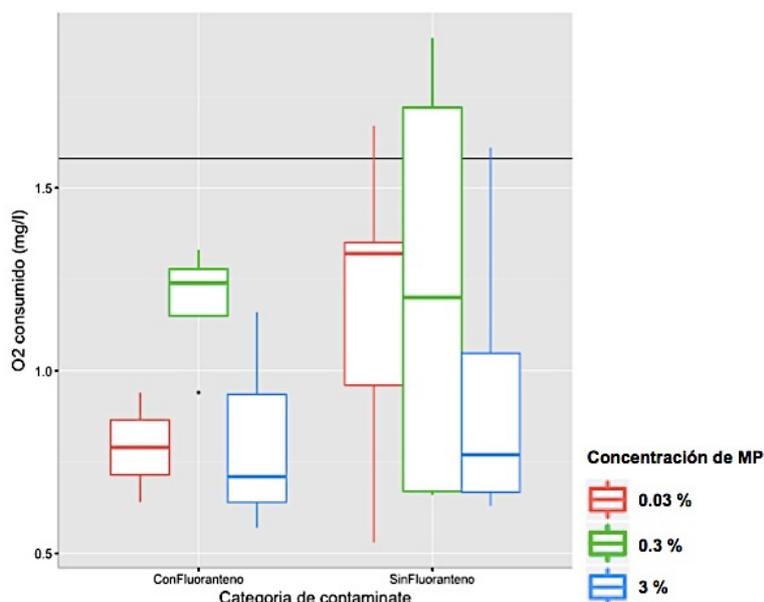


Figura 14. Oxígeno consumido durante 20 min por *E. rullieri* en los diferentes tratamientos. Se muestran los parámetros de localización (mínimo, 1er cuartil, mediana, 3er cuartil y máximo).

En resumen los resultados muestran que no existen diferencias significativas entre los tratamientos empleados en las variables medidas para *E. rullieri*. A excepción del procesamiento de arena, no se observó alguna relación o tendencia entre el factor de la concentración de los microplásticos y el factor de la presencia/ausencia de fluoranteno (Tabla 14).

El procesamiento de arena parece presentar una relación entre la presencia del fluoranteno y la disminución de la cantidad de arena procesada (Fig. 13). En esta variable evaluando el factor presencia/ausencia de fluoranteno, la hipótesis alternativa de diferencias entre los tratamientos, podría ser aceptada con un nivel de confianza del 94.4% según el análisis de ANOVA (Tabla 14).

La probabilidad de aceptar la hipótesis alternativa en los análisis de varianza de las demás variables es baja como para considerar plausible un efecto causado por los tratamientos (Tabla 14).

Tabla 14. Resumen de los resultados obtenidos en las diferentes variables medidas en la especie detritívora *Eupolyornia rullieri*

Variable de Respuesta	Factor	Valor de P	Intervalos de confianza	Tendencia	Efecto	Probabilidad de confianza para aceptar la Ha
Tasa de crecimiento	Presencia/Ausencia del fluoranteno	0.921	ConF - SinF -0.61 a 0.56	No	-	0.79 %
	Concentración de MP	0.145	0.03% - 0.3% -0.88 a 0.71 0.03% - 3% -0.32 a 1.32 0.3% - 3% -0.18 a 1.35	No	-	85.5 %
Procesamiento de arena	Presencia/Ausencia del fluoranteno	0.056	ConF - SinF -0.032 a 2.1	Si	La presencia de fluoranteno aumenta la cantidad de arena procesada	94.4 %
	Concentración de MP	0.233	0.03% - 0.3% -1.73 a 1.56 0.03% - 3% -0.63 a 2.50 0.3% - 3% -0.62 a 2.66	No	-	76.7 %
Tasa de respiración	Presencia/Ausencia del fluoranteno	0.412	ConF - SinF -0.53 a 0.23	No	-	58.8 %
	Concentración de MP	0.329	0.03% - 0.3% -0.70 a 0.39 0.03% - 3% -0.41 a 0.75 0.3% - 3% -0.22 a 0.87	No	-	67.1 %

Ruta de exposición: microplásticos en sedimento; Tipo de partículas: microplásticos de 160 µm de tamaño promedio.

F=fluoranteno

5.2.2 Exposición de *Isognomon alatus* a los MP y MP/F y medición de las variables de respuesta

5.2.2.1 Tasa de crecimiento

No se presentaron diferencias significativas para la tasa de crecimiento entre los tratamientos de los 2 factores, ni en su interacción (Tabla 15). El peso húmedo de los organismos varía desde una pérdida de peso de 1.30 g (-1.30) hasta una ganancia de peso de 0.90 g. El promedio de la tasa de crecimiento de todos los organismos fue de 0.02 g (\pm 0.41 DS, n= 62), lo que indica que en general los organismos se mantuvieron en su peso.

Tabla 15. Comparación entre los tratamientos de las diferentes concentraciones de MP y la presencia/ausencia de fluoranteno para la variable tasa de crecimiento. Resultados de ANOVA (gl= grados de libertad, SC= suma de cuadrados, SCM= suma de cuadrados medios)

Fuente de variación	gl	SC	SCM	F	P
Presencia/Ausencia del fluoranteno	1	0.170	0.170	1.060	0.308
Concentración de MP	2	0.493	0.246	1.530	0.225
Interacción	2	0.816	0.408	2.534	0.088
Residuales	56	9.015	0.161		

$\alpha = 0.05$
 $R^2 = 0.141$

Asimismo, la gráfica de la figura 15 no muestra alguna tendencia entre la tasa de crecimiento y la presencia/ausencia de fluoranteno, ni entre la tasa de crecimiento y cantidad de MP suministrado.

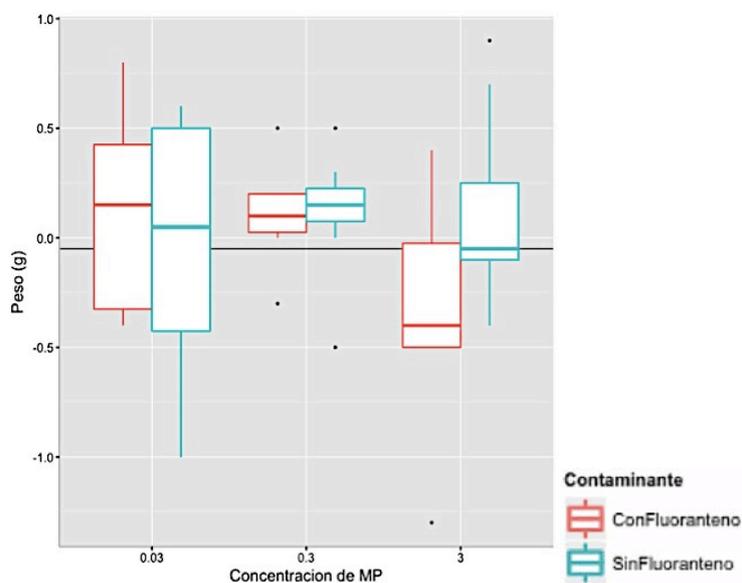


Figura 15. Diferencia del peso húmedo al final del experimento de *I. alatus* en los diferentes tratamientos. Se muestran los parámetros de localización (mínimo, 1er cuartil, mediana, 3er cuartil y máximo).

5.2.2.2 Producción de heces

No se presentaron diferencias significativas en la cantidad de heces producidas entre los tratamientos de los 2 factores; sin embargo, la interacción entre ambos factores es significativa (Tabla 16). La cantidad de heces producidas

por los organismos varía de 0.09 g hasta 0.18 g y el promedio de las heces producidas en todos los organismos fue de 0.13 g (± 0.3 DS, n= 30).

Tabla 16. Comparación entre los tratamientos de las diferentes concentraciones de MP y la presencia/ausencia de fluoranteno para la variable producción de heces. Resultados de ANOVA (gl= grados de libertad, SC= suma de cuadrados, SCM= suma de cuadrados medios)

Fuente de variación	gl	SC	SCM	F	P
Presencia/Ausencia del fluoranteno	1	0.112	0.112	4.060	0.055
Concentración de MP	2	0.093	0.047	1.603	0.222
Interacción	2	0.218	0.109	3.736	0.039*
Residuales	24	0.670	0.029		

$\alpha = 0.05$; * < 0.05

$R^2 = 0.381$

Tampoco se observa una alguna relación entre la producción de heces y la presencia/ausencia de fluoranteno, ni entre la producción de heces y cantidad de MP suministrado. (Fig. 16).

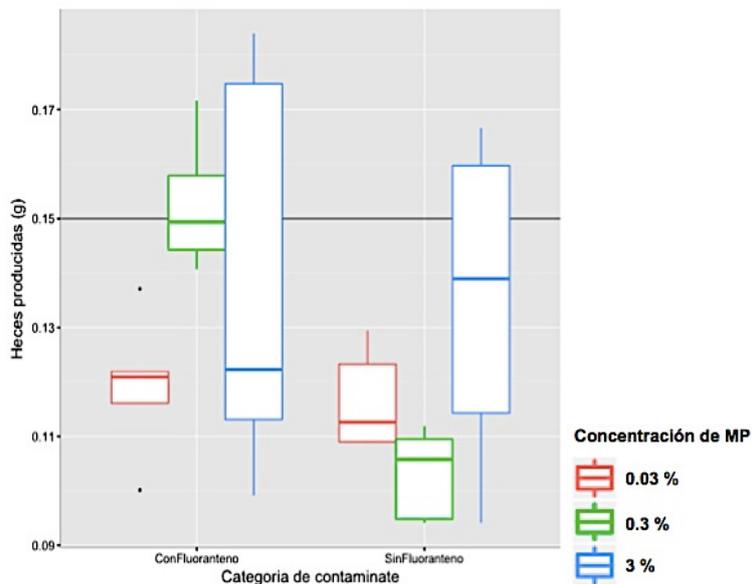


Figura 16. Cantidad de heces producidas por *I. alatus* en los diferentes tratamientos. Se muestran los parámetros de localización (mínimo, 1er cuartil, mediana, 3er cuartil y máximo).

5.2.2.3 Tasa de consumo de algas

No se presentaron diferencias significativas en la tasa de consumo de algas entre los tratamientos de los 2 factores, ni en su interacción (Tabla 17). La tasa de consumo de algas de los organismos varía de una concentración de 4000 algas/ml hasta 548000 algas/ml y el promedio fue de 207888.89/ml (\pm 153344.63 DS, n= 18).

Tabla 17. Comparación entre los tratamientos de las diferentes concentraciones de MP y la presencia/ausencia de fluoranteno para la variable tasa de consumo de algas. Resultados de ANOVA (gl= grados de libertad, SC= suma de cuadrados, SCM= suma de cuadrados medios)

Fuente de variación	gl	SC	SCM	F	P
Presencia/Ausencia del fluoranteno	1	3.698e+09	3.698e+09	0.149	0.706
Concentración de MP	2	4.249e+10	2.124e+10	0.857	0.449
Interacción	2	5.593e+10	2.797e+10	1.128	0.356
Residuales	12	2.976e+11	2.480e+10		

α =0.05;
 R^2 =0.256

Los tratamientos con y sin fluoranteno son muy similares en sus medias y no muestran ninguna tendencia (Fig. 17). Con respecto a la cantidad de MP suministrado, en la figura 17 se observa una tendencia al aumentar la cantidad de MP, aumenta la cantidad de consumo de algas.

Asimismo y como se observa en la figura 17, los tratamientos con fluoranteno no aumentan o disminuyen conforme aumenta la cantidad de MP. En cambio, en los tratamientos con fluoranteno, se observa una relación en donde los organismos aumentan el consumo de algas al aumentar la cantidad de los MP. El menor consumo de algas promedio se obtuvo con el tratamiento 0.03% MP/F y el mayor consumo de algas promedio se obtuvo con el tratamiento de 3% MP (Fig. 17).

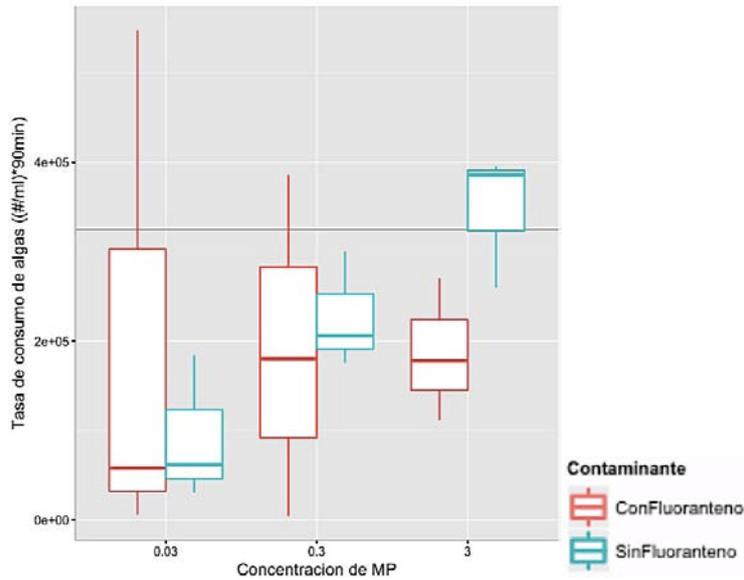


Figura 17. Algas consumidas durante 20 min por *I. alatus* en los diferentes tratamientos. Se muestran los parámetros de localización (mínimo, 1er cuartil, mediana, 3er cuartil y máximo).

5.2.2.4 Tasa de respiración

No se presentaron diferencias significativas en la tasa de respiración entre los tratamientos de los 2 factores, ni en su interacción (Tabla 18). El oxígeno consumido de los organismos varía desde 0.18 mg/l hasta 0.94 mg/l y en promedio fue de 0.36 mg/l (± 0.21 DS).

Tabla 18. Comparación entre los tratamientos de las diferentes concentraciones de MP y la presencia/ausencia de fluoranteno para la variable tasa de respiración. Resultados de ANOVA (gl= grados de libertad, SC= suma de cuadrados, SCM= suma de cuadrados medios)

Fuente de variación	gl	SC	SCM	F	P
Presencia/Ausencia del fluoranteno	1	0.632	0.632	3.590	0.107
Concentración de MP	2	0.516	0.258	1.466	0.303
Interacción	2	0.033	0.016	0.093	0.913
Residuales	6	1.056	0.176		

$\alpha = 0.05$;
 $R^2 = 0.528$

En los tratamientos con fluoranteno, los organismos consumieron más oxígeno que en los tratamientos sin fluoranteno (Fig. 18). Asimismo, se observa una relación en la cantidad de los MP suministrados, al aumentar la cantidad de los MP aumenta el oxígeno consumido (Fig. 18). Todos los organismos de los

diferentes tratamientos consumieron más oxígeno que los organismos del control. El tratamiento en donde se consumió menos oxígeno en promedio fue el de 0.03% MP y en el que más oxígeno se consumió fue el de 3% MP/F (Fig. 18).

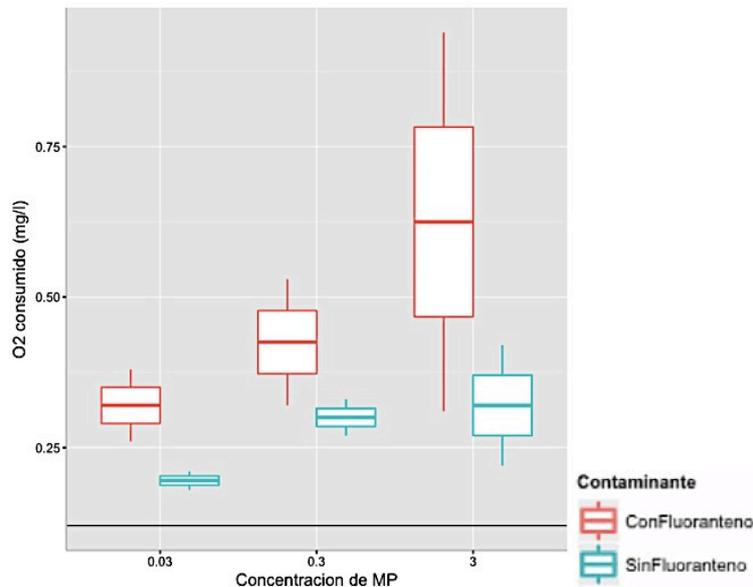


Figura 18. Oxígeno consumido durante 20 min por *I. alatus* en los diferentes tratamientos. Se muestran los parámetros de localización (mínimo, 1er cuartil, mediana, 3er cuartil y máximo).

En resumen los resultados muestran que no existen diferencias significativas entre los tratamientos empleados en las variables medidas para *I. alatus*. No obstante, en 2 de las variables, consumo de algas y respiración, se observó una relación positiva entre la presencia de los microplásticos y el fluoranteno, y el valor medido (Tabla 19).

Para el consumo de algas la probabilidad de confianza para aceptar la diferencia entre los tratamientos del factor concentración de microplásticos fue de sólo el 55.1% (Tabla 19). No obstante, se observó una relación donde el consumo de algas aumenta al aumentar la concentración de los microplásticos sin fluoranteno (Fig. 17).

Los microplásticos con fluoranteno, sin embargo, no muestran esta tendencia. Los valores máximos y mínimos presentan un amplio intervalo, por lo que probablemente tienen una fuerte influencia sobre las medias de los grupos. Consecuentemente, es difícil determinar tanto una relación directa como las diferencias entre los tratamientos.

