UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA Escuela de Doctorado

OPTIMIZACIÓN DEL MUESTREO DE MICROPLÁSTICOS: Ensayos para la mejora de la monitorización mediante la aplicación de diseños innovadores y el empleo de barcos de oportunidad.

> TESIS DOCTORAL Tania Montoto Martínez

Fotografía de portada: Vista aérea del BIO Ángeles Alvariño en una de las Campañas Oceanográficas a ESTOC en el año 2018 en la que se realizaron ensayos de monitorización de microplásticos desarrollados en esta tesis. En la parte inferior se aprecia un cachalote en superficie (Fotografía contraportada). © PLOCAN



TESIS DOCTORAL

OPTIMIZACIÓN DEL MUESTREO DE MICROPLÁSTICOS: Ensayos para la mejora de la monitorización mediante la aplicación de diseños innovadores y el empleo de barcos de oportunidad.

TANIA MONTOTO MARTÍNEZ

PROGRAMA DE DOCTORADO DE CALIDAD AMBIENTAL Y RECURSOS NATURALES (DOCARNA)

> Directora: María Dolores Gelado Caballero Co-director: José Joaquín Hernández Brito



Tecnologías, Gestión y Biogeoquímica Ambiental Universidad de Las Palmos de Gran Canaria



Plataforma Oceánica de Canarias

LAS PALMAS DE GRAN CANARIA OCTUBRE, 2022



D. Jesús García Rubiano COORDINADOR/A DEL PROGRAMA DE DOCTORADO DOCARNA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

INFORMA,

De que la Comisión Académica del Programa de Doctorado, en su sesión de fecha XXXXX tomó el acuerdo de dar el consentimiento para su tramitación, a la tesis doctoral titulada "Optimización del muestreo de microplásticos: Ensayos para la mejora de la monitorización en áreas marinas mediante la aplicación de diseños innovadores y el empleo de barcos de oportunidad" presentada por la doctoranda D/Dª Tania Montoto Martínez, dirigida por la Doctora María Dolores Gelado Caballero y codirigida por el Doctor José Joaquín Hernández Brito.

Y para que así conste, y a efectos de lo previsto en el Art^o 11 del Reglamento de Estudios de Doctorado (BOULPGC 04/03/2019) de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, firmo la presente en Las Palmas de Gran Canaria, a 15 de Septiembre de dos mil veintidós.

Créditos:

Sugerencia de cita para este documento:

Montoto-Martínez, T. 2022. Optimización del muestreo de microplásticos: Ensayos para la mejora de la monitorización mediante la aplicación de diseños innovadores y el empleo de barcos de oportunidad. Tesis Doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC), Las Palmas de Gran Canaria.

Diseño gráfico: Tania Montoto Martínez

Dedicatoria:

A mis pequeñes, que me ponen lo importante por delante.

Apoyo financiero:

Este trabajo ha sido apoyado por una beca de investigación de postgrado de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Además, se ha contado con financiación del Fondo Europeo de Desarrollo Regional a través del Programa Operativo de Cooperación Territorial Madeira-Açores-Canarias (POMAC) 2014-2020 a través del Proyecto MARCET (MAC/1.1b/149) para la realización de las tareas de investigación en el ámbito de la contaminación por microplásticos en los cetáceos y en las aguas de la Macaronesia.



AGRADECIMIENTOS

El camino

Desde los ánimos para matricularme en la Escuela de Doctorado, hasta prácticamente el otro día que depositamos este documento, el camino ha estado lleno de personas y razones a las que agradecer el apoyo, la ayuda, el acompañamiento, la motivación, los recursos, las ideas, las críticas, las escuchas, [...] y también los silencios, los cafés, los medios y las oportunidades.

El suelo

Gracias a Leo, y a su papi, por poner lo pequeño y lo más importante en el centro de la senda. A mi familia, tan lejos y tan cerca, por la libertad, el cuidado y el amor que me transmiten siempre.

Las llaves de las portillas

Agradezco la confianza depositada en mi por mi directora y codirector, sembrando en este camino numerosos proyectos que fructifican en forma de aprendizaje, independencia y llaves de las portillas que a día de hoy se siguen abriendo.

La flor en el camino

A Abi, por hacer agradable, y especialmente dulce, el trabajo en el laboratorio.

Las esencias

A todas las "Ecologistas en Acción", y con especial cercanía a Ben Magec y Salvar Agaete, por esa *lógica-ecológica-aplastante*, por *poner la vida en el centro*, por estar ahí para *no perder el norte*. A Carmen (@ProyectoFarfalle), por contagiar su ilusión por la ciencia y la divulgación, y a Claudia Pérez Barrancos, por su ejemplo desde la *e-coherencia*.

Los bastones: ideas, acompañamiento, soporte

A Pedro y Cayetano, por estar siempre pendientes y dispuestos ante *los problemillas técnicos*; a los y las marineras que, en este mismo sentido, salvan la vida de la tripulación científica en las campañas oceanográficas. Al elenco de compañeros/as de campañas, que lo mismo te ayudaban con el muestreo que amenizando las tardes y noches de vaivén en el barco.

A todo ese equipazo de *batas verdes*, por la asistencia en cada una de las necropsias y por hacer posible las sinergias entre las ciencias del mar y la veterinaria.

A Jesús Acabani y Nabil, Diego de Murillo y Javier Zaera, por acogernos abordo en las distintas etapas de testeo de los muestreadores de microplásticos, en el Marhaba, el Acrobat y el Spirit of the Seas. A las iniciativas como PreciousPlastic y Sailing Living Lab, por su ejemplo y ganas de sumar.

A Amelia Rodríguez, por abrir las puertas del laboratorio de arqueología a mis partículas, y a Tariq Jawhari, por arrojar luz con aquel láser tan preciso de la espectroscopía microRaman de los Centros Científicos y Tecnológicos de la Universidad de Barcelona.

Caminantes

A ti, que te estás acercando a este trabajo; a ti, que me serviste de guía; o a ti, que fuiste delante quitando piedras. También a ti, que vas caminando y saludas con empatía.

Resumen

Esta tesis doctoral recoge una serie de investigaciones llevadas a cabo en el ámbito de la contaminación marina por microplásticos en aguas y cetáceos de la Macaronesia, comprendiendo el estudio de la abundancia y distribución de estas partículas tanto en las aguas marinas superficiales como en el contenido estomacal de cetáceos varados de esta misma región.

Se realizaron varios ensayos metodológicos dirigidos la optimización del muestreo de microplásticos desde embarcaciones de oportunidad, lo que culminó en el registro en la Oficina Española de Patentes y Marcas de un Dispositivo para el muestreo: [MuMi]. Se efectuó un estudio comparativo de este innovador muestreador con la red Manta, el sistema más ampliamente utilizado para este fin hasta la fecha.

En el caso de los cetáceos, se presenta un protocolo interdisciplinar para la extracción de estas partículas del tracto gastrointestinal, estudiando así la ingesta de microplásticos en animales varados. Complementariamente, se analizaron una serie de contaminantes orgánicos persistentes en tejidos musculares de los mismos individuos.

En último lugar, se apuntan algunas consideraciones a tener en cuenta para la optimización en la lectura e interpretación de la huella química de los microplásticos analizados mediante microespectroscopía Raman, una cuestión sobre la que profundizar en futuros estudios.

Entre las conclusiones y las perspectivas futuras se destaca la necesidad e idoneidad de armonizar los métodos para incrementar las posibilidades de monitorización de estas partículas en el medio marino, poniendo de relieve la importancia de las herramientas de transferencia y cultura científica en la resolución del problema.

ABSTRACT

This doctoral thesis includes a series of investigations carried out in the field of marine pollution by microplastics in the waters of Macaronesia, including the study of the abundance and distribution of these particles both in surface marine waters and in the stomach contents of stranded cetaceans in this same region.

To this end, a series of methodological tests were carried out to optimise the sampling of microplastics from vessels of opportunity, culminating in the registration at the Spanish Patent and Trademark Office of a sampling device called MuMi, on which a comparative investigation was carried out with respect to the Manta net, the most widely used system for this purpose to date.

In the case of cetaceans, an interdisciplinary protocol for the extraction of these particles from the gastrointestinal tract is presented, the ingestion of microplastics in stranded cetaceans in the Macaronesian Region is studied and a series of persistent organic pollutants in the tissues of the same individuals are analyzed.

Finally, some questions to be taken into account for the optimisation of the reading of the chemical fingerprint of these particles analysed by Raman microspectroscopy are pointed out, a question to be studied in depth in future studies.

Final conclusions and future perspectives include the suitability of harmonising methods to increase the possibilities of comparison between different regions of the world and different monitoring programmes, and highlight the importance of tackling an environmental problem such as this one with an integrated approach, understanding its human dimension and making use of the tools of scientific outreach and culture in solving the problem.

Índice_

Lista de Acrónimos	022
Lista de Figuras	024
	024
Lista de Tablas	028
Lista de Imágenes	029
5	

Capítulo 1. El porqué de esta tesis de microplásticos y su estructura.

1.1	Introducción al marco teórico	034
1.2	Las lagunas de conocimiento	035
1.3	Objetivos y esquema de la tesis	037
1.4	Otras cuestiones importantes del encuadre	039

Capítulo 2. Microplásticos: un problema ambiental de procedencia terrestre desembocando en un planeta inmensamente marino.

2.1 Las basuras marinas haciendo historia044
2.1.1 Fuentes de entrada de las basuras marinas al medio marino
2.1.2 La ubicuidad de un problema ambiental global
2.1.3 Las basuras marinas como descriptor del Buen Estado Ambiental
2.2 Plásticos: principal componente de las basuras marinas051
2.2.1 Algunos datos sobre la producción de plástico
2.2.2 Tipos de plástico y procesos de degradación
2.3 Una atención especial a los microplásticos
2.3.1 Microplásticos primarios y secundarios
2.4 Microplásticos en aguas superficiales oceánicas059
2.4.1 Distribución general
2.4.2 Distribución en las distintas cuencas oceánicas
2.4.3 Lagunas de conocimiento
2.5 Microplásticos afectando distintas formas de vida marina
2.5.1 Affecciones a la biota
2.5.2 Ingesta de microplásticos
2.5.3 Interacción e incorporación de contaminantes químicos
2.6 Lagunas de conocimiento066

Parte I: Para entender hay que conocer:

¿Cómo muestreamos los océanos?

Capítulo 3. El sistema de circulación de agua marina en los barcos: una oportunidad para las necesidades de monitorización de microplásticos.

3.1 Introducción072
3.1.1 Los microplásticos: dificultades de muestreo
3.1.2 Una propuesta de optimización del muestreo de microplásticos
3.2 Material y métodos074
3.2.1 Zona de muestreo
3.2.2 Métodos de muestreo
3.2.3 Procedimientos para la prevención de la contaminación
3.2.4 Análisis de laboratorio
3.3 Resultados080
3.3.1 Resultados generales
3.3.2 Comparativa entre muestreo estacionario Vs en navegación
3.3.3 Distribución de colores y tamaños
3.4 Discusión084
3.4.1 El sistema de circulación de agua marina de los barcos: una
oportunidad para mejorar la monitorización de microplásticos
3.4.2 Evolución y rendimiento del ingenio de muestreo de
microplásticos
3.4.3 Comparativa de las distribuciones de microplásticos
3.5 Conclusiones090
Capítulo 4. MuMi: un Muestreador de Microplásticos diseñado para su uso

por embarcaciones de oportunidad registrado como Modelo de Utilidad

4.1	Antecedentes de la invención	96
4.2	Descripción de la invención09	96
4.3	Descripción de una realización preferente10	22
4.4	Reivindicaciones	24

Capítulo 5. Estudio comparativo de métodos para el muestreo de microplásticos en aguas marinas superficiales: la red Manta y el Muestreador de Microplásticos (MuMi).

5.1	Introducción	110
5.2	Material y Métodos	
5	5.2.1 Zona de muestreo	
5	5.2.2 Estrategia de muestreo	

5.2.3 Red Manta
5.2.4 Muestreador de microplásticos: MuMi
5.2.5 Análisis en el laboratorio
5.2.6 Controles de contaminación
5.2.7 Análisis estadístico
5.3 Resultados
5.4 Discusión
5.4.1 Comparación de la operación con ambos métodos de muestreo
5.4.2 Volumen de muestreo
5.4.3 Tamaños de malla
5.4.4 Diferencias en las características de las partículas filtradas
5.4.5 Resumen comparativo
5.5 Conclusiones134

Parte II: Partículas de menos de 5 mm en aninales de más de 2 m: ¿Ingieren microplásticos los cetáceos?

Capítulo 6. Microplásticos, bisfenoles, ftalatos y pesticidas en especies de odontocetos de la Región Macaronésica.

6.1 Introducción		
6.1.1 La ingestión de plástico en cetáceos		
6.1.2 Los impactos derivados de la ingestión de plástico		
6.1.3 Contaminantes orgánicos persistentes		
6.1.4 Necesidades de investigación en el campo		
6.2 Material y métodos145		
6.2.1 Especímenes y sitios de muestreo		
6.2.2 Prevención de la contaminación		
6.2.3 Extracción del contenido gastrointestinal		
6.2.4 Análisis de laboratorio		
6.2.5 Detección de contaminantes orgánicos persistentes		
6.2.6 Análisis estadístico		
6.3 Resultados y discusión156		
6.3.1 Ingestión de plástico		
6.3.2 Distribución de partículas en los tractos digestivos		
6.3.3 Contaminantes orgánicos persistentes		
6.4 Conclusiones168		

Parte III: Más allá de contar partículas.

Capítulo 7. Consideraciones para la identificación de microplásticos mediante espectroscopía micro-Raman.

7.1 Introducción174
7.1.1 La relevancia y utilidad de la identificación de los polímeros
7.1.2 Las razones para la elección de la espectroscopía micro-Raman
7.2 Materiales y métodos178
7.2.1 Biblioteca de espectros de referencia de elaboración propia
7.2.2 Caracterización de microplásticos de muestras ambientales
propias
7.3 Resultados
7.3.1 Biblioteca de espectros de referencia de elaboración propia
7.3.2 Caracterización de microplásticos de muestras ambientales
propias
7.4 Discusión
7.4.1 El color: factor de enmascaramiento en la identificación
7.4.2 Partículas degradadas: la necesidad de las librerías de espectros de
materiales ambientales
7.4.3 La variedad y singularidad de las muestras ambientales
7.5 Conclusiones

Capítulo 8. Cerrando (el ciclo): Conclusiones y perspectivas futuras.

8.1	Conclusiones generales	94
8.2	Conclusiones específicas19	95
8.3	Perspectivas futuras	98

Capítulo 9. Referencias

Capítulo 10. Anexos

Capítulo 11. Publicaciones

11.1	Publicaciones de la tesis doctoral2	250
11.2	Difusión de resultados de investigación predoctoral:	253
11.3	Participación en otros eventos2	255
11.4	Otras publicaciones	263

Lista de Acrónimos

Acrónimo	Significado
AMAP	Programa de Asesoramiento y Monitorización del Ártico
BEA	Buen Estado Ambiental
BIO	Buque de Investigación Oceanográfica
BPA, BPF, BPS	Bisfenoles A, F y S, respectivamente
CCITUB	Centros Científicos y Tecnológicos de la Universidad de Barcelona
COPs	Contaminantes Orgánicos Persistentes
CSIC	Consejo Superior de Investigaciones Científicas
DBP	dibutilftalato
DDD	diclorodifenildicloroetileno
DDE	diclorodifenildicloroetileno
DDT	diclorodifeniltricloroetano
DEP	dietilftalato
DEHP	di(2-etilhexil) ftalato
DMEM	Directiva Marco Estrategia Marina
ESTOC	Estación Europea de Series Temporales Oceánicas de Canarias Oceánicas
FTIR	Espectroscopía de Infrarrojos por Transformada de Fourier
GCPN	Giro Central del Pacífico Norte
HDPE	Polietileno de alta densidad
IEO	Instituto Español de Oceanografía
IUSA	Instituto Universitario de Sanidad Animal

КОН	Hidróxido de Potasio	
MARPOL	Convención para Prevención de la Contaminación generada por Buques	
MPs	Microplástico(s)	
NPE	Etoxilatos de nonilfenol	
OEPM	Oficina Española de Patentes y Marcas	
РСВ	Bisfenilos Policlorados	
PE	Polietileno	
PLA	Ácido Poliláctico	
PLOCAN	Plataforma Oceanográfica de Canarias	
PNUMA	Programa para el Medio Ambiente de las Naciones Unidas	
POMAC	Programa Operativo de Cooperación Territorial Madeira-Açores- Canarias	
РР	Polipropileno	
PVC	Policloruro de Vinilo	
RUP	Región Ultraperiférica, según Tratado de Funcionamiento de la Unión Europea.	
TGBA	Tecnologías, Gestión y Biogeoquímica Ambiental	
TSGML	Subgrupo Técnico sobre Basuras Marinas (de la DMEM)	
UICN	Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza	
ULPGC	Universidad de Las Palmas de Gran Canaria	
UNED	Universidad Nacional de Educación a Distancia	
UV	Radiación Ultravioleta	
ZEC	Zona de Especial Conservación	

Lista de Figuras

Fig.2.1: Infografía elaborada por Vanessa Ortiz para el Informe "Basuras Marinas, plásticos y microplásticos: orígenes, impactos y consecuencias de una amenaza global", editado por Ecologistas en Acción en 2017.

Fig.2.2: Adaptación de figura de Deudero y Alomar (2015) en la que se muestran los datos por aquel entonces disponibles de elementos de plástico (%) hallados en zonas marinas del fondo (en negro) y de superficie (en gris) a partir de una revisión de los estudios realizados en el Mar Mediterráneo......052

Fig.3.1: Mapa de los puntos de muestreo repetidos en los tres cruceros de investigación. (i) estaciones oceánicas correspondientes a la estación ESTOC, (ii) estaciones costeras correspondientes a tres estaciones en el Banco de Ensayos de PLOCAN, a 2 millas náuticas de la costa de Gran Canaria, y (iii) muestras de navegación recogidas durante el tránsito hacia y desde ESTOC al puerto de origen, una distancia de aproximadamente 60 millas náuticas por transecto. Esta figura fue generada con el software gratuito y de código abierto QGIS .Mapa base: EMODNET Bathymetry WMS 1.3.0..... 074

Fig.3.2: Esquema del ingenio de muestreo, conectado al sistema de bombeo de agua marina del BIO Ángeles Alvariño mediante una toma de manguera de ¾" en el laboratorio húmedo. Esta figura muestra imágenes reales del artefacto de muestreo utilizado en este estudio, con los tamices apilados que contiene mostrados a la derecha de la imagen.....076

Fig.3.3: Distribución de tamaños de las partículas microplásticas encontradas. a) Distribución de tamaños de las partículas microplásticas encontradas, separadas por tipo de muestra; b) Rango

Fig.4.2: Diagrama de operación del Muestreador de Microplásticos (MuMi)...... 101

Fig.4.3: Relación de vistas del dispositivo de muestreo de microplásticos MuMi......103

Fig.5.3: Boxplot que representa los microplásticos recogidos en cada uno de los transectos (cada uno de los puntos grises) según el método y el tamaño de malla (donde sólo el MuMi tiene un tamaño de malla de 50 μm).Las líneas interiores representan la mediana y los rombos la media.119

Fig.5.8: a) Gráfico de densidad del número de microplásticos según el modo de muestreo. Se indica el número medio de microplásticos filtrados con cada método. b) Datos utilizados para la estimación estadística de la representatividad de la muestra, donde μ es la media de las partículas Fig.6.5: Distribución de colores de los microplásticos encontrados en este estudio.160

Fig.6.6: Relación entre los contenidos estomacales analizados para los registros dietéticos y el estudio de la abundancia de microplásticos. El Cet 934 fue el único animal con macroplásticos en su contenido estomacal, lo que se corresponde con un alto registro de microplásticos. También se observa que el animal que contenía más restos de presas en su estómago (Cet ID = 956) tenía las segundas concentraciones más bajas de microplásticos.

Fig.6.9: Concentración de pesticidas (DDT, DDD y DDE) en los cetáceos analizados. La línea roja indica la concentración a la que los compuestos organohalogenados se consideran tóxicos en

los tejidos de los mamíferos marinos (Letcher et al. 2010)......165

Fig.7.3: Comparación de los espectros devueltos por el *Software Spectragryph* de dos fibras rojas procedentes de dos matrices diferentes: (A) agua y (B) contenido estomacal de un cetáceo. 183

Lista de Tablas

Tabla 2.1: Listado de la repercusión de los impactos de las basuras marinas en distintosámbitos, más allá del ambiental. Adaptación del contenido del Informe conjunto de la UNEP y laComisión Intergubernamental Oceanográfica (Cheshire et al., 2009).

Tabla 3.1:Tabla comprendiendo los estudios que, hasta la fecha de publicación del presentetrabajo de investigación, se habían realizado siguiendo métodos similares de bombeo de agua demar subsuperficial, bien mediante una bomba aportada al uso o mediante el sistema de circulaciónde agua del propio buque.081

Tabla 3.2: Número de microplásticos por metro cúbico de agua muestreado hallados en ellos muestreos, en función del modo de obtención (en navegación o en estación), y de éstas últimas,oceánicas o costeras.082

 Tabla 5.1: Número y concentración de microplásticos identificados según método de muestreo y por transecto.

 120

Tabla 5.2: Comparación de las principales características de los dos sistemas de muestreo: Lared Manta y el muestreador MuMi134

Tabla 6.1: Lista de ejemplares analizados en el presente estudio. Todas las especies están incluidas en el Catálogo Español de Especies Amenazadas, dos de ellas, marcadas con un asterisco, bajo la categoría "vulnerable". Ubicación del varamiento: Madeira (MA), Islas Canarias (IC). Desarrollo sexual (SD): I, inmaduro; M, maduro. Condición corporal (BC): G, buena; M, moderada; P, pobre; VP, muy pobre. Categorías de estado de descomposición (DCC): 1, carcasa extremadamente fresco, apenas muerto; 2, carcasa fresca; 3, descomposición moderada; 4, descomposición avanzada; 5, restos momificados o esqueléticos. Contenido Estomacal (Cont. Estom.).

Tabla 7.1: Relación de materiales de referencia estudiados......178

Lista de Imágenes

Imagen 3.1 Piezas empleadas para la construcción del ingenio de filtración......075

Imagen 3.3 Fotografía tomada durante una campaña oceanográfica a bordo del BIO Ángeles Alvariño en 2017 en la que se realizaron ensayos con distintas configuraciones de tamaños de malla y volúmenes de muestreo para determinar los parámetros óptimos a tener en cuenta para el posterior estudio llevado a cabo en el mismo buque, que se describe en este capítulo......077

Imagen 3.4 Fotografía de otro de las configuraciones previas testadas, en esta ocasión a bordo del BIO Sarmiento de Gamboa, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) durante la campaña oceanográfica FLUXES, en noviembre de 2017......077

Image	n 3.6	Fragmento verde fotografiado a 60 aumentos	284
Image	n 3.7	Fibras, fotografiadas a 20 aumentos	284
Image	n 3.8	Fibras, fotografiadas a 20 aumentos	284
Image	n 3.9	Fibra roja, fotografiada a 80 aumentos	284
Image	n 5.1	Lavado de la red Manta aplicando agua de mar a presión desde el exterior o	de la
red. con el fin	de re	coger todo el material filtrado en el copo	.114

Imagen 5.2 Traspaso del material recogido en el copo a botes de rosca para su posterior

filtrado, digestión y análisis en el laboratorio en tierra	
--	--

Imagen 6.1 Fotografía del intestino de uno de los animales estudiados dispuesto en una bandeja independiente antes de comenzar con su muestreo......149



-CAPÍTULO 1-

1

El porqué de esta tesis de microplásticos y su estructura.

1.1 Introducción al marco teórico

Al tiempo que se comenzaba esta tesis doctoral, el estudio de los microplásticos se trataba de manera englobaba en un conjunto más amplio denominado **basuras marinas**. Hoy en día, sin embargo, han pasado de ser la fracción microscópica de este conjunto a ser considerados, por sí solos, **una problemática ambiental global**, contando con entidad más que suficiente como para ser investigados específicamente por programas mundiales como el Programa Mundial del Medio Ambiente de La Organización de las Naciones Unidas (PNUMA) (PNUMA, 2021).

Prueba de esto es que los documentos marco de hace aproximadamente una década, como el Informe del Panel Asesor Científico-Técnico del Área de Medio Ambiente Global del Programa de la ONU citado anteriormente, en 2011 tan sólo citaba la palabra **microplásticos** en dos ocasiones (STAP, 2011). Sí es cierto, no obstante, que en las dos es para advertir de la acumulación de estas partículas en distintos hábitats, señalar las dificultades de muestreo y análisis dado su microscópico tamaño e reconocer que existen importantes cuestiones a investigar en cuanto a su emisión, transporte, destino, y efectos físico-químicos.

La evolución de esta problemática ambiental y la cantidad de estudios realizados y publicados desde los primeros hallazgos a finales de los años 60 hasta hoy en día se aborda en el segundo capítulo de esta tesis. No obstante, cabe mencionar una última referencia a este tema y es precisamente una cita de Leticia Carvalho, jefa de la Subdivision de Aguas Marinas y Dulces del PNUMA quien recientemente afirmaba que "El impacto de los productos químicos peligrosos y de los microplásticos en la fisiología de los seres humanos y de los organismos marinos es todavía incipiente y debe ser priorizado y acelerado en esta Década de las Ciencias del Mar para el Desarrollo Sostenible" ("Inside the Clean Seas campaign against microplastics," 2022).



Imagen 1.1 Fotografía tomada en Noviembre del 2021 en la arena de la Playa de Las Canteras (Las Palmas de Gran Canaria) tras una tormenta que dejó la costa repleta de microplásticos. © Tania Montoto Martínez.

1.2 Las lagunas de conocimiento

Dónde incidir con el trabajo de investigación

La necesidad de abordar el estudio de los microplásticos desde la comunidad científica, y las posibilidades de aportar conocimiento en este campo eran evidentes. En la revisión realizada por Galganit et al. (2013) sobre el abordaje de las basuras marinas en el marco de la Directiva Marco sobre las Estrategias Marinas (DMEM) (Directiva 2008/56/CE) se identifican una serie de necesidades de investigación para la implementación del Descriptor 10, sobre Basuras Marinas. Entre ellas, se destaca como prioridad el desarrollo de métodos de monitorización y protocolos para el muestreo en los distintos compartimentos marinos.

A su vez, era latente la rapidez en la evolución y publicación de los trabajos, representando un factor crítico a la hora de plantear la **necesidad de armonización de los métodos de muestreo**, identificación y análisis de las partículas encontradas (Rochman et al., 2017). Cada vez había más datos, pero la proliferación de éstos no se daba de la mano a ningún procedimiento común, dificultando enormemente la comparación entre los distintos estudios (Barboza y Giménez, 2015; Connors et al., 2017).

Así pues, uno de los objetivos en la elaboración de los trabajos de investigación que se comprenden en esta tesis doctoral fue el de trabajar, siempre que los hubiera, de acuerdo a los estándares vigentes, proporcionando los datos siguiendo recomendaciones internacionales las para la monitorización (GESAMP, 2019), y contribuyendo, en la medida de lo posible, a los programas gubernamentales establecidos para ello, como es el caso de la DMEM y sus Programas de Seguimiento para el alcance del Buen Estado Ambiental (BEA).



Imagen 1.2 Una mano tomando una bolsa de plástico de la superficie del mar en La Playa de Las Canteras. Fecha: Noviembre/2016. © Tania Montoto Martínez.

Por otro lado, las basuras marinas son difícilmente estudiadas en el océano abierto, siendo la mavoría de los estudios realizados en las aguas y sedimentos costeros (Barboza y Giménez, 2017; Monteiro et al., 2018), donde se acumulan mayoritariamente, y sobre todo, de manera mucho más accesible para su muestreo. Así pues, una de las lagunas de conocimiento que se pretendía abordar era precisamente la falta de datos sobre microplásticos en el océano abierto. Para ello, se ha adoptado un enfoque dirigido a incrementar las posibilidades de muestreo en aguas oceánicas mediante un sistema de muestreo que fuera oportunista y sencillo de utilizar, de manera que las ventajas para su utilización permitieran saltar la barrera de la falta de información sobre estas partículas en aguas oceánicas.

Se han realizado varias campañas de monitorización en barcos de oportunidad que han conducido al diseño de distintos prototiposparaelmuestreodemicroplásticos, culminando con el registro de un dispositivo de Muestreo de Microplásticos (MuMi) como Modelo de Utilidad ante la Oficina Española de Patentes y Marcas (OEPM), testando su eficiencia en comparación con el sistema de muestreo más ampliamente utilizado hasta el momento en aguas marinas superficiales. Todo esto se concentra en los tres capítulos que comprende la *Parte I* de esta tesis.

En tercer lugar, de entre los distintos compartimentos ambientales y las especies afectadas por la contaminación por microplásticos, se ha puesto **el foco de atención en un conjunto poco accesible:** estudiándose **la ingesta de estas pequeñas partículas por algunos de los animales más** grandes del mar, los cetáceos. Se identificó la posibilidad de trabajar con los cetáceos varados como una importante oportunidad para optimizar la obtención de información sobre la contaminación por microplásticos en estos animales, que además son considerados importantes centinelas de la contaminación marina (Bossart, 2011). Así, en *el capítulo 6*, se incluyen los resultados de investigación relativos a un protocolo de actuación y se recogen los primeros datos de ingesta de microplásticos y el establecimiento de las concentraciones de contaminantes orgánicos persistentes (COPs) en tejidos de cetáceos de la Macaronesia.

Por último, en un ámbito más analítico, se identificó la necesidad de mejorar la precisión de las técnicas de caracterización de los microplásticos basadas en la identificación visual. Al igual que los métodos de muestreo de microplásticos son muy diversos, las técnicas de identificación de los polímeros que los componen son también muy variadas, contando cada una con sus particulares ventajas e inconvenientes (Käppler et al., 2016). Así, en el capítulo 7 se recogen, mediante la exposición de tres casos ilustrativos fruto de la experiencia con las muestras trabajadas en los capítulos precedentes, se recogen algunas consideraciones para la optimización de la identificación de microplásticos mediante espectroscopía micro-Raman, una de las técnicas espectroscópicas con más resolución para el estudio de los plásticos más pequeños.

Finalmente, en <u>el capítulo 8</u> se incluyen las conclusiones y perspectivas futuras en este campo de investigación que sigue aún hoy en día manteniendo su popularidad.

1.3 Objetivos y esquema de la tesis.

Oportunidades de contribución al conocimiento científico.

Surgido de la preocupación por las profundas implicaciones que representa la contaminación por microplásticos a nivel global, el objetivo principal de esta tesis doctoral es la optimización de las técnicas de muestreo de microplásticos en áreas marinas, de manera que se facilite el establecimiento del estatus real de las distribuciones de microplásticos y favorezca la implementación de la Directiva Marco Estrategia Marina (DMEM), en particular al Descriptor 10 sobre Basuras Marinas, contribuyendo al reto de incrementar el número y la calidad de las observaciones, a la vez que se fomenta la ciencia ciudadana

Para lograr este objetivo, se estructuró el trabajo a largo plazo en tres subobjetivos:

1) Realizar una extensa revisión bibliográfica sobre las metodologías de muestreo, extracción y determinación de microplásticos en el medio marino, concretamente, en las aguas superficiales, y con especial atención al océano abierto, como una zona infraexplorada respecto a las aguas costeras, pero también en el caso concreto del estudio de la ingesta de estas partículas en cetáceos.

2) Mejorar la monitorización de microplásticos en: 1) aguas oceánicas y costeras, mediante la validación de diseños y ensayos de prototipos muestreadores de microplásticos que pudieran ser utilizados para la consecución de los muestreos de seguimiento para el análisis del Buen Estado Ambiental según la Directiva Estrategia Marco Marina; 2) cetáceos, contribuyendo al establecimiento de un protocolo común e interdisciplinar que permitiera evaluar la ingesta de microplásticos en estos animales, reconocidos centinelas de la contaminación marina.

3) Contribuir al establecimiento de las características de las distribuciones de microplásticos en el medio marino, su alcance y variabilidad, en un escenario ambiental en el que es imperativo fomentar la relación entre ciencia y sociedad, a través de colaboraciones, ciencia ciudadana, y la efectiva transferencia de la innovación y la producción científica.

Esta investigación se estructura, tras el presente capítulo introductorio (*Capítulo* 1), y un capítulo de revisión del estado del arte (*Capítulo* 2), en las siguientes partes:

Primera parte: Comprende el estudio de los métodos de muestreo empleados para la monitorización de los microplásticos en los océanos, los ensayos metodológicos para la optimización del muestreo desde embarcaciones con sistema de circulación de agua en continuo (*Capítulo* 3), la presentación de un muestreador de microplásticos diseñado y registrado como Modelo de Utilidad (MuMi) (*Capítulo* 4) y una investigación comparativa sobre su operabilidad en barcos de oportunidad como
respuesta a las necesidades en este ámbito (*Capítulo 5*).

Segunda parte: Aborda el estudio de microplásticos en el contenido estomacal de cetáceos varados, presentando un protocolo que ha sido convenientemente validado y registrado como oportunidad para conocer la incidencia de estas partículas en estos mamíferos marinos, y analizando al mismo tiempo la presencia de contaminantes orgánicos persistentes característicos de los aditivos plásticos en una serie de ejemplares varados en la zona de estudio (*Capítulo 6*). **Tercera parte**: Apunta algunas cuestiones de relevancia para el estudio de la huella química de los microplásticos de los muestreos precedentes, analizando la influencia de la matriz (agua marina Vs contenido estomacal), el color o el tamaño de la partícula, así como su grado de degradación (*Capítulo 7*), poniendo de relevancia la idoneidad de trabajar con bibliotecas de espectros de referencia adecuadas, incluso propias.

Finalmente, en el <u>Capítulo 8</u> se recogen las conclusiones finales y las perspectivas futuras.

1.4 Otras cuestiones importantes del encuadre

Además de la necesidad de enmarcar el trabajo en un contexto vigente atendiendo a las lagunas de conocimiento en el área y aportarle un carácter innovador, existieron otras cuestiones clave en el encuadre de la tesis doctoral.

Así pues, en el planteamiento del trabajo experimental se adoptó un enfoque orientado al desarrollo de distintos protocolos o productos que allanaran el camino con el objetivo de solucionar el problema. En este sentido, a la hora de investigar sobre la abundancia de microplásticos en superficie y los métodos para ello, no bastó con recabar datos nuevos en una zona, sino que el trabajo se dio por culminado una vez se logró diseñar y testar un dispositivo de muestreo de microplásticos eficiente que sirviera para reportar datos a los instrumentos de gestión en vigor (Parte I).

La conversación entre la ciencia fundamental y la aplicada acompañaron en todo su proceso a este trabajo de investigación, en el que fructificaron aportes desde empresas del sector náutico y recreativo, fomentando a su vez la transferencia de conocimiento y su aplicación en sectores que comparten el medioconestecampodeestudio, comosonlas embarcaciones de turismo de avistamiento de cetáceos y turismo científico, con las que se realizaron ensayos de navegación con los distintos modelos precursores del muestreador de microplásticos. El **reto interdisciplinar,** fusionando los conocimientos de las Facultades de Ciencias del Mar y Veterinaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC) fue también un objetivo claro que se materializa en la <u>Parte II</u>, con el trabajo colaborativo para la creación de un protocolo de muestreo de microplásticos en cetáceos varados.

Por último, en la <u>Parte III</u> se aborda la necesidad de **trascender**, respondiendo a una serie de cuestiones sobre el análisis mediante espectroscopía en aras de la optimización de la identificación de la huella química de las partículas. y de **enriquecer** el análisis de los datos de microplásticos reportados.

Con todo, esta tesis recoge una serie de estudios llevados a cabo en una ventana de seis años de formación como investigadora marina. Uno de los propósitos vertebradores de este trabajo en todo este tiempo ha sido el de mantener activada la relevancia científica y social e impulsar la acción desde los distintos ámbitos de gestión, dirigiendo el esfuerzo investigador a **atajar las limitaciones y** la falta de armonización en el estudio de la contaminación por microplásticos, favoreciendo la monitorización en un escenario de dedicación exponencial por parte de la comunidad científica y ante una previsión nada halagüeña desde la mirada ambiental.



- CAPÍTULO 2-

2

Microplásticos: un problema ambiental de procedencia terrestre desembocando en un planeta inmensamente marino.

Resumen

Este capítulo comienza con una revisión histórica de las basuras marinas, conjunto de residuos compuesto principalmente por plásticos, que con el paso del tiempo y sujetos a las distintas condiciones ambientales terminan convirtiéndose en el objeto de estudio de esta tesis doctoral: la optimización de las técnicas de muestreo de los microplásticos.

Estudiados en infinitos ámbitos y desde distintas perspectivas, la presente revisión científica sitúa el estado del arte y las lagunas de conocimiento para las mejoras en los procedimientos metodológicos para la determinación de:

1) Los microplásticos en aguas superficiales marinas.

2) La ingesta de microplásticos en cetáceos.

2.1 Las basuras marinas haciendo historia

Una de las primeras menciones a las hoy en día llamadas basuras marinas se hizo en la novela de Julio Verne "20.000 leguas de viaje submarino" (1869). En ella se describe la acumulación en el Mar de los Sargazos de "cuerpos flotantes de todo origen, amontonados en medio de las hierbas oscuras, troncos de árboles [...], numerosos restos de naufragios, de quillas y carenas, tablones desgajados,...."

Un siglo después, Carpenter y Smitth (1972) demostraron la presencia de pequeñas partículas de plástico precisamente también en la superficie del Mar de los Sargazos, reportando una concentración aproximada de 3500 piezas/km² y haciendo ya alusión al previsible incremento de estas partículas en los océanos como consecuencia de la creciente producción de plásticos y el establecimiento del hábito de consumo de usar y tirar (Imagen 2.1).

A raíz de estas primeras citas de microplásticos, Rothstein (1973) amplió la información atestiguando la presencia de partículas similares a las halladas por Carpenter y Smith en un paíño boreal en Terranova, en una investigación que había sido llevada a cabo en 1962. En ella, mostraba su preocupación al indicar que "esta forma de contaminación y sus consecuencias están probablemente más extendidas, tanto temporal como geográficamente, de lo que sugieren los datos de Carpenter y Smith".

Seis años después, en 1968, se daría registro a la primera tortuga con plástico conocida, y así esta referencia, junto con algunas otras (Mrosovsky et al., 2009), fueron completando lo que hoy en día podemos decir que fueron los primeros signos de alerta sobre el grave problema ambiental de las basuras marinas.

Así pues, las basuras marinas comenzaron a investigarse por autores independientemente en distintas áreas oceánicas durante los años 70 y principio de los 80, y los resultados se pusieron por primera vez en conjunto en la Conferencia Internacional sobre el destino e impacto de las basuras marinas celebrada de Hawai en 1984 (NOAA, 1985). Los estudios vertidos en ella dirigían las principales evidencias de la problemática ambiental de las basuras marinas hacia dos impactos: (1) el enredamiento, por el que los bucles y aberturas de diversos tipos de residuos interfieren con los apéndices de los animales y/o los atrapan; y (2) la ingestión, por la que se ingieren intencionada o accidentalmente elementos de desecho que entran en el tracto digestivo. En su conjunto, la puesta en común de los conocimientos en la conferencia demostró que estas interacciones estaban mucho más extendidas y eran más comunes de lo que se pensaba, y que ambos tipos de impacto podían causar lesiones y la muerte de animales individuales de muchas especies diferentes. Consecuentemente. pronto después, comenzaron a desarrollarse estudios detallados sobre el tema. incluvendo revisiones sobre el estado del arte en cuanto a los efectos sobre las distintas formas biológicas (Laist, 1987) o el planteamiento de enfoques jurídicos de acción internacional (Lentz, 1987). A partir de entonces. los estudios sobre las basuras

marinas comenzaron a publicarse de manera continuada, tal y como se vio reflejado, entre otras, en el ritmo de publicación de artículos sobre esta temática en la popular revista Marine Pollution Bulletin (Borja and Elliott, 2019).

Tras una extensa recopilación de referencias por aquel entonces, Laist (1997) publicó el primer trabajo de revisión en el que se recoge información sobre la naturaleza y el alcance de esta recientemente descrita interacción entre las basuras marinas y la vida



marina. En él, se incluye una lista de todas las especies sabidas por entonces habían sufrido daños o bien por enredo o ingestión, revisando los factores, y describiendo los efectos. Esta lista, comprendía un registro total de 267 especies que habían sufrido daños por enredo con y/o ingestión de basuras marinas. Hoy en día, esta lista se ha visto incrementada no sólo en número. sino en cuanto a su variedad y naturaleza, abarcando los ámbitos social, económico y de seguridad pública, además del plano ambiental (PNUMA, 2021) (Tabla 2.1).

chance, we must suspect that the key to their evolution is a dissipative mecha-nism not present in the solar system today. It might have involved a viscous medium in the early solar nebula or the influence of a passing star. A study of evolutionary models with such alternate evolutionary models with such alternate mechanisms might provide useful clucs about conditions in the young solar

R. J. GREENBERG C. C. COUNSELMAN, III UNSELMAN, III I. I. SHAPIRO Department of Earth and Pla Sciences, Massachusetts Institu Technology, Cambridge 02139

Polystyrene Spherules in Coastal Waters

Abuttact. Polystyrene spherules averaging 0.5 millimiter in diameter (range 0.1 to 2 millimeters) are abundant in the coastal waters of southern New England. Two types are present, a crystalline (clear) form and a white, opaque form with pies mentation resulting from a diane nubber. The spherules have bacteria on their surfaces and contain polychlorinated biphenyls, apparently absorbed from ambient seeware, in a concentration of 5 parts per million. While, opaque spherules are selectively consumed by 8 species of this out of 14 species examined, and a chae-tognath. Ingestion of the plastic may lead to intestinal blockage in smaller fish.

comple, P. Goldneich, Mrm. Notic. 50, 50c, 139, 159 (1965). a discussion is given by R. J. Greet-ts, Massachusetts Institute of Tech-terather 1972. A complete discussion is given by R. J. Green-berg, thesis, Massachusetts Institute of Tech-nology (September 1972). D. Biouwer and G. Chentence, Methods of Celestial Mechanics (Acadomic Press, New of of the stability for of e, was described for rela-tribed by md E. C. of the Titanin the evolution of presents certs of in (2). Symposis Maters 1 Maters russed ... In Symposic tra-Alta Matematica, 1970), vol. 3, p. 75. gitude Whrates abo sciellites' acce 50 Universi-Universi-the con-e average modes ca range was not delin være collected with tows by using the Ni Sciences (NAS) refer diametor at the mot μ m) equipped with a highest concentratior the Niamic Bay area about 1 ajberule per samples taken on a february and May tions up to 14 m⁻² february and May tions up to 14 m⁻² february to March concentrations were chis area. At other s February to March concentrations were lished Sound (statio m⁻²; cast of Block Island Sound (statio m⁻²; cast of Block Using and and w Sound (stations 19 to Block Usiand and w Sound (stations 19 to Block Usiand and m Sound (

of 5 parts per millio not added in the ma styrene (2), it is source was ambient

selectively consumed by 8 species of tish tognath. Ingestion of the plastic may lee Polystycene spherules are widespread in the coastal waters of southern New England. We first observed spherical plastic particles in plankton tows in January 1971 while sampling to deter- mine the effects of a nuclear power sta- tion on the ecology of Nantie Bay (continuence Long Lindow South). The	out of 14 species examined, and a chae- ad to intestinal blockage in smaller fish. sediments since polystyrene is of a great- er density than seawater. The spherules are present in coastal waters from western Long Island Sound to Vincyard Sound (Table 1), and may be more widespread since their total			negative bacteria v incubation. An extra of the spherules fro fiexane showed it PCB's (Aroclor 125- of 5 parts per milli not added in the m styrene (2), it is source was ambien		
particles, although usually present in zooplankton samples throughout the	Table 1. Sample location, date, volume filtered, and concentration or coastal water. Stations 1 to 12 were in an area of about 10 km ² ; the <i>i</i> the spherode concentrations at these 12 stations are presented.					
until February 1972. The spherules are markedly different in size, shape, dis-	Station	Location	Dat (197	2) v	olumo ltored (m ⁵)	
from the plastics on the Sargasso Sea surface (<i>I</i>). Infrared appetrophotometry of the particles indicated that they were poly- asymptotic plastic. Two types are present in seawater, in approximately equal proportions. One is a cleant or crystal- line pulystyrene, and the other is a white, opaque form with pigmentation due to the presence of a diene rubber compound in the plastic, as indicated by infrared spectrophotometry and con- firmed by a representative of the plastics industry (2). Both forms are virtually parfect spheres and average about 0.5 mm in diameter, ranging from 0.1 to 2 mm. They contain various Airs and numbers of gascous voids. Thus, they are found at the sea surface, in the water colomn, and prevumably in the	1-12 1-12 1-12 1-12 1-12 1-12 1-12 1-12	41191N, 7210W 41198X, 7210W 41198X, 7210W 41198X, 7210W 41198X, 7210W 41198X, 7210W 41198X, 7210W 4119X, 7210W 4119X, 7019W 4119X, 7019W 4119X, 7019W 4119X, 7019W 4119X, 7119W 4119X, 71	 Andrew Parkensen, Standard Markensen, Standard Markensen,	any aty aty b b b b b b b b b b b b b b b b b b b	475 140 503 387 59 50 48 31 108 76 94 191 104 280 122 48 109 122 4109 125 151	
17 NOVEMBER 1972						

Imagen 2.1 Portada (izquierda) y página (derecha) de la revista Science del 17 de Noviembre de 1972, en la que Carpenter y Smith publicaron un artículo que representa la primera evidencia de la presencia de microplásticos en los océanos, en concreto en el Mar de los Sargazos.

Tabla 2.1: Listado de la repercusión de los impactos de las basuras marinas en distintos ámbitos, más allá del ambiental. Adaptación del contenido del Informe conjunto de la UNEP y la Comisión Intergubernamental Oceanográfica (Cheshire et al., 2009).

Medio Ambiente	 Enredos y pesca fantasma Ingestión (bloqueo intestinal, desnutrición y envenenamiento) Bloqueo de los mecanismos de alimentación por filtración de pequeñas partículas (neustónicas) de residuos plásticos Daño físico y asfixia de los arrecifes, hierbas marinas, manglares Potencial para vectorizar plagas marinas, incluidas las especies invasoras.

Social	 · Pérdida de la estética y/o del atractivo visual. · Pérdida de los valores autóctonos. · Antagonismo contra los contaminantes percibidos. · Riesgos percibidos o reales para la salud y la seguridad. 	
		/

Económico	 Coste para el turismo (pérdida de atractivo visual y obstrucción del uso de la playa) Coste para los operadores de embarcaciones (tiempo de inactividad y daños debidos a los enredos) Pérdidas para las operaciones de pesca y acuicultura debido a los daños o enredos. Costes de limpieza, operaciones de rescate de animales, recuperación y eliminación. 	

Seguridad Pública Riesgos para la navegación (la pérdida de potencia o de dirección en el mar puede poner en peligro la vida). Riesgos para los nadadores y buceadores (enredos) Cortes, abrasiones y lesiones por pinchazos de lixiviación de productos químicos venenosos. Riesgo de explosiones (las bombonas de gas llegan con frecuencia a la costa del norte de Australia, y el vertido de armamento militar es un problema en la costa irlandesa).

En respuesta al desafío global que las basuras marinas comenzaban a suponer, el Programa de Mares Regionales del Programa para el Medio Ambiente de las Naciones Unidas (PNUMA) y el Programa de Acción Mundial se embarcaron en 2003 en el desarrollo de una *Iniciativa Mundial sobre Basuras Marinas* (Cheshire et al., 2009). En ella, se definieron las basuras marinas englobando "cualquier sólido persistente de origen no natural (manufacturado) que haya sido desechado, depositado o abandonado en ambientes marinos y/o costeros". De acuerdo con esta organización, y no sin dificultad, se estimó que en el océano entraban cada año entre 6.4 y 8 millones de toneladas de basuras marinas (Jambeck et al., 2015; Jeftic et al., 2009).

Desde entonces, numerosas publicaciones respaldaron la constatación de las basuras marinas como una amenaza para los ecosistemas, tanto de agua dulce como marinos (Bouwman et al., 2016; Deudero and Alomar, 2015; Gall and Thompson, 2015; Poeta et al., 2016; Poeta and Romiti, 2015). Asimismo, se corroboró que estos materiales estaban ampliamente distribuidos por los océanos, en aguas abiertas y en zonas costeras (Andrades et al., 2016; Barnes et al., 2009; Cózar et al., 2014; Galgani et al., 2015; Pham et al., 2014). Además, también se detectaron enormes concentraciones de plásticos en los principales giros subtropicales de los hemisferios norte y sur de los océanos Atlántico y Pacífico, así como en el océano Índico (Barnes, 2004; Eriksen et al., 2014; Leichter, 2011).

En definitiva, las basuras marinas se convirtieron en un desafío global intersectorial que no reconocía fronteras geográficas ni políticas, donde sus impactos tanto ecológicos como socioeconómicos suponen una grave amenaza también para los medios de vida humanos afectando a hábitats, especies y ecosistemas; a la salud humana y la seguridad; y a sectores económicos tales como la pesca, el turismo y la navegación (GESAMP, 2015; Jeftic et al., 2009; STAP, 2011; Thompson et al., 2009; PNUMA, 2016), convirtiéndose en uno de los mayores problemas de contaminación a nivel mundial de la época actual (Veiga et al., 2016).

2.1.1 Fuentes de entrada de las basuras marinas al medio marino

Existen muchos factores y actividades que contribuyen a la acumulación de basuras marinas, incluidos la pesca, la navegación, el turismo y las actividades recreativas, así como las malas prácticas de gestión de residuos (Galgani et al., 2010; Hartley et al., 2015). En la Figura 2.1, se recogen algunas de las principales fuentes, si bien hay que tener en cuenta que éstas han ido cambiando con el paso de los años y los avances en las investigaciones sobre el tema (Ryan et al., 2009).

De acuerdo con Andrades et al. (2016), los primeros trabajos acerca de la composición y distribución de las basuras en el medio marino indicaban los pellets de plástico como uno de los elementos flotantes más abundantes en los mares, que a su vez eran peligrosamente ingeridos por la fauna marina (Carpenter et al., 1972; Carpenter and Smith, 1972; Kartar et al., 1973; Morris and Hamilton, 1974). Más tarde, mediante el estudio de los contenidos estomacales de aves marinas, como las pardelas, como vector para determinar la composición de las basuras marinas, Vlietstra y Parga (2002) desvelaron que en dos décadas (desde los 70 hasta finales del los 90) el tipo de basura ingerida por estos animales (principalmente plástico en todos los casos), había cambiado de los típicos pellets usados por la industria a utensilios de plástico y fragmentos de objetos más grandes, de uso doméstico. De hecho, de acuerdo con Ryan et al. (2009), los barcos de pasajeros y las labores de pesca habían sido la principal vía de entrada de basura marina al medio durante la mitad del pasado siglo, que posteriormente habría descendido gracias al control de estos vertidos a partir de la Convención para Prevención de la Contaminación generada por Buques, MARPOL (Anexo V) en 1988 (Ryan, 2015). Sin embargo, a pesar de la disminución, que no erradicación, de la entrada de basuras marinas desde los barcos, a día de hoy el problema ambiental continúa vigente, siendo actualmente indiscutible y mayoritaria la importancia de las entradas al medio marino desde fuentes terrestres (Andrady, 2011a; Galgani et al., 2015), con puntos calientes en zonas industrializadas o de mayor densidad de población (Derraik, 2002).

Los vertidos desde tierra se producen debido a múltiples factores, estando esta entrada muy influenciada por el régimen de lluvias y la proximidad a las desembocaduras de los ríos, entre otras, así como estrechamente relacionada con la densidad de población y la presencia de industrias, vertederos, y todo tipo de concentración de actividades antropogénicas (Simul Bhuyan et al., 2021). Se ha constatado, por ejemplo, que las cantidades de basuras marinas en algunas de las playas pueden aumentar un 40% en verano, debido al elevado número de turistas (Galgani et al., 2015). Curiosamente, se da la paradoja de que las zonas turísticas ven mermada su popularidad debido a su contaminación, que a su vez es producida por la propia actividad turística en el lugar, como es el caso de algunas playas de Bali (Suteja et al., 2021).

Dentro de las entradas desde tierra, a lo largo de la línea de costa cada vez cobra más importancia la llegada a la mar de basura a través de ríos, desde grandes corrientes a pequeños cursos de agua, estimándose que hasta el 80% de los residuos sólidos encontrados en algunas playas provendrían de los ríos cercanos (Christina Araújo and Costa, 2007; Rech et al., 2014). Son numerosos los estudios que hace años



Fig.2.1: Infografía elaborada por Vanessa Ortiz para el Informe "Basuras Marinas, plásticos y microplásticos: orígenes, impactos y consecuencias de una amenaza global", editado por Ecologistas en Acción en 2017.

sugirieron la importancia de estos cursos como fuente de contaminación de basuras en los mares (Claessens et al., 2011; Cole et al., 2011; Galgani et al., 2000; "RIMMEL (Riverine and Marine floating macro litter Monitoring and Modelling of Environmental Loading)," n.d.; Williams and Simmons, 1997). Una reciente estimación ciñe a 1000 el número de ríos responsables del 80% de las entradas de plástico al océano procedentes de estas fuentes de agua dulce (Meijer et al., 2021). También en forma de modelos, la estimación de residuos plásticos que entran desde los ríos resulta abrumadora: entre 1,15 y 2,41 millones de toneladas anuales, según un estudio de Lebreton et al. (2017), que localiza el 67% de los efluentes más importantes (n=20) en Asia.

Sin embargo, los lugares de la geografía que no presentan ríos no están exentos de basuras marinas, ejemplo que se materializa, entre otros, en el Archipiélago Canario (Baztan et al., 2014; Herrera et al., 2018, 2017), zona de estudio de esta tesis, pero también en numerosos ejemplos de islas remotas como las del Archipiélago Fernando de Noronha (Grillo and Mello, 2021) y la Isla de Trinidad (Andrades et al., 2018), en el Atlántico Sur, o las vecinas islas del Archipiélago de Azores (Pieper et al., 2019, 2019). Así pues, la presencia de basuras marinas en zonas costeras remotas, e incluso en zonas alejadas de zonas de producción, evidencian precisamente la influencia de la dinámica marina sobre la distribución de las mismas, moviéndose y acumulándose a lo largo y ancho de todo el planeta. En este sentido, se han identificado varios factores como el viento, las mareas y las corrientes oceánicas como agentes que contribuyen a

la dispersión de plásticos después su entrada al medio marino (Aliani and Molcard, 2003; Critchell and Lambrechts, 2016; Maximenko et al., 2012).

Las entradas de basuras marinas desde los propios océanos, si bien representan un porcentaje menor que las entradas desde tierra, están también ligadas a la actividad humana, fundamentalmente a través del transporte de mercancías y la pesca industrial. Mención especial merece la pesca fantasma: el abandono o pérdida de aparejos (redes, líneas, boyas, etc.) que viajan a la deriva en los océanos atrapando accidentalmente numerosos organismos y dañando hábitats bentónicos (Good et al., 2010; Pawson, 2003). Según el PNUMA, cada año se pierden en los océanos unas 640.000 toneladas de aparejos, que corresponden a un 10% de las basuras marinas ("Abandoned, lost or otherwise discarded fishing gear," n.d.).

2.1.2 La ubicuidad de un problema ambiental global

La ubicuidad de las basuras marinas, y la contaminación asociada por plásticos y microplásticos es, lamentablemente, una cuestión argumentada y respaldada por una gran cantidad de estudios (Duis and Coors, 2016; GESAMP, 2015; Thompson, 2015). Este tipo de contaminación, ha sido reportada en todo el mundo (Barnes et al., 2009; Cózar et al., 2014), y en todos los entornos ambientales desde los polos hasta el ecuador. Si bien en los inicios las basuras de mayor tamaño al principio se detectaron principalmente en costa (Gabrielides et al., 1991; Galganietal., 2000), en los últimos años las investigaciones sobre basuras marinas flotantes en mar abierto (Suaria and Aliani, 2014), así como las depositadas en los fondos han crecido exponencialmente. De hecho, se han encontrado grandes concentraciones de basuras en cañones submarinos (Pham et al., 2014) o incluso bajo el hielo, en el Mar de Barents y en el estrecho de Fram, en el Ártico (Bergmann et al., 2017, 2016; Bergmann and Klages, 2012).

La cantidad de estudios realizados y publicados sobre esta temática no ha dejado de aumentar desde los primeros hallazgos a finales de los años 60, sin embargo, la falta de estandarización limita gravemente la posibilidad de realizar estimaciones cuantitativas intercomparables geográficamente o incluso temporalmente. A su vez, con respecto a la cobertura geográfica, el hemisferio sur y las áreas remotas están particularmente росо estudiadas y, a pesar de que los océanos son los compartimentos donde se acumula la mayor parte del plástico (Barnes et al., 2009; Ryan et al., 2009), son relativamente pocos los estudios que se centran específicamente en el medio ambiente marino respecto a los desarrollados en las costas debido a las dificultades inherentes del muestreo de aguas oceánicas.

2.1.3 Las basuras marinas como descriptor del Buen Estado Ambiental

El aumento de las basuras marinas en los océanos y la exposición a ellas llevan ahora décadas señalando la necesidad de tomar serias medidas al respecto, y numerosos programas, comités, convenciones y reglamentos a nivel mundial han prestado atención a esta problemática. A nivel europeo se han dado algunos pasos para la identificación, cuantificación y para la propuesta de medidas para paliar este problema. La directiva más importante en vigor actualmente para la protección del medio marino es la Directiva Marco de Estrategia Marina (DMEM) (Directiva 2008/56/CE), la cual establece un marco para que cada Estado Miembro ponga en marcha acciones para alcanzar el Buen Estado Ambiental (BEA) en el medio marino.

La DMEM define 11 Descriptores, que representan conjuntamente el estado y funcionamiento del medio marino (Borja et al., 2010). El Descriptor 10 está exclusivamente dedicado a las basuras marinas, dando idea de la relevancia del problema. Este descriptor se centra en las cantidades, tendencias, fuentes y composición de estos objetos, como método para determinar su efecto sobre el medio ambiente marino, en referencia tanto a daños ecológicos como a económicos y/o sociales.

Basándose en una evaluación de lo que podría definirse como BEA, la Comisión Europea identifica cuatro indicadores diferentes para el Descriptor 10:

- La evolución de la cantidad de basura arrastrada por las olas y/o depositada en las costas;
- 2. Las tendencias en la cantidad de basura en la columna de agua;
- Las tendencias en la cantidad, distribución y, cuando sea posible, la composición de micropartículas;

 Las tendencias en la cantidad y composición de los desechos ingeridos por los animales marinos (Comisión Europea, 2010).

Además, bajo el paraguas de la DMEM, se estableció un Subgrupo Técnico sobre Basura Marina (TSGML) para evaluar a los Estados miembros y apoyarlos en su implementación. Entre las recomendaciones de este grupo, se destacan como tareas a seguir la necesidad de armonizar los datos y la demanda de más estudios para allanar el camino a una mejor evaluación de la abundancia y distribución de estos contaminantes en aguas oceánicas.

Muchos expertos y expertas en el campo están de acuerdo en que, aunque los impactos de este empeoramiento del problema pueden ser difíciles de estudiar, existe evidencia suficiente de que un número cada vez mayor de especies se ven afectadas por la basura marina con múltiples consecuencias (Egbeocha et al., 2018; Guzzetti et al., 2018; Werner et al., 2016).

2.2 Plásticos: principal componente de las basuras marinas

Por definición, las basuras marinas incluyen distintos materiales tales como vidrio, papel, cartón, metal, tela, residuos relacionados con la pesca, municiones, madera, filtros de cigarrillos, residuos sanitarios provenientes de aguas residuales, cuerdas, juguetes, etc. Sin embargo cada vez son más los estudios que le otorgan al plástico un porcentaje predominante, por encima del 80% de la composición de las basuras marinas.

De acuerdo con investigaciones realizados en distintas zonas del mundo, los plásticos representan la mayor parte de las basuras marinas. Algunos ejemplos de estos porcentajes mayoritarios son el 68% del total de la basura encontrada en playas de California (Rosevelt et al., 2013), un 77% en playas de Taiwan (Liu et al., 2013), un 86% en Chile (Thiel et al., 2013), y un 91% en el sur del Mar Negro (Topçu et al., 2013).

