

Trabajo de Fin de Máster



Máster en Biotecnología Avanzada

Evaluación ecotoxicológica de contaminantes orgánicos y microplásticos mediante bioensayos de supervivencia con el copépodo marino *Acartia clausi*

Ecotoxicological evaluation of organic pollutants and microplastics by survival bioassays with the marine copepod *Acartia clausi*

Avaliación ecotoxicolóxica de contaminantes orgánicos e microplásticos mediante bioensaiois de supervivencia co copépodo mariño *Acartia clausi*

Sara López Ibáñez



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Febrero de 2018

Evaluación ecotoxicológica de contaminantes orgánicos y microplásticos mediante bioensayos de supervivencia con el copépodo marino *Acartia clausi*

Ecotoxicological evaluation of organic pollutants and microplastics by survival bioassays with the marine copepod *Acartia clausi*

Avaliación ecotoxicolóxica de contaminantes orgánicos e microplásticos mediante bioensaíos de supervivencia co copépedo mariño *Acartia clausi*

Autora:

Sara López Ibáñez

Centro de realización:

Estación de Ciencias Marinas de Toralla (ECIMAT), Universidad de Vigo

Centro de presentación:

Facultad de Ciencias, Universidad de A Coruña

D. Ricardo Beiras García-Sabell (Catedrático de Ecología en la Universidad de Vigo) y D. Sergio González Fernández (Director Técnico del Laboratorio de la Unidad de Calidad Ambiental de la ECIMAT), como tutores de la alumna Sara López Ibáñez, autorizan la presentación y defensa de la presente memoria.



Fdo.: Ricardo Beiras García-Sabell



Fdo.: Sergio González Fernández

Índice

Listado de tablas

Listado de figuras

Abreviaturas

Resumen

1. Introducción	1
2. Hipótesis y objetivos	6
3. Materiales y métodos	7
3.1. <i>Compuestos químicos</i>	7
3.2. <i>Microplásticos</i>	7
3.3. <i>Material biológico</i>	7
3.4. <i>Bioensayos</i>	8
3.4.1. <i>Tipos de bioensayos</i>	8
3.4.2. <i>Pruebas previas para evaluar la supervivencia en agitación rotatoria</i>	9
3.4.3. <i>Pruebas previas para evaluar la calidad biológica del stock de copépodos</i>	9
3.4.4. <i>Pruebas de ingestión de microplásticos</i>	9
3.4.5. <i>Bioensayos de toxicidad de microplásticos puros</i>	9
3.4.6. <i>Bioensayos de toxicidad con microplásticos y contaminantes orgánicos hidrófobos</i>	9
3.4.7. <i>Tratamiento estadístico</i>	10
4. Resultados y discusión	11
4.1. <i>Supervivencia de <i>Acartia clausi</i> en agitación rotatoria</i>	11
4.2. <i>Calidad biológica del stock de copépodos</i>	11
4.3. <i>Ingestión de microplásticos</i>	13
4.4. <i>Toxicidad de microplásticos puros</i>	13
4.5. <i>Toxicidad de microplásticos y contaminantes orgánicos hidrófobos</i>	14
5. Conclusiones	21
6. Perspectivas	22
Bibliografía	23
Anexo I	26

Listado de tablas

Tabla 1. Porcentajes de supervivencia obtenidos en los modelos de bioensayo estático y rotatorio tras la exposición a 3,5-DCP a diferentes concentraciones	11
Tabla 2. Valores de CL_{50} y sus intervalos de confianza al 95% obtenidos para el tóxico de referencia en nuestro caso y en el recogido en la norma ISO 14669:1999	12
Tabla 3. Porcentaje de supervivencia correspondiente al control (C_{AMF}) y al resto de los tratamientos (T_{1-4}) con las diferentes concentraciones de microplásticos puros.....	14
Tabla 4. Valores de significancia para microplásticos y tóxicos calculados mediante el test H de Kruskal-Wallis para los diferentes ensayos realizados. * indica $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$	16
Tabla 5. Valores de significancia obtenidos en la prueba U de Mann-Whitney al comparar cada tratamiento (columna 1) con los controles (fila 1), en el caso del BP-3	16
Tabla 6. Valores de significancia obtenidos en la prueba U de Mann-Whitney al comparar cada tratamiento (columna 1) con los controles (fila 1), en el caso del 4-NP. * indica $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$	17
Tabla 7. Valores de significancia obtenidos en la prueba U de Mann-Whitney al comparar cada tratamiento (columna 1) con los controles (fila 1), en el caso del 4-MBC. * indica $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$	17
Tabla 8. Resultados de CL_{50} y CL_{10} correspondientes a los tratamientos estudiados con los tóxicos 4-NP y 4-MBC. n.c.: no calculable	19