En la variable respiración, la probabilidad de confianza para aceptar las diferencias entre los tratamientos del factor presencia/ausencia de fluoranteno fue del 89.3% (Tabla 19). Además, se observó una relación entre la presencia del fluoranteno y el aumento de la respiración (Fig. 18). En cuanto al factor concentración de microplásticos, la probabilidad de confianza para aceptar las diferencias entre los tratamientos fue del 69.7% y, como en el caso anterior,

también se observó una relación positiva entre el aumento de la concentración de los microplásticos y la respiración (Fig. 18; Tabla 19).

Tabla 19. Resumen de los resultados obtenidos en las diferentes variables medidas en la especie detritívora *Isognomon alatus*

Variable de Respuesta	Factor	Valor de P	Intervalos de confianza	Tendencia	Efecto	Probabilidad de confianza para aceptar la Ha
Tasa de crecimiento	Presencia/Ausencia del fluoranteno	0.308	ConF - SinF -0.31 a 0.10	No	-	69.2 %
	Concentración de MP	0.225	0.03% - 0.3% -0.37 a 0.23 0.03% - 3% -0.16 a 0.45 0.3% - 3% -0.08 a 0.52	No	-	77.5 %
Producción de heces	Presencia/Ausencia del fluoranteno	0.055	ConF - SinF -0.00 a 0.25	No	-	94.5 %
	Concentración de MP	0.222	0.03% - 0.3% -0.24 a 0.15 0.03% - 3% -0.31 a 0.06 0.3% - 3% -0.28 a 0.11	No	-	77.8 %
Tasa de consumo de algas	Presencia/Ausencia del fluoranteno	0.706	ConF - SinF -190423.6 a 133090.2	No	-	29.4 %
	Concentración de MP	0.449	0.03% - 0.3% -303245.1 a 181911.8 0.03% - 3% -361578.4 a 123578.4 0.3% - 3% -300911.8 a 184245.1	Si	Al aumentar la Concentración de MP aumenta el consumo de algas (y la filtración)	55.1 %
Tasa de respiración	Presencia/Ausencia del fluoranteno	0.107	ConF - SinF -0.13 a 1.05	Si	La presencia del fluoranteno aumenta la respiración	89.3 %
	Concentración de MP	0.303	0.03% - 0.3% -1.26 a 0.56 0.03% - 3% -1.40 a 0.42 0.3% - 3% -1.05 a 0.77	No es claro	Al aumentar la Concentración de MP aumenta la respiración	69.7 %

Ruta de exposición: microplásticos en columna de agua; Tipo de partículas: microplásticos de 160 µm de tamaño promedio.
F=fluoranteno

5.2.2.5 Experimento de hipoxia

Para determinar las diferencias en la supervivencia de los organismos de los diferentes tratamientos se utilizó un modelo de riesgos proporcionales o Cox ph. Los resultados de la prueba de Cox ph no muestran diferencias significativas en la supervivencia de los organismos de los diferentes tratamientos en ambos factores, presencia/ausencia de fluoranteno y concentración de MP (Tabla 20).

Tabla 20. Comparación entre los tratamientos de las diferentes concentraciones de MP y la presencia/ausencia de fluoranteno para hipoxia bajo el modelo de Cox ph

Fuente de variación	gl	F	P
Presencia/Ausencia del fluoranteno	1	1.054	0.305
Concentración de MP	2	0.514	0.774
Interacción	2	0.177	0.915

$\alpha = 0.05$

Los organismos del tratamiento control fueron los que presentaron mayor supervivencia (100%). Los organismos de los tratamientos MP/F 0.03 % y MP/F 0.3 % fueron los que presentaron una menor supervivencia (71.4%; Tabla 21; Fig. 19).

Tabla 21. Comparación entre los diferentes tratamientos para el experimento de hipoxia

Tratamiento	n	Promedio de días en el experimento de hipoxia	DS	Porcentaje de supervivencia (%)
Control	8	30.00	±0.00	100.0
MP 0.03 %	9	28.56	±4.33	88.9
MP 0.3 %	9	26.67	±6.61	77.8
MP 3 %	9	28.67	±4.00	88.9
MP/F 0.03 %	7	27.57	±4.61	71.4
MP/F 0.3 %	7	25.14	±8.38	71.4
MP/F 3 %	9	26.11	±7.75	77.8

Durante los 30 días del experimento de hipoxia 10 organismos de diferentes tratamientos murieron. El orden de las muertes y el tratamiento al que los organismos fueron sometidos, así como su probabilidad de supervivencia se muestran en la gráfica Kaplan Meier de la figura 19.

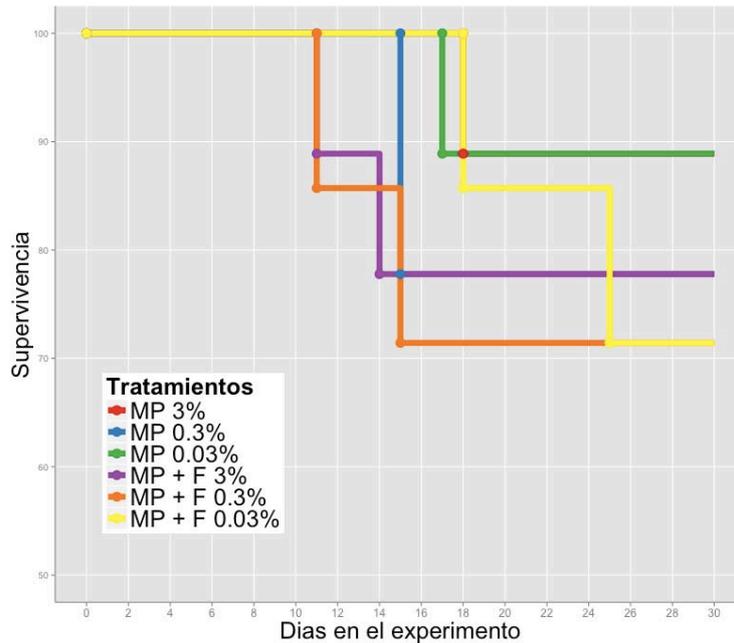


Figura 19. Gráfica Kaplan Meier de supervivencia para el experimento de hipoxia de *I. alatus*

La concentración de oxígeno en el agua, que se midió antes de cada recambio, presentó valores muy bajos de oxígeno. Durante el monitoreo del agua, se observó que la mayoría de los animales alcanzaron a una concentración de 0.04 mg/l de oxígeno, sin que esto ocasionara su muerte. Todos los animales que murieron en el transcurso del experimento de hipoxia tuvieron una concentración de oxígeno en agua de 0.02 mg/l.

5.3 MONITOREO Y CUANTIFICACIÓN DE MICROPLÁSTICOS Y FLUORANTENO *in situ*

5.3.1 Monitoreo de microplásticos *in-situ*

En todas las zonas muestreadas se encontraron microplásticos, tanto en la zona intermareal como en la zona submareal. Las fibras fueron los restos encontrados más abundantes, seguidos de los microplásticos en forma de pellets, los fragmentos (polígonos regulares e irregulares) y los microplásticos con formas no definidas (Fig. 20; Tabla 22). No se encontraron restos de espuma o láminas de microplásticos.

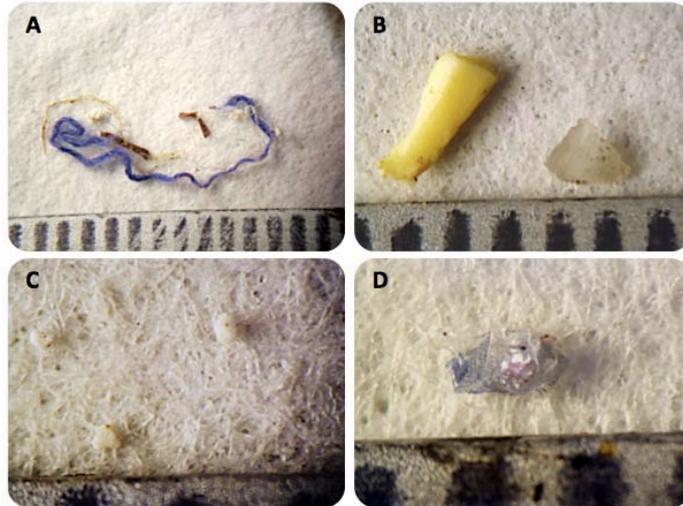


Figura 20. A. Restos de fibras; B. Fragmentos de microplásticos; C. Pellets de microplásticos; D. Resto con forma no definida de microplásticos.

Tomando en cuenta la zona intermareal y la zona submareal, por cada 2 kg de arena (peso seco) se obtuvo un total de 111.33 partículas de microplásticos (55.67 partículas de microplásticos por kg; Tabla 21). El total de fibras es de 42.67 por kg de arena (38.33%), de pellets es de 36.33 por kg de arena (32.63%), de los fragmentos es de 29.00 por kg de arena (26.05%) y el de las formas no definidas es de 3.33 por kg de arena (2.99%; Fig. 21). La manera en que se distribuyen los restos de microplásticos, tanto en las 2 zonas (intermareal y submareal) como en las 2 capas (superficial y profunda), se muestra en la Tabla 22.

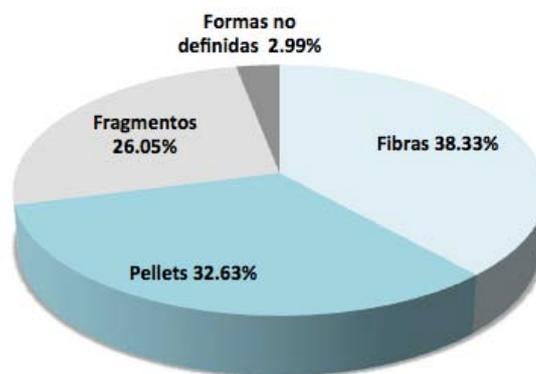


Figura 21. Gráfica de porcentajes totales de cada tipo de partículas de microplásticos encontrada

Tabla 22. Cantidad de microplásticos por kg (peso seco) de arena por zona y por capa

Formas	Intermareal		Submareal		Total (partículas/2 kg) 0-10 cm
	0-5 cm	5-10 cm	0-5 cm	5-10 cm	
Fibras	8.00	14.33	10.00	10.33	42.67
Pellets	11.67	16.67	8.00	0.00	36.33
Fragmentos	6.33	3.00	3.67	16.00	29.00
Formas no definidas	0.00	0.00	1.67	1.67	3.33
Láminas	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Espuma	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Total	26.00	34.00	23.33	28.00	111.33

Aunque son muy parecidas, la zona intermareal presenta el mayor porcentaje de partículas por kg de arena seca y la zona submareal el menor porcentaje, 53.89 % y 46.11%, respectivamente. Asimismo, en ambas zonas, la capa profunda presenta el mayor porcentaje de partículas por kg de arena seca (Fig. 22).

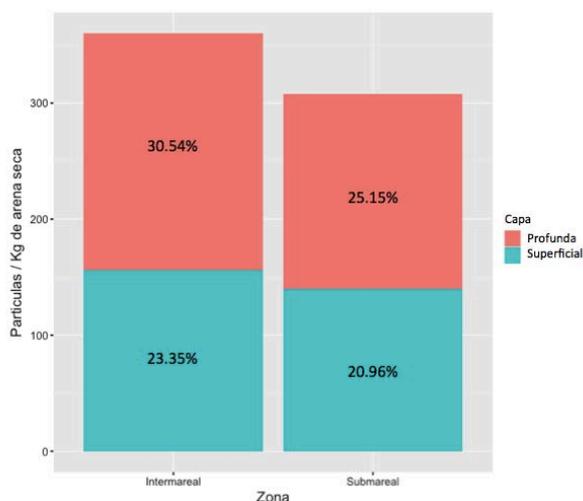


Figura 22. Cantidad y porcentaje de las partículas por kg de arena (peso seco) en las zonas de muestreo.

5.3.2 Monitoreo de fluoranteno *in-situ*

Los resultados completos del monitoreo de fluoranteno *in-situ* se presentan en la sección 4.2.

5.4 DETECCIÓN DE FLUORANTENO EN CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC, por su siglas en inglés)

5.4.1 Determinación de fluoranteno en el Tejido Animal

En los análisis de HPLC no se detectó la presencia de fluoranteno en ninguna de las muestras, ni en los tejidos de los organismos control, ni en los tejidos de los organismos de los diferentes niveles MP/F (0.03, 0.3, y 3%).

5.4.2 Determinación de fluoranteno en muestras de MP incubado *in situ*

No se detectó la presencia de fluoranteno en el análisis de HPLC en ninguna de las muestras tomadas: la Marina El Cid, el muelle de Puerto Morelos, el muelle frente al ICML.

5.4.3 Determinación de fluoranteno en muestras de MP preparadas en el laboratorio

De todos los análisis de HPLC, las muestras de MP/F preparadas en el laboratorio fueron las únicas en las que se detectó la presencia de fluoranteno. En las muestras preparadas en el laboratorio con fluoranteno se detectaron 4.97 ng fluoranteno/g PVC (± 0.78 DS), mientras que en las muestras preparadas sólo con agua de mar no se detectó fluoranteno.

6. DISCUSIÓN

6.1 CUATIFICACIÓN DE FLUORANTENO EN LOS MICROPLÁSTICOS PREPARADOS EN EL LABORATORIO

La concentración de fluoranteno en los microplásticos preparados en el laboratorio para alimentar a los animales ejemplifican un escenario realista. La cantidad de fluoranteno utilizada en el estudio se determinó con base en los trabajos de Rochman *et al.* (2013). Estos autores señalan que la saturación máxima de fluoranteno en los microplásticos se alcanza tras 3 meses de exposición y corresponde a una concentración de 3.7 ng/g.

Al inicio de nuestros experimentos se propuso una concentración teórica de 4 ng/g, es decir, muy cercana a los 3.7 ng/g monitoreada por Rochman *et al.* (2013) en la Bahía de San Diego. Sin embargo, a diferencia de estos autores que mantuvieron la exposición de los microplásticos al fluoranteno a largo plazo (de hasta 12 meses), en este estudio debido a la naturaleza del protocolo internacional que se siguió, sólo se pudo exponerlos durante 3 semanas.

Los análisis de HPLC realizados para determinar la concentración real del fluoranteno en los microplásticos utilizados durante este experimento señalan una concentración de 4.97 ng/g (± 0.78 DS). Este resultado probablemente se deba a que los microplásticos de este experimento fueron expuestos a una solución de fluoranteno preparada en el laboratorio, en donde el contaminante se preparó con acetona y agua de mar para una mejor dilución, a diferencia de Rochman *et al.* 2013 que expusieron los microplásticos directamente en el medio natural. Aunque, este valor es mayor que el que inicialmente fue planeado se mantiene en un intervalo muy cercano a los 4 ng/g.

Las interacciones entre tipo de plástico, contaminante, grado de saturación y tiempo de exposición aún no están completamente entendidas. Debido a esto, es difícil encontrar un modelo con el que se desarrolle una metodología precisa para adherir los microplásticos al fluoranteno. A pesar de las pequeñas diferencias encontradas entre la concentración nominal y la real, con los resultados obtenidos en este trabajo, se considera que la metodología utilizada es correcta y puede ser utilizada en experimentos de laboratorio similares.

6.2 EXPOSICIÓN DE LOS ORGANISMOS A LOS TRATAMIENTOS

6.2.1 Exposición de *Eupolyornia rullieri* a los microplásticos y microplásticos con fluoranteno y medición de las variables de respuesta

Durante el experimento la mortalidad de *E. rullieri* fue muy alta en todos los tratamientos (ver sección A1.14). Los estudios pilotos realizados para determinar esta mortandad no mostraron una relación entre posibles factores de estrés (falta de comida o aire) y la causa de muerte. Aparentemente la mortalidad más importante se debió al manejo de los animales mientras se midieron las variables, ya que para ello se necesitaba que salieran de sus

tubos; sin embargo, muy a menudo no los volvían a construir y por tanto morían.

Los poliquetos han sido utilizados como indicadores biológicos en una amplia gama de estudios de impacto ambiental para determinar factores como la calidad del agua y del grado de contaminación del sustrato (Bellan, 1980; Raman y Ganapati, 1983; Bellan *et al.*, 1988; Pocklington y Wells, 1992; Cañete *et al.*, 2000; Londoño-Mesa, 2011). Los patrones de distribución temporal y espacial de las comunidades de poliquetos pueden cambiar en función de la contaminación a la que están expuesta (Hutchings, 1998), asimismo la sensibilidad hacia los contaminante puede variar dependiendo de la familia del poliqueto (Del-Pilar-Ruso *et al.*, 2008). Especies de *Capitella* han sido empleadas como bioindicadores, debido a que en condiciones naturales alguna especie pueden soportan altos niveles de contaminantes como el fluoranteno (Gamenick *et al.*, 2000; Méndez *et al.*, 2001).

En el caso de *E. rullieri*, los resultados podrían ser explicados por 2 fenómenos. El primero de estos supone que algunos poliquetos pueden sobrevivir en ambientes contaminado, por lo que posiblemente *E. rullieri*, logró contrarrestado los efectos adversos de los microplásticos y el fluoranteno.