Deudero y Alomar (2015), realizaron una revisión de la influencia de las basuras marinas sobre la biodiversidad en el Mar Mediterráneo, encontrando un notable incremento de la presencia de plásticos en el porcentaje total de las basuras marinas registradas con el paso de los años. Así, los primeros informes sobre basuras marinas flotantes en la zona reportaron un 65% de desechos marinos de plástico en 1979, pasando este valor a abarcar hasta un 83% en 1997 (Fig. 2.2). Por otro lado, los primeros estudios sobre el plástico del fondo marino se llevaron a cabo en 1993, reportando también una predominancia (77%) de artículos de plástico. En el mismo estudio, las autoras advierten que, si bien los organismos marinos se han adaptado a las fluctuaciones de las condiciones ambientales (temperatura, pH, salinidad, CO2, carbonatos, etc.) y sus mecanismos fisiológicos han evolucionado para hacer



Fig.2.2: Adaptación de figura de Deudero y Alomar (2015) en la que se muestran los datos por aquel entonces disponibles de elementos de plástico (%) hallados en zonas marinas del fondo (en negro) y de superficie (en gris) a partir de una revisión de los estudios realizados en el Mar Mediterráneo.

frente a los cambios que se producen a través del tiempo geológico, en el caso de los plásticos los ritmos no juegan a favor del desarrollo evolutivo de las especies. Se trata de sustancias nuevas, duraderas en la naturaleza, que sólo han estado presentes durante menos de 100 años, por lo que aún no se han producido las respuestas de adaptación de los organismos, poniendo por tanto las diferentes formas de vida en peligro.

2.2.1 Algunos datos sobre la producción de plástico

En 1907, el belga ganador del Premio Nobel en Química Leo Hendrick Baekeland (1863-1944) creó la primera sustancia de plástico sintética, la baquelita. No fue hasta medio siglo después, en los años cincuenta, que estas fibras sintéticas comenzaron a producirse masivamente (Derraik, 2002), y desde entonces la producción de plástico, material versátil por excelencia, ha ido creciendo exponencialmente, con un incremento aproximado de un 5% anual hasta 2009, tendencia mantenida a lo largo de los veinte años anteriores (Andrady and Neal, 2009). Ya entonces se preveía un aumento en la producción de plástico considerable, que una década después se materializó en los 369 millones de toneladas producidos en el año 2019 (Plastics Europe, 2021).

Bajo el paraguas de la palabra "plástico" se engloban un grupo de componentes artificiales o de fibras sintéticas de diversidad de tamaños, texturas y colores: desde textiles como los forros polares de poliéster, hasta material quirúrgico, pasando por todo tipo de piezas para aparatos electrónicos e industriales, material agrícola, enseres y, por descontado, envases. Hoy en día es difícil encontrar un producto que no contenga plástico y se ha estimado que



Porcentajes del consumo de plástico por tipo de polímero (2002-2014)

Fig.2.3: Adaptación del recurso de la UNEP (2021): *Drowning in Plastics Marine Litter and Plastic Waste Vital Graphics*, en la que se muestran los porcentajes del consumo de plástico por tipo de polímeto, destancando el peso de los envases destinados a un sólo uso como las bolsas o botellas de plástico.

el 50% de los productos plásticos que se fabrican están destinados a ser de un solo uso (Hopewell et al., 2009), confirmando a su vez que el envasado de bienes de consumo es el principal responsable de los residuos de plástico, sin desestimar la importancia de los plásticos del sector de la construcción o de la electrónica y la industria automovilística, que representan entre el 20 y el 15% de la demanda europea de plástico respectivamente (Plastics Europe, 2022) (Fig. 2.3).

En 2016 el PNUMA hacía una previsión para la producción mundial de plástico que, de mantenerse la tendencia de producción y demanda de aquel entonces, alcanzaría los 2.000 millones de toneladas en 2050 (PNUMA, 2016). Afortunadamente, como se aprecia en la Figura 2.4, las cifras no han seguido creciendo exponencialmente, registrándose incluso una bajada de la producción mundial en el 2019 debido a la pandemia del coronavirus Covid-19 ("Coronavirus disease (COVID-19) – World Health Organization," n.d.; Plastics Europe, 2022). No obstante, el aumento de la producción está ligado al constante crecimiento de la demanda y, a pesar de las extraordinarias circunstancias, se mantuvo en los 49 millones de toneladas en Europa en 2021, representando un 14% de la producción global.

La combinación de estas cifras con la elevada durabilidad del material y los bajos porcentajesdereciclajeoreaprovechamiento del mismo han dado como resultado una acumulación de desechos de plástico por todo el planeta, incluso en lugares muy alejados de los núcleos de origen (Barnes et al., 2010; Bergmann and Klages, 2012).En concreto, en 2020 se produjeron en Europa 55 millones de toneladas de plástico, de las cuales se lograron recuperar 29.5 para el ciclo post-consumo. De éstas, 10 millones de toneladas fueron recicladas, un 18% de la producción (Plastics Europe, 2021). Sin embargo, aún son muy elevadas las cifras de las derivaciones a vertedero (12.4

- CAPÍTULO 2 -



Datos estimados - Flgura adaptada de Plastics Europe (2021).

Fig.2.4: Evolución de la producción de plásticos en el mundo y en Europa, en la que se aprecia una sutil disminución de la producción global en el 2019 debido a la pandemia del coronavirus Covid-19. Figura adaptada de Plastics Europe (2022).

millones de toneladas) y la incineración o aprovechamiento energético (6.9 millones de toneladas). Completando la imagen del flujo post-consumo de los plásticos, las entradas de plásticos a los océanos rondan entre 9-14 o 19-23 millones de toneladas según distintas estimaciones recogidas en el último informe del PNUMA(2021).

2.2.2 Tipos de plástico y procesos de degradación

Los plásticos son polímeros procedentes del petróleo combinados con otras sustancias, diferentes aditivos, que son los que le confieren las propiedades deseadas en cuanto a su textura, resistencia a la temperatura, maleabilidad, estabilidad, brillo, etc. (Rochman, 2015). Las diferentes combinaciones posibles de estos compuestos y aditivos dan lugar a multitud de variaciones posibles y, en definitiva, multitud de tipos de plástico. Los nombres completos de los materiales de plástico convencionales son complejos debido precisamente a su formulación química, de forma que es usual referirlos con acrónimos. Los polímeros más usados y más abundantes son el polietileno de alta densidad, polietileno de baja densidad, policloruro de vinilo, poliestireno, polipropileno y polietileno tereftalato (HDPE, LDPE, PVC, PS, PP y PET, respectivamente, según sus siglas en inglés), constituyendo entre ellos el 90% de la producción de plástico a escala global (Andrady and Neal, 2009) (Fig. 2.5).

Además de la composición, a menudo se clasifican también los tipos de plástico en función de la degradación que experimentan. En ese sentido,

- CAPÍTULO 2 -



Fig.2.5: Seis de los polímeros de plástico más extendidos y algunos de los productos más característicos propios del material. Adaptación del recurso de la UNEP (2021): *Drowning in Plastics Marine Litter and Plastic Waste Vital Graphics*.

sólo usc

podemos encontrar plásticos clasificados como convencionales, oxo-degradables y bioplásticos. A menudo, la composición básica de los tres tipos es la misma, si bien a los llamados oxo- o biodegradables se les añaden otros compuestos que aceleran la degradación o grasas vegetales que lo que hacen es reducir el tiempo de permanencia en el medio (Derraik, 2002; O'Brine and Thompson, 2010; Thompson et al., 2004)

A menudo, la degradación de estos plásticos biodegradables está sujeta a una serie de condiciones que no se dan en el medio marino (GESAMP, 2015). Por esta razón, tanto unos como los otros pueden ser una fuente de entrada de macro y microplásticos al medio ambiente, especialmente cuando no son desechados correctamente y son expuestos a las condiciones biológicas, químicas y físicas que los deterioran y fragmentan (Arthur et al., 2009). Para más detalle, los plásticos bio-derivados representan además otro tipo de problemáticas socio-ambientales como puede ser la competición por el suelo fértil destinado a la producción de bioplásticos en vez de alimentos (Sekiguchi et al., 2011).

En última instancia, la velocidad de la degradación de los plásticos depende a su vez de los factores a los que se expongan, y por ende al compartimento ambiental en el que se encuentren. Factores como la radiación ultravioleta (UV), la temperatura o el tipo de polímero empleado, actúan de forma imperturbable en el proceso de degradación de estos materiales (Ali et al., 2021; Andrady et al., 2003). En concreto, el frío, los bajos niveles de oxígeno, menos disponibilidad de luz y menor cantidad de organismos vivos son cuatro factores determinantes que influyen en los procesos de degradación negativamente, siendo especialmente importantes en los ambientes marinos, donde no juegan a su favor (Booth et al., 2017), especialmente en los fondos oceánicos, donde los niveles de oxígeno y la temperatura son menores y en ausencia de radiación solar, los procesos de degradación son extremadamente lentos (GESAMP, 2015).

Las playas, dadas las condiciones que reúnen para que se den procesos de degradación física, como la incidencia de rayos ultravioleta y mayor temperatura y disponibilidad de oxígeno que en el mar, son entornos más favorables para la

degradación de los plásticos (Barnes et al., 2009; Corcoran et al., 2009), aunque, aun así, menos que tierra adentro. Ya en 1987, Gregory (1987) demostró que el porcentaje de pellets degradados aumentaba a medida que nos alejamos de la orilla, por estar éstos más expuestos a la radiación UV que aquellos más cercanos al contacto con el agua. No obstante, en los años 70, el mismo autor, junto con otros, había llegado a afirmar que los plásticos desaparecían totalmente mediante procesos de fotodegradación v oxidación (Cundell, 1974; Scott, 1972), asumiendo que estos materiales se desintegraban por completo, reduciéndose a un polvo que se absorbía rápidamente en el ambiente (Gregory, 1983)

Más adelante, como bien conocemos hoy día, se probaría que lo que estaba ocurriendo era una degradación a partículas y fibras microscópicas (Thompson et al., 2004), que los plásticos pierden resistencia y se fragmentan en partículas sin sufrir necesariamente una alteración de su composición química. Es decir, que el plástico degradado sigue siendo eminentemente plástico, si bien más pequeño. Es más, el descubrimiento de las islas de plástico que se estaban formando en los giros oceánicos (Law et al., 2010; Moore et al., 2001) demostraba que estas partículas seguían presentes en el medio marino.

En definitiva, y a pesar de que los plásticos existen desde hace poco más de un siglo, se trata, hoy en día, de una de las amenazas más persistentes en el medio ambiente marino (Hopewell et al., 2009). A medida que pasa el tiempo, dada la lentitud de los procesos de degradación y sumado este hecho al incesante ritmo de producción, hace que incluso se llegara a afirmar que todo el plástico producido, salvo aquel que ha sido incinerado, permanece hoy en día en el medio ambiente sin haberse mineralizado (Thompson, 2015). Afortunadamente, las investigaciones en el campo del aprovechamiento, reciclaje y biodegradación de este material también están en auge desde entonces. No obstante, estos hechos hacen inevitable que se le dedique una especial atención a estas pequeñas partículas, los microplásticos.

2.3 Una atención especial a los microplásticos

Los microplásticos son pequeñas partículas de plástico, citados por primera vez a principio de los años 70 en la literatura científica (Carpenter and Smith, 1972). A pesar de que hay evidencias de su presencia en estómagos de aves desde los años 60 (Rothstein, 1973), no fue hasta unos años después que este nombre comenzó a emplearse (Ryan and Moloney, 1990), y no fue hasta décadas más tarde que alcanzaron mayorrelevancia gracias a las investigaciones de Thompson et al. (2004). Desde entonces, tanto la investigación sobre estas partículas como su concentración en el medio marino no ha cesado de crecer, y existen citas de presencia de microplásticos en todo tipo de ambientes, incluso los considerados como más vírgenes o alejados de las fuentes de producción de estos materiales como el hielo del Ártico (Bergmann et al., 2017; Obbard et al., 2014), desde los ecosistemas más oscuros de las profundidades oceánicas (Jamieson et al., 2019; Peng et al., 2020; Pham et al., 2014; Van Cauwenberghe et al., 2013; Woodall et al., 2014), hasta lo más remoto de algunos lagos de montaña (Allen et al., 2019; Free et al., 2014), pasando por muchos otros lugares, incluso inesperados, como el propio aire que respiramos (Dris et al., 2016; Gasperi et al., 2018). La lista es interminable, y prueba de ello son las infinitas publicaciones reportando la presencia de estas partículas a lo largo y ancho del globo.

Se puede afirmar, además, que estas micropartículas han entrado en la cadena trófica marina (Farrell and Nelson, 2013; Setälä et al., 2014) y, según Andrady y Neal (2009), en una publicación firmada precisamente en colaboración con *PlasticsEurope*, una de las principales asociaciones comerciales del plástico a nivel europeo, la concentración de microplásticos en el medio marino continuará aumentando, llevando a una acumulación gradual y significativa en el litoral y medio ambiente marino.

De manera genérica, los microplásticos comprenden todas aquellas partículas de plástico con un tamaño inferior a 5 mm (Arthur et al., 2009; GESAMP, 2015); si bien hay autores que aplican la misma norma a partículas <2mm, de <1 mm, o incluso de <500 μ m (Cole et al., 2011). Andrady (2011b) apuntó la necesidad de emplear tres términos diferentes para tres rangos de tamaño por debajo de los 5 mm en función de las distintas características físicas y los impactos biológicos que éstos ocasionan: mesoplásticos (500 μ m – 5 mm),



Fig.2.6: Figura del artículo de Da Costa et al. (2016), en el que se recogen y comparan los distintos rangos de tamaños y las definiciones de las partículas de pástico según las propuestas de diferentes autores (Rocha-Santos y Duarte 2015, Hartmann et al. 2015, Browne et al. 2007, Ryan et al. 2009, EUCommision 2011, Claessens et al. 2013, Desforges et al. 2014).

microplásticos (50-500 µm) y nanoplásticos (<50 µm). A medida que las investigaciones sobre los impactos de los diferentes rangos de tamaños de estas partículas se siguieron sucediendo, las clasificaciones se fueron adaptando, tal y como ya reflejaban da Costa et al. (2016) (Fig. 2.6).

2.3.1 Microplásticos primarios y secundarios

Se denominan microplásticos primarios aquellos que va son manufacturados tamaño con un microscópico (Cole et al., 2011; Zitko and Hanlon, 1991). Entre ellos, destacan las microesferas (<500 µm) contenidas en distintos productos como cosméticos, o las mezclas utilizadas para el arenado o granallado (Gregory, 1996; Zitko and Hanlon, 1991) y los microplásticos empleados como vectores de medicamentos (Patel et al., 2009), así como los empleados para la impresión en 3D de forma más reciente. Estas micropartículas suponen un grave problema ambiental al incorporarse tras su uso a la red de alcantarillado, sorteando los sistemas de saneamiento y desembocando en los mares y océanos. Por otro lado, los pellets, partículas de plástico de 2-5 mm, precursores de materiales plásticos de mayor tamaño, representan por sí mismos una importante entrada de plástico en los océanos debido a derrames accidentales en el transporte o manipulación (Gregory, 1978). Suelen predominantemente estar compuestos por polímeros como el polietileno y el polipropileno (Endo et al., 2005; Ogata et al., 2009) y, aunque su concentración suele ser mayor en zonas cercanas a áreas urbanas e industriales, como es el caso de las rieras de

pellets en Tarragona (Good Karma Projects [@goodkarma_org], 2022), también se encuentran importantes acumulaciones en numerosas playas del Pacífico e islas remotas como Fiji o playas de Nueva Zelanda (Gregory, 1999), cuyo origen está vinculado al transporte marítimo (Sewwandi et al., 2022).

En definitiva, estos *pellets* conforman una parte importante de las basuras marinas que llegan a costa, como hace más de una década ya se constataba en las playas de Carolina del Norte (Viehman et al., 2011) y numerosas playas y llanuras intermareales de Brasil (Costa et al., 2011), así como aquí mismo en las Islas Canarias (Baztan et al., 2014; Herrera et al., 2018).

Por otro lado, los microplásticos secundarios son aquellos productos de plástico de mayor tamaño que, una vez manufacturados, bien en la superficie del mar, en las playas o en otros ambientes, están expuestos a condiciones externas como la radiación solar (UV), entre otras, que causarán la degradación de los mismos (Andrady, 2011a), tal y como se explicaba más en detalle en el apartado anterior. Esta degradación, que puede ser de muchos tipos en función de la causa que la genere, lleva asociada la decoloración de los plásticos, el desarrollo de erosiones varias en su superficie y un aumento de su fragilidad.

Las primeras fases de degradación de los plásticos se han estudiado con más detalle (Andrady, 2011a; Wang et al., 2016), sin embargo, para conocer lo que ocurre en sucesivas etapas, aún quedan factores pendientes de estudio como los efectos de otras variables como la presión hidrostática (para el caso de los plásticos en los fondos marinos), o la temperatura, niveles de oxígeno y salinidad. En cualquier caso, la fragmentación de plásticos de mayor tamaño constituye una fuente adicional de entrada de microplásticos, y nanoplásticos, al medio (Eerkes-Medrano et al., 2015), bien tenga lugar antes de ser desechados en el medio ambiente (Browne et al., 2011), como es el caso de la fragmentación de las fibras sintéticas al lavar la ropa, o bien la que ocurre una vez estos plásticos de mayor tamaño ya forman parte del medio ambiente y son degradados por diferentes procesos químicos, biológicos y físicos (Tosin et al., 2012). Según un estudio de Browne et al. (2011), en un solo lavado de prendas sintéticas se pueden liberar más de 1900 fibras de microplásticos, que llegarían a los océanos a través de los efluentes de aguas residuales. Hoy en día, ya son numerosas las publicaciones documentando la presencia y estudiando las vías de eliminación de estas fibras sintéticas en las plantas de tratamiento (Murphy et al., 2016; Šaravanja et al., 2022; Simon et al., n.d.).

2.4 Microplásticos en aguas superficiales oceánicas

2.4.1 Distribución general

Conocer la cantidad de microplásticos flotando en las superficies oceánicas es una cuestión difícil de abordar, pero ha habido algunos intentos y estimaciones. Un estudio de Cózar et al. (2014) valoró que existen entre 7.000 y 35.000 toneladas de plástico flotando en los océanos. Otro estudio del mismo año afirma que la estimación de 5 trilllones de piezas de plástico suman además en total más de 250.000 toneladas (Eriksen et al., 2014). A menor escala, la mayor parte de las masas de agua han sido estudiadas de manera más local, siendo más deficitarias en cuanto a estudios las regiones polares, y el Océano Índico (Lusher, 2015).

Una vez entran en el medio ambiente marino, los microplásticos persisten en él, estando su distribución ligada a las interacciones de estos materiales con las condiciones oceanográficas y ambientales (Eriksen et al., 2013). Entre estas se encuentran las corrientes oceánicas, el transporte generado por el viento y los procesos de mezcla vertical y horizontal derivados del mismo (Kukulka et al., 2012), o la formación de capas de biofilm (Oberbeckmann et al., 2015; Tu et al., 2020). Por otro lado, las características físicas v químicas propias debidas a la composición del propio material afectan también a la distribución de estas partículas en el medio acuático (Murray and Cowie, 2011). De esta forma, los plásticos compuestos por polímeros más ligeros permanecerán en la columna de agua o en las aguas superficiales, mientras que los plásticos de mayor densidad, o aquellos colonizados por organismos marinos, se hunden hacia los fondos marinos (Engler, 2012).

La fragmentación y el estado de degradación de las partículas son factores que también influyen en su distribución. Por esta razón, es útil y necesario conocer las fuentes de entrada de los plásticos al océano y la temporalidad, de manera que se pueda estimar el grado de su degradación según el tiempo que lleven en el sistema. De la misma forma, es también interesante conocer las concentraciones de plástico en las playas, pues los artículos más grandes, mediante su degradación, suponen una entrada de microplásticos al sistema oceánico.

Tal y como ha sido demostrado por numerosos estudios de modelado, una vez los microplásticos entran en la circulación oceánica, tenderán a acumularse en las regiones propias de los giros oceánicos y las zonas de convergencia (Law et al., 2010; Sebille et al., 2012). Estos giros se dan en todos los océanos del planeta, de forma que la acumulación de microplásticos se da a escala global y ha sido bien documentada a lo largo de las últimas cuatro décadas. En consecuencia, pueden encontrarse suspendidos en la columna de agua (Lattin et al., 2004), en aguas superficiales (Cózar et al., 2014), estuarios (Sadri and Thompson, 2014), ríos (van Wijnen et al., 2019), además de en playas y sedimentos profundos, tal y como se mencionó anteriormente y se desarrolla con un poco más de detalle en los apartados a continuación.

2.4.2 Distribución en las distintas cuencas oceánicas

En 2014 se publicó el primer estudio comparativo de la distribución de plástico flotante de todos los tamaños entre las distintas cuencas oceánicas. Este estudio, publicado por Eriksen et al. (2014), comprende los datos de 1751 estaciones de muestreo, recorridas en un total de 24 expediciones realizadas entre los años 2007 y 2013 en los giros oceánicos (Pacífico Norte y Sur, Atlántico Norte y Sur, Índico), el Mar Mediterráneo, el Golfo de Bengala y las aguas costeras de Australia. En todas ellas se encontraron macro o microplásticos, con una tendencia mayor en zonas de convergencia, pero con porcentajes de abundancia similares entre el hemisferio norte y en el sur, donde tanto la producción de plástico, como su consumo o la densidad de población es menor.

Los estudios sobre la distribución de plásticos en el Océano Pacífico son abundantes, y en especial sobre la acumulación más famosa de todas, la llamada "Gran Isla de Basura" que contiene el Giro Central del Pacífico Norte (GCPN) (Greenly et al., 2021; Kaiser et al., 1996). Los resultados indican que la concentración de microplásticos en el GCPN incrementa a un ritmo de un orden de magnitud cada veinte años (Goldstein et al., 2012). En el Pacífico Sur, los estudios se centran principalmente también en torno al giro oceánico, donde se ha registrado un incremento de partículas a medida que nos adentramos en el mismo (Eriksen et al., 2014). Los sistemas costeros de esta cuenca también se ven afectados. influenciados además por los patrones de afloramiento de nutrientes profundos (Doyle et al., 2011a) y las condiciones meteorológicas locales (Lattin et al., 2004; Moore et al., 2001). Al igual que en el resto del planeta, los microplásticos son más abundantes en zonas costeras próximas a núcleos urbanos, desde dónde se incorporan a las corrientes oceánicas (Reisser et al., 2013; Ryan, 2013).

De manera análoga al caso de la cuenca anterior, en el Océano Atlántico la "sopa de plástico" más característica es la del Mar de los Sargazos, conocida, como advertíamos al comienzo de este capítulo, desde hace ya más de medio siglo. En esta cuenca son más las investigaciones con un mayor carácter de monitorización a largo plazo (Lusher, 2015), y son además numerosos los puntos calientes de acumulación de macro y microplásticos vinculados a zonas más antropizadas (Barnes et al., 2009), así como las zonas de menor energía hidrodinámica como los puertos de Bélgica (Claessens et al., 2011) , y allí donde los fondos oceánicos son más llanos (Galgani et al., 2000).

Las basuras marinas son también una problemática tangible en el **Mar Mediterráneo**, donde incluso los niveles de concentración de partículas reportados son, a juicio de los autores, comparables a los de las grandes zonas de acumulación de los giros oceánicos (Collignon et al., 2012; Cózar et al., 2015). De manera similar al resto de los casos citados, la distribución de estas partículas está claramente influenciada por las corrientes oceánicas, los vientos predominantes, y las zonas de soco, siendo por ello un ejemplo de acumulación de microplásticos la laguna de Venecia (Vianello et al., 2013).

Ladistribuciónyabundanciadebasuras de plástico en el **Océano Índico** comenzó a estudiarse a partir de los datos obtenidos del "International Pellet Watch" (Ogata et al., 2009; Takada, 2006), pero con escasa información acerca del resto de fragmentos, tanto macro como microplásticos. A día de hoy ya son también numerosos los estudios sobre microplásticos también en esta zona (Vaid et al., 2021), destacando aquellos relacionados con eventos que incrementan los flujos de este tipo de contaminación, como las inundaciones o los monzones (Bakaraki Turan et al., 2021). Sin duda, se trata de una cuenca de enorme interés para el estudio, dado que, además de ser India un enorme consumidor de plástico a nivel mundial, también alberga en su territorio numerosos vertederos a cielo abierto que provocan contaminación directa tanto por flujos incontrolados de material, a menudo importados de otros países, como por contaminación de las aguas superficiales (Veerasingam et al., 2020).

En Los Polos, a raíz de las investigaciones sobre el calentamiento global y el deshielo, se han registrado evidencias de la presencia de microplásticos en testigos de hielo de regiones remotas en el Océano Ártico (Obbard et al., 2014), en superficie (Reisser et al., 2013) y en las profundidades (Taylor et al., 2016). También en la Antártida, los primeros registros fueron exclusivos de macroplásticos a la deriva (Barnes et al., 2010), sin embargo ya hay citas también de microplásticos tanto en las aguas superficiales (Cincinelli et al., 2017; Waller et al., 2017) como en el hielo (Kelly et al., 2020). Incluso llama la atención un estudio de modelado que sugiere la formación de una sexta isla de plástico en el Mar de Barents (Sebille et al., 2012).

Tras este breve pero a su vez abundado recorrido por las aguas superficiales del planeta, parece indudable que no existe superficie en el medio marino que se libre hoy en día de la presencia de estas pequeñas partículas.

2.4.3 Lagunas de conocimiento

La ubicuidad de las basuras marinas -y en concreto de los plásticos (macro y microplásticos)- en los diferentes compartimentos acuáticos es bien conocida y está documentada profusamente (Moreira et al., 2016; Thompson, 2015). Tal y como se acaba de recoger en el apartado anterior, hoy en día se han encontrado plásticos en casi todos los hábitats acuáticos del planeta, desde el océano abierto, ríos, mares, aguas superficiales y también en la columna de agua e incluso los sedimentos, tanto playas como profundos (Lusher, 2015).

Conocer la distribución У cuantificación de los microplásticos, dado su tamaño en comparación con los mares, es complejo y presenta numerosos inconvenientes (Cole et al., 2011). Por un lado, existen múltiples formas de entrada de estas partículas a los océanos que, al no estar datadas, imposibilitan el cálculo del tiempo de degradación de las mismas (Ryan et al., 2009). Además, la combinación de las corrientes y las variaciones estacionales en los océanos hace que sea aún más difícil abordar una distribución temporal y espacial para estas diminutas partículas (Doyle et al., 2011b). Todo ello, junto con las dificultades añadidas de muestreo y extracción de estos microplásticos, así como la variedad de técnicas empleadas para su cuantificación hasta el momento, hace que conocer la abundancia de estos materiales y su distribución resulte una tarea muy compleja, cuestión vertebradora que motiva

la primera parte de esta tesis doctoral. Los resultados de los estudios proporcionan datos que a menudo no se pueden comparar entre ellos, de forma que es incuestionable la necesidad de estandarización de los métodos de muestreo y las técnicas de extracción y cuantificación de microplásticos (Hidalgo-Ruz et al., 2012; Van Cauwenberghe et al., 2015).

A su vez, la monitorización de esta contaminación contempla un reto adicional en cuanto a las necesidades de recogida de muestras suficientes a nivel tanto espacial como temporal, así como la disponibilidad de medios (embarcaciones) y recursos humanos. En este sentido, la ciencia ciudadana es una herramienta que, aprovechando el interés del público por el impacto del plástico en el medio ambiente marino ("Attitudes of Europeans towards the environment - Publications Office of the EU," n.d.), involucra la sociedad para que, en colaboración con equipos científicos, proporcione muestras fiables y datos precisos, con beneficios tanto para la ciencia, como para la sociedad en general (Zettler et al., 2017). Todo ello precisa igualmente de la garantía y estandarización de los métodos y el control de calidad para que las muestras y los datos puedan ser comparados y utilizados legítimamente en investigaciones revisadas por pares.

Así pues, la combinación de estas lagunas de conocimiento fue el origen del trabajo que se desarrolla en los capítulos 3, 4 y 5 de la presente tesis.

2.5 Microplásticos afectando distintas formas de vida marina

2.5.1 Affecciones a la biota

Las afecciones de las basuras marinas, y en particular de los macroplásticos, a los organismos y ecosistemas marinos se asocian generalmente a animales muertos, debilitados o varados por consecuencias enmallamientos v relacionadas con atrapamientos, sofocación, o ingestión de estos materiales no biodegradables (Baulch and Perry, 2014; Gregory, 2009; Laist, 1997). Además de estas formas, que fueron las primeras en ser investigadas y que se encuentran hoy día ampliamente documentadas, se han explorado también una multitud y diversidad de efectos de estos elementos de plástico en el medio marino.

Sin entrar en mucho detalle, a continuación nombran algunos se ejemplos de otro tipo de impacto generado por las basuras marinas, y en concreto los microplásticos, que aparecen de forma global en los distintos ecosistemas, afectando por tanto también indirectamente a las múltiples formas de vida. Así pues, podemos señalar cómo los fragmentos de plástico pueden hacer de "transportadores" o "ascensores" de otras especies, desplazándolas horizontalmente o verticalmente en la columna de agua y haciéndolas llegar a nuevos ecosistemas (Kiessling et al., 2015), y/o facilitando nuevos hábitats para especies donde de otra manera no se desarrollarían.

A lo anterior habría que añadir que algunos estudios han mostrado evidencias de la posibilidad de formación de biofilms de bacterias (como Escherichia coli) y la persistencia de patógenos potencialmente dañinos (tales como ciertas cepas de Vibrio spp.) sobre residuos de plástico (Keswani et al., 2016; McCormick et al., 2014; Zettler et al., 2013). Dada la capacidad de los microorganismos para persistir en los plásticos presentes en las playas, aumentándose así la diseminación de microbios potencialmente patógenos en las zonas costeras, este tema requiere también atención y estudios más profundos y detallados, ya que las playas y los ambientes costeros forman parte de las zonas ecológicas y socioeconómicas más importantes a nivel mundial (Harley et al., 2006; Verlis et al., 2013).

Entre los posibles impactos en el medio marino que pueden generar los plásticos, sin duda los más documentados hoy día están relacionados con la ingestión de macro y microplásticos, habiendo experimentado un crecimiento exponencial desde el año 2009, según un extenso artículo de revisión sobre más de 400 estudios independientes (Gouin, 2020).

2.5.2 Ingesta de microplásticos

Un amplio espectro de organismos marinos, incluidos corales, invertebrados como moluscos y crustáceos, peces, aves, tortugas e incluso cetáceos, pueden ingerir

microplásticos, incorporarlos 0 bien mediante la ingesta de presas (Lusher, 2015; Tourinho et al., 2010; Wootton et al., 2021; Wright et al., 2013). Esto puede conllevar trastornos en la alimentación y la digestión, así como en la reproducción, entre otros efectos como, por ejemplo, bloquear los apéndices utilizados para obtener comida u ocluir el paso por el tracto intestinal de algunos organismos, así como limitar la ingesta de comida y por tanto reducir la cantidad de energía disponible (Cole et al., 2013, 2011; Tourinho et al., 2010; Watts et al., 2017), al igual que ocurre con los macroplásticos en otros organismos como focas, aves y tortugas. Sin embargo, hay otros animales, como los poliquetos, que pueden eliminar materiales indeseados como los microplásticos sin sufrir daños asociados (Andrady, 2011b; Thompson, aunque en todas las especies, 2006). dependiendo del tamaño, estos elementos pueden sufrir translocación al sistema circulatorio u otros órganos. En algunos casos, los mecanismos de alimentación de los organismos no les permiten discriminar entre presas y microplásticos y los ingieren indistintamente, o bien los ingieren intencionadamente al confundirlos con presas (Lusher, 2015; Moore, 2008; Moore et al., 2001), por ejemplo, en el caso del plancton. Las rutas de exposición e incorporación de microplásticos, además, no tienen por qué ceñirse sólo a la ingesta propiamente dicha, sino que, en algunos casos, como en el de los cangrejos, estos también pueden incorporarse a través de las branquias hacia el sistema circulatorio (Watts et al., 2017).

De entre la larga lista de animales estudiados, los mamíferos marinos son importantes indicadores de la salud de los ecosistemas marinos, particularmente en relación con la contaminación. Dada su larga esperanza de vida, su tendencia a alimentarse en niveles tróficos elevados y sus reservas de grasa únicas que pueden servir como depósitos de toxinas antropogénicas, estos animales son considerados importantes centinelas de la contaminación marina (Bossart, 2011).

En el <u>Capítulo 6</u> se recoge una revisión específica de los registros de interacción de estos mamíferos marinos con la ingesta de microplásticos.

2.5.3 Interacción e incorporación de contaminantes químicos

Además de los efectos nombrados anteriormente, está asumido de manera general que los microplásticos pueden actuar como vectores para el transporte de compuestos químicos, bien sean:

a) compuestos y contaminantes orgánicos persistentes (COPs) directamente relacionados a la fabricación de plásticos para proporcionarles ciertas propiedades (aditivos), como los ftalatos que los hacen más maleables, el Bisfenol A, los retardantes de llama, los antimicrobianos, y aquellos que evitan los daños oxidativos (nonilfenoles),

b) metales pesados y contaminantes orgánicos hidrófobos (COHs) que se adsorben en ellos, como cobre, zinc, plomo, bifenilos policlorados (PCBs), hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), etc. (Anderson et al., 2016; Andrady, 2011b; Ashton et al., 2010; Brennecke et al., 2016; Browne et al., 2013, 2007; Gouin et al., 2011; Rochman, 2015; Teuten et al., 2009)

Se ha comprobado que estos aditivos, metales pesados y COPs se concentran en polímeros de plástico como PVC, polietileno o poliestireno, y se han encontrado partículas en el océano que contienen cantidades considerables de estos compuestos químicos, siendo por tanto una fuente potencial para el medioambiente y la biota (Koelmans, 2015; Koelmans et al., 2016). Estos aditivos y COPs pueden interferir con procesos biológicos importantes, y pueden tener efectos como disruptores endocrinos, produciendo efectos en la movilidad, la reproducción y el desarrollo, en los sistemas neurológicos e inmunológicos, o bien tener efectos carcinogénicos (Barnes et al., 2009; Lithner et al., 2011, 2009).

Debido a la presencia de estos compuestos en las partículas de algunos microplásticos, estudios han propuesto incluso utilizar la bioacumulación en órganos diana de aditivos de plásticos, exclusivos de estos, como trazadores de la ingesta de microplásticos por organismos marinos, como en el caso de la acumulación de ftalatos las ballenas, concretamente en el rorcual común (Baini et al., 2017; Fossi et al., 2012).

Sin embargo, el hecho de que los plásticos puedan actuar como vectores de contaminantes y representen un peligro real en este sentido, depende de varios factores. De acuerdo con Koelmans (2015), el principal es si el aporte de contaminantes por parte de los microplásticos y, por tanto, la incorporación de ellos a los organismos, es de una magnitud relevante en comparación con la incorporación de contaminantes por otras vías de exposición, como la comida, el agua y el sedimento. El segundo es si para ciertos contaminantes, sobre todo en el caso de organismos que han sufrido procesos de bioacumulación y/o biomagnificación, la concentración que está presente en los tejidos del organismo es mayor que la que tienen los microplásticos, en cuyo caso los microplásticos no actuarían como vectores de incorporación de ese compuesto en concreto sino que actuarían como sumideros (Koelmans et al., 2013). El tercer factor es si la degradación de los microplásticos puede conllevar que sus propiedades de adsorción/ absorción y transporte de contaminantes varíen, y por tanto vaya cambiando su capacidad para actuar como vector (Andrady, 2011b; Koelmans, 2015).

Otro factor adicional a tener en cuenta es el tiempo que estos microplásticos estén dentro del tracto gastrointestinal, que dependerá de sus características y de las del organismo, lo que posibilitará un mayor o menor intercambio de compuestos químicos entre los tejidos del organismo marino y los microplásticos. En caso de residir dentro del organismo el tiempo suficiente, diversos autores han especulado si esto podría conllevar una mayor exposición a aditivos característicos de los plásticos y otros contaminantes orgánicos, que sin la presencia de estos microplásticos no se daría o sería menor (Hammer et al., 2012; Koelmans, 2015; Rochman, 2015; Teuten et al., 2009, 2007), o bien que, en algunos casos, al ser la concentración de ciertos contaminantes bioacumulables mayor en los tejidos del organismo que en los microplásticos (debido a la incorporación a través de la dieta, etc.), estos actúen retirando parte de estos contaminantes (Besseling et al., 2013; Chua et al., 2014; Gouin et al., 2011; Koelmans et al., 2013).

Es importante tener en cuenta, además de todo lo anterior, ciertos factores que pueden influir en la biodisponibilidad de los contaminantes presentes en los microplásticos, como por ejemplo el rol de los procesos fisiológicos, como la presencia de encimas o de surfactantes gástricos, y las diferentes condiciones fisiológicas de temperatura y pH que se dan dentro de los distintos tractos digestivos en función del tipo de organismo (Bakir et al., 2016). En definitiva, en el campo del riesgo y el peligro que implican los microplásticos y los compuestos químicos asociados queda mucho por investigar, como por ejemplo cómo diversos factores pueden afectar en menor o mayor medida a la incorporación de algunos de estos contaminantes por los organismos marinos, siendo mucho más relevantes como vectores de transmisión en el caso de algunos compuestos que en otros y pudiendo trasladar los nuevos conocimientos a la evaluación del impacto ecotoxicológico para su gestión.

2.6 Lagunas de conocimiento

Como en el caso de la distribución de los microplásticos en las aguas superficiales del planeta, se puede decir que existen evidencias de la ingesta de microplásticos en una interminable lista de especies marinas. Esta lista viene representada en forma de una infinidad de estudios reportando distintas cantidades, tamaños, formas y tipos de microplásticos ingeridos, así como diversas formas a la hora de recoger, procesar, analizar y clasificar los resultados. Así pues, nos encontramos hoy en día ante una heterogeneidad que provoca importantes problemas a la hora de intentar evaluar las tendencias temporales y espaciales. Consecuentemente, y tal y como se ha expresado en algunos trabajos de revisión específicos sobre esta precisa temática, una vez más, se necesita urgentemente el desarrollo y la aplicación de métodos estandarizados (Gouin, 2020; Wesch et al., 2016; Zantis et al., 2021).

Elegir los cetáceos como objeto de estudio en este trabajo viene dado por distintos factores, entre ellos considerar sus singulares características y aprovechar la oportunidad de abordar la investigación con un enfoque multidisciplinar en el marco del Proyecto MARCET (MAC/1.1b/149), proyecto de cooperación del Programa Operativo de Cooperación Territorial Madeira-Açores-Canarias (POMAC) 2014-2020 en el que se planteó una investigación enfocada a dar solución a una brecha de conocimiento.

Con esta premisa como fundamento del trabajo, lo primero que se realizó en esta tercera parte de la tesis fue desarrollar, validar y registrar un protocolo para la determinación de microplásticos en cetáceos varados y realizar un caso de estudio poniéndolo en práctica en la región de la Macaronesia (*Capítulo 6*). A su vez, es imperativo avanzar hacia estudios más dirigidos a la respuesta por parte de los organismos y el estudio de los efectos y riesgos específicos que conllevan. Específicamente, es de suma importancia el campo de los Contaminantes Orgánicos Persistentes, en el que aún se encuentran en el aire demasiadas incógnitas como para poder comprenderlo y evaluarlo en toda su magnitud, haciendo esencial que en los próximos años se avance rápidamente en el conocimiento de estos efectos. Así pues, en el mismo capítulo se incluye también un estudio sobre la relación de una serie de COPs característicos de los derivados plásticos.



-CAPÍTULO 3-

3

El sistema de circulación de agua marina en los barcos: una oportunidad para las necesidades de monitorización de microplásticos.



Resumen

Los métodos de muestreo a gran escala para la monitorización de microplásticos en aguas oceánicas continúa siendo un desafío en oceanografía. Se requiere una gran cantidad de muestras para comprender la distribución, la abundancia y el destino de los microplásticos en el medio ambiente. A pesar de más de una década de estudio generalizado, actualmente no existe una serie temporal establecida de mediciones de microplásticos y desde la comunidad científica aún no se ha conseguido establecer un conjunto armonizado de procedimientos que permitan la recopilación de datos de distribución y abundancia de microplásticos por las distintas plataformas posibles sin perder por ello la capacidad de trabajar los resultados conjuntamente.

En este capítulo se presenta una técnica de muestreo eficaz mediante la conexión de un ingenio de muestreo específicamente diseñado para ser acoplado al sistema de bombeo de agua marina que incorporan, a partir de ciertas dimensiones, las embarcaciones. A nuestro modo de ver, se trata de una oportunidad para atender a las necesidades de monitorización oceánica relacionadas con la abundancia y distribución de estas partículas.

El método es rentable, muy versátil y preciso, y puede muestrear partículas de hasta 50 µm desde diversas plataformas de oportunidad, lo que contribuye a un área de estudio emergente y, en particular, ayuda a aumentar el reporte de datos y, por lo tanto, contribuye a la implementación de la Directiva Marco sobre la Estrategia Marina (DMEM). El muestreo se realizó durante tres campañas oceanográficas consecutivas en el Atlántico centro-oriental durante un año, muestreando aguas subsuperficiales (en torno a los 4 m de profundidad) durante la navegación y en las estaciones costeras y oceánicas. Se encontraron microplásticos en todas las estaciones y transectos muestreados. Las fibras (64.42%) predominaron sobre los fragmentos (35.58%), estando los valores de concentración dentro de los rangos de datos reportados para otras áreas del Atlántico.

3.1 Introducción

3.1.1 Los microplásticos: dificultades de muestreo

El estudio de los microplásticos pelágicos es un campo que comenzó a estudiarse tímidamente en 2009, comenzando la escalada exponencial de estudios pocos años después, hasta la actualidad (Borja and Elliott, 2019; Monteiro et al., 2018). El muestreo de microplásticos en el agua generalmente requiere la obtención y filtrado de grandes volúmenes, existiendo una gran variedad de redes de arrastre con distintos diseños y tamaños de malla y aberturas variables que se utilizan comúnmente para el rastreo en aguas superficiales (Löder and Gerdts, 2015; Mai et al., 2018; Stock et al., 2019).

El grupo de trabajo de la Directiva Marco Estrategia Marina (DMEM) (Directiva 2008/56/CE) sobre el Buen Estado Ambiental (BEA) recomienda el arrastre de redes de este tipo como una herramienta para la investigación de microplásticos en las aguas superficiales (Hanke et al., 2013). Sin embargo, los controles de validación y recuperación de partículas con estos sistemas no se han llevado a cabo concienzudamente, lo cual puede dar lugar a estimaciones erróneas. Además, el mencionado grupo de trabajo y otros estudios han identificado algunas desventajas, como la dificultad de calcular el volumen muestreado debido a la turbulencia del agua y su ineficiencia para recolectar microplásticos más pequeños debido a la limitación del tamaño de la malla (Setälä et al., 2016). A su vez, la ventana de operación de este tipo de redes para el muestreo está restringida a condiciones de mar relativamente tranquilas y una velocidad máxima de remolque de aproximadamente 3 nudos (Frias et al., 2019). Se ha demostrado que la turbulencia debida al viento (Kukulka et al., 2012) y otros factores como el hundimiento debido a la colonización de la superficie de las partículas por materia orgánica, o las distintas morfologías y tamaños de las propias partículas que pueden influir sobre la movilidad de las mismas en la columna de agua (Chubarenko, 2017). En definitiva, existen evidencias de que los reportes de microplásticos en aguas superficiales subestiman la abundancia total de estas partículas (Kukulka et al., 2012).

El muestreo de microplásticos de aguas superficiales se puede realizar de varias maneras (Mai et al., 2018; Miller et al., 2017; Rocha-Santos and Duarte, 2015). Algunos de estos métodos alternativos al sistema de arrastre de redes de plancton o manta se basan en el muestreo de grandes volúmenes de agua mediante el bombeo, o de volúmenes más reducidos con cubos o botellas Niskin (Barrows, 2017). Aunque se han empleado menos ampliamente, se trata de métodos que cuentan con sus propias ventajas, pudiéndose emplear más fácilmente en alta mar aún en condiciones adversas. Uno de los primeros trabajos de esta tesis doctoral consistió precisamente en realizar una comparación entre las muestras de agua obtenidas a través de las botellas de la roseta y del sistema de filtración de agua en contínuo de un buque oceanográfico (Montoto Martínez et al., 2018) (Anexo 3.1). Este estudio demostró el potencial de los sistemas de circulación de los buques como método eficiente para el muestreo de microplásticos en barcos de oportunidad, una cuestión sobre la que se contiuó investigando, y que se presenta en este capítulo.

3.1.2 Una propuesta de optimización del muestreo de microplásticos

La propuesta descrita en este capítulo, presentada como una oportunidad para las necesidades de monitorización de microplásticos, se basa en la toma de agua del sistema de circulación de agua marina que poseen determinados buques, entre ellos, los barcos de investigación oceanográfica. Esta entrada de agua ha sido utilizada para este propósito en algunos estudios previamente (Cincinelli et al., 2017; Desforges et al., 2014; Enders et al., 2015; Kanhai et al., 2017; Lusher et al., 2014). En el Anexo 3.2 se presenta una tabla comparativa de estos métodos, que sirvieron de precedente en el planteamiento del presente estudio.

Así, el método que se desarrolla en este capítulo permite el muestreo desde barcos y distintas plataformas de oportunidad, entendidas éstas como aquellas que no están necesariamente destinadas a la investigación marina, si bien pueden servir de soporte a ésta dada su actividad en el medio. En la línea de las conclusiones de la 6.ª Conferencia Internacional sobre Basuras Marinas (UNEP & NOAA, 2018), en la que se puso sobre la mesa la necesidad de abordar el problema global de las basuras marinas mediante soluciones colaborativas, el objetivo principal de este estudio es demostrar las oportunidades de un ingenio de filtración de microplásticos y una metodología basada en el sistema de circulación de agua marina de los barcos. Este abordaje ha sido fomentado por expertos/as con el fin de facilitar la monitorización de los microplásticos y los reportes en aguas marinas costeras y oceánicas (Piha Henna et al., 2011; Zobkov et al., 2019) y se ha desarrollado teniendo en cuenta los informes emitidos por el Grupo de Trabajo de Basuras Marinas de la Directiva Marco Estrategia Marina. Paralelamente, además de servir para testar esta metodología, se reportan los primeros datos de abundancia y distribución de microplásticos en aguas oceánicas subsuperficiales de un área geoestratégica en la región Macaronésica.
3.2 Material y métodos

3.2.1 Zona de muestreo

Todas las muestras se recogieron durante tres campañas oceanográficas organizadas por la Plataforma Oceánica de Canarias (PLOCAN) a la Estación Europea de Series Temporales Oceánicas de Canarias (ESTOC; 29°10'N, 15°30'W), que tuvieron lugar durante los días 24-26 de marzo de 2018 (ESTOC 1803), 6-8 de diciembre de 2018 (ESTOC 1812) y 21-25 de febrero de 2019 (ESTOC 1902). En las tres ocasiones la campaña se realizó a bordo del Buque de Investigación Oceanográfica (BIO) Ángeles Alvariño del Instituto Español de Oceanografía (IEO), recogiendo muestras tanto en la ubicación en ESTOC como en el Banco de Ensayos, una zona en aguas costeras de Gran Canaria, que forma parte de las delimitaciones de PLOCAN para la investigación marina (Fig. 3.1.)



Fig.3.1: Mapa de los puntos de muestreo repetidos en los tres cruceros de investigación. (i) estaciones oceánicas correspondientes a la estación ESTOC, (ii) estaciones costeras correspondientes a tres estaciones en el Banco de Ensayos de PLOCAN, a 2 millas náuticas de la costa de Gran Canaria, y (iii) muestras de navegación recogidas durante el tránsito hacia y desde ESTOC al puerto de origen, una distancia de aproximadamente 60 millas náuticas por transecto. Esta figura fue generada con el software gratuito y de código abierto QGIS .Mapa base: EMODNET Bathymetry WMS 1.3.0

3.2.2 Métodos de muestreo

En base a las necesidades en el campo del muestreo de microplásticos identificadas en varias revisiones de literatura (Barrows, 2017; Mai et al., 2018; Miller et al., 2017; Rocha-Santos and Duarte, 2015) y a una serie de ensayos precedentes con muestreadores de microplásticos diseñados para su operación acoplada al sistema de bombeo y circulación de agua marina en buques de investigación oceanográficos, el Grupo de Investigación en Tecnologías, Gestión y Biogeoquímica Ambiental (TGBA) de La Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC) diseñó y construyó un ingenio de filtración para el muestreo de microplásticos que fuera capaz de aportar valor en las lagunas de conocimiento y los objetivos clave extraídos de estos antecedentes, entre los que destacan:

1) Ayudar a aumentar el número de observaciones y mediciones válidas para contribuir a las necesidades de monitorización de la Directiva Marco Estrategia Marina (DMEM), en particular al Descriptor 10 (Basuras marinas).

2) Permitir un aumento en el conocimiento sobre microplásticos de menor tamaño, a través de la retención de partículas de hasta 50 μm.

3) Minimizar el riesgo de contaminación y facilitar la operación en plataformas de oportunidad, a través de un diseño versátil, asequible y encapsulado.

De esta forma, el ingenio de filtración (Fig. 3.2) consta de cuatro tamices apilados (*ø*= 100 mm) con mallas de 300, 200, 100 y 50 µm. El diseño incluye además una tapa para evitar la contaminación atmosférica y un medidor de flujo, para asegurar un volumen muestreado igual en los diferentes ensayos realizados y permitir la comparación de resultados con otros estudios. Se realizaron varias pruebas a bordo de otros barcos de investigación y de oportunidad (Imágenes 3.3 y 3.4), como embarcaciones de recreo (De Murillo, 2022a, 2022b), antes de seleccionar esta configuración para el ingenio.

En efecto, el diseño final es una modificación de los métodos de Lusher et al. (2014) y Enders et al. (2015), aplicándose algunos cambios con el fin de aumentar la información de distribución de tamaños proporcionada y poder adaptar el ingenio a diferentes circunstancias y condiciones de muestreo. En la selección de los materiales de construcción del ingenio se trató de emplear piezas estándar (Imagen 3.1), primando que se pudieran adquirir en cualquier ferretería a precios asequibles, de manera que se favoreciera la replicabilidad, siendo el caudalímetro la pieza más complicada de encontrar. El resultado final es un artefacto que puede ser montado y dispuesto sin necesidad de personal ni equipo especializado a bordo.



Imagen 3.1 Piezas empleadas para la construcción del ingenio de filtración.

A) Modos de operación de muestreo

Tal y como se muestra en la Fig. 3.1, durante las campañas se realizaron muestreos diferenciando dos modos de operación: (i) modo estacionario; puesto en práctica tanto en estaciones costeras (en el *Banco de Ensayos* de PLOCAN) como en estaciones oceánicas (en ESTOC) y (ii) modo navegación. Ambas ubicaciones, el Banco de Ensayos y ESTOC forman parte de las facilidades de PLOCAN para la investigación oceánica.





Fig.3.2: Esquema del ingenio de muestreo, conectado al sistema de bombeo de agua marina del BIO Ángeles Alvariño mediante una toma de manguera de ¾" en el laboratorio húmedo. Esta figura muestra imágenes reales del artefacto de muestreo utilizado en este estudio, con los tamices apilados que contiene mostrados a la derecha de la imagen. **Imagen 3.2** Disposición del sistema para el lavado de los tamices entre muestras sucesivas. Uno a uno, los tamices se colocaron sobre un embudo que canalizaba, mediante la aplicación de agua filtrada ultrapura a presión, todo el contenido retenido en la malla de cada tamiz hacia el bote de muestreo correspondiente.

Muestreos estáticos

Utilizando el ingenio de muestreo de microplásticos descrito anteriormente, y utilizando la bomba de circulación de agua marina de la embarcación, que toma el agua a unos 4 metros de profundidad, se tomaron muestras de agua de mar en las diferentes estaciones. El tiempo total de muestreo en cada estación fue de alrededor de 35 \pm 11 minutos, tiempo durante el

cual se muestreó un volumen de 251 \pm 20 L a una velocidad de flujo promedio de 7 L/min. Las diferencias en los volúmenes muestreados se corrigen expresando los resultados en términos de número de partículas por metro cúbico. Después de la adquisición de cada muestra, se desconectó el artefacto de filtración de microplásticos y se lavó cada malla pasando el contenido a un recipiente con tapa de rosca etiquetado con agua filtrada ultrapura (Imagen 3.2).

Muestreos en navegación

También se realizaron muestreos durante la navegación desde el puerto de origen (Puerto de Las Palmas; 28°7'N, 15°24'W) a la estación oceánica ESTOC y viceversa, en dos campañas oceanográficas. Se muestrearon un total de 10472 L en los cuatro transectos separados, con un volumen de muestreo medio de 2377 ± 895 L a un caudal medio de 5 L/min. Se siguió el mismo procedimiento que con las muestras estacionarias después de cada transecto, desconectando el artefacto de filtración y lavando cada malla en un recipiente etiquetado con tapa de rosca con agua filtrada ultrapura.



Imagen 3.3 Fotografía tomada durante una campaña oceanográfica a bordo del BIO Ángeles Alvariño en 2017 en la que se realizaron ensayos con distintas configuraciones de tamaños de malla y volúmenes de muestreo para determinar los parámetros óptimos a tener en cuenta para el posterior estudio llevado a cabo en el mismo buque, que se describe en este capítulo.



Imagen 3.4 Fotografía de otro de las configuraciones previas testadas, en esta ocasión a bordo del BIO Sarmiento de Gamboa, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) durante la campaña oceanográfica FLUXES, en noviembre de 2017.

3.2.3 Procedimientos para la prevención de la contaminación

El artefacto de filtración y todas las mallas del filtro se limpiaron minuciosamente con agua filtrada ultrapura antes de cada uso. Al finalizar el muestreo, los tamices se retiraron cuidadosamente y todas las partículas retenidas en las mallas se vertieron cuidadosamente en su correspondiente frasco, previamente etiquetado. Se aplicó un código de vestimenta de material no plástico, superficies de trabajo limpias y antebrazos lavados para evitar la contaminación. Para evaluar las posibles fuentes de contaminación ambiente durante la preparación de la muestra y durante el enjuague y la filtración al vacío, se colocaron placas de Petri abiertas con papel de filtro limpio en las proximidades directas del área de trabajo, lo que proporcionó un control de la posible contaminación atmosférica durante el trabajo. Estos filtros de control se examinaron de acuerdo con el mismo protocolo que los filtros de agua de mar.

Se ha demostrado que las mejoras en las medidas preventivas, según lo recomendado por Norén y Naustvol (2010), reducen considerablemente la contaminación atmosférica en cuanto a la posible introducción de partículas en las muestras que están siendo objeto de estudio. Las medidas comunes para prevenir la contaminación durante el procesamiento en el laboratorio incluyen (i) usar ropa de algodón mientras se manipulan las muestras, (ii) limpiar todos los recipientes con agua filtrada antes de su reutilización, (iii) realizar controles en blanco filtrando agua ultrapura, (iv) cubrir los tamices y otros equipos para prevenir la deposición de partículas que estén presentes en el aire y (v) colocar una placa Petri limpia con un papel de filtro junto al área de manipulación para registrar, si la hubiera, dicha contaminación procedente del ambiente (Cincinelli et al., 2017; Lusher et al., 2014).

3.2.4 Análisis de laboratorio

Una vez concluida la salida al mar, en los laboratorios de las instalaciones en tierra, en la Facultad de Ciencias del Mar de la ULPGC, las muestras de agua tomadas se transfirieron a un vaso de precipitados de vidrio, enjuagándose a fondo tres veces con agua filtrada ultrapura. El contenido del vaso de precipitados se filtró al vacío utilizando un filtro de microfibra de vidrio Whatman de 0,7 μ m (GF/F, Ø = 47 mm). Cada filtro se colocó en una placa de Petri y se secó durante la noche antes de la inspección visual, que se realizó bajo un microscopio estereoscópico (Nikon SMZ1000, 8-80X). Las partículas más pequeñas y cualquier partícula cuyos orígenes no estaban claros se observaron más minuciosamente bajo un microscopio metalográfico con un aumento de hasta 400X (NIKON LV100POL). Las partículas que no fueron identificadas con claridad como de origen plástico no se tuvieron en cuenta en el conteo final para el análisis. Las imágenes y las dimensiones de las partículas identificadas se registraron con una cámara DS-Fi2 utilizando el software NIS-Elements.

Al igual que en los pasos previos en el barco, cada muestra se procesó siguiendo cuidadosas medidas de prevención de contaminación y se mantuvo tapada cuando no se manipulaba. También se colocaron placas de Petri abiertas con papeles de filtro limpios junto al área de examen, lo que proporcionó un segundo control de la posible contaminación del aire. Los microplásticos se identificaron siguiendo las pautas de Lusher et al. (2014), basándose en características como su color y forma, y en el caso de las fibras, su espesor y flexión tridimensional. Teniendo en cuenta el posible sesgo en la identificación manual de microplásticos, solo se consideraron para el análisis las partículas que se identificaron como plásticos con un alto nivel de confianza, habiendo realizado previamente un análisis de una serie de partículas recabadas con el mismo método y en condiciones similares con un espectroscopio microRaman, alcanzando la tasa de confirmación de la identificación de microplásticos el 95%.

La hoja de datos de clasificación comprendía diferentes categorías: fibras, fragmentos, películas, gránulos y espumas; sin embargo, sólo se hallaron partículas en las dos primeras, por lo que los resultados están clasificados según estos dos grupos: fibras y fragmentos. Los resultados se dan como número de partículas por unidad de volumen para facilitar la comparación entre ubicaciones o repeticiones, así como entre diferentes usuarios/as y repositorios de datos institucionales (Hanke et al., 2013). La estadística descriptiva se realizó utilizando el software libre R, en su versión 3.5.3 (R Core Team, 2019).

Para verificar la reproducibilidad, se tomaron tres muestras consecutivas en la estación oceánica ESTOC, las cuales se analizaron siguiendo el mismo procedimiento que el resto de las muestras de este estudio. Este protocolo está publicado y disponible para su consulta y descarga en el repositorio público *protocols.io* (Montoto-Martínez and Gelado-Caballero, 2020).

3.3 Resultados

3.3.1 Resultados generales

En este estudio se muestreó un volumen total de 13997 L, comprendiendo los 3525 L de las muestras estacionarias de las tres campañas oceanográficas y los 10472 L de los cuatro transectos de navegación. Se encontraron microplásticos en todas las muestras tomadas en todas las estaciones y durante todos los transectos, identificándose un total de 163 partículas $(5 \text{ mm} - 50 \mu \text{m})$: 105 fibras (64.42 %) y 58 fragmentos (35.58 %). La concentración de partículas osciló entre 0 y 46.15 partículas/m³, con un valor medio y desviación estándar de 9.92±11.22 partículas/m³ (mediana: 5.5; IC 95%: 4.73-15.10), correspondiente a 14.46±13.23 fibras/m³ y 5.37± 6.35 fragmentos/m³ (Tabla 3.1).

En cuanto al experimento de reproducibilidad, se filtraron 240 L, obteniendo una media de 2.7±1.2 partículas por réplica. En muchos de los filtros observados, las fibras se encontraban enredadas entre sí formando ovillos (Imagen 3.5a). En cuanto a los fragmentos, su apariencia típica, de bordes irregulares y color brillante, se puede apreciar en la Imagen 3.5b).

En relación a los blancos de procedimiento, no se encontraron microplásticos en los controles de contaminación atmosférica llevados a cabo durante la manipulación de las muestras, tanto en la embarcación como en el laboratorio en tierra. Así, esto respalda el hecho de que no se introdujeron microplásticos en las muestras fruto de la contaminación atmosférica mientras se operaba el ingenio de filtración o durante su procesamiento.



Imagen 3.5 Serie de dos fotografías que ilustran el aspecto típico de los microplásticos hallados en el presente estudio. a) Un ovillo de fibras, estructura enredada encontrada con frecuencia en las muestras; b) Un fragmento de plástico rojo, que muestra características visuales identificativas de los microplásticos, como son los bordes irregulares y el color brillante.