Listado de figuras

Figura 1. Representación gráfica de los datos de mortalidad con respecto a las diferentes concentraciones de 3,5-DCP en escala logarítmica, tanto para los obtenidos experimentalmente (O) como para la línea estimada teórica (—). a) bioensayo rotatorio, b) bioensayo estático	12
Figura 2. Microplásticos marcados con fluorescencia verde presentes en el tracto digestivo del copépodo <i>A. clausi</i> en fase de larva nauplio, tras 48h de exposición en la rueda de zooplancton.....	13
Figura 3. Porcentaje de supervivencia de las larvas nauplio frente a las diferentes concentraciones de BP-3 combinadas con las de MP. Barras de error: desviación estándar	14
Figura 4. Porcentaje de supervivencia de las larvas nauplio frente a las diferentes concentraciones de 4-NP combinadas con las de MP. Barras de error: desviación estándar	15
Figura 5. Porcentaje de supervivencia de las larvas nauplio frente a las diferentes concentraciones de 4-MBC combinadas con las de MP. Barras de error: desviación estándar	15

Abreviaturas

3,5-DCP	3,5-diclorofenol
4-NP	4-nonilfenol
4-MBC	3-(4-metilbencilideno) alcanfor
ANOVA	Análisis de la varianza
AMF	Agua de mar filtrada
BP-3	Benzofenona-3
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
CEU	<i>Council of the European Union</i>
CL₁₀	Concentración que causa un 10% de mortalidad
CL₅₀	Concentración letal mediana
DEPA	<i>Danish Environmental Protection Agency</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECIMAT	Estación de Ciencias Marinas de Toralla
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
GESAMP	<i>Group of Experts on Scientific Aspects of Marine Environmental Protection</i>
HOC	Contaminantes orgánicos hidrófobos
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
MP	Microplásticos
NOAA	<i>National Oceanic and Atmospheric Administration</i>
NOEC	Concentración sin efectos observados significativos
NPE	Nonilfenol etoxilatos
PE	Polietileno
PET	Polietilen tereftalato
PP	Polipropileno
PS	Poliestireno
PU	Poliuretano
PVC	Cloruro de polivinilo
UV	Ultravioleta
UNESCO	<i>United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

Resumen

Debido al amplio alcance de la contaminación por plásticos en los ecosistemas marinos, son numerosos los estudios realizados para su cuantificación y evaluación de los posibles efectos que puedan producir en la biota. Este trabajo se centra en determinar el impacto que suponen los microplásticos sobre el zooplancton marino, de forma aislada o en combinación con contaminantes orgánicos hidrófobos (HOC) habituales en el medio: benzofenona-3 (BP-3), 4-nonilfenol (4-NP) y 3-(4-mentilbencilideno) alcanfor (4-MBC). Para ello, se ha seleccionado como indicador biológico al copépodo *Acartia clausi* en fase de larva nauplio y se han llevado a cabo una serie de bioensayos mediante un agitador rotatorio. Se documentó la ingestión activa de dichos microplásticos -de polietileno puro-, así como su ausencia de toxicidad. Por el contrario, los contaminantes sí presentaron efectos tóxicos sobre la población, siendo los valores de CL_{50} de $45,5 \mu\text{g L}^{-1}$ y $193,5 \mu\text{g L}^{-1}$ para el 4-NP y 4-MBC, respectivamente. Para las concentraciones utilizadas de BP-3 se obtuvo una respuesta de supervivencia elevada. Estos valores de toxicidad no se vieron incrementados por la adición de microplásticos, sino que, en algunos casos, los redujeron. El trabajo desarrollado sienta las bases para pruebas futuras en el campo de los efectos ecotoxicológicos de los microplásticos en el medio marino.

Palabras clave: *Acartia clausi*, contaminantes orgánicos hidrófobos (HOC), copéodos, microplásticos, toxicidad, zooplancton.