En el segundo fenómeno, la alta mortalidad resultado del manejo de los organismos ocasionó que la cantidad de individuos evaluados fuera pequeña en algunas variables por lo que, incluso si los animales fueron afectados por los microplásticos y fluoranteno, los posibles efectos pudieron ser disimulados por el tamaño de la muestra.

De igual forma, es importante tomar en cuenta que los resultados pudieron estar influenciados por el estrés que los animales tuvieron durante su manejo. Como se menciona en la sección A1.14, la mortalidad durante el experimento alcanzó valores altos y fue independiente de los tratamientos suministrados. En consecuencia, el estrés pudo ser tan grande como para enmascarar las señales de los microplásticos y fluoranteno.

Tomando en cuenta la alta mortandad durante este estudio, así como las observaciones que se hicieron durante las recolectas de los animales y el transcurso del experimento, se considera que esta especie es de muy difícil manejo. Asimismo, no se considera que sea adecuada para desarrollar experimentos como este o cualquier otro donde se necesite manipular repetidamente a los individuos.

Los efectos obtenidos bajo el mismo esquema de trabajo en los diferentes países que participaron en GAME (2014) presentan algunas similitudes con nuestros resultados. Estos resultados revelan que tanto los microplásticos como el fluoranteno pueden llegar a causar alteraciones en los animales detritívoros. En todas las especies detritívoras estudiadas en GAME (2014; Tabla 23) se midieron al menos 3 variables diferentes. Las variables relacionadas con las diferentes actividades vinculadas con la alimentación (eg. producción de heces, alimentación y procesamiento de arena) parecen ser afectadas por la presencia de los microplásticos y fluoranteno.

En *Holothuria leucospilota* y *Arenicola marina* se observó una disminución en la cantidad de heces producidas después de que los individuos estuvieron expuestos a los microplásticos y fluoranteno (Tabla 23; GAME, 2014), mientras que en *Abarenicola pacifica* la presencia de los microplásticos hizo que los animales disminuyeran la ingesta de alimento (Tabla 23; GAME, 2014).

En *E. rullieri* la actividad de alimentación fue medida mediante el procesamiento de arena. Aunque los resultados del ANOVA no son significativos, la probabilidad de que haya diferencias entre los tratamientos fue alta (94.4%). Asimismo, se observó una relación entre la presencia de los microplásticos y el fluoranteno y el procesamiento de arena.

Estos resultados señalan una alteración común en la alimentación de especies detritívoras causada por la presencia de los microplásticos y el fluoranteno en el ambiente.

Otras variables también fueron afectadas por la exposición de los microplásticos y fluoranteno en especies detritívoras analizadas por los equipos participantes en GAME (2014). En *Uca rapax* la presencia de los microplásticos y el fluoranteno aumentó la mortalidad de los individuos. En *Abarenicola pacifica*, los microplásticos ocasionaron la disminución de la velocidad con que los individuos se enterraban. En *Holothuria sanctori* la presencia de los microplásticos y el fluoranteno aumentaron la tasa de respiración de los animales (Tabla 23).

Tabla 23. Efectos de los microplásticos y el fluoranteno en diferentes especies detritívoras estudiadas durante el proyecto GAME XII (2014) en diferentes estaciones*.

País	Localidad	Biota	Especie	Efectos
Brasil	Rio de Janeiro	Crustacea	<i>Uca rapax</i>	Aumenta la mortalidad con la presencia de MP y fluoranteno
Chile	Coquimbo	Polychaeta	<i>Ochetostoma baronii</i>	Sin efectos
Indonesia	Bogor	Holothuroidea	<i>Holothuria leucospilota</i>	Disminuye la producción de heces con la presencia de MP
Japón	Akkeshi	Polychaeta	<i>Abarenicola pacifica</i>	Disminuye la alimentación con la presencia de MP Disminución de la velocidad de enterrarse con la presencia de MP
Portugal	Madeira	Holothuroidea	<i>Holothuria sanctori</i>	Aumenta la respiración con la presencia de MP y fluoranteno
Reino Unido	Wales	Polychaeta	<i>Arenicola marina</i>	Disminuye la producción de heces con la presencia de MP y fluoranteno

*Las fechas de los experimentos así como la metodología de exposición de los organismos a los microplásticos y al fluoranteno son las mismas que en este proyecto.

Se ha registrado que en condiciones naturales una gran cantidad de animales detritívoros marinos consumen microplásticos (Tabla 3). Crustáceos

decápodos, como la langosta de Noruega (*Nephrops norvegicus*) y el camarón café (*Crangon crangon*), son consumidores oportunistas. En *N. norvegicus* el 83% de los individuos investigados en el área del mar de Clayde presentaban microplásticos en sus estómagos (Murray y Cowie, 2011). Los microplásticos encontrados en los estómagos de estos organismos fueron principalmente monofilamentos fuertemente enredados (atribuidos a desperdicios de las actividades de pesca) y pellets. En *C. crangon* la contaminación por microplásticos en condiciones naturales consiste principalmente en fibras sintéticas en concentraciones de 0.64 ± 0.53 partículas por g peso húmedo (Devriese *et al.*, 2015).

Los resultados en campo, como los mencionados en el párrafo anterior, no aportan suficiente información sobre el impacto en la salud de los animales marinos. Los pocos estudios en laboratorio que se tienen en poliquetos utilizan como modelo a la especie *A. marina* (Thompson *et al.*, 2004; Wright *et al.*, 2013; Van Cauwerberghe *et al.*, 2015b). En los estudios de Thompson *et al.* (2004) y Wright *et al.* (2013), al igual que en este estudio, se observan alteraciones en la alimentación en los animales expuestos a los microplásticos. Los resultados de Van Cauwerberghe *et al.* (2015b) no muestran efectos significativos tras alimentar a los animales con microplásticos.

6.2.2 Exposición de *Isognomon alatus* a los microplásticos y microplásticos con fluoranteno y medición de las variables de respuesta

Los bivalvos que se alimentan por filtración se han utilizado ampliamente como biomonitores por acumular metales y tóxicos (Ismail, 2006; Zhou *et al.* 2008). *I. alatus* ha mostrado ser un buen bioindicador de metales pesados (Siung, 1980; Campos, 1988; Ismail, 2006; Lebrón, 2007). Lebrón (2007) señala que, incluso en su nivel máximo de acumulación, este bivalvo es capaz de eliminar el cobre de sus tejidos sin llegar a la muerte.

Durante el experimento, pudimos observar que esta especie resiste muy bien el manejo en laboratorio, así como las condiciones de los tratamientos. Es probable que *I. alatus* pueda contrarrestar los efectos de intoxicación por fluoranteno, tal como lo hace con los metales pesados. Esto no sucede con los microplásticos los cuales podrían generar un bloqueo en el sistema digestivo que los individuos no pueden subsanar, tal y como se ha observado en numerosas especies filtradoras (Fry *et al.*, 1987; Baird y Hooker, 2000; Derraik, 2002; Eriksson y Burton, 2009; Teuten *et al.*, 2009; Boerger *et al.*, 2010).

En hipoxia la concentración de oxígeno en el agua alcanzó valores muy bajos (0.04 mg/l), sin que esto ocasionara la muerte de los animales. Se ha observado en diferentes especies de bivalvos, como *Mytilus edulis*, *Cardium glaucum*, *Cardium edule* y *Modiolus demissus*, que bajo condiciones de estrés, como hipoxia, los animales pueden cerrar las valvas y bajar su ritmo cardiaco (Akberali y Trueman, 1985). Trueman y Lowe (1971) estudiaron el comportamiento de *I. alatus* en condiciones de hipoxia y también advierten el cierre de las valvas y el descenso de la frecuencia cardiaca para bajar los niveles de consumo de oxígeno. La concentración de oxígeno de los animales

que murieron en este experimento durante hipoxia fue de 0.02mg/l, asimismo, se observó que los animales mantuvieron sus valvas cerradas durante casi todo el experimento, por lo que se considera que *I. alatus* desarrolla procesos similares a los descritos por Trueman y Lowe (1971) y Akberali y Trueman (1985).

Aunque se observó diferencia en la mortalidad entre el control y algunos tratamientos, no fue significativo el efecto de los MP y fluoranteno en el análisis de Cox ph. Con el objetivo de aumentar el grado de estrés en los animales y observar posibles efectos de los microplásticos y fluoranteno, para futuros experimentos se propone bajar la concentración inicial de oxígeno hasta 1.0 mg/l, hacer recambios cada tercer día en vez de diariamente y aumentar la duración del experimento.

Dentro de los animales analizados por los equipos participantes en el experimento GAME (2014), las especies filtradoras parecen ser menos afectadas por los microplásticos y el fluoranteno que las especies detritívoras. Mientras que sólo en 1 de las 7 especies detritívoras (*Ochetostoma baronii*) no se presentaron efectos significativos (bajo el criterio de $\alpha = 0.05$; Tabla 23) en las diferentes variables medidas, en las especies filtradoras, 3 de 7 (*Perna perna*, *Perumytilus purpuratus* y *Mytilus edulis*) no presentaron efectos significativos (bajo el criterio de $\alpha = 0.05$; Tabla 24).

Al igual que en las especies detritívoras, en *Perna viridis* (GAME, 2014) y en *I. alatus*, las variables relacionadas con la alimentación (ie. la tasa de filtración y el consumo de algas) son afectadas por la presencia de los microplásticos y el fluoranteno; sin embargo, la respuesta para cada especie es distinta. En el caso de *P. viridis* la tasa de filtración disminuye como consecuencia de la exposición a los microplásticos y el fluoranteno, mientras que para *I. alatus* la tasa de filtración (en nuestro experimento referida como variable de consumo de algas) aumenta.

En *P. viridis* esta respuesta posiblemente se deba a que los individuos detectan las partículas en suspensión en el agua, como consecuencia, el proceso de filtración se vuelve más tardado y menos eficiente (GAME, 2014).

Wegner *et al.* (2012) también señalan que en *M. edulis* la tasa de filtración disminuye como consecuencia de la exposición a los microplásticos. Tanto en *P. viridis* como en *M. edulis*, las condiciones de laboratorio fueron similares, ie. el agua de mar en la que se encontraban los organismos era prefiltrada y el alimento y los microplásticos eran administrados de manera independiente.

En *I. alatus* las condiciones de laboratorio fueron diferentes. Para este experimento el agua en la que permanecieron los animales fue bombeada directamente del mar sin filtración previa. Por consiguiente, los individuos tuvieron a su disposición todo el tiempo el alimento que normalmente está presente en el agua, y no fue necesario alimentarlos adicionalmente.

Ward y Kach (2009) observaron que la ingesta de microplásticos depende en gran medida de los hábitos de los animales. En *Crassostrea virginica* y *M.*

edulis, esto autores mostraron que los animales ingerían mayor cantidad de microplásticos cuando estos eran incorporados en agregados (compuesto de diatomeas, granos de minerales, esporas de hongos, entre otros) que cuando estaban sólo en suspensión.

Tomando en cuenta que en *I. alatus* los microplásticos, el sedimento y el agua, con sus respectivos nutrientes, estuvieron todo el tiempo en interacción, se asume que los microplásticos pudieron formar agregados como los descritos por Ward y Kach (2009) o cubrirse con microorganismos como ocurre en la naturaleza (Dobretsob, 2010; Reisser *et al.*, 2014). Este proceso pudo enmascarar a los microplásticos y generar que *I. alatus* los ingirieran como cualquier otra partícula de alimento, a diferencia de *P. viridis* (Wegner *et al.*, 2012) y *M. edulis* (GAME, 2014) que rechazaron los microplásticos que no tuvieron este tipo de interacción previa.

Otra explicación es que durante las mediciones de la filtración de *I. alatus*, los animales se colocaron en contenedores donde no había microplásticos, por lo que posiblemente durante el tiempo que duró la medición, los organismos se alimentaron conforme a sus necesidades sin que los microplásticos les causaran alguna molestia. Bajo esta hipótesis, los animales que más consumieron algas son los que en condiciones de laboratorio pudieron haber filtrado diariamente menos alimento por tener una mayor cantidad de microplásticos en suspensión.

Dentro de las variables que mostraron cambios significativos por efecto de los microplásticos y fluoranteno durante el proyecto GAME (2014) se encuentran: la disminución de los bisos por efecto de los microplásticos en *Perna viridis* y en *Mytilus trossulus*; la disminución de la motilidad por efecto de los microplásticos en *Perna viridis*; la aumento en la mortalidad por efecto de los microplásticos y fluoranteno en *Mytilus trossulus*; la disminución de la actividad cirral por efecto de los microplásticos y fluoranteno en *Megabalanus azoricus*; y la variación de la tasa de filtración por efecto de los microplásticos y el fluoranteno en *Perna viridis* y en *I. alatus* (Tabla 24).

Tabla 24. Efectos de los microplásticos y el fluoranteno en diferentes especies filtradoras estudiadas durante el proyecto de GAME XII (2014) en diferentes estaciones*.

País	Localidad	Biota	Especie	Efectos
Brasil	Rio de Janeiro	Bivalvia	<i>Perna Perna</i>	Sin efectos
Chile	Coquimbo	Bivalvia	<i>Perumytilus purpuratus</i>	Sin efectos
Indonesia	Bogor	Bivalvia	<i>Perna viridis</i>	Disminuye la tasa de filtración con la presencia de MP Disminuye la producción de bisos con la presencia de MP Disminuye la motilidad con la presencia de MP
Japón	Akkeshi	Bivalvia	<i>Mytilus trossulus</i>	Disminuye la producción de bisos con la presencia de MP Aumenta la mortalidad con la presencia de MP y fluoranteno
Portugal	Madeira	Crustacea	<i>Megabalanus azoricus</i>	Disminuye la actividad cirral con la presencia de MP y fluoranteno
Reino Unido	Wales	Bivalvia	<i>Mytilus edulis</i>	Sin efectos

*Las fechas de los experimentos así como la metodología de exposición de los organismos a los microplásticos y al fluoranteno son las mismas que en este proyecto.

Una amplia variedad de especies de bivalvos consumen microplásticos en condiciones naturales (Tabla 3). En Europa se ha reportado que los mejillones (*Mytilus edulis*) presentan en promedio entre 0.2 a 0.5 partículas de microplásticos por gramo peso húmedo (De Witte *et al.*, 2014, Van Cauwenberghe y Janssen, 2014; Van Cauwenberghe *et al.*, 2015b), mientras que en Canadá este tipo de mejillones presentan en promedio de 34 a 178 partículas de microplásticos por individuo (Mathalon y Hill, 2014). Aunque la gran diferencia entre las cantidades microplásticos encontrados en los estómagos de los animales puede deberse en parte a que las técnicas de muestreo no están estandarizadas, es importante recalcar que la ingesta de microplásticos en bivalvos, en menor o mayor cantidad, es un fenómeno mundial.

Goldstein y Goodwin (2013) estimaron que cerca del 33.5% de los percebes (*Lepas anatifera* y *L. pacifica*) que se encuentran cerca del giro subtropical del Pacífico Norte, ya han ingerido microplásticos.

Las diferentes respuestas para contrarrestar el efecto de los microplásticos y compuestos tóxicos pueden estar más relacionadas con diferentes estrategias adaptativas, así como con la biología propia de las especies que con los contaminantes.

Los análisis de HPLC mostraron que los tejidos corpóreos tanto de *E. rullieri* como de *I. alatus*, no presentaron fluoranteno. Aunque la HPLC mostró la ausencia del fluoranteno en todos los animales de los diferentes tratamientos,

los microplásticos que se les dieron de comer si presentaron fluoranteno en una concentración de 4.97ng/kg. Por lo que suponemos que la ausencia del fluoranteno en los tejidos está relacionada con la capacidad de los animales de eliminar el compuesto tóxico de su organismo, al menos cuando éste está en concentraciones bajas como las suministradas en el experimento.

6.2.3 Crítica al diseño experimental

En la prueba de ANOVA el valor p corresponde a la probabilidad de obtener resultados similares a los observados en la realidad. Cuando más pequeño es p mayor será la probabilidad de que la hipótesis nula sea falsa. No obstante, Nuzzo (2001) señala que cuando Fisher introdujo el valor p no buscaba que este fuera un test definitivo sino que era solamente una manera informal de evaluar si el dato era significativo en el sentido clásico: "digno de una segunda mirada". p

Varios estudios han demostrado que el valor p puede variar en réplica de un mismo experimento (Ioannidis, 2005; Nosek *et al.*, 2012; Ziliak y McCloskey, 2009). Gelman y Loken (2014) proponen el análisis en 2 etapas como una alternativa para reducir el número de falsos positivos y falsos negativos en los experimentos.

En este estudio, se está consciente de las limitantes de este proyecto y del escenario de los resultados obtenidos: Se considera que los efectos de los tratamientos pudieron ser encubiertos por factores externos, por lo que es difícil precisar cuánto de este efecto es resultado de los tratamientos con los microplásticos y con el fluoranteno. Tal como proponen Gelman y Loken (2014), se sugiere tomar este estudio como base para futuras investigaciones y hacer réplicas con el fin de identificar si los resultados son consistentes y no consecuencia de factores externos o el azar.

Aunque las hipótesis alternativas no se cumplen bajo el criterio de $\alpha = 0.05$, se encontraron tendencias definidas en las variables. Lo anterior sugiere que si en réplicas experimentales estas son consistentes, entonces se podrían corroborar efectos relacionados con los tratamientos, incluso cuando la probabilidad de confianza para aceptar la H_a sea inferior al 95%.