Tabla 3.1: Tabla comprendiendo los estudios que, hasta la fecha de publicación del presente trabajo de investigación, se habían realizado siguiendo métodos similares de bombeo de agua de mar subsuperficial, bien mediante una bomba aportada al uso o mediante el sistema de circulación de agua del propio buque.

Referencia	Zona de muestreo	st / Tr	Método de provisión de agua de mar	Prof. (m)	Tamaño de malla(s) (μm)	Volumen de muestra (L)	Volumen total filtrado (m³)	Rango de concentraciones de microplásticos (MP/m³)	Media de concentración de microplásticos (MP/m ³)
Lusher et al. (2014)	Atlántico NE	Æ	B	3	250	2000	940		2.46 ± 2.43
Desforges et al. (2014)	Pacífico NE	St & Tr	S.C.	4.5	250; 125; 62.5	[3]	1	8.51 - 9180	2080 ± 2190
Enders et al. (2015)	Atlántico NE	Ŧ	S.C.	0-3	300 – 10 <i>[i]</i>	2600 ± 1300	60	13 - 501	
Setälä et al. (2016)	Golfo de Finlandia	st	в	0-0.5	300 or 100 [2]	2000	2	0-1.25 & 0 - 6.8	1.3 ± 1.9 & 0.6 ± 0.4 [2]
Cincinelli et al. (2017)	Antártida	st	S.C.	വ		2000		0.0032 - 1.18	0.17 ± 0.34
Kanhai et al. (2017)	Atlántico NE	*IL	в	u	250	2000	152	0 - 8.5	1,15 ± 1,45
Montoto et al. (2019)	Atlántico NE	St & Tr	s.c.	4	300; 200; 100; 50	~240 & ~2000 [4]	-14	0 - 46.15	19.88 ± 15.92

St/Tr: Muestreas obtenidas en estación (St.) o en navegación, realizando un transecto (Tr.).

B/S.C.: Obtención del agua de mar para el muestreo mediante Bomba abordo (B) o el Sistema de Circulación (S.C.) de agua del buque.

fr*: no se especifica cuando el BIO se detiene para las estaciones de muestreo.

[1] El filtro de menor luz de malla (10 µm) se cambia a uno superior (50 µm) debido a la colmatación producida.

[2] Realizan dos ensayos por separado, con mallas de 300 y 100 µm) respectivamente.

[3] Variable, en función del tiempo de muestreo.

[4] Volumen para las muestras estacionarias y en navegación, respectivamente.

3.3.2 Comparativa entre muestreo estacionario Vs en navegación

De las 163 partículas identificadas, 82 se obtuvieron en muestras durante los transectos en navegación y 81 en las estaciones. A pesar de que el número de partículas es casi igual, es transcendental tener en cuenta que el volumen muestreado fue muy superior en el caso de las muestras en navegación (10472 L), frente al volumen total de las muestras estacionarias (3495 L). Si prestamos atención exclusivamente a los datos de fragmentos, observamos como las concentraciones de este tipo de partícula no difiere mucho entre las muestras de navegación y las estacionarias (Tabla 3.2). Sin embargo, en el caso de las fibras, éstas fueron aproximadamente tres veces más abundantes en las muestras estacionarias que en las de navegación, tal y como se representa en la Fig. 3.3a.

		Estaciones (n=14)		Transectos (n=4)	Total (n=18)	
		Oceanic (n=6)	Coastal (n=8)			
Concentración (nº MP/m³)	Fibras	11.20 ± 8.03	21.39 ± 14.25	5.64 ± 12.15	14.49 ± 13.22	
	Fragmentos	5.92 ± 8.76	5.69 ± 5.10	3.97 ± 3.46	5.39 ± 6.35	
	Total	17.12 ± 16.45	27.08 ± 16.52	9.61 ± 7.36	19.88 ± 15.92	
Concentración (%)	Fibras	18 ± 2.66 (64.29%)	42 ± 4.06 (79.25%)	45 ± 9.32 (54.88%)	105 (64.42%)	
	Fragmentos	10 ± 2.66 (35.71%)	11 ± 1.51 (20.75%)	37 ± 4.11 (45.12%)	58 (35.58%)	
	Total	28 ± 5.13 (100%)	53 ± 4.17 (100%)	82 ± 12.23 (100%)	163 (100%)	

Tabla 3.2: Número de microplásticos por metro cúbico de agua muestreado hallados en el los muestreos, en función del modo de obtención (en navegación o en estación), y de éstas últimas, oceánicas o costeras.

Analizando más en detalle las muestras estacionarias podemos observar, además, otra diferencia clara: los fragmentos no muestran diferencias significativas entre las dos clases de estación, con concentraciones medias de 7.06±9.26 partículas/m³ en estaciones oceánicas frente a 5.69 ±6.29 partículas/m³ en los sitios costeros. En el caso de las fibras, se aprecia un claro aumento de las fibras muestreadas en las estaciones costeras (Fig. 3.3b). Por otro lado, la distribución de la tipología de partícula en los microplásticos recabados durante las navegaciones indican una mayor similitud entre fragmentos y fibras (Tabla 3.2).



Fig.3.3: Distribución de tamaños de las partículas microplásticas encontradas. a) Distribución de tamaños de las partículas microplásticas encontradas, separadas por tipo de muestra; b) Rango de tamaño más pequeño separado en fracciones de 0.05 a 0,10 mm; 0.10 a 0.20 mm; 0.20 a 0.30 mm y 0.30 a 1.00 mm, correspondientes a los tamaños de malla empleados.





3.3.3 Distribución de colores y tamaños

Negro, azul y rojo fueron los tres colores predominantes (>80%) del total de microplásticos muestreados, ya fuera en navegación o estación, en aguas costeras u oceánicas (Fig. 3.4). Las partículas blancas o incoloras fueron las siguientes en abundancia, seguidas de las verdes y amarillas en el caso de las muestras costeras y de navegación.Las partículas en la fracción de tamaño de 1 a 3 mm fueron las más abundantes en las muestras estacionarias, y la fracción de 100 a 200 μ m fue la más abundante en el caso de las partículas recogidas en las muestras en navegación. Sólo se encontraron partículas de un tamaño superior a los 5 mm en las estaciones (Fig. 3.A), siendo todas ellas fibras (Fig. 3.4B). En las imágenes a continuación se muestran algunas partículas encontradas en este estudio (Imágenes 3.6 a 3.9).



Relación de imágenes, por orden, de izquierda a derecha y de arriba abajo: Imagen 3.6 Fragmento verde fotografiado a 60 aumentos.

- Imagen 3.7 Fibras, fotografiadas a 20 aumentos.
- Imagen 3.8 Fibras, fotografiadas a 20 aumentos.
- Imagen 3.9 Fibra roja, fotografiada a 80 aumentos.

3.4 Discusión

3.4.1 El sistema de circulación de agua marina de los barcos: una oportunidad para mejorar la monitorización de microplásticos

El arrastre de las redes de plancton, o similares, es la base del método de muestreo de microplásticos más comúnmente empleado para el caso de las aguas superficiales y subsuperficiales. Sin embargo, presenta algunos inconvenientes: la posibilidad de desplegar esta infraestructura está muy condicionada por el estado de la mar, presenta una importante imprecisión en cuanto al volumen muestreado y no es adecuada para el estudio de microplásticos más pequeños debido a la limitación del tamaño de malla. Frente a estas desventajas, el sistema de bombeo y circulación de agua marina de los buques de investigación ha demostrado ser un método alternativo para el muestreo de microplásticos en algunos estudios hasta la fecha. En la Tabla 3.1 se pueden consultar algunos de estos estudios precedentes. En otros casos se han utilizado las botellas niskin de la roseta, y en otros, algún tipo de sistema de bombeo de agua subsuperficial a bordo dispuesto ex profeso para el muestreo de microplásticos (Lusher et al., 2014). Sin embargo, en principio, los grandes volúmenes de agua que requiere el muestreo de microplásticos para estudiar su abundancia, hace que las redes de arrastre hayan sido los métodos más ampliamente utilizados en la última década (Frias et al., 2019).

El uso de un sistema de bombeo para circular agua marina abordo y muestrear el volumen deseado no es una idea nueva: ya en 1975 Wilson y Harrison (1975) describieron una instrumentación basada en este sistema, para muestrear mientras el barco está navegando con el objetivo de mejorar las oportunidades de monitorización de las aguas superficiales. Posteriormente, en el campo específico de los microplásticos, esta técnica ha demostrado ser también eficaz, validándose en varios estudios hasta la fecha, permitiendo el muestreo en continuo y sin interferir con la actividad regular de la embarcación en la que se opera (Desforges et al., 2014; Enders et al., 2015; Kanhai et al., 2017; Setälä et al., 2016). Además, una de las virtudes de este método es que tiene el potencial de emplearse en operaciones de monitorización de microplásticos desde una gama más amplia de plataformas de oportunidad. Prueba de su versatilidad es que, con las necesarias adaptaciones, incluso se puede utilizar para el muestreo de la capa más superficial desde embarcaciones más pequeñas (Song et al., 2014).

En este capítulo, se ha presentado el diseño de un ingenio de muestreo de microplásticos que, apoyado en el sistema de bombeo y circulación de agua marina de los barcos, ha sido puesto a prueba como una oportunidad sin explotar para las necesidades de monitorización de microplásticos en aguas costeras y oceánicas. Se considera que este enfoque tiene varias ventajas prácticas en cuanto a su operación y uso generalizado, tales como:

(i) **Rentable y asequible**: el ingenio de muestreo de microplásticos construido y puesto a prueba en este estudio se fabricó con piezas estándar, económicas y fáciles de obtener. Para su montaje o instalación no se requieren ni herramientas ni infraestructuras específicas. Si bien las redes de arrastre para el muestreo de microplásticos son cada vez más asequibles, ha de

tenerse en cuenta que a su vez requieren de cierta infraestructura y personal cualificado para las maniobras de despliegue y recuperación.

(ii) **Oportunidad**: puede emplearse para reportar datos aprovechando las campañas oceanográficas sin generar interferencias o incompatibilidades con las actividades del Plan Científico de Campaña o con las actividades rutinarias del buque en cuestión. Así, en este sentido de artefacto *oportunista*, sin requerir limitaciones en la velocidad de crucero, se rebaja el coste de la monitorización, pues la hora de trabajo de un buque de investigación es un costo considerable a tener en cuenta en la previsión de las acciones de monitorización.

(iii) Versatilidad: puede adaptarse a diferentes requisitos de muestreo, tales como diferentes profundidades o distintas plataformas, incluidas las embarcaciones de recreo o de pesca, entre otras. Además, se pueden acoplar filtros adicionales al pasar por áreas con más partículas para evitar obstrucciones, y se puede escalar al caudal deseado aumentando el diámetro de la superficie de muestreo en sí.

(iv) Precisión: en el sistema de muestreo se incluye un medidor de flujo a la entrada del artefacto, de manera que la información obtenida sobre la abundancia de microplásticos es concreta y comparable con la de otros estudios, o con eventos de monitorización anteriores. Actualmente, uno de los principales inconvenientes de las redes de arrastre para el muestreo de microplásticos es la dificultad de calcular el volumen muestreado, incluso en los diseños provistos de caudalímetro (Lenz and Labrenz, 2018). En consecuencia, se introducen importantes errores al convertir la cantidad de partículas recogidas a concentración de microplásticos por volumen de agua (Setälä et al., 2016).

(v) Rango de tamaño: este ingenio es adecuado para el muestreo de microplásticos pequeños -tanto fibras como fragmentos de hasta 50 μ m-, un área de estudio emergente debido al mayor riesgo ecológico que representan estas partículas más pequeñas, y el más importante para futuras investigaciones según algunas autoras (Enders et al., 2015; Mai et al., 2018) e informes (SAPEA, 2019; PNUMA, 2016). En el caso de las redes, la fracción de tamaño a menudo se limita a 330 o 200 μ m debido a la tensión del agua, hecho que se cree que subestima las concentraciones totales de microplásticos en uno a cuatro órdenes de magnitud en comparación con las muestras que se filtran a través de tamaños de malla mucho más pequeños (por ejemplo, <100 μ m) (Covernton et al., 2019).

Todas estas características dan como resultado un aumento considerable en la ventana de oportunidad de muestreo, lo que combinado con la versatilidad de las posibles plataformas desde las que se puede operar el ingenio, hacen que este sistema sea una oportunidad real para mejorar la monitorización de microplásticos en aguas costeras y oceánicas. Como herramienta de interés para este propósito, serviría para mejorar la capacidad de muestreo en el medio ambiente marino poco explorado, como se recomienda en el informe del Subgrupo Técnico de la DMEM sobre Basuras Marinas titulado *"Recomendaciones técnicas para la implementación de los requisitos de la DMEM"* (Piha Henna et al., 2011), donde se recomiendan más investigaciones, como el desarrollo de muestreadores automáticos para cuantificar los microplásticos en el agua.

3.4.2 Evolución y rendimiento del ingenio de muestreo de microplásticos

El diseño del ingenio de muestreo de microplásticos utilizado en este trabajo se ha mejorado progresivamente en función de los resultados de varios ensayos de prueba de rendimiento en los que se probaron diferentes materiales, tamaños de malla y dimensiones hasta lograr la combinación más adecuada. A modo de ejemplo, el prototipo original se construyó con canalones de lluvia de PVC estándar, de 75 mm de diámetro, y constaba de una sola malla de 200 µm que en ocasiones se obstruía ocasionando pequeñas fugas de agua.

El diseño final del ingenio de filtración, tal y como se puede observar en la Fig. 3.2, permitió el estudio de la concentración de microplásticos en volúmenes de hasta 4000 L sin soportar obstrucciones en transectos de hasta 60 millas náuticas, que es precisamente la distancia recorrida en los ensayos desde el puerto de origen a la estación oceánica ESTOC, y viceversa. Así pues, el diseño final logró ser el adecuado tanto para la monitorización en continuo durante la navegación, como para los muestreos en estación, en ambos casos sin interferir en la actividad rutinaria de la embarcación o las acciones previstas en el Plan de Campaña.

En este trabajo se han puesto de manifiesto, además, algunas ventajas adicionales fruto de la incorporación de algunas piezas claves en su diseño tales como el conector a la toma de agua, que mantiene el ingenio firme en el circuito, o la tapa, que hacen que el artefacto pueda trabajar autónomamente y sin sufrir riesgo de contaminación, permitiendo a la persona encargada de su supervisión realizar otras actividades de investigación complementarias mientras el ingenio está en funcionamiento.

3.4.3 Comparativa de las distribuciones de microplásticos

Como concluyen Monteiro et al. (2018) en su artículo sobre la contaminación por microplásticos en las islas del Océano Atlántico, existe la necesidad de que la comunidad científica se centre en las islas oceánicas remotas, ya que estas regiones son importantes en términos de la contaminación por plásticos como un problema ambiental global. Las Islas Canarias, reconocidas como una Región Ultraperiférica (RUP) por la Unión Europea, están ubicadas en la zona centro-oriental del Océano Atlántico, a 62 millas náuticas al oeste de Marruecos en el punto más cercano, y son conocidas por su alta biodiversidad marina y terrestre. Los estudios de microplásticos en la zona se han realizado en playas (Álvarez-Hernández et al., 2019; Baztan et al., 2014; Herrera et al., 2018; Villanova-Solano et al., 2022) y en biota, como algunas especies de peces (Herrera et al., 2019; Sánchez-Almeida et al., 2022) e invertebrados (Sevillano-González et al., 2022; Tejedor-Junco et al., 2021). Sin embargo, con respecto a las muestras de agua de mar, éste y otro llevado a cabo por Herrera et al. (2020) fueron los primeros estudios sobre microplásticos pelágicos que se realizaron en la Región Macaronésica.

Aunque el objetivo de la investigación desarrollada en este capítulo se centra en la validación del método de muestreo en sí, y a pesar de que la falta de estandarización a la hora de la toma de muestras y la monitorización de microplásticos en muestras oceánicas es uno

de los principales impedimentos para la comparación de los resultados (Gago et al., 2016), se incluyen a continuación algunos datos mostrando ciertas analogías y diferencias en relación a una cuidadosa selección de estudios previos realizados en condiciones similares (Tabla 3.1) y teniendo en cuenta los factores que pueden influir en las diferencias existentes con otras metodologías.

A) Concentraciones observadas

Las concentraciones totales de microplásticos para las aguas subsuperficiales del océano en la región obtenidas en este estudio (14.46±13.23 fibras/m³ y 5.37±6.35 fragmentos/m³) son más altas que las publicadas para otras áreas del Atlántico, incluidas las áreas costeras. La abundancia de microplásticos a lo largo del transecto norte/sur en el Océano Atlántico realizado por Kanhai et al. (2017) osciló entre o y 8.5 partículas/m³, mostrando los valores más altos frente a la costa de Namibia (8.5 partículas/m³) y frente a la costa oeste de Marruecos (6 a 6.5 partículas/m³). Estas cantidades fueron muestreadas durante la navegación, recuperando el agua de mar a 11 m de profundidad con el sistema de bombeo en navegación. En las muestras de navegación se observó un valor medio de 4.81±3.88 partículas/m³, que se encuentra dentro del rango de los datos obtenidos en nuestro estudio, si bien las diferencias podrían atribuirse a la disparidad en la profundidad de muestreo (11 frente a 4 m) y los tamaños de malla que se utilizaron (50 µm frente a 250 µm).

Nuestros resultados se pueden comparar más fácilmente con investigaciones que utilizan el sistema de bombeo y circulación de agua marina de los barcos a profundidades de muestreo similares, en diferentes áreas geográficas. Este es el caso del trabajo realizado por Lusher et al. (2014) en el Atlántico nororiental y Cincinelli et al. (2017) en la Antártida, quienes obtuvieron concentraciones medias de 2.46±2.43 y 0.17±0.34 partículas/m³ respectivamente. A primera vista, nuestros resultados parecen mucho más altos que éstos. Sin embargo, para que la comparación sea apta es necesario considerar únicamente las partículas de más de 200 µm en lugar de la fracción completa, y tener en cuenta únicamente las muestras tomadas durante la navegación. De esta manera, la concentración reportada descendería a 2.03±2.09 partículas/m³, un rango mucho más similar al indicado por las autoras anteriores.

Hasta la fecha, el estudio realizado por Enders et al. (2015) es el más comparable con este trabajo, ya que el tamaño de malla más pequeño empleado fue de 10 μ m, cambiando a 50 μ m en regiones con alto contenido de material en suspensión para evitar obstrucciones. En su estudio, también se encontraron microplásticos en todas las estaciones muestreadas, con un rango de 13 a 501 partículas/m³. Otra de las conclusiones extraídas de este trabajo fue que los microplásticos aumentaron de manera sostenida en número a medida que decrecía el tamaño, aplicándose esto tanto a las fibras como a los fragmentos. Esta observación también se refleja en nuestro estudio, en el que el 55% de las fibras son inferiores a 1 mm, frente al 64% de fibras inferiores a 900 μ m medido por Enders et al. (2015). Recientemente, Ruiz-Ortegón et al. (2022) realizaron un muestreo utilizando la toma de agua marina de un buque de investigación y filtrando con una malla de 45 μ m oscilando el tamaño de sus partículas entre 45 y 193 μ m (media: 67 μ m). Dada la fragmentación de los objetos de plástico más grandes ya presentes

en el medio marino, se espera que esta fracción de ítems más pequeños siga en aumento aún incluso si se cesara la introducción de plásticos en el medio ambiente (Werner et al., 2016). Como se expresó anteriormente, la posibilidad de muestrear microplásticos de tamaños más pequeños es una ventaja del ingenio de muestreo método empleado en este estudio, el cual es menos discriminatorio que otras técnicas que no pueden alcanzar tan fácilmente las fracciones por debajo de las 300 µm.

B) Distribución de colores

La distribución de los colores de las partículas obtenida en este estudio es muy consistente con los trabajos anteriores (Tabla 3.1), donde el azul, el negro y el rojo figuran entre los colores predominantes. El azul y el negro también se encuentran entre los colores predominantes citados por varios autores en artículos sobre la ingestión de pescado (Bellas et al., 2016; Murphy et al., 2017; Steer et al., 2017), incluida la publicación de Herrera et al. (2019), de peces en aguas canarias, o las fibras ingeridas mayoritariamente por los erizos diadema estudiados por Sevillano-González et al. (2022) también en Canarias. Según un estudio de Lenz et al. (2015) el azul es el color que diferenciamos más fácilmente, seguido del verde y el rojo, de manera que esta predominancia podría también venir dada por la facilidad de identificación visual por parte de la persona observadora en el estudio.

C) Diferencias entre aguas costeras y oceánicas

La basura marina suele ser más abundante en las zonas costeras poco profundas (<40 m de profundidad) (Browne et al., 2010), con la excepción de algunas zonas de acumulación en mar abierto (Katsanevakis, 2008). Estas observaciones son consistentes con este estudio, donde la concentración de partículas muestreadas en el Banco de Ensayos (aguas costeras y poco profundas) es significativamente mayor que la concentración obtenida en muestras oceánicas: 13.54±14.30 partículas/m³, frente a 8.50±8.49 partículas/m³. Esta diferencia también fue advertida por Cincinelli et al. (2017), quienes tomaron muestras en el Mar de Ross, cerca de la costa y en aguas más alejadas, vinculando en su discusión la mayor concentración de microplásticos en aguas costeras con la influencia de la estación científica Mario Zuchelli y el efluente de la planta de tratamiento de aguas residuales. De manera similar, en nuestro caso, el Banco de Ensayos se encuentra a 2 millas náuticas de la costa, justo frente a la desembocadura de un barranco, y en el trayecto de una corriente marina procedente de las inmediaciones de la ciudad más grande de la isla, siendo todos ellos factores que pueden contribuir a una mayor abundancia de microplásticos.

D) Diferencias entre las muestras en navegación y las estacionarias

Existe cierta desemejanza al comparar las muestras tomadas en navegación (4.81±3.88 partículas/m³) frente a las tomadas en modo estacionario (8.50±8.49 partículas/m³ para estaciones oceánicas y 13.54±14.30 partículas/m³ para estaciones costeras) que ha de ser abordadadenuevoprestandoatenciónaltipodepartícula.Así,ladiferencianoparecesignificativa para el caso particular de los fragmentos, siendo preciso realizar una investigación dirigida a este

factor para poder corroborar si la hidrodinámica derivada en el movimiento del barco podría influir en una mayor captación de fibras por parte del sistema de circulación de agua marina de la embarcación. Este factor no se tiene en cuenta en los estudios de Lusher et al. (2014) y Kanhai et al. (2017) que combinaron muestras recolectadas bajo un rango de velocidades del barco de o a 10 nudos. De esta manera, nuestros resultados parecen indicar que podría haber una subestimación de la concentración de fibras durante la navegación, pudiendo tratarse de un error atribuido al sistema de captación durante las condiciones de navegación.

3.5 Conclusiones

El uso del ingenio de muestreo de microplásticos acoplado al sistema de bombeo y circulación de agua marina de los barcos muestra un gran potencial como una forma de aumentar el esfuerzo de monitorización de la contaminación por microplásticos, obteniendo información sobre la abundancia y distribución de estas partículas de una manera comparable a otros estudios y proporcionando, al mismo tiempo, otras ventajas adicionales: (i) el artefacto de muestreo está totalmente fabricado con materiales estándar, siendo rentable y asequible, y no requiere de personal cualificado para su montaje, ni equipos de asistencia para su puesta en marcha y remolque, al ser de pequeña envergadura y fácil operación; (ii) puede emplearse para reportar datos aprovechando campañas oceanográficas y otras plataformas en el mar sin interferir en sus actividades rutinarias o previstas; (iii) es altamente versátil; (iv) preciso y comparable; y (v) es adecuado para muestrear microplásticos (tanto fibras como fragmentos) en un espectro de tamaño que abarca fracciones más pequeñas de las muestreadas con otros métodos (hasta 50 µm en este ensayo en particular).

A diferencia de la mayoría de los estudios publicados hasta la fecha que reportan registros únicos en el tiempo, este trabajo representa el primer esfuerzo de monitorización de microplásticos en el área al repetir el mismo procedimiento durante tres campañas oceanográficas consecutivas en la misma zona geográfica. Se encontraron microplásticos en todas las estaciones y transectos muestreados. Predominaron las fibras (64.42%) frente a los fragmentos (35.58%), estando la concentración hallada dentro de los rangos reportados en otras áreas del Atlántico.

Es conveniente continuar profundizando en investigaciones de este tipo para comprender cómo pueden afectar factores como la velocidad de navegación y la profundidad de muestreo a este método de muestreo. Asimismo, todavía se requiere un mayor número de estudios de monitorización de este tipo de manera que se pueda aumentar la cobertura espacial y temporal de los reportes de contaminación por microplásticos y así identificar la posible influencia de los factores ambientales en las concentraciones y tendencias tanto en Canarias como en otras regiones marinas.



-CAPÍTULO 4-

4

MuMi: un Muestreador de Microplásticos diseñado para su uso por embarcaciones de oportunidad registrado como Modelo de Utilidad

Resumen

En este capítulo se describe la invención de un muestreador de microplásticos, MuMi, con los detalles y las reivindicaciones que le otorgan su condición como Modelo de Utilidad 202100078 según la Resolución de Concesión de la Oficina Española de Patentes y Marcas (OEPM) del 21/09/2021 en la que se concede la solicitud, la cual puede consultarse en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial (BOPI) de fecha 27/09/2021, y a través del servicio de Consulta de Expedientes OEPM (CEO) de la web de la OEPM (*www.oepm.es*).

El diseño de este muestreador de microplásticos vino motivado por la necesidad de ampliar las posibilidades de observación oceánica y monitorización de la contaminación por microplásticos y favorecida por las ocasiones de su puesta en práctica en colaboración con distintas plataformas de oportunidad, como lo son las embarcaciones de turismo científico, observación de cetáceos, así como las de particulares y proyectos del sector del ocio y recreación náutica.

4.1 Antecedentes de la invención

Son conocidos en el estado de la técnica diversos dispositivos y sistemas de filtración diseñados para la separación de las partículas de plástico inferiores a 5 mm presentes en la superficie marina. No obstante, la mayoría de éstos están basados en el arrastre de redes de Neuston o Plancton (Barrows, 2017; Mai et al., 2018; Prata et al., 2019).

Estos sistemas, cuyo funcionamiento se basa en el arrastre mediante el remolque de la propia embarcación, mantienen una flotabilidad positiva con la ayuda de accesorios de flotación. Así, la boca de entrada se mantiene en la película superior de la superficie marina, realizando un efecto de filtrado, reteniendo en una malla las partículas de plástico no deseadas en el medio. Generalmente, la luz de malla ronda las 300 µm, aunque actualmente se comercializan distintos diseños personalizados, pudiendo elegir la luz de malla y el tamaño de las aberturas (Eriksen et al., 2018).

A pesar de estar ampliamente extendidos, dichos dispositivos no están exentos de inconvenientes. La aplicación de los mismos para el muestreo de microplásticos en la superficie del medio marino conlleva una serie de limitaciones técnicas que implican desventajas. Entre ellas, tal y como se explicaba en el Capítulo anterior, la inexactitud a la hora de calcular el volumen muestreado debido a la turbulencia del agua y su ineficiencia para recuperar microplásticos inferiores a 300 µm debido a la limitación del tamaño de la malla. Además, la ventana de operación de estos sistemas está restringida a condiciones de mar relativamente tranquilas, con un límite máximo de velocidad de remolque de 3 nudos. Si bien existen algunos modelos de utilidad ya registrados cuyo objeto es la eliminación de micropartículas de plástico, como el Modelo de Utilidad U201931368, que comprende una cámara de evaporación con una salida de evaporado conectada a una estación de filtrado principal con filtros electrostáticos, no se ha encontrado no obstante, ningún documento ni antecedente que se aproxime al objeto de la presente invención, que es el de obtener un dispositivo de muestreo de microplásticos para el medio acuático mediante su remolque aplicado a un rango más amplio de embarcaciones, simplificando la técnica y adaptando el diseño a las condiciones hidrodinámicas del medio. Idealmente ha de ser un modelo sencillo que no requiera de personal cualificado para su montaje, ni equipos de asistencia para su puesta en marcha y remolque, de pequeña envergadura y fácil operación.

4.2 Descripción de la invención

La invención descrita en este capítulo se refiere a un dispositivo que permite el muestreo de microplásticos de hasta 50 µm de tamaño, presentes en medio acuático, bien sea marino, o dulce, solventando una serie de inconvenientes que presentan los métodos actuales para llevar a cabo esta tarea, basados principalmente, como ya se ha mencionado, en el sistema de colecta mediante el remolque de una red de plancton.

El procedimiento para la recogida de estas partículas mediante el uso de este dispositivo está basado en el remolque del mismo por una embarcación de pequeña envergadura, como pueden ser embarcaciones de recreo, de pesca recreativa, de turismo náutico, etc.

La instalación del dispositivo no requiere ninguna especificación técnica compleja, pudiendo ser utilizado por un amplio rango de plataformas de muestreo. En general, el dispositivo posee una serie de especificaciones técnicas, que se describirán más detalladamente a continuación, y que resultan de especial interés para su aplicación en embarcaciones pequeñas, con menos tecnología o personal a bordo, como pueden ser las embarcaciones de recreo o las lanchas de pesca artesanal, entre otras.

Todas estas características dan como resultado un aumento considerable en la ventana de oportunidad de muestreo, que multiplicada por la versatilidad de las posibles plataformas desde las cuales se puede operar el dispositivo, conduce a una oportunidad real para mejorar la monitorización de microplásticos en aguas oceánicas.

Más en particular, el dispositivo de muestreo de microplásticos para un medio acuático comprende medios de tracción configurados para remolcar el dispositivo a través del medio acuático, al menos una primera abertura para la entrada de un caudal de agua de dicho medio acuático, y medios de filtrado de dicho caudal de agua. Dicha configuración permite tener un control del caudal de agua que entra a través de dicha primera abertura, estableciendo una medida precisa de las muestras recogidas de microplásticos a través de los medios de filtrado por unidad de volumen de agua, derivando a partir de ello la concentración de microplásticos en el medio acuático.

Como se ha mencionado, el dispositivo puede emplearse para muestrear microplásticos aprovechando las campañas oceanográficas sin interferir en sus actividades regulares de la embarcación, o sin necesidad de limitar la velocidad, y por lo tanto influir en el costo del monitoreo. De la misma forma, ofrece la posibilidad de ser utilizado desde embarcaciones de pequeña envergadura, sin necesidad de tener un barco con grúa para remolcar el dispositivo de tomas de muestras, ni de tripulación para su operación, como pueden ser las embarcaciones de recreo, lanchas de pesca artesanal. etc.

Más concretamente, la primera abertura va situada en una pieza de cabecera del dispositivo, según el sentido de navegación por el medio acuático, de manera que el caudal de agua entra de modo natural al interior del dispositivo, a medida que éste avanza por el medio acuático, al ser arrastrado por la embarcación que lo transporta. Ventajosamente, la abertura presenta una morfología que facilita la conducción del agua hacia el interior del dispositivo, donde se ubican unos medios de filtrado. Preferiblemente la pieza de cabecera es de forma redondeada para facilitar la hidrodinámica del dispositivo.

Complementariamente, los medios de tracción son al menos un agujero situado en la pieza de cabecera del dispositivo, al cual se conecta un cabo que será el lazo de remolque para la pequeña embarcación.

Según otro aspecto de la invención, el dispositivo de muestreo de microplásticos comprendemedios de orientación del mismo para una navegación estable a través del medio acuático. De este modo el dispositivo se mantiene de modo constante en el sentido de avance de la embarcación, posibilitando la continuidad en el sentido de entrada y salida del caudal de agua, minimizando el riesgo de que los microplásticos captados vuelvan a salir por la primera abertura, como consecuencia de turbulencias en el flujo de agua. Específicamente, los medios de orientación son al menos una aleta, diseño ampliamente contrastado en el medio acuático que posibilita la estabilidad en la navegación.

Opcionalmente, los medios de orientación están situados en una pieza final del dispositivo, permitiendo mantenerlo con las condiciones de flotabilidad e hidrodinamismo más beneficiosas posible, dado que el agua, ya filtrada, puede regresar al mar sin causar turbulencias que desestabilicen el dispositivo. Así, la pieza final comprende una segunda abertura para la salida del caudal de agua que entra por la primera abertura. De este modo el caudal de agua pasa a través del dispositivo de modo limpio, y con mínima generación de turbulencias, no representando apenas resistencia al avance por el medio acuático. Preferentemente la segunda abertura se encuentra situada en el extremo opuesto del dispositivo, incidiendo en los efectos mencionados.

Según otro aspecto de la invención, el dispositivo de muestreo de microplásticos comprende medios de medida del caudal de agua que entran por la primera abertura, de modo que es posible establecer la cantidad de microplásticos por unidad de volumen de agua, permitiendo así reportar concentraciones de estas partículas.

Ventajosamente, los medios de medida son un caudalímetro electrónico, el cual está preferentemente conectado a un cable de datos, configurado para conectarse a una pantalla a bordo de una embarcación que remolca el dispositivo, lo cual permite visualizar el volumen de agua filtrado directamente desde la embarcación y en todo momento.

Así, y por medio de la medida del flujo en la entrada del dispositivo se hace posible recuperar información sobre la abundancia y distribución de microplásticos de manera comparable a otros estudios anteriores y posteriores, superando uno de los principales inconvenientes de las técnicas de arrastre de red que es que el volumen muestreado es difícil de calcular, incluso en los diseños provistos de un medidor de flujo, conllevando una inexactitud en la medida al tratar convertir la cantidad de partículas recolectadas en concentraciones por volumen de agua. Precisamente, este tema se investiga con más detalle en <u>el siguiente</u> <u>Capítulo</u>. Los medios de medida, o en otras palabras, caudalímetro, van situados en una primera pieza intermedia, tras una pieza de cabecera, aportando un mayor equilibrio en la navegación del dispositivo de muestreo, evitando un excesivo cabeceo en su arrastre.

Precisar que la pieza intermedia es una pieza anular configurada especialmente

para alojar el caudalímetro. Así, tras la entrada, todo el volumen de agua que va a ser muestreada pasa por dicho caudalímetro. Al tratarse de un aparato electrónico, a montar dentro de un aparato que cumplirá su función sumergido, esta pieza o sección del dispositivo se encuentra de modo preferente totalmente sellada, con solamente un orificio necesario para la salida del cable del caudalímetro hacia la embarcación.

Según una realización preferente de la invención, los medios de filtrado van situados en al menos una segunda pieza intermedia, de modo que el filtrado de los



Fig.4.1: Dispositivo de muestreo de microplásticos, constituido de acuerdo con la invención descrita en este capítulo.

microplásticos se efectúa tras la entrada y la medida del caudal de agua.

Más en particular, el dispositivo de muestreo de microplásticos comprende una pluralidad de segundas piezas intermedias con varios medios de filtrado. De este modo se pueden montar filtros adicionales al pasar por áreas con más material particulado de cara a evitar obstrucciones. Dichos medios de filtrado puede ser escalables al caudal deseado adaptando el diámetro. Idealmente, los medios de filtrado mantienen el mismo diámetro que el resto del dispositivo, manteniendo las condiciones positivas de hidrodinamismo. Así se llega a un diseño compacto, hidrodinámico y manejable, permite además intercambiar los filtros fácilmente tras su uso, lo cual permite realizar muestreos sucesivos sin tocar tierra, dado que el dispositivo ofrece la posibilidad de realizar varios muestreos en una misma travesía, ya que cuenta con un set de filtros intercambiables. Esto posibilita un filtrado más o menos fino, mediante la incorporación de distintas unidades de filtros intercambiables de diferentes tamaños, tanto de su diámetro como de los orificios de paso de los medios de filtrado.

En una realización preferida de la invención, los medios de filtrado de la segunda pieza intermedia comprenden una pared transversal a la dirección de paso del caudal de agua, dicha pared transversal comprendiendo una pluralidad de orificios, a través de los cuales se canaliza el caudal de agua para su filtrado.

Adicionalmente, los medios de filtrado comprenden una malla de filtro, la cual, preferentemente, es extraíble y reemplazable, habilitando un filtrado y una detección más fina de microplásticos.

En cuanto al rango de tamaño, cabe mencionar que los medios de filtrado son adecuados para muestras de microplásticos, tanto fibras como fragmentos de hasta 50 µm, siendo ésta un área emergente de estudio y muy importante para futuras investigaciones debido al mayor riesgo ecológico que representan estas partículas más pequeñas.

En el caso de las redes de arrastre, la fracción de tamaño a menudo se limita a 330 ó 200 µm debido a la tensión del agua, hecho que se cree que subestima las concentraciones totales de microplásticos en uno a cuatro órdenes de magnitud en comparación con las muestras que se filtran a través de mallas mucho más pequeñas (por ejemplo, menores de 100 µm).

Señalar por otro lado que, una vez alcanzado el volumen de muestreo deseado, se recupera el dispositivo tirando del cabo, se endulza, y se procede a la retirada de los filtros para su almacenaje y posterior análisis. Si en la misma jornada se desea hacer un segundo muestreo, se pueden montar filtros nuevos y volver a lanzar el dispositivo.

Cabe precisar que la malla de filtro va situada en un alojamiento de la segunda pieza intermedia, y apoyada sobre la pared transversal, de modo que se mantiene en una posición estable, aun pasando a su través un caudal de agua con un cierto grado de turbulencias.

ESQUEMA DE COLOCACIÓN Y FUNCIONAMIENTO DEL MUMI, MUESTREADOR DE MICROPLÁSTICOS.





Según otro aspecto de la invención, al menos una de la pieza de cabecera, primera pieza intermedia, segunda pieza intermedia y pieza final, presenta una sección anular, representando una forma natural para el paso del caudal de agua, ofreciendo una menor resistencia a su paso.

En una realización preferida de la invención, al menos dos del grupo de la pieza de cabecera, primera pieza intermedia, segunda pieza intermedia y pieza final, comprenden una rosca, de manera que posibilita el ir ensambladas entre sí de modo roscado.

Más específicamente, la primera pieza intermedia y/o al menos una segunda pieza intermedia comprenden una rosca en su superficie interior y otra rosca en su superficie exterior de modo que se hace posible el enroscarse varias entre sí de ser necesario.

Opcionalmente, las distintas piezas que conforman el dispositivo van ensambladas entre sí de modo roscado, ofreciendo una mayor facilidad de montaje, y de reemplazo de cada una de las distintas piezas, de modo separado.

Señalar por otro lado, que el material queconformaeldispositivoesbiodegradable, siendo preferentemente PLA, un poliéster poliláctico biodegradable derivado del maíz. Así, aumenta la coherencia del diseño, pues su uso final será el de estudiar la abundancia de microplásticos dado el grave problema ambiental que estos suponen, sin estar a su vez fabricado con ellos. Mencionar asimismo que el material PLA, permite la impresión 3D, consiguiendo un dispositivo rentable y asequible, de bajo costo económico.

En la Figura. 4.1 se muestra, a título de ejemplo no limitativo, un dispositivo de

muestreo de microplásticos, constituido de acuerdo con la invención, que se describe con más detalle a continuación.

4.3 Descripción de una realización preferente

Según se puede observar en la Figura 4.2, el dispositivo de muestreo de microplásticos (MuMi) es arrastrado en un medio acuático por una embarcación (1) mediante unos medios de tracción (2). El tipo de embarcación varía en función de la oportunidad de muestreo que se presente, siendo esta adaptabilidad una de las ventajas del MuMi, que puede ser empleado en distintas circunstancias y navegaciones de oportunidad en plataformas de distintas envergaduras y destinadas a distintas actividades, desde el ocio de una canoa a la actividad profesional de un pesquero artesanal. Por las fuerzas de la propia navegación, en el dispositivo entra un caudal de agua que, en función de los niveles de contaminación de la zona, tendrá mayores o menores niveles de microplásticos. Un cable de datos (3) conecta el dispositivo de muestreo con una pantalla (4) presente en la embarcación (1) de modo que se pueden ir viendo los diversos valores del caudal de agua y valorar el volumen de agua filtrado en tiempo real. Esta característica permite controlar con precisión en qué momento se ha de detener el muestreo, si éste se diseña teniendo en cuenta un volumen de agua a filtrar determinado. Una vez alcanzado el volumen deseado, se retira el dispositivo del agua, obteniendo del número de partículas

retenidas la concentración de partículas en la zona muestreada de manera precisa.

Según se puede observar en la Figura 4.1, el dispositivo de muestreo comprende en su esquema una pieza de cabecera (I), una pieza anular intermedia donde va alojado el caudalímetro (II), varios filtros apilados mediante un engarce con roscas (III) y una pieza final (IV), la cual incluye unos medios de orientación que en particular pueden ser al menos una aleta, si bien el diseño de la figura presenta dos, otorgando así una mayor estabilidad. Se puede apreciar, además, la forma aerodinámica del dispositivo para una adecuada navegación por un medio acuático.

En la Figura 4.3, se puede observar con detalle cada una de estas piezas en las distintas vistas, lateral, planta y alzado, así como el montaje completo a mayor tamaño apreciar mejor los detalles que permiten al MuMi desarrollar su total funcionalidad para el muestreo de microplásticos al ser remolcado por una embarcación de oportunidad.

Cabe destacar que los portafiltros ubicados en el cuerpo de filtrado comprenden una pared transversal a la dirección de paso del caudal de agua con una pluralidad de orificios, los cuales presentan una forma de hexágonos, distribuidos en panal, o círculos.

- CAPÍTULO 4 -

RELACIÓN DE VISTAS DEL DISEÑO DEL MUESTREADOR DE MICROPLÁSTICOS (MUMI)



Fig.4.3: Relación de vistas del dispositivo de muestreo de microplásticos MuMi.

Sobre esta disposición, se configuran las mallas de filtro de los tamaños de luz de malla deseados, que serán preferentemente de nylon y han sido probados con resultados satisfactorios hasta un tamaño de 50 µm.

Por último señalar que el material que conforma el dispositivo es biodegradable, manteniendo así un diseño coherente con el fin para el que se crea. Si bien los detalles, las formas, las dimensiones y demás elementos accesorios, así como los componentes empleados en la implementación del dispositivo de muestreo de microplásticos, pueden ser convenientemente sustituidos por otros que sean técnicamente equivalentes, y no se aparten de la esencialidad de la invención ni del ámbito definido por las reivindicaciones que se incluyen a continuación de la siguiente lista, se ha descrito hasta este punto el diseño de MuMi que ha sido registrado satisfactoriamente como Modelo de Utilidad y testado en varias campañas de muestreo de diferente índole.

4.4 Reivindicaciones

Las reivindicaciones de una patente o un modelo de utilidad definen el objeto para el que se solicita la protección. Tal y como indica la *Oficina Española de Patentes y Marcas* (OEPM), deben ser claras y concisas y han de fundarse en la descripción, que sirve para interpretar estas reivindicaciones. Una reivindicación puede referirse a un producto, un procedimiento o una utilización.

A continuación se enumeran las reivindicaciones con las que se ha concedido al Muestreador de Microplásticos (MuMi) la protección como Modelo de Utilidad, conteniendo la esencia de la invención.

- Dispositivo de muestreo de microplásticos (MuMi) para un medio acuático caracterizado porque comprende medios de tracción configurados para remolcar el dispositivo a través del medio acuático, al menos una primera abertura para la entrada de un caudal de agua de dicho medio acuático, y medios de filtrado de dicho caudal de agua.
- Dispositivo de muestreo de microplásticos según la reivindicación 1, caracterizado por que la primera abertura va situada en una pieza de cabecera del dispositivo, según el sentido de navegación por el medio acuático.
- **3.** Dispositivo de muestreo de microplásticos según la reivindicación 2, caracterizado

por que los medios de tracción son al menos un agujero situado en la pieza de cabecera del dispositivo.

- 4. Dispositivo de muestreo de microplásticos según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que comprende medios de orientación del dispositivo para una navegación estable a través del medio acuático.
- Dispositivo de muestreo de microplásticos según la reivindicación 4, caracterizado por que los medios de orientación son al menos una aleta
- Dispositivo de muestreo de microplásticos según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5, caracterizado por que los medios de orientación están situados en una pieza final del dispositivo.
- 7. Dispositivo de muestreo de microplásticos según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la pieza final comprende una segunda abertura para la salida del caudal de agua que entra por la primera abertura.
- Dispositivo de muestreo de microplásticos según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que comprende medios de medida del caudal de agua que entran por la primera abertura.
- **9.** Dispositivo de muestreo de microplásticos según la reivindicación 8, caracterizado

por que los medios de medida son un caudalímetro electrónico.

- Dispositivo de muestreo de microplásticos según cualquiera de las reivindicaciones
 8 a 9, caracterizado por que los medios de medida van situados en una primera pieza intermedia.
- **11.** Dispositivo de muestreo de microplásticos según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que los medios de filtrado van situados en al menos una segunda pieza intermedia.
- **12.** Dispositivo de muestreo de microplásticos según la reivindicación 11, caracterizado por que comprende una pluralidad de segundas piezas intermedias con una pluralidad de medios de filtrado.
- **13.** Dispositivo de muestreo de microplásticos según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 12, caracterizado por que los medios de filtrado de la segunda pieza intermedia comprenden una pared transversal a la dirección de paso del caudal de agua, dicha pared transversal comprendiendo una pluralidad de orificios.
- 14. Dispositivo de muestreo de microplásticos según la reivindicación 13, caracterizado por que los medios de filtrado comprenden una malla de filtro.
- **15.** Dispositivo de muestreo de microplásticos según la reivindicación 14, caracterizado por que la malla de filtro va situada en un alojamiento de la segunda pieza intermedia, y apoyada sobre la pared transversal.
- 16. Dispositivo de muestreo de microplásticos según las reivindicaciones 2 y 6 y 10 y 11, caracterizado por que al menos una de la pieza de cabecera, primera pieza

intermedia, segunda pieza intermedia y pieza final, presenta una sección anular.

- **17.** Dispositivo de muestreo de microplásticos según la reivindicación 16, caracterizado por que al menos dos del grupo de la pieza de cabecera, primera pieza intermedia, segunda pieza intermedia y pieza final, comprenden una rosca.
- **18.** Dispositivo de muestreo de microplásticos según la reivindicación 17, caracterizado por que la primera pieza intermedia y/o la al menos una segunda pieza intermedia comprenden una rosca en su superficie interior y otra rosca en su superficie exterior.
- Dispositivo de muestreo de microplásticos según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, caracterizado por que las distintas piezas que conforman el dispositivo van ensambladas entre sí de modo roscado.
- 20. Dispositivo de muestreo de microplásticos según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el material que conforma el dispositivo es biodegradable.



-CAPÍTULO 5-

5

Estudio comparativo de métodos para el muestreo de microplásticos en aguas marinas superficiales: la red Manta y el Muestreador de Microplásticos (MuMi).

Resumen

El uso de la red Manta se ha generalizado como uno de los sistemas de muestreo de microplásticos en el medio marino, si bien presenta algunos inconvenientes. Este estudio compara este método con el uso de un innovador muestreador de microplásticos, denominado MuMi, protegido como Modelo de Utilidad (202100078), y descrito en <u>el Capítulo 4</u>.

Los hallazgos muestran resultados muy diferentes para varios factores como el volumen filtrado, el número y el tipo de partículas y ponen de manifiesto la gran variabilidad que puede existir en los resultados de los distintos estudios a nivel mundial debido a la falta de armonización entre los métodos y a los diferentes parámetros como el tamaño de la malla de muestreo, la representatividad o la reproducibilidad de los volúmenes de muestreo.

El muestreador MuMi representa un sistema de monitorización de microplásticos muy ventajoso en términos de facilidad de operación, menor coste, capacidad de obtener muestras de partículas de menor tamaño y mayor precisión, todo ello manteniendo la representatividad de las muestras recogidas. El control sobre el volumen filtrado es una cuestión a mejorar en los muestreos con redes Manta, mientras que en el MuMi el control sobre la profundidad de muestreo podría mejorarse.
5.1 Introducción

Uno de los problemas a los que se enfrenta la humanidad en la actualidad es la excesiva cantidad de plástico que acaba en el océano cada año: al menos 14 millones de toneladas según un reciente informe (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los Recursos Naturales (UICN), 2021). Una vez en el medio marino, el plástico se desplaza y se acumula en función de factores físicos oceanográficos y biológicos, por lo que hay indicios de basura marina en todos los mares y océanos, desde las aguas superficiales hasta los sedimentos de las profundidades (van Sebille et al., 2020). La persistencia de los plásticos en la naturaleza puede acarrear graves riesgos para los seres humanos y la fauna silvestre, lo que se traduce en cambios en los ecosistemas, en la exposición a sustancias químicas, que están presentes en la composición de estos plásticos o que han sido adsorbidas en ellos en el medio marino, y en efectos letales y subletales debidos al enredo con elementos de plástico por parte de la fauna marina o a su ingestión (Rochman, 2015).

El seguimiento de los microplásticos en los diferentes compartimentos ambientales es clave para conocer el estado y el comportamiento de estas partículas sintéticas en el medio ambiente y así poder adoptar las consiguientes medidas de gestión en función de su distribución y abundancia (Lusher et al., 2021). Los métodos de muestreo elegidos deben ajustarse a los objetivos del programa de seguimiento deseado, así como seguir las directrices recomendadas o métodos que hayan sido previamente armonizados (Martin et al., 2022). Una cuestión igualmente importante destacada por Lusher et al. (2021) es que estos métodos no pueden ser estáticos, sino que deben ser lo suficientemente flexibles como para incorporar mejoras a medida que se desarrollen.

Bajo estas premisas, se han redactado directrices para la armonización de los reportes de microplásticos con el fin de, sin recomendar un método sobre otro, garantizar que se proporcione un conjunto de información básica, como el tamaño de la malla y su apertura, para que los resultados puedan ser lo más comparables posible (Cheshire y Adler, 2009; Galgani et al., 2013). En un esfuerzo por armonizar las metodologías y mejorar la comparabilidad de los programas de seguimiento nacionales e internacionales, el Grupo de Expertos en Aspectos Científicos de la Protección del Medio Marino (GESAMP, 2019) proporcionó una serie de recomendaciones sobre los métodos para desarrollar las mejores estrategias de seguimiento en función de los objetivos que se persigan en los cuatro compartimentos ambientales principales (es decir, la línea de costa, la superficie del mar/columna de agua, el fondo marino y la biota).

Dentro de éstos, los océanos son especialmente difíciles de monitorizar, ya que son zonas de enorme superficie y volumen, en constante movimiento y afectadas por numerosos procesos físicos, químicos y biológicos (Chester y Jickells, 2012; Kvale et al., 2020). Además, si la intención con el programa de seguimiento es detectar pequeños cambios en la abundancia, o tendencias más precisas, el muestreo deberá ser correspondientemente más exhaustivo, requiriendo un mayor número de muestras. En este sentido, el muestreo oportunista, en el que la monitorización de los microplásticos se integra en un programa de investigación existente, se presenta como un formato viable y rentable (GESAMP, 2019; Lusher et al., 2021). Estas razones hacen que la optimización del muestreo de microplásticos en el medio marino sea aún hoy en día un reto en desarrollo, para el que se han probado numerosos métodos (Sönmez et al., 2022) y donde los esfuerzos hacia la armonización y estandarización para comparar los resultados siguen siendo vigentes (Michida et al., 2019).

Hace ya una década, Hidalgo-Ruz et al. (2012) publicaron una revisión de los diferentes métodos de muestreo de microplásticos en el medio ambiente, donde para el caso concreto de las muestras acuáticas, se identificaron 33 estudios en los que se utilizaron hasta 5 tamaños de malla diferentes y varias profundidades. En la misma línea, Barrows (2017) revisó los diferentes métodos existentes para el muestreo de microplásticos en entornos acuáticos, diferenciando entre los que recogen volúmenes específicos de agua que se filtran a posteriori (como las muestras tomadas con pequeños recipientes por la borda o de botellas Niskin) o los estudios de muestreo de redes más extendidos. Su conclusión fue que la mejor opción para lograr una comprensión más completa de la distribución y abundancia de microplásticos en un entorno determinado sería una combinación de métodos. Como antecedentes propios en este campo, se han llevado a cabo varias pruebas de seguimiento de microplásticos en aguas superficiales marinas tanto desde buques de investigación como desde embarcaciones más pequeñas y recreativas, y probando tanto sistemas de bombeo continuo de agua como métodos de recogida mediante el uso de las botellas niskin de la roseta (Montoto-Martínez et al., 2018).

Entre la diversidad de métodos de muestreo, las redes Manta ha sido la opción predominante para el muestreo de aguas superficiales (GESAMP, 2019; Mai et al., 2018). Este método ha sido favorecido para el muestreo de microplásticos por parte de diferentes actores interesados, desencadenando campañas de monitorización llevadas a cabo por instituciones públicas, privadas y también organizaciones medioambientales. Sin embargo, a pesar de su popularidad, presenta algunas desventajas que podrían estar falseando la abundancia de microplásticos, como la inexactitud en el cálculo del volumen muestreado debido a la turbulencia del agua, o su ineficiencia en la recuperación de microplásticos menores de 300 µm debido a la limitación del tamaño de la malla (Eriksen et al., 2018; GESAMP, 2019; Mai et al., 2018; Montoto-Martínez et al., 2020). Como señalaron Martin et al. (2022), el muestreo con redes de arrastre es poco práctico cuando hay una gran biomasa o condiciones meteorológicas adversas. Además de esto, atribuible en parte a la limitación de la apertura de la red, las cantidades totales de microplásticos flotantes pueden estar subestimadas por un factor de 1.04 a 30.0 (Kooi et al., 2016).

El objetivo de este estudio fue el de comparar el método de muestreo más utilizado y aceptado a nivel mundial, aunque con sus inconvenientes, la red Manta, con el innovador dispositivo de muestreo de microplásticos presentado en el capítulo anterior y denominado MuMi, que fue diseñado y fabricado específicamente para superar algunos de estos inconvenientes y ha sido registrado como Modelo de Utilidad (Montoto-Martínez et al., 2021). Así pues, se pretende dilucidar las ventajas e inconvenientes de uno y otro con el fin de perfeccionar su aplicabilidad.

5.2 Material y Métodos

5.2.1 Zona de muestreo

La zona de estudio se sitúa en el sur de Tenerife, isla del archipiélago canario (España). La franja costera frente a la que se realizaron los transectos está fuertemente antropizada e influenciada por la industria del turismo de sol y playa, con un gran número de infraestructuras hoteleras y de abastecimiento y gestión del agua que dan lugar a un gran censo de vertidos al mar (Gobierno de Canarias - Consejería de Transición Ecológica, Lucha contra el Cambio Climático y la Planificación Territorial, 2017). Además, la franja marina adyacente está catalogada como Zona Especial de Conservación ZEC ES7020017 Franja marina de Teno-Rasca (Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino, 2011), especialmente por la presencia de cetáceos, con presencia de especies residentes como calderones (*Globichephala macrorhynchus*) y delfines mulares (*Tursiops truncatus*) (Fig. 5.1). Vinculado a este hecho, en esta misma zona se desarrollan numerosas empresas de avistamiento de cetáceos y otras actividades recreativas, por lo que consideramos que es un lugar que requiere y se beneficiará de un seguimiento en cuanto a la calidad ambiental de sus aguas, incluyendo la contaminación por microplásticos.



Fig.5.1: a) Mapa de localización del área de muestreo, en el sur de Tenerife, Islas Canarias (España). Cada una de las líneas (I-VI) representa un transecto de una milla. b) Las franjas de color en el mar delimitan las Zonas de Especial Conservación. En concreto, el muestreo se realizó en la franja marina ZEC ES7020017 Teno-Rasca. Mapa base: IDECanarias Ortofotos Satélite SENTINEL-2 Super Resolution.

5.2.2 Estrategia de muestreo

Las muestras se recogieron durante una campaña a bordo del catamarán Marhaba el 17 de junio de 2020. La navegación se inició a la salida del puerto de Los Gigantes y se realizó en dirección sureste, navegando a una milla de la costa, recorriendo gran parte del litoral más antropizado de la isla. Las condiciones del mar fueron óptimas durante el día, realizándose todos los lances con luz diurna y con condiciones de la escala de Beaufort entre 0 y 2.

Se realizaron un total de seis transectos de una milla (medidos por coordenadas GPS) a una velocidad de unos tres nudos, manteniendo el rumbo paralelo a la costa. En cada uno de los transectos, los dos métodos de muestreo a comparar, la red de arrastre Manta y el dispositivo MuMi, se lanzaron desde la popa del barco (Fig. 5.2). Permanecieron el mismo tiempo en el agua, aproximadamente 20 minutos, barriendo simultáneamente la superficie del mar.



Fig.5.2: Vista de la disposición de muestreo de ambos sistemas ensayados: la red Manta y el muestreador MuMi. a) Tabla comparativa de las principales características de muestreo. b) Esquema detallado de las partes del muestreador MuMi, registrado como Modelo de Utilidad (20211000078). Ver Capítulo 4 para más detalle.

5.2.3 Red Manta

La red de Manta utilizada en este estudio se montó con medios propios, utilizando un marco de aluminio con una boca rectangular de 60 cm de ancho y 25 cm de alto y una red de nylon con una malla de 200 µm, que se fijó al marco. En el extremo de la red se colocó un copo desmontable con una malla de 200 µm mediante abrazaderas. Esta pieza se fabricó con tubos de polipropileno gris de 3 mm de espesor, con una longitud de 23 cm y un diámetro de 11 cm.

Una vez posicionado en el punto de inicio del transecto, se lanzó la red Manta desde la popa del barco y se inició la navegación. Una vez alcanzada la milla náutica (NM), se tiró de los cabos para recuperar la estructura a bordo, donde se enjuagó la red con chorros de agua de mar, para que todo el material atrapado en la longitud de la red pasara por el copo (Imagen 5.1). Una vez limpia la red, se desprendió el extremo del tubo y se vació el contenido en botes de plástico para su posterior filtrado, digestión y análisis en los laboratorios de tierra (Imagen 5.2). Toda la red y el copo se limpiaron a fondo con agua de mar antes de volver a salir para un nuevo transecto. El volumen de agua muestreado por la red Manta se calculó según las estimaciones de Karlsson et al. (2020).



Imagen 5.1 Lavado de la red Manta aplicando agua de mar a presión desde el exterior de la red, con el fin de recoger todo el material filtrado en el copo.



Imagen 5.2 Traspaso del material recogido en el copo a botes de rosca para su posterior filtrado, digestión y análisis en el laboratorio en tierra.

5.2.4 Muestreador de microplásticos: MuMi

El muestreador MuMi, tal y como se describe en detalle en <u>el capítulo anterior</u>, es un dispositivo que permite el muestreo de microplásticos presentes en entornos acuáticos. Una de sus principales ventajas en cuanto al diseño del muestreo es que permite el uso de filtros únicos para cada muestreo, intercambiándolos fácilmente entre transectos. Está fabricado en Ácido Poliláctico (PLA) mediante impresión 3D y cuenta con un caudalímetro incorporado que, mediante el cable de conexión y una pantalla a bordo, permite conocer y visualizar el volumen de agua filtrada directamente desde el recipiente, lo cual es otra característica muy valiosa.

Como se puede ver en detalle en la Figura 5.2b, el MuMi tiene un cabezal de entrada hidrodinámico redondeado y una abertura cuya morfología facilita la conducción del agua hacia el interior del dispositivo, donde se encuentran los filtros. Tras la entrada, todo el volumen de agua a muestrear pasa por un anillo anular que alberga el caudalímetro. A continuación, el flujo de agua pasa por el conjunto de filtros, que para el presente estudio se configuró con tres filtros de 5 mm, 200 µm y 50 µm. Finalmente, para mantener el dispositivo con las condiciones de flotabilidad e hidrodinámica más beneficiosas posibles, la cola del dispositivo se ha diseñado con las aletas que se muestran en la figura, de forma que el agua, ya filtrada, vuelve al mar sin provocar turbulencias que puedan desestabilizarla.

El funcionamiento del muestreador MuMi se basa en un sistema de arrastre similar y paralelo al de la red Manta, aunque más sencillo por sus menores dimensiones y con la diferencia de que, para disponer de información de caudal en tiempo real, se conecta a una toma de 12v que alimenta el caudalímetro. Una vez transcurrida la milla de transecto, se recupera el dispositivo MuMitirando del cabo. A continuación, se retiraran los filtros para sualmacenamiento (en bolsas zip) y posterior análisis en las dependencias del laboratorio en tierra. Antes de iniciar el siguiente transecto, se coloca un nuevo juego de filtros.