1. Introducción

Actualmente, los ecosistemas marinos están sometidos a una gran degradación a nivel global. Muchos de los diferentes hábitats que los componen se deterioran o llegan a desaparecer, y una de las principales causas de que esto suceda es la intervención del ser humano, por el que se ven afectados directa e indirectamente (Lotze *et al.*, 2006; Hoegh-Guldberg & Bruno, 2010). Actividades como la pesca, el aumento de las emisiones de CO₂ a la atmósfera o el vertido desmesurado de contaminantes suponen un riesgo para estos ambientes.

Centrándonos en la contaminación marina, alrededor del 80% procede de los desechos que se generan en los núcleos urbanos, a raíz del uso de fertilizantes, medios de transporte, producción de aguas residuales o de residuos sólidos, entre otras fuentes (NOAA, 2017; UNESCO, 2017). Una vez en el medio marino, estos contaminantes de diferente naturaleza tienen la capacidad de alterar parámetros químicos, físicos y biológicos del agua, de forma que se modifica su calidad. Este hecho influye en la ecología de los organismos marinos. Dependiendo de la naturaleza del contaminante y las características del ambiente y de los organismos presentes, estos se pueden ver perjudicados a diferentes niveles. La interacción puede resultar letal para ellos o bien pueden manifestarse efectos subletales, que producen daños en variables biológicas de relevancia para el tamaño de las poblaciones de los organismos afectados (reproducción, disrupción endocrina, efectos intergeneracionales, etc.) (Islam & Tanaka, 2004).

Los residuos plásticos componen entre el 60 y el 80% de los desechos marinos (Derraik, 2002), y llevan encontrándose en estos ecosistemas desde la década de los setenta (Carpenter & Smith, 1972). A este hecho no se le dio gran relevancia a nivel de impacto ambiental. Sin embargo, poco a poco, gracias a estudios en diferentes áreas de la ecología marina, han ganado más atención por parte de la comunidad científica y se han reconocido los impactos que generan (Andrady, 2011). Los principales daños que ocasionan a las comunidades marinas resultan de su enredo con los individuos o su ingestión, ambos casos documentados en gran cantidad de especies (Derraik, 2002; Gall & Thompson, 2015). A este impacto se le añaden su alta persistencia en el medio y su abundancia.

Cada año aumenta la demanda de plásticos de forma global, lo que se debe a las propiedades que hacen de este material una sustitución de otros, como metal o cristal, más barata y con una presentación y prestación similar (Andrady, 2011).

Una vez que estos plásticos pasan a formar parte del medio marino, las condiciones ambientales, principalmente la radiación UV y la temperatura, pueden ocasionar una degradación de este material, transformándolo en uno más frágil y vulnerable a la fragmentación por el efecto mecánico del hidrodinamismo (corrientes, olas, etc.). Esta ruptura es capaz de generar plásticos de un tamaño muy reducido, los llamados microplásticos (MP), que también se crean directamente en la industria para la elaboración de determinados productos, como cosméticos exfoliantes (Andrady, 2011). Aunque no existe un rango de tamaño exacto oficialmente establecido, se consideran de forma general dentro de este grupo a aquellos que presenten un tamaño inferior a los 5 mm (Hidalgo-Ruz *et al.*, 2012; Cole *et al.*, 2013, 2015; Gall & Thompson, 2015; GESAMP, 2015).

Gracias a su densidad y tamaño, se distribuyen por el ambiente con facilidad y son prácticamente ubicuos (GESAMP, 2015). Desde el momento en que se descubrió su presencia, cada vez se han encontrado en más tipos de ecosistemas, especialmente en los acuáticos, tanto en lagos o ríos como en mares y océanos (NOAA, 2015), y el número de publicaciones sobre microplásticos en el medio marino se ha incrementado de forma exponencial en los últimos años (Van Cauwenberghe *et al.*, 2015).