El tiempo restringido que se tuvo para realizar el proyecto fue una limitante para aumentar el número de individuos estudiados y la certeza en las conclusiones alcanzadas. Se considera que para cada una de las mediciones del experimento hubiera sido preferible un mayor tiempo de experimentación. Por lo anterior, se sugiere que en estudios con un marco de trabajo similar se analice un mayor número de individuos y durante más tiempo en vez de analizar un mayor número de variables.

Para futuros estudios se propone trabajar con una especie detritívora diferente a *Eupolyornia rullieri*, ya que ésta es de difícil manejo en condiciones de laboratorio. *Isognomon alatus*, por su parte, presenta gran variabilidad biológica. Para este estudio se escogieron organismos de diferentes tallas,

edades y de ambos sexos; el único criterio de exclusión que se tomó fue que los animales no tuvieran enfermedades físicamente visibles. Esta decisión fue tomada con el propósito de aumentar la validez externa del experimento y poder extrapolar los resultados a la población de estos animales; sin embargo, es probable que esta heterogeneidad, así como el número limitado de repeticiones pudieron influir en los resultados obtenidos.

Para evitar futuros sesgos por efecto de la heterogeneidad de los organismos, se sugiere aumentar el número de repeticiones con el objetivo de mantener una validez externa y compensar la variabilidad biológica de los organismos (*ie.* tamaño, edad, sexo, etc.). Si esto no fuera posible, por ejemplo, porque se puede poner en riesgo a la población en la naturaleza, o porque los recursos son limitados, entonces se sugiere aumentar la validez interna. Una de las opciones que se proponen para aumentar la validez interna, es reproducir a los animales y empezar a utilizarlos a partir de la segunda generación en los experimentos. Otra alternativa más sencilla a esta opción, es escoger animales sanos de la misma talla.

6.3 MONITOREO Y CUANTIFICACIÓN DE MICROPLÁSTICOS Y FLUORANTENO *in situ*

6.3.1 Monitoreo de microplásticos *in-situ*

En este estudio se evaluó la presencia de microplásticos tanto en la zona intermareal como en la zona submareal. La zona intermareal presentó una mayor acumulación de microplásticos (el 53.89%) que la zona submareal (el 46.11%). Esto podría deberse a diferentes fenómenos, entre los más importantes podemos apuntar: Los desechos plásticos en la zona intermareal generados por los asentamientos humanos y el turismo; y la corriente de la laguna arrecifal en la zona submareal que genera un flujo constante de sedimento y partículas.

Los desechos plásticos transportados por las corrientes de la laguna arrecifal de Puerto Morelos son de una densidad menor o igual a la del agua de mar. Estos desechos pueden ser transportados por la corriente o establecerse en el sitio si llegan a ser colonizados por microorganismos, lo cual aumenta su densidad y disminuye su flotabilidad (Ye y Andrady, 1991; Andrady 2011; Lobelle y Cunliffe, 2011; Reisser *et al.*, 2013; Zettler *et al.*, 2013). Tanto en la playa como en la laguna arrecifal, los procesos físicos, químicos y/o biológicos ocasionan que los macroplásticos se fragmenten en microplásticos (Gregory, 1983).

En cada una de las zonas también se evaluó la presencia de microplásticos en la capa superficial (0 – 5 cm) y la capa profunda (5-10cm). Aunque en ambas capas la cantidad de microplásticos es similar, en la zona intermareal y en la submareal la capa profunda presenta una mayor acumulación de partículas.

Independientemente de su origen endógeno o exógeno, los microplásticos que se establecen en la capa superficial de ambas zonas, intermareal y submareal,

son enterrados debido a varios procesos. Uno de los procesos que más influye en el movimiento o enterramiento de microplásticos en la zona intermareal es generado por el hombre mediante el barrido de la arena con máquinas o rastrillos. De igual manera, se ha observado que los procesos naturales, como el viento y las mareas, tienen gran influencia en el movimiento de partículas plásticas (Maximenko *et al.*, 2008).

En la zona submareal, el movimiento de la capa superficial es generado mayormente por las corrientes (Maximenko *et al.*, 2008). Tanto el sedimento como los microplásticos que se depositan en la capa superficial son barridos por la corriente. Debido al movimiento ocasionado por las corrientes, los microplásticos flotantes tienen una menor probabilidad de permanecer en la superficie que los microplásticos que están enterrados. Estos procesos generan diferencias en el contenido de la capa superficial y la profunda, que conllevan a una mayor cantidad de microplásticos en la capa profunda (Kusui y Noda, 2003).

Los resultados presentados son similares a los obtenidos en playas de diferentes localidades evaluadas en el proyecto GAME 2014. La evaluación global muestra que, en general, la capa profunda (entre 5 y 10 cm) es la que presenta una mayor cantidad de microplásticos (Tabla 25).

Tabla 25. Evaluación de microplásticos en sedimento de playa de diferentes localidades estudiadas durante el proyecto GAME 2014

País	Locación	Zona de Muestreo	GAME XII 2014		
			Promedio (# de partículas)	0-5 cm (%)	5-10 cm (%)
Brasil	Laguna de Itaipu	Marea alta	5.3	40.6	59.4
		Intermareal	6	44.2	55.8
Chile	Bahía la Herradura	Marea alta	26.4	42.6	57.4
		Submareal	19.4	43.6	56.4
Indonesia	Isla de Rambut	Marea alta	2.4	30.9	69.1
		Intermareal	9.25	44.2	55.85
Japón	Bahía Akkeshi	Marea alta	23	51.6	48.4
		Intermareal	54	31.8	68.2
México	Puerto Morelos	Intermareal	60	43.3	56.7
		Submareal	51.4	45.1	54.9
Portugal	Madeira	Marea alta	5.3	50	50
		Intermareal	2.6	45.1	54.9
Reino Unido	Red Wharsbay	Intermareal	17.8	47.6	52.4
		Submareal	25.9	27.9	72.1

La mayor cantidad de restos plásticos encontrados en el sedimento de Puerto Morelos son fibras (38.33%), seguido de pellets (32.63%) y fragmentos (26.05%).

El origen de las fibras se ha relacionado con el desgaste de la ropa y con los desechos de la actividad pesquera (Browne *et al.*, 2011). El tipo de fibras que se encontraron en el sedimento de Puerto Morelos la mayoría de las veces se presentó en paquetes de varias fibras como el que se muestra en la figura 19. Esta característica, así como su forma y color parecen indicar que estos desechos se originan de la actividad pesquera.

La presencia de pellets se vincula con lugares donde la industria del plástico se ha establecido, aunque también se originan como desecho de muchos productos cosméticos (Claessens *et al.*, 2011; Wright *et al.*, 2013). Este tipo de microplásticos son muy comunes globalmente (Hidalgo-Ruz *et al.*, 2012). En el caso de los pellets encontrados no consideramos que estén directamente relacionados con la industria del plástico, ya que esta actividad no se realiza en Puerto Morelos, ni en lugares cercanos. Se considera que los pellets encontrados son resultado de desechos de productos de uso diario como cremas, jabones, pasta de dientes, limpiadores y pulidores. Por tanto, los pellets están relacionados con la actividad del turismo y los asentamientos humanos de Puerto Morelos y de las localidades cercanas.

El tercer tipo de microplástico más abundante son los fragmentos, los cuales son originados por el desgaste de diferentes productos, por ejemplo, botellas, tubería de PVC, utensilios de comida, bolsas, trastes de empaque, entre los más comunes. (Browne y Thompson, 2010). El origen de los fragmentos no está relacionado con alguna actividad en específico debido a la gran diversidad de productos de los que provienen.

Los desechos plásticos producto del turismo y de los asentamientos humanos pueden representar gran parte del origen de los fragmentos (Ng y Obbard, 2006). En Puerto Morelos, el proceso de fragmentación de los plásticos se ve favorecido por la utilización de máquinas que barren la arena. Las corrientes que llegan a la laguna arrecifal también transportan plásticos de localidades tanto vecinas como alejadas y, en numerosas ocasiones, son desechos vertidos directamente al mar por los buques de crucero que pasan principalmente desde Cozumel hacia o desde Florida, y que a menudo son más de 6 a 9 por día. Los plásticos que llegan por esta vía se pueden convertir en microplásticos e incorporarse al sedimento.

Existe una fuerte relación entre la abundancia de los microplásticos y áreas densamente pobladas. Browne *et al.* (2011), al analizar sedimento de 18 localidades en los 6 continentes, encontraron una relación positiva entre los microplásticos y la densidad de la población humana aledaña. El vínculo entre contaminación por microplásticos en sedimento y actividades humanas también ha sido demostrado por Claessens *et al.* (2011), quienes detectaron concentraciones particularmente altas de gránulos de microplásticos en puertos costeros. La concentración que encontraron de microplásticos en puertos fue superior a 390 partículas por kilogramo de peso seco de arena, 15 a 50 veces más alta que la observada en áreas de estudio similares.

Aunque Puerto Morelos no está densamente poblada, ciudades cercanas como Cancún y Playa del Carmen pueden influir por medio de las corrientes en la presencia de microplásticos en la zona. Asimismo, la gran cantidad de desplazamientos en embarcaciones vinculados con el turismo desechan macro y microplásticos que pueden llegar a asentarse en el sedimento

Investigaciones recientes sobre la distribución de los plásticos en el Norte del Atlántico y el Norte del Pacífico indican que las corrientes juegan un rol importante en la distribución de los desechos plásticos (Maximenko *et al.*,

2008; Barnes *et al.*, 2009; Law *et al.*, 2010; Ribic *et al.*, 2010). Las modelaciones realizadas por Maximenko *et al.* (2008) señalan que la acumulación de desechos plásticos en los cinco giros subtropicales puede predecirse por la física del océano. Consecuentemente, la exportación del plástico, de las regiones de alta concentración hacia las zonas de los giros tropicales, es favorecida por los patrones de circulación oceánica (Law *et al.*, 2010).

Los cinco giros de las corrientes oceánicas no se relacionan con la exportación de plásticos hacia Puerto Morelos; sin embargo, otras corrientes, como la corriente de Yucatán, pueden influir en la presencia de microplásticos en la zona evaluada en este estudio (Coronado *et al.*, 2007).

6.3.2 Monitoreo de fluoranteno *in-situ*

Las muestras de microplásticos que se dejaron en el mar en los sitios de la Marina El Cid, el muelle de Puerto Morelos y el muelle frente al ICML no contienen fluoranteno, lo que señala que los animales empleados para este estudio no tienen que lidiar con la presencia de fluoranteno en su medio natural.

El fluoranteno se origina como un producto de la combustión incompleta del petróleo y su presencia se vincula a áreas con actividades humanas de diferente índole. Tanto en el muelle de Puerto Morelos como en el muelle de la Marina El Cid, la actividad principal es el transporte marítimo. Ambos sitios presentan un flujo constante de embarcaciones, las cuales utilizan gasolina o diesel para funcionar.

Fisher *et al.* (2013) muestran una relación entre los puertos y la presencia de PAHs, como el fluoranteno. Debido a esto, en nuestros resultados esperábamos encontrar al menos concentraciones bajas de fluoranteno. Sin embargo, es muy probable que el flujo de embarcaciones sea muy escaso en comparación con el área estudiada por Fisher *et al.* (2013). La cantidad de PAHs generados en estos dos sitios es demasiado pequeña incluso para ser detectada mediante los análisis de HPLC.

En el muelle frente al ICML casi no se realizan actividades relacionadas con la quema de combustibles, solo podemos considerar la escasa utilización de las lanchas para proyectos del instituto. Por ello, era de esperarse la ausencia de fluoranteno en las muestras de microplásticos.

En la zona del Caribe el turismo puede llegar a tener una gran influencia en el aporte de contaminantes al agua *in situ*. Para la zona de Akumal, Hernández-Terrones *et al.* (2015) señalan que el vertido de aguas residuales, con los nutrientes y microorganismos asociados, aumentan considerablemente en la temporada alta de turismo. Aunque no se detectó fluoranteno en las muestras analizadas es importante considerar que los PHAs, como el fluoranteno, también pueden incrementar su concentración con el aumento del turismo, debido a que los servicios que se brindan a este sector implican muchas veces

la quema de combustibles (eg. los paseos turísticos en embarcaciones, los cruceros y la actividad de pesquería, que en su mayoría se realiza en lanchas).

Cancún y Playa del Carmen son los sitios más cercanos con una alta densidad poblacional y una gran cantidad de actividades en las que se consumen y queman combustibles. Pese a esto, nuestros resultados indican que la posible contaminación generada en ambos sitios no influye en la presencia de fluoranteno en Puerto Morelos.

Coronado *et al.* (2007) señalan que el tiempo promedio de residencia del agua en la laguna arrecifal de Puerto Morelos es de 3 h. Incluso si los sitios cercanos, como Cancún, desecharan una gran cantidad de contaminantes es poco probable que estos se queden en Puerto Morelos debido a que el agua y los compuestos asociados a ésta se mantiene en constante flujo.

6.4 IMPLICACIONES ECOLÓGICAS

Incluso cuando los microplásticos y el fluoranteno no causan efectos mortales en *E. rullieri* e *I. alatus*, el sólo hecho de encontrar los microplásticos en sus estómagos representa un riesgo potencial para la cadena trófica que se alimenta de ellos.

La transferencia natural de los microplásticos a través de los niveles tróficos ha sido observada en diferentes organismos. Por ejemplo, de mejillones (*Mytilus edulis*) a cangrejos (*C. maenas*) (Farrell y Nelson, 2013; Watts *et al.*, 2014) y de zooplancton a mísidos de la especie *Mysis relicta* (Setälä *et al.*, 2014). Sin embargo, en otra especie de mísidos (*M. mixta*), Setälä *et al.* (2014), muestran que no siempre se presenta esta transferencia de microplásticos.

Takeuchi *et al.* (2009) describen el proceso de biomagnificación de tóxicos (PBTs) a través de niveles tróficos superiores en moluscos, cangrejos y peces de la bahía de Tokio. En ese estudio, los autores demostraron que conforme aumenta el nivel trófico en la cadena alimenticia aumenta la concentración de tóxicos.

Los efectos causados por los microplásticos y elementos tóxicos varían en función de diferentes factores, por ejemplo, la biología de los animales y las condiciones naturales en las que viven (Ivar do Sul y Costa, 2014). Asimismo, en el laboratorio, la respuesta de los animales puede cambiar incluso al hacer pequeñas modificaciones en los elementos del diseño experimental (Fig. 23).

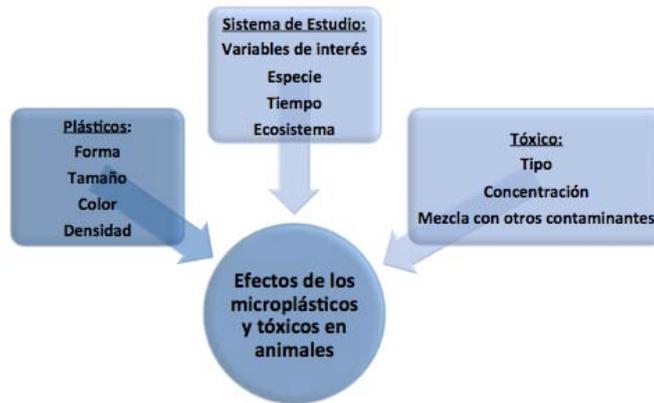


Figura 23. Posibles variaciones en los modelos para evaluar el efecto de los microplásticos y elementos tóxicos en el laboratorio (Adaptado de GAME, 2014)

La evaluación de microplásticos y sustancias (o elementos) tóxicos en sedimento y agua tienen como propósito final determinar el impacto en los ecosistemas, las consecuencias en la salud de los organismos marinos y las repercusiones en los seres humanos.

Con excepción de los estudios realizados en el proyecto GAME en 2013, no se tiene registro de la evaluación de microplásticos y elementos tóxicos en sedimento de playa para la zona del Caribe y Centro América, ni de sus repercusiones en especies caribeñas. Los resultados de este estudio aportan nueva información de los efectos de los microplásticos y tóxicos en especies del Caribe mexicano.

CONCLUSIONES

1. Aunque todas las hipótesis estadísticas alternativas presentaron un α mayor a 0.05, se encontraron tendencias en algunas de las variables.
2. Los microplásticos generaron un efecto positivo en la alimentación de *Isognomon alatus*.
3. Los efectos causados por los microplásticos sobre el crecimiento y la respiración de *Eupolyornia rullieri* e *I. alatus* fueron despreciables, así como también lo fueron en la mortalidad bajo condiciones de hipoxia para *I. alatus*.
4. El fluoranteno generó un efecto en la alimentación de *E. rullieri* e *I. alatus*; asimismo, este contaminante causó un efecto positivo en la respiración de *I. alatus*.
5. El efecto causado por el fluoranteno fue despreciable para la tasa de crecimiento en ambas especies. En la respiración, para *E. rullieri*, y la mortalidad bajo condiciones de hipoxia, para *I. alatus*, los efectos también fueron despreciables.
6. *E. rullieri* resultó ser una especie de difícil manejo en condiciones de laboratorio debido a que se ve afectada por la manipulación que requiere; en contraste, *I. alatus* resiste bien las condiciones de manejo en laboratorio.
7. En promedio se encontraron 55.67 partículas de microplásticos por kg de arena seca en las muestras analizadas *in situ*.
8. No se encontró fluoranteno en las muestras analizadas *in situ*.
9. Este trabajo es pionero en cuanto a las evaluaciones de microplásticos y fluoranteno sobre especies caribeñas en sedimentos de playa de la región del Caribe y Centroamérica.