Imagen 5.3 Dispositivo MuMi una vez retirado del agua. Los filtros, 5 mm, 200 μm y 50 μm, en amarillo, están integrados en el cuerpo del muestreador.



Imagen 5.4 Finalizado el transecto, los filtros se desenroscan y almacenan en bolsas zip, y se dispone un nuevo juego para el siguiente lance.

5.2.5 Análisis en el laboratorio

Todas las muestras se trataron según el mismo procedimiento, independientemente de si las muestras habían sido tomadas con la red Manta o con el dispositivo MuMi. El material retenido se digirió en una solución de hidróxido de potasio (KOH) al 10% para eliminar la materia orgánica, tal y como recomiendan Thiele et al. (2019). Una vez degradado el material, el contenido se pasó por filtros de microfibra de vidrio Whatman[®] (Grado GF/F, 47 mm), se secó durante una noche (24h) a 60°C y se inspeccionó bajo un estereomicroscopio (Leica S9i). Snto Se anotó el número, el tamaño, el color y la forma de las partículas, sacando fotos de todos los microplásticos identificados.

5.2.6 Controles de contaminación

En todo momento se aplicaron medidas comunes para limitar el riesgo de contaminación de las muestras, extremando las mismas en las fases de manipulación en el barco. Durante la manipulación de las muestras se dispusieron filtros limpios en placas de Petri. Se colocaba un filtro nuevo por cada transecto y se situaba en la zona de operación de cada uno de los dispositivos de muestreo: en el caso del MuMi, en la mesa donde se desenroscaban los filtros y se introducían en las bolsas independientes (Imagen 5.5); en el caso de la red Manta, en la zona donde se hacía el trasvase del copo a los botes (Imagen 5.6).

En el laboratorio, de manera análoga a lo realizado en los estudios previos y especificado en el <u>Capítulo 3</u>: (1) Se usó ropa de laboratorio de algodón durante el análisis; (2) Todo el equipo se limpió y enjuagó con agua filtrada ultrapura y se revisó bajo un estereomicroscopio para detectar la contaminación aérea antes de su uso; (3) Se colocó un papel de filtro húmedo en una placa de Petri texto a las áreas de operación en el laboratorio y se revisó para detectar la contaminación aérea; (4) Se realizaron blancos de procedimiento (250 ml de agua ultrapura pasada por el sistema de filtración al vacío), sometidos al mismo tratamiento que las muestras (exposición al aire, digestión, filtración al vacío, etc.); (5) Todas las muestras se cubrieron después de cada paso del procedimiento.



Imagen 5.5 Control de contaminación mediante colocación de filtro limpio en placa petri colocado en la zona de operación del dispositivo MuMi, la mesa del barco en la que se desenroscaban y enroscaban los filtros usados y nuevos.



Imagen 5.6 Control de contaminación mediante colocación de filtro limpio en placa petri colocado en la zona de operación de la red Manta al realizar el trasvase del contenido filtrado a los botes correspondientes.

5.2.7 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico, las concentraciones de microplásticos obtenidas con cada método de muestreo se convirtieron en número de partículas por metro cúbico. Los datos no se ajustaban a los supuestos paramétricos de normalidad y homogeneidad de la varianza, por lo que se utilizaron pruebas no paramétricas (pruebas de suma de rangos de Wilcoxon) para comparar los métodos red Manta y MuMi. Del mismo modo, se utilizaron pruebas de suma de rangos de Kruskal-Wallis para comparar las concentraciones de microplásticos encontradas con los diferentes métodos entre los seis transectos. Se asumió una significación estadística de $\alpha = 0.05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el lenguaje de scripting en un entorno RStudio (RStudio Team, 2022). El mapa se produjo utilizando el software QGIS (QGIS Development Team, 2021).

5.3 Resultados

Los dos dispositivos de muestreo se utilizaron simultáneamente durante los seis transectos realizados, lo que limita los principales factores diferenciadores, aparte de las características de cada dispositivo en sí, a dos: el volumen de agua muestreado y el tamaño de la malla.

El total de litros filtrados por el muestreador MuMi, conocido por su caudalímetro incorporado, fue de 2224.8, con una media de 370.8 litros por transecto (sd = 80.5, min.= 289.9 L; max.= 512.2 L). Por el contrario, las estimaciones del volumen filtrado realizadas para la red Manta, que se basaron en la apertura de su boca (0.15 m²) y la distancia de arrastre (1 MN), siguiendo los cálculos de Karlsson et al. (2020) arrojaron un total de 833400 litros, correspondientes a 138900 litros por transecto, o expresado de otra manera, por milla náutica (Tabla 5.1).

		RED MANTA			DISPOSI	TIVO MUMI
TRANSECTO	VOLUMEN (L)	Nº MP	Nº MP/M³	VOLUMEN (L)	Nº MP	Nº MP/M³
1	138900.0	98	0.7	512.2	11	21.5
- II	138900.0	50	0.4	371.9	6	16.1
щ	138900.0	27	0.2	398.2	34	85.4
IV	138900.0	41	0.3	289.9	16	55.2
V	138900.0	13	0.1	302.6	36	119.0
VI	138900.0	40	0.3	350.0	36	102.9

 Tabla 5.1:
 Número y concentración de microplásticos identificados según método de muestreo y por transecto.

Ambos dispositivos filtraron el agua de mar a través de una malla de 200 µm, aunque el MuMi tenía una adicional de 50 µm. La distribución de las partículas se puede ver en la Figura 5.3, donde los microplásticos del MuMi se segregan además según la malla en la que se encontraron para poder comparar con los datos de la red Manta. Se encontraron partículas en cada una de las muestras tomadas, y se filtraron un total de 408 microplásticos: 269 (65.9%) con la red Manta y 139 (34.1%) con el muestreador MuMi. Según su morfología, se identificaron 250 fragmentos (61.3%), 155 fibras (38%) y 3 *pellets* (0.7%).

Los blancos de procedimiento se realizaron en paralelo con las muestras y se analizaron del mismo modo que las demás muestras para detectar microplásticos. No indicaron grandes fuentes de contaminación potencial, ya que los microplásticos encontrados en los papeles de filtro de control fueron insignificantes: nueve en total, encontrados en los distintos filtros colocados en los diferentes entornos de trabajo durante los procedimientos del barco y del laboratorio. El número medio de microplásticos recogidos por los dos sistemas fue significativamente diferente (prueba de Wilcoxon, W=34, valor p = 0.002165 < 0.05). La red Manta filtró una media de 44.8 partículas (min.=13; max.=98; sd = 29.1) frente a las 23.2 (min.=6; max.=36; sd = 13.7) que recogió el MuMi, que corresponden a 8.3 (min.= 2; max.= 19; sd = 7.2) y 14.8(min.= 2; max.= 28; sd=8.9) para las mallas separadas de 200 y 50 μ m respectivamente. La Figura5.3 muestra el total de partículas recogidas por cada método en cada uno de los transectos (puntos grises), con una línea que representa la mediana y el rombo interior la media.

En cuanto a la distribución del color, en general hubo mayoría de partículas blancas, negras, azules e incoloras (Fig. 5.4). Destaca el predominio de las partículas claras (incoloras y blancas) recogidas por la red Manta y de las azules recogidas por el muestreador MuMi, que a su vez corresponden a una mayoría de fragmentos y fibras respectivamente. Traducidos estos datos en número de partículas por volumen de agua muestreada, las concentraciones medias son de 0.3 MP/m³ (min.= 0.1; max.= 0.7; sd = 0.2) para la red Manta y de 66.6 6 MP/m³ (sd = 42.7) para el muestreador MuMi. O bien, 23.3 MP/m³ (min.= 3.9; max.= 54.3; sd = 19.9) y 43.3 MP/m³ (min.= 5.4; max.= 92.5; sd=30.3), si consideramos los tamaños de malla (200 y 50 μ m) por separado.



Fig.5.3: Boxplot que representa los microplásticos recogidos en cada uno de los transectos (cada uno de los puntos grises) según el método y el tamaño de malla (donde sólo el MuMi tiene un tamaño de malla de 50 μm). Las líneas interiores representan la mediana y los rombos la media.

Las diferencias en la abundancia de microplásticos (número de partículas por metro cúbico) son muy notables (prueba de Wilcoxon, valor p < 0.005), siendo las densidades reportadas por el muestreador MuMi mucho más altas que las de la red Manta para todos los transectos. Esto puede verse en la Figura 5.5, donde los datos de abundancia se han transformado a la escala logarítima.

El tamaño de malla adicional de 50 µm del MuMi recogió el 64% del total de partículas filtradas por este dispositivo, fracción que se diferencia en la Figura 5.5. En cuanto a la morfología de las partículas, el tipo de partícula (fibra, fragmento o *pellet*) recogido predominantemente por cada uno de los sistemas de muestreo es notablemente diferente. La mayoría de los microplásticos recogidos por la red Manta son fragmentos, frente al 5% que filtró el muestreador MuMi. Por lo tanto, las comparaciones entre métodos o entre transectos también están necesariamente relacionadas con este factor, una cuestión sobre la que se profundiza en la discusión.



Fig.5.4: Distribución de colores de las partículas identificadas, según modo de muestreo (Red Manta, Muestreador MuMi) y tipo de partícula: fibra, fragmento o pellet.

- CAPÍTULO 5 -



Fig.5.5: Distribución de los tamaños de partícula según el modo de muestreo (Red Manta, Muestreador MuMi), tamaño de malla y tipo de partícula: fibra, fragmento o pellet.



Fig.5.6: Abundancia de partículas encontradas en cada transecto según el modo de muestreo y diferenciadas según la morfología.Sólo se tienen en cuenta aquellas filtradas con la malla de 200 µm en el caso del MuMi.

Las diferencias en las densidades declaradas entre los dos métodos son significativas según el T-Test para muestras emparejadas (valor p = 0.01276 < 0.05). Sin embargo, ninguno de los dos métodos muestra una diferencia significativa entre los transectos. Por lo tanto, en este trabajo consideramos los seis trantos realizados como seis réplicas de prueba de ambos métodos de muestreo.

Analizando los resultados en base a la distribución de tamaños de las partículas identificadas, encontramos un predominio de partículas entre 1 y 2 mm (41.4%) y entre 3 y 4 mm (24.5%). La Figura 5.7 muestra cómo cuanto mayor es el tamaño de las partículas, menos partículas encontramos, tanto para la red Manta como para el muestreador MuMi. En el caso de este último sistema, podemos ver cómo la incorporación de la segunda malla, con un tamaño de poro más pequeño, es la responsable de capturar más de la mitad del total de partículas filtradas por este sistema, concretamente 89 microplásticos, que corresponden al 64% del total filtrado.



Fig.5.7: Gráficos de barras que representan la distribución de los microplásticos identificados con cada uno de los sistemas de muestreo, diferenciados según el tamaño de la malla y el tipo de partícula. Nótese la diferencia en las escalas en los ejes verticales.

5.4 Discusión

Nuestra investigación muestra que la contaminación por microplásticos es frecuente en el sur de Tenerife. Las partículas estaban presentes en todas las muestras independientemente del método utilizado, con concentraciones de microplásticos que oscilaban entre 0.1 y 92.5 partículas/m³ considerando ambos métodos.

La metodología de muestreo empleada influyó en la concentración estimada de microplásticos, ya que el muestreador MuMi reportó concentraciones de hasta tres órdenes de magnitud más altas que la red Manta. Varios estudios han abordado la comparación de métodos para el muestreo de microplásticos variando el tamaño de las mallas, o la profundidad de muestreo (Karlsson et al., 2020; Lusher et al., 2015, 2014; Zheng et al., 2021). En términos generales, este estudio corrobora la cuestión abordada por Green et al. (2018) en el sentido de que los datos aportados sobre la abundancia de microplásticos en el medio marino son muy variables en función del método de muestreo utilizado. Esta cuestión también se señala en las recientes directrices del Programa de Asesoramiento y Monitorización del Ártico (AMAP, por sus siglas en inglés) (2021), haciendo hincapié en la precaución a la hora de comparar resultados entre estudios que se han desarrollado bajo diferentes metodologías.

Esta disparidad ha sido resaltada por Miller et al. (2021), quienes en su revisión de métodos, al comparar los resultados entre las redes de arrastre y los sistemas de muestreo basados en la colección de pequeños volúmenes, las redes resultaron dar datos de abundancia hasta dos órdenes de magnitud menores. Zhang et al. (2021) compararon los resultados obtenidos tras el muestreo de las aguas del río Lijiang en China con tamices y redes de plancton de diferentes tamaños de malla y encontraron diferencias muy significativas entre los métodos que atribuyen, en parte, a los diferentes volúmenes filtrados, que diferían hasta en tres órdenes de magnitud, como es el caso de nuestros resultados.

Con el presente estudio se ha pretendido mantener el mayor número de variables en común (tamaño de malla, simultaneidad en la distancia recorrida, misma velocidad de navegación y profundidad de muestreo, ...), pudiendo así evaluar las diferencias en los datos de microplásticos que se reportan en función del tipo de equipo utilizado y los inconvenientes que pueda presentar.

En los siguientes subapartados se discuten algunas de las cuestiones que han surgido de la comparación realizada. Se hace especial hincapié en dos factores clave: el volumen de agua muestreado y el tamaño de malla utilizado. Además, también se reflexiona sobre las condiciones de operatividad de ambos métodos, que sirven para poner de manifiesto las ventajas e inconvenientes de cada uno de ellos, y las ventanas de oportunidad y mejora en cada caso. Por último, aunque el objetivo principal de este estudio es más bien metodológico, los resultados cuantitativos también nos proporcionan una capa de información básica sobre la contaminación por microplásticos en esta zona de estudio, que es muy importante por la biodiversidad que alberga y la presión antrópica a la que está sometida.

5.4.1 Comparación de la operación con ambos métodos de muestreo

La rutina de lanzamiento de los dos sistemas de muestreo es bastante similar. Una vez que la embarcación se situaba en el punto de inicio del transecto, ambos dispositivos, previamente atados con cabos de remolque, se lanzaban al agua desde la popa de la embarcación. Una vez completado el transecto, ambos dispositivos se recuperaban del agua tirando de las líneas de anclaje. En este sentido, la operación con el MuMi, dadas sus dimensiones más manejables, resulta algo más sencilla. Aunque ambas pueden llevarse a cabo sin necesidad de grandes requerimientos técnicos por parte de la embarcación, el lanzamiento y posterior recuperación de la red Manta precisa de al menos dos personas libres para la maniobra.

Una vez que los dispositivos están a bordo, una de las principales diferencias es el tiempo necesario para obtener y almacenar las muestras en un lugar seguro y libre de contaminación y para preparar el instrumento para un nuevo lance. En este sentido, la posibilidad de utilizar filtros intercambiables y nuevos en cada uno de los transectos que ofrece el MuMi es muy ventajosa. De lo contrario, la muestra recogida con la red Manta debe seguir siendo recogida en este punto (utilizando chorros de agua para limpiar la red y recogiendo el material retenido en botellas) con el consiguiente empleo de tiempo y pérdida de eficacia en la recogida de la muestra. Además, este procedimiento conlleva el riesgo de que la contaminación acumule partículas que no se han limpiado bien de la red de un transecto a otro, o que el tejido esté más obstruido con materia orgánica en los transectos finales en comparación con los iniciales, y por tanto se filtre con un tamaño de malla inferior.

Además, dado que la red Manta también recoge mayores cantidades de materia orgánica y organismos asociados a la superficie del mar, esto también conlleva un mayor tiempo de procesamiento de las muestras. De hecho, se recomienda evitar el muestreo con la red de arrastre durante el atardecer, ya que es probable que se produzcan grandes volúmenes de zooplancton al migrar a la superficie al anochecer (GESAMP, 2019). La digestión de esta materia orgánica, utilizando KOH al 10% a temperatura ambiente, puede tardar hasta varias semanas en reducirse a niveles lo suficientemente bajos como para no dificultar la identificación visual al microscopio (Lusher et al., 2017), por lo que aún siendo más representativa del medio dado el mayor volumen de agua que filtra, la red de Manta tiene el inconveniente de ser mucho más costosa en cuanto al tiempo invertido para analizar las muestras.

Como se expresa en el trabajo de Prata et al. (2020), en el que se realizan experimentos de volumen para el muestreo de microplásticos, las muestras resultantes de los volúmenes más altos son de menor calidad debido a la abundancia de materia orgánica y mineral, que puede ocultar los microplásticos. En futuros estudios, sería interesante optimizar el protocolo de digestión alcalina de la materia orgánica según las recomendaciones del GESAMP, que sugieren utilizar 40mL de KOH 10M por cada 0.2 g de peso seco de la muestra mantenida a 60°C durante 24 horas (GESAMP, 2019). Este último método ha demostrado ser muy eficaz para eliminar el material biogénico ingerido por los peces (Lusher et al., 2017; Rochman et al., 2015). Precisamente, según la publicación de la AMAP sobre este tema (2021), todavía hay mucho

margen para aumentar la calidad y reducir el tiempo y los costes de estos procedimientos en el estado actual de la técnica.

5.4.2 Volumen de muestreo

Una de las diferencias clave en la comparación de la red Manta y el muestreador MuMi es la cantidad de agua muestreada. Esta cuestión conlleva tres factores que, a tenor de los resultados obtenidos, han resultado fundamentales para el análisis y la comparación de los informes sobre microplásticos. Estos tres factores, en los que profundizamos en los apartados siguientes, tienen que ver con (A) la certeza de conocer el volumen de agua filtrada, y la reproducibilidad de los volúmenes obtenidos, de manera que los resultados puedan ser replicados satisfactoriamente, y (B) la representatividad de las partículas obtenidas en función del volumen filtrado.

a. Certeza del volumen filtrado

Conocer el volumen exacto de agua filtrada es uno de los puntos débiles de los sistemas de muestreo basados en la red de arrastre. Tras analizar 35 estudios publicados en 2021 sobre el seguimiento o muestreo de microplásticos con redes Manta (Anexo 5.1), podemos concluir que el uso de caudalímetros se ha extendido mucho, siendo un elemento incorporado en el 66% de los artículos. Sin embargo, también cabe destacar el hecho de que, aún incorporando un caudalímetro, su disposición no permite medir el volumen exacto de agua filtrada por la red, sino que necesariamente se debe realizar una estimación en función del tamaño de la boca de la estructura, su grado de inmersión y un factor teórico, como se explica en Liu et al. (2021) y Suteja et al. (2021). Como expresan Razeghi et al. (2021), al cambiar la profundidad de inmersión de la red constantemente con las olas, el viento y el movimiento del barco, es difícil estimar el volumen exacto de agua filtrada. De hecho, en algunos de estos estudios se utiliza la red de Manta con el caudalímetro incorporado, pero los resultados se siguen reportando por área cubierta (Bowman et al., 2021; Okuku et al., 2021).

En nuestro caso, el volumen de agua recogido por la red Manta se calculó siguiendo las estimaciones realizadas por Karlsson et al. (2020). No obstante, la incertidumbre en el volumen es probablemente la mayor falta de fiabilidad en el muestreo con una red de arrastre, siendo un área en la que hay hueco para la innovación en aras de una mayor precisión. Precisamente por el hecho de que, incluso incorporando un caudalímetro, las estimaciones de los volúmenes filtrados pueden ser muy dispares entre réplicas (Karlsson et al., 2020), la repetibilidad de los volúmenes reportados al realizar un estudio de seguimiento puede ser también una desventaja de las redes de arrastre como método de muestreo frente a muestreadores como el MuMi u otros de similares prestaciones.

Como resultado de este estudio, de los seis transectos realizados, los volúmenes estimados para la red Manta fueron de 138.9 m³, mientras que los valores reales del muestreador MuMi estuvieron entre 0.29 y 0.51 m³ por transecto, con una media de 0.37 m³ (sd = 0.08 m³). Si en lugar de medir el volumen filtrado con el muestreador MuMi con el caudalímetro lo hubiéramos estimado, podríamos haber cometido un error de hasta el 8% en el reporte de los datos de concentración de microplásticos, ya que los litros de variación equivalen aproximadamente a

cinco partículas mal estimadas. Las variaciones en los volúmenes se deben a que el criterio para establecer los transectos se tomó como una milla náutica navegada, y no el alcanzar un volumen concreto. Por lo tanto, conocer el volumen filtrado exacto es una clara ventaja del muestreador MuMi sobre la red Manta, que no sólo ofrece datos de concentración más precisos, sino que también proporciona volúmenes de muestreo exactos y, por lo tanto, reproducibles.

b. Representatividad de las partículas por volumen filtrado

Los grandes volúmenes de muestra suelen ser deseables porque se ven menos afectados por la heterogeneidad en la escala espacial de las aguas superficiales, una cuestión que afecta especialmente a las micropartículas más grandes (Miller et al., 2021). En este sentido, una baza característica en este caso de la red Manta frente al muestreador MuMi es su capacidad para filtrar grandes volúmenes de agua en un corto periodo de tiempo (Tamminga et al., 2019). Sin embargo, dada la intensidad del trabajo y el tiempo que conlleva la recogida, el procesamiento y el análisis de cada muestra, recoger el menor tamaño de muestra posible es un enfoque que puede ser muy adecuado a la hora de diseñar un experimento. Como afirman Prata et al. (2020) en su estudio, filtrar el mínimo volumen necesario tiene la ventaja de dar la posibilidad de tomar más réplicas en la zona y, por tanto, obtener datos más representativos de la concentración de microplásticos. Se sabe que la distribución de los microplásticos no es homogénea ni en la superficie ni en la columna de agua (Sönmez et al., 2022), por lo que para conocer mejor la distribución de los microplásticos, así como su transporte, es interesante poder aprovechar el esfuerzo de muestreo para realizar una malla de muestreo más amplia, que cubra un mayor número de estaciones o transectos, y que por tanto proporcione una información más detallada y concisa.

En este estudio no hubo suficientes réplicas para poder establecer y recomendar un umbral de detección, pero se han realizado estudios específicos por parte de otros autores. Según la investigación realizada por Lenz y Labrenz (2018), los volúmenes de agua filtrada pueden reducirse a medida que disminuye el tamaño de partícula objetivo sin perder representatividad. Es decir, para los microplásticos más grandes (por encima de 200-300 µm), cuyas concentraciones suelen ser inferiores a una partícula por metro cúbico, es necesario, por tanto, tomar muestras de varias veces este volumen. Sin embargo, las concentraciones reportadas de los microplásticos más pequeños son hasta dos órdenes de magnitud superiores, por lo que los volúmenes de muestreo pueden reducirse sin perder eficacia en el muestreo. En nuestro caso, el número medio de partículas por metro cúbico obtenido fue de 66.7 (sd = 42.7) para el caso MuMi (que cubre los tamaños más pequeños con la malla de 50 µm), frente a 0.3 (sd = 0.2) para el caso de la red Manta. Por lo tanto, los requisitos de volumen mínimo son diferentes para cada sistema. También se han realizado otros estudios de reproducibilidad de réplicas para microplásticos pequeños que recomiendan volúmenes de 0.5-1litro para futuros estudios (Prata et al., 2020). En última instancia, el volumen de agua necesario dependerá además de la presencia de elementos antropogénicos y orgánicos por muestra (Arctic Monitoring and Assessment Programme (AMAP), 2021).

Para ver hasta dónde se puede reducir el volumen sin perder representatividad, Karlsson et al. (2020) realizaron un muestreo comparativo entre la red Manta y un método de filtración por bombeo determinando el número mínimo de partículas por muestra que se debe registrar para evitar falsos negativos. Para el volumen recogido y basándose en los resultados de una estimación estadística, se considera un mínimo de 26 partículas por muestra. Esto corresponde a una desviación estándar relativa del 20% calculada a partir de una función de densidad de probabilidad de Poisson, que es inferior a la variabilidad real de la muestra (55%).

Realizando el mismo tratamiento estadístico para nuestro caso de estudio, podemos afirmar que, tanto para el muestreador Manta como para el MuMi, se filtró un número suficiente de partículas para que las muestras fueran representativas. En el caso de la red Manta, la



Fig.5.8: a) Gráfico de densidad del número de microplásticos según el modo de muestreo. Se indica el número medio de microplásticos filtrados con cada método. b) Datos utilizados para la estimación estadística de la representatividad de la muestra, donde μ es la media de las partículas filtradas por cada método, sd la desviación estándar de estas observaciones y la varianza calculada a partir de la estimación estadística basada en el estudio de Karlsson et al. (2020), de la que se obtiene la desviación estándar relativa (RSD estimada) y se compara con la observada (RSD observada).

desviación estándar relativa estimada es del 14.94% (frente al 64.96% de variabilidad en las observaciones reales). En el caso del MuMi, la variabilidad observada es del 59.05%, mientras que, con una media de 23.2 partículas, la desviación típica relativa alcanza un porcentaje similar (20.76%) al de las 26 del estudio mencionado anteriormente. La Figura 5.8 muestra las funciones de densidad de probabilidad de ambos dispositivos. Obsérvese que en el caso del MuMi la distribución es bimodal, lo que corresponde a las dos mallas que incorpora este dispositivo (200 y 50 µm), frente a la malla única de 200 µm de la red Manta.

5.4.3 Tamaños de malla

El tamaño de la malla influye en gran medida en las concentraciones reportadas (Prata et al., 2019). El muestreo con redes de Manta suele configurarse con redes de entre 200 y 330 µm. De hecho, mantener estos tamaños de malla para el monitoreo de muestras ambientales es deseable, para que los resultados puedan ser comparados con informes anteriores, como se recomienda en las Directrices para la armonización de los métodos de monitorización de microplásticos en la superficie del océano publicadas por Michida et al. (2019).

En este estudio, se utilizó una malla de 200 µm tanto para la red Manta como para el muestreador MuMi. Aun así, la abundancia de partículas reportada por ambos métodos excluyendo las partículas retenidas en la malla adicional de 50 µm fue significativamente diferente (Fig. 5.7). E incluyendo esta fracción, la diferencia fue de varios órdenes de magnitud más para los informes del MuMi que para la red Manta. En concreto, disponer de una malla más fina adicional en el muestreador MuMi contribuyó en un 64% al recuento total de partículas identificadas por este sistema de muestreo, demostrando así la importancia de obtener datos sobre las partículas más pequeñas, no sólo por su potencial riesgo, sino también por su probada abundancia en el medio ambiente (Rochman, 2015).

En este sentido, Lindeque et al. (2020) ya destacaron en su publicación la subestimación que se produce en la recogida de los microplásticos más pequeños con los métodos de muestreo tradicionales. Además, las concentraciones reportadas podrían aumentar hasta 10 veces cuando se utiliza una malla de 100 µm en lugar de una de 500 µm, o 2.5 veces utilizando una red de 100 µm en comparación con una de 333 µm. Asimismo, Kang et al. (2015) identificaron 0.62-860 microplásticos/m³ utilizando una red Manta de 330 µm y 21-15560 microplásticos/m³ utilizando una red Manta de 100 µm en la desembocadura del río Nakdong, en el Mar del Sur de Corea. En la misma línea, Vermaire et al. (2017) descubrieron que una red de nylon (100 µm) revelaba concentraciones casi cien veces mayores que una red Manta (333 µm), 100 y 1.35 partículas por metro cúbico, respectivamente. Del mismo modo, Dris et al.(2018) también afirmaron que el uso de una malla de muestreo de 80 µm frente a una de 330 µm aumentaba la posibilidad de muestreo de fibras en 250 veces.

Por último, en cuanto a las mallas utilizadas, el hecho de no filtrar directamente sobre la malla de 50 µm, sino disponer previamente de un filtro de desbaste y otro de 200 µm, contribuyó eficazmente a su buen funcionamiento, sin que se produjeran colmataciones en ninguno de los transectos realizados. En este sentido, la experiencia previa en el estudio de Enders et al. (2015),

en el que el objetivo inicial de filtrado con una malla de 10 µm tuvo que ser sustituido por una malla de 50 µm debido a la saturación de la misma, fue útil para establecer los detalles de la metodología en el presente estudio.

5.4.4 Diferencias en las características de las partículas filtradas

a. Predominancia según tipo de partícula

El tipo de partículas que recoge preferentemente cada muestreador presenta diferencias. En el caso de la red Manta, los fragmentos y *pellets* representan el 91.45% (246/269) del total de partículas, mientras que las fibras sólo representan el 8.55%. En cambio, en el caso del MuMi ocurre lo contrario: sólo se recogen 7 fragmentos, que corresponden al 5% del total. La procedencia de las fibras no está exenta de sospechas en cuanto a las posibilidades de contaminación aérea, especialmente cuando los estudios se realizan en espacios que no pueden estar tan controlados como un entorno limpio de laboratorio. En este sentido, se deben tomar precauciones tanto durante la manipulación de las muestras en el barco como en el laboratorio, realizando los controles recomendados por AMAP (2021) y siguiendo cuidadosamente las pautas de identificación de Lusher y Hernández-Milian (2018).

Las diferencias en las concentraciones entre la red de arrastre y el MuMi en el presente estudio podrían estar condicionadas por dos factores determinantes que afectan directamente al tipo de partícula filtrada. Estos serían (1) la respuesta de cada dispositivo a las diferentes condiciones hidrodinámicas a las que están sometidos con respecto a los fragmentos, y (2) la variación en la profundidad de muestreo, que en principio parecía ser despreciable. Esta diferencia en la preferencia de las partículas atrapadas por cada enfoque también se puso de manifiesto en el ensayo comparativo realizado por Green et al. (2018), que compararon los métodos de muestreo con botellas de un litro y red de zooplancton, y por Song et al. (2014), que corroboraron, tras comparar diferentes modos de muestreo en aguas superficiales, que tanto el número como el tipo de partículas variaban en función del método de recogida utilizado.

La forma más abundante de desechos marinos en la superficie del océano son los fragmentos de tamaño milimétrico con una densidad media del material de 965 Kg/m³, es decir, inferior a la densidad del agua superficial de 1027 Kg/m³ (Morét-Ferguson et al., 2010). En su estudio sobre el efecto de la mezcla del viento en la distribución vertical de las partículas plásticas flotantes, Kukulka et al. (2012) afirman que, al ser partículas pasivas, están sometidas a la física de los procesos de mezcla en la superficie del océano. Así, los movimientos de los microplásticos en la columna de agua son impulsados principalmente por su densidad, tamaño y forma, pero también pueden ser modificados por la turbulencia. En consecuencia, en lo que respecta a los fragmentos, según nuestro punto de vista, el hecho de que la red Manta filtre principalmente este tipo de partículas en comparación con el muestreador MuMi puede estar relacionado con la hidrodinámica de las partículas, que son más grandes y tienen una mayor superficie en relación con su longitud. A pesar de que la red Manta está montada sobre una estructura que también genera turbulencia, estas partículas también tienen más margen para ser interceptadas en su trayectoria por la red. Además, el grado de turbulencia que genera el

muestreador de microplásticos en la superficie en relación con el pequeño diámetro de su boca de entrada puede estar condicionando la entrada de los fragmentos en el muestreador.

En cuanto a las fibras, una hipótesis que puede explicar la disparidad de resultados (donde el 95% de las partículas filtradas por el MuMi eran fibras, frente al 1.7% filtrado por la red Manta) puede estar relacionada con una mínima pero relevante diferencia en la profundidad de muestreo de ambos dispositivos. Esto ha sido mencionado anteriormente por otros autores como una posible explicación (Michida et al., 2019), y también está relacionado con las diferencias en las densidades relativas de los diferentes tipos de partículas.

Aunque ambos dispositivos se instalaron de forma que muestreaban las aguas superficiales, la red Manta está colocada de forma que la mitad de su abertura está siempre por encima de la superficie del océano, por lo que siempre recoge las partículas que flotan en la capa más superficial del océano. Sin embargo, el MuMi, al tener una abertura mucho más pequeña, está configurado para que su flotabilidad sea menor, de manera que pueda ir sumergido y filtrar el agua, y no rebotar en la superficie del mar. Esta configuración, por tanto, puede afectar al muestreo de esta capa superficial, saltándosela en algunas partes de su recorrido.

Esta limitación es común a los sistemas de muestreo basados en el bombeo de agua, como explican Zobkov et al. (2019) en su trabajo: la dinámica de flotación y acumulación de partículas hace que las fibras dominen las capas subsuperficiales mientras que los fragmentos, que tienen una mayor flotabilidad por su relación peso/superficie, están más presentes en la capa superficial. Como también corroboran otros autores, esta diferencia centimétrica puede ser clave para determinar el tipo de partícula recogida por cada método (Song et al., 2014).

b. Tamaños

La fragmentación de la basura marina de mayor tamaño y de los plásticos en trozos más pequeños es bien conocida (Hidalgo-Ruz et al., 2012), lo que justifica que, a medida que disminuye la clase de tamaño, aumente la abundancia de partículas (Tokai et al., 2021). La mayor parte de las partículas identificadas se encontraban entre 1 y 4 mm, lo que coincide con los recuentos del estudio de Eriksen et al. (2014) en el que se contabilizan los microplásticos de 24 expediciones (2007-2013) a través de los cinco giros subtropicales, la costa de Australia, la Bahía de Bengala y el Mar Mediterráneo realizando arrastres de red de superficie (N = 680), donde el 57.5% de las partículas se clasificaron en el rango de tamaño de 1.01 a 4.75 mm.

También cabe mencionar que, aunque las muestras de partículas se analizaron por separado en función del tamaño de malla en el que fueron retenidas, los tamaños de partícula asignados a cada partícula vienen dados por las mediciones del microscopio óptico y no están vinculados al tamaño de malla. Es decir, una fibra de 3 mm de longitud puede haber sido retenida en la malla de 50 µm y, por tanto, contabilizarse en el tamaño de 3-4 mm, como vemos en la Figura 5.7, donde en la sección de malla de 50 µm encontramos observaciones para todos los rangos de tamaño. De este modo, se evita una interpretación errónea de los tamaños de las partículas.

c. Colores

El análisis del color de las partículas microplásticas es una cuestión que implica una cierta variabilidad incontrolada de los datos, como la de estar abiertos a la clasificación subjetiva de las diferentes tonalidades según los observadores o las diferentes clasificaciones designadas en los distintos estudios. Por ello, los resultados, creemos, deben ser tomados como un aspecto cualitativo descriptivo, del que podemos hacer algunas breves puntualizaciones. Además, los procesos de foto-oxidación inducen cambios tanto en el color como en las propiedades mecánicas de los polímeros plásticos, por lo que incluso el color de las partículas puede no ser el original. En este sentido, coincidimos con el criterio de Hartmann et al. (2019), en el que destacan que el color no es crucial en un marco de categorización, a pesar de que su inclusión como descriptor adicional puede tener sentido.

Martí et al. (2020) plantean la hipótesis de una decoloración progresiva de las basuras marinas de plástico, que también es un indicador de la edad de las muestras tomadas. Así, del total de partículas recogidas e identificadas en este estudio, casi la mitad (47.79%) tenían colores claros o tonos decolorados. Este porcentaje se eleva al 71.6% si se consideran sólo los fragmentos, ya que se contabilizaron hasta 99 fragmentos blancos entre las partículas recogidas por la red Manta. Por otro lado, el color predominante de las fibras fue el rojo, el azul y el negro, que también fueron predominantes (>80%) en el estudio del <u>Capítulo 3</u>, realizado con muestras de agua superficial también del océano Atlántico (Montoto-Martínez et al., 2020).

5.4.5 Resumen comparativo

Las directrices de AMAP (2021) dedican un apartado específico a la importancia de la armonización y la estandarización en el trabajo con microplásticos. El documento reflexiona sobre ambos términos y las diferencias que conllevan: (1) La estandarización requiere el establecimiento de métodos específicos, limitando la flexibilidad de los procedimientos entre los distintos grupos de investigación, pero permitiendo resultados más comparables; (2) La armonización, en cambio, permite el uso de distintos métodos, aportando siempre los metadatos y detalles técnicos necesarios y habiendo sido las técnicas rigurosamente probadas, de forma que los resultados obtenidos sean también comparables. Según la AMAP, los protocolos estandarizados son actualmente muy limitados en la investigación de los microplásticos y la comunidad científica suele probar nuevos métodos para su armonización, al tiempo que comunica los datos como fuente de información para compararlos con otros estudios.

Incluso dentro de un mismo equipo de trabajo, no todas las oportunidades de seguimiento cuentan con los mismos medios o recursos, por lo que consideramos fundamental hablar de armonización en un sentido flexible, sin pretender llegar a un método único, como también expresaron Lusher et al. (2021). En este sentido, una de las mejores prácticas es compartir abiertamente las experiencias de los diferentes programas de monitorización a nivel nacional e internacional (desde el muestreo hasta el tratamiento o procesamiento de las muestras) facilitando así la coordinación y fortaleciendo los conjuntos de datos de manera que sea posible establecer patrones y tendencias globales. Además de esto, creemos que es recomendable dejar espacio para la innovación e incluso combinar diferentes perspectivas metodológicas que

permitan obtener una imagen lo más completa posible de la contaminación por microplásticos, tal y como proponen Martin et al. (2022).

Así, con el presente estudio y partiendo de este punto de vista sobre el tema, se ha querido contribuir a la armonización y promoción del seguimiento de los microplásticos en las aguas marinas superficiales. A partir de nuestras experiencias en estudios anteriores y de las referencias consultadas, hemos recogido una serie de características, pros y contras de cada uno de los métodos de muestreo comparados: la red Manta y el muestreador MuMi (Tabla 5.2). Como otros autores han sugerido previamente (Barrows, 2017; Mai et al., 2018; Tamminga et al., 2019), consideramos que la combinación de métodos es la mejor opción para futuras investigaciones, ya que permite obtener una información más completa y contrastada. Sin embargo, como esto no siempre será posible, debemos ser conscientes de las limitaciones del que utilicemos.

Asimismo, como se ha introducido anteriormente, la generación de datos comparables con otras zonas o con estudios anteriores en la misma zona es una necesidad en el seguimiento de contaminantes ambientales. Aspectos críticos como el tamaño de la malla, el volumen muestreado o la profundidad de la operación deben ser especialmente tenidos en cuenta. Pero, al mismo tiempo, también son relevantes cuestiones más relacionadas con la logística y el tiempo y los recursos de que disponen los equipos científicos. Así, el coste y el mantenimiento del dispositivo, o el tiempo de procesamiento de la muestra son dos ventajas clave de MuMi. Además, la posibilidad de fabricar el dispositivo mediante impresión 3D a bajo coste y su sencillo funcionamiento hacen de este dispositivo un candidato muy adecuado para el muestreo de seguimiento por parte de embarcaciones de oportunidad, como las de recreo, o incluso las de pesca artesanal o de turismo de avistamiento de cetáceos.

La contaminación por microplásticos se caracteriza por una dispersión a menudo irregular sobre la superficie del mar y por la influencia de numerosos factores físicos, químicos, biológicos y climáticos que pueden dar lugar a grandes variaciones en los recuentos incluso en réplicas contiguas o simultáneas en el tiempo. Teniendo en cuenta estos hechos, el uso del MuMi también presenta ventajas en este sentido, ya que permite obtener muestras representativas con un volumen de muestreo menor. A su vez, permite abarcar un mayor número de réplicas sin aumentar desproporcionadamente el esfuerzo de muestreo y el posterior tiempo de procesamiento de las muestras

CARACTERÍSTICAS	RED MANTA	MUESTREADOR MUMI
Lanzamiento	Necesita ser coordinado por al menos dos personas, de manera que no se escore	Dado su pequeño tamaño, el lanzamiento es más sencillo: sujetando un extremo del cabo
Operación en condiciones de mar desfavorables	No es posible.	No es posible.
Certeza del volumen muestreado	La incorporación de un flujómetro es posible pero no ofrece una respuesta muy precisa.	Sí, mediante información del flujo y caudal en tiempo real.
Reproducibilidad del volumen muestreado	No. Existen grandes disparidades en los volúmenes reportados entre distintos estudios con características de muestreo equivalentes.	Sí, la lectura del flujo filtrado en tiempo real y la facilidad para detener el muestreo (recuperando el muestreador) permiten obtener volúmenes reproducibles.
Representatividad del volumen muestreado	Probablemente sí, si fuera preciso.	Más crítico, pero parece suficiente en el caso de los microplásticos más pequeños.
Manipulación de muestras entre replicados	Larga: se necesita aplicar chorros de agua a presión para limpiar la red entre transectos.	Corta: se retiran los filtros mediante un sistema de rosca y se colocan otros nuevos.
Tiempo de procesamiento de muestras en el laboratorio	Largo: captura más materia orgánica, cuya digestión puede requerir semanas.	Corta: el pequeño tamaño de los filtros hace que sean relativamente rápidos de observar.
Posibilidad de operar con varios tamaños de malla	Las mallas de menos de 200 µm se saturan fácilmente.	Permite la colocación de distintos filtros, pudiendo alcanzar tamaños de luz de malla menores (50 µm).
Posibilidad de usar filtros intercambiables y nuevos cada vez	Q	S
Riesgo de contaminación	Alto; se pueden acumular fácilmente partículas de un muestreo al siguiente si no se lava bien la red.	Bajo; el muestreador mantiene los filtros encapsulados.

-4

5.5 Conclusiones

Este estudio compara dos métodos de muestreo de microplásticos en aguas marinas: la red Manta y el muestreador MuMi, un innovador dispositivo de muestreo de microplásticos protegido como modelo de utilidad.

Aunque se demostró que el volumen de agua filtrado con cada dispositivo era adecuado, las concentraciones de partículas registradas fueron desiguales, siendo las concentraciones medias de 0.3 (sd = 0.2) para la red Manta y de 66.6 (sd = 4.7) para el muestreador MuMi. Estas variaciones se atribuyen principalmente al diseño del muestreador y a la propia estrategia de muestreo, como la falta de control sobre la profundidad de la muestra en los muestreos en navegación.

Ciertamente, el control sobre el volumen filtrado es una cuestión a mejorar en los muestreos con redes Manta y similares. El muestreador MuMi presenta importantes ventajas en diferentes aspectos: facilidad de manejo, menor coste, menor tamaño del objetivo de microplásticos y mayor precisión, todo ello manteniendo la representatividad de las muestras recogidas. Entre los aspectos a mejorar se encuentra el control de la profundidad de muestreo, que también permitirá investigar más a fondo las diferencias en la distribución vertical.





-CAPÍTULO 6-

6

Microplásticos, bisfenoles,ftalatos y pesticidas en especies de odontocetos de la Región Macaronésica.

Resumen

Se sabe muy poco sobre la presencia de microplásticos en especies de nivel trófico superior como los cetáceos (Moore et al., 2020). Hasta hace poco, se centraban principalmente en el estudio de partículas mayores de 2.5 cm, y no se evaluaba la presencia de microplásticos, lo que sigue siendo una tarea difícil debido a los grandes volúmenes de contenido estomacal e intestinal y a las dificultades de muestreo.

En este estudio se valida un protocolo para estudios de ingestión de microplásticos que sirve para obtener muestras de diferentes equipos multidisciplinares. En él, se incorpora un sistema de filtros a la mesa de necropsia tradicional que resultó ser muy cómodo y eficiente para la extracción de partículas microplásticas del contenido gastrointestinal sin interferir en las tareas propias de los equipos veterinarios, cumpliendo con las necesidades de armonización explicadas por Panti et al. (2019). Este enfoque es totalmente compatible con el protocolo de necropsia en cetáceos, y al mismo tiempo cumple con las recomendaciones para informar sobre los plásticos ingeridos en la megafauna marina (Provencher et al., 2017). El flujo de trabajo propuesto permite la recogida de datos valiosos para diferentes equipos de investigación interdisciplinarios, con el objetivo de armonizar los datos, facilitar las comparaciones a gran escala de la ingestión de plásticos y también dar una base científica a las futuras políticas de conservación.

Se examinó el contenido gastrointestinal de doce individuos de seis especies de odontocetos que vararon entre 2018 y 2019 en la Región Macaronésica (Atlántico Centro Oriental). Además, se analizaron las concentraciones de once contaminantes orgánicos persistentes (nonilfenoles, bisfenoles, ftalatos y pesticidas) en muestras de tejido muscular mediante cromatografía líquida. No se encontraron partículas mayores de 5 mm, a excepción de dos etiquetas de plástico ingeridas por el mismo delfín. Por el contrario, todos los animales contenían microplásticos de diversos tamaños, siendo la mayoría fibras (98.06%, n=708). Los contaminantes predominantes detectados fueron bisfenoles (4-984 ng/g) y el di(2-etilhexil) ftalato (DEHP) (102-1533 ng/g). Además, a excepción de dos individuos, todos los animales reflejaron pesticidas en sus tejidos.

6.1 Introducción

La cantidad de basura que, bien a través del abandono directo o mediante la entrada por escorrentía y otras fuentes de emisión terrestres termina desembocando en los océanos representa hoy día una perturbación ambiental antropogénica de una escala sin precedentes. Como tal, las basuras marinas se han identificado como un problema global junto con otras cuestiones ambientales clave de nuestro tiempo. Está demostrado que puede impactar la biodiversidad de varias maneras, y sus efectos pueden variar según el tipo y tamaño de las partículas, así como de los organismos que los encuentren o ingieran. En este capítulo se desarrolla una investigación específica mediante un caso de estudio para analizar la ingestión de basuras marinas, y en particular de microplásticos, en cetáceos.

6.1.1 La ingestión de plástico en cetáceos

La ingestión de plástico por organismos marinos, junto con los atrapamientos o enmallamientos, es uno de los impactos más evidentes consecuencia de la contaminación por basuras marinas y ha sido ampliamente documentado desde el comienzo de las observaciones sobre este tema (Laist, 1987, 1997). Las basuras marinas, y en especial los plásticos, son confundidos con alimento provocando disrupciones estomacales, o alterando otras funciones de los organismos como, entre otras, la reproducción (McCauley and Bjorndal, 1999). Tradicionalmente, los mamíferos marinos, tortugas y aves marinas han sido los testigos mortales más evidentes de estas afecciones (Deudero and Alomar, 2015), si bien cada vez es más amplio el rango de organismos afectados, incluidas especies de peces e invertebrados (Oliveira et al., 2020; Shalom et al., 2022), y hasta los copépodos (Cole et al., 2013). Según Bergman et al. (2015), el número de especies de aves, tortugas y mamíferos marinos afectados por esta causa ha aumentó de 143 (33%) a 233 (44%).

En concreto, ciñéndonos a los mamíferos marinos, y en particular a los cetáceos, orden objeto de estudio en este capítulo, la primera cita de la interacción de una ballena con residuos plásticos es de 1979 (de Stephanis et al., 2013). Actualmente, se han documentado casos de ingestión de macroplásticos en un amplio abanico de especies de cetáceos, incluyendo cetáceos dentados, como los zifios (Lusher et al., 2015), delfines (Denuncio et al., 2011) o los cachalotes (Jacobsen et al., 2010).

Los mamíferos marinos son importantes indicadores de la salud de los ecosistemas marinos, particularmente en relación con la contaminación. Dada su larga esperanza de vida, su tendencia a alimentarse en niveles tróficos elevados y sus reservas de grasa únicas que pueden servir como depósitos de toxinas antropogénicas, estos animales son considerados importantes centinelas de la contaminación marina (Bossart, 2011).

El impacto de las basuras marinas sobre estos animales hasido ampliamente documentado y ha crecido rápidamente durante la última década (Meaza et al., 2021; Provencher et al., 2017). En todos los casos, la ingestión y el enredamiento destacan como las principales interacciones deletéreas, siendo el plástico el principal material involucrado. Un exhaustivo trabajo de recopilación realizado por Kühn et al. (2015) sobre los efectos de los microplásticos en la vida marina recopilan registros de impactos por ingestión de basuras marinas en más de la mitad de las especies de misticetos (53.8%) y odontocetos (61.5%).

La ingestión de plásticos por parte de los cetáceos es una cuestión difícil de estudiar por varios motivos, entre ellos el tratarse de animales que viven en un hábitat lo suficientemente salvaje como para incluso tras su muerte sólo tener acceso a ellos si llegan varados a costa, o cerca de ella (Burkhardt-Holm and N'Guyen, 2019). Al mismo tiempo, evaluar la gravedad de los impactos que pueden ser físicos y/o toxicológicos plantea un reto adicional (Puig-Lozano et al., 2018). Además, existe una amplia gama de efectos subletales como lesiones en el tracto gastrointestinal, desnutrición, reducción de la reproducción, crecimiento y/o longevidad, etc., que se suman a los más evidentes y que dificultan la evaluación de los impactos en su conjunto (Panti et al., 2019).

Los cetáceos varados representan una importante oportunidad para estudiar la interacción de la megafauna marina con las basuras marinas y, por ello, varios estudios han abordado este tema a partir de este acceso oportunista a animales varados y fallecidos. Hasta la fecha, se han reportado ingestas de plástico en los informes de necropsias en varias especies de cetáceos; pero sin embargo, aún se sabe muy poco sobre la presencia de microplásticos en estas especies, de niveles tróficos superiores (Moore et al., 2020). Hasta hace poco, los estudios se centraban en partículas de más de 2.5 cm y por tanto no evaluaban la presencia de microplásticos. Hoy en día, estudiar la ingesta de microplásticos de manera rutinaria en las necropsias sigue siendo una tarea que requiere de refuerzos para su implementación, en especial debido a los grandes volúmenes de contenido gastrointestinal a muestrear y las dificultades de los aspectos más minuciosos del muestreo en sí en unas instalaciones que por lo general son amplias y en las que resulta más difícil cumplir con protocolos de control de la contaminación cruzada.

No obstante, existen estudios previos al que se presenta en este capítulo que han abordado la ingestión de microplásticos en particular, incluidos informes de microplásticos en especies concretas, con ejemplos tanto de misticetos (Besseling et al., 2015; Garcia-Garin et al., 2021) como de odontocetos (Lusher et al., 2015; Xiong et al., 2018; Zhu et al., 2019), y también abordando varias especies, en este caso, de odontocetos (Hernández-González et al., 2018; Moore et al., 2020; Novillo et al., 2020), o un conjunto de diferentes especies varadas durante un período de tiempo determinado, como es el caso de Lusher et al. (2018), Nelms et al (2019) y el presente estudio.

6.1.2 Los impactos derivados de la ingestión de plástico

La ingestión de plástico, bien sea intencionada o accidental, puede causar la muerte directa a través de la simple obstrucción física de los estómagos, o afectar a los organismos mediante disfunciones estomacales varias, entre ellas efectos químicos derivados. Los pedazos de plástico no necesitan ser excesivamente grandes para provocar daños: la orientación de los mismos también es clave (Bjorndal et al., 1994), y de ésta puede depender también el tipo de daño que ocasionen. Por ejemplo, en un estudio de Brandão et al. (2011) se documenta la muerte de un pingüino por perforación de la pared del estómago al ingerir una pajita. Tampoco es necesaria una obstrucción total del estómago, sino que la sensación de estar saciado es suficiente para anular la búsqueda de alimento, y que la consecuente falta de nutrientes acabe ocasionando la muerte indirecta del organismo (Sheavly and Register, 2007). De la misma forma, la ingestión de pedazos de plástico similares a las bolsas, pueden cubrir parte de la superficie de absorción de nutrientes del estómago y afectar a la eficiencia de la nutrición o generar úlceras (Hoss and Settle, 1990; Pettit et al., 1981).

Las aves marinas tienen una cierta probabilidad de regurgitar los plásticos ingeridos accidentalmente, si bien éstos pueden ser posteriormente ingeridos por sus crías. Por el contrario, las tortugas marinas y los cetáceos suelen ingerir los plásticos sin posibilidad de regurgitación provocándoles una larga lista de efectos sobre su salud (Kühn et al., 2015; Nelms et al., 2016). A pesar de que existen ejemplos muy impactantes (de Stephanis et al., 2013), en relación al tamaño de las poblaciones y los individuos afectados, probablemente sean más importantes los casos de efectos subletales, los efectos indirectos derivados de la ingestión de plástico (Bergmann et al., 2015). Por último, la degradación de los macroplásticos ingeridos en los estómagos de los organismos y la consecuente liberación de contaminantes orgánicos persistentes (COPs) y aditivos que éstos contienen puede estar generando otros efectos subletales, una cuestión que se sondea en este estudio y que se introduce a continuación.

6.1.3 Contaminantes orgánicos persistentes

Las basuras marinas de origen plástico pueden suponer una fuente de entrada de contaminantes químicos en los hábitats marinos pelágicos y bentónicos (Teuten et al., 2007). Los plásticos pueden acumular una mezcla compleja de contaminantes presentes en el agua de mar circundante, que se suma al cóctel de productos químicos que ya incorporan de fábrica estos materiales. Estos contaminantes orgánicos están presentes en distintas formas, incluyendo diferentes aditivos, como plastificantes, antioxidantes, retardantes de llama y estabilizadores UV y, en algunos casos, constituyen una gran proporción en la composición de los propios productos (Rochman, 2015). Estas sustancias tienen un alarmante potencial de provocar efectos físicos y/o biológicos no deseados.

El rápido aumento de la producción química mundial y la expansión de su distribución a nivel global, tanto de productos químicos per se, como de bienes de consumo que los contienen, está generando lo que algunos autores han denominado una "intensificación química", una situación en la que los microplásticos representan una fuente importante entre las denominadas entidades novedosas por Steffen et al. (2015). Dentro de los sectores de producción de productos químicos, aquellos utilizados en la producción textil representan un alto porcentaje que se espera crezca a una tasa de crecimiento anual del 4.5 % entre 2019 y 2025 (Grand View Research, 2019). Estos pueden aparecer como pesticidas (utilizados en la producción de fibras naturales y tintes), retardantes de llama o recubrimientos que mejoran el rendimiento, como repelentes de agua o retardantes de fuego (PNUMA, 2011). Los ftalatos, por ejemplo, pueden constituir hasta el 50% del peso total de los plásticos como el PVC (Rochman, 2015). El di(2-etilhexil) ftalato (DEHP) se usa comúnmente como revestimiento plástico, como material impermeabilizante, mientras que los etoxilatos de nonilfenol (NPE) se usan con frecuencia en detergentes y auxiliares, con la consiguiente liberación al agua (PNUMA, 2011).

Varios estudios sugieren la transferencia de contaminantes químicos de los desechos plásticos a los animales marinos. Los estudios de campo y la monitorización indican que las interacciones que se producen entre la basura marina y la mezcla de compuestos químicos son significativos (Panti et al., 2019), y las investigaciones precedentes han identificado los plásticos como un vector de elementos traza tóxicos en el medio ambiente, lo que plantea preocupaciones en el campo de la toxicidad química (Bradney et al., 2019).

6.1.4 Necesidades de investigación en el campo

La necesidad de implementar un protocolo de operación para el estudio de la ingesta de microplásticos en cetáceos varados nace de un escenario donde la ingestión es generalizada en la biota marina, y las evidencias de los efectos adversos que pueden ocasionar en los distintos niveles de la cadena trófica cada vez más latentes y numerosas (Montoto-Martínez and Gelado-Caballero, 2020, Fossi et al., 2018; Meaza et al., 2021).

A ello se suma la clara falta de armonización de métodos para el estudio de microplásticos, en general, y en concreto en animales de gran envergadura como los cetáceos y la oportunidad de desarrollarlo en un equipo multidisciplinar, aportando el conocimiento de las ciencias ambientales y marinas a un procedimiento de estudio patológico y sanitario ya previamente establecido y consolidado desde el campo de la veterinaria.

En el ámbito de la megafauna marina, Provencher et al. (2017) propusieron técnicas estandarizadas para facilitar las comparaciones espaciales y temporales entre especies y para avanzar hacia un enfoque más cohesionado por parte de la comunidad científica. Panti et al. (2019) también consideraron que debería implementarse un protocolo estandarizado, sencillo y rentable que permita realizar el análisis de las muestras para detectar la presencia de microbasuras de forma comparable y transparente. Además, todavía hay muy pocos conocimientos científicos sobre los impactos potenciales de los microplásticos en los cetáceos (IWC, 2020), y aún menos sobre el grado de biomagnificación de los productos químicos relacionados con el plástico en los animales de nivel trófico superior, o sobre cómo estos contaminantes podrían estar impactando en los organismos marinos (en comparación con otras fuentes de contaminación química en el medio ambiente).

Ante la previsión del aumento del flujo de plásticos hacia los océanos (Jambeck et al., 2015) y teniendo en cuenta que el 24% de las 90 especies de cetáceos reconocidas están amenazadas (es decir, en peligro crítico, en peligro o vulnerables) (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN), 2020), profundizar en los efectos de la ingestión de plásticos en los cetáceos es una cuestión tan pertinente como crucial.

Además, el estudio presentado en este capítulo se realizó en una zona de gran importancia ecológica para los mamíferos marinos, con altos índices de diversidad de cetáceos reportados en numerosos estudios, como Correia et al. (2020) recopilan en su reciente publicación. En

concreto, las Islas Canarias representan un importante punto caliente en aguas europeas con 30 especies de cetáceos (7 misticetos y 23 odontocetos) de las 90 descritas en todo el mundo registradas en el archipiélago (Arbelo et al., 2013; Díaz-Delgado et al., 2018; Herrera et al., 2021). La zona presenta unas características oceanográficas idóneas para los cetáceos tanto tropicales como de aguas templadas, ya que coexisten las aguas oligotróficas del océano abierto con las aguas ricas en nutrientes del afloramiento costero provocado por la corriente de Canarias (Fernández et al., 2009).

Aprovechando la oportunidad que brindan las redes de asistencia a varamientos de cetáceos para estudiar la interacción de la basura marina con los cetáceos, y la experiencia multidisciplinar previa de los equipos implicados en este trabajo, este estudio propone un protocolo multidisciplinar para estudiar la ingesta de microplásticos en cetáceos varados e investiga (1) el nivel de ingestión de plásticos en cetáceos varados (con especial atención a los microplásticos, tamizando el contenido gastrointestinal hasta 200 µm), (2) las concentraciones de contaminantes orgánicos persistentes en el músculo esquelético de estos mismos cetáceos. Así, en este estudio se pretende contribuir a estas lagunas de investigación mediante la aplicación de un protocolo que facilite la comparación a gran escala de la ingestión de plásticos y proporcione datos de referencia para futuras investigaciones sobre los posibles efectos ecotoxicológicos de la ingestión de estas partículas.

6.2 Material y métodos

6.2.1 Especímenes y sitios de muestreo

Se analizaron los tractos gastrointestinales completos, desde el esófago hasta el ano, de 12 individuos de 6 especies de odontocetos que vararon entre 2018 y 2019 a lo largo de las costas de Madeira y las Islas Canarias, en la Región Macaronésica (Atlántico centro-oriental). El listado de ejemplares se recoge en la Tabla 6.1, y su distribución en la Fig. 6.1. Todas las especies estudiadas están incluidas en el Catálogo Español de Especies Amenazadas, dos de ellas catalogadas como "vulnerables" (BOE (Boletín Oficial del Estado), 2011).

Los animales se almacenaron en una cámara a -20°C hasta su procesamiento y las disecciones se realizaron en la sala de necropsias del Instituto de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria (IUSA) de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC) (n=10) y las instalaciones del Museu da Baleia (n=2). En todos ellos se extrajeron los tractos gastrointestinales completos, cuyo contenido se analizó en profundidad para la determinación de la presencia de microplásticos en los laboratorios del grupo de investigación Tecnologías, Gestión y Biogeoquímica Ambiental (TGBA), en la Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC). Para la determinación de contaminantes orgánicos persistentes, las muestras fueron enviadas al Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED), en Madrid.



Fig.6.1: Área de estudio en la Región Macaronésica (Atlántico Centro-Oriental), indicando las islas en las que se encontraron cada uno de los cetáceos varados y las especies correspondientes.Mapa base: EMODnet Bathymetry WMS 1.3.0
Condición corporal (BC): C, buena; M, moderada; P, pobre; VP, muy pobre. Categorías de estado de descomposición (DCC): 1, carcasa extremadamente fresco, apenas Tabla 6.1: Lista de ejemplares analizados en el presente estudio. Todas las especies están incluidas en el Catálogo Español de Especies Amenazadas, dos de ellas, marcadas con un asterisco, bajo la categoría "vulnerable". Ubicación del varamiento: Madeira (MA), Islas Canarias (IC). Desarrollo sexual (SD): I, inmaduro; M, maduro. muerto; 2, carcasa fresca; 3, descomposición moderada; 4, descomposición avanzada; 5, restos momificados o esqueléticos. Contenido Estomacal (Cont. Estom.).