En cuanto a su composición, va a estar basada principalmente en alguno de los seis tipos de plásticos más demandados en la industria: polietileno (PE), polipropileno (PP), poliestireno (PS), cloruro de polivinilo (PVC), poliuretano (PU) y polietileno tereftalato (PET) (GESAMP, 2015). En concreto, el PE es el polímero que lidera la producción a escala global, superando las 150 toneladas en 2015, cifra que se prevé que continúe incrementando, principalmente en países en vías de desarrollo (Galiè, 2016). Además, es el polímero que se encuentra en mayor proporción en los residuos plásticos de origen marino (Suaria *et al.*, 2016). Destaca como principal componente de las bolsas de plástico (UNEP, 2016) y presenta una tasa de descomposición extremadamente lenta, por lo que se acumula especialmente en los ecosistemas marinos (Iñiguez *et al.*, 2017).

Con el objetivo de conseguir una mejora de estos materiales, en la industria del plástico se ha optado por añadir sustancias que permitan obtener las propiedades óptimas a nivel químico, físico o mecánico, en el producto final. Entre esas sustancias se encuentran las que se incluyen en este estudio: BP-3, 4-NP y 4-MBC, que forman parte principalmente de materiales con filtros UV, detergentes y cosméticos (Darbre, 2015).

El BP-3 se utiliza como saborizante, en perfumes y también como aditivo de plásticos, productos farmacéuticos o insecticidas. Actúa como filtro UV en gafas de sol, jabones y cremas y se incluye, además, en productos de limpieza y como humectante en tintas. En 2003 se clasificó por la EPA como una sustancia de grandes volúmenes de producción, alcanzando las 500 toneladas por año en EEUU (IARC, 2013). Se encuentra presente en el ambiente, tanto en sedimentos como en masas de agua, y existe una importante exposición humana a esta sustancia. Es tóxico para el fitoplancton marino (Paredes *et al.*, 2014). Además, se trata de un potencial disruptor endocrino, es decir, puede afectar a la acción correcta de las hormonas, y, por tanto, al desarrollo de los diferentes organismos. En el caso del pez *Oryzias latipes*, existen estudios en los que se ha comprobado que el BP-3 se puede transformar en derivados que poseen actividad estrogénica, es decir, simulan el mecanismo de acción de los estrógenos (Kim *et al.*, 2014). Esta transformación también se aprecia en ratas, peces y en otros organismos, como insectos, con los que se han desarrollado ensayos *in vivo* e *in vitro*, demostrando su alteración de receptores de estrógenos, andrógenos y progesterona, entre otros (Wang *et al.*, 2016). Existen suficientes datos como para catalogarlo de compuesto carcinogénico en animales y es posible que pueda presentar dichos efectos en humanos (IARC, 2013), en los que se ha estudiado su absorción y excreción en la orina (Janjua *et al.*, 2004). Es una sustancia relativamente móvil y se volatiliza en las condiciones adecuadas, por lo que no permanece en el medio durante mucho tiempo, siendo menos activa que las demás (DEPA, 2015).

Por su parte, el 4-MBC también actúa como un filtro UV que se usa en cosméticos y cremas de protección solar. Se ha observado una alteración en el desarrollo embionario en peces, equinodermos (Torres *et al.*, 2016) y mamíferos (Hofkamp *et al.*, 2008) al exponerlos a esta sustancia. Además, también se ha estudiado su absorción y excreción en la orina en humanos, al igual que el BP-3 (Janjua *et al.*, 2004), ya que se trata de un compuesto lipofílico que se puede absorber fácilmente por la piel en contacto directo y acumularse en tejidos tras una exposición prolongada. Como disruptor endocrino en humanos y otros animales, es un potente antagonista de receptores de andrógenos, con actividad estrogénica y gran potencial de bioacumulación (Schlumpf *et al.*, 2001; Jiménez-Díaz *et al.*, 2013).

Por último, el 4-NP se encuentra en el grupo de los alquilfenoles, y se utiliza para la producción de NPE (nonilfenol etoxilatos), unos de los surfactantes más importantes en la industria de detergentes y productos de limpieza. Estos NPE se generan en grandes cantidades y al degradarse liberan el 4-NP al medio ambiente, el cual es muy tóxico para los

organismos marinos, especialmente en sus fases embrionarias y larvarias (Tato *et al.*, 2017). Además, el 4-NP se bioacumula en los organismos (EPA, 2010). Como en los casos anteriores, se ha detectado en fluidos de procedencia humana (Calafat *et al.*, 2004). También se considera un disruptor endocrino y puede actuar de forma conjunta con otras sustancias que tengan efectos similares (WHO, 2012).