REFERENCIAS

- Akberali HB. y ER. Trueman. 1985. Effects of environmental stress on marine bivalve molluscs. En: Blaxter JHS., Russell FS. y M. Yonge (eds). *Advances in Marine Biology*. volumen 22. Academic Press, Londres. 101-198 p.
- Andrady AL. 1994. Assessment of environmental biodegradation of synthetic polymers: a review. *J. Macromol. Sci. R. M. C* 34 (1), 25–75.
- Andrady AL. 2011. Microplastics in the marine environment. *Mar. Pollut. Bull.* 62:1596–605.
- Andrady AL. y MA. Neal. 2009. Applications and societal benefits of plastics. *Phil. Trans. R. Soc. B* 364: 1977 – 1984.
- ATSDR. 2007. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). Página en red: <http://www.atsdr.cdc.gov/substances/toxsubstance.asp?toxid=25>.
- Ballent A., Purser A., de Jesus Mendes PPS y L. Thomsen. 2012. Physical transport properties of marine microplastic pollution. *Biogeosci. Discuss.* 9: 18755-18798.
- Baird RW. Y SK. Hooker. 2000. Ingestion of plastic and unusual prey by a juvenile harbour porpoise. *Mar. Pollut. Bull.* 40: 719–720.
- Barnes DKA., Galgani F., Thompson RC. y M. Barlaz. 2009. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philos. Trans. R. Soc. B- Biol. Sci.* 364: 1985-1998.
- Baztan J., Carrasco A., Chouinard O., Cleaud M., Gabaldon JE., Huck T., Jaffres L., Jorgensen B., Miguelez A., Paillard C. y JP. Vanderlinden. 2014. Protected areas in the Atlantic facing the hazards of micro-plastic pollution: first diagnosis of three islands in the Canary Current. *Mar. Pollut. Bull.* 80: 302-311.
- Bellan G. 1980. Relationship of pollution to rocky bottom substratum polychaetes on the French Mediterranean coast. *Mar. Pollut. Bull.* 11: 318-321.
- Bellan G., Desrosiers G. y A. Willsie. 1988. Use of an Annelid Pollution Index for monitoring a moderately polluted littoral zone. *Mar. Pollut. Bull.* 19: 662- 665.
- Boerger CM, Lattin GL., Moore SL. y CJ. Moore. 2010. Plastic ingestion by planktivorous fishes in the North Pacific Central Gyre. *Mar. Pollut. Bull.* 60 (12): 2275–2278.
- Boj del Val E. 2015. El modelo de regresión de Cox. Página en red: <http://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/49070/11/EI%20modelo%20de%20Cox%20de%20riesgos%20proporcionales.pdf>
- Browne MA., Crump P., Niven SJ., Teuten E., Tonkin A., Galloway TS. y RC. Thompson. 2011. Accumulation of microplastic on shorelines worldwide: sources and sinks. *Environ. Sci. Technol.* 45: 9175-9179.
- Browne MA., Dissanayake A., Galloway TS., Lowe DM. y RC. Thompson. 2008. Ingested microscopic plastic translocates to the circulatory system of the mussel, *Mytilus edulis* (L.). *Environ. Sci. Technol.* 42 5026-5031.

Browne MA., Galloway TS. y RC. Thompson. 2010. Spatial patterns of plastic debris along estuarine shorelines. *Environ. Sci. Technol.* 44: 3404-3409.

Campos NH. 1988. Selected bivalves for monitoring of heavy metal contamination in the Colombian Caribbean. En: Seeliger U., De Lacerda LD. y SR. Patchineelam (eds) *Metals in coastal environments of Latin America*. Springer-Verlag, Berlín, Alemania. 270-275 p.

Cañete J., Leighton G. y E. Soto. 2000. Proposición de un índice de vigilancia ambiental basado en la variabilidad temporal de la abundancia de dos especies de poliquetos bentónicos de bahía Quintero, Chile. *Rev. biol. mar. oceanogr.* 35 (2): 185 – 194.

Carson HS., Colbert SL., Kaylor MJ. y KJ. McDermid. 2011. Small plastic debris changes water movement and heat transfer through beach sediments. *Mar. Pollut. Bull.* 62: 1708-1713.

Castañeda RA., Avlijas S., Simard MA. y A. Ricciardi. 2014. Microplastic pollution in St. Lawrence river sediments. *Can. J. Fish. Aquatic Sci.* 70: 1767-1771.

Claessens M., De Meester S., Van Landuyt L., De Clerck K. y CR. Janssen. 2011. Occurrence and distribution of microplastics in marine sediments along the Belgian coast. *Mar. Pollut. Bull.* 62: 2199-2204.

CONANP. 2000. Página en red: http://www.conanp.gob.mx/que_hacemos/pdf/programas_manejo/puerto_morelos.pdf

Cooper DA. y PL. Corcoran. 2010. Effects of mechanical and chemical processes on the degradation of plastic beach debris on the island of Kauai, Hawaii. *Mar. Pollut. Bull.* 60(5): 650–654.

Coronado C., Candela J., Iglesias-Prieto R., Sheinbaum M., López M. y F. Ocampo-Torres. 2007. On the circulation in the Puerto Morelos fringing reef lagoon. *Coral Reefs* 26: 149-163.

Costa MF., Silva-Cavalcanti JS., Barbosa CC., Portugal JL. y M. Barlett. 2011. Plastics buried in the inter-tidal plain of a tropical estuarine ecosystem. *J. Coast. Res.* SI 64: 339-343.

Dataapex. 2015. Página en red: <https://www.dataapex.com>

De Witte B., Devriese L., Bekaert K., Hoffman S., Vandermeersch G., Cooreman K. y J. Robbens. 2014. Quality assessment of the blue mussel (*Mytilus edulis*): comparison between commercial and wild types. *Mar. Pollut. Bull.* 85: 146-155.

Dekiff JH., Remy D., Klasmeier J. y E. Fries. 2014. Occurrence and spatial distribution of microplastics in sediments from Norderney. *Environ. Pollut.* 186: 248-256.

Del-Pilar-Ruso Y., De-la-Ossa-Carretero J., Giménez-Casaldueiro F. y J. Sánchez-Lizaso. 2008. Effects of a brine discharge over soft bottom Polychaeta assemblage. *Environ. Pollut.* 156 (2): 240-250.

Della Torre C., Bergami E., Salvati A., Faleri C., Cirino P., Dawson KA. y I. Corsi. 2014. Accumulation and embryotoxicity of polystyrene nanoparticles at early stage of

development of sea urchin embryos *Paracentrotus lividus*. Environ. Sci. Technol. 48: 12302-12311.

Derraik JGB. 2002. The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. Mar. Pollut. Bull. 44 (9): 842–852.

Devriese L., van der Meulen MD., Maes T., Bekaert K., Paul-Pont I., Lambert C., Huvet A., Soudant P., Robbens J. y AD. Vethaak. 2015. Evaluation of the ingested microplastics content in European brown shrimp (*Crangon crangon*, Linnaeus 1758). Mar. Pollut. Bull. 98(1-2):179-87.

Discover Life. 2016. *Isognomon alatus*. Página en red: <http://www.discoverlife.org/mp/20q?search=Isognomon+alatus>

Domaneschi O. y CM. Martins, 2002. *Isognomon bicolor* (C.B. Adams) (Bivalvia, Isognomonidae): primeiro registro para o Brasil, redescricao da espécie e considerações sobre a ocorrência e distribuição de *Isognomon* na costa brasileira. Revta Bras. Zool. 19 (2): 611 – 627.

Dobretsov S. 2010. Marine biofilms. En: Dürr S. y JC. Thomason (Eds.), Biofouling. Wiley-Blackwell, Chichester. 123-136 p.

Engler R. 2012. The Complex Interaction between Marine Debris and Toxic Chemicals in the Ocean. Environ. Sci. Technol. (46): 12302-12315.

Eriksson C. y H. Burton. 2009. Origins and Biological Accumulation of Small Plastic Particles in Fur Seals from Macquarie Island. AMBIO 32 (6): 380–384.

Faraway JJ. 2014. Linear models with R. Chapman and Hall/CRC. Londres, 274 p.

Farrell P. y K. Nelson. 2013. Trophic level transfer of microplastics: *Mytilus edulis* (L.) to *Carcinus maenas* (L.). Environ. Pollut. 177: 1-3.

Feldman D. 2002. Polymer Weathering: Photo-Oxidation. J. Polym. Environ. 10(4): 163-173.

Fisher V., Elsner NO., Brenke N., Schwabe E. y A. Brandt. 2015. Plastic pollution of the Kuril-Kamchatka Trench area (NW Pacific). Deep-Sea Res. II 111: 399-405.

Fleming TH. y DP. Harrington. 1984. Nonparametric estimation of the survival distribution in censored data. Comm. in Statistics 13: 2469-2486.

Fry DM., Fefer SI. y L. Sileo. 1987. Ingestion of plastic debris by Laysan Albatrosses and Wedge-tailed Shearwaters in the Hawaiian Islands. Mar. Pollut. Bull. 18(6): 339–343.

Galgani F., Hanke G., Werner S. y L. De Vrees. 2013. Marine litter within the European Marine strategy framework directive. ICES J. Mar. Sci. 70: 1055-1064.

Gamenick I., Forbes F. y N. Méndez. 2000. Effects of chronic fluoranthene exposure on sibling species of *Capitella* with different development modes. Mar. Ecol.-Prog. Ser. 3023: 191-203.

García-Cubas A. y M. Reguero. 2007. Catálogo Ilustrado de moluscos Bivalvos del Golfo de México y Mar Caribe. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología : UNAM,

Dirección General de Publicaciones y Fomento Editorial. 94 p.

Garraffoni A. y P. Lana. 2010. A critical review of ontogenetic development in Terebellidae (Polychaeta). *Acta Zoologica (Stockholm)* 91: 390–401.

Gelman A. y E. Loken. 2014. The Statistical Crisis in Science. *Am. Sci.* 102: 460–465.

Graham ER. y JT. Thompson. 2009. Deposit and suspensión feeding sea cucumbers (Echinodermata) ingest plastic fragments. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 368: 22-29.

Gregory MR. 1983. Virgin plastic granules on some beaches of Eastern Canada and Bermuda. *Mar. Environ. Res.* 10: 73-92.

Goldstein MC. y DS. Goodwin. 2013. Gooseneck barnacles (*Lepas spp.*) ingest microplastic debris in the North Pacific Subtropical Gyre. *PeerJ* 1:e184.

Haritash AK. y CP. Kaushik. 2011. Seasonal and spatial occurrence and distribution of respirable particulate-bound atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons in Hisar city and their potential health-risks. *Asian J. Water Environ. Pollut.* 8: 73-80.

Heo NW., Hong SH., Han GM., Hong S., Lee J., Song YK., Jang M. y WJ. Shim. 2013. Distribution of small plastic debris in cross-section and high strandline on Heungnam Beach, South Korea. *Ocean Sci. J.* 48,: 225-233.

Hernández-Terrones LM., Null KA., Ortega-Camacho D. y A. Paytan. 2015. Water quality assessment in the Mexican Caribbean: Impacts on the coastal ecosystem. *Cont. Shelf. Res.* 102: 62–72.

Hidalgo-Ruz V., Gutow L., Thompson RC. y M. Thiel. 2012. Microplastics in the marine environment: a review of the methods used for identification and quantification. *Environ. Sci. Technol.* 46: 3060-3075.

Hidalgo-Ruz V. y M. Thiel. 2013. Distribution and abundance of small plastic debris on beaches in the SE Pacific (Chile): a study supported by a citizen science project. *Mar. Environ. Res.* 87: 12-18.

Hutchings P. 1998. Biodiversity and functioning of polychaetes in benthic sediments. *Biodivers. Conserv.* 7(9): 1133-1145.

Imhof HK., Ivleva NP., Schmid J., Niessner R. y C. Laforsch. 2013. Contamination of beach sediments of a subalpine lake with microplastic particles. *Curr. Biol.* 23: 867-868.

Ioannidis JPA. 2005. Why most published research findings are false. *PLoS Med* 2(8): 696-701.

Ismail A. 2006. The use of intertidal molluscs in the monitoring of heavy metals and organotin compounds in the west coast of Peninsular Malaysia. *Coast. Mar. Sci.* 30: 401-406.

ITIS. 2016. Integrated Taxonomic Information System on-line database. Página en red: <http://www.itis.gov>.

Ivar do Sul J. y M. Costa. 2014. The present and future of microplastic pollution in the marine environment. *Environ. Pollut.* 185: 352-364.

- Ivar do Sul J., Spengler A. y MF. Costa. 2009. Here, there and everywhere. Small plastic fragments and pellets on beaches of Fernando de Noronha (Equatorial Western Atlantic). *Mar. Pollut. Bull.* 58: 1236-1238.
- Jambeck JR., Geyer R., Wilcox C., Siegler TR., Perryman M., Andrady A., Narayan R. y KL. Law. 2015. Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science* 347: 768-771.
- Jayasiri HB., Purushothaman CS. y A. Vennila. 2013. Quantitative analysis of plastic debris on recreational beaches in Mumbai, India. *Mar. Pollut. Bull.* 77: 107-112.
- Kaberi H., Tsangaris C., Zeri C., Mousdis G., Papadopoulos A. y N. Streftaris. 2013. Microplastics along the shoreline of a Greek island (Kea isl., Aegean Sea): types and densities in relation to beach orientation, characteristics and proximity to sources. En: 4th International Conference on Environmental Management, Engineering, Planning and Economics (CEMEPE) and SECOTOX Conference, Mykonos Island, Greece. 197-202 p.
- Kach DJ. y JE. Ward. 2008. The role of marine aggregates in the ingestion of picoplankton-size particles by suspension-feeding molluscs. *Mar. Biol.* 153: 797-805.
- Kim IS., Chae DH., Kim SK., Choi S. y SB. Woo. 2015. Factors influencing the spatial variation of microplastics on high-tidal coastal beaches in Korea. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 69(3): 299-309.
- Kusui T. y M. Noda. 2003. International survey on the distribution of stranded and buried litter on beaches along the Sea of Japan. *Mar. Pollut. Bull.* 47: 175-179.
- Laglbauer BJL., Franco-Santos RM., Andreu-Cazenave M., Brunelli L., Papadatou M., Palatinus A., Grego M. y T. Deprez. 2014. Macrodebris and microplastics from beaches in Slovenia. *Mar. Pollut. Bull.* 89: 356-366.
- Law KL., Moret-Ferguson S., Maximenko NA., Proskurowski G., Peacock EE., Hafner J. y CM. Reddy. 2010. Plastic accumulation in the North Atlantic sub-tropical Gyre. *Science* 329: 1185-1188.
- Lee J., Hong S., Song YK., Hong SH., Jang YJ., Jang M., Heo NW., Han GM., Lee MJ., Kang D. y WJ. Shim. 2013. Relationships among the abundances of plastic debris in different size classes on beaches in South Korea. *Mar. Pollut. Bull.* 77: 349-354.
- Lebrón S. 2007. Accumulation and elimination of copper by the Flat-tree oyster *Isognomon alatus*. Tesis de maestría, University of Puerto Rico Mayagüez Campus.
- Liebezeit G. y F. Dubaish. 2012. Microplastics in beaches of the East Frisian islands Spiekeroog and Kachelotplate. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 89: 213-217.
- Lobelle D. y M. Cunliffe. 2011. Early microbial biofilm formation on marine plastic debris. *Mar. Pollut. Bull.* 62: 197-200.
- Londoño-Mesa H. 2009 Terebellidae (Polychaeta: Terebellida) from the Grand Caribbean region. *Zootaxa* 2320: 1-93.
- Londoño-Mesa H. 2011. Terebélidos (Terebellidae: Polychaeta: Annelida) del Caribe colombiano. *Biota Colombiana* 12(1): 1-18.

Lusher AL., McHugh M. y RC. Thompson. 2013. Occurrence of microplastics in the gastrointestinal tract of pelagic and demersal fish from the English Channel. *Mar. Pollut. Bull.* 67: 94-99.

Martins J., y P. Sobral. 2011. Plastic marine debris on the Portuguese coastline: a matter of size? *Mar. Pollut. Bull.* 62: 1649-1653.

Mathalon A. y P. Hill. 2014. Microplastic fibers in the intertidal ecosystem surrounding Halifax Harbor, Nova Scotia. *Mar. Pollut. Bull.* 81: 69-79.

Maximenko NA., Lebedev KV., Hacker PW., Potemra JT., Yoshinari T. y SH. DeCarlo. 2008. Monitoring geostrophic ocean currents using Argo and satellite data. Página en red: http://www.aoml.noaa.gov/phod/docs/Dohan_MeasuringtheGlobalOcean.pdf

McDermid KJ. y TL. McMullen. 2004. Quantitative analysis of small-plastic debris on beaches in the Hawaiian archipelago. *Mar. Pollut. Bull.* 48: 790-794.