Entidad patológica	Asociada a pérdida significativa del estado nutricional.	Asociada a pérdida significativa del estado nutricional.	Asociada a pérdida significativa del estado nutricional.		
Hallazgos histopatológicos	Bronconeumonía parasitaria grave; Gastritis parasitaria; Enteritis linfoplasmocítica; Enfermedad parasitaria multiorgánica; Leucocitosis y coagulación intravascular.	Meningoencefalitis no supurativa y radiculitis en los nervios craneales; hiperplasia de los ganglios linfáticos; leucocitosis y coagulación intravascular; cilindros hialinos en los túbulos renales.	Patología de varamiento activo; Laringitis piogranulomatosa severa; Enfermedad parasitaria multiorgánica.		
Cont. Estom.	0 Z	0 Z	°Z		
DCC	Ν	N	o 390 M P 1		
° g	٩	٩			
SD	_	Σ			
(ယ၁) .၉၈၀၂	243	215			
oxəs	ď	O+			
Especie	* T. truncatus	S. coeruleoalba	* G. macrorhynchus		
Varamiento	Porto Santo Porto Santo	Porto Santo (MA)	(IC) Gnahequa blaha qe		
Fecha	81/8/8	81/9/9	81/2/4		
Q	45	43	620		

	de	5	de			
Entidad patológica	Asociada a pérdida significativa estado nutricional.	Asociada a u buen estada nutricional.	Asociada a pérdida significativa estado nutricional.	Interacción con las actividade: pesqueras.		
Hallazgos histopatológicos	Traumatismo cérvico-torácico; cambios agudos degenerativos en el músculo esquelético; leucocitosis y coagulación intravascular.	Leucocitosis y coagulación intravascular.	Hiperplasia y necrosis epitelial multiorgánica; Depleción y necrosis linfoide; Leucocitosis y coagulación intravascular.	Rostro fracturado; lesiones lineales de la piel submandibular compatibles con las improntas de la red; cambios agudos degenerativos en el músculo esquelético; enfisema y edema alveolar; dispositivos de pesca adheridos al cadáver.		
Cont. Estom.	Presencia moderada de espinas de peces.	Presencia moderada de otolitos y picos de calamar.	Presencia moderada de otolitos, lentes y picos de calamar.	Presencia escasa de picos de calamar.		
DCC	n	m	0	m		
		Σ	< S	Σ		
- ²		-	_			
(cm) ¹		160	198, 5	164		
oxəs oxəs		ď	O+	ď		
Especie K. berviceps		L. hosei	G. griseus	S. coeruleoalba		
Ubicación Varamiento	(IC) godne blaya del	(IC) Gaviota Punta	(IC) (IC)	gocapaιtauco (IC) blaγa de		
Fecha	61/2/91	£\3\16 ^{\$\$}	61/4/3	50/4/19		
Q	Z96	896	LL6	886		

- CAPÍTULO 6 -

147

Entidad patológica	Asociada a pérdida significativa del estado nutricional.	Asociada a pérdida significativa del estado nutricional.	Asociada a pérdida significativa del estado nutricional.	Asociada a un buen estado nutricional.	Sin determinar.
Hallazgos histopatológicos	Meningoencefalitis no supurativa; Hiperplasia y necrosis epitelial multiorgánica; Depleción y necrosis linfoide; Leucocitosis y coagulación intravascular; Patología de varamiento activo.	Emaciación; bronconeumonía linfoplasmática intersticial leve	Leucocitosis y coagulación intravascular.	Encefalitis no supurativa; Enfermedad parasitaria multiorgánica.	Cambios agudos degenerativos en el músculo esquelético.
Cont. Estom.	0 Z	Arena y pequeñas piezas de plástico.	ON	oz	Lentes de calamar y espinas de peces abundantes
DCC	_	4	n	ო	4
BC	Σ	< P	٩	Σ	AN
SD	-	_	-	Σ	Σ
၂၀၀၀ (ငယ)	184	161	146	195	170
oxəs	ď	O+	O+	O+	- O+
Especie	S. coeruleoalba	* T. truncatus	G. griseus	S. coeruleoalba	S. coeruleoalba
Ubicación Varamiento	(IC) blaya del Águila	(IC) Izduierdo Pozo	co (IC) Βοcapaιιαυ ΒΙαλα qe	(IC) Bincón El	(IC) Calma Costa
Fecha	52/6/18	81/9/32	81/01/02	61/1/12	61/2/41
Ø	633	634	686	096	996

- CAPÍTULO 6 -

148

6.2.2 Prevención de la contaminación

Para evitar y limitar el riesgo de contaminación de la muestra, se tomaron las siguientes medidas: (1) Se usó ropa de laboratorio de algodón durante el análisis; (2) Todo el equipo se limpió y enjuagó con agua Milli-Q y se examinó bajo un microscopio para detectar contaminación en el aire antes de su uso; (3) Se colocó un papel de filtro húmedo en una placa de Petri en la mesa de necropsia para registrar cualquier partícula en el aire que pudiera estar depositándose en las muestras; (4) Se realizaron blancos de procedimiento (250 ml de agua Milli-Q pasada por el sistema de filtración al vacío), sometidos al mismo tratamiento que las muestras (exposición al aire, digestión, filtración al vacío, etc.); (5) Todas las muestras se cubrieron con papel de aluminio después de cada paso del procedimiento. No se encontraron microplásticos en los blancos de procedimiento realizados y todos los controles resultaron libres de partículas.

6.2.3 Extracción del contenido gastrointestinal

Todos los animales incluidos en el presente estudio fueron examinados y sometidos a necropsia de acuerdo con los procedimientos estándar (Ijsseldijk et al., 2019). Los tractos gastrointestinales se trasladaron a una mesa de necropsia limpia, de acero inoxidable, donde se lavaron externamente con agua del grifo y se cortaron en diferentes secciones: esófago, compartimentos estomacales, ampolla duodenal e intestinos, tal y como se recoge detalladamente en el protocolo descrito a continuación y publicado en el repositorio de protocolos protocols.io (Montoto-Martínez et al., 2021).

Para lograr un diseño más funcional de la mesa de necropsias para la investigación de microplásticos, se realizó una adaptación a medida conectando el drenaje a un conjunto de tres tamices de acero inoxidable apilados (de 1000, 500 y 200 µm) donde el contenido estomacal lavado quedaba retenido tras los enjuagues (Fig. 6.2). Cada una de las secciones del tracto gastrointestinal se examinó por separado para su evaluación diagnóstica

(Imagen 6.1). Se extrajeron los otolitos de peces y picos de calamar con el objetivo de ser estudiados por separado por especialistas en estudios de dieta, y se procedió al diagnóstico de las basura marinas, que se realizó teniendo en cuenta las recomendaciones del último *Taller sobre basuras marinas de la Comisión Ballenera Internacional* (2020). El material retenido para estudio se transfirió a los botes correspondientes y se transportó al laboratorio en la Facultad de Ciencias del Mar, donde se llevaría a cabo el procedimiento de digestión de la materia orgánica y posterior análisis.



Imagen 6.1 Fotografía del intestino de uno de los animales estudiados dispuesto en una bandeja independiente antes de comenzar con su muestreo.

- CAPÍTULO 6 -



Fig.6.2: Fotografía de la mesa de necropsias en la sala de las instalaciones del Instituto Universitario de Sanidad Animal (IUSA) en la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC) en la que se puede apreciar el sistema de tamices acoplados al desagüe, una de las singularidades del "Protocolo para el estudio de la ingesta de microplásticos en cetáceos varados" (DOI: *dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bcfxitpn*).

A continuación se enumeran los pasos a realizar en el momento de la necropsia, en la misma sala habilitada donde se atienden los animales varados para su estudio. El procedimiento a seguir se puede comenzar tras las inspecciones necesarias a efectuar por parte del equipo de veterinaria, de manera que no se interfiera en sus rutinas ni necesidades de estudio y análisis para con el individuo objeto de estudio.

- Tras abrir la cavidad torácica, localice la parte final del esófago (entre ambos pulmones) antes de atravesar el diafragma por el hiato esofágico. Separe un poco del tejido conectivo que lo mantiene en su lugar y con un poco de cuerda (o bridas) haga un nudo alrededor de esta parte del esófago para sellarlo firmemente. Repita el procedimiento unos cinco centímetros cranealmente y corte entre las dos zonas anudadas.
- 2. Posteriormente, tras la extracción en bloque de los órganos torácicos, localice la zona proximal del esófago (tras el apéndice laríngeo) y séllela como se ha explicado en el paso anterior.
- 3. Retirar el esófago, enjuagarlo externamente y reservarlo en una bandeja aparte.

- 4. Después de abrir la cavidad abdominal, sellar la parte final del intestino de la misma manera que se explicó para el esófago, haciendo dos ligaduras con un poco de cuerda (o bridas) alrededor de esta porción intestinal.
- **5.** Extraer el paquete gastrointestinal en bloque y separarlo del resto de las estructuras (páncreas, bazo, ganglio linfático mesentérico, etc.).
- 6. Separar el estómago junto con la ampolla duodenal del resto del intestino. Para ello, sellaremos la parte proximal del duodeno con dos ligaduras, dejando un espacio de unos 5 cm entre ellas realizando un corte en la zona central de este espacio.
- 7. Diseccionar con cuidado, separando el intestino del mesenterio.
- 8. Aclarar externamente el estómago y la ampolla duodenal por un lado y el paquete intestinal por el otro y disponer en bandejas separadas para su análisis.

Durante todo el procedimiento, y especialmente llegado este punto en el que se abrirán cada uno de los compartimentos gastrointestinales, se extremarán las precauciones para evitar la contaminación, adoptando las medidas citadas anteriormente. Una vez se ha dispuesto el sistema de tamices acoplados al desagüe de la mesa de necropsia, se procede con los siguientes pasos, trabajando uno a uno con los distintos compartimentos gastrointestinales separados y reservados anteriormente en bandejas (Imagen 6.1).

- **9.** Aclare bien el exterior del compartimento a estudiar en la bandeja para posteriormente abrirlo e ir lavando el contenido directamente en la mesa de necropsia.
- 10. Aclare el interior del compartimento con agua, teniendo cuidado de enjuagar, separando del tejido en sí, todos los restos de digestión, que serán retenidos en los tamices del desagüe.
- **11.** Realice el examen macroscópico del compartimento que está siendo inspeccionado, tomando las muestras que sean necesarias para estudios histopatológicos y, de ser necesario, microbiología.
- **12.** Continúe lavando el interior del compartimento con abundante agua, frotando bien las mucosas hasta liberar todos los restos digestivos, que serán convenientemente retenidos en los tamices acoplados al desagüe.
- **13.** Una vez finalizado el lavado interior del compartimento, aclare la mesa de necropsias con abundante agua para que cualquier partícula que pueda estar sobre la misma termine retenida en los tamices del desagüe.
- 14. Proceda a retirar los tamices uno a uno, realizando una observación en detalle y extracción manual de los restos orgánicos retenidos para la observación y estudio de la dieta del organismo. Éstos restos serán extraídos e introducidos en un recipiente hermético, almacenándose en un congelador a -20 °C para su posterior estudio en el laboratorio por parte del equipo especializado en esta materia.

15. Seguidamente, realice una observación exhaustiva y extracción manual de los parásitos* para, al igual que en el paso anterior, su observación e identificación por parte del equipo especializado en esta materia.

(*) Se recogerá el mayor número de parásitos presentes para realizar un censo de la carga parasitaria, introduciéndolos en diferentes recipientes para cada tipo de parásito y órgano parasitado (esófago, estómago y ampolla duodenal, e intestino). Se colocarán en alcohol de 70°, incluyendo en la etiqueta el nombre del órgano donde se observaron.

Asimismo, en todos los casos se dará un índice de carga parasitaria (1-5) en los órganos donde aparezcan los parásitos:

- Leve: 1-10 parásitos
- Moderada: 20-50 parásitos
- Intermedio: 50-100 parásitos
- Alta: 100-500 parásitos
- Masivo: más de 500 parásitos
- 16. Por último, antes de proceder al almacenamiento del contenido retenido en el tamiz, proceda con una última observación exhaustiva y una extracción manual de los residuos no orgánicos depositados en el tamiz de mayor luz de malla para el estudio de los posibles elementos de basuras marinas y cuerpos extraños presentes.
- **17.** Los residuos extraídos se introducirán en recipientes diferenciados para cada compartimento (esófago, estómago y ampolla duodenal, e intestinos) y se almacenarán en congelación a -20 °C para su posterior estudio en laboratorio.
- **18.** Una vez completadas las observaciones para los estudios de dieta, parásitos y macrobasuras, proceda a guardar el contenido de cada uno de ellos en frascos etiquetados con la luz de malla y el compartimento correspondiente, para su posterior tratamiento en el laboratorio.
- **19.** Al finalizar este proceso sobre la mesa de necropsia con cada compartimento, limpie bien dicha superficie y proceda a cambiar el filtro de control de contaminación aérea que se había colocado previamente en la zona de trabajo, reemplazándolo por uno limpio para analizar el siguiente compartimento.

6.2.4 Análisis de laboratorio

Una vez finalizado el trabajo en la sala de necropsias y recogidas las muestras de microplásticos correspondientes a cada uno de los compartimentos gastrointestinales en frascos separados también en función del tamiz retenedor, se procede a analizar estas muestras para la determinación y caracterización de los posibles microplásticos que pudieran contener.

En el laboratorio, el primer paso a abordar será la digestión de la materia orgánica. Siguiendo el protocolo de Foekema et al. (2013) para la eliminación de la materia orgánica, se prepara la digestión del contenido estomacal muestreado transfiriéndolo a un vaso de precipitados de cristal en el que verteremos aproximadamente tres veces el volumen contenido de hidróxido de potasio (KOH) al 10%. El tiempo de degradación oscilará entre unas muestras y otras en función de la cantidad de materia orgánica contenida en la muestra, recomendando un media mínima de 20 días a temperatura ambiente.

Una vez degradado el material, se siguieron los pasos del Protocolo de "Preparación de muestras de agua de mar para la determinación de microplásticos" (Montoto-Martínez and Gelado-Caballero, 2020) en el que se procede con los siguientes pasos:

- 1. Limpie el vaso de cristal donde se transfiere la muestra de agua de mar: enjuáguelo bien tres veces con agua MilliQ, anotando el volumen empleado.
- Prepare el sistema de filtración al vacío con un filtro de microfibra de vidrio (0.7 μm; GF/F ø=47 mm) y filtre todo el volumen de agua de la muestra.
- **3.** Enjuague el sistema de filtración al vacío tres veces mientras sigue filtrando al filtro de microfibra, para que no queden partículas en las paredes contenedoras.
- **4.** Coloque el filtro en una placa Petri, tápelo y déjelo secar durante 24 horas en la estufa a una temperatura de 60°C.
- 5. Una vez seco, observe el filtro bajo un microscopio.
- 6. Tome fotografías y medidas de las partículas identificadas siguiendo las directrices de Lusher et al. (2014).

En el caso de estudio analizado en este capítulo las muestras se inspeccionaron bajo un microscopio estereoscópico (Leica S9i) siguiendo el procedimiento llevado a cabo por Lusher et al. (2014) para la clasificación de partículas, registrando el número, tamaño, color y forma de los microplásticos identificados por individuo. Se consideraron varias categorías: fibras, fragmentos, películas, gránulos, perlas y espumas. No obstante, todos los microplásticos encontrados fueron fibras, fragmentos o películas, descartándose así el resto de categorías en el análisis de los resultados.

En la página siguiente se puede ver un diagrama resumen del procedimiento (Fig. 6.3) desarrollado en el marco del Proyecto MARCET (MAC/1.1b/149) de la convocatoria del Fondo Europeo de Desarrollo Regional a través del Programa Operativo de Cooperación Territorial Madeira-Açores-Canarias (POMAC) 2014-2020. En el Anexo 6.1. se incluye el protocolo tal y como aparece registrado en el repositorio *protocols.io*.



- CAPÍTULO 6 -

6.2.5 Detección de contaminantes orgánicos persistentes

La separación cromatográfica de los analitos se llevó a cabo en un equipo de cromatografía líquida de Agilent Techonologies (modelo 1260) de inyección automática con detector de diodo array (HPLC-DAD) y columna ACE-1210-1546 (150x 4.6 mm) acoplado a un equipo de cromatografía liquida con espectrometría de masas Agilent Techonologies (modelo 6100).

La fase móvil fue una mezcla de acetonitrilo (Solvente A) y agua ultra pura Mili-Q (Solvente B) ambos con una concentración de 0.1% de ácido acético. El gradiente programado usado fue: 0-30 min, 45% A y 55% B, 30-31 min, 80% A y 20% B y finalmente 100% B durante 9 min. A continuación, la columna se reacondiciona a 45% de A y 55% de B. El flujo de la fase móvil se fijó en 0.8 mL/min, siendo la inyección del volumen de muestra de 20 µL y la longitud de onda de detección de 210 nm, para todos los analitos.

Las condiciones para la obtención de los espectros de masas de cada uno de los derivados plásticos varían en función de su naturaleza. Así pues, se dividen en tres grandes grupos: bisfenoles, bisfenol S (BPS), bisfenol F (BPF) y bisfenol A (BPA); ftalatos, di(2-etilhexil)ftalato (DEHP), dibutilftalato (DBP), dietilftalato (DEP); y pesticidas, diclorofenildicloroetano (DDD), diclorodifenildicloroetileno (DDE) y diclorodifeniltricloroetano (DDT). De esta forma, se logran optimizar y elaborar tres métodos de detección másica distintos para cada grupo de contaminantes.

6.2.6 Análisis estadístico

La estadística descriptiva y el análisis de los resultados se realizaron con RStudio (R Core Team, 2019). Se utilizó estadística no paramétrica, ya que los datos carecían de normalidad. Se calcularon los coeficientes de correlación de Spearman para evaluar la fuerza y la dirección de las correlaciones entre los contaminantes y la abundancia de microplásticos, entre otras variables que dieron negativo. El número medio de partículas por sección del tracto gastrointestinal (esófago, estómago, ampolla duodenal e intestinos) se comparó con pruebas no paramétricas (Kruskal-Wallis y Wilcoxon).

6.3 Resultados y discusión

En nuestro conocimiento, este estudio ha sido el primero en evaluar y cuantificar la ingestión de microplásticos y las concentraciones de contaminantes orgánicos persistentes en tejidos de cetáceos varados en la Región Macaronésica. En él, se examinó el tracto gastrointestinal completo de 12 individuos de 6 especies de odontocetos que vararon a lo largo de las costas de Madeira y las Islas Canarias entre 2018 y 2019 (Fig. 6.1).

El sexo y la morfometría, así como las categorías corporales y de descomposición, entre otros datos patológicos relevantes, se incluyen en la Tabla 6.1. La muestra incluye cinco *S. coeruleoalba*, dos *T. truncatus*, dos *G. griseus*, un *G. macrorhynchus*, un *K. berviceps* y un *L. hosei*; seis hembras y seis machos, de los cuales ocho eran animales inmaduros.

Las investigaciones existentes reconocen la importancia del tema abordado en este estudio:

 Estos animales son considerados importantes centinelas de la contaminación marina (Bossart, 2011);

• A pesar de que los impactos de las basuras marinas en la fauna son un tema de investigación amplio y cada vez más estudiado, falta conocimiento sobre la incidencia y los niveles de microplásticos en los grandes vertebrados marinos Taller de la Sociedad Europea de Cetáceos (Panti et al., 2019), "el desarrollo de protocolos que permitan un enfoque armonizado para la monitorización del impacto de las basuras marinas en los mamíferos marinos, incluidos los microplásticos, se ha convertido en un aspecto esencial a tener en cuenta en futuras investigaciones";

► Los mamíferos marinos a menudo se utilizan como especies emblemáticas, convenientes para las labores de concienciación y estimular la acción por parte de la ciudadanía o la comunidad (Bowen-Jones and Entwistle, 2002).

En este sentido, y antes de entrar en detalles y discutir los resultados más cuantitativos de la investigación, se destacan dos importantes logros de carácter cualitativo:

• La validación de un protocolo de muestreo de microplásticos que sirve para obtener muestras de diferentes equipos multidisciplinarios (i.e. Facultades de Veterinaria y Ciencias del Mar), sin interferir en el trabajo de ninguna de las partes.

► La exitosa adaptación de la mesa de necropsias empleada para la extracción de microplásticos del contenido del tracto gastrointestinal que resultó ventajosa, además de ser fácilmente replicable por cualquier grupo de investigación que ya cuente con las instalaciones necesarias para realizar análisis de autopsias de cetáceos, cumpliendo con las necesidades de armonización explicadas por Panti et al. (2019).

6.3.1 Ingestión de plástico

A) Cantidad y tipo de partículas

Se encontraron microplásticos en todos los animales investigados, al igual que en otros estudios previos que abordaron específicamente estas partículas (Hernández-González et al., 2018; Lusher et al., 2018; Moore et al., 2020). De las 722 partículas encontradas, la mayoría (n=708, 98.06%) fueron fibras. Los fragmentos se encontraron en un tercio de los animales analizados, dos delfines mulares y dos delfines listados, en diferentes tramos de sus vías digestivas. Además, se encontraron dos films de plástico en un delfín mular hembra.

Con la excepción de estas dos películas plásticas y un fragmento que apenas supera los 5 mm, no hubo registro de macroplásticos en los animales analizados. Consideramos importante resaltar este resultado porque, si bien existen estudios que han demostrado el impacto de la ingestión de grandes cantidades de basuras marinas en algunas ballenas (Unger et al., 2016), el porcentaje de ocurrencia en mamíferos marinos en particular es relativamente bajo (4.4%) según un estudio de Kühn y van Franeker (2020).

Además, los informes sobre la ausencia de basuras marinas en este tipo de estudios no son tan frecuentes, hasta el punto de que en ocasiones se llega a exagerar la presencia de estos materiales, por pequeña que sea, como comentan en su artículo Völker et al. (2020). En este sentido, en el último *Taller sobre Basuras Marinas de la Comisión Ballenera Internacional* se recomendó que se registraran también los valores nulos de ingestión, o el enredo en desechos marinos en los informes de necropsia (IWC, 2020).

Por otro lado, todos los animales contenían microplásticos de diversos tamaños, siendo la mayoría de las partículas clasificadas como fibras (98.06%, n=708). Aparecieron fragmentos (1.66%, n=12) en 4 de los 12 animales analizados, correspondiéndose con dos *T. truncatus* y dos *S. Coeruleoalba*. En el esófago y el estómago de una hembra de *T. truncatus* (Código de identificación (en adelante, Cet ID) = 934) se encontraron dos films, correspondientes a las etiquetas de plástico mencionadas anteriormente e identificadas como polipropileno. Se encontraron un promedio de 59.08 fibras (SD = 40.52, n=12) y 3.00 fragmentos (SD = 1.15, n=4) por animal.

Centrándonos en partículas menores de 5 mm, encontramos algunos estudios con los que comparar nuestros resultados, aunque no sin dificultades, debido a los diferentes enfoques metodológicos. Lusher et al. (2018) investigaron 21 cetáceos varados y encontraron microplásticos en las vías digestivas de todos ellos, de 1 a 88 partículas por animal y en su mayoría fibras (83.6%). Además, Moore et al. (2020) y Hernández-González (2018) detectaron microplásticos en cada animal muestreado: con una media de 11.6 (SD = 6.6) y de 12 (SD = 8) por beluga y delfín común, respectivamente. Novillo et al. (2020) encontraron microplásticos en el 90.5 % de los delfines estudiados, lo que representa una media de 14.9 (SD = 22.3) partículas por animal. - CAPÍTULO 6 -

En este estudio, el promedio de partículas encontradas es hasta cinco veces mayor (59.08, SD = 40.52 fibras y 3.00, SD = 1.15 fragmentos) que los valores reportados anteriormente. Sin embargo, es importante señalar que el rango de tamaño abordado en este trabajo de investigación, utilizando un sistema de tamizado que permitió la retención de partículas hasta 200 μ m, es mayor que el abordado en otros estudios citados. En este sentido, otros autores coinciden en que las comparaciones no son fáciles, ya que los resultados dependen en gran medida de diversos factores como la metodología utilizada o la región geográfica estudiada (Moore et al., 2020).

Además, diferentes especies de cetáceos de la misma área geográfica pueden tener preferencias de presa y estrategias de alimentación específicas de la especie que pueden conllevar diferencias en la potencial absorción de microplásticos (Burkhardt-Holm and N'Guyen, 2019). Hay pocos datos publicados para evaluar este tema clave, y las limitaciones prácticas implícitas en el trabajo con animales varados dificultan su abordaje con la profundidad que se merece.

No obstante, el porcentaje de fibras (98.06%) con respecto a los fragmentos encontrados corrobora la creciente evidencia de que las microfibras constituyen una parte importante de la contaminación por microplásticos en el medio marino (Dris et al., 2016). Además, como observaron Moore et al. (2020), nuestros resultados muestran que la abundancia de microplásticos puede distribuirse de manera desigual en todo el tracto gastrointestinal. Estos resultados, además, podrían indicar que las partículas de este tamaño (microplásticos, menores de 5 mm) son transitorias, como también se sugiere en otras publicaciones (Lusher et al., 2018; Nelms et al., 2019).

B) Tamaños

El tamaño de las fibras osciló entre 0.1 y 34 mm (media: 2.66; SD: 2.51 mm). En cuanto a los fragmentos, los tamaños oscilaron entre 4.42·10⁻³ y 5.6 mm², y su área media fue de 1.11 mm² (SD: 1.94 mm²) (Fig. 6.4). Nuestros datos están en consonancia con otros reportes, presentando el mayor porcentaje de fibras entre 1 y 3 mm de longitud. Esta fracción fue también la más predominante en las aguas costeras macaronésicas, región donde se desarrolla este estudio (Montoto-Martínez et al., 2020). A escala global, Suaria et al. (2020) dieron cuenta de fibras en aguas superficiales oceánicas que oscilan entre 0.09 y 27.06 mm (mediana: 1.07 mm), con solo tres fibras de más de 10 mm y solo tres de más de 15 mm. En nuestro caso, quince fibras midieron más de 10 mm y seis más de 15 mm. Siguiendo la misma tendencia dentro de otros tractos gastrointestinales analizados, Moore et al. (2020) no encontraron partículas de más de 5 mm de longitud, siendo la mayoría de ellas menores de 2 mm. La longitud media de las fibras encontrada en nuestro estudio fue muy similar (media: 2.66 mm; SD: 2.51 mm) al rango encontrado por Hernández-González (2018), (media: 2.1 mm; SD: 1.26 mm) y por Nelms et al. (2019), (media: 2 mm; SD: 2.3 mm).

Basándonos en el tamaño relativamente pequeño de las partículas encontradas, parece poco probable que éstas puedan causar lesiones físicas. Sin embargo, el daño físico no es el único efecto adverso que se puede considerar cuando se aborda la exposición a los microplásticos. Aunque se necesitan más estudios para comprender verdaderamente si el origen de la contaminación química en los organismos estudiados proviene de los plásticos o de otras fuentes ambientales, varias líneas de evidencia científica sugieren que los plásticos de las basuras marinas conllevan un peligro químico adicional asociado con los contaminantes orgánicos persistentes que éstos tienen y acumulan (Rochman, 2015; Teuten et al., 2009).





C) Colores

El verde fue el color más frecuente (n = 274, 37.9 %), seguido del rojo (n = 153, 21 %) y el azul y el negro (n = 101, 14 % en ambos casos) (Fig. 6.5). Destaca el predominio del verde (38 %) frente a los otros colores como el azul, el negro o el rojo, que son los más frecuentes en estudios similares realizados sobre contenidos de vías digestivas en cetáceos (Hernández--González et al., 2018; Lusher et al., 2018; Xiong et al., 2018; Zhu et al., 2019; Novillo et al., 2020). Sorprendentemente, entre las muestras de agua de mar analizadas para el estudio presentado en el *Capítulo 3*, en la misma región, el verde tampoco alcanzó porcentajes mayoritarios. La ingestión de microplásticos por confusión con las especies de presa preferidas es poco probable

debido al comportamiento de alimentación de los cetáceos odontocetos y sus capacidades de ecolocalización (Walker and Coe, 1989), por lo que este resultado puede indicar que la ingesta de estas partículas podría ser indirecta. La dieta de las especies de odontocetos analizadas en este estudio varía levemente, siendo las presas más comunes los cefalópodos y los peces mesopelágicos (Culik and Wurtz, 2011), como lo confirman los registros de contenido estomacal que se muestran en la Tabla 6.1. Varios estudios revelan la ingestión de microplásticos por especies que son presas potenciales para los animales estudiados (McGoran et al., 2021), como los peces linterna (Romeo et al., 2016) o las sepias (Oliveira et al., 2020).

Sin embargo, va más allá del alcance de este estudio determinar si la ingestión de microplásticos por parte de las presas puede tener un comportamiento selectivo en la ingesta de partículas de determinados colores. Aunque no disponemos de información suficiente ni de una muestra lo suficientemente robusta como para poder sacar conclusiones muy concretas, en nuestro caso, precisamente, los animales en los que se han encontrado las mayores cantidades de microplásticos no coinciden con aquellos que, en el momento de su muerte, tenían la mayor cantidad de restos de presas en sus estómagos (Fig. 6.6). Con la información proporcionada por el análisis veterinario del contenido del estómago para el estudio de la dieta en la sala de necropsias, se encontró que el único animal con macroplásticos (Cet ID = 934) también tenía un alto número de microplásticos, revelados tras la digestión química del contenido estomacal en el laboratorio.



Fig.6.5: Distribución de colores de los microplásticos encontrados en este estudio.



Fig.6.6: Relación entre los contenidos estomacales analizados para los registros dietéticos y el estudio de la abundancia de microplásticos. El Cet 934 fue el único animal con macroplásticos en su contenido estomacal, lo que se corresponde con un alto registro de microplásticos. También se observa que el animal que contenía más restos de presas en su estómago (Cet ID = 956) tenía las segundas concentraciones más bajas de microplásticos.

6.3.2 Distribución de partículas en los tractos digestivos

La distribución de las partículas ingeridas no presentó diferencias significativas en cuanto a su ocurrencia en los distintos compartimentos del tracto gastrointestinal (esófago, estómago, ampolla duodenal e intestinos) (Kruskal-Wallis, p = 0.063). La prueba de Wilcoxon reveló diferencias en las medias entre grupos (p = 0.0034) sólo en el caso del estómago y la ampolla duodenal (Fig. 6.7), lo que fácilmente puede deberse a la diferencia de tamaño de estas dos cámaras. El análisis de correlación de Spearman evidenció una correlación negativa relativamente significativa en el número de microplásticos en el contenido del tracto gastrointestinal y la longitud total de los animales (R = -0.78, p=0.007), indicando un menor número de elementos con el aumento de la longitud del animal. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la muestra de animales es pequeña y comprende diferentes especies, por lo que se necesitan más estudios para establecer relaciones más fiables.



Fig.6.7: Distribución de microplásticos en las secciones gastrointestinales. No se encontraron diferencias significativas en la abundancia de microplásticos dentro de las diferentes secciones gastrointestinales, excepto en el caso de la ampolla duodenal y el estómago.

6.3.3 Contaminantes orgánicos persistentes

Se encontraron bisfenoles y ftalatos en todas las muestras de músculo esquelético, mientras que 10 de los 12 animales analizados también presentaban pesticidas, aunque en menor concentración. Los compuestos NP (nonilfenol) y NP-9 (nonilfenol-9) no se encontraron en ninguna de las muestras. En la Tabla 6.2, se presentan las concentraciones medias de los nueve compuestos detectados (en ng/g), junto con la desviación estándar correspondiente al triplicado realizado. Los valores medios se representan en la Fig. 6.8, donde las concentraciones máximas pueden observarse sombreadas en rojo. No se encontraron correlaciones entre los contaminantes orgánicos persistentes analizados y la abundancia de microplásticos (Test de Spearman, R = 0.43, p = 0.16), ni entre el tamaño del animal y el total de contaminantes presentes en el tejido (Test de Spearman, R = -0.22, p = 0.48).

Bisfenoles

Los compuestos correspondientes a la familia de los bisfenoles se encontraron en el 94.44% de las muestras y sus concentraciones oscilaron entre 4 ng/g y 984 ng/g con valores de desviación estándar inferiores a los ±100 ng/g en todas las mediciones realizadas. En particular, el BPA osciló entre 48.67 ng/g (*G. griseus*, Cet ID = 977) y 731.67 ng/g (*G. macrorhynchus*, Cet ID = 920). Las concentraciones de BPA observadas por Page-Karjian et al. (2020) en muestras de grasa tomadas de *T. truncatus* varados en el sureste de Estados Unidos durante 2012-2018 fueron mucho más altas que las del presente estudio, llegando hasta 258.3 g/g frente a 0.6 g/g para la misma especie. Una evaluación global del BPA en el medio ambiente realizada por Corrales et al. (2015) reveló concentraciones en la fauna, sobre todo en peces, que oscilaban entre 0.2 y 13000 ng/g.

Ftalatos

Los ftalatos estudiados resultaron estar presentes en menor proporción que los bisfenoles en los animales de estudio. El compuesto detectado con mayor frecuencia fue el di(2-etilhexil)



Fig.6.8: Mapa de calor de las concentraciones de los diferentes contaminantes orgánicos persistentes analizados: bisfenol S (BPS), bisfenol F (BPF) y bisfenol A (BPA), di (2-etilhexil) ftalato (DEHP), dibutilftalato (DBP) y dietilftalato (DEP), dicloroetano (DDD), diclorodifenil dicloroetileno (DDE) y diclorodifenil tricloroetano (DDT)

ftalato (DEHP), que se encontró en el 88% de las muestras. Esto no es sorprendente, ya que es uno de los más utilizados, representando en 2015 un 37.1% del mercado mundial de aditivos plásticos (Hermabessiere et al., 2017). De hecho, la concentración de DEHP reportada en muestras de biopsia de piel de delfines listados del Mediterráneo (Baini et al., 2017) es casi ocho veces mayor que la concentración más alta encontrada en nuestro estudio, que también corresponde a un delfín listado. El ftalato menos presente fue el DEP (ftalato de dietilo) con un 38.88% de ocurrencia y un rango de concentración de 13 a 225 ng/g con una SD inferior a 20 ng/g. La mediana de las concentraciones en nuestro estudio (74 ng/g) es muy similar a la de Page-Karjian et al. (2020) en el sureste de Estados Unidos: 70 ng/g para el caso específico de *Stenella spp*.

Pesticidas

Por último, cabe señalar que los pesticidas analizados se encontraron en el 50% de las muestras en el caso del DDD (dicloroetano de diclorofenilo) con concentraciones entre 199 ng/g y 2204 ng/g; en el 40% en el caso del DDT (diclorodifeniltricloroetano) con una concentración mínima de 100 ng/g y una máxima de 465 ng/g, y en el 8.33% en el caso del DDE (diclorodifenil dicloroetileno), cuya concentración varió desde 898 ng/g a 178 ng/g (SD < 26 ng/g). Como se muestra en la Fig. 7.8, salvo dos individuos, todos los animales presentaron niveles de pesticidas en sus tejidos, lo que da una idea de la extensión de estos contaminantes.

El mayor nivel de contaminación tisular encontrado corresponde a la concentración de DDD en un *T. truncatus* varado en la costa de Gran Canaria (Fig. 6.9, Cet ID = 934). Este animal presentó una concentración superior a 1ppm (1620 ng/g), lo que Letcher et al. (2010) consideran una concentración tóxica para los compuestos organohalogenados en los tejidos de los mamíferos marinos. Esto puede estar relacionado con las características intrínsecas de esta especie de delfín, como ser una especie que habita y mora cerca de la costa, donde también se alimenta, lo que los sitúa entre los mamíferos marinos con mayor acumulación de organoclorados persistentes (Carballo et al., 2008).

En un estudio realizado por García-Álvarez et al. (2014) en el que se midieron los niveles de contaminantes orgánicos persistentes en *T. truncatus* en libertad de las Islas Canarias, el grupo de pesticidas que más contribuyó a los organoclorados fue el de los DDTs, y en particular el p,p'-DDE, que supuso una media del 87.6% del sumatorio de los DDTs. Además, en un estudio anterior del mismo grupo, realizado en *T. truncatus* varados en la misma región, los DDTs estaban presentes en las concentraciones más altas, que iban de 147 a 21050 ng/g en la grasa (Carballo et al., 2008). Según los autores, estos niveles de contaminación se acercan a las concentraciones que podrían producir efectos inmunosupresores y antiandrogénicos en los mamíferos marinos y, por tanto, pueden suponer un cierto riesgo para la salud de estos animales.

Los niveles de DDT en las Islas Canarias en diferentes muestras ambientales alcanzan concentraciones bastante elevadas en comparación con otras zonas del mundo. Probablemente debido al uso intensivo de este producto en la región en el pasado, se han encontrado altos niveles de DDT en los microplásticos muestreados en Gran Canaria, con una mediana de 993.5 ng/g en el caso de pellets y 32.4 ng/g en el caso de fragmentos en la playa de Las Canteras, y 76.5 ng/g y 241.6 ng/g, respectivamente, en la playa de Cuervitos (Camacho et al., 2019).



Fig.6.9: Concentración de pesticidas (DDT, DDD y DDE) en los cetáceos analizados. La línea roja indica la concentración a la que los compuestos organohalogenados se consideran tóxicos en los tejidos de los mamíferos marinos (Letcher et al. 2010).

(DEP); (3) Pesticidas: diclorofenil dicloroetano (DDD), diclorodifenil tricloroetano (DDT) y diclorodifenil dicloroetileno (DDE). R significa "réplica" y NQ corresponde a Tabla 6.2: Concentración (µg/g) DE (µg/g) de los contaminantes orgánicos persistentes analizados correspondientes a los doce individuos estudiados con el método MSPD-HPLC-DAD-MS. De esta manera, se pudo optimizar y desarrollar tres métodos de detección masiva diferentes para cada grupo de contaminantes, que corresponden a: (1) Bisfenoles: bisfenol S (BPS), bisfenol F (BPF) y bisfenol A (BPA); (2) Ftalatos: di (2-etilhexil) ftalato (DEHP), dibutilftalato (DBP) y dietilftalato "no cuantificado", debido a la baja concentración de estos compuestos, por debajo del límite de detección.

Especies	Q	A BPS	BPF	BPA	DEHP	DBP	DEP	DDD	DDT	DDE
S. coeruleoalba	983	I 0.030±0.002	0.279±0.005	0.026±0.010	0.230±0.023	1.056±0.058	0.079±0.016	I	0.138±0.001	I
S. coeruleoalba	983	2 0.104±0.003	0.125±0.006	0.161±0.019	0.295±0.007	0.811±0.026	0.041±0.020	0.199±0.006	0.124±0.008	0.134±0.005
S. coeruleoalba	983	3 0.024±0.007	0.035±0.003	0.034±0.010	0.204± 0.003	0.625±0.006	0.027±0.004	I	0.167±0.005	I
S. coeruleoalba	950	ŊŊ	0.045 ± 0.0006	0.918±0.034	I	I	I	0.339±0.056	ı	I
S. coeruleoalba	950	2 0.745±0.011	I	0.984±0.022	0.073±0.001	0.266±0.056	0.069±0.006	0.599±0.032	I	I
S. coeruleoalba	950 3	3 0.236±0.001	0.053±0.001	0.134±0.024	0.162±0.018	0.665±0.023	0.050±0.019	I	0.181±0.528	0.178±0.002
S. coeruleoalba	43	Ŋ	0.046±0.004	0.035±0.002	1.633±0.010	I	ı	I	I	ı
S. coeruleoalba	43	2 NQ	0.138±0.005	0.154±0.025	2.748±0.021	I	ı	2.204±0.025	I	I
S. coeruleoalba	43	3 0.300±0.007	0.152±0.014	0.328±0.029	0.218±0.003	I	ı	0.609±0.010	ı	I
S. coeruleoalba	933	ŊŊ	0.166±0.006	0.654±0.006	0.3131±0.016	I	ı	0.699±0.022	I	I
S. coeruleoalba	933	ŊŊ	0.023±0.001	0.349±0.020	0.320±0.003	I	ı	0.894±0.028	I	I
S. coeruleoalba	933 3	3 0.004±0.0003	0.136±0.011	0.504±0.034	I	I	ı	0.673±0.011	ı	I
S. coeruleoalba	956	0.011±0.0003	0.064±0.001	0.190±0.046	0.230±0.009	0.794±0.016	0.216±0.004	I	0.166±0.012	I
S. coeruleoalba	956	2 0.033±0.0008	0.128±0.010	0.073±0.010	0.709±0.054	0.907±0.085	0.101±0.021	I	0.126±0.011	I
S. coeruleoalba	956 3	3 0.029±0.002	0.071±0.001	0.017±0.004	0.139±0.011	0.699±0.026	0.133±0.007	I		I
T. truncatus	934	0.017±0.001	0.323±0.031	0.021±0.011	1.354±0.031	I	ı	2.14±0.139	0.465±0.010	0.898±0.026
T. truncatus	934	2 0.007±0.0003	0.117±0.005	0.161±0.014	1.283±0.006	0.413±0.007		1.72±0.071	0.417±0.010	ı
T. truncatus	934 3	3 0.024±0.001	0.034±0.003	ŊŊ	1.146±0.012	I	ı	1.00±0.048	0.277±0.012	I
T. truncatus	42	0.004±0.0002	0.043±0.002	0.084±0.013	0.424±0.004	I	ı	0.523±0.020	ı	ı
T. truncatus	42	ŊŊ	0.113±0.001	0.196±0.010	ı	ı		ı	ı	ı
T. truncatus	42	NQ	0.028±0.001	0.656±0.011	0.186±0.007	I		0.637±0.013	·	ı
G. griseus	677	I 0.014±0.007	0.082±0.001	0.022±0.003	0.363±0.009	0.874±0.006	0.142±0.067	•	ı	I

(*) Continúa en la página siguiente.

1																Ľ
	DDE	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	
	DDT	I	I	I	0.087±0.002	0.105±0.001	I	I	I	0.093±0.022	I	T	0.010±0.0003	0.039±0.003	0.092±0.006	
	DDD	I	I	0.472±0.013	I	2.121±0.029	I	ī	I	0.282±0.009	0.550±0.001	I	I	I	I	
	DEP	0.043±0.008	0.069±0.010	I	I	I	I	I	I	I	I	I	0.225±0.035	0.013±0.007	0.055±0.020	
	DBP	1.355±0.081	0.537±0.022	0.311±0.031	I	0.076±0.001	I	I	0.969±0.035	I		0.664±0.025	0.610±0.030	0.355±0.018	0.691±0.027	
	DEHP	0.270±0.013	0.278±0.018	0.227±0.010	0.185±0.007	0.962±0.004	0.0572±0.025	0.613±0.008	I	0.130±0.018	0.0611±0.001	0.115±0.001	0.140±0.0312	0.128±0.012	0.721±0.010	0
	BPA	0.034±0.006	0.090±0.024	0.194±0.018	0.365±0.019	0.273±0.021	0.191±0.008	0.277±0.001	1.727±0.005	0.122±0.017	0.118±0.012	0.303±0.030	0.047±0.001	0.068±0.005	0.101±0.001	
	BPF	0.053±0.001	0.142±0.002	0.082±0.001	0.129±0.010	0.048±0.001	0.089±0.003	0.074±0.001	I	0.077±0.001	0.017±0.001	Ŋ	0.073±0.004	0.029±0.001	0.100±0.001	
	BPS	0.054±0.0010	0.129±0.001	Ŋ	0.011±0.002	0.007±0.002	0.005±0.0003	0.020±0.002	I	0.065±0.005	ŊŊ	0.361±0.033	0.008±0.0002	0.045±0.003	0.032±0.002	
	DR	77 2	77 3	39 1	39 2	39 3	20 1	20 2	20 3	57 1	57 2	57 3	33 1	33 2	33 3	100000000
	Especies	G. griseus 9.	G. griseus 9.	G. griseus 9:	G. griseus 9:	G. griseus 9:	G. macrorhynchus 92	G. macrorhynchus 92	G. macrorhynchus 92	K. breviceps 9!	K. breviceps 9!	K. breviceps 9!	L. hosei 9(L. hosei 9(L. hosei 9(

- CAPÍTULO 6 -

6.4 Conclusiones

En este trabajo se presenta un protocolo ideado para el estudio de la ingestión de microplásticos en cetáceos varados que permite la obtención de muestras valiosas para diferentes equipos de investigación interdisciplinarios. En él, se plantea la incorporación de un sistema de filtros a la mesa de necropsias, que demostró ser eficiente para la separación de microplásticos durante el análisis del contenido gastrointestinal sin interferir en las tareas propias de los equipos veterinarios.

En aplicación del citado protocolo, este estudio proporciona información sobre la ingestión de microplásticos en cetáceos y la presencia de contaminantes orgánicos persistentes en muestras de tejido en la Región Macaronésica (Atlántico centro-oriental). Salvo el caso de dos etiquetas de plástico que se encontraron en el esófago y el estómago de un mismo delfín, no se observaron partículas de plástico mayores de 5 mm. Por el contrario, las fibras microplásticas estaban presentes en todos los animales analizados, aunque consideramos en cantidades lo suficientemente bajas como para no bloquear o comprometer el funcionamiento del tracto digestivo.

Los resultados evidencian la exposición de los cetáceos a contaminantes orgánicos persistentes, ya que los contaminantes predominantes, los bisfenoles (BPS, BPF y BPA) y el DEHP se detectaron en el 94.44% y el 88% de las muestras de tejido, respectivamente. Además, a excepción de dos individuos, todos los animales presentaron concentraciones de pesticidas en sus tejidos. Quedan muchas preguntas aún por resolver con respecto al daño potencial y a largo plazo asociado con la exposición crónica a estos contaminantes orgánicos persistentes.





-CAPÍTULO 7-

7

Consideraciones para la identificación de microplásticos mediante espectroscopía micro-Raman.



Resumen

En este trabajo se incluye una primera aproximación al potencial del análisis de microplásticos mediante espectroscopía micro-Raman, una cuestión que debe investigarse más a fondo en un futuro, prestando especial atención a algunas limitaciones que presenta esta avanzada técnica. Fruto de las experiencias de análisis de partículas procedentes de las investigaciones desarrolladas en los capítulos anteriores, y mediante tres casos ilustrativos y la creación de una librería de espectros de referencia propia, se pone de relieve la importancia de las interferencias producidas por los pigmentos, la materia orgánica residual en la muestra, o el nivel de degradación de las partículas a analizar, cuestiones que resultan determinantes para una determinación polimérica efectiva.

7.1 Introducción

Desde los años 60, los estudios de microplásticos, de forma similar a las investigaciones sobre el cambio climático, se han sucedido de manera exponencial, duplicándose de media cada 7.7 años según un reciente y exhaustivo estudio de revisión realizado por Harris et al. (2021). Se trata, además, de un campo en el que la tendencia al aumento se sigue produciendo tanto en el tiempo como en la variedad de temas tratados.

Si bien la mayor proporción de los trabajos están vinculados al estudio en organismos (en torno al 34%), y junto con aquellos vinculados al medio ambiente suman más de la mitad del total, el tercer puesto en las temáticas lo ocupa el ámbito de la química. En este sentido, el estudio de la huella química y la identificación de los polímeros que conforman los microplásticos muestreados es un tema de una crucial relevancia al que se le ha comenzado a prestar atención posteriormente (Rochman, 2015).

Sin embargo, no se trata de una cuestión despreciable. Al contrario, según Rochman et al. (2016), los riesgos químicos de los productos de plásticos son lo suficientemente preocupantes como para ser éstos considerados como peligrosos. La cuestión reside en que durante la fase de fabricación de estos materiales se necesitan grandes cantidades de productos químicos que en su mayoría se derivan del petróleo crudo no renovable, varios de los cuales son peligrosos para la salud humana y el medio ambiente pudiendo llegar a liberarse bien durante la propia producción, o también durante el uso o la eliminación del producto de plástico. De acuerdo con los Programas de las Naciones Unidas y de la Unión Europea, más del 50% de los plásticos que se producen son peligrosos en función de los monómeros que los componen, los aditivos y los subproductos (Lithner et al., 2011).

7.1.1 La relevancia y utilidad de la identificación de los polímeros

La identificación de los polímeros es una fuente información muy valiosa para comprender las fuentes, el transporte y el destino de los microplásticos en el medio. Por un lado, ayuda a conocer los posibles focos de origen, y es por tanto a su vez una forma de poder diagnosticar y ajustar mejor los ámbitos de actuación desde la gestión. Como ejemplo de esta cuestión, Brignac et al. (2019) aportaron pruebas de la estratificación polimérica en el medio marino, poniendo de relieve que la mayor parte de los desechos marinos de Hawái llegan flotando desde fuentes lejanas y no desde los residentes o turistas de las propias islas.

Por otro lado, en cuanto a las partículas en sí, las distintas estructuras químicas de los polímeros harán que el comportamiento de éstas sea de una manera u otra en términos de degradación o interacción (química, física y/o biológica) en el medio ambiente. De la misma manera, las tasas de sorción y las concentraciones de contaminantes orgánicos y de metales pesados varían entre polímeros, lo que hace que algunos constituyan una mayor amenaza de exposición a los contaminantes para los organismos (Rochman et al., 2013).

Además, las herramientas de identificación de polímeros también proporcionan indicadores del desgaste ambiental de las partículas, un signo de su envejecimiento que sirve para estudiar la longevidad de la basura y el tiempo de permanencia en el medio (Nauendorf et al., 2016; Ter Halle et al., 2017), así como para indagar sobre el grado de degradación bajo distintas condiciones del medio, como monitorizaron Beltrán-Sanahuja et al. (2020).

En último lugar, la caracterización polimérica de las partículas, o al menos de una submuestra del conjunto estudiado, es reclamada por algunos autores como un procedimiento operativo necesario para confirmar la naturaleza plástica de las partículas identificadas. En una investigación realizada por Löder y Gerdts (2015) los autores concluyen que, especialmente para el caso de las partículas <500 μ m, la inspección visual de las muestras por sí sola resulta insuficiente, recomendando el uso de técnicas espectroscópicas como la espectroscopía micro-Raman o micro-FTIR (de infrarrojos por transformada de Fourier) que además aportan un valor añadido, como se recoge anteriormente. En un ensayo más exhaustivo sobre el nivel de incertidumbre de las concentraciones reportadas mediante la identificación puramente visual, utilizando criterios morfológicos, Lenz et al. (2015) demuestran que las tasas de éxito en la identificación son superiores al 83% para el caso de los microplásticos de un tamaño superior a las 100 μ m, disminuyendo al 63% en partículas menores de 50 μ m. Además, otro resultado interesante discierne entre el error cometido según el tipo de partícula, siendo éste superior para el caso de fibras frente a las partículas.

n°	Muestra	Polímero	Identificación en pieza	Color
5.60	Pieza de cubierta de aparato electrónico	ABS	No	Gris
2	Tapón de botella	HDPE	Sí	Rosa
3	Envase de gel de baño	HDPE	Sí	Transparente
4	Envase de suavizante	HDPE	Sí	Azul
5	Envase/Bolsa de papel higiénico	LDPE	Sí	Transparente
6	Bolsa fina de la compra	LDPE	Sí	Transparente
7	Cabo (aparejo pesca)	PA	No	Verde
8	Cabo (aparejo pesca)	PA	No	VerdeDesgastado
9	Nylon de pesca	PA	No	Transparente
10	Pieza para enrollar filamento impresión 3D	PC	Sí	Transparente
11	Botella	PET	Sí	Transparente/Azulada
12	Envase de comida	PET	Sí	Transparente
13	Pellet	PMMA	No	Amarillo
14	Pellet	PMMA	No	Transparente
15	Envase de comida	PP	Sí	Transparente
16	Envase de take-away	PP	Sí	Blanco
17	Bandeja de poliestireno	PS	Sí	Blanco
18	Corcho blanco	PS	No	Blanco
19	Cinta de teflón	PTFE	Sí	Blanco
20	Tubo de desague	PVC	Sí	Gris
21	Patilla de gafa protectora	PC	Sí	Transparente
22	Tecla de ordenador	ABS	No	BlancaAmarillenta

 Tabla 7.1:
 Relación de materiales de referencia estudiados.



Imagen 7.1 Relación de materiales de referencia preparados para el ensayo a partir de objetos de desecho cotidianos, siendo representativos de los polímeros más frecuentemente encontrados en las basuras marinas.

Como última reflexión en cuanto al tamaño como factor clave para la confirmación del origen plástico de las partículas, cabe mencionar que Gago et al. (2016) recomiendan la identificación polimérica mediante espectroscopía para todas aquellas partículas entre 1 y 100 µm y el Subgrupo Técnico sobre Basura Marina de la Directiva Marco Estrategia Marina (DMEM) no considera crítica la confirmación de la identificación mediante FTIR o espectroscopía Raman para el caso de partículas de más de 500 µm (Galgani et al., 2013).

En cualquier caso, es importante tener en cuenta que incluso la utilización de técnicas espectroscópicas complementarias a la identificación visual no resuelve el hecho de poder estar infravalorando las cantidades de partículas en la muestra por mera omisión a la hora de seleccionar visualmente las partículas para el análisis. Por este motivo, el tamaño de partícula y la capacidad del ojo humano serán invariablemente, siempre y cuando no estemos hablando de procesos automatizados, factores determinantes en el grado de certeza de las caracterizaciones de microplásticos realizadas.

7.1.2 Las razones para la elección de la espectroscopía micro-Raman

Son varios los métodos de confirmación polimérica de los microplásticos los que se comenzaron a poner en práctica, siendo la espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) y Raman de las más populares (Araujo et al., 2018; Cabernard et al., 2018; Elert et al., 2017; Löder and Gerdts, 2015; Renner et al., 2018; Song et al., 2015). Por lo general, las técnicas seguidas para la identificación espectroscópica de microplásticos carecen de un protocolo estandarizado (Song et al., 2015), no representando ninguna de ellas una solución absoluta o carente de limitaciones, e incluso siendo discutible la necesidad de su utilización en función del tamaño de las partículas analizadas y el objeto del estudio en sí.

En un extenso trabajo de revisión, Araujo et al. (2018) recopilan las principales ventajas e inconvenientes de la espectroscopía micro-Raman para este fin, y reconocen que se necesita urgentemente una herramienta de confirmación polimérica rápida y fácil de aplicar, capaz de detectar pequeños microplásticos. Si bien el micro-Raman es una herramienta indispensable para el análisis de microplásticos muy pequeños, en concreto, inferior a las 20µm, no es una técnica usada mayoritariamente debido, principalmente, a las interferencias causadas por fluorescencia, y los extensos tiempos de medición que se requieren (di Mauro et al. 2022). No obstante, precisamente por la imperante necesidad de estudiar las fracciones más pequeñas de microplásticos, fuera del rango de medida de la espectroscopía por infrarrojos (Araujo et al., 2018), y los esfuerzos que ya hoy en día se están realizando para optimizar la calidad de la señal (Oßmann et al., 2017) o implementar rutinas que reduzcan considerablemente el tiempo de medida (Ghosal et al., 2018), se ha optado por profundizar en la espectroscopía micro-Raman en este trabajo.

Así pues, en este capítulo se ahonda precisamente en algunas cuestiones a tener en cuenta a la hora de analizar microplásticos mediante la citada técnica, haciendo hincapié en una serie de aspectos clave para optimizar la resolución de las medidas e incrementar las posibilidades y la certeza en la identificación polimérica.

7.2 Materiales y métodos

7.2.1 Biblioteca de espectros de referencia de elaboración propia

En el marco de este ensayo y con el objetivo de enriquecer la base de datos de espectros de referencia con partículas de polímeros conocidos e incrementar así las posibilidades de identificación de las muestras, se realizó un trabajo de preparación, creación, análisis y validación de una serie de espectros de referencia a partir de una selección de materiales.

Tras realizar una búsqueda de bibliografía referente a estudios de polímeros mayoritarios en los resultados de basuras marinas y contrastarla con el último informe de PlasticsEurope (2022) sobre la producción y demanda de los distintos tipos de resinas plásticas más empleadas, especialmente, en los productos de usar y tirar, por ser estos componentes mayoritarios del conjunto de las basuras marinas, se seleccionaron un total de 22 materiales de referencia a partir de objetos de desecho cotidianos, siendo representativos de los polímeros más frecuentemente encontrados en los estudios de microplásticos (Tabla 7.1). En la Imagen 7.1 se puede ver la relación de materiales de referencia preparados para el ensayo.

Estas partículas se cortaron con un tamaño aproximado de 1x1 cm, seleccionando una parte plana para obtener los espectros de la manera más limpia posible. Además, se seleccionaron preferentemente artículos que no tuvieran color, si bien en el caso de algunos materiales, como el polietileno de alta densidad (HDPE) se incorporaron duplicados, uno con color y otro incoloro, precisamente para poder estudiar las diferencias en los espectros en relación a este factor.

7.2.2 Caracterización de microplásticos de muestras ambientales propias

Para la realización de este ensayo se efectuó una caracterización de una serie de microplásticos procedentes de los muestreos de los capítulos anteriores. Esta caracterización permitió conocer, en su conjunto, el tipo de microplásticos identificados mayoritariamente en las muestras analizadas hasta el momento, cuantificando así la predominancia de los distintos tipos de plástico y analizando algunos de los factores vinculantes para el objeto de este ensayo, como el tamaño, el color o la degradación.

Se analizó una submuestra de 33 partículas procedentes de muestras de agua de mar de las cuales el 67% eran fibras, el 27% fragmentos, y el 6% partículas biogénicas. Las partículas fueron seleccionadas de acuerdo con la relación de abundancia y la mayor dificultad de identificación de las fibras con respecto a los fragmentos y películas. Igualmente, también se tuvieron en cuenta los colores más frecuentes encontrados en los estudios, de manera que la submuestra fuera lo más representativa posible. Para una mejor resolución, cada una de las partículas fueron transferidas individualmente del filtro de fibra de vidrio original a uno de policarbonato, de manera que fuera más sencillo obtener un espectro limpio, con menos interferencias y mayor facilidad para el enfoque (Anexo 7.1).

Las medidas, tanto de los materiales de referencia como de las muestras ambientales, se realizaron en las instalaciones de los Centros Científicos y Tecnológicos de la Universidad de Barcelona (CCiTUB). El equipo utilizado fue un espectrofotómetro microRaman Horiba Jobin-Yvon Labram HR800-UV equipado con 4 láseres que cubren longitudes de onda desde UV hasta NIR. Para cada una de las partículas se realizaron varias mediciones, ajustando en cada caso el tiempo de adquisición y la longitud de onda, entre otros parámetros. La rutina de trabajo se iniciaba con una búsqueda de las mejores áreas para la medición por microscopía., identificando previamente mediante fotografías el punto de enfoque del láser, tal y como describen di Mauro et al. (2022) en su trabajo. Para evitar la destrucción de las muestras y el aumento del ruido, la potencia del láser aplicada y el tiempo de adquisición se incrementaron gradualmente en función de la naturaleza y estado de cada partícula, con un máximo de 100 segundos.

Posteriormente, los espectros obtenidos se trataron con el *Software Spectragryph* (Menges, 2016). Los picos se normalizaron y las líneas base se corrigieron automáticamente siguiendo el método adaptativo que ofrece el programa. Los espectros se compararon con la biblioteca SLoPP, que consta de 148 espectros de referencia, incluyendo varios tipos de polímeros, colores y morfologías, y la biblioteca SLoPP-e, que tiene en cuenta los efectos del envejecimiento ambiental en los microplásticos, incluyendo 113 espectros (Munno et al., 2020). También se utilizó la quinta versión actualizada de *Pigment Checker Library* (Caggiani et al., 2016), junto con otros espectros de referencia de elaboración propia, tal y como se detalla a continuación.

- Capítulo 7 -



Fig.7.1: Gráfica de sectores mostrando la distribución en proporción de los distintos polímeros identificados de los polímeros más representativos de los materiales plásticos (n=33).

7.3 Resultados

El análisis con espectroscopía microRaman ha permitido obtener más información sobre los tipos de plásticos encontrados en este estudio y sus posibles fuentes. La obtención de los espectros fue un proceso que requirió sucesivas repeticiones, como ya se ha señalado, ajustando los parámetros del equipo para obtener la mejor combinación que devolviera un espectro suficientemente limpio sin dañar la partícula y sin introducir demasiado ruido ni producir demasiada fluorescencia. Mediciones complementarias en la región del infrarrojo cercano (a 785 nm) y el uso de la biblioteca de espectros SLOPP-e (Munno et al., 2020), que incluye espectros de referencia de polímeros degradados, permitieron identificar partículas con tasas de coincidencia superiores a 80%.