Méndez N., Gamenick I., Forbes V. y D. Baird. 2001. Sediment processing in *Capitella* spp. (Polychaeta: Capitellidae): strain-specific differences and effects of the organic toxicant fluoranthene. *Mar. Biol.* 138(2): 311-319.

Merino M. y L. Otero. 1991. Atlas Ambiental Costero, Puerto Morelos – Quintana Roo. Ferrandiz SA, México D.F. 14640: 80 p.

Moore CJ. 2008. Synthetic polymers in the marine environment: a rapidly increasing, long-term threat. *Environ. Res.* 108: 131-139.

Murray F. y PR. Cowie. 2011. Plastic contamination in the decapod crustacean *Nephrops norvegicus* (Linnaeus, 1758). *Mar. Pollut. Bull.* 62: 1207-1217.

Ng KL. y JP. Obbard. 2006. Prevalence of microplastics in Singapore's coastal marine environment. *Mar. Pollut. Bull.* 52: 761-767.

Nosek BA., Spies JR. y M. Motyl. 2012. Scientific Utopia: II. Restructuring Incentives and Practices to Promote Truth Over Publishability. *Perspe. Psychol. Sci.* 7(6): 615–631.

NOAA. 2015. Página en red: https://marinedebris.noaa.gov/sites/default/files/publications-files/noaa_microplastics_methods_manual.pdf

Nor NHM. y JP. Obbard. 2014. Microplastics in Singapore's coastal mangrove system. *Mar. Pollut. Bull.* 79: 278-283.

Norén F. 2008. Small Plastic Particles in Coastal Swedish Waters. KIMO Sweden Report .11 p.

Nuzzo R. 2001. *P* values, the 'gold standard' of statistical validity, are not as reliable as many scientists assume. *Nature* 506: 150-152.

Pocklington P. y PG. Wells. 1992. Polychaetes. Key Taxa for Marine Environmental Quality Monitoring. *Mar. Pollut. Bull.* 24 (12): 593-598.

pubchem.ncbi. 2015. Página en red: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/fluoranthene>

- Pule B., Mmualefe L. y N. Torto. 2012. Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Fish with Agilent Bond Elut QuEChERS AOAC Kit and HPLC-FLD. Agilent Technologies. Página en red: <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5990-5441EN.pdf>
- Raman AV. y PN. Ganapati. 1983. Pollution effects on ecobiology of benthic polychaetes in Visakhapatnam Harbour (Bay of Bengal). *Mar. Pollut. Bull.* 14 (2): 46-52.
- Reddy MS., Basha S., Adimurthy S. y G. Ramachandraiah. 2006. Description of the small plastics fragments in marine sediments along the Alang-Sosiya ship-breaking yard, India. *Estuar. Coast. Shelf. Sci.* 68: 656-660.
- Reisser J., Shaw J., Wilcox C., Hardesty BD., Proietti M., Thums M. y C. Pattiaratchi. 2013. Marine plastic pollution in waters around Australia: characteristics, concentrations, and pathways. *PLoS One* 8: e80466.
- Reisser J., Shaw J., Hallegraef G., Proietti M., Barnes DKA., Thums M., Wilcox C., Hardesty BD. y C. Pattiaratchi. 2014. Millimeter-sized marine plastics: a new pelagic habitat for microorganisms and invertebrates. *PLoS One* 9: e100289.
- Ribic CA., Sheavly SB., Rugg DJ. y ES. Erdmann. 2010. Trends and drivers of marine debris on the Atlantic coast of the United States 1997–2007. *Mar. Pollut. Bull.* 60: 1231–1242.
- Rios LM., Moore C. y PR. Jones. 2007. Persistent organic pollutants carried by synthetic polymers in the ocean environment. *Mar. Pollut. Bull.* 54 (8):1230–1237.
- Rochman CM., Hoh E., Hentschel BT. y S. Kaye. 2013. Long-term field measurement of sorption of organic contaminants to five types of plastic pellets: implications for plastic marine debris. *Environ. Sci. Technol.* 47 (3):1646–1654.
- Rodríguez-Martínez RE., Ruíz-Rentería F., van Tussenbroek B., Barba-Santos G., Escalante-Mancera E., Jordán-Garza G. y E. Jordán-Dahlgren. 2010. Environmental state and tendencies of the Puerto Morelos CARICOMP site, Mexico. *Rev. Biol. Trop.* 58 (3): 23-43.
- Rummel C. 2014. Occurrence and Potential Effects of Plastic Ingestion by Pelagic and Demersal Fish from the North Sea and Baltic Sea. Tesis para obtener el grado de biólogo. Universidad Johannes Gutenberg. 89 p.
- Sanchez W., Bender C. y JM. Porcher. 2014. Wild gudgeons (*Gobio gobio*) from French rivers are contaminated by microplastics: preliminary study and first evidence. *Environ. Res.* 128: 98-100.
- Setälä O., Fleming-Lehtinen V. y M. Lehtiniemi. 2014. Ingestion and transfer of microplastics in the planktonic food web. *Environ. Pollut.* 185: 77-83.
- Siung AM. 1980. Studies on the Biology of *Isognomon alatus* Gmelin (Bivalvia: Isognomonidae) with Notes on Its Potential as a Commercial Species. *B. Mar. Sci.* 30: 90-101.
- Takeuchi I., Miyoshi N., Mizukawa K., Takada H., Ikemoto T., Omori K. y K. Tsuchiya. 2009. Biomagnification profiles of polycyclic aromatic hydrocarbons, alkylphenols and

polychlorinated biphenyls in Tokyo Bay elucidated by $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ isotope ratios as guides to trophic web structure. *Mar. Pollut. Bull.* 58(5): 663–671.

Teuten EL., Saquing JM., Knappe DRU., Barlaz M., Jonsson S., Björn A., Rowland SJ., Thompson RC., Galloway TS., Yamashita R., Ochi D., Watanuki Y., Moore C., Viet PH., Tana TS., Prudente M., Boonyatumanond R., Zakaria MP., Akkhavong K., Ogata Y., Hirai H., Iwasa S., Mizukawa K., Hagino Y., Imamura A., Saha M. y H. Takada. 2009. Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 364: 2027–2045.

Thompson RC., Olsen Y., Mitchell RP., Davis A., Rowland SJ., John AWG., McGonigle D. y AE. Russell. 2004. Lost at sea: where is all the plastic?. *Science* 304(5672):838.

Trueman ER. y GA. Lowe. 1971. The effect of temperature and littoral exposure on the heart rate of a bivalve mollusc, *Isognomum alatus*, in tropical conditions. *Comp. Biochem. Physiol. A* 38: 555-564.

Van Cauwenberghe L. y CR. Janssen. 2014. Microplastics in bivalves cultured for human consumption. *Environ. Pollut.* 193: 65-70.

Van Cauwenberghe L., Claessens M., Vandegehuchte M. y CR. Janssen. 2015b. Microplastics are taken up by mussels (*Mytilus edulis*) and lugworms (*Arenicola marina*) living in natural habitats. *Environ. Pollut.* 199: 10-17.

Van Cauwenberghe L., Devriese L., François, G. y J. Robbens. 2015a. Microplastics in sediments: A review of techniques, occurrence and effects. *Mar. Environ. Res.* 111: 5-17.

Van Cauwenberghe L., Vanreusel A., Mees J. y CR. Janssen. 2013. Microplastic pollution in deep-sea sediments. *Environ. Pollut.* 182: 495-499.

Vianello A., Boldrin A., Guerriero P., Moschino V., Rella R., Sturaro A. y L. Da Ros. 2013. Microplastic particles in sediments of Lagoon of Venice, Italy: first observations on occurrence, spatial patterns and identification. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 130: 54-61.

von Moos N., Burkhardt-Holm P. y A. Koehler. 2012. Uptake and effects of microplastics on cells and tissues of the blue mussel *Mytilus edulis* L. after experimental exposure. *Environ. Sci. Technol.* 46: 11327-11335.

Ward JE. y DJ. Kach. 2009. Marine aggregates facilitate ingestion of nanoparticles by suspension-feeding bivalves. *Mar. Environ. Res.* 68: 137-142.

Watts AJR., Lewis C., Goodhead RM., Beckett SJ., Moger J., Tyler CR. y TS. Galloway. 2014. Uptake and retention of microplastics by the Shore crab *Carcinus maenas*. *Environ. Sci. Technol.* 48: 8823-8830.

Wegner A., Besseling E., Foekema EM., Kamermans P. y AA. Koelmans. 2012. Effects of nanopolystyrene on the feeding behaviour of the Blue Mussel (*Mytilus edulis* L.). *Environ. Toxicol. Chem.* 31: 2490-2497.

Wickham H. 2009. ggplot2: elegant graphics for data analysis: R package version 0.9.3.1. Página en red: <http://had.co.nz/ggplot2/>

Wright SL, Thompson RC y TS Galloway. 2013. The physical impacts of microplastics on marine organisms: a review. *Environ. Pollut* 178:483–92.

Ye S. y A. Andrady. 1991. Fouling of floating plastic debris under Biscayne Bay exposure conditions. *Mar. Pollut. Bull.* 22(12): 608–613.

Zeng EY. y CL. Visa. 1997. Organic pollutants in the coastal environment off San Diego, California. 1. Source identification and assessment by compositional indices of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ. Toxicol. Chem.* 16 (2): 179–188.

Zettler ER., Mincer TJ. y LA. Amaral-Zettler. 2013. Life in the “plastisphere”: microbial communities on plastic marine debris. *Environ. Sci. Technol.* 47: 7137-7146.

Zhao S., Zhu L., Wang T. y D. Li. 2014. Suspended microplastics in the surface water of the Yangtze Estuary System, China: first observations on occurrence, distribution. *Mar. Pollut. Bull.* 86: 562-568.

Zhou Q., Zhang J., Fu J., Shi J. y G. Jiang. 2008. Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Anal. Chim. Acta* 606:135-150.

Ziliak ST. y DN. McCloskey. 2009. The Cult of Statistical Significance. Section on Statistical Education JSM: 2302-2316. Página en red: <http://www.deirdremccloskey.com/docs/jsm.pdf>

A.1 ANEXO 1. ESTUDIOS PILOTOS

METODOLOGÍA

A1. 1 Determinación del modelo experimental

Previo al experimento principal, se realizó un estudio piloto para elegir a las 2 especies que serían los modelos experimentales. El objetivo fue encontrar especies que cumplieran con las siguientes características:

1. Ser abundantes en la zona.
2. De las dos especies una debía ser de hábito filtrador y la otra de hábito detritívoro.
3. Deberían ingerir los MP (microplásticos de PVC; las particularidades del producto se detallan en el Anexo 2).
4. Ser de manejo relativamente fácil, es decir adaptables a las condiciones de vida en acuarios de tamaño reducido.

Teniendo en cuenta estas características, se intentó probar con diferentes animales para ver cuales ingerían los MP. Cinco organismos de cada una de las siguientes especies fueron examinados para este propósito: *Canthigaster rostrata* (Chordata, Actinopterygii), *Eupolymnia rullieri* (Annelida, Polychaeta), *Isognomon alatus* (Mollusca, Bivalvia), *Ophiocoma echinata* (Equinodermata, Stelleroidea), *Ophiocoma wendtii* (Equinodermata, Stelleroidea) y *Ophiolepis impressa* (Equinodermata, Ophiuroidea) (Fig. 24).

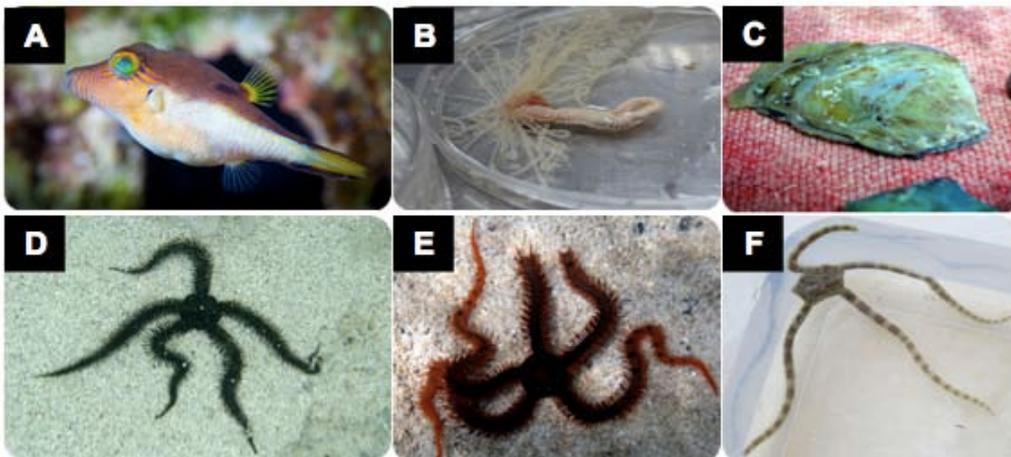


Figura 24. A. *Canthigaster rostrata*; B. *Eupolymnia rullieri*; C. *Isognomon alatus*; D. *Ophiocoma echinata*; E. *Ophiocoma wendtii*; F. *Ophiolepis impressa*.

Cada uno de los organismos se colocó en un acuario de vidrio de 5 L, sin comida por 2 días para vaciar el intestino. Posteriormente, en cada acuario se agregaron 5 g de MP. Transcurridos 5 días, los organismos se diseccionaron para determinar la presencia/ausencia de los MP en sus estómagos.

Todos los organismos de las especies *Canthigaster rostrata*, *Eupolymnia rullieri* e *Isognomon alatus* presentaron MP en sus estómagos. En contraste, en ningún estómago de los organismos de *Ophiocoma echinata*, *Ophiocoma wendtii* y *Ophiolepis impressa* se encontraron MP (Tabla 26).

Tabla 26. Resultados de la ingestión de los MP

Especie	n	Ingestión de los MP
<i>Canthigaster rostrata</i>	5	Si
<i>Eupolymnia rullieri</i>	5	Si
<i>Isognomon alatus</i>	5	Si
<i>Ophiocoma echinata</i>	5	No
<i>Ophiocoma wendtii</i>	5	No
<i>Ophiolepis impressa</i>	5	No

Debido a que *C. rostrata* presenta más complicaciones para su captura y manejo, se decidió utilizar *I. alatus* como especie filtradora. *E. rullieri* fue la única especie detritívora que ingirió los MP por lo que se también fue elegida.

A1. 2 Ensayos de resuspensión de los MP

Estos ensayos se hicieron con el propósito de mantener la mayor cantidad de MP en suspensión en la columna de agua de los acuarios. Se probaron 3 diferentes sistemas de flujo de agua. El primero, consistió en colocar dentro de los acuarios 2 mangueras largas en sentido opuesto y aumentar el flujo de agua dentro del sistema. El segundo, consistió en colocar una bomba de agua (Aquasub modelo 4203 con capacidad de 280 L*h) dentro del acuario. El tercero, consistió en colocar una piedra de aeración conectada a una bomba de aire (Resun modelo AC-9602 con 2 salida de 6 L*min).

Con los 3 sistemas (2 mangueras en sentido opuesto, bomba de aire y piedra de aeración) se obtuvieron buenos resultados. Sin embargo, se eligió el tercero por su bajo costo y facilidad de manejo. El primer sistema presentó una buena resuspensión de los MP en general, no obstante con frecuencia la presión del agua que alimentaba a los acuarios disminuía, afectando con ello la fuerza de movimiento del agua y en consecuencia la resuspensión de los MP.

El segundo sistema presentó la mejor resuspensión, sin embargo, implicaba un mantenimiento constante debido a que los filtros de las bombas se tapaban repetidamente con las pequeñas partículas de MP. Además de un mantenimiento intenso, este sistema implicaba un gasto monetario elevado debido a que se requería una bomba por acuario.

Por último, el tercer sistema tuvo las siguientes cualidades: podían ser conectadas varias piedras de aeración a una misma bomba; no dependía de la presión de salida del agua y no requería de mantenimiento adicional. Una vez instalado este sistema de bombas, se conectó a un temporizador que resuspendía los MP 2 veces al día, de 9 a 11 am y de 16 a 18 h.

A1. 3 Proporción peso húmedo vs peso seco de los MP

Los cálculos para el experimento se realizaron tomando en cuenta el peso seco de los MP. Sin embargo, en la práctica se utilizó el MP húmedo preparado con fluoranteno (sección 4.1.1) o MP húmedo preparado con agua de mar (sección 4.1.2). Para evitar sesgo y hacer más fácil en la práctica la medición del MP, se obtuvo la relación de peso húmedo–peso seco.

Esta relación se obtuvo midiendo 10 muestras de MP preparadas con fluoranteno y 10 muestras preparadas sólo con agua de mar. Las 20 muestras (10 con fluoranteno y 10 sólo con agua de mar) fueron pesadas (Balanza modelo adventure pro precisión de Ohaus, precisión 0.01 g), enjuagadas con agua destilada y secadas en horno (Thermo Scientific™ Lab-Line™ Imperial III estándar) a 60° C por 4 días. Posteriormente, las muestras se pesaron y se calculó la proporción peso seco vs peso húmedo.

La proporción peso seco vs peso húmedo obtenida para los microplásticos preparados con fluoranteno fue 1 : 1.8 (± 0.048 DS, $n=10$), por lo que se determinó que por cada gramo de MP calculado se debía pesar 1.8 g de MP preparado con fluoranteno.

La proporción peso seco vs peso húmedo obtenida para los microplásticos preparados con agua de mar fue 1 : 1.62 (± 0.049 DS, $n=10$), por lo que se determinó que por cada gramo de MP calculado se debía pesar 1.6 g de MP preparado con agua de mar.

A1. 4 Proporción peso seco vs volumen de la arena

Al igual que en el caso anterior, los cálculos para el experimento se realizaron tomando en cuenta el peso seco de la arena. Debido a la dificultad de secar toda la arena requerida para los acuarios, en la práctica se utilizó el volumen de la arena húmeda.

Para disminuir el sesgo ocasionado por utilizar volumen en lugar de peso seco, se obtuvo la relación de volumen vs peso húmedo y posteriormente la relación peso húmedo vs peso seco de la arena. Diez muestras de arena con un volumen de 250 ml, se pesaron (Balanza modelo adventure pro precisión de Ohaus, precisión 0.01 g) y se secaron en horno (Thermo Scientific™ Lab-Line™ Imperial III estándar) a 60 °C por 7 días. Posteriormente, se pesaron y se calculó la proporción peso seco vs volumen

La proporción peso seco vs peso húmedo fue 1 g : 0.75 g (± 0.036 DS, $n=10$). La proporción peso húmedo vs volumen fue 1 g : 1.79 ml (± 0.086 DS, $n=10$). Por último la proporción peso seco vs *volumen* fue 1 g : 1.34 ml (± 0.006 DS, $n=10$), lo que significa que por cada gramo de arena calculado se debe de medir 1.34 ml de arena.

A1. 5 Proporción peso húmedo vs peso seco de *Eupolymnia rullieri*

Se obtuvo la proporción peso seco vs peso húmedo de *E. rullieri* para el análisis y discusión de resultados.

Durante las recolectas varios organismos murieron, debido en parte a su fragilidad *per se* y en parte a su mal manejo. Veinte de estos organismos se emplearon con el fin de obtener la proporción peso húmedo-peso seco.

Cada uno de los organismos se pesó (Balanza modelo adventure pro precision de Ohaus, precisión 0.01 g) y secó en horno (Thermo Scientific™ Lab-Line™ Imperial III estandar) a 60 °C por 4 días. Posteriormente, se pesaron de nuevo y se calculó la proporción peso seco vs peso húmedo.

De los 20 organismos, 3 se sacaron del horno por equivocación al 2do día. Al 3er día se regresaron de nuevo al horno. Sin embargo, estos no se tomaron en cuenta ya que sufrieron una notable descomposición durante este periodo. La proporción peso seco vs peso húmedo obtenida fue 1 : 4.85 (\pm 2.11 DS, n=17).

A1. 6 Proporción peso húmedo vs peso seco de *Isognomon alatus*

Para realizar los cálculos pertinentes para el experimento se obtuvo el peso seco de *I. alatus*. Asimismo, se obtuvo la proporción peso seco vs peso húmedo para la discusión de resultados.

Para obtener el peso seco se recolectaron 21 organismos, los cuales se pesaron individualmente (Balanza modelo adventure pro precision de Ohaus, precisión 0.01 g). Los organismos fueron separados de sus conchas, se pesó la concha y el cuerpo blando por separado. El cuerpo blando se secó en horno (Thermo Scientific™ Lab-Line™ Imperial III estandar) a 60 °C por 4 días. Transcurrido este tiempo se pesó nuevamente y se calculó la proporción peso seco vs peso húmedo.

La proporción peso seco vs peso húmedo del cuerpo blando fue 1 : 6.461 (\pm 1.274 DS, n=21).

A1. 7 Determinación del sustrato preferencial de *Eupolymnia rullieri*

Este estudio se hizo con el objetivo de precisar si *E. rullieri* mostraba alguna preferencia por algún sustrato. Se colocaron 5 organismos en acuarios independientes, en cada acuario se colocó arena, una teja de barro, una piedra de coral muerto y un pedazo de tabique de concreto.

Los organismos se dejaron por 3 días y posteriormente se revisó en cuál de los sustratos hicieron sus tubos.

Se observó que de los 5 organismos, 3 hicieron su tubo en las tejas de barro y 2 en las piedras de coral, por lo que se decidió utilizar tejas en los acuarios.

A1. 8 Estudios pilotos de respiración

Con el objetivo de brindar información general del consumo de oxígeno de ambas especies se realizaron pruebas piloto de respiración. Nueve organismos de la especie *E. rullieri* y 8 organismos de *I. alatus* se recolectaron para este propósito.

Cada organismo fue colocado en un contenedor de plástico de 250 ml y este se llenó a tope con agua de mar. Dentro de cada contenedor se colocó un agitador magnético para asegurar una mezcla homogénea del agua. En cada contenedor se colocó una malla a la mitad para que los organismos no chocaran con el agitador magnético. En la tapa de los contenedores se hizo un agujero para colocar la sonda del oxímetro (Multisonda oxígeno-pH-salinidad-temperatura marca WTW modelo 3430) y se colocó parafilm en los bordes para sellarlos. La concentración de oxígeno en agua dentro de los contenedores fue medida por 240 min cada 20 min.

Los datos obtenidos del consumo total de oxígeno se graficaron y se obtuvo el porcentaje de oxígeno consumido para cada intervalo de tiempo.

A1. 8.1 Estudio piloto de respiración de *Eupolyornia rullieri*

El promedio de consumo de oxígeno para los 9 organismos de *E. rullieri* tiende a decrecer conforme avanza el tiempo (Tabla 5 y Fig. 27). En el primer lapso (0 a 20 min), el porcentaje de oxígeno consumido fue del 22.86 % y en el último lapso de tiempo (220 a 240 min), el porcentaje de oxígeno consumido fue del 2.80 %.

Tabla 27. Consumo de O₂ (mg/l) de *Eupolyornia rullieri*

TOTAL DE O ₂ (mg/l) CONSUMIDO*												
0 min	20 min	40 min	60 min	80 min	100 min	120 min	140 min	160 min	180 min	200 min	220 min	240 min
42.35	33.78	29.14	21.97	20.74	16.76	12.14	9.86	7.81	7.51	6.22	4.42	3.01
PORCENTAJE DE O ₂ CONSUMIDO												
0	22.86	36.58	52.10	56.67	65.60	75.53	80.21	84.08	84.82	87.41	90.96	93.76
DIFERENCIA DEL PORCENTAJE ENTRE INTERVALOS DE TIEMPO												
0	22.86	13.73	15.52	4.57	8.93	9.93	4.68	3.87	0.74	2.58	3.56	2.80

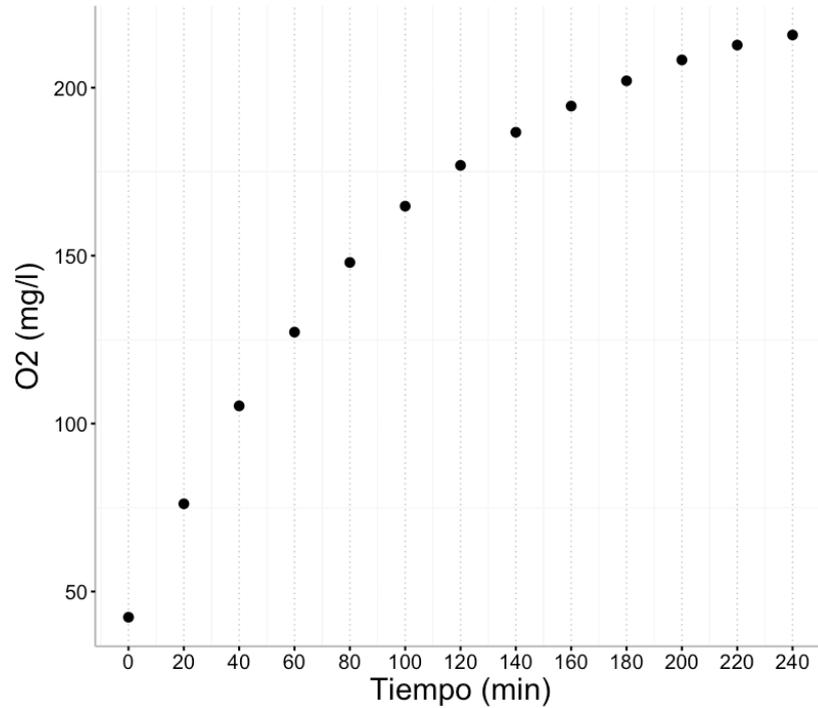


Figura 25. Gráfica de valor acumulado de consumo de O₂ (mg/l) total durante los 240 min del experimento con *Eupolyornia rullieri*

A1. 8.2 Estudio piloto de respiración de *Isognomon alatus*

Similar a *E. rullieri*, el consumo de oxígeno para los organismos de *I. alatus*, en general, tiende a decrecer conforme avanza el tiempo (Tabla 5 y Fig. 28). En el primer lapso de tiempo (0 a 20 min), el porcentaje de oxígeno consumido fue del 6.73 % y en el último lapso de tiempo (220 a 240 min), el porcentaje de oxígeno consumido fue del 2.35 %.

Tabla 28. Consumo de O₂ (mg/l) de *Isognomon alatus*

TOTAL DE O ₂ (mg/l) CONSUMIDO*												
0 min	20 min	40 min	60 min	80 min	100 min	120 min	140 min	160 min	180 min	200 min	220 min	240 min
39.98	37.30	35.93	34.34	32.91	31.49	30.17	29.98	27.82	26.69	25.61	24.48	23.55
PORCENTAJE DE O CONSUMIDO												
0	6.73	10.32	14.27	17.83	21.41	24.76	25.15	30.70	33.58	36.33	39.26	41.60
DIFERENCIA DEL PORCENTAJE ENTRE INTERVALOS DE TIEMPO												
0	6.73	3.59	3.95	3.56	3.57	3.36	0.39	5.54	2.88	2.76	2.92	2.35

*n=8

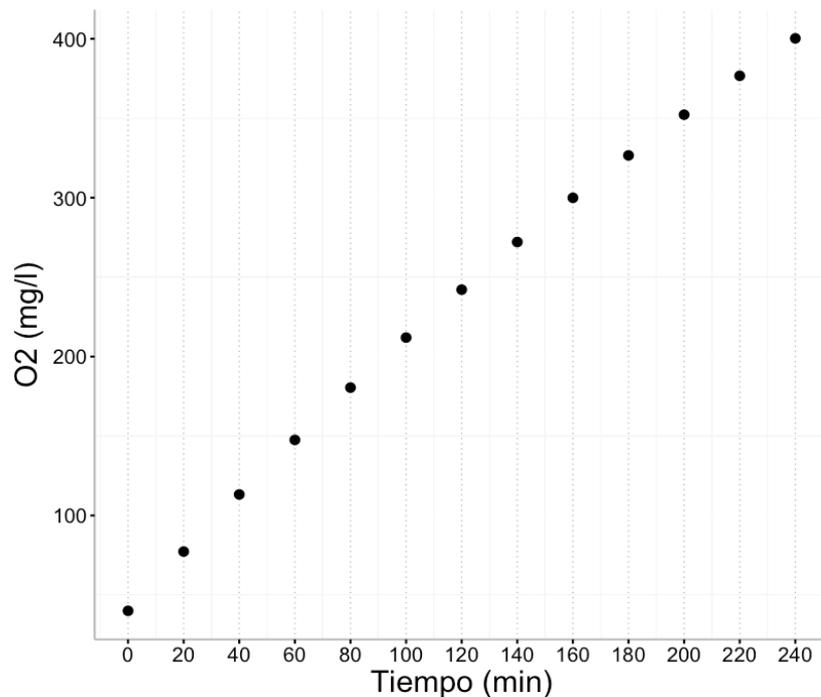


Figura 26. Gráfica de valor acumulado de consumo de O₂ (mg/l) total durante los 240 min del experimento con *Isognomon alatus*

Como se observa en las figuras 25 y 26, el mayor consumo de oxígeno ocurre durante los primeros 20 minutos en ambas especies. Los resultados obtenidos sirvieron para ajustar un lapso de tiempo adecuado para la prueba de consumo de oxígeno.

A1. 9 Estudios pilotos de consumo de algas para *Isognomon alatus*

Este ensayo se hizo con el propósito de obtener información general del consumo de algas (*Tetraselmis chuii*) de *I. alatus*. Quince organismos de *I. alatus* se utilizaron para este estudio. Cada organismo fue colocado en un vaso de precipitados de 250 ml con 180 ml de agua de mar, 50 ml de cultivo de algas y 1 agitador magnético. La concentración de algas en el agua dentro de los vasos de precipitados fue medida cada 15 min durante 90 min en total. Las mediciones se hicieron mediante la técnica de conteo de algas unicelulares utilizando la cámara de Neubauer (marca Brand con cuadrícula doble, sin pinzas).

Los datos obtenidos del consumo total de algas se graficaron y se obtuvo el porcentaje de algas consumidas para cada intervalo de tiempo.

La concentración total de algas por ml consumidas por todos los organismos fue de 43600000. Dicha cantidad representa el 63.30% de algas con respecto al inicio del experimento. De este 63.30%, los 2 primeros intervalos de tiempo suman el 36.33% del total de algas consumidas, mientras que los otros 4 intervalos de tiempo juntos suman el 26.97% del total de algas consumidas (Tabla 29).

Tabla 29. Consumo de algas de *Isognomon alatus*

CONCENTRACIÓN TOTAL DE ALGAS CONSUMIDAS (#/ml)*						
0 min	15 min	30 min	45 min	60 min	75 min	90 min
116480000	89120000	73180000	66160000	62700000	55200000	43600000
PORCENTAJE DE ALGAS CONSUMIDAS						
0.00	20.98	36.33	44.44	47.81	53.70	63.30
DIFERENCIA ENTRE INTERVALOS DE TIEMPO						
	20.98	15.35	8.11	3.37	5.89	9.60

*n=15

Como se observa en la figura 27, el mayor consumo de algas se dio en el primer y segundo intervalo de tiempo dentro de los primeros 30 minutos.

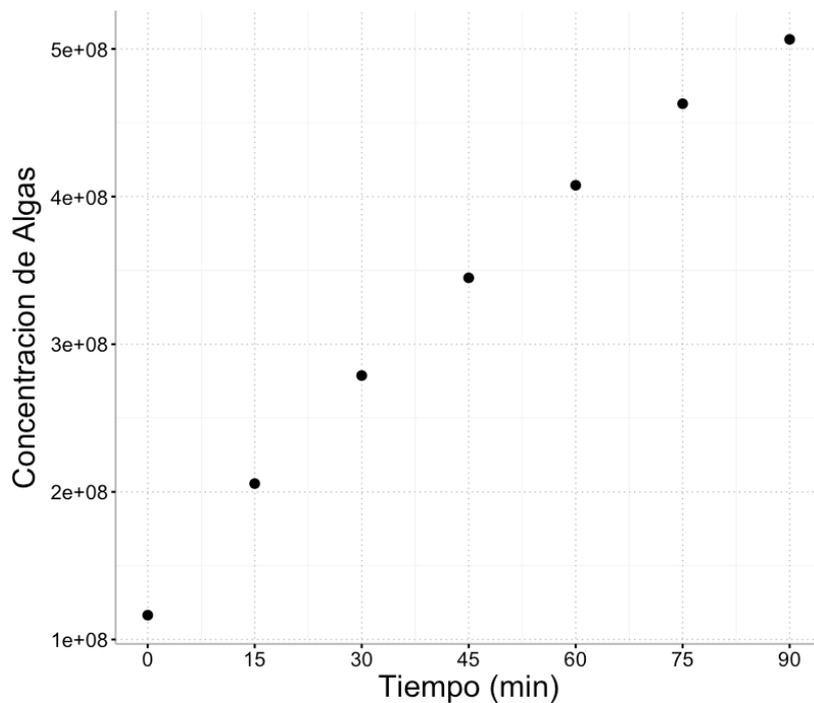


Figura 27. Gráfica del consumo de algas (#/ml) total durante los 90 min del experimento con *Isognomon alatus*

Los resultados adquiridos así como la logística de planeación del experimento sirvieron para ajustar un lapso de tiempo adecuado para la prueba de consumo de algas, el cual fue definido en 20 minutos.

A1. 10 Estudios pilotos de motilidad para *Eupolyornia rullieri*

Este estudio se realizó con para obtener información de la capacidad de movimiento de los organismos y tenía como objetivo inicial incluirla en el experimento principal. Para este estudio se utilizaron 18 organismos.

El experimento se realizó de noche, debido a los hábitos nocturnos de los animales. En una charola de disección, llena con agua de mar, se colocó una teja en una de las esquinas. La charola fue alumbrada con una lámpara. Cada organismo se sacó de su tubo y se colocó en la esquina contraria de la teja (Fig. 28). Se filmó cada prueba y se tomó el tiempo que los organismos tardaban en resguardarse debajo de la teja.