7.3.1 Biblioteca de espectros de referencia de elaboración propia

De los 22 materiales de referencia preparados, salvo uno que no pudo ser analizado, 16 de ellos se identificaron satisfactoriamente, representando el 76% de los espectros estudiados. Los cinco restantes no pudieron identificarse con un grado de certeza aceptable, siendo la causa principal la interferencia por la señal de la fluorescencia. Los altos niveles de fluorescencia fueron los responsables de la falta de determinación del polímetro en dos de las cuatro partículas no identificadas, mientras que en las otras dos, las coincidencias con espectros de diversos materiales hicieron imposible discernir o elegir uno de ellos predominantemente con la suficiente confianza.

7.3.2 Caracterización de microplásticos de muestras ambientales propias

Se analizaron un total de 33 partículas mediante espectroscopía micro-Raman, de las cuales tres cuartas partes pudieron ser satisfactoriamente identificadas, mientras que en un 15% de los espectros existieron interferencias que impidieron realizar una identificación dentro de un rango de certeza aceptable. En particular, el 58% fueron identificadas gracias a los espectros proporcionados por la librería SLOPPe, mientras que en el 17% de los casos fue suficiente con la librería SLOPP y en un 25% la identificación fue corroborada por ambas.

La distribución de los polímeros identificados se muestra en la Fig. 7.1, con una clara predominancia de polipropileno (PP, 38%) y polietileno (PE, 17%). En la selección inicial de las muestras se escogieron dos partículas clasificadas como biogénicas, con ánimo de ratificar también esta procedencia no sintética. En ambos casos, estas fibras fueron identificadas con un porcentaje de coincidencia superior al 80% con fibras de celulosa. Por otro lado, hubo cinco partículas en las que, dados los elevados niveles de fluorescencia que producían, no fueron identificables con certeza. Es el caso de la partícula mostrada en la Figura 7.2 a continuación.



Fig.7.2: Espectro de la fibra B25 del presente estudio, presentando altos niveles de fluorescencia que impiden su identificación. En amarillo, el mejor porcentaje de coincidencia devuelto por el Software Spectragryph (Rubber 3), con un 40%.
7.4 Discusión

El análisis con espectroscopia microRaman permitió, por un lado, obtener más información sobre el posible origen de los microplásticos estudiados, y por otro, profundizar en los factores que influyen en la determinación de su huella química mediante esta técnica, ayudando a identificar algunas consideraciones importantes para la elección y preparación de las muestras. En esta línea, la reciente publicación de Dabrowska (2021) proporciona una serie de buenas prácticas para la optimización en la obtención de los espectros de polímeros primarios, comprendiendo un estudio del caso particular de las redes fantasma, que resultó, además, muy propicio para la línea de la presente investigación.

A pesar de la intensa fluorescencia y el ruido de fondo en muchos de los espectros, las mediciones complementarias en la región del infrarrojo cercano (a 785 nm) y el uso de la biblioteca de espectros SLOPP-e (Munno et al., 2020), que incluye espectros de referencia de polímeros degradados, simulando su paso por el medio ambiente, permitieron identificar partículas con tasas de coincidencia superiores al 80%.

Además de la fluorescencia, otra cuestión clave que se desprende de las medidas de microRaman es que, para una correcta determinación de las partículas, es crucial examinar los espectros con especial atención a las alteraciones que los pigmentos producen sobre la huella química de los propios polímeros.

Del mismo modo, la meteorización también promueve la generación de diferentes grupos funcionales, principalmente C=O, O-H y C-O en la superficie de los microplásticos (Duan et al., 2021) y, por tanto, genera una serie de alteraciones que hacen que los espectros sean significativamente diferentes y, en general, menos claros y más difíciles de identificar. Según Duan et al. (2021), entre los diferentes factores que afectan a la meteorización ambiental de los plásticos, como el oxígeno, la temperatura o el contenido de agua, también influyen de forma significativa la presencia de materia orgánica y la formación de biofilm, condiciones ambas que se dan, por ejemplo, en el interior del tracto gastrointestinal. Así, en los apartados a continuación, a través de casos ilustrativos, se desgranan los factores considerados más determinantes: el color, la materia orgánica y el grado de degradación.

7.4.1 El color: factor de enmascaramiento en la identificación

Una cuestión clave que surgió de las medidas microRaman es que, para una correcta determinación de las partículas, es crucial examinar los espectros con especial atención a las alteraciones que producen los pigmentos en la huella química de los propios polímeros. Dado el predominio de la señal correspondiente a los pigmentos contenidos en las partículas, se utilizó



- CAPÍTULO 7 -

estomacal de un cetáceo.

Intensidad

la base de datos *Pigment Checker* para sustraer el espectro correspondiente a la coloración e identificar el polímero en cuestión.

Como caso ilustrativo de esta cuestión se presenta aquí la selección de dos fibras, del mismo color, pero procedentes de matrices diferentes: la primera de ellas de una muestra de microplásticos recogidos en aguas marinas (en concreto, en la investigación descrita en el *Capítulo 3*), y la otra, del tracto intestinal de uno de los cetáceos estudiados en el *Capítulo 6*.

En la Fig. 7.3 se muestra la coincidencia de los espectros para el caso de estas dos fibras. Ambos espectros se midieron bajo los mismos parámetros de medición. La correspondencia con el espectro de los pigmentos, en estos casos con alizarina y siena natural (*Alizarin y Raw Sienna*, en inglés), es muy alta (>98%), lo que nos advierte de la importancia de trabajar con una base de datos de pigmentos para poder llevar a cabo una identificación de los microplásticos de manera más efectiva, que a menudo son precisamente partículas coloridas.

La mayor presencia de ruido en el espectro de la fibra extraída del cetáceo podría deberse también a materia orgánica residual, que no hubiera sido eliminada completamente en el tratamiento de la muestra. En este sentido, Nauendorf et al. (2016) realizaron un estudio del efecto de la colonización y degradación microbiana que muestra claramente el aumento del ruido de fondo en los espectros generados por estos dos factores en muestras de bolsas de plástico prístinas incubadas con materia orgánica.

Porotro lado, también cabe destacar con este ejemplo cómo los espectros correspondientes a los pigmentos predominan y a menudo se superponen sobre los espectros de los polímeros, imposibilitando la identificación en algunos casos (Ribeiro-Claro et al., 2017). La Figura 7.3 muestra una notable coincidencia (superior al 98%) entre los espectros de las muestras (dos fibras rojas) y los pigmentos (alizarina y siena natural). Por tanto, es muy importante tener en cuenta, al analizar los espectros de los microplásticos, que generalmente contienen otros componentes además de la matriz polimérica, como aditivos químicos o colorantes, debiendo ser cautelosos a la hora de interpretarlos.

En último lugar, mencionar que si bien la presencia de pigmentos nos advierte de que estamos ante una partícula de origen antropogénico, esto no significa necesariamente que sea de origen plástico, ya que pueden ser también, entre otros casos, fibras de celulosa, como describen concretamente en su trabajo Remy et al. (2015). En este caso, sin embargo, la correspondencia con los espectros del polietileno (PE7 y PE6 de la biblioteca SLoPP) sí permite afirmar que se trata de un microplástico.

Aunque desconocemos el tiempo de residencia de cada una de las fibras en las dos matrices, los resultados parecen indicar que el paso por el tracto digestivo genera una mayor



185

degradación de las partículas, provocando así un espectro menos claro que el de la fibra extraída del agua de mar. Si bien serían necesarias más pruebas para establecer una comparación clara, por el momento, se puede decir que tanto la materia orgánica residual como el deterioro de los materiales de partida microplásticos tienen una influencia significativa en el espectro devuelto y, por lo tanto, deben tenerse en cuenta para la correcta identificación de su huella química. Pasamos a analizar este segundo factor en el siguiente caso ilustrado.

7.4.2 Partículas degradadas: la necesidad de las librerías de espectros de materiales ambientales

El envejecimiento ambiental de los microplásticos se puede producir por diversos factores: exposición a temperaturas extremas, la radiación UV, el viento, la erosión del agua, entre otros. La exposición de los microplásticos a estas condiciones ambientales afecta a la señal espectrográfica que devuelven, haciendo que los resultados de las mediciones, bien sean interpretados por personas o por programas especializados, sean menos fiables que los de las muestras no afectadas (Ramanna et al., 2022).

El deterioro ambiental promueve la generación de diferentes grupos funcionales, principalmente C=O, O–H y C–O en la superficie de los microplásticos (Duan et al., 2021) y por tanto genera una serie de alteraciones que hacen que los espectros sean significativamente diferentes y, en general, menos claros y más difíciles de identificar.

Entre los diferentes factores que afectan al deterioro o desgaste ambiental de los plásticos, como el oxígeno, la temperatura o el contenido de agua, también tienen una influencia significativa la presencia de materia orgánica y la formación de biopelículas, ambas condiciones que se dan en el tracto gastrointestinal.

Realmente, las herramientas y tecnologías que se utilizan actualmente para analizar las estructuras de los compuestos químicos que identifican los tipos de polímeros en los microplásticos no están optimizadas para el caso de los microplásticos erosionados por factores ambientales. Precisamente, Ramanna et al. (2022), en un trabajo pendiente de publicación, probaron un modelo de aprendizaje automático (*Machine Learning, en inglés*), en el que incrementan la precisión de clasificación de los espectros Raman en casi cinco puntos utilizando el conjunto de datos de espectros de materiales de plástico degradados SLoPP-E.

En la Figura 7.4 se muestran los espectros y porcentajes de coincidencia devueltos por el Software Spectragryph para una de las partículas del estudio, una fibra azul hallada en el tracto gastrointestinal de un *K. breviceps* (*Capítulo 6*). El uso de la biblioteca SLOPP-e, que incluye espectros de microplásticos degradados, permite un mayor porcentaje de acierto al tener en cuenta las modificaciones que sufre el material al ser expuesto a las condiciones ambientales. Una de estas diferencias puede verse en los picos sombreados, donde el espectro de la biblioteca SLOPP del poliéster prístino tiene un pico más prominente que los espectros de la biblioteca SLOPP-e o el espectro de la fibra azul del presente estudio. En último lugar, también se ha incluido, a modo de referencia, el espectro correspondiente al pigmento azul.





187

7.4.3 La variedad y singularidad de las muestras ambientales

En último lugar, reflexionamos sobre la variedad y la singularidad de las muestras ambientales, y de cómo la preparación de nuestra propia librería de materiales de referencia, que recoja las características propias en cuanto a grado de degradación, paleta de colores, nivel de deterioro y/o cantidad y tipo de materia orgánica de nuestras muestras tipo, nos puede ayudar a optimizar la caracterización química de las partículas de estudio.

Así pues, en la Figura 7.5 se muestra el espectro de una fibra verde característica de nuestras ambientales y de cómo, de no usar materiales de referencia adecuados, se podría estar perdiendo la capacidad de identificación del polímero que la conforma. Así pues, la línea verde discontínua muestra el espectro correspondiente al pigmento *phtalogreen*, de la Librería de Pigmentos Pigment Checker para el que el software Spectragryph devuelve el mayor porcentaje de coincidencia (99.84%). Si en el proceso de caracterización hubiéramos usado exclusivamente la librería SLOPP, que no tiene en cuenta las partículas degradadas, no se hubiera logrado determinar el polímero para este espectro, y la identificación resultaría fallida. Haciendo uso de la librería SLOPP-e, que incorpora espectros de referencia de partículas degradadas, se desenmascara una coincidencia de 99.62% con polipropileno (espectro rojo discontínuo en la Figura 7.5).

Para contrastar la hipótesis de si la fibra verde tomada para este ejemplo podría proceder de aparejos de pesca abandonados, se comparó con el espectro devuelto por los filamentos de red de pesca (verde turquesa) comprendidos en los materiales empleados para la creación de la librería de espectros (Imagen 7.1). Tal y como se puede observar en la Figura 7.6, la coincidencia de éste material con el polietileno fue clara, con porcentajes de coincidencia por encima del 97%. En este sentido, la configuración de una librería de espectros de referencia propia, que responda a las especificidades del análisis que vamos a llevar a cabo presenta interesantes ventajas, si bien ha de tenerse en cuenta la variedad y singularidad de las muestras ambientales, una cuestión a valorar en la preparación de futuros estudios.



Fig.7.6: Comparación de los espectros micro-Raman del filamento procedente de una red de pesca (ítem nº 8 de los materiales de referencia preparados

7.5 Conclusiones

La espectroscopía micro-Raman es una de las técnicas más propicias para el análisis de la huella química de partículas incluso inferiores a las 20 µm. No obstante, no es sin limitaciones: el tratamiento de la muestra es una cuestión trascendental en la que la eliminación de la materia orgánica, la selección de la zona a medir, el color de la partícula o el deterioro ambiental de la misma representan factores cruciales para la obtención de un espectro legible e interpretable. Por otro lado, ya en cuanto a la técnica en sí, los altos niveles de fluorescencia imposibilitan en numerosos casos la obtención de un espectro lo suficientemente limpio como para poder ser identificado, tanto por medios automatizados como manuales.

A través de tres casos ilustrativos fruto de las investigaciones precedentes, se demuestra el potencial de la identificación de microplásticos mediante esta técnica, haciendo especial hincapié en las interferencias causadas por los pigmentos o el deterioro ambiental. A partir de estos resultados se puede concluir la idoneidad de la creación de una librería propia de espectros que incorpore las características de las muestras a analizar con mayor representatividad, si bien ha de tenerse en cuenta la variedad y singularidad de las muestras ambientales, siendo recomendable contar con un banco de espectros lo más amplio y diverso posible.







- CAPÍTULO 8-



Cerrando (el ciclo): Conclusiones y perspectivas futuras.

8.1 Conclusiones generales

La producción mundial de plástico ha crecido desde finales de la década de 1940 y en la actualidad se producen más de 300 millones de toneladas de plástico al año en todo el mundo, sin que se vislumbre una disminución (Plastics Europe, 2022). La investigación sobre microplásticos lleva creciendo exponencialmente durante décadas, e incluso desplazando problemas ambientales globales tan trascendentales como el Cambio Climático (Borja and Elliott, 2019a). Las posibilidades de estudio en este campo son tan vastas como el medio marino, ciñéndose esta tesis en su aporte de conocimiento a tres áreas precisas:

1) El muestreo de microplásticos en aguas superficiales marinas, respondiendo a las necesidades en el campo de la monitorización en aguas abiertas con el diseño y validación de un artefacto de muestreo para barcos con toma de agua marina en continuo y el diseño y registro como modelo de utilidad de un dispositivo de muestreo de microplásticos (MuMi) para embarcaciones más pequeñas, como las de recreo, turismo de avistamiento de cetáceos o turismo científico, a bordo de las que se realizó un estudio comparativo con la tradicional red manta para el muestreo de microplásticos.

2) El estudio de la ingesta de microplásticos por cetáceos y el análisis de la posible relación con los niveles de Contaminantes Orgánicos Persistentes en sus tejidos, desarrollando un protocolo que permite actuar a los equipos multidisciplinares de las áreas de veterinaria y ciencias del mar ante el estudio de los contenidos gastrointestinales de cetáceos varados.

3) El acercamiento a la espectroscopía micro-Raman para la identificación de la huella química de los microplásticos muestreados mediante la exploración de las limitaciones producidas, fundamentalmente, por la fluorescencia, los pigmentos o el deterioro ambiental a través de tres casos ilustrativos, resultando en la idoneidad la creación de una librería de espectros de referencia propia.

8.2 Conclusiones específicas

Parte I - Para entender hay que conocer: ¿Cómo muestreamos los océanos?

- **1.** El uso del sistema de circulación de agua marina de los buques de investigación se presenta con un gran potencial como una forma de aumentar el esfuerzo de monitorización de la contaminación por microplásticos en aguas superficiales marinas.
- 2. El ingenio de filtración diseñado y testado para este fin ha demostrado ser una herramienta idónea que permite su incorporación en barcos de oportunidad, sin interferir en sus actividades rutinarias o previstas. Los materiales seleccionados para su fabricación y las características para su manejo hacen que se trate de un equipo rentable, asequible, de fácil operación, preciso y comparable. Además, resulta adecuado para muestrear microplásticos de hasta 50 µm.
- 3. Se encontraron microplásticos en todas las estaciones y transectos muestreados, siendo la mayoría fibras (64.42%). La concentraciones (14.46±13.23 fibras/m³ y 5.37±6.35 fragmentos/m³) se encuentran dentro de los rangos reportados en otras áreas del Atlántico.
- **4.** Es conveniente continuar profundizando en investigaciones de este tipo para comprender cómo pueden afectar factores como la velocidad de navegación y la profundidad de muestreo a este método.
- 5. Con la misma filosofía comentada anteriormente, se diseñó un muestreador de microplásticos innovador destinado a ser empleado en embarcaciones de oportunidad de menor envergadura, que no dispongan del sistema de circulación de agua en continuo, como lo son las embarcaciones de pesca artesanal, observación de cetáceos, así como las recreativas particulares o de sectores del ocio y la náutica.
- Este muestreador, MuMi, fue registrado como Modelo de Utilidad 202100078 según la Resolución de Concesión de la Oficina Española de Patentes y Marcas (OEPM) del 21/09/2021.
- **7.** Se realizó una comparación metodológica entre la red Manta y el muestreador MuMi, demostrando su utilidad y funcionalidad del mismo, siendo el volumen de agua filtrado con cada dispositivo adecuado y las muestras recogidas representativas. Las concentraciones de partículas registradas fueron desiguales entre ambos métodos:

0.3±0.2 microplásticos/m³ y de 66.6±4.7 microplásticos/m³ para la red Manta y el muestreador MuMi, respectivamente.

8. El control sobre el volumen filtrado es una cuestión a mejorar en los muestreos con redes Manta y similares. Se corroboraron importantes ventajas para el MuMi en cuanto a la facilidad de manejo, menor coste y posibilidad de muestrear partículas más pequeñas (hasta 50 μm), debiendo mejorarse el control de la profundidad de muestreo.

Parte II - Partículas de menos de 5mm en animales de más de 2m: ¿Ingieren microplásticos los cetáceos?

- **9.** Se presentó un protocolo ideado para el estudio de la ingestión de microplásticos en cetáceos varados que demostró ser eficiente para la separación de microplásticos durante el análisis del contenido gastrointestinal sin interferir en las tareas propias de los equipos veterinarios.
- 10. En aplicación del citado protocolo, que incorpora un sistema de filtros a la mesa de necropsias, este estudio proporcionó información sobre la ingestión de microplásticos en cetáceos varados de la Región Macaronésica (n=12). Salvo el caso de dos etiquetas de plástico que se encontraron en el esófago y el estómago de un mismo delfín, no se observaron partículas de plástico mayores de 5 mm; si bien se encontraron fibras en todos los animales analizados.
- 11. Además, se analizaron muestras de tejido de estos mismos animales, evidenciando su exposición a diversos Contaminantes Orgánicos Persistentes, entre los que los bisfenoles (BPS, BPF y BPA) y el DEHP fueron detectados en el 94.44% y el 88% de las muestras, respectivamente. A excepción de dos individuos, todos los animales presentaron también concentraciones de pesticidas (DDT, DDD y DDE).

Parte III: Más allá de contar partículas

- **12.** Se realizó un estudio sobre el potencial y las limitaciones del análisis de microplásticos mediante espectroscopía micro-Raman, una cuestión que debe investigarse más a fondo en un futuro.
- **13.** Mediante tres casos ilustrativos y la creación de una librería de espectros de referencia propia, se pone de relieve la importancia de las interferencias producidas por los pigmentos, la materia orgánica residual en la muestra, o el nivel de degradación de las partículas a analizar, cuestiones que resultan determinantes para una determinación polimérica efectiva.
- **14.** El tratamiento de la muestra es una cuestión trascendental, si bien también lo es la imposibilidad de obtener un espectro lo suficientemente limpio como para poder ser identificado debido a los altos niveles de fluorescencia. Resulta idóneo contar con un banco de espectros de partículas de referencia lo más amplio y diverso posible, que incorpore las características de las muestras a analizar con la mayor representatividad.

8.3 Perspectivas futuras

Hace seis años, los primeros estudios exploratorios sobre la percepción del riesgo y la comprensión de la sociedad sobre los microplásticos muestran que el término "microplásticos" no era ampliamente conocido por el público (Anderson et al., 2016; Catarino et al., 2021). Hoy en día, el mismo término concentra no sólo grandes volúmenes de investigación, sino que además es protagonista de numerosas portadas y especiales de conservación, y meta de numerosos programas de financiación.

Desde muy distintos ámbitos, se están buscando soluciones y alternativas para las diferentes etapas y condiciones de su presencia y permanencia en el planeta. Son varias también las medidas regulatorias que se han adoptado como vías para atajar este reconocido problema ambiental, como la prohibición de las microesferas de plástico en cosméticos, o las restricciones en el uso de plástico en productos de un solo uso (Directiva (UE) 2019/904 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 5 de junio de 2019, relativa a la reducción del impacto de determinados productos de plástico en el medio ambiente, 2019; Schnurr et al., 2018; Xanthos and Walker, 2017). Sin entrar a valorar lo ambiciosas que llegan o no a ser, son sin duda un reflejo de que la contaminación por microplásticos no sólo ha despertado el interés científico, sino que también ha creado una creciente conciencia pública y política sobre otros temas relacionados con el plástico, lo que ha dado lugar a acciones políticas y legales.

El 3 de marzo de 2020 se publicó una encuesta especial del Eurobarómetro sobre las actitudes de los ciudadanos de la Unión Europea en materia de medio ambiente que muestra que el 88% del público europeo está preocupado por el impacto medioambiental de los microplásticos (Directorate-General for Environment (European Commission) and Kantar, 2020). Tomando este dato por bandera, y tal y como recogen Borja y Elliot (2019b) en su editorial, debemos aprovechar la oportunidad y la fuerza que brinda una sociedad concienciada para generar cambios. Así pues, para concienciar sobre los problemas a los que se enfrentan los océanos necesitamos aumentar las acciones de cultura oceánica (Uyarra and Borja, 2016), incluyendo labores de educación desde los públicos más infantiles hasta los más especializados (sector pesquero, gente de la mar, turistas, etc.).

Por otra parte, desde la comunidad científica deben urgentemente adoptarse enfoques integradores, basados, en el caso que nos ocupa, en el uso sostenible real de los océanos, en lugar de abordar los problemas de forma aislada. Es de notable necesidad también seguir pautas de monitorización, seguimiento y evaluación rigurosas, garantizando que nuestras políticas estén respaldadas por una ciencia de buena calidad y adecuada a su finalidad. Para que ese seguimiento sea significativo y eficaz, debe llevarse a cabo con indicadores cuantitativos y cualitativos y utilizando métodos adecuados. Esto, a su vez, permitirá a la comunidad científica y gestora determinar las tendencias del sistema y evaluar si las acciones de gestión aplicadas previamente tienen éxito (Borja et al., 2017).

En todo ello, retomamos las palabras a las que se hacía ilusión en el encuadre de la tesis: mantener un enfoque orientado a resolver el problema, no perder el hilo de la conversación entre la ciencia fundamental y la aplicada, ni el de la ciencia con la ciudadanía, a través tanto de la transferencia del conocimiento como de las acciones de cultura científica. Por ello también, hace falta también abrir camino en la amplitud de métodos de investigación de las Ciencias Sociales y del Comportamiento y cómo pueden éstos aplicarse al problema de los microplásticos en el medio ambiente (Pahl and Wyles, 2017). En definitiva, los microplásticos son un problema causado por el ser humano y es necesario comprender su dimensión humana para poder abordarlo.







-CAPÍTULO 9-



Referencias

Abandoned, lost or otherwise discarded fishing gear [WWW Document], n.d. URL <u>https://www.fao.org/3/io620e/io620e00.htm</u> (accessed 5.26.22).

Ali, S.S., Elsamahy, T., Koutra, E., Kornaros, M., El-Sheekh, M., Abdelkarim, E.A., Zhu, D., Sun, J., 2021. Degradation of conventional plastic wastes in the environment: A review on current status of knowledge and future perspectives of disposal. Science of The Total Environment 771, 144719. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> <u>scitotenv.2020.144719</u>

Aliani,S.,Molcard,A.,2003.Hitch-hiking on floating marine debris: macrobenthic species in the Western Mediterranean Sea. Hydrobiologia 503, 59–67. <u>https://doi.</u> org/10.1023/B:HYDR.0000008480.95045.26

Allen, S., Allen, D., Phoenix, V.R., Roux, G.L., Jiménez, P.D., Simonneau, A., Binet, S., Galop, D., 2019. Atmospheric transport and deposition of microplastics in a remote mountain catchment. Nature Geoscience 12, 339. <u>https://doi.org/10.1038/s41561-019-0335-</u> 5

Álvarez-Hernández, C., Cairós, C., López-Darias, J., Mazzetti, E., Hernández-Sánchez, C., González-Sálamo, J., Hernández-Borges, J., 2019. Microplastic debris in beaches of Tenerife (Canary Islands, Spain). Marine Pollution Bulletin 146, 26–32. <u>https://</u> doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.05.064

Anderson, A.G., Grose, J., Pahl, S., Thompson, R.C., Wyles, K.J., 2016.

Microplastics in personal care products: Exploring perceptions of environmentalists, beauticians and students. Marine Pollution Bulletin113,454–460.<u>https://doi.org/10.1016/j.</u> marpolbul.2016.10.048

Anderson, J.C., Park, B.J., Palace, V.P., 2016. Microplastics in aquatic environments: Implications for Canadian ecosystems. Environmental Pollution 218, 269–280. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.06.074

Andrades, R., Martins, A., Fardim, L., Ferreira, J., Santos, R., 2016. Origin of marine debris is related to disposable packs of ultra-processed food. Marine Pollution Bulletin 109. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> <u>marpolbul.2016.05.083</u>

Andrades, R., Santos, R.G., Joyeux, J.-C., Chelazzi, D., Cincinelli, A., Giarrizzo, T., 2018. Marine debris in Trindade Island, a remote island of the South Atlantic. Marine Pollution Bulletin 137, 180–184. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> <u>marpolbul.2018.10.003</u>

Andrady, A.L., 2011a. Microplastics in the marine environment. Mar Pollut Bull 62, 1596–1605. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> marpolbul.2011.05.030

Andrady, A.L., Hamid, H.S., Torikai, A., 2003. Effects of climate change and UV-B on materials. Photochem Photobiol Sci 2, 68–72. *https://doi.org/10.1039/b211085g*

Andrady, A.L., Neal, M.A., 2009. Applications and societal benefits of plastics. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 364, 1977– 1984. https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0304 Araujo, C.F., Nolasco, M.M., Ribeiro, A.M.P., Ribeiro-Claro, P.J.A., 2018. Identification of microplastics using Raman spectroscopy: Latest developments and future prospects. Water Research 142, 426–440. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> watres.2018.05.060

Arbelo, M., Monteros, A.E. de los, Herráez, P., Andrada, M., Sierra, E., Rodríguez, F., Jepson, P.D., Fernández, A., 2013. Pathology and causes of death of stranded cetaceans in the Canary Islands (1999–2005). Diseases of Aquatic Organisms 103, 87–99. <u>https://doi.</u> org/10.3354/da002558

Arctic Monitoring and Assessment Programme (AMAP), 2021. AMAP Litter and microplastics monitoring guidelines. Version 1.0. Tromsø, Norway.

Arthur, C., Baker, J., Bamford, H., 2009. Proceedings of the International Research Workshop on the Ocurrence, Effects and Fate of Microplastic Marine Debris. NOAA, Tacoma (USA).

Ashton, K., Holmes, L., Turner, A., 2010. Association of metals with plastic production pellets in the marine environment. Marine Pollution Bulletin 60, 2050–2055. <u>https://doi.</u> org/10.1016/j.marpolbul.2010.07.014

Attitudes of Europeans towards the environment - Publications Office of the EU [WWW Document], n.d. URL https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/ publication/9a97b30e-15cb-11ec-b4fe-01aa75ed71a1/language-en (accessed 7.11.22). Baini, M., Martellini, T., Cincinelli, A., Campani, T., Minutoli, R., Panti, C., Finoia, M.G., Fossi, M.C., 2017. First detection of seven phthalate esters (PAEs) as plastic tracers in superficial neustonic/planktonic samples and cetacean blubber. Anal. Methods 9, 1512– 1520. <u>https://doi.org/10.1039/C6AY02674E</u>

Bakaraki Turan, N., Sari Erkan, H., Onkal Engin, G., 2021. Current status of studies on microplastics in the world's marine environments. Journal of Cleaner Production 327, 129394. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> jclepro.2021.129394

Bakir, A., O'Connor, I.A., Rowland, S.J., Hendriks, A.J., Thompson, R.C., 2016. Relative importance of microplastics as a pathway for the transfer of hydrophobic organic chemicals to marine life. Environmental Pollution 219, 56–65. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> *envpol.2016.09.046*

Barboza, L.G.A., Giménez, B.C.G., 2015. Microplastics in the marine environment: Current trends and future perspectives. Marine Pollution Bulletin 97, 5–12. <u>https://doi.</u> org/10.1016/j.marpolbul.2015.06.008

Barnes, D.K.A., 2004. Natural and plastic flotsam strading in the Indian Ocean, in: Davenport, J., Davenport, J.L. (Eds.), . Royal Irish Academy, Dublin, pp. 193–205.

Barnes, D.K.A., Galgani, F., Thompson, R.C., Barlaz, M., 2009. Accumulation and Fragmentation of Plastic Debris in Global Environments. Philosophical Transactions: Biological Sciences 364, 1985–1998. Barnes, D.K.A., Walters, A., Gonçalves, L., 2010. Macroplastics at sea around Antarctica. Mar Environ Res 70, 250–252. <u>https://doi.</u> org/10.1016/j.marenvres.2010.05.006

Barrows, A., 2017. National Microplastics Field Methodology Review. College of teh Atlantic & Adventure Scientists. https://doi.org/10.13140/RG.2.2.19421.41446

Baulch, S., Perry, C., 2014. Evaluating the impacts of marine debris on cetaceans. Marine Pollution Bulletin 80, 210–221. <u>https://</u> doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.12.050

Baztan, J., Carrasco, A., Chouinard, O., Cleaud, M., Gabaldon, J.E., Huck, T., Jaffrès, L., Jorgensen, B., Miguelez, A., Paillard, C., Vanderlinden, J.-P., 2014. Protected areas in the Atlantic facing the hazards of microplastic pollution: First diagnosis of three islands in the Canary Current. Marine Pollution Bulletin 80, 302–311. <u>https://doi.</u> org/10.1016/j.marpolbul.2013.12.052

Bellas, J., Martínez-Armental, J., Martínez-Cámara, A., Besada, V., Martínez-Gómez, C., 2016. Ingestion of microplastics by demersal fish from the Spanish Atlantic and Mediterranean coasts. Marine Pollution Bulletin 109, 55–60. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> <u>marpolbul.2016.06.026</u>

Beltrán-Sanahuja, A., Casado-Coy, N., Simó-Cabrera, L., Sanz-Lázaro, C., 2020. Monitoring polymer degradation under different conditions in the marine environment. Environmental Pollution 259, 113836. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> envpol.2019.113836 Bergmann, M., Gutow, L., Klages, M. (Eds.), 2015. Marine Anthropogenic Litter. Springer International Publishing, Cham.

Bergmann, M., Klages, M., 2012. Increase of litter at the Arctic deep-sea observatory HAUSGARTEN. Marine Pollution Bulletin 64, 2734–2741. <u>https://doi.</u> org/10.1016/j.marpolbul.2012.09.018

Bergmann, M., Peeken, I., Beyer, B., Krumpen, T., Primpke, S., Tekman, M.B., Gerdts, G., 2017. Vast Quantities of Microplastics in Arctic Sea Ice—A Prime Temporary Sink for Plastic Litter and a Medium of Transport, in: Baztan, J., Jorgensen, B., Pahl, S., Thompson, R.C., Vanderlinden, J.-P. (Eds.), Fate and Impact of Microplastics in Marine Ecosystems. Elsevier, pp. 75–76. <u>https://doi.org/10.1016/B978-0-12-</u> 812271-6.00073-9

Bergmann, M., Sandhop, N., Schewe, I., D'Hert, D., 2016. Observations of floating anthropogenic litter in the Barents Sea and Fram Strait, Arctic. Polar Biol 39, 553–560. https://doi.org/10.1007/s00300-015-1795-8

Besseling, E., Foekema, E.M., Van Franeker, J.A., Leopold, M.F., Kühn, S., Bravo Rebolledo, E.L., Heße, E., Mielke, L., IJzer, J., Kamminga, P., Koelmans, A.A., 2015. Microplastic in a macro filter feeder: Humpback whale Megaptera novaeangliae. Marine Pollution Bulletin 95, 248–252. <u>https://</u> doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.04.007

Besseling, E., Wegner, A., Foekema, E.M., van den Heuvel-Greve, M.J., Koelmans, A.A., 2013. Effects of Microplastic on Fitness and PCB Bioaccumulation by the Lugworm Arenicola marina (L.). Environ. Sci. Technol. 47, 593–600. <u>https://doi.org/10.1021/</u> es302763x

Bjorndal, K., Bolten, A., Lagueux, C.J., 1994. Ingestion of marine debris by juvenile sea turtles in coastal Florida habitats. <u>https://</u> <u>doi.org/10.1016/0025-326X(94)90391-3</u>

BOE (Boletín Oficial del Estado), 2011. Real Decreto 139/201, 139/2011, de 4 de febrero, para el desarrollo del Listado de Especies Silvestres en Régimen de Protección Especial y del Catálogo Español de Especies Amenazadas. <u>https://www.boe.es/eli/es/</u> <u>rd/2011/02/04/139.</u>

Booth, A.M., Kubowicz, S., Beegle-Krause, C., Skancke, J., Nordam, T., Landsem, E., Jahren, S., 2017. Microplastic in global and Norwegian marine environments: Distributions, degradation mechanisms and transport.

Borja, A., Elliott, M., 2019. So when will we have enough papers on microplastics and ocean litter? Marine Pollution Bulletin 146, 312–316. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> <u>marpolbul.2019.05.069</u>

Borja, A., Elliott, M., 2019. So when will we have enough papers on microplastics and ocean litter? Marine Pollution Bulletin 146, 312–316. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> marpolbul.2019.05.069

Borja, A., Elliott, M., Carstensen, J., Heiskanen, A.-S., van de Bund, W., 2010. Marine management--towards an integrated implementation of the European Marine Strategy Framework and the Water Framework Directives. Mar. Pollut. Bull. 60, 2175–2186. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> <u>marpolbul.2010.09.026</u>

Borja, A., Elliott, M., Uyarra, M.C., Carstensen, J., Mea, M., 2017. Editorial: Bridging the Gap between Policy and Science in Assessing the Health Status of Marine Ecosystems. Frontiers in Marine Science 4.

Bossart, G.D., 2011. Marine Mammals as Sentinel Species for Oceans and Human Health. Veterinary Pathology 48, 676–690. *https://doi.org/10.1177/0300985810388525*

Bouwman, H., Evans, S.W., Cole, N., Choong Kwet Yive, N.S., Kylin, H., 2016. The flip-or-flop boutique: Marine debris on the shores of St Brandon's rock, an isolated tropical atoll in the Indian Ocean. Mar Environ Res 114, 58–64. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> <u>marenvres.2015.12.013</u>

Bowen-Jones, E., Entwistle, A., 2002. Identifying appropriate flagship species: the importance of culture and local contexts. Oryx 36, 189–195. <u>https://doi.org/10.1017/</u> <u>S0030605302000261</u>

Bowman, K.L., Lamborg, C.H., Agather, A.M., Hammerschmidt, C.R., 2021. The role of plastic debris in the biogeochemical cycle of mercury in Lake Erie and San Francisco Bay. Mar. Pollut. Bull. 171, 112768. https://doi. org/10.1016/j.marpolbul.2021.112768

Bradney, L., Wijesekara, H., Palansooriya, K.N., Obadamudalige, N., Bolan, N.S., Ok, Y.S., Rinklebe, J., Kim, K.-H., Kirkham, M.B., 2019. Particulate plastics as

- REFERENCIAS -

a vector for toxic trace-element uptake by aquatic and terrestrial organisms and human health risk. Environment International 131, 104937. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> <u>envint.2019.104937</u>

Brandão, M.L., Braga, K.M., Luque, J.L., 2011. Marine debris ingestion by Magellanic penguins, Spheniscus magellanicus (Aves: Sphenisciformes), from the Brazilian coastal zone. Marine Pollution Bulletin 62, 2246–2249. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> <u>marpolbul.2011.07.016</u>

Brennecke, D., Duarte, B., Paiva, F., Caçador, I., Canning-Clode, J., 2016. Microplastics as vector for heavy metal contamination from the marine environment. Estuarine, Coastal and Shelf Science 178, 189– 195. https://doi.org/10.1016/j.ecss.2015.12.003

Brignac, K.C., Jung, M.R., King, C., Royer, S.-J., Blickley, L., Lamson, M.R., Potemra, J.T., Lynch, J.M., 2019. Marine Debris Polymers on Main Hawaiian Island Beaches, Sea Surface, and Seafloor. Environ. Sci. Technol. 53, 12218– 12226. <u>https://doi.org/10.1021/acs.est.9b03561</u>

Browne, M.A., Crump, P., Niven, S.J., Teuten, E., Tonkin, A., Galloway, T., Thompson, R., 2011. Accumulation of Microplastic on Shorelines Woldwide: Sources and Sinks. Environ. Sci. Technol. 45, 9175–9179. <u>https://</u> doi.org/10.1021/es201811s

Browne, M.A., Galloway, T., Thompson, R., 2007. Microplastic--an emerging contaminant of potential concern? Integr Environ Assess Manag 3, 559–561. <u>https://doi.</u> org/10.1002/ieam.5630030412 Browne, M.A., Galloway, T.S., Thompson, R.C., 2010. Spatial Patterns of Plastic Debris along Estuarine Shorelines. Environ. Sci. Technol. 44, 3404–3409. <u>https://</u> <u>doi.org/10.1021/es903784e</u>

Browne, M.A., Niven, S.J., Galloway, T.S., Rowland, S.J., Thompson, R.C., 2013. Microplastic Moves Pollutants and Additives to Worms, Reducing Functions Linked to Health and Biodiversity. Current Biology 23, 2388–2392. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> cub.2013.10.012

Burkhardt-Holm, P., N'Guyen, A., 2019. Ingestion of microplastics by fish and other prey organisms of cetaceans, exemplified for two large baleen whale species. Marine Pollution Bulletin 144, 224–234. <u>https://doi.</u> org/10.1016/j.marpolbul.2019.04.068

Cabernard, L., Roscher, L., Lorenz, C., Gerdts, G., Primpke, S., 2018. Comparison of Raman and Fourier Transform Infrared Spectroscopy for the Quantification of Microplastics in the Aquatic Environment. Environ. Sci. Technol. 52, 13279–13288. <u>https://</u> doi.org/10.1021/acs.est.8b03438

Caggiani, M.C., Cosentino, A., Mangone, A., 2016. Pigments Checker version 3.0, a handy set for conservation scientists: A free online Raman spectra database. Microchemical Journal 129, 123–132. <u>https://</u> doi.org/10.1016/j.microc.2016.06.020

Camacho, M., Herrera, A., Gómez, M., Acosta-Dacal, A., Martínez, I., Henríquez-Hernández, L.A., Luzardo, O.P., 2019. Organic pollutants in marine plastic debris from Canary Islands beaches. Science of The Total Environment 662, 22–31. <u>https://doi.</u> org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.422

Carballo, M., Arbelo, M., Esperón, F., Mendez, M., De, L.T., Muñoz, M.J., 2008. Organochlorine residues in the blubber and liver of bottlenose dolphins (Tursiops truncatus) stranded in the Canary Islands, North Atlantic Ocean. Environmental Toxicology 23, 200–210. <u>https://doi.</u> org/10.1002/tox.20322

Carpenter, E.J., Anderson, S.J., Harvey, G.R., Miklas, H.P., Peck, B.B., 1972. Polystyrene spherules in coastal waters. Science 178, 749–750. <u>https://doi.org/10.1126/</u> science.178.4062.749

Carpenter, E.J., Smith, K.L., 1972. Plastics on the Sargasso sea surface. Science 175, 1240–1241.

Catarino, A.I., Kramm, J., Völker, C., Henry, T.B., Everaert, G., 2021. Risk posed by microplastics: Scientific evidence and public perception. Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry 29, 100467. <u>https://</u> <u>doi.org/10.1016/j.cogsc.2021.100467</u>

Cheshire, A., Adler, E., 2009. UNEP/ IOC Guidelines on Survey and Monitoring of Marine Litter (IOC Technical Series No. 186), UNEP Regional Seas Reports and Studies No. 83.

Cheshire, A., Adler, E., Barbière, J., 2009. UNEP/IOC guidelines on survey and monitoring of marine litter, Regional Seas reports and studies. United Nations Environment Programme, Regional Seas Programme (UNEP); Intergovernmental Oceanographic Commission, Integrated Coastal Area Management and Regional Programme (IOC), Nairobi : Paris.

Chester, R., Jickells, T., 2012. Marine Geochemistry, 2nd ed. John Wiley & Sons, Ltd, Liverpool. https://doi. org/10.1002/9781118349083

Christina Araújo, M., Costa, M., 2007. An analysis of the riverine contribution to the solid wastes contamination of an isolated beach at the Brazilian Northeast. Management of Environmental Quality: An International Journal 18, 6–12. <u>https://doi.</u> org/10.1108/14777830710717677

Chua, E.M., Shimeta, J., Nugegoda, D., Morrison, P.D., Clarke, B.O., 2014. Assimilation of Polybrominated Diphenyl Ethers from Microplastics by the Marine Amphipod, Allorchestes Compressa. Environ. Sci. Technol. 48, 8127–8134. <u>https://</u> <u>doi.org/10.1021/es4057172</u>

Chubarenko, I., 2017. Microplastics Migrations in Sea Coastal Zone: Baltic Amber as an Example, in: Fate and Impact of Microplastics in Marine Ecosystems. Elsevier, pp. 15–16. <u>https://doi.org/10.1016/B978-0-12-</u> <u>812271-6.00017-X</u>

Cincinelli, A., Scopetani, C., Chelazzi, D., Lombardini, E., Martellini, T., Katsoyiannis, A., Fossi, M.C., Corsolini, S., 2017. Microplastic in the surface waters of the Ross Sea (Antarctica): Occurrence, distribution and characterization by FTIR. Chemosphere

175, 391–400. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> chemosphere.2017.02.024

Claessens, M., Meester, S.D., Landuyt, L.V., Clerck, K.D., Janssen, C.R., 2011. Occurrence and distribution of microplastics in marine sediments along the Belgian coast. Marine Pollution Bulletin 62, 2199–2204. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> *marpolbul.2011.06.030*

Cole, M., Lindeque, P., Fileman, E., Halsband, C., Goodhead, R., Moger, J., Galloway, T.S., 2013. Microplastic Ingestion by Zooplankton. Environ. Sci. Technol. 47, 6646–6655. https://doi.org/10.1021/es400663f

Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., Galloway, T.S., 2011. Microplastics as contaminants in the marine environment: A review. Marine Pollution Bulletin 62, 2588–2597. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> <u>marpolbul.2011.09.025</u>

Collignon, A., Hecq, J.-H., Glagani, F., Voisin, P., Collard, F., Goffart, A., 2012. Neustonic microplastic and zooplankton in the North Western Mediterranean Sea. Marine Pollution Bulletin 64, 861–864. <u>https://</u> <u>doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.01.011</u>

Comisión Europea, 2010. Decisión de la Comisión, de 1 de septiembre de 2010, sobre los criterios y las normas metodológicas aplicables al buen estado medioambiental de las aguas marinas [notificada con el número C(2010) 5956].

Connors, K.A., Dyer, S.D., Belanger, S.E., 2017. Advancing the quality of environmental microplastic research. Environmental Toxicology and Chemistry 36, 1697–1703. https://doi.org/10.1002/etc.3829

Corcoran, P.L., Biesinger, M.C., Grifi, M., 2009. Plastics and beaches: A degrading relationship. Marine Pollution Bulletin 58, 80–84. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> <u>marpolbul.2008.08.022</u>

Coronavirus disease (COVID-19) – World Health Organization [WWW Document], n.d. URL <u>https://www.who.int/</u> <u>emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019</u> (accessed 7.11.22).

Corrales, J., Kristofco, L.A., Steele, W.B., Yates, B.S., Breed, C.S., Williams, E.S., Brooks, B.W., 2015. Global Assessment of Bisphenol A in the Environment. Dose Response 13. *https://doi.org/10.1177/1559325815598308*

Correia, A.M., Gil, Á., Valente, R.F., Rosso, M., Sousa Pinto, I., Pierce, G.J., 2020. Distribution of cetacean species at a large scale - Connecting continents with the Macaronesian archipelagos in the eastern North Atlantic. Diversity and Distributions 26,1234–1247. *https://doi.org/10.1111/ddi.13127*

Costa, M.F., Silva-Cavalcanti, J.S., Barbosa, C.C., Portugal, J.L., Barletta, M., 2011. Plastics buried in the inter-tidal plain of a tropical estuarine ecosystem. Journal of Coastal Research 339–343.

Covernton, G.A., Pearce, C.M., Gurney-Smith, H.J., Chastain, S.G., Ross, P.S., Dower, J.F., Dudas, S.E., 2019. Size and shape matter: A preliminary analysis of microplastic sampling technique in seawater studies with implications for ecological risk assessment.

Science of The Total Environment 667, 124–132. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.346

Critchell, K., Lambrechts, J., 2016. Modelling accumulation of marine plastics in the coastal zone; what are the dominant physical processes? Estuarine, Coastal and Shelf Science 171, 111–122. <u>https://doi.</u> <u>org/10.1016/j.ecss.2016.01.036</u>

Culik, B.M., Wurtz, M., 2011. Odontocetes: the toothed whales, CMS technical series. UNEP / CMS / ASCOBANS Secretariat, Bonn.

Cundell, A.M., 1974. Plastics in the Marine Environment. Envir. Conserv. 1, 63–68. https://doi.org/10.1017/S0376892900003945

Cózar, A., Echevarría, F., González-Gordillo, J.I., Irigoien, X., Úbeda, B., Hernández-León, S., Palma, Á.T., Navarro, S., García-de-Lomas, J., Ruiz, A., Fernándezde-Puelles, M.L., Duarte, C.M., 2014. Plastic debris in the open ocean. PNAS 111, 10239– 10244. <u>https://doi.org/10.1073/pnas.1314705111</u>

Cózar, A., Sanz-Martín, M., Martí, E., González-Gordillo, J.I., Ubeda, B., Gálvez, J.Á., Irigoien, X., Duarte, C.M., 2015. Plastic Accumulation in the Mediterranean Sea. PLOS ONE 10, e0121762. <u>https://doi.</u> org/10.1371/journal.pone.0121762

da Costa, J.P., Santos, P.S.M., Duarte, A.C., Rocha-Santos, T., 2016. (Nano)plastics in the environment - Sources, fates and effects. Sci Total Environ 566–567, 15–26. <u>https://doi.</u> org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.041 Day, R.H., Wehle, D.H.S., Coleman, F.C., 1985. Ingestion of plastic pollutants by marine birds., in: Proceedings of the Workshop on the Fate and Impact of Marine Debris. NOAA Technical Memorandum, NMFS, SWFC 54, pp. 344–386.

De Murillo, D., 2022a. Universidad de las Palmas de Gran Canaria | Sailing Living Lab. Sailing Living Lab. URL <u>https://sailinglivinglab.</u> <u>com/es/universidad-de-las-palmas-de-gran-</u> <u>canaria/</u> (accessed 7.9.22).

De Murillo, D., 2022b. Sailing Living Lab [WWW Document]. Sailing Living Lab. URL <u>https://sailinglivinglab.com/es/tripulacion/</u> (accessed 7.9.22).

Denuncio, P., Bastida, R., Dassis, M., Giardino, G., Gerpe, M., Rodríguez, D., 2011. Plastic ingestion in Franciscana dolphins, Pontoporia blainvillei (Gervais and d'Orbigny, 1844), from Argentina. Marine Pollution Bulletin 62, 1836–1841. <u>https://doi.</u> org/10.1016/j.marpolbul.2011.05.003

Derraik, J.G.B., 2002. The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. Marine Pollution Bulletin 44, 842–852. <u>https://doi.org/10.1016/S0025-</u> 326X(02)00220-5

Desforges, J.-P.W., Galbraith, M., Dangerfield, N., Ross, P.S., 2014. Widespread distribution of microplastics in subsurface seawater in the NE Pacific Ocean. Marine Pollution Bulletin 79, 94–99. <u>https://doi.</u> org/10.1016/j.marpolbul.2013.12.035 de Stephanis, R., Giménez, J., Carpinelli, E., Gutierrez-Exposito, C., Cañadas, A., 2013. As main meal for sperm whales: Plastics debris. Marine Pollution Bulletin 69, 206–214. <u>https://</u> doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.01.033

Deudero, S., Alomar, C., 2015. Mediterranean marine biodiversity under threat: Reviewing influence of marine litter on species. Marine Pollution Bulletin 98, 58–68. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> <u>marpolbul.2015.07.012</u>

Di Mauro, R., Castillo, S., Pérez, A., Iachetti, C.M., Silva, L., Tomba, J.P., Chiesa, I.L., 2022. Anthropogenic microfibers are highly abundant at the Burdwood Bank seamount, a protected sub-Antarctic environment in the Southwestern Atlantic Ocean. Environmental Pollution 306, 119364. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> <u>envpol.2022.119364</u>

Directiva 2008/56/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 17 de junio de 2008 por la que se establece un marco de acción comunitaria para la política del medio marino (Directiva marco sobre la estrategia marina). Diario Oficial de la Unión Europea L nº 164 del 26 de junio de 2008.

Directiva (UE) 2019/904 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 5 de junio de 2019, relativa a la reducción del impacto de determinados productos de plástico en el medio ambiente (Texto pertinente a efectos del EEE), 2019., OJ L.

Directorate-General for Environment (European Commission), Kantar, 2020. Attitudes of Europeans towards the environment: report. Publications Office of the European Union, LU.

Doyle, M.J., Watson, W., Bowlin, N.M., Sheavly, S.B., 2011a. Plastic particles in coastal pelagic ecosystems of the Northeast Pacific ocean. Marine Environmental Research 71, 41–52. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> <u>marenvres.2010.10.001</u>

Doyle, M.J., Watson, W., Bowlin, N.M., Sheavly, S.B., 2011b. Plastic particles in coastal pelagic ecosystems of the Northeast Pacific ocean. Marine Environmental Research 71, 41–52. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> <u>marenvres.2010.10.001</u>

Dris, R., Gasperi, J., Rocher, V., Tassin, B., 2018. Synthetic and non-synthetic anthropogenic fibers in a river under the impact of Paris Megacity: Sampling methodological aspects and flux estimations. Sci. Total Environ. 618, 157–164. https://doi. org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.009

Dris, R., Gasperi, J., Saad, M., Mirande, C., Tassin, B., 2016. Synthetic fibers in atmospheric fallout: A source of microplastics in the environment? Marine Pollution Bulletin 104, 290–293. <u>https://doi.</u> org/10.1016/j.marpolbul.2016.01.006

Duan, J., Bolan, N., Li, Y., Ding, S., Atugoda, T., Vithanage, M., Sarkar, B., Tsang, D.C.W., Kirkham, M.B., 2021. Weathering of microplastics and interaction with other coexisting constituents in terrestrial and aquatic environments. Water Research 196, 117011. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> watres.2021.117011 Duis, K., Coors, A., 2016. Microplastics in the aquatic and terrestrial environment: sources (with a specific focus on personal care products), fate and effects. Environ Sci Eur 28, 2. <u>https://doi.org/10.1186/s12302-015-</u> 0069-y

Díaz-Delgado, J., Fernández, A., Sierra, E., Sacchini, S., Andrada, M., Vela, A.I., Quesada-Canales, Ó., Paz, Y., Zucca, D., Groch, K., Arbelo, M., 2018. Pathologic findings and causes of death of stranded cetaceans in the Canary Islands (2006-2012). PLOS ONE 13, e0204444. <u>https://doi.org/10.1371/journal.</u> <u>pone.0204444</u>

Dąbrowska, A., 2021. Raman Spectroscopy of Marine Microplastics - A short comprehensive compendium for the environmental scientists. Marine Environmental Research 168, 105313. <u>https://</u> doi.org/10.1016/j.marenvres.2021.105313

Eerkes-Medrano, D., Thompson, R.C., Aldridge, D.C., 2015. Microplastics in freshwater systems: A review of the emerging threats, identification of knowledge gaps and prioritisation of research needs. Water Research 75, 63–82. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> <u>watres.2015.02.012</u>

Egbeocha, C.O., Malek, S., Emenike, C.U., Milow, P., 2018. Feasting on microplastics: ingestion by and effects on marine organisms. Aquatic Biology 27, 93–106. <u>https://doi.</u> org/10.3354/ab00701

Elert, A.M., Becker, R., Duemichen, E., Eisentraut, P., Falkenhagen, J., Sturm, H., Braun, U., 2017. Comparison of different methods for MP detection: What can we learn from them, and why asking the right question before measurements matters? Environmental Pollution 231, 1256–1264. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.074

Enders, K., Lenz, R., Stedmon, C.A., Nielsen, T.G., 2015. Abundance, size and polymer composition of marine microplastics ≥10µm in the Atlantic Ocean and their modelled vertical distribution. Mar. Pollut. Bull. 100, 70–81. https://doi.org/10.1016/j. marpolbul.2015.09.027

Endo, S., Takizawa, R., Okuda, K., Takada, H., Chiba, K., Kanehiro, H., Ogi, H., Yamashita, R., Date, T., 2005. Concentration of polychlorinated biphenyls (PCBs) in beached resin pellets: variability among individual particles and regional differences. Mar Pollut Bull 50, 1103–1114. <u>https://doi.</u> org/10.1016/j.marpolbul.2005.04.030

Engler, R.E., 2012. The complex interaction between marine debris and toxic chemicals in the ocean. Environ. Sci. Technol. 46, 12302–12315. <u>https://doi.org/10.1021/es3027105</u>

Eriksen, M., Lebreton, L.C.M., Carson, H.S., Thiel, M., Moore, C.J., Borerro, J.C., Galgani, F., Ryan, P.G., Reisser, J., 2014. Plastic Pollution in the World's Oceans: More than 5 Trillion Plastic Pieces Weighing over 250,000 Tons Afloat at Sea. PLOS ONE 9, e111913. *https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111913*

Eriksen, M., Liboiron, M., Kiessling, T., Charron, L., Alling, A., Lebreton, L., Richards, H., Roth, B., Ory, N.C., Hidalgo-Ruz, V., Meerhoff, E., Box, C., Cummins, A., Thiel, M., 2018. Microplastic sampling with the AVANI trawl compared to two neuston trawls in the Bay of Bengal and South Pacific. Environmental Pollution 232, 430–439. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.09.058

Eriksen, M., Maximenko, N., Thiel, M., Cummins, A., Lattin, G., Wilson, S., Hafner, J., Zellers, A., Rifman, S., 2013. Plastic pollution in the South Pacific subtropical gyre. Marine Pollution Bulletin 68, 71–76. <u>https://doi.</u> org/10.1016/j.marpolbul.2012.12.021

Farrell, P., Nelson, K., 2013. Trophic level transfer of microplastic: Mytilus edulis (L.) to Carcinus maenas (L.). Environmental Pollution 177, 1–3. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> <u>envpol.2013.01.046</u>

Fernández, R., Santos, M.B., Carrillo, M., Tejedor, M., Pierce, G.J., 2009. Stomach contents of cetaceans stranded in the Canary Islands 1996–2006. J. Mar. Biol. Ass. 89, 873–883. <u>https://doi.org/10.1017/</u> <u>S0025315409000290</u>

Foekema, E.M., De Gruijter, C., Mergia, M.T., van Franeker, J.A., Murk, A.J., Koelmans, A.A., 2013. Plastic in North Sea Fish. Environ. Sci. Technol. 47, 8818–8824. <u>https://doi.</u> org/10.1021/es400931b

Fossi, M.C., Panti, C., Guerranti, C., Coppola, D., Giannetti, M., Marsili, L., Minutoli, R., 2012. Are baleen whales exposed to the threat of microplastics? A case study of the Mediterranean fin whale (Balaenoptera physalus). Marine Pollution Bulletin 64, 2374–2379. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> <u>marpolbul.2012.08.013</u> Fossi, M.C., Pedà, C., Compa, M., Tsangaris, C., Alomar, C., Claro, F., Ioakeimidis, C., Galgani, F., Hema, T., Deudero, S., Romeo, T., Battaglia, P., Andaloro, F., Caliani, I., Casini, S., Panti, C., Baini, M., 2018. Bioindicators for monitoring marine litter ingestion and its impacts on Mediterranean biodiversity. Environmental Pollution 237, 1023–1040. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.11.019

Free, C.M., Jensen, O.P., Mason, S.A., Eriksen, M., Williamson, N.J., Boldgiv, B., 2014. High-levels of microplastic pollution in a large, remote, mountain lake. Marine Pollution Bulletin 85, 156–163. <u>https://doi.</u> org/10.1016/j.marpolbul.2014.06.001

Frias, J., Filgueiras, A., Gago, J., Pedrotti, M.L., Suaria, G., Tirelli, V., Andrade, J., Nash, R., O'Connor, I., Lopes, C., Caetano, M., Raimundo, J., Carretero, O., Viñas, L., Antunes, J., Bessa, F., Sobral, P., Goruppi, A., Aliani, S., Gerdts, G., 2019. Standardised protocol for monitoring microplastics in seawater. <u>https://</u> doi.org/10.13140/RG.2.2.14181.45282

Gabrielides, G.P., Golik, A., Loizides, L., Marino, M.G., Bingel, F., Torregrossa, M.V., 1991. Man-made garbage pollution on the Mediterranean coastline. Marine Pollution Bulletin, Environmental Management and Appropriate Use of Enclosed Coastal Seas 23, 437–441. <u>https://doi.org/10.1016/0025-326X(91)90713-3</u>

Gago, J., Galgani, F., Maes, T., Thompson, R.C., 2016. Microplastics in Seawater: Recommendations from the Marine Strategy Framework Directive Implementation Process. Front. Mar. Sci. 3. https://doi.org/10.3389/fmars.2016.00219 Galgani, F., Hanke, G., Maes, T., 2015. Global Distribution, Composition and Abundance of Marine Litter.

Galgani, F., Hanke, G., Werner, S., De Vrees, L., 2013. Marine litter within the European Marine Strategy Framework Directive. ICES J Mar Sci 70, 1055–1064. <u>https://doi.org/10.1093/icesjms/fst122</u>

Galgani, F., Hanke, G., Werner, S., De Vrees, L., 2013. Marine litter within the European Marine Strategy Framework Directive. ICES Journal of Marine Science 70, 1055–1064. <u>https://doi.org/10.1093/icesjms/</u> <u>fst122</u>

Galgani, F., Hanke, G., Werner, S., Oosterbaan, L., Nilsson, P., Fleet, D., Kinsey, S., Thompson, R.C., Van Franeker, J., Vlachogianni, T., Scoullos, M., Veiga, J.M., Palatinus, A., Matiddi, M., Maes, T., Korpinen, S., Budziak, A., Leslie, H., Gago, J., Liebezeit, G., 2013. Guidance on monitoring of marine litter in European seas. Publications Office of the European Union, Luxembourg.

Galgani, F., Joint Research Centre (European Commission), Birkun, A., Mouat, J., Zampoukas, N., Poitou, I., Thompson, R., Hanke, G., Van Franeker, J., Katsanevakis, S., Janssen, C., Fleet, D., Maes, T., Oosterbaan, L., Amato, E., 2010. Marine strategy framework directive : task group 10 report (marine litter - april 2010) (Joint Report), Task Group 10 Report Marine Litter. Publications Office of the European Union, LU.

Galgani, F., Leaute, J.P., Moguedet, P., Souplet, A., Verin, Y., Carpentier, A., Goraguer, H., Latrouite, D., Andral, B., Cadiou, Y., Mahe, J.C., Poulard, J.C., Nerisson, P., 2000. Litter on the Sea Floor Along European Coasts. Marine Pollution Bulletin 40, 516–527. <u>https://doi.</u> org/10.1016/S0025-326X(99)00234-9

Gall, S.C., Thompson, R.C., 2015. The impact of debris on marine life. Marine Pollution Bulletin 92, 170–179. <u>https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.12.041</u>

Garcia-Garin, O., Aguilar, A., Vighi, M., Víkingsson, G.A., Chosson, V., Borrell, A., 2021. Ingestion of synthetic particles by fin whales feeding off Western Iceland in summer. Chemosphere 130564. <u>https://doi.</u> org/10.1016/j.chemosphere.2021.130564

García-Álvarez, N., Martín, V., Fernández, A., Almunia, J., Xuriach, A., Arbelo, M., Tejedor, M., Boada, L.D., Zumbado, M., Luzardo, O.P., 2014. Levels and profiles of POPs (organochlorine pesticides, PCBs, and PAHs) in free-ranging common bottlenose dolphins of the Canary Islands, Spain. Science of The Total Environment 493, 22–31. <u>https://</u> *doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.05.125*

Gasperi, J., Wright, S.L., Dris, R., Collard, F., Mandin, C., Guerrouache, M., Langlois, V., Kelly, F.J., Tassin, B., 2018. Microplastics in air: Are we breathing it in? Current Opinion in Environmental Science & Health, Micro and Nanoplastics Edited by Dr. Teresa A.P. Rocha-Santos 1, 1–5. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> coesh.2017.10.002

GESAMP, 2015. Sources, fate and effects of microplastics in the marine environment: a global assessment. (IMO/FAO/UNESCO-IOC/ UNIDO/WMO/IAEA/UN/UNEP/UNDP Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection) No. 90), Rep. Stud. GESAMP. IMO/FAO/UNESCO-IOC/ UNIDO/WMO/IAEA/UN/UNEP/UNDP Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection).

GESAMP, 2019. Guidelines for the monitoring and assessmend of plastic litter in the ocean. (Kershaw P.J., Turra A. and Galgani F. editors), (IMO/FAO/UNESCO-IOC/UNIDO/ WMO/IAEA/UN/UNEP/UNDP/ISA Joint Group of Experts onthe Scientific Aspects of Marine Environmental Protection). Rep. Stud. GESAMP No. 99, 130p.

Ghosal, S., Chen, M., Wagner, J., Wang, Z.-M., Wall, S., 2018. Molecular identification of polymers and anthropogenic particles extracted from oceanic water and fish stomach – A Raman micro-spectroscopy study. Environmental Pollution 233, 1113–1124. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.10.014

Gobierno de Canarias - Consejería de Transición Ecológica, Lucha contra el Cambio Climático y la Planificación Territorial, 2017. Censo de vertidos [WWW Document]. Censo Vertidos. URL <u>https:// www.gobiernodecanarias.org/medioambiente/ temas/calidad-del-agua/vertidos_tierra_mar/ censo_vertidos/</u> (accessed 4.19.22).

Goldstein, M.C., Rosenberg, M., Cheng, L., 2012. Increased oceanic microplastic debris enhances oviposition in an endemic pelagic insect. Biology Letters 8, 817–820. https://doi.org/10.1098/rsbl.2012.0298

González-Ortegón, E., Sendra, M., Sparaventi, E., F. Sánchez Leal, R., de los Ríos, I., Baldó, F., González-Fernández, D., Yeste, M.P., 2022. Coastal gradients of small microplastics and associated pollutants influenced by estuarine sources. Marine Pollution Bulletin 174, 113292. <u>https://doi.</u> org/10.1016/j.marpolbul.2021.113292

Good, T.P., June, J.A., Etnier, M.A., Broadhurst, G., 2010. Derelict fishing nets in Puget Sound and the Northwest Straits: patterns and threats to marine fauna. Mar Pollut Bull 60, 39–50. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> marpolbul.2009.09.005

Good Karma Projects [@goodkarma_ org], 2022. Monday 16th of May 2022, the video of one of the river streams in Tarragona. We continue to find spots on the river streams that show persistent pellet contamination from the plastics industry. When will measures be taken? <u>https://t.co/</u> *RTocYKXSGW*. Twitter.

Gouin, T., 2020. Toward an Improved Understanding of the Ingestion and Trophic Transfer of Microplastic Particles: Critical Review and Implications for Future Research. Environmental Toxicology and Chemistry 39, 1119–1137. *https://doi.org/10.1002/etc.4718*

Gouin, T., Roche, N., Lohmann, R., Hodges, G., 2011. A Thermodynamic Approach for Assessing the Environmental Exposure of Chemicals Absorbed to Microplastic. Environ. Sci. Technol. 45, 1466– 1472. https://doi.org/10.1021/es1032025

Grand View Research, 2019. Textile Chemicals Market Size, Share & Trends Analysis Report By Product (Colorants & Auxiliaries, Finishing Agents, Coating & Sizing, Surfactants), By Application (Apparel, Home Furnishing), And Segment Forecasts, 2019 - 2025. Grand View Research.

Green, D.S., Kregting, L., Boots, B., Blockley, D.J., Brickle, P., da Costa, M., Crowley, Q., 2018. A comparison of sampling methods for seawater microplastics and a first report of the microplastic litter in coastal waters of Ascension and Falkland Islands. Mar. Pollut. Bull. 137, 695–701. https://doi.org/10.1016/j. marpolbul.2018.11.004

Greenly, C., Gray, H., Wong, H., Chinn, S., Passmore, J., Johnson, P., Zaidi, Y., 2021. Observing and Tracking the Great Pacific Garbage Patch, in: Technical Session 13: Future Missions. Presented at the Small Satellite Conference, Logan, UT, p. 14.

Gregory, M.R., 1978. Accumulation and distribution of virgin plastic granules on New Zealand beaches. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research 12, 399–414. <u>https://doi.org/10.1080/00288330.1978.95157</u> <u>68</u>

Gregory, M.R., 1983. Virgin plastic granules on some beaches of Eastern Canada and Bermuda. Marine Environmental Research 10, 73–92. <u>https://</u> <u>doi.org/10.1016/0141-1136(83)90011-9</u>

Gregory, M.R., 1987. Plastics and other seaborne litter on the shores of New Zealand's subantarctic islands [WWW Document].

Gregory, M.R., 1996. Plastic 'scrubbers' in hand cleansers: a further (and minor) source for marine pollution identified. Marine Pollution Bulletin 32, 867–871. <u>https://</u> <u>doi.org/10.1016/S0025-326X(96)00047-1</u> Gregory, M.R., 1999. Plastics and South Pacific Island shores: environmental implications. Ocean & Coastal Management 42, 603–615. <u>https://doi.org/10.1016/S0964-</u> 5691(99)00036-8

Gregory, M.R., 2009. Environmental implications of plastic debris in marine settings—entanglement, ingestion, smothering, hangers-on, hitch-hiking and alien invasions. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 364, 2013–2025. <u>https://doi.org/10.1098/</u> <u>rstb.2008.0265</u>

Grillo, A.C., Mello, T.J., 2021. Marine debris in the Fernando de Noronha Archipelago, a remote oceanic marine protected area in tropical SW Atlantic. Marine Pollution Bulletin 164, 112021. <u>https://</u> doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112021

Guzzetti, E., Sureda, A., Tejada, S., Faggio, C., 2018. Microplastic in marine organism: Environmental and toxicological effects. Environmental Toxicology and Pharmacology 64, 164–171. <u>https://doi.</u> org/10.1016/j.etap.2018.10.009

Hammer, J., Kraak, M.H.S., Parsons, J.R., 2012. Plastics in the marine environment: the dark side of a modern gift. Rev Environ Contam Toxicol 220, 1–44. <u>https://doi.</u> org/10.1007/978-1-4614-3414-6_1

Hanke, G., Galgani, F., Werner, S., Oosterbaan, L., Nilsson, P., Fleet, D., Kinsey, S., Thompson, R., Palatinus, A., Van Franeker, J.A., Vlachogianni, T., Scoullos, M., Veiga, J.M., Matiddi, M., Alcaro, L., Maes, T., Korpinen, S., Budziak, A., Leslie, H., Gago, J., Liebezeit, G., 2013. Guidance on Monitoring of Marine
Litter in European Seas (EUR - Scientific and Technical Research Reports). Publications Office of the European Union.

Harley, C.D.G., Hughes, A.R., Hultgren, K.M., Miner, B.G., Sorte, C.J.B., Thornber, C.S., Rodriguez, L.F., Tomanek, L., Williams, S.L., 2006. The impacts of climate change in coastal marine systems. Ecology Letters 9, 228–241.

Harris, L.S.T., Fennell, J., Fales, R.J., Carrington, E., 2021. Spatial–Temporal Growth, Distribution, and Diffusion of Marine Microplastic Research and National Plastic Policies. Water Air Soil Pollut 232, 400. https://doi.org/10.1007/s11270-021-05352-4

Hartley, B.L., Thompson, R.C., Pahl, S., 2015. Marine litter education boosts children's understanding and self-reported actions. Marine Pollution Bulletin 90, 209–217. <u>https://</u> doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.10.049

Hartmann, N.B., Hüffer, T., Thompson, R.C., Hassellöv, M., Verschoor, A., Daugaard, A.E., Rist, S., Karlsson, T., Brennholt, N., Cole, M., Herrling, M.P., Hess, M.C., Ivleva, N.P., Lusher, A.L., Wagner, M., 2019. Are We Speaking the Same Language? Recommendations for a Definition and Categorization Framework for Plastic Debris. Environ. Sci. Technol. 53, 1039–1047. https:// doi.org/10.1021/acs.est.8b05297

Hermabessiere, L., Dehaut, A., Paul-Pont, I., Lacroix, C., Jezequel, R., Soudant, P., Duflos, G., 2017. Occurrence and effects of plastic additives on marine environments and organisms: A review. Chemosphere

182, 781–793. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> chemosphere.2017.05.096

Hernández-González, A., Saavedra, C., Gago, J., Covelo, P., Santos, M.B., Pierce, G.J., 2018. Microplastics in the stomach contents of common dolphin (Delphinus delphis) stranded on the Galician coasts (NW Spain, 2005–2010). Marine Pollution Bulletin 137, 526–532. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> *marpolbul.*2018.10.026

Herrera, A., Asensio, M., Martínez, I., Santana, A., Packard, T., Gómez, M., 2018. MicroplasticandtarpollutiononthreeCanary Islands beaches: An annual study. Marine Pollution Bulletin 129, 494–502. <u>https://doi.</u> org/10.1016/j.marpolbul.2017.10.020

Herrera, A., Martínez, I., Packard, T., Asensio, M., Gómez, M., 2017. Microtrophic Project, in: Fate and Impact of Microplastics in Marine Ecosystems. Elsevier, p. 69. <u>https://</u> doi.org/10.1016/B978-0-12-812271-6.00066-1

Herrera, A., Raymond, E., Martínez, I., Álvarez, S., Canning-Clode, J., Gestoso, I., Pham, C.K., Ríos, N., Rodríguez, Y., Gómez, M., 2020. First evaluation of neustonic microplastics in the Macaronesian region, NE Atlantic. Marine Pollution Bulletin 153, 110999. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> *marpolbul.2020.110999*

Herrera, A., Ŝtindlová, A., Martínez, I., Rapp, J., Romero-Kutzner, V., Samper, M.D., Montoto, T., Aguiar-González, B., Packard, T., Gómez, M., 2019. Microplastic ingestion by Atlantic chub mackerel (Scomber colias) in the Canary Islands coast. Marine Pollution

Bulletin 139, 127–135. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> marpolbul.2018.12.022

Herrera, I., Carrillo, M., Cosme de Esteban, M., Haroun, R., 2021. Distribution of Cetaceans in the Canary Islands (Northeast Atlantic Ocean): Implications for the Natura 2000 Network and Future Conservation Measures. Front. Mar. Sci. 8, 669790. <u>https://</u> <u>doi.org/10.3389/fmars.2021.669790</u>

Hidalgo-Ruz, V., Gutow, L., Thompson, R.C., Thiel, M., 2012. Microplastics in the Marine Environment: A Review of the Methods Used for Identification and Quantification. Environ. Sci. Technol. 46, 3060–3075. *https://doi.org/10.1021/es2031505*

Hopewell, J., Dvorak, R., Kosior, E., 2009. Plastics recycling: challenges and opportunities. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 364, 2115–2126. <u>https://doi.org/10.1098/</u> <u>rstb.2008.0311</u>

Hoss, D., Settle, L., 1990. Ingestion of plastics by teleost fishes. Proceedings of the Second International Conference of Marine Debris, Honolulu (Hawaii) 693–709.

Ijsseldijk, L.L., Brownlow, A.C., Mazzariol, S. (Eds.), 2019. European Best Practice on Cetacean Post-Mortem Investigation and Tissue Sampling. Joint ACCOBAMS and ASCOBANS Document.

International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN) (Ed.), 2021. Issues Brief: Marine Plastic Pollution.

IWC,2020.ReportoftheIWCWorkshop on Marine Debris: The Way Forward, 3-5 December, 2019. La Garriga, Catalonia, Spain. International Whaling Commission, La Garriga, Catalonia, Spain.

Jacobsen, J.K., Massey, L., Gulland, F., 2010. Fatal ingestion of floating net debris by two sperm whales (Physeter macrocephalus). Marine Pollution Bulletin 60, 765–767. <u>https://</u> <u>doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.03.008</u>

Jambeck, J.R., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T.R., Perryman, M., Andrady, A., Narayan, R., Law, K.L., 2015. Plastic waste inputs from land into the ocean. Science 347, 768–771. <u>https://doi.org/10.1126/</u> <u>science.1260352</u>

Jamieson, A.J., Brooks, L.S.R., Reid, W.D.K., Piertney, S.B., Narayanaswamy, B.E., Linley, T.D., 2019. Microplastics and synthetic particles ingested by deep-sea amphipods in six of the deepest marine ecosystems on Earth. R. Soc. open sci. 6, 180667. <u>https://doi. org/10.1098/rsos.180667</u>

Jeftic, L., Sheavly, S.B., Adler, E., Meith, N., 2009. Marine litter: a global challenge. Regional Seas, United Nations Environment Programme, Nairobi: UNEP.

Kaiser, M., Bullimore, B., Newman, P., Lock, K., Gilbert, S., 1996. Catches in "ghost fishing" set nets. Marine Ecology Progress Series 145, 11–16. <u>https://doi.org/10.3354/</u> <u>meps145011</u>

Kang, J.-H., Kwon, O.Y., Lee, K.-W., Song, Y.K., Shim, W.J., 2015. Marine neustonic microplastics around the southeastern coast of Korea. Mar. Pollut. Bull. 96, 304–312. https:// doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.04.054

Kanhai, L.D.K., Officer, R., Lyashevska, O., Thompson, R.C., O'Connor, I., 2017. Microplastic abundance, distribution and composition along a latitudinal gradient in the Atlantic Ocean. Marine Pollution Bulletin 115, 307–314. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> <u>marpolbul.2016.12.025</u>

Karami, A., Golieskardi, A., Choo, C.K., Romano, N., Ho, Y.B., Salamatinia, B., 2017. A high-performance protocol for extraction of microplastics in fish. Sci. Total Environ. 578, 485–494. https://doi.org/10.1016/j. scitotenv.2016.10.213

Karlsson, T.M., Kärrman, A., Rotander, A., Hassellöv, M., 2020. Comparison between manta trawl and in situ pump filtration methods, and guidance for visual identification of microplastics in surface waters. Environ. Sci. Pollut. Res. 27, 5559–5571. https://doi.org/10.1007/s11356-019-07274-5

Kartar, S., Milne, R.A., Sainsbury, M., 1973. Polystyrene waste in the Severn Estuary. Marine Pollution Bulletin 4, 144. <u>https://doi.</u> org/10.1016/0025-326X(73)90010-6

Katsanevakis, S., 2008. Marine debris, a growing problem: sources, distribution, composition and impacts., in: Hofer, T.N. (Ed.), Marine Pollution: New Research. Nova Publishers, pp. 53–100.

Kelly, A., Lannuzel, D., Rodemann, T., Meiners,K.M.,Auman,H.J.,2020.Microplastic contamination in east Antarctic sea ice. Marine Pollution Bulletin 154, 111130. <u>https://</u> doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111130

Keswani, A., Oliver, D.M., Gutierrez, T., Quilliam, R.S., 2016. Microbial hitchhikers on marine plastic debris: Human exposure risks at bathing waters and beach environments. Marine Environmental Research 118, 10–19. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> *marenvres.2016.04.006*

Kiessling, T., Gutow, L., Thiel, M., 2015. Marine Litter as Habitat and Dispersal Vector, in: Bergmann, M., Gutow, L., Klages, M. (Eds.), Marine Anthropogenic Litter. Springer International Publishing, Cham, pp. 141–181. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16510-3_6

Koelmans, A.A., 2015. Modeling the Role of Microplastics in Bioaccumulation of Organic Chemicals to Marine Aquatic Organisms. A Critical Review, in: Marine Anthropogenic Litter. Springer, Cham, pp. 309–324. <u>https://doi.org/10.1007/978-3-319-</u> 16510-3_11

Koelmans, A.A., Bakir, A., Burton, G.A., Janssen, C.R., 2016. Microplastic as a Vector for Chemicals in the Aquatic Environment: Critical Review and Model-Supported Reinterpretation of Empirical Studies. Environmental Science & Technology 50, 3315–3326. <u>https://doi.org/10.1021/acs.</u> est.5b06069

Koelmans, A.A., Besseling, E., Wegner, A., Foekema, E.M., 2013. Plastic as a carrier of POPs to aquatic organisms: a model analysis. Environ. Sci. Technol. 47, 7812–7820. <u>https://</u> doi.org/10.1021/es401169n Kooi, M., Reisser, J., Slat, B., Ferrari, F.F., Schmid, M.S., Cunsolo, S., Brambini, R., Noble, K., Sirks, L.-A., Linders, T.E.W., Schoeneich-Argent, R.I., Koelmans, A.A., 2016. The effect of particle properties on the depth profile of buoyant plastics in the ocean. Sci. Rep. 6, 33882. https://doi.org/10.1038/srep33882

Kuiken, T., García-Hartmann, M., 1991. Proc 1st ECS Workshop on Cetacean Pathology: Dissection Techniques and Tissue Sampling. European Cetacean Society Newsletter. Special Issue, Saskatoon.

Kukulka, T., Proskurowski, G., Morét Ferguson, S., Meyer, D.W., Law, K.L., 2012. The effect of wind mixing on the vertical distribution of buoyant plastic debris. Geophysical Research Letters 39. <u>https://doi.</u> org/10.1029/2012GL051116

Kukulka, T., Proskurowski, G., Morét Ferguson, S., Meyer, D.W., Law, K.L., 2012. The effect of wind mixing on the vertical distribution of buoyant plastic debris. Geophysical Research Letters 39. <u>https://doi.</u> org/10.1029/2012GL051116

Kvale, K., Prowe, A.E.F., Chien, C.-T., Landolfi, A., Oschlies, A., 2020. The global biological microplastic particle sink. Sci. Rep. 10, 16670. <u>https://doi.org/10.1038/s41598-</u> 020-72898-4

Käppler, A., Fischer, D., Oberbeckmann, S., Schernewski, G., Labrenz, M., Eichhorn, K.-J., Voit, B., 2016. Analysis of environmental microplastics by vibrational microspectroscopy: FTIR, Raman or both? Anal Bioanal Chem 1–15. <u>https://doi.</u> org/10.1007/s00216-016-9956-3 Kühn, S., Rebolledo, E.L.B., Franeker, J.A. van, 2015. Deleterious Effects of Litter on Marine Life, in: Bergmann, M., Gutow, L., Klages, M. (Eds.), Marine Anthropogenic Litter. Springer International Publishing, pp. 75–116. <u>https://doi.org/10.1007/978-3-319-</u> 16510-3_4

Kühn, S., van Franeker, J.A., 2020. Quantitative overview of marine debris ingested by marine megafauna. Marine Pollution Bulletin 151, 110858. <u>https://doi.</u> org/10.1016/j.marpolbul.2019.110858

Laist, D.W., 1987. Overview of the biological effects of lost and discarded plastic debris in the marine environment. Marine Pollution Bulletin 18, 319–326. <u>https://doi.org/10.1016/S0025-326X(87)80019-X</u>

Laist, D.W., 1997. Impacts of Marine Debris: Entanglement of Marine Life in Marine Debris Including a Comprehensive List of Species with Entanglement and Ingestion Records, in: Coe, J.M., Rogers, D.B. (Eds.), Marine Debris: Sources, Impacts, and Solutions, Springer Series on Environmental Management. Springer, New York, NY, pp. 99–139. <u>https://doi.org/10.1007/978-1-4613-</u> 8486-1_10

Lattin, G.L., Moore, C.J., Zellers, A.F., Moore, S.L., Weisberg, S.B., 2004. A comparison of neustonic plastic and zooplankton at different depths near the southern California shore. Marine Pollution Bulletin 49, 291–294. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> *marpolbul.2004.01.020* Law, K.L., Morét-Ferguson, S., Maximenko, N.A., Proskurowski, G., Peacock, E.E., Hafner, J., Reddy, C.M., 2010. Plastic Accumulation in the North Atlantic Subtropical Gyre. Science 329, 1185–1188. <u>https://doi.org/10.1126/science.1192321</u>

Lebreton, L.C.M., van der Zwet, J., Damsteeg, J.-W., Slat, B., Andrady, A., Reisser, J., 2017. River plastic emissions to the world's oceans. Nat Commun 8, 15611. <u>https://doi.</u> org/10.1038/ncomms15611

Leichter, J., 2011. Investigating the Accumulation of Plastic Debris in the North Pacific Gyre. Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry - Marine Environmental Modeling & Analysis.

Lenaker, P.L., Baldwin, A.K., Corsi, S.R., Mason, S.A., Reneau, P.C., Scott, J.W., 2019. Vertical Distribution of Microplastics in the Water Column and Surficial Sediment from the Milwaukee River Basin to Lake Michigan. Environ. Sci. Technol. 53, 12227–12237. <u>https://</u> <u>doi.org/10.1021/acs.est.9b03850</u>

Lentz, S.A., 1987. Plastics in the marine environment: Legal approaches for international action. Marine Pollution Bulletin 18, 361–365. <u>https://doi.org/10.1016/</u> S0025-326X(87)80027-9

Lenz, R., Enders, K., Stedmon, C.A., Mackenzie, D.M.A., Nielsen, T.G., 2015. A critical assessment of visual identification of marine microplastic using Raman spectroscopy for analysis improvement. Marine Pollution Bulletin 100, 82–91. <u>https://</u> doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.09.026 Lenz, R., Enders, K., Stedmon, C.A., Mackenzie, D.M.A., Nielsen, T.G., 2015. A critical assessment of visual identification of marine microplastic using Raman spectroscopy for analysis improvement. Marine Pollution Bulletin 100, 82–91. <u>https://</u> doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.09.026

Lenz, R., Labrenz, M., 2018. Small Microplastic Sampling in Water: Development of an Encapsulated Filtration Device. Water 10, 1055. <u>https://doi.</u> org/10.3390/w10081055

Letcher, R.J., Bustnes, J.O., Dietz, R., Jenssen, B.M., Jørgensen, E.H., Sonne, C., Verreault, J., Vijayan, M.M., Gabrielsen, G.W., 2010. Exposure and effects assessment of persistent organohalogen contaminants in arctic wildlife and fish. Science of The Total Environment, Levels, trends and effects of legacy and new persistent organic pollutants in the Arctic: An AMAP Assessment 408, 2995–3043. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> scitotenv.2009.10.038

Lindeque, P.K., Cole, M., Coppock, R.L., Lewis, C.N., Miller, R.Z., Watts, A.J.R., Wilson-McNeal, A., Wright, S.L., Galloway, T.S., 2020. Are we underestimating microplastic abundance in the marine environment? A comparison of microplastic capture with nets of different mesh-size. Environ. Pollut. 265, 114721. https://doi.org/10.1016/j. envpol.2020.114721

Lithner, D., Damberg, J., Dave, G., Larsson, Å., 2009. Leachates from plastic consumer products – Screening for toxicity with Daphnia magna. Chemosphere

74, 1195–1200. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> chemosphere.2008.11.022

Lithner, D., Larsson, Å., Dave, G., 2011. Environmental and health hazard ranking and assessment of plastic polymers based on chemical composition. Science of The Total Environment 409, 3309–3324. <u>https://doi.</u> org/10.1016/j.scitotenv.2011.04.038

Liu, S., Chen, H., Wang, J., Su, L., Wang, X., Zhu, J., Lan, W., 2021. The distribution of microplastics in water, sediment, and fish of the Dafeng River, a remote river in China. Ecotoxicol. Environ. Saf. 228, 113009. <u>https://</u> <u>doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.113009</u>

Liu, T.-K., Wang, M.-W., Chen, P., 2013. Influence of waste management policy on the characteristics of beach litter in Kaohsiung, Taiwan. Mar Pollut Bull 72, 99–106. <u>https://</u> <u>doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.04.015</u>

Lusher, A., 2015. Microplastics in the Marine Environment: Distribution, Interactions and Effects, in: Bergmann, M., Gutow, L., Klages, M. (Eds.), Marine Anthropogenic Litter. Springer International Publishing, Cham, pp. 245–307.

Lusher, A.L., Burke, A., O'Connor, I., Officer, R., 2014. Microplastic pollution in the Northeast Atlantic Ocean: Validated and opportunistic sampling. Marine Pollution Bulletin 88, 325–333. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> <u>marpolbul.2014.08.023</u>

Lusher, A.L., Burke, A., O'Connor, I., Officer, R., 2014. Microplastic pollution in the Northeast Atlantic Ocean: Validated and opportunistic sampling. Marine Pollution

Bulletin 88, 325–333. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> marpolbul.2014.08.023

Lusher, A.L., Hernandez-Milian, G., 2018. Microplastic Extraction from Marine Vertebrate Digestive Tracts, Regurgitates and Scats: A Protocol for Researchers from All Experience Levels. Bio-Protoc. 8, e3087– e3087.

Lusher, A.L., Hernandez-Milian, G., Berrow, S., Rogan, E., O'Connor, I., 2018. Incidence of marine debris in cetaceans stranded and bycaught in Ireland: Recent findings and a review of historical knowledge. Environmental Pollution 232, 467–476. <u>https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.09.070</u>

Lusher, A.L., Hernandez-Milian, G., O'Brien, J., Berrow, S., O'Connor, I., Officer, R., 2015. Microplastic and macroplastic ingestion by a deep diving, oceanic cetacean: The True's beaked whale Mesoplodon mirus. Environmental Pollution 199, 185–191. <u>https://</u> doi.org/10.1016/j.envpol.2015.01.023

Lusher, A.L., Hurley, R., Arp, H.P.H., Booth, A.M., Bråte, I.L.N., Gabrielsen, G.W., Gomiero, A., Gomes, T., Grøsvik, B.E., Green, N., Haave, M., Hallanger, I.G., Halsband, C., Herzke, D., Joner, E.J., Kögel, T., Rakkestad, K., Ranneklev, S.B., Wagner, M., Olsen, M., 2021. Moving forward in microplastic research: A Norwegian perspective. Environ. Int. 157, 106794. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> envint.2021.106794

Lusher, A.L., Tirelli, V., O'Connor, I., Officer, R., 2015. Microplastics in Arctic polar waters: the first reported values of particles in surface and sub-surface samples. Sci. Rep. 5, 14947. <u>https://doi.org/10.1038/srep14947</u>

Lusher, A.L., Welden, N.A., Sobral, P., Cole, M., 2017. Sampling, isolating and identifying microplastics ingested by fish and invertebrates. Anal. Methods 9, 1346–1360. <u>https://doi.org/10.1039/C6AY02415G</u>

Lv, L., Yan, X., Feng, L., Jiang, S., Lu, Z., Xie, H., Sun, S., Chen, J., Li, C., 2021. Challenge for the detection of microplastics in the environment. Water Environ. Res. 93, 5–15. https://doi.org/10.1002/wer.1281

Löder, M.G.J., Gerdts, G., 2015. Methodology Used for the Detection and Identification of Microplastics—A Critical Appraisal, in: Bergmann, M., Gutow, L., Klages, M. (Eds.), Marine Anthropogenic Litter. Springer International Publishing, Cham, pp. 201–227. <u>https://doi.org/10.1007/978-3-319-</u> 16510-3_8

Mai, L., Bao, L.-J., Shi, L., Wong, C.S., Zeng, E.Y., 2018. A review of methods for measuring microplastics in aquatic environments. Environ Sci Pollut Res 25, 11319–11332. <u>https://doi.org/10.1007/s11356-</u> 018-1692-0

Martí, E., Martin, C., Galli, M., Echevarría, F., Duarte, C.M., Cózar, A., 2020. The Colors of the Ocean Plastics. Environ. Sci. Technol. 54, 6594–6601. <u>https://doi.org/10.1021/acs.</u> est.9b06400

Martin, J., Granberg, M., Provencher, J.F., Liboiron, M., Pijogge, L., Magnusson, K., Hallanger, I.G., Bergmann, M., Aliani, S., Gomiero, A., Grøsvik, B.E., Vermaire, J., Primpke, S., Lusher, A.L., 2022. The power of multi-matrix monitoring in the Pan-Arctic region: plastics in water and sediment. Arct. Sci. *https://doi.org/10.1139/AS-2021-0056*

Maximenko, N., Hafner, J., Niiler, P., 2012. Pathways of marine debris derived from trajectories of Lagrangian drifters. Marine Pollution Bulletin, At-sea Detection of Derelict Fishing Gear 65, 51–62. <u>https://doi.</u> org/10.1016/j.marpolbul.2011.04.016

McCauley, S.J., Bjorndal, K.A., 1999. Conservation Implications of Dietary Dilution from Debris Ingestion: Sublethal Effects in Post-Hatchling Loggerhead Sea Turtles. Conservation Biology 13, 925–929.

McCormick, A., Hoellein, T.J., Mason, S.A., Schluep, J., Kelly, J.J., 2014. Microplastic is an abundant and distinct microbial habitat in an urban river. Environ Sci Technol 48, 11863–11871. https://doi.org/10.1021/es503610r

Meaza, I., Toyoda, J.H., Wise Sr, J.P., 2021. Microplastics in Sea Turtles, Marine Mammals and Humans: A One Environmental Health Perspective. Front. Environ. Sci. 8. <u>https://doi.</u> org/10.3389/fenvs.2020.575614

Menges, F., 2016. Spectragryph - optical spectroscopy software.

Meijer, L.J.J., van Emmerik, T., van der Ent, R., Schmidt, C., Lebreton, L., 2021. More than 1000 rivers account for 80% of global riverine plastic emissions into the ocean. Science Advances 7, eaaz5803. <u>https://doi.</u> org/10.1126/sciadv.aaz5803 McGoran, A.R., Maclaine, J.S., Clark, P.F., Morritt, D., 2021. Synthetic and Semi-Synthetic Microplastic Ingestion by Mesopelagic Fishes From Tristan da Cunha and St Helena, South Atlantic. Front. Mar. Sci. 8. <u>https://doi.org/10.3389/fmars.2021.633478</u>

Michida, Y., Chavanich, S., Cabañas, A.C., Hagmann, P., Hinata, H., Isobe, A., Kershaw, P., Kozlovskii, N., Li, D., Martí, E., Mason, S.A., Mu, J., Saito, H., Shim, W.J., Syakti, A.D., Takada, H., Thompson, R., Tokai, T., Vasilenko, K., Wang, J., 2019. Guidelines for Harmonizing Ocean Surface Microplastic Monitoring Methods 74.

Miller, M.E., Kroon, F.J., Motti, C.A., 2017. Recovering microplastics from marine samples: A review of current practices. Marine Pollution Bulletin 123, 6–18. <u>https://</u> doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.08.058

Miller, E., Sedlak, M., Lin, D., Box, C., Holleman, C., Rochman, C.M., Sutton, R., 2021. Recommended best practices for collecting, analyzing, and reporting microplastics in environmental media: Lessons learned from comprehensive monitoring of San Francisco Bay. J. Hazard. Mater. 409, 124770. <u>https://doi. org/10.1016/j.jhazmat.2020.124770</u>

Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino, 2011. Orden ARM/2417/2011, de 30 de agosto, por la que se declaran zonas especiales de conservación los lugares de importancia comunitaria marinos de la región biogeográfica Macaronésica de la Red Natura 2000 y se aprueban sus correspondientes medidas de conservación. Monteiro, R.C.P., Ivar do Sul, J.A., Costa, M.F., 2018. Plastic pollution in islands of the Atlantic Ocean. Environmental Pollution 238, 103–110. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> <u>envpol.2018.01.096</u>

Montoto-Martínez, T., Gelado-Caballero, M.D., 2020. A protocol for Seawater sample preparation for microplastic determination. <u>https://dx.doi.org/10.17504/</u> protocols.io.bcfyitpw

Montoto-Martínez, T., Hernández-Brito, J.J., Gelado-Caballero, M.D., 2018. Underway water system of Research vessels: Optimizaition of a method for small microplastics sampling in oceanic waters. Póster presentado en el VI Simposio Internacional de Ciencias Marinas (ISMS). Vigo (Spain), 20-22th June 2018.

Montoto-Martínez, T., Hernández-Brito, J.J., Gelado-Caballero, M.D., 2020. Pump-underway ship intake: An unexploited opportunity for Marine Strategy Framework Directive (MSFD) microplastic monitoring needs on coastal and oceanic waters. PLOS ONE 15, e0232744. <u>https://doi.org/10.1371/</u> journal.pone.0232744

Montoto-Martínez, T., Hernández-Brito, J.J., Gelado-Caballero, M.D., Cardona Castellano, P., 2021a. MuMi Microplastic sampling device (Utility Model). ES1270147.

Montoto-Martínez, T., Puig-Lozano, R., Marques, N., Fernández, A., De la Fuente, J., Gelado-Caballero, M.D., 2021. A protocol to address the study of microplastic intake in stranded cetaceans. protocols.io <u>https://doi.</u> org/10.17504/protocols.io.bcfxitpn

Moore, C.J., Moore, S.L., Leecaster, M.K., Weisberg, S.B., 2001. A Comparison of Plastic and Plankton in the North Pacific Central Gyre. Marine Pollution Bulletin 42, 1297–1300. <u>https://doi.org/10.1016/S0025-</u> 326X(01)00114-X

Moore, C.J., 2008. Synthetic polymers in the marine environment: A rapidly increasing, long-term threat. Environmental Research, The Plastic World 108, 131–139. *https://doi.org/10.1016/j.envres.2008.07.025*

Moore, R.C., Loseto, L., Noel, M., Etemadifar, A., Brewster, J.D., MacPhee, S., Bendell, L., Ross, P.S., 2020. Microplastics in beluga whales (Delphinapterus leucas) from the Eastern Beaufort Sea. Marine Pollution Bulletin 150, 110723. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> *marpolbul.2019.110723*

Moreira, F.T., Balthazar-Silva, D., Barbosa, L., Turra, A., 2016. Revealing accumulation zones of plastic pellets in sandy beaches. Environmental Pollution 218, 313–321. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> <u>envpol.2016.07.006</u>

Morris, A.W., Hamilton, E.I., 1974. Polystyrene spherules in the Bristol Channel. Marine Pollution Bulletin 5, 26–27. <u>https://doi.</u> org/10.1016/0025-326X(74)90311-7

Morét-Ferguson, S., Law, K.L., Proskurowski, G., Murphy, E.K., Peacock, E.E., Reddy, C.M., 2010. The size, mass, and composition of plastic debris in the western North Atlantic Ocean. Mar. Pollut. Bull. 60, 1873–1878. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> marpolbul.2010.07.020

Mrosovsky, N., Ryan, G.D., James, M.C., 2009. Leatherback turtles: The menace of plastic. Marine Pollution Bulletin 58, 287–289. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> <u>marpolbul.2008.10.018</u>

Munno, K., De Frond, H., O'Donnell, B., Rochman, C.M., 2020. Increasing the Accessibility for Characterizing Microplastics: Introducing New Application-Based and Spectral Libraries of Plastic Particles (SLoPP and SLoPP-E). Anal. Chem. 92, 2443–2451. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b03626

Murphy, F., Ewins, C., Carbonnier, F., Quinn, B., 2016. Wastewater Treatment Works (WwTW) as a Source of Microplastics in the Aquatic Environment. Environ. Sci. Technol. 50, 5800–5808. <u>https://doi.org/10.1021/acs.</u> est.5b05416

Murphy, F., Prades, L., Ewins, C., Quinn, B., 2017. The Effects of Microplastic on Freshwater Hydra attenuatta Morphology and Feeding, in: Fate and Impact of Microplastics in Marine Ecosystems. Elsevier, pp. 78–79. <u>https://doi.org/10.1016/B978-0-12-</u> 812271-6.00077-6

Murray, F., Cowie, P.R., 2011. Plastic contamination in the decapod crustacean Nephropsnorvegicus(Linnaeus,1758).Marine Pollution Bulletin 62, 1207–1217. <u>https://doi.</u> org/10.1016/j.marpolbul.2011.03.032

Nauendorf, A., Krause, S., Bigalke, N.K., Gorb, E.V., Gorb, S.N., Haeckel, M., Wahl, M., Treude, T., 2016. Microbial colonization and degradation of polyethylene and biodegradable plastic bags in temperate fine-grained organic-rich marine sediments. Mar Pollut Bull 103, 168–178. <u>https://doi.</u> org/10.1016/j.marpolbul.2015.12.024

Nelms, S.E., Barnett, J., Brownlow, A., Davison, N.J., Deaville, R., Galloway, T.S., Lindeque, P.K., Santillo, D., Godley, B.J., 2019. Microplastics in marine mammals stranded around the British coast: ubiquitous but transitory? Sci Rep 9, 1075. <u>https://doi.</u> org/10.1038/s41598-018-37428-3

Nelms, S.E., Duncan, E.M., Broderick, A.C., Galloway, T.S., Godfrey, M.H., Hamann, M., Lindeque, P.K., Godley, B.J., 2016. Plastic and marine turtles: a review and call for research. ICES Journal of Marine Science 73, 165–181. *https://doi.org/10.1093/icesjms/fsv165*

NOAA, 1985. Proceedings of the workshop on the fate and impact of marine debris 27-29 November, 1984, Honolulu, Hawaii.

Norén, F., Naustvol, L., 2010. Survey of microscopic anthropogenic particles in Skagerrak. (Tech. Rep.). Commission of Klima og forurensningsdirektoratet.

Novillo, O., Raga, J.A., Tomás, J., 2020. Evaluating the presence of microplastics in striped dolphins (Stenella coeruleoalba) stranded in the Western Mediterranean Sea. Mar Pollut Bull 160, 111557. <u>https://doi.</u> org/10.1016/j.marpolbul.2020.111557

Obbard, R.W., Sadri, S., Wong, Y.Q., Khitun, A.A., Baker, I., Thompson, R.C., 2014. Global warming releases microplastic legacy frozen in Arctic Sea ice. Earth's Future 2, 315–320. https://doi.org/10.1002/2014EF000240

Oberbeckmann, S., Löder, M.G.J., Labrenz, M., Oberbeckmann, S., Löder, M.G.J., Labrenz, M., 2015. Marine microplasticassociated biofilms—a review. Environ. Chem. 12, 551–562. <u>https://doi.org/10.1071/EN15069</u>

Ogata, Y., Takada, H., Mizukawa, K., Hirai, H., Iwasa, S., Endo, S., Mato, Y., Saha, M., Okuda, K., Nakashima, A., Murakami, M., Zurcher, N., Booyatumanondo, R., Zakaria, M.P., Dung, L.Q., Gordon, M., Miguez, C., Suzuki, S., Moore, C., Karapanagioti, H.K., Weerts, S., McClurg, T., Burres, E., Smith, W., Velkenburg, M.V., Lang, J.S., Lang, R.C., Laursen, D., Danner, B., Stewardson, N., Thompson, R.C., 2009. International Pellet Watch: Global monitoring of persistent organic pollutants (POPs) in coastal waters. 1. Initial phase data on PCBs, DDTs, and HCHs. Marine Pollution Bulletin 1437–1446. https://doi.org/10.1016/j. 58, marpolbul.2009.06.014

Okuku, E., Kiteresi, L., Owato, G., Otieno, K., Mwalugha, C., Mbuche, M., Gwada, B., Nelson, A., Chepkemboi, P., Achieng, Q., Wanjeri, V., Ndwiga, J., Mulupi, L., Omire, J., 2021. The impacts of COVID-19 pandemic on marine litter pollution along the Kenyan Coast: A synthesis after 100 days following the first reported case in Kenya. Mar. Pollut. Bull. 162, 111840. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> *marpolbul.2020.111840*

Oliveira, A.R., Sardinha-Silva, A., Andrews, P.L.R., Green, D., Cooke, G.M., Hall, S., Blackburn, K., Sykes, A.V., 2020. Microplastics presence in cultured and wildcaught cuttlefish, Sepia officinalis. Marine Pollution Bulletin 160, 111553. <u>https://doi.</u> org/10.1016/j.marpolbul.2020.111553

Oßmann, B.E., Sarau, G., Schmitt, S.W., Holtmannspötter, H., Christiansen, S.H., Dicke, W., 2017. Development of an optimal filter substrate for the identification of small microplastic particles in food by micro-Raman spectroscopy. Anal Bioanal Chem 409, 4099–4109. <u>https://doi.org/10.1007/</u> s00216-017-0358-y

O'Brine, T., Thompson, R.C., 2010. Degradation of plastic carrier bags in the marine environment. Mar Pollut Bull 60, 2279–2283. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> marpolbul.2010.08.005

Page-Karjian, A., Lo, C.F., Ritchie, B., Harms, C.A., Rotstein, D.S., Han, S., Hassan, S.M., Lehner, A.F., Buchweitz, J.P., Thayer, V.G., Sullivan, J.M., Christiansen, E.F., Perrault, J.R., 2020. Anthropogenic Contaminants and Histopathological Findings in Stranded Cetaceans in the Southeastern United States, 2012–2018. Front. Mar. Sci. 7. <u>https://doi.</u> org/10.3389/fmars.2020.00630

Pahl, S., Wyles, K.J., 2017. The human dimension: how social and behavioural research methods can help address microplastics in the environment. Anal. Methods 9,1404–1411. <u>https://doi.org/10.1039/</u> <u>C6AY02647H</u>

Panti, C., Baini, M., Lusher, A., Hernandez-Milan, G., Bravo Rebolledo, E.L., Unger, B., Syberg, K., Simmonds, M.P., Fossi, M.C., 2019. Marine litter: One of the major threats for marine mammals. Outcomes from the European Cetacean Society workshop. Environmental Pollution 247, 72–79. <u>https://</u> doi.org/10.1016/j.envpol.2019.01.029

Patel, M.M., Goyal, B.R., Bhadada, S.V., Bhatt, J.S., Amin, A.F., 2009. Getting into the Brain. CNS Drugs 23, 35–58. <u>https://doi.</u> org/10.2165/0023210-200923010-00003

Pawson, M., 2003. The catching capacity of lost static fishing gears: Introduction. Fisheries Research - FISH RES 64, 101–105. <u>https://doi.org/10.1016/S0165-7836(03)00208-X</u>

Peng, G., Bellerby, R., Zhang, F., Sun, X., Li, D., 2020. The ocean's ultimate trashcan: Hadal trenches as major depositories for plastic pollution. Water Research 168, N.PAG-N.PAG. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> watres.2019.115121

Pettit, T.N., Grant, G.S., Whittow, G.C., 1981. Ingestion of Plastics by Laysan Albatross. Auk 98, 839–841.

Pham, C.K., Ramirez-Llodra, E., Alt, C.H.S., Amaro, T., Bergmann, M., Canals, M., Company, J.B., Davies, J., Duineveld, G., Galgani, F., Howell, K.L., Huvenne, V.A.I., Isidro, E., Jones, D.O.B., Lastras, G., Morato, T., Gomes-Pereira, J.N., Purser, A., Stewart, H., Tojeira, I., Tubau, X., Rooij, D.V., Tyler, P.A., 2014. Marine Litter Distribution and Density in European Seas, from the Shelves to Deep Basins. PLOS ONE 9, e95839. <u>https://doi.</u> org/10.1371/journal.pone.0095839

Pieper, C., Amaral-Zettler, L., Law, K.L., Loureiro, C.M., Martins, A., 2019. Application of Matrix Scoring Techniques to evaluate marine debris sources in the remote islands of the Azores Archipelago. Environmental Pollution 249, 666–675. <u>https://doi.</u> org/10.1016/j.envpol.2019.03.084

Piha Henna, E., Hanke, G., Galgani, F., Werner, S., Alcaro, L., Mattidi, M., Fleet, D., Kamizoulis, G., Maes, T., Osterbaan, L., Thompson, R., Van Franeker, J.A., Mouat, J., Meacle, M., Carroll, C., Detloff, K.C., Kinsey, S., Nilsson, P., Sheavly, S., Svärd, B., Veiga, J.M., Morison, S., Katsanevakis Stylianos, M., Lopez-Lopez, L., Palatinus, A., Scoullos, M., 2011. Marine Litter : Technical Recommendations for the Implementation of MSFD Requirements (EUR - Scientific and Technical Research Reports). Publications Office of the European Union. <u>https://doi. org/10.2788/92438</u>

Plastics Europe, 2021. Plastics - The Facts 2020. An analysis of European plastics production, demand and waste data.

Plastics Europe, 2022. Plastics - the Facts 2021.

Poeta, G., Battisti, C., Bazzichetto, M., Acosta, A.T.R., 2016. The cotton buds beach: Marine litter assessment along the Tyrrhenian coast of central Italy following the marine strategy framework directive criteria. Marine Pollution Bulletin 113, 266–270. <u>https://doi.</u> org/10.1016/j.marpolbul.2016.09.035

Poeta, G., Romiti, F., 2015. Discarded bottles in sandy coastal dunes as threat for macro-Invertebrate populations: first evidence of a trap effect. Vie et Milieu 65, 125–127. Prata, J.C., da Costa, J.P., Duarte, A.C., Rocha-Santos, T., 2019. Methods for sampling and detection of microplastics in water and sediment: A critical review. TrAC Trends Anal. Chem. 110, 150–159. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> <u>trac.2018.10.029</u>

Prata, J.C., da Costa, J.P., Duarte, A.C., Rocha-Santos, T., 2019. Methods for sampling and detection of microplastics in water and sediment: A critical review. TrAC Trends in Analytical Chemistry 110, 150–159. <u>https://doi.</u> org/10.1016/j.trac.2018.10.029

Prata, J.C., Manana, M.J., da Costa, J.P., Duarte, A.C., Rocha-Santos, T., 2020. What Is the Minimum Volume of Sample to Find Small Microplastics: Laboratory Experiments and Sampling of Aveiro Lagoon and Vouga River, Portugal. Water 12, 1219. <u>https://doi.</u> org/10.3390/w12041219

Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA), 2011. The Chemicals in Products Project: Case Study of the Textiles Sector. United Nations Environment Programme DTIE/Chemicals branch.

Programa de Las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA), 2016. Marine Plastic Debris and Microplastics: Global Lessons and Research to Inspire Action and Guide Policy Change. United Nations Environment Programme, Nairobi. <u>https://</u> doi.org/DEP/2010/nA

Programa de Las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA), 2021. From Pollution to Solution. A global assessment of marine litter and plastic pollution. Programa de Las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA), 2022. Inside the Clean Seas campaign against microplastics. URL <u>http://www.unep.org/</u> <u>news-and-stories/story/inside-clean-seas-</u> <u>campaign-against-microplastics</u> (accedido 7.11.22).

Provencher, J.F., Bond, A.L., Avery-Gomm, S., Borrelle, S.B., Rebolledo, E.L.B., Hammer, S., Kühn, S., Lavers, J.L., Mallory, M.L., Trevail, A., Franeker, J.A. van, 2017. Quantifying ingested debris in marine megafauna: a review and recommendations for standardization. Anal. Methods 9, 1454–1469. <u>https://doi.org/10.1039/C6AY02419J</u>

Puig-Lozano, R., Bernaldo de Quirós, Y., Díaz-Delgado, J., García-Álvarez, N., Sierra, E., De la Fuente, J., Sacchini, S., Suárez-Santana, CM., Zucca, D., Câmara, N., Saavedra, P., Almunia, J., Rivero, M.A., Fernández, A., Arbelo, M., 2018. Retrospective study of foreign body-associated pathology in stranded cetaceans, Canary Islands (2000– 2015). Environmental Pollution 243, 519–527. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.09.012

QGIS Development Team, 2021. QGIS Geographic Information System.

Ramanna, S., Morozovskii, D., Swanson, S., Bruneau, J., 2022. Machine Learning of polymer types from the spectral signature of Raman spectroscopy microplastics data. https://doi.org/10.48550/arXiv.2201.05445

Razeghi, N., Hamidian, A.H., Wu, C., Zhang, Y., Yang, M., 2021. Microplastic sampling techniques in freshwaters and sediments: a review. Environ. Chem. Lett. 19, 4225–4252. <u>https://doi.org/10.1007/s10311-</u> 021-01227-6

R Core Team, 2019. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing.

Rech, S., Macaya-Caquilpán, V., Pantoja, J., Rivadeneira, M., Madariaga, D., Thiel, M., 2014. Rivers as a source of marine litter-A study from the SE Pacific. Marine Pollution Bulletin, 82, 66-75. Marine pollution bulletin 82. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> *marpolbul.*2014.03.019

Reisser, J., Shaw, J., Wilcox, C., Hardesty, B.D., Proietti, M., Thums, M., Pattiaratchi, C., 2013. Marine Plastic Pollution in Waters around Australia: Characteristics, Concentrations, and Pathways. PLOS ONE 8, e80466. <u>https://doi.org/10.1371/journal.</u> <u>pone.0080466</u>

Remy, F., Collard, F., Gilbert, B., Compère, P., Eppe, G., Lepoint, G., 2015. When Microplastic Is Not Plastic: The Ingestion of Artificial Cellulose Fibers by Macrofauna Living in Seagrass Macrophytodetritus. Environ. Sci. Technol. 49, 11158–11166. <u>https://</u> doi.org/10.1021/acs.est.5b02005

Renner, G., Schmidt, T.C., Schram, J., 2018. Analytical methodologies for monitoring micro(nano)plastics: Which are fit for purpose? Current Opinion in Environmental Science & Health, Micro and Nanoplastics Edited by Dr. Teresa A.P. Rocha-Santos 1, 55–61. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> <u>coesh.2017.11.001</u> Ribeiro-Claro, P., Nolasco, M.M., Araújo, C., 2017. Characterization of Microplastics by Raman Spectroscopy, in: Comprehensive Analytical Chemistry. Elsevier, pp. 119–151. https://doi.org/10.1016/bs.coac.2016.10.001

RIMMEL (Riverine and Marine floating macro litter Monitoring and Modelling of Environmental Loading) [WWW Document], n.d. . ResearchGate. URL <u>https://www.researchgate.net/project/RIMMEL-Riverine-and-Marine-floating-macro-litter-Monitoring-and-Modelling-of-Environmental-Loading</u> (accessed 5.12.22).

Rocha-Santos, T., Duarte, A.C., 2015. A critical overview of the analytical approaches to the occurrence, the fate and the behavior of microplastics in the environment. TrAC Trends in Analytical Chemistry 65, 47–53. https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.10.011

Rochman, C.M., 2015. The Complex Mixture, Fate and Toxicity of Chemicals Associated with Plastic Debris in the Marine Environment, in: Bergmann, M., Gutow, L., Klages, M. (Eds.), Marine Anthropogenic Litter. Springer International Publishing, Cham, pp. 117–140. <u>https://doi.org/10.1007/978-3-319-</u> 16510-3_5

Rochman, C.M., Browne, M.A., Underwood, A.J., van Franeker, J.A., Thompson, R.C., Amaral-Zettler, L.A., 2016. The ecological impacts of marine debris: unraveling the demonstrated evidence from what is perceived. Ecology 97, 302–312.

Rochman, C.M., Hoh, E., Hentschel, B.T., Kaye, S., 2013. Long-Term Field Measurement of Sorption of Organic Contaminants to Five Types of Plastic Pellets: Implications for Plastic Marine Debris. Environ. Sci. Technol. 130109073312009. <u>https://doi.org/10.1021/</u> es303700s

Rochman, C.M., Regan, F., Thompson, R.C., 2017. On the harmonization of methods for measuring the occurrence, fate and effects of microplastics. Anal. Methods 9, 1324–1325. <u>https://doi.org/10.1039/C7AY90014G</u>

Rochman, C.M., Tahir, A., Williams, S.L., Baxa, D.V., Lam, R., Miller, J.T., Teh, F.-C., Werorilangi, S., Teh, S.J., 2015. Anthropogenic debris in seafood: Plastic debris and fibers from textiles in fish and bivalves sold for human consumption. Sci. Rep. 5, 14340. *https://doi.org/10.1038/srep14340*

Rojo-Nieto, E., Montoto-Martínez, T., 2017. Basuras marinas, plásticos y microplásticos: orígenes, impactos y consecuencias de una amenaza global. Ecologistas en Acción. <u>http://www.</u> ecologistasenaccion.org/article7363.html

Romeo, T., Pedà, C., Fossi, M.C., Andaloro, F., Battaglia, P., 2016. First record of plastic debris in the stomach of Mediterranean lanternfishes 10.

Rosevelt, C., Los Huertos, M., Garza, C., Nevins, H.M., 2013. Marine debris in central California: Quantifying type and abundance of beach litter in Monterey Bay, CA. Marine Pollution Bulletin 71, 299–306. <u>https://doi.</u> org/10.1016/j.marpolbul.2013.01.015

Rothstein, S.I., 1973. Plastic Particle Pollution of the Surface of the Atlantic Ocean:

232

Evidence from a Seabird. The Condor 75, 344–345. *https://doi.org/10.2307/1366176*

RStudio Team, 2022. RStudio: Integrated Development Environment for R.

Ryan, P.G., 2013. A simple technique for counting marine debris at sea reveals steep litter gradients between the Straits of Malacca and the Bay of Bengal. Marine Pollution Bulletin 69, 128–136. <u>https://doi.</u> org/10.1016/j.marpolbul.2013.01.016

Ryan, P.G., 2015. A Brief History of Marine Litter Research, in: Bergmann, M., Gutow, L., Klages, M. (Eds.), Marine Anthropogenic Litter. Springer International Publishing, Cham, pp. 1–25. <u>https://doi.org/10.1007/978-</u> <u>3-319-16510-3_1</u>

Ryan, P.G., Moloney, C.L., 1990. Plastic and other artefacts on South African beaches; temporal trends in abundance and composition. South African Journal of Science 86, 450–452.

Ryan, P.G., Moore, C.J., van Franeker, J.A., Moloney, C.L., 2009. Monitoring the Abundance of Plastic Debris in the Marine Environment. Philosophical Transactions: Biological Sciences 364, 1999–2012.

Šaravanja, A., Pušić, T., Dekanić, T., 2022. Microplastics in Wastewater by Washing Polyester Fabrics. Materials 15, 2683. <u>https://</u> <u>doi.org/10.3390/ma15072683</u>

Sadri, S.S., Thompson, R.C., 2014. On the quantity and composition of floating plastic debris entering and leaving the Tamar Estuary, Southwest England. Marine Pollution Bulletin 81, 55–60.

SAPEA, Science Advice for Policy by European Academies, 2019. A Scientific Perspective on Microplastics in Nature and Society. Science Advice for Policy by European Academies, Berlin. <u>https://www.sapea.info/</u> wp-content/uploads/report.pdf

Schnurr, R.E.J., Alboiu, V., Chaudhary, M., Corbett, R.A., Quanz, M.E., Sankar, K., Srain, H.S., Thavarajah, V., Xanthos, D., Walker, T.R., 2018. Reducing marine pollution from single-use plastics (SUPs): A review. Marine Pollution Bulletin 137, 157–171. <u>https://</u> doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.10.001

Scott, P.G., 1972. Plastics packaging and coastal pollution. International Journal of Environmental Studies 3, 35–36. <u>https://doi.</u> org/10.1080/00207237208709489

Sebille, E. van, England, M.H., Froyland, G., 2012. Origin, dynamics and evolution of ocean garbage patches from observed surface drifters. Environ. Res. Lett. 7, 044040. <u>https://</u> doi.org/10.1088/1748-9326/7/4/044040

Secretariat of the Convention on Biological Diversity and the Scientific and Technical Advisory Panel - GEF, 2012. Impacts of marine debris on biodiversity: current status and potential solutions, Technical Series. Montreal.

Sekiguchi, T., Saika, A., Nomura, K., Watanabe, Toshihiro, Watanabe, Toru, Fujimoto, Y., Enoki, M., Sato, T., Kato, C., Kanehiro, H., 2011. Biodegradation of a liphatic polyesters soaked in deep seawaters and isolation of poly(-caprolactone)-degrading bacteria. Polymer Degradation and Stability 96, 1397–1403. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> polymdegradstab.2011.03.004

Setälä, O., Fleming-Lehtinen, V., Lehtiniemi, M., 2014. Ingestion and transfer of microplastics in the planktonic food web. Environmental Pollution 185, 77–83. <u>https://</u> <u>doi.org/10.1016/j.envpol.2013.10.013</u>

Setälä, O., Magnusson, K., Lehtiniemi, M., Norén, F., 2016. Distribution and abundance of surface water microlitter in the Baltic Sea: A comparison of two sampling methods. Marine Pollution Bulletin 110, 177–183. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> <u>marpolbul.2016.06.065</u>

Sevillano-González, M., González-Sálamo, J., Díaz-Peña, F.J., Hernández-Sánchez, C., Catalán Torralbo, S., Ródenas Seguí, A., Hernández-Borges, J., 2022. Assessment of microplastic content in Diadema africanum sea urchin from Tenerife (Canary Islands, Spain). Marine Pollution Bulletin 175, 113174. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> <u>marpolbul.2021.113174</u>

Sewwandi, M., Hettithanthri, O., Egodage, S.M., Amarathunga, A.A.D., Vithanage, M., 2022. Unprecedented marine microplastic contamination from the X-Press Pearl container vessel disaster. Science of The Total Environment 828, 154374. <u>https://doi.</u> org/10.1016/j.scitotenv.2022.154374

Shalom, J., Mazlan, N., Universiti Malaysia Sabah, Jannah, M., Universiti Malaysia Sabah, Saud, S.N., Management and Science University, Ong, M.C., Universiti Malaysia Terengganu, 2022. Microplastics in marine benthic feeder: a review on the ocurrence, routes of ingestion, method of extraction and effects to the ecosystem. JSSM 17, 179–199. <u>https://doi.org/10.46754/</u> jssm.2022.05.015

Sheavly, S.B., Register, K.M., 2007. Marine Debris & Plastics: Environmental Concerns, Sources, Impacts and Solutions. J Polym Environ 15, 301–305. <u>https://doi.</u> org/10.1007/s10924-007-0074-3

Simon, M., van Alst, N., Vollertsen, J., n.d. Quantification of microplastic mass and removal rates at wastewater treatment plants applying Focal Plane Array (FPA)-based Fourier Transform Infrared (FT-IR) imaging. Water Research. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> watres.2018.05.019

Simul Bhuyan, Md., S., V., S., S., Szabo, S., Maruf Hossain, Md., Rashed-Un-Nabi, Md., C.r., P., M.p., J., Shafiqul Islam, Md., 2021. Plastics in marine ecosystem: A review of their sources and pollution conduits. Regional Studies in Marine Science 41, 101539. <u>https://</u> <u>doi.org/10.1016/j.rsma.2020.101539</u>

Song, Y.K., Hong, S.H., Eo, S., Jang, M., Han, G.M., Isobe, A., Shim, W.J., 2018. Horizontal and Vertical Distribution of Microplastics in Korean Coastal Waters. Environ. Sci. Technol. 52, 12188–12197. <u>https://</u> doi.org/10.1021/acs.est.8b04032

Song, Y.K., Hong, S.H., Jang, M., Han, G.M., Rani, M., Lee, J., Shim, W.J., 2015. A comparison of microscopic and spectroscopic identification methods for analysis of

- REFERENCIAS -

microplastics in environmental samples. Marine Pollution Bulletin 93, 202–209. <u>https://</u> doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.01.015

Song, Y.K., Hong, S.H., Jang, M., Kang, J.-H., Kwon, O.Y., Han, G.M., Shim, W.J., 2014. Large Accumulation of Micro-sized Synthetic Polymer Particles in the Sea Surface Microlayer. Environ. Sci. Technol. 48, 9014– 9021. https://doi.org/10.1021/es501757s

STAP, 2011. Marine Debris as a Global Environmental Problem. Introducing a solutions based framework focused on plastic. A STAP information document. (A STAP Information Document.), Scientific and Technical Advisory Panel. UNEP, Global Environment Facility, Washington, D.C.