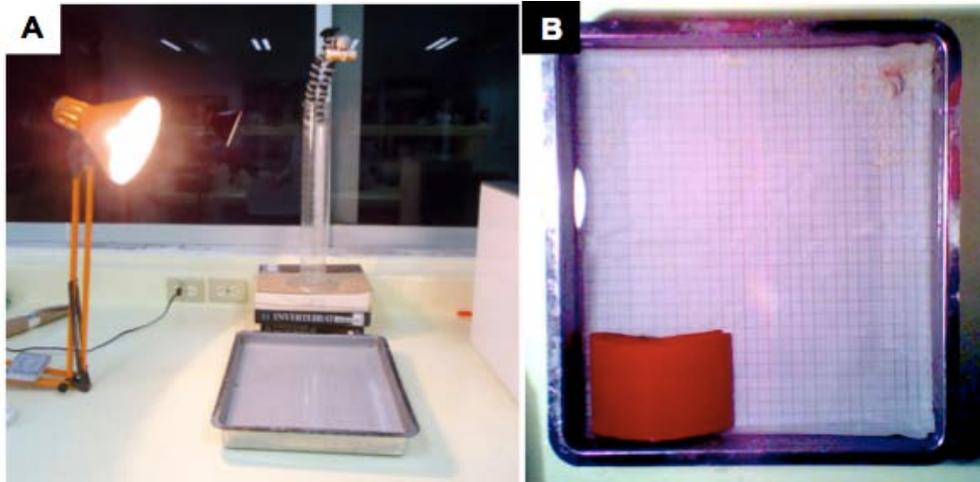


Figura 28. A. Disposición de los materiales; B Posición del organismo con respecto a la teja.

El tiempo para resguardarse varió entre los organismos en el intervalo de 2.30 a 4.80 min El promedio de todos los organismos fue de 3.42 min (± 0.76 DS, $n=18$).

Debido a que los organismos se estresan demasiado al ser sacados de sus tubos, se decidió no hacer esta prueba para evitar que se murieran a causa de este estrés.

A1. 11 Relación entre sustrato-arena y la supervivencia de *Eupolyornia rullieri*

Este estudio se hizo para saber si los organismos podrían vivir sin arena o sustrato (en este caso una teja), con el objetivo de utilizar esta información para la prueba de hipoxia, que al principio se planteó para ser llevada a cabo con *E. rullieri*. Los poliquetos normalmente utilizan el sustrato para adherir sus tubos y la arena para construirlos u obtener su alimento. Sin embargo, se determinó que agregar arena y/o sustrato podría influir con la medición del oxígeno. Además, por el diseño de los contenedores, colocar arena dificultaba el recambio diario de agua durante el experimento de hipoxia.

El experimento se llevó a cabo durante 7 días con 6 organismos y se probaron 2 tratamientos. En el primer tratamiento se colocó a un organismo en un acuario sólo con arena. En el segundo tratamiento se colocó a un organismo en un acuario sólo con una teja. Cada tratamiento se hizo por triplicado.

En ambos tratamientos murieron 2 organismos y sobrevivió uno (Tabla 30). Sin embargo, los organismos que tenían únicamente arena murieron durante el primer día, mientras que los organismos que tenían únicamente tejas murieron en el quinto día. Esto nos indica que al menos a corto plazo (aunque suponemos que será así siempre por la etología de los organismos en el medio natural), los organismos *E. rullieri* son mayormente afectados por la falta de sustrato (en este caso la teja) que por la falta de arena.

Tabla 30. Mortalidad bajo condiciones de hipoxia de *Eupolyornia rullieri*

Individuo	Tratamiento	Días en el experimento
1	Arena / sin Teja	1
2	Arena / sin Teja	1
3	Arena / sin Teja	+
4	Teja / sin Arena	5
5	Teja / sin Arena	5
6	Teja / sin Arena	+

* + El organismo sobrevivió hasta el final del experimento (x 7 días)

*n = 6 (3 por tratamiento)

Cabe señalar que el individuo que sobrevivió al tratamiento de “Arena/sin Teja” juntó restos de algas, que se encontraban en la arena, y se cubrió con éstas (Fig. 29). *E. rullieri* forma parte de la criptofauna, por lo que este comportamiento es esperable y lo hace con el propósito de protegerse de la luz.



Figura 29. *Eupolyornia rullieri* cubriéndose con restos de algas

A1. 12 Estudios pilotos de hipoxia para *Isognomon alatus*

El objetivo de este estudio fue obtener información general de la supervivencia de *I. alatus* bajo condiciones de estrés. El experimento se llevó a cabo durante 15 días con 6 organismos. Los organismos fueron sometidos a estrés mediante hipoxia (concentración de oxígeno de 1.5 µg/l). Para alcanzar la concentración deseada se llenó un garrafón de 20 L con agua de mar y se le inyectó nitrógeno hasta llegar a 1.5 µg/l de oxígeno. Se llenaron recipientes de 250 ml con el agua de mar preparada y en cada uno se colocó un organismo.

Posteriormente, los recipientes se cerraron herméticamente. Cada día se hizo un recambio de agua para evitar la contaminación por amonio.

Los resultados de esta prueba se muestran en la Tabla 31. Al morir los organismos se midió la concentración de oxígeno disuelto y se observó que ésta fue de 0.02 ml/l en todos los casos.

Tabla 31. Mortalidad de *Isognomon alatus* bajo condiciones de hipoxia

Individuo	O ₂ (mg/l) inicial	Días en el experimento	O ₂ (mg/l) final
1	1.5	12	0.02
2	1.5	12	0.02
3	1.5	12	0.02
4	1.5	13	0.02
5	1.5	14	0.02
6	1.5	+	0.06

* + El organismo sobrevivió hasta el final del experimento (x 15 días)

*n = 6

Se determinó que la concentración de oxígeno de 1.5 mg/l era adecuada para los fines del experimento. Con esta concentración los organismos no morían tan rápido, como para poder diferenciar entre la supervivencia de los organismos de los diferentes tratamientos, ni tan lento como para no poder registrar las muertes en el tiempo del experimento.

A1. 13 Estudios pilotos de hipoxia para *Eupolyornia rullieri*

Este estudio se hizo con el propósito de obtener información general de la supervivencia de *E. rullieri* bajo condiciones de estrés. El experimento se llevó a cabo durante 15 días con 6 organismos. El procedimiento fue el mismo que se utilizó para *I. alatus*, con la diferencia de que en este caso se utilizaron contenedores de 500 ml y se colocó una teja dentro de cada contenedor.

Los resultados de esta prueba se muestran en la Tabla 32. Al morir los organismos, se midió la concentración de oxígeno disuelto, en todos los casos esta fue de 0.02 ml/l, al igual que en *I. alatus*. De los 6 organismos sólo uno sobrevivió hasta el final del experimento, los demás murieron entre el día 8 y 11.

Tabla 32. Mortalidad de *Eupolyornia rullieri* bajo condiciones de hipoxia

Individuo	O ₂ (mg/l) inicial	Días en el experimento	O ₂ (mg/l) final
1	1.5	8	0.02
2	1.5	9	0.02
3	1.5	9	0.02
4	1.5	9	0.02
5	1.5	11	0.02
6	1.5	+	0.04

* + El organismo sobrevivió hasta el final del experimento (x 15 días)

*n = 6

Estos resultados, junto con los del experimento anterior, señalan que *E. rullieri* son organismos demasiado delicados para ser utilizados en experimentos de laboratorio como los que se necesitaban en esta ocasión.

La tasa de mortalidad durante el experimento fue muy alta, por lo que se decidió no llevar a cabo este experimento. Así, los organismos que sobrevivieron pudieron ser utilizados para las pruebas de HPLC.

A1. 14 Estudios pilotos de mortalidad en *Eupolyornia rullieri*

Este estudio se hizo con el objetivo de generar información que pudiera ayudar en futuros estudios a extender la supervivencia de *E. rullieri*. Se probaron 4 tratamientos para determinar si la elevada tasa de mortalidad se asociaba a factores como el suministro de oxígeno y alimento. Cada tratamiento se realizó por triplicado durante 15 días.

En el primer tratamiento, se colocó en cada acuario una bomba de aire para proporcionar una mayor aeración y movimiento en el agua. Estos acuarios se posicionaron en la parte inferior de la mesa, que es donde se observó una mayor tasa de mortalidad. En el segundo tratamiento, se agregaron 10 ml de cultivo de alga (*Tetraselmis chuii*) cada tercer día en cada acuario para proporcionar un mayor suministro de alimento. Estos acuarios también se posicionaron en la parte inferior de la mesa. El tercer y cuarto tratamiento fueron controles, sin embargo, el tercero se posicionó en la parte inferior y el cuarto en la parte superior.

Los acuarios fueron colocados en una mesa de madera de 2 niveles. El nivel superior tiene una altura de 120 cm y el nivel inferior una altura de 20 cm por arriba del piso. La mesa estuvo situada en un corredor techado y al aire libre. El techo junto con una malla sombra colocada alrededor de los acuarios proporcionó sombra y protección del clima (*i.e.* viento, polvo, lluvia) a los organismos (Fig. 30).



Figura 30. Acomodo y posición de los acuarios de *Eupolyornia rullieri*

A pesar de las precauciones tomadas, muchos organismos de *E. rullieri* murieron durante el experimento. La figura 31 muestra el día de muerte del organismo así como su posición. La mayor mortalidad se dio en los individuos del tratamiento MP/F 0.03%, en donde el 83.33% individuos murieron durante el experimento. La menor mortalidad se dio en los individuos de los tratamientos MP 0.03% y MP 0.3%, en donde el 41.66% individuos murieron durante el experimento (Tabla 33). En general, la tasa de mortalidad es alta, sin embargo, los organismos posicionados en la parte inferior de la mesa fueron los más afectados, motivo por el cual se consideró la posición de los acuarios como el principal factor de la causa de muerte de los organismos.

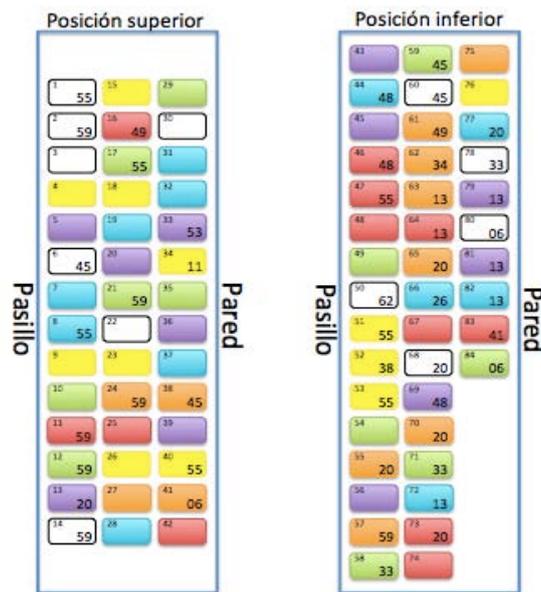


Figura 31. Mapa de mortalidad a lo largo del experimento. El número superior izquierdo es el número de acuario. El número inferior derecho es el número de día del experimento en que murió el organismo. Los tratamientos están representados por los siguientes colores: Blanco= Control; Morado= MP 0.03%; Amarillo= MP 0.3%; Azul= MP 3%; Naranja= MP/F 0.03%; Verde= MP/F 0.3%; Rojo= MP/F 3%.

Tabla 33. Porcentaje de mortalidad en cada tratamiento después de 2 meses bajo condiciones de laboratorio

Tratamiento	Total de individuos al inicio del experimento	Total de individuos al final del experimento	Porcentaje de Mortalidad	Porcentaje de Supervivencia
Control	12	9	75%	25%
MP 0.03%	12	5	41.66%	58.33%
MP 0.3%	12	5	41.66%	58.33%
MP 3%	12	6	50%	50%
MP/F 0.03%	12	10	83.33%	16.66%
MP/F 0.3%	12	7	58.33%	41.66%
MP/F 3%	12	7	58.33%	41.66%

Los resultados de los estudios pilotos ejecutados para determinar la posible causa de muerte de los organismos se muestran en la Tabla 34. Los individuos de los acuarios control posicionados en la parte inferior de la mesa fueron los que más tardaron en morir. Los individuos control posicionados en la parte superior, así como a los que se les suministró aire, tuvieron una mortalidad muy similar a los individuos control posicionados en la parte inferior. Los individuos que más rápido murieron fueron a los que se les suministró comida.

Tabla 34. Mortalidad de *Eupolyornia rullieri* bajo 4 tratamientos diferentes

Individuo	Tratamiento	Días en el experimento
1	Suministro de aire - posición inferior	2
2	Suministro de aire - posición inferior	+
3	Suministro de aire - posición inferior	+
4	Suministro de comida - posición inferior	2
5	Suministro de comida - posición inferior	10
6	Suministro de comida - posición inferior	+
7	Control - posición inferior	5
8	Control - posición inferior	+
9	Control - posición inferior	+
10	Control-posición superior	2
11	Control-posición superior	+
12	Control-posición superior	+

* + El organismo sobrevivió hasta el final del experimento (x 15 días)

*n = 12 (3 por tratamiento)

Los resultados de este experimento señalan que la alta mortalidad de *E. rullieri* no se debe a la falta de comida o aire. Durante los 15 días que duró este experimento, no se observó una mayor supervivencia en los individuos a los que se le aumento el suministro de aire y comida en relación con los individuos a los que no se les suministro nada (controles).

A1. 15 Diversidad de algas dentro de los acuarios

Durante el experimento una gran cantidad de algas creció dentro de los acuarios. Estas algas se identificaron para determinar las posibles interacciones con los organismos.

La especie más abundante encontrada en los acuarios fue *Cladophora liniformis* (Chlorophyta, Ulvophyceae; Fig. 32), seguida de la especie *Cladophora albida* (Chlorophyta, Ulvophyceae).

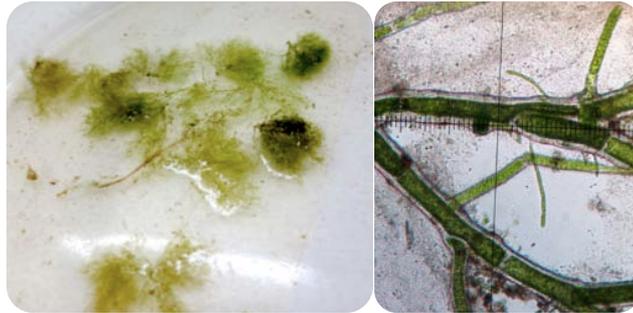


Figura 32. Izquierda. *Cladophora albida*; Derecha. Detalle de las células

A1. 16 Densidad de algas en los acuarios de *Isognomon alatus*

Se midió la cantidad de algas en la columna de agua y en el fondo de los acuarios para determinar la disponibilidad de comida para los organismos. Se escogieron al azar 5 acuarios para medir concentración de algas en la columna de agua y 5 acuarios para medir la concentración de algas en el fondo. En cada acuario se midió la concentración de algas utilizando una cámara de Neubauer (marca Brand con cuadrícula doble, sin pinzas).

La concentración promedio de algas en la columna de agua de los acuarios es de 139600 algas/ml y en el fondo del acuario es de 50000 algas/ml.

A1. 17 Densidad de los MP en los acuarios de *Isognomon alatus*

Se midió la cantidad de MP en la columna de agua para determinar si los MP estaban disponibles para ser filtrados por los organismos. Para este estudio se escogieron al azar 3 acuarios de cada concentración de MP (0.03%, 0.3% y 3%). En cada acuario se midió la concentración de MP utilizando una cámara de Neubauer (marca Brand con cuadrícula doble, sin pinzas).

La concentración de MP promedio en los acuarios de 3% fue 194500 partículas/ml, en los acuarios de 0.03% de 103822 partículas/ml y en los acuarios de 0.03% de 18511 partículas/ml.

A2. ANEXO 2. Características de los microplásticos de PVC utilizados

Los microplásticos fueron donados por la empresa Mexichem, las características técnicas se obtuvieron de su página oficial (www.mexichem.com) y se enuncian a continuación.

A2. 1 Datos del producto

El tamaño promedio de las partículas de los microplásticos de PVC es de 160 μm , son un homopolímero de peso molecular medio. La polimerización se realiza por el proceso de suspensión, el cual es diseñado por procesos de alta productividad tiempos de mezclado cortos, bajo contenido de partículas oscuras y buena estabilidad térmica.

Es un compuesto rígido para extrusión de tuberías y perfiles, además, es inocuo y no contiene metales pesados ni aditivos. Las propiedades se muestran en la Tabla 35.

Tabla 35. Propiedades de los microplásticos de PVC utilizados en el experimento

Propiedades (Properties)	Unidades (Units)	Especificaciones (Specifications)	Método de Análisis (Test Method)
Valor K K Value	-	66 \pm 1	DIN 53726 1983
Densidad Aparente Apparent Density	g/cc	0.54 mín.	D1895-96
Partículas Oscuras Dark Specks	#/100 gr	30 máx.	ACA-I-002
Tamaño de Partícula: Particle Size			D 1921-A-96
<ul style="list-style-type: none">Retenido en Malla 40 Retained on 60 sieve	%	0.05 máx.	
<ul style="list-style-type: none">Retenido en Malla 60 Retained on 200 sieve	%	7.0 máx.	
<ul style="list-style-type: none">A través de Malla 200 Through 200 sieve	%	4.0 máx.	
Porosidad Total (DOP) Total Porosity	cc/g	0.31 mín.	D3367-75
Monómero Residual Residual Monomer	ppm	10.0 máx.	D3749-95

CERTIFICADOS DE CALIDAD / QUALITY CERTIFICATES
ISO 9001: 2008, ISO 14001: 2004. Planta certificada Industria Limpia / Plant certified as Clean Industry.