Steer, M., Cole, M., Thompson, R.C., Lindeque, P.K., 2017. Microplastic ingestion in fish larvae in the western English Channel. Environmental Pollution 226, 250–259. *https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.03.062*

Steffen, W., Richardson, K., Rockström, J., Cornell, S.E., Fetzer, I., Bennett, E.M., Biggs, R., Carpenter, S.R., Vries, W. de, Wit, C.A. de, Folke, C., Gerten, D., Heinke, J., Mace, G.M., Persson, L.M., Ramanathan, V., Reyers, B., Sörlin, S., 2015. Planetary boundaries: Guiding human development on a changing planet. Science 347. <u>https://doi.org/10.1126/</u> science.1259855

Stock, F., Kochleus, C., Bänsch-Baltruschat, B., Brennholt, N., Reifferscheid, G., 2019. Sampling techniques and preparation methods for microplastic analyses in the aquatic environment – A review. TrAC Trends in Analytical Chemistry 113, 84–92. <u>https://doi.</u> org/10.1016/j.trac.2019.01.014

Suaria, G., Achtypi, A., Perold, V., Lee, J.R., Pierucci, A., Bornman, T.G., Aliani, S., Ryan, P.G., 2020. Microfibers in oceanic surface waters: A global characterization. Science Advances 6, eaay8493. <u>https://doi.</u> org/10.1126/sciadv.aay8493

Suaria, G., Aliani, S., 2014. Floating debris in the Mediterranean Sea. Marine Pollution Bulletin 86, 494–504. <u>https://doi.</u> org/10.1016/j.marpolbul.2014.06.025

Suteja, Y., Atmadipoera, A.S., Riani, E., Nurjaya, I.W., Nugroho, D., Cordova, M.R., 2021. Spatial and temporal distribution of microplastic in surface water of tropical estuary: Case study in Benoa Bay, Bali, Indonesia.Mar.Pollut.Bull.163,111979.<u>https://</u> doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.111979

Suteja, Y., Atmadipoera, A.S., Riani, E., Nurjaya, I.W., Nugroho, D., Purwiyanto, A.I.S., 2021. Stranded marine debris on the touristic beaches in the south of Bali Island, Indonesia: The spatiotemporal abundance and characteristic. Marine Pollution Bulletin 173, 113026. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> <u>marpolbul.2021.113026</u>

Sánchez-Almeida, R., Hernández-Sánchez, C., Villanova-Solano, C., Díaz-Peña, F.J., Clemente, S., González-Sálamo, J., González-Pleiter, M., Hernández-Borges, J., 2022. Microplastics Determination in Gastrointestinal Tracts of European Sea Bass (Dicentrarchus labrax) and Gilt-Head Sea Bream (Sparus aurata) from Tenerife (Canary Islands, Spain). Polymers 14, 1931. <u>https://doi.</u> org/10.3390/polym14101931

Sönmez, V.Z., Akarsu, C., Cumbul Altay, M., Sivri, N., 2022. Extraction, Enumeration, and Identification Methods for Monitoring Microplastics in the Aquatic Environment, in: Hashmi, M.Z. (Ed.), Microplastic Pollution: Environmental Occurrence and Treatment Technologies, Emerging Contaminants and Associated Treatment Technologies. Springer International Publishing, Cham, pp. 21–66. <u>https://doi.org/10.1007/978-3-030-89220-3_2</u>

Takada, H., 2006. Call for pellets! International Pellet Watch Global Monitoring of POPs using beached plastic resin pellets. Marine Pollution Bulletin 52, 1547–1548. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> <u>marpolbul.2006.10.010</u>

Tamminga, M., Stoewer, S.-C., Fischer, E.K., 2019. On the representativeness of pump water samples versus manta sampling in microplastic analysis. Environ. Pollut. 254, 112970. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> <u>envpol.2019.112970</u>

Taylor, M.L., Gwinnett, C., Robinson, L.F., Woodall, L.C., 2016. Plastic microfibre ingestion by deep-sea organisms. Scientific Reports 6, 33997. <u>https://doi.org/10.1038/</u> <u>srep33997</u>

Tejedor-Junco, M.T., Díaz, V.C., González-Martín, M., Tuya, F., 2021. Presence of microplastics and antimicrobial-resistant bacteria in sea cucumbers under different anthropogenic influences in Gran Canaria (Canary Islands, Spain). Marine Biology

Research 17, 537–544. <u>https://doi.org/10.1080</u> /17451000.2021.1990960

Ter Halle, A., Ladirat, L., Martignac, M., Mingotaud, A.F., Boyron, O., Perez, E., 2017. To what extent are microplastics from the open ocean weathered? Environ Pollut 227, 167–174. *https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.04.051*

Teuten, E.L., Rowland, S.J., Galloway, T.S., Thompson, R.C., 2007. Potential for Plastics to Transport Hydrophobic Contaminants. Environ. Sci. Technol. 41, 7759–7764. <u>https://</u> doi.org/10.1021/es071737s

Teuten, E.L., Saquing, J.M., Knappe, D.R.U., Barlaz, M.A., Jonsson, S., Björn, A., Rowland, S.J., Thompson, R.C., Galloway, T.S., Yamashita, R., Ochi, D., Watanuki, Y., Moore, C., Viet, P.H., Tana, T.S., Prudente, M., Boonyatumanond, R., Zakaria, M.P., Akkhavong, K., Ogata, Y., Hirai, H., Iwasa, S., Mizukawa, K., Hagino, Y., Imamura, A., Saha, M., Takada, H., 2009. Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci. 364, 2027–2045. <u>https://doi. org/10.1098/rstb.2008.0284</u>

Thiel, M., Hinojosa, I.A., Miranda, L., Pantoja, J.F., Rivadeneira, M.M., Vásquez, N., 2013. Anthropogenic marine debris in the coastal environment: A multi-year comparison between coastal waters and local shores. Marine Pollution Bulletin 71, 307–316. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> <u>marpolbul.2013.01.005</u>

Thiele, C.J., Hudson, M.D., Russell, A.E., 2019. Evaluation of existing methods to extract microplastics from bivalve tissue: Adapted KOH digestion protocol improves filtration at single-digit pore size. Mar. Pollut. Bull. 142, 384–393. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> marpolbul.2019.03.003

Thompson, R.C., 2006. Plastic debris in the marine environment: Consequences and solutions., in: Marine Nature Conservation in Europe. Proceedings of the Sympossium, May 2006. J. C. Krause, H. von Nordheim, & S. Bräger (Eds.). Federal Agency for Nature Conservation, Stralsund, Germany, pp. 107– 115.

Thompson, R.C., 2015. Microplastics in the Marine Environment: Sources, Consequences and Solutions, in: Bergmann, M., Gutow, L., Klages, M. (Eds.), Marine Anthropogenic Litter. Springer International Publishing, Cham, pp. 185–200. <u>https://doi.</u> org/10.1007/978-3-319-16510-3_7

Thompson, R.C., Moore, C.J., Saal, F.S. vom, Swan, S.H., 2009. Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences 364, 2153–2166. <u>https:// doi.org/10.1098/rstb.2009.0053</u>

Thompson, R.C., Olsen, Y., Mitchell, R.P., Davis, A., Rowland, S.J., John, A.W.G., McGonigle, D., Russell, A.E., 2004. Lost at Sea: Where Is All the Plastic? Science 304, 838. <u>https://doi.org/10.1126/science.1094559</u>

Tokai, T., Uchida, K., Kuroda, M., Isobe, A., 2021. Mesh selectivity of neuston nets for microplastics. Mar. Pollut. Bull.

165, 112111. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> marpolbul.2021.112111

Topçu, E.N., Tonay, A.M., Dede, A., Öztürk, A.A., Öztürk, B., 2013. Origin and abundance of marine litter along sandy beaches of the Turkish Western Black Sea Coast. Mar Environ Res 85, 21–28. <u>https://doi.</u> org/10.1016/j.marenvres.2012.12.006

Tosin, M., Weber, M., Siotto, M., Lott, C., Innocenti, F.D., 2012. Laboratory Test Methods to Determine the Degradation of Plastics in Marine Environmental Conditions. Front. Microbio. <u>https://doi.org/10.3389/</u> <u>fmicb.2012.00225</u>

Tourinho, P.S., Ivar do Sul, J.A., Fillmann, G., 2010. Is marine debris ingestion still a problem for the coastal marine biota of southern Brazil? Marine Pollution Bulletin 60, 396–401. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> marpolbul.2009.10.013

Tu, C., Zhou, Q., Zhang, C., Liu, Y., Luo, Y., 2020. Biofilms of Microplastics, in: He, D., Luo, Y. (Eds.), Microplastics in Terrestrial Environments: Emerging Contaminants and Major Challenges, The Handbook of Environmental Chemistry. Springer International Publishing, Cham, pp. 299–317. https://doi.org/10.1007/698_2020_461

UNEP & NOAA, 2018. Sixth international marine debris conference proceedings. United Nations Environment Programme & National Oceanic and Atmospheric Administration, San Diego.

Unger, B., Rebolledo, E.L.B., Deaville, R., Gröne, A., IJsseldijk, L.L., Leopold, M.F., Siebert, U., Spitz, J., Wohlsein, P., Herr, H., 2016. Large amounts of marine debris found in sperm whales stranded along the North Sea coast in early 2016. Marine Pollution Bulletin 112, 134–141. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> <u>marpolbul.2016.08.027</u>

Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) (Ed.), 2020. Laista roja de las especies amenazadas de la UICN. Völker, C., Kramm, J., Wagner, M., 2020. On the Creation of Risk: Framing of Microplastics Risks in Science and Media. Global Challenges 4, 1900010. <u>https://doi.</u> org/10.1002/gch2.201900010

Uyarra, M.C., Borja, Á., 2016. Ocean literacy: A"new" socio-ecological concept for a sustainable use of the seas. Marine Pollution Bulletin 104, 1–2. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> <u>marpolbul.2016.02.060</u>

Vaid, M., Mehra, K., Gupta, A., 2021. Microplastics as contaminants in Indian environment: a review. Environ Sci Pollut Res 28, 68025–68052. <u>https://doi.org/10.1007/</u> <u>\$11356-021-16827-6</u>

Van Cauwenberghe, L., Devriese, L., Galgani, F., Robbens, J., Janssen, C.R., 2015. Microplastics in sediments: A review of techniques, occurrence and effects. Marine Environmental Research, Particles in the Oceans: Implication for a safe marine environment 111, 5–17. <u>https://doi.</u> org/10.1016/j.marenvres.2015.06.007

Van Cauwenberghe, L., Vanreusel, A., Mees, J., Janssen, C.R., 2013. Microplastic pollution in deep-sea sediments. Environmental Pollution 182, 495–499. *https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.08.013*

van Sebille, E., Aliani, S., Law, K.L., Maximenko, N., Alsina, J.M., Bagaev, A., Bergmann, M., Chapron, B., Chubarenko, I., Cózar, A., Delandmeter, P., Egger, M., Fox-Kemper, B., Garaba, S.P., Goddijn-Murphy, L., Hardesty, B.D., Hoffman, M.J., Isobe, A., Jongedijk, C.E., Kaandorp, M.L.A., Khatmullina, L., Koelmans, A.A., Kukulka, T., Laufkötter, C., Lebreton, L., Lobelle, D., Maes, C., Martinez-Vicente, V., Magueda, M.A.M., Poulain-Zarcos, M., Rodríguez, E., Ryan, P.G., Shanks, A.L., Shim, W.J., Suaria, G., Thiel, M., Bremer, T.S. van den, Wichmann, D., 2020. The physical oceanography of the transport of floating marine debris. Environ. Res. Lett. 023003. https://doi.org/10.1088/1748-15, 9326/ab6d7d

van Wijnen, J., Ragas, A.M.J., Kroeze, C., 2019. Modelling global river export of microplastics to the marine environment: Sources and future trends. Science of The Total Environment 673, 392–401. <u>https://doi.</u> org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.078

Veerasingam, S., Ranjani, Μ., Venkatachalapathy, R., Bagaev, Α., Mukhanov, V., Litvinyuk, D., Verzhevskaia, L., Guganathan, L., Vethamony, P., 2020. Microplastics in different environmental compartments in India: Analytical methods, distribution. associated contaminants and research needs. TrAC Trends in Analytical Chemistry 133, 116071. https://doi. org/10.1016/j.trac.2020.116071

Veiga, J.M., Vlachogianni, T., Pahl, S., Thompson, R.C., Kopke, K., Doyle, T.K., Hartley, B.L., Maes, T., Orthodoxou, D.L., Loizidou, X.I., Alampei, I., 2016. Enhancing public awareness and promoting coresponsibility for marine litter in Europe: The challenge of MARLISCO. Marine Pollution Bulletin 102, 309–315. <u>https://doi.</u> org/10.1016/j.marpolbul.2016.01.031

Verlis, K.M., Campbell, M.L., Wilson, S.P., 2013. Ingestion of marine debris plastic by the wedge-tailed shearwater Ardenna pacifica in the Great Barrier Reef, Australia. Marine Pollution Bulletin 72, 244–249. <u>https://</u> doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.03.017

Vermaire, J.C., Pomeroy, C., Herczegh, S.M., Haggart, O., Murphy, M., 2017. Microplastic abundance and distribution in the open water and sediment of the Ottawa River, Canada, and its tributaries. FACETS 2, 301–314. <u>https://doi.org/10.1139/</u> facets-2016-0070

Verne, J., 1869. Veinte mil leguas de viaje submarino, 1st ed. Establecimiento tipográfico Tomás Rey y Cía., Madrid.

Vianello, A., Boldrin, A., Guerriero, P., Moschino, V., Rella, R., Sturaro, A., Da Ros, L., 2013. Microplastic particles in sediments of Lagoon of Venice, Italy: First observations on occurrence, spatial patterns and identification. Estuarine, Coastal and Shelf Science, Pressures, Stresses, Shocks and Trends in Estuarine Ecosystems 130, 54–61. *https://doi.org/10.1016/j.ecss.2013.03.022*

Viehman, S., Vander Pluym, J.L., Schellinger, J., 2011. Characterization of marine debris in North Carolina salt marshes. Marine Pollution Bulletin 62, 2771–2779. <u>https://doi.</u> org/10.1016/j.marpolbul.2011.09.010 Villanova-Solano, C., Díaz-Peña, F.J., Hernández-Sánchez, C., González-Sálamo, J., González-Pleiter, M., Vega-Moreno, D., Fernández-Piñas, F., Fraile-Nuez, E., Machín, F., Hernández-Borges, J., 2022. Microplastic pollution in sublittoral coastal sediments of a North Atlantic island: The case of La Palma (Canary Islands, Spain). Chemosphere 288, 132530. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> chemosphere.2021.132530

Vlietstra, L.S., Parga, J.A., 2002. Longterm changes in the type, but not amount, of ingested plastic particles in short-tailed shearwaters in the southeastern Bering Sea. Marine Pollution Bulletin 44, 945–955. <u>https://</u> doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00130-3

Walker, W.A., Coe, J.M., 1989. Survey of marine debris ingestion by odontocete cetaceans, in: Proceedings of the 2nd International Conference on Marine Debris. R.S. Shomura and M.L. Godfrey, Honolulu, Hawaii, pp. 747–774.

Waller, C.L., Griffiths, H.J., Waluda, C.M., Thorpe, S.E., Loaiza, I., Moreno, B., Pacherres, C.O., Hughes, K.A., 2017. Microplastics in the Antarctic marine system: An emerging area of research. Science of The Total Environment 598, 220–227. <u>https://doi.</u> org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.283

Wang, J., Tan, Z., Peng, J., Qiu, Q., Li, M., 2016. The behaviors of microplastics in the marine environment. Marine Environmental Research 113, 7–17. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> *marenvres.2015.10.014* Watts, A., Urbina, M., Lewis, C., Galloway, T., 2017. Primary (Ingestion) and Secondary (Inhalation) Uptake of Microplastic in the Crab Carcinus maenas, and Its Biological Effects, in: Fate and Impact of Microplastics in Marine Ecosystems. Elsevier, p. 38. <u>https://</u> doi.org/10.1016/B978-0-12-812271-6.00038-7

Werner, S., Budziak, A., Franeker, J. van, Galgani, F., Hanke, G., Maes, T., Matiddi, M., Nilsson, P., Oosterbaan, L., Priestland, E., Thompson, R., Veiga, J., Vlachogianni, T., 2016. Harm caused by Marine Litter: MSFD GES TG Marine Litter - thematic report.

Wesch, C., Bredimus, K., Paulus, M., Klein, R., 2016. Towards the suitable monitoring of ingestion of microplastics by marine biota: A review. Environmental Pollution 218, 1200–1208. <u>https://doi.</u> org/10.1016/j.envpol.2016.08.076

Williams, A.T., Simmons, S.L., 1997. Estuarine Litter at the River/Beach Interface in the Bristol Channel, United Kingdom. Journal of Coastal Research 13, 1159–1165.

Wilson, T.R.S., Harrison, A.J., 1975. Submerged-pump systems for underway monitoring at the sea surface, using a conventional STD or CTD unit. Deep Sea Research and Oceanographic Abstracts 22, 571–574. <u>https://doi.org/10.1016/0011-</u> 7471(75)90039-X

Woodall, L.C., Sanchez-Vidal, A., Canals, M., Paterson, G.L.J., Coppock, R., Sleight, V., Calafat, A., Rogers, A.D., Narayanaswamy, B.E., Thompson, R.C., 2014. The deep sea is a major sink for microplastic debris. R Soc Open Sci 1. <u>https://doi.org/10.1098/rsos.140317</u>

Wootton, N., Reis-Santos, P., Gillanders, B.M., 2021. Microplastic in fish – A global synthesis. Rev Fish Biol Fisheries 31, 753–771. *https://doi.org/10.1007/s11160-021-09684-6*

Wright, S.L., Thompson, R.C., Galloway, T.S., 2013. The physical impacts of microplastics on marine organisms: A review. Environmental Pollution 178, 483–492. *https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.02.031*

Xanthos, D., Walker, T.R., 2017. International policies to reduce plastic marine pollution from single-use plastics (plastic bags and microbeads): A review. Marine Pollution Bulletin 118, 17–26. <u>https://</u> doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.02.048

Xiong, X., Chen, X., Zhang, K., Mei, Z., Hao, Y., Zheng, J., Wu, C., Wang, K., Ruan, Y., Lam, P.K.S., Wang, D., 2018. Microplastics in the intestinal tracts of East Asian finless porpoises (Neophocaena asiaeorientalis sunameri) from Yellow Sea and Bohai Sea of China. Marine Pollution Bulletin 136, 55–60. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> <u>marpolbul.2018.09.006</u>

Zantis, L.J., Carroll, E.L., Nelms, S.E., Bosker, T., 2021. Marine mammals and microplastics: A systematic review and call for standardisation. Environmental Pollution 269, 116142. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> <u>envpol.2020.116142</u>

Zettler, E.R., Mincer, T.J., Amaral-Zettler, L.A., 2013. Life in the "plastisphere": microbial communities on plastic marine debris. Environ Sci Technol 47, 7137–7146. <u>https://doi.</u> org/10.1021/es401288x

Zettler, E.R., Takada, H., Monteleone, B., Mallos, N., Eriksen, M., Amaral-Zettler, L.A., 2017. Incorporating citizen science to study plastics in the environment. Anal. Methods 9, 1392–1403. https://doi.org/10.1039/C6AY02716D

Zhang, L., Xie, Y., Zhong, S., Liu, J., Qin, Y., Gao, P., 2021. Microplastics in freshwater and wild fishes from Lijiang River in Guangxi, Southwest China. Sci. Total Environ. 755, 142428. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142428

Zheng, Y., Li, J., Sun, C., Cao, W., Wang, M., Jiang, F., Ju, P., 2021. Comparative study of three sampling methods for microplastics analysis in seawater. Sci. Total Environ. 765, 144495. <u>https://</u> doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144495

Zhu, J., Yu, X., Zhang, Q., Li, Y., Tan, S., Li, D., Yang, Z., Wang, J., 2019. Cetaceans and microplastics: First report of microplastic ingestion by a coastal delphinid, Sousa chinensis. Science of The Total Environment 659, 649–654. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.389

Zitko, V., Hanlon, M., 1991. Another source of pollution by plastics: Skin cleaners with plastic scrubbers. Marine Pollution Bulletin 22, 41–42. *https://doi.org/10.1016/0025-326X(91)90444-W*

Zobkov, M.B., Esiukova, E.E., Zyubin, A.Y., Samusev, I.G., 2019. Microplastic content variation in water column: The observations employing a novel sampling tool in stratified Baltic Sea. Mar. Pollut. Bull. 138, 193–205. <u>https://</u> doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.11.047 . 4



-CAPÍTULO 10-

10

Anexos



Anexo 3.1 Póster presentado en el Simposio Internacional de Ciencias Marinas en el que se muestran algunos resultados obtenidos en el muestreo comparativo de microplásticos obtenidos a través del agua del sistema de circulación en contínuo del buque y de las botellas niskin de la roseta.

Underway water system of research vessels: waters oceanic for microplastic sampling in **Optimization of a method**

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

Tecnologías, Gestión y Biogeoquímica Ambié

Authors: Tania Montoto-Martínez.^{1*}, J.Joaquín Hernández-Brito, J.J.^{1,2} & M^a Dolores Gelado-Caballero.¹ (ULPGC) Grupo de investigación en Tecnologias, Gesti (2) Plataforma Oceánica de Canarias (PLOCAN)

Gobierno de Canarias

PLOCAN ***

INTRODUCTION:

Broad scale monitoring efforts and microplastic sampling in open oceanic waters are required to understand distribution, abundance and fate of these particles in the environment. For surface seawaters, towing a neuston net is the most common sampling method; however, the deployment of this infrastructure is not always an opportunity when at sea, and the underway water system of research vessels has been tried for this purpose in several studies to date. Method validation and recovery checks have not been thoroughly applied, which may be resulting in wrong estimations.

AIM:

ing.

Keywords:

The aim of this study is to validate the performance and effectiveness of this method, based on the inter-comparability of samples taken through the underway intake system and samples filtered from the Rosetta.

III

(Control) 200 L

derway Water System 200 L

system

00 L were obtained using the underway wi ship through a tap located at the wet lab. 00 L were collected from the Niskin boi sette Sampler.

- 200 L we the ship thr

Duc

Making use of an improved" filtering device (Fig.2), 400 L of subsurface seawater (=- 5 m) were filtered at each station:

2 x Inflow



ŝ

Time series in the Ocean is (ESTOC), and the Station: rom the PLOCAN Test Site re north-east of the island o a, in the Canary Island: (Spain), (Fig.1). periment was performed onbo earch Vessel Angeles Alvariño fferent stations: the Europe

ach sampling volume was acquired, the filtering devi sconnected and each mesh was washed to a screw to h MilliQ water. Back in the clean lab, each sample wi Millied onto glass microfiber filters of 0,7 micro and visual inspection under a stereoscope and cope up to 80X was performed.

We tested the method for its calibration and investigated abundance, distribution and type of small microplastics sampled from subsurface waters.

0

-

in C

as

tested onboard the R/V Sarmier ships of opportunity, such

(*) Previous designs were t de Gamboa and other recreational vessels [Fig.4].

ġ

300 µm 200 µm 50 µm 50 µm

x 4 St.: E, 1, X. ESTOC

The filtering device consists on four stacked sieves with me sizes of 300, 200, 100 and 50 microns. The design compris a lid -to prevent airbone contamination- and a flowmeter, ensure equal volume sampled in the different tri

RESULTS:

(urt) əzis yəəm

A total of 1730 L of subsurface water were sampled while testing two different intake methods for the microplastic sampling device operation.
Microplastic particles were found in all four stamples, either taken with the Rosetta Sampler or the Underway Intake [Fig. 5].
A total of 572 particles were identified, being the Rosetta Sampler or the Underway Intake [Fig. 5].
A total of 572 particles were identified, being the twest majority of them fibres (85%). The most particle concentration with up to 465 fibres per m³. [Fig. 6].
The majority of fragments found were black (64%), whereas blue fibres were the most abundant (36%), followed by black (28%), red (16%) and transparent, nylon-alike ones (13%) [Fig.7]

50

tibres & Fragments) found at the four mesh sizes (300, 200, 100, 50) and VS Underway System). Fig. 5 Particle concentration (Fil stations, according to different untake mode (Rosetta Sampler ^N

ation (E, I, X & ESTOC) with both intake meth tta Control Sampler, Right: abundance perce nd at each Str and (R) Rose per station. Fig. 6 Density of particles foun (U) Underway Intake System a each type of particle is shown r

È



CONCLUSION:

distribution of micr fied, by number & perc Fig. 7 Color particles identi

Caleur Back Back Back Bac Arapia Partia Versiov Versiov

St ESTOC

Stl. Rosotta

Stations For the for

Sampling methods standardization and validation are essential to ensure the intercomparability of the data reported in the different sampling efforts worldwide concerning distribution and abundance of microplastics in marine open waters environments.

DISCUSSION:

This preliminary study demonstrates the potential of the underway water intake system of ships as a method to sample microplastic particles in marine open water environments with vessels of opportunity. Although further trials are required to tast the effectiveness and significant difference among the abundance and type of microplastic particles collected using either the Rosetta or the Underway water system, it was been proved as an effective technique that allows continuous sampling without interfering the regular activity of the



ating vessel

Reported abundance in the subsurface ocean waters in the area studied is higher than the reported in other areas in the NE. Atlantic, including coastal areas. Color distribution is consistent with the proportions found

Methods used for identifying particles rely on visual observation assisted with optical microscope and could be omitting plastics. It is important to complement this method with other methods that might be in the detection of smaller particles and are beneficial to identify the polymer type and potential procedence.

J um mesh, B) Fibres fragment observed at croscope (20X), E) & F) ope (100X), oberved at 5 Fig. 8 A) Sever observed under 80X, D) White fr

The use of the underway water system of research vessels as a way of seawater uptake for the use of the filtration device has been proved efficient. This is an important step that allows its use in a wider array of opportunity platforms, such as recreational vessels, therefore increasing the observations at sea and the possibilities for ocean monitoring on microplastic pollution.

ing factor

and res

Furth

REFERENCES:

Enders, K. et al. (2015). Abundance, size and polymer composition of marine microplastics ≥10µm in the Atlantic Ocean and their modelled vertical distribution. Marine Pollution Bulletin, 100(1), 70-81. Lusher, A.L. et al. (2014). Microplastic pollution in the Northeast Atlantic Ocean: validated and opportunistic asympting. Marine Pollution Bulletin, 88(1-2), 325-333. Miller, M.E. et al. (2017) Recovering microplastic from marine samples: A review of current practices. Marine Pollution Bulletin, 123(11, 6.18)

ACKNOWLEDGEMENTS: The authors thank Amelia Redriguez, Read of the Archaeology Department at the ULPGC, for providing access to the microscope and Diego de Miguel-Murillo, CEO from the SailingLivingLab Project, for facilitating further trials of the sampling device onboard recreational vessels. The research work was performed and financed by the European Funds for Transnational Cooperation, through the MARCET Project (MAC/1,1b/149).





Anexo 3.2 Tabla comparativa de los métodos similares precedentes al desarrollo del sistema en el Capítulo 3.

	Pump power (kW)	ל. ני	N/A	$\frac{2}{3}$ \rightarrow not spec.		0,37		2,2							N/A		N/A	
	Mesh size(s) (microns)	250	250; 125; 62,5	←	250	300 – 10 (switched to 50 due to clogging)	300 or 100 (2 separate tests)	300 and 20							2000		N/A	
	Filtering device	Stainless steel sieve	Copper sieves	SSW directly passed under ressure, through a precombust ed glass fiber filter.	Covered stainless steel sieve	Polypropyle ne pipe modules	Stainless steel tubes and fittings with clamp filter								Metal sieve mesh for SML sampling		bucket sampling	
	Prefilter (mm)	Primary gauze (1 mm)	5 mm	° Z	2 mm	2	2	е С							No		Ñ	
	Samplin g depth (m)	ო	4,5	a	5	integral of 3 first meters	0 – 0,5 m (quite waters)								SML (150-400 microns)		0-0,3 m	
	Seawater (intake) supply	Operating pump aboard	SW Intake System of the vessel	SW Intake System of the vessel	Operating pump aboard	SW Intake System of the vessel	Operating pump aboard / electrically driven impeller pump								Direct hand sampling		measuring jug, bucket sampling	
	¿Platfor m on moveme nt?	Yes	N	° Z	Yes	Yes	Yes	No							No	No		
	Operating platform	RN	RN	Vessel	RN	RN	RN								From a boat, to sample SML	From a boat, to sample SML		
	Basin	Northeast Atlantic	NE Pacific Ocean	Antarctica	Atlantic Ocean	North Atlantic (atlantic open ocean and other regions)	Gulf of Finland	Rivers, Sweden					N/A WWT	N/A WWT	Coastal waters, South Korea	waters, South	Sweden	
	Keywords	Plastic, fibres, sub-surface, neuston, continuous monitoring.	British Columbia, Pacific Ocean, Microplastic, tsunami debris, Litter, Plastic	Microplastic, Sub-surface water, Ross Sea, FTIR, Antarctica	microplastic, sub-surface waters, upwelling, Atlantic Ocean, Marine debris	small microplastic, continuous monitoring, horizontal distribution, size-selective vertical distribution, model	Gulf of Finland, Litter, Monitoring, Surafce area, Manta trawl, Pump, microplastics			debris, detection, environment, marine environment, plastic, sampling, seawater, sediment, water	marine plastic pollution, FTIR, visual separation, density flotation, acid digestion, enzymatic digestion	microplastics, analytical method, sampling, identification, quantitation,	pollution monitoring, enginering	microplastic identification, synthetic fibres, treated waste water, enzymatic purification, FTIR spectroscopy, pollution	microplastics, identification, stereomicroscope, FT-IR microscope			
	Year	2014	2014	2017	2017	2015	2016	2016		2015	2017	2017 2018	2018	2017	2015	2014	2007	
	Reference	Lusher et al. (2014)	Desforges et al. (2014)	Cincinelli et al. (2017)	Kanhai et al. (2017)	Enders et al. (2015)	Setälä et al. (2016)	Durkin (2016	Magnusson and Noren	Rocha-Santos & Duarte (2015)	Miler et al. (2017)	Barrows (2017) Mai et al. (2018)	Lenz & Labrenz, 2018	Mintenig et al. (2017)	Song et al. (2015)	Song et al. (2014)	Noren 2007	
	Checked?	Yes	Yes	Yes (see supplementary material to see if there is more info on how she did it)	Yes	Yes	Yes		manta trial	Overview	Review	Review	No incluir en tabla WWT	No incluir en tabla WWT	No incluir en tabla SML	No incluir en tabla SML	Yes, bucket quite waters	





ANEXO 5.1 Relación de estudios de muestreo de microplásticos con redes de arrastre identificando si usan o no caudalímetro.

Esta tabla presenta los 35 estudios publicados durante el año 2021 en los que se investigaron los microplásticos en aguas superficiales mediante el muestreo con redes de arrastre especificando si utilizan o no un caudalímetro, y la forma en que obtienen el volumen muestreado.

Referencia	Caudalímetro	Volumen muestreado					
Aigars et al.	No	estimado					
Bertoldi et al.	No	estimado					
Bowman et al.	Sí	estimado					
Carlsson et al.	No	estimado					
Expósito et al.	No	estimación sin detalle					
Felismino et al.	No	estimado					
Hamilton et al.	No	estimado					
He et al.	No	estimado					
Jones et al.	Sí	estimado					
Kashiwabara et al.	Sí	estimado					
Li et al.	Sí	estimado					
Liang et al.	No	no reportado					
Liboiron et al.	Sí	no reportado					
Liu M. et al.	Sí	estimación sin detalle					
Liu Y. et al.	No	estimado					
Liu S. et al.	Sí	estimado					
Magni et al.	Sí	estimado					
Manbohi et al.	No	estimado					
Okuku et al.	Sí	no reportado					
Pan, Liu, Jiang et al.	Sí	estimado					
Pan, Liu, Sun et al.	Sí	estimado					
Reis de Carvalho et al.	Sí	estimado					
Rios-Mendoza et al.	Sí	estimado					
Ripken et al.	Sí	estimado					
Russel & Webster	Sí	estimado					
Sari et al.	No	no reportado					
Schmidt et al.	No	estimado					
Shiu et al.	Sí	estimado					
Smith et al.	Sí	estimado					
Suteja et al.	Sí	estimado					
Wu et al.	Sí	no reportado					
Xu et al.	Sí	estimación sin detalle					
Zaw et al.	Sí	estimado					
Zhang et al.	Sí	estimación sin detalle					
Zheng et al.	Sí	estimación sin detalle					

ANEXO 6.1 Protocolo para el estudio de microplásticos en el contenido gastrointestinal de cetáceos varados tal y como se recoge en el repositorio protocols.io.

 Jun 28, 2021
 Share

 Image: Straig S

ABSTRACT

Marine debris can impact biodiversity in a number of ways, and its effects may vary depending on the type and size of the debris and the organisms that encounter it [1]. Since the first evidence of a marine mammal's interaction with plastic intake, there have been a number of studies on this subject, together with alarming images of stomachs full of marine debris and a growing concern about it.

However, very little is known about the presence of microplastics in higher trophic level species such as cetaceans [2]. Up to more recently, they were primarly focused on the study of particles larger than 2.5 cm, and therefore failing to assess the microlitter presence, which remains a challenging task due to large gut content volumes and the difficulties of sampling following careful airborne contamination prevention protocols.

Working with stranded cetaceans (n=12), which represent a significant opportunity to study the interaction of marine fauna with plastic debris, we have validated a protocol for microplastic ingestion studies that serves to obtain samples from different multidisciplinary teams (i.e. veterinary and marine sciences schools), without interfering in the work of any of the parties.

The successful table set up used for the extraction of microplastic particles from the gastrointestinal contents was proofed advantageous and applicable by any research group that already counts with the necessary facilities to perform cetaceans autopsy analysis, fulfilling the harmonisation needs as explicated by Panti et al. [3].

This approach is fully compatible with necropsy protocol in cetaceans [4], and at the same time complies with the recommendations for reporting ingested plastics in marine megafauna [5]. The proposed workflow allows the collection of valuable data for different interdisciplinary research teams, aiming to harmonize data, facilitate large-scale comparisons of plastic ingestion and also give scientific basis to future conservation policies.

protocols.io

Citation: Tania Montoto-Martinez, Raquel Puig-Lozano, Nuno Marques, Antonio FernÃÅindez, JesÃźs De La Fuente, Maria Dolores

References:

1. Secretariat of the Convention on Biological Diversity and the Scientific and Technical Advisory Panel - GEF. Impacts of marine debris on biodiversity: current status

and potential solutions. Montreal; 2012. Available: http://www.deslibris.ca/ID/242832

2. Moore RC, Loseto L, Noel M, Etemadifar A, Brewster JD, MacPhee S, et al. Microplastics in beluga whales (Delphinapterus leucas) from the Eastern Beaufort Sea. Mar Pollut Bull. 2020;150: 110723. doi:10.1016/j.marpolbul.2019.110723

3. Panti C, Baini M, Lusher A, Hernandez-Milan G, Bravo Rebolledo EL, Unger B, et al. Marine litter: One of the major threats for marine mammals. Outcomes from the European Cetacean Society workshop. Environ Pollut. 2019;247: 72–79. doi:10.1016/j.envpol.2019.01.029

4. Kuiken T, García-Hartmann M, editors. Cetacean pathology: dissection techniques and tissue sampling. 1993. Available:

https://www.researchgate.net/publication/285819905_Cetacean_Dissection_techniq ues_and_tissue_sampling

5. Provencher JF, Bond AL, Avery-Gomm S, Borrelle SB, Rebolledo ELB, Hammer S, et al. Quantifying ingested debris in marine megafauna: a review and recommendations for standardization. Anal Methods. 2017;9: 1454–1469. doi:10.1039/C6AY02419J

DOI

dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bcfxitpn

PROTOCOL CITATION

Tania Montoto-Martinez, Raquel Puig-Lozano, Nuno Marques, Antonio Fernández, Jesús De La Fuente, Maria Dolores Gelado Caballero 2021. A protocol to address the study of microplastic intake in stranded cetaceans. **protocols.io**

https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bcfxitpn

MANUSCRIPT CITATION please remember to cite the following publication along with this protocol

ŀ

Tania Montoto-Martínez, Jesús De la Fuente, Raquel Puig-Lozano, Nuno Marques, Manuel Arbelo, José Joaquín Hernández-Brito, Antonio Fernández, María Dolores Gelado-Caballero, Microplastics, bisphenols, phthalates and pesticides in odontocete species in the Macaronesian Region (Eastern North Atlantic), Marine Pollution Bulletin, Volume 173, Part B, 2021, 113105, ISSN 0025-326X, https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.113105.

protocols.io

2

Citation: Tania Montoto-Martinez, Raquel Puig-Lozano, Nuno Marques, Antonio FernÃâ;ndez, JesÃâºs De La Fuente, Maria Dolores

KEYWORDS

microplastics, protocol, stranded cetaceans, necropsy, megafauna

LICENSE

This is an open access protocol distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited

IMAGE ATTRIBUTION

Acknowledgments: This work has been supported by a postgraduate research scholarship from the University of Las Palmas de Gran Canaria and carried out with funding from the European Regional Development Fund through the Madeira-Açores-Canarias Territorial Cooperation Operational Program (POMAC) 2014-2020 through the MARCET Project (MAC/1.1b/149).

CREATED

Feb 12, 2020

LAST MODIFIED Jun 28, 2021

PROTOCOL INTEGER ID 32983

GUIDELINES

The airborne contamination is proved to be reduced as the preventive methodology is improved, as it is recommended on the study of Norén and Naustvol (2010). That's why, we recommend to take into consideration the following common measures to prevent contamination of the samples during lab processing:

MATERIALS TEXT

MATERIALS

MilliQ water Contributed by users

Bistilled Water Contributed by users

KOH Potassium hydroxide Fisher Scientific

Slass microfibre filter (0.7 μm; GF/F ø=47 mm) Contributed by users

SAFETY WARNINGS

You will be working with Potassium Hydroxide, which is very corrosive and can cause severe skin burns and eye damage. Please, ensure you are using the appropriate lab protective equipment, including: googles, lab coat, vent hood and proper gloves.

protocols.io

3

Citation: Tania Montoto-Martinez, Raquel Puig-Lozano, Nuno Marques, Antonio Fern̉indez, Jes̼s De La Fuente, Maria Dolores

BEFORE STARTING

(i) Wear cotton clothes while manipulating the samples,

(ii) Clean all containers using distilled water prior to its reuse,

(iii) Perform blank controls filtering MilliQ water,

(iv) Place a clean petri dish with a filter paper close to the manipulation area to register possible airborne contamination.

(v) Cover all samples with aluminium foil after each single step and during the procedure.

2m

2m

Extraction of the digestive tract during the necropsy

After opening the thoracic cavity, locate the final part of the oesophagus (between both lungs) before passing through the diaphragm by the oesophageal hiatus. Separate a little bit of the connective tissue that holds it in place and with some string (or ties) make a tight and secure knot around this part of the oesophagus to seal it.

Repeat the procedure about five centimetres cranially and cut between the two knotted areas.

2 Subsequently, after block extraction of the thoracic organs, locate the proximal area of the ^{2m} oesophagus (after the laryngeal appendix) and seal as explained in the previous step.

Cut the sealed area skull and dissect it by carefully separating this first part of the digestive system.

- 3 Remove the oesophagus, rinse externally and set aside.
- 4 After opening the abdominal cavity, seal the final part of the intestine in the same way as ^{2m} explained for the oesophagus, by making two ligatures with a little string (or ties) around this intestinal portion.
- 5 Extract the gastrointestinal package in block and separate it from the rest of the structures (pancreas, spleen, mesenteric lymph node...).

Separate the stomach together with the duodenal ampulla from the rest of the intestine. To do this, we will seal the proximal part of the duodenum with two ligatures, leaving a space of about 5 cm between them by making a cut in the central area of this space.

Dissect carefully, separating the intestine from the mesentery.

Rinse the stomach and duodenal ampulla externally on one side and the intestinal package on the other.

Sample collection for anatomopathological, microbiological, parasitological, dietary and microplastic studies

Citation: Tania Montoto-Martinez, Raquel Puig-Lozano, Nuno Marques, Antonio FernÃâindez, JesÃâºs De La Fuente, Maria Dolores

4
6 <u>('</u>)

Throughout the procedure, and especially now that each of the gastrointestinal compartments is going to be opened, precautions to prevent contamination shall be taken.

Recommendations can be found at the "Guidelines & Warnings" section of this protocol.

7 🛕

A custom-made adaptation to the necropsy table was made to perform the following steps meeting the requirements for microplastic research. The drainage of the necropsy table was connected to a set of three stacked metal sieves (1000, 500 and 200 μ m) where the washed stomach contents were retained after thorough GIT rinses.

8 Empty the digestive content of each GIT section (oesophagus, stomach, duodenal ampulla, and intestine) into separate trays. Perform this step one by one so the contents exposure time is reduced. In between the different GIT sections inspections, clean the table thoroughly and place a new air control filter next to the operation area.

The steps described here correspond to the steps to be followed for each of the successive sections (esophagus, duodenal ampulla, stomach and intestines). The times indicated are the approximate sum of the performance of each action for the four compartments, even if they are done separately.

- 9 Rinse the inside of each section with filtrated water, taking care to leave all digestive traces on the trays.
- 10 Carry out the macroscopic examination of the different GIT sections and take samples for ^{12m} histopathology and, if necessary, for microbiology.
- 12 Wash the inside of the GIT sections with water, rubbing the mucous membranes thoroughly until all the digestive remains have been left on the trays.
- 12 Now, the digestive content will be retined in each of the sieves described above.

protocols.io

Citation: Tania Montoto-Martinez, Raquel Puig-Lozano, Nuno Marques, Antonio Fern̉indez, Jes̼s De La Fuente, Maria Dolores

5

- ANEXOS -

Sample	Sample treatment for the study of macrowaste, diet and parasites 12m			
13	Carry out a thorough observation and manual extraction of organic remains retained for $^{\rm 12m}$ observation and identification of diet.			
	The remains extracted will be introduced in an airtight container and stored in freezing at § -20 °C for their subsequent laboratory study.			
14	Carry out a thorough observation and manual extraction of parasites for observation and $^{12\mathrm{m}}$ identification.			
	The greatest number of parasites present will be collected in order to take a census of the parasite load, introducing them into different containers for each type of parasite and parasitized organ (oesophagus, stomach and duodenal ampulla, and intestine). They will be set in 70° alcohol, including the name of the organ where they were observed on the label. 870 ° Alcohol Contributed by users			
	Likewise, in all cases a parasitic load index (1 - 5) will be given in the organs where parasites appear:			
	 Mild: 1-10 parasites Moderate: 20-50 parasites Intermediate: 50-100 parasites High: 100-500 parasites Massive: more than 500 parasites 			
15	Carry out an exhaustive observation and manual extraction of the non-organic waste deposited on the 5mm sieve for the study of macro-waste.			
	The extracted residues will be introduced in containers differentiated for each organ (oesophagus, stomach and duodenal ampulla, and intestine) and will be stored in freezing at & -20 °C for their subsequent laboratory study.			
Sample	treatment for the study of microplastics 4m			
16	Check that the sieve has no traces of diet indicators (small otoliths, crystals, etc.) that may have been left behind.			
17	The filtered remains will be introduced into different containers for each organ (oesophagus, stomach and duodenal ampulla, and intestine) and will be stored in freezing at 8 -20 °C for			

protocols.io

6

Citation: Tania Montoto-Martinez, Raquel Puig-Lozano, Nuno Marques, Antonio FernÃÂindez, Jesús De La Fuente, Maria Dolores

- ANEXOS	-
----------	---

their subsequent laboratory study.				
Laboratory study of microplasticsics 2w 6d 12h 20m				
18 Following <i>Foekema et al. (2013)</i> protocol to remove organic material, prepare the digestion the stomach content of each of the GIT compartments, pouring it into a glass beaker, with triple the volume of KOH [M]10 % volume.	v 6d in of i			
19 Once the material is degraded, follow 2h 3	30m			
Seawater sample preparation for microplastic determination by Tania Montoto-Martinez, University of Las Palmas de Gran Canaria	\			
filtering the remains using a vacuum pump .				
We used Whatman® glass microfiber filters (Grade GF/F, 47 mm).				
19.1 Clean the glass beaker where your seawater sample is transfered: rinse it thoroughly three times with MilliQ water Contributed by users	2m e			
Note down the volume.				
19.2 Prepare the vacuum filtration system with a glass microfibre filter (0.7 μ m; GF/F ϕ =47 and filter the full volume.	^{15m} mm)			
19.3 Rinse the vacuum filtration system three times while it continues filtrating to the microfib filter, so no particles are left behind.	5m re			
19.4 Place the filter on a petri dish and let it $dry \ overnight$ in the oven at $\ \$ \ 60 \ ^{\circ}C$.	1d			
19.5 Observe the filter under a microscope . Take pictures and measures of the identified particles following Lusher et al (2014) guidel	10m ines.			
20 Dry the filters overnight at 8 60 °C.	12h			
protocols.io 7				

Citation: Tania Montoto-Martinez, Raquel Puig-Lozano, Nuno Marques, Antonio FernÃÂindez, Jesús De La Fuente, Maria Dolores

- ANEXOS -

Observe each filter under a microscope taking careful airbone contamination controls. 21 Take pictures and measures of the identified particles following Lusher et al (2014) guidelines.

4d

i protocols.io

Citation: Tania Montoto-Martinez, Raquel Puig-Lozano, Nuno Marques, Antonio FernÃâjndez, JesÃâºs De La Fuente, Maria Dolores

ANEXO 7.1 Fotografías de varias partículas analizadas mediante espectroscopía micro-Raman en el filtro de fibra de vidrio original, y una vez transferidas al filtro de policarbonato.

filtros fibra de vidrio



FILTROS POLICARBONATO



- ANEXOS -



FILTROS FIBRA DE VIDRIO FILTROS POLICARBONATO

ANEXO 7.2 Caracterización de dos fibras según sus espectros y el porcentaje de coincidencias devuelto por el Software Spectragryph en base a las librerías de espectros de referencia empleadas.



Identificada como PE – Dark Blue Fiber en ambas librerías.

B6







-CAPÍTULO 11-

11

Publicaciones

11.1 Publicaciones de la tesis doctoral

A) Artículos de la tesis publicados en revistas científicas

Comparison between the traditional Manta net and an innovative device for microplastic sampling in surface marine waters.

Montoto Martínez, Tania; Meléndez Díez, Carmen; Melían Ramírez, Abisai; Hernández Brito, José Joaquín; Gelado Caballero, María Dolores

Fecha de publicación: Diciembre, 2022

DOI: 10.1016/j.marpolbul.2022.114237

Revista: Marine Pollution Bulletin [ISSN 0025-326X], V 185, (Part A), 114237. Indicadores: SJR: 1,548 - Q1 // JCR: 5,553 - Q1 // SCIE // MIAR ICDS: 11,0

Microplastics, bisphenols, phthalates and pesticides in odontocete species in the Macaronesian Region (Eastern North Atlantic).

Montoto Martínez, Tania; De La Fuente Marquez, Jesus; Puig Lozano, Raquel Patricia; Marques, Nuno; Arbelo Hernández, Manuel Antonio

Fecha de publicación: Diciembre, 2021

DOI: 10.1016/j.marpolbul.2021.113105

Revista: Marine Pollution Bulletin [ISSN 0025-326X], v 173 (Part B), 113105. Indicadores: SJR: 1,548 - Q1 // JCR: 5,553 - Q1 // SCIE // MIAR ICDS: 11,0

Pump-underway ship intake: An unexploited opportunity for Marine Strategy Framework Directive (MSFD) microplastic monitoring needs on coastal and oceanic waters.

Montoto Martínez, Tania; Hernández Brito, José Joaquín; Gelado Caballero, María Dolores

Fecha de publicación: Marzo, 2020

DOI: 10.1371/journal.pone.0232744

Revista: PLoS ONE [ISSN 1932-6203], v. 15(5), e0232744.

Indicadores: SJR: 1,1 - Q1 // JCR: 2,776 - Q2 // SCIE // ERIH PLUS

B) Capítulos de libros

First Observations and Monitoring of Microplastics on Oceanic and Coastal Waters off the Canary Islands (Subtropical NE Atlantic).

Montoto Martínez, Tania; Hernández Brito, José Joaquín; Gelado Caballero, María Dolores

Fecha de publicación: 2020

DOI: 10.1007/978-3-030-45909-3

Localización: Proceedings of the 2nd International Conference on Microplastic Pollution in the Mediterranean Sea. Springer Water [ISSN 2364-6934] / Mariacristina Cocca, Emilia Di Pace, Maria Emanuela Errico, Gennaro Gentile, Alessio Montarsolo, Raffaella Mossotti, Maurizio Avella (eds.), p. 294-298

Indicadores: SPI: Q1

Experiences and potentiality of a continuous microplastic sampler: performance onboard opportunity vessels to increase oceanic sampling efforts.

Montoto Martínez, Tania; Hernández Brito, José Joaquín; Gelado Caballero, María Dolores

Fecha de publicación: 2018

Localización: Proceedings of the Microplastic Conference MICRO2018: Fate, and impact of microplastics. Knowledge, actions and solutions. [ISBN 978-84-09-06477-9] / Baztan J., Bergmann M., Carrasco A., Fossi C., Jorgensen B., Miguelez A., Pahl S., Thompson R.C., Vanderlinden J-P. (eds), 414pp. MSFS-RBLZ

C) Otros resultados de la investigación predoctoral:

a. Registro de la Propiedad Industrial e Intelectual:

MuMi: Muestreador de Microplásticos

Modelo de Utilidad 202100078 según la Resolución de Concesión de la Oficina Española de Patentes y Marcas (OEPM) del 21/09/2021 en la que se concede la solicitud, la cual puede consultarse en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial (BOPI) de fecha 27/09/2021, y a través del servicio de Consulta de Expedientes OEPM (CEO) de la web de la OEPM (*www.oepm.es*).

b. Premios:

Premio a la Mejor Invención de Estudiantes ULPGC protegida mediante derechos de propiedad industrial otorgado por la Cátedra Telefónica de la ULPGC 2022.

Nº de invención premiada: U 202100078

Título: "DISPOSITIVO DE MUESTREO DE MICRO-PLÁSTICOS"

Fecha de Concesión: 21/09/2021

c. Registro de Protocolos en repositorios internacionales:

A protocol to address the study of microplastic intake in stranded cetaceans **Montoto Martínez, Tania**; Puig-Lozano, Raquel; Marques, Nuno; Fernández, Antonio; De La Fuente, Jesús; Gelado Caballero, María Dolores.

Repositorio: protocols.io

DOI: dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bcfxitpn

Seawater sample preparation for microplastic determination Gelado Caballero, María Dolores; **Montoto Martínez, Tania**. Repositorio: protocols.io DOI: dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bcfyitpw

d. Informes científicos:

Basuras marinas, plásticos y microplásticos: orígenes, impactos y consecuencias de una amenaza global

Rojo-Nieto, Elisa; **Montoto Martínez, Tania** Informe de Ecologistas en Acción. ISBN: 978-84-946151-9-1 Fecha de publicación: 2017

11.2 Difusión de resultados de investigación predoctoral:

A) Pósters de congresos

Microplastics and organic persistent contaminants in odontocete species: evident exposure, but not correlated.

Montoto Martínez, Tania; De La Fuente Marquez, Jesus; Puig Lozano, Raquel Patricia; Marques, Nuno; Arbelo Hernández, Manuel Antonio

Congreso: BAMAR - 11 International Workshop on Marine Litter. Las Palmas de Gran Canaria (España). Fecha: Julio, 2022.

Looking at the MACRO is no longer enough: A protocol to address the study of microplastic intake in stranded cetaceans

Montoto Martínez, Tania; De La Fuente Marquez, Jesus; Puig Lozano, Raquel; Marques, Nuno; Fernández Rodríguez, Antonio Jesús

Congreso: MICRO2020. Fate and Impacts of Microplastics: Knowledge and Responsibilities. Lanzarote (España). Fecha: Noviembre 2020.

MARCET Project: International and Multidisciplinary Network for the conservation of cetaceans and the promotion of a sustainable tourism associated with whale watching activity in the Macaronesian waters

De La Fuente Marquez, Jesus; Arbelo Hernández, Manuel Antonio; Gelado Caballero, María Dolores; **Montoto Martínez, Tania**; Galván González, Blas José

Congreso: 32nd Annual Conference of the European Cetacean Society. Italia. Fecha: 2020.

First observations and monitoring of microplastics on oceanic and coastal waters off the Canary Islands (Subtropical NE Atlantic)

Montoto Martínez, Tania; Hernández Brito, José Joaquín; Gelado Caballero, María Dolores

Congreso: 2nd International Conference on Microplastic Pollution in the Mediterranean Sea (ICMPMS 2019). Capri (Italia). Fecha: Octubre, 2019

Underway water system of research vessels: Optimization of a method for microplastic sampling in oceanic waters.

Montoto Martínez, Tania; Hernández Brito, José Joaquín; Gelado Caballero, María Dolores

Congreso: Simposio Internacional de Ciencias Marinas (ISMS) Vigo (España). Fecha: 2018.

B) Ponencias en congresos

MuMi–(Mu)estreador de (Mi)croplásticos.

Montoto Martínez, Tania

Congreso: SUMA 2021. Encuentro de I+D+i Universidad Empresa. Las Palmas de Gran Canaria (España). Fecha: 2021

Libres de macroplásticos y llenos de microfibras: Resultados del desarrollo de un protocolo para el examen de la ingestión de microplásticos en cetáceos.

Montoto Martínez, Tania; de la Fuente Marquez, J.; Puig Lozano, et al. (2021) Congreso: XII Congreso Sociedad Española de Cetáceos (SEC) [online] Fecha: 2021

Characterization of microplastics in the gastrointestinal tract as well as phthalates and bisphenols in skeletal muscle of stranded cetaceans in the Macaronesian region **Montoto Martínez, Tania**; de la Fuente Marquez, J.; Puig Lozano, et al. (2020)

Congreso: BAMAR – Workshop on Marine Debris - VII International Symposium on Marine Sciences (ISMS 2020) . Barcelona (España) [Online]

Pump-underway ship intake: an opportunity for Marine Strategy Framework Directive (MSFD) monitoring needs. First observations of microplastics on oceanic and coastal waters off the Canary Islands.

Montoto Martínez, Tania; Hernández Brito, José Joaquín; Gelado Caballero, María Dolores (2019)

Congreso: II International Congress of Young Marine Researchers. Book of Abstracts. p. 78-80. Málaga - España.

Experiences and potentiality of a continuous microplastic sampler: performance onboard opportunity vessels to increase oceanic sampling efforts.

Montoto Martínez, Tania; Hernández Brito, José Joaquín; Gelado Caballero, María Dolores (2018)

Congreso: MICRO2018: Fate and Impact of Microplastics: Knowledge, Actions and Solutions. Lanzarote – España.

Characterization of microplastics in the gastrointestinal tract as well as phthalates and bisphenols in skeletal muscle of stranded cetaceans in the Macaronesian Region.

Montoto Martínez, Tania; Hernández Brito, José Joaquín; Gelado Caballero, María Dolores (2018)

Congreso: SIQUIMAR (Simposio Internacional de Ciencias Marinas (ISMS) Vigo (España).

11.3 Participación en otros eventos

MARCET Project, an opportunity for microplastic research in the Macaronesian Region.

Montoto Martínez, Tania.

Congreso: MARLICE, Foro internacional sobre Basuras Marinas y Economía Circular. Sevilla (España). Abril, 2019.

Muestreador de Microplásticos (MuMi): Modelo de Utilidad Montoto Martínez, Tania.

Congreso: Patents Week. Las Palmas de Gran Canaria (España). Octubre, 2018.

Comité Organizador y Moderadora de un Panel en la Conferencia MICRO2018: Fate and Impact of Microplastics: Knowledge, Actions and Solutions. Lanzarote, 19-23 Noviembre, 2018.

Coordinadora Científica del Proyecto de I+D "La Acidificación marina: Océanos más ácidos, conchas más frágiles", del Vicerrectorado de Investigación, Desarrollo e Innovación de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, enmarcado en el "Campus de la Ciencia y la Tecnología de Canarias", en el Eje Energía Biodiversidad y Medio Ambiente, desde el 27 de junio al 8 de julio de 2016.

Colaboradora del evento de divulgación científica Macaronight, la noche de los investigadores. 27 de septiembre de 2019.

Ponencia en el Ciclo de charlas denominado "Café Conciencia", la cual se enmarca dentro del Proyecto UniPlanet, financiado por el Gobierno de Canarias. 5 de febrero de 2020.

11.4 Otras publicaciones

Motivations and concerns of early career marine researchers Montoto Martínez, Tania; OYSTER Euromarine Working Group

Tipo de publicación: póster

Congreso: VII International Symposium on Marine Sciences ISMS. Barcelona (España)-Julio, 2020.

Microplastic ingestion by Atlantic chub mackerel (Scomber colias) in the Canary Islands coast

Herrera, A.; Ŝtindlová, A.; Martínez, I.; Rapp Cabrera, J.; Romero-Kutzner, V., Samper, M.D., Montoto Martínez, Tania; Aguiar González, M.B. Borja; Packard, T., Gómez, M.

Tipo de publicación: artículo científico.

DOI: 10.1016/j.marpolbul.2018.12.022

Revista: Marine Pollution Bulletin [ISSN 0025-326X], v. 139, p. 127-135 (2019).

Indicadores: SJR: 1,27 - Q1 // JCR: 4,049 - Q1 // SCIE

Strandings of cetaceans and sea turtles in the Alboran Sea and Strait of Gibraltar: A long-term glimpse at the north coast (Spain) and the south coast (Morocco)

Rojo-Nierto, Elisa; Álvarez, Pablo; Morote, Elvira; Burgos, Macarena; **Montoto Martínez, Tania**

Tipo de publicación: artículo científico

Revista: Animal Biodiversity and Conservation [ISSN 1578-665X], v. 34 (1), p. 151-163 (2011). Indicadores: SJR: 0,271 - Q3 // Sello FECYT SCIE

Influence of ocean acidification and deep water upwelling on oligotrophic plankton communities in the subtropical North Atlantic: Insights from an in situ mesocosm study

Taucher, J.; Bach, L.T.; Boxhammer, T.; Nauendorf, A.; Achterberg, E. P., et al.

Tipo de publicación: artículo científico

DOI: 10.3389/fmars.2017.00085

Revista: Frontiers in Marine Science [ISSN 2296-7745], v. 4, article number 85 (2017) Indicadores: SJR: 1,225 - Q1 // SCIE





se producen más de 300 millones de toneladas de plástico al año en todo el mundo, sin que se vislumbre una disminución (Plastics Europe, 2022). La investigación sobre microplásticos lleva creciendo exponencialmente durante décadas, e incluso desplazando problemas ambientales globales tan trascendentales como el Cambio Climático (Borja and Elliott, 2019a). Las posibilidades de estudio en este campo son tan vastas como el medio marino, ciñéndose esta tesis en su aporte de conocimiento a tres áreas precisas:

El muestreo de microplásticos en aguas superficiales marinas, monitorización mediante un artefacto de muestreo para barcos con toma de agua marina en continuo y diseño y registro como Modelo de Utilidad de un dispositivo de muestreo de microplásticos (MuMi) para embarcaciones más pequeñas, a bordo de las que se realizó un estudio comparativo.

El estudio de la ingesta de microplásticos por cetáceos y el análisis de la posible relación con los niveles de Contaminantes Orgánicos Persistentes en sus tejidos, desarrollando un protocolo que permite actuar a los equipos multidisciplinares de las áreas de veterinaria y ciencias del mar ante el estudio de los contenidos gastrointestinales de cetáceos varados.

El acercamiento a la espectroscopía micro-Raman para la identificación de la huella química de los microplásticos muestreados mediante la exploración de las limitaciones producidas, fundamentalmente, por la fluorescencia, los pigmentos o el deterioro ambiental a través de tres casos ilustrativos, resultando en la idoneidad la creación de una librería de espectros de referencia propia.