Estas características estudiadas han motivado el establecimiento de límites de concentración en los productos en los que se incluyan estas sustancias: 4% para 4-MBC, 10 % para BP-3 y 0,1% para el 4-NP (Janjua *et al.*, 2004; CEU, 2014).

Aún se desconoce mucho sobre los MP y sus riesgos, pero se ha descrito su capacidad de actuar como vectores o transportadores de los contaminantes orgánicos, debido al carácter hidrófobo que presentan y a su persistencia en el medio. Esto, unido al reducido tamaño de los MP, hace que tengan una alta capacidad de retención de estas sustancias, de modo que, cuanto menor es el tamaño del MP, mayor es la relación superficie:volumen y la capacidad de adsorción de estos contaminantes (GESAMP, 2015).

El estudio más detallado de los MP en diferentes áreas es relativamente reciente. Podrían producir daños físicos en los organismos (p. e., daños al tracto digestivo) o químicos, lo que depende de las características del organismo y de los MP, condiciones externas, biodisponibilidad, etc., u otros factores como la vía de exposición: por contacto externo o por ingestión. Esta última es frecuente en organismos con alimentación activa, y ya ha sido documentada su existencia en diferentes grupos taxonómicos y niveles tróficos, desde pequeños invertebrados hasta aves y mamíferos marinos (GESAMP, 2015).

Por otra parte, son escasos los estudios realizados hasta el momento con estos materiales y sustancias de forma conjunta y, más aún, que estén enfocados hacia organismos que forman parte del zooplancton marino. El zooplancton, como grupo ecológico, tiene un papel esencial en el ecosistema. Por esta razón, este estudio se ha centrado en la subclase de los copépodos para la realización de bioensayos de toxicidad.

Los copépodos son un grupo muy diversificado y abundante que sustenta la base de una gran variedad de hábitats acuáticos. Puede que sean los metazoos que más abundan en los océanos o incluso en todo el planeta (Kiørboe, 2011). En este grupo de organismos en concreto se han realizado estudios con anterioridad con las sustancias propuestas o sus derivados (O'halloran *et al.*, 1999; Kusk *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2017; Tato *et al.*, 2018). También la ingestión de microplásticos ha sido documentada en adultos de diferentes especies de

copépodos (Cole *et al.*, 2013; Cole *et al.*, 2015). Este potencial de ingestión en un grupo ecológico que se encuentra en la base de la cadena trófica, puede constituir una transferencia relevante de microplásticos al resto de organismos de los siguientes niveles, comenzando por el macrozooplancton (Setälä *et al.*, 2014). Se ha llegado a estudiar esta transferencia en especies de cangrejos que almacenaron los microplásticos en varios de sus tejidos durante semanas (Farrell & Nelson, 2013). Estos hechos podrían suponer una alteración de la vida tanto de los organismos marinos como del resto de la red trófica, incluyéndonos a nosotros, a pesar de que las consecuencias a día de hoy no han sido definidas con exactitud.

Los diferentes efectos toxicológicos que se han estudiado han dirigido las investigaciones hacia distintas fases del desarrollo de los organismos, no sólo a individuos adultos, y cabe destacar que la fase que presenta más sensibilidad en estos invertebrados marinos es la de larva nauplio, con la que se ha trabajado (Turesson *et al.*, 2007; Preuss *et al.*, 2011; Kulkarni *et al.*, 2013). Con estos organismos, lo que se pretende es realizar un estudio que valide un método de incubación adecuado para su exposición a los HOC y microplásticos, y que permita dilucidar su toxicidad y posibles interacciones entre ellos.

La importancia de este estudio radica en la necesidad de entender cómo responden los ecosistemas a los cambios que se producen en el medio, principalmente de origen antrópico, y en cómo ese conocimiento nos permite desarrollar medidas para prevenir y paliar la contaminación ambiental alarmante que encontramos hoy en día.

2. Hipótesis y objetivos

En este estudio se plantea la hipótesis de que la larva nauplio del copépodo marino planctónico *Acartia clausi* es un modelo biológico sensible de utilidad en bioensayos ecotoxicológicos para examinar los potenciales efectos nocivos de los microplásticos.

Partiendo de esta hipótesis, los objetivos específicos que se pretenden alcanzar son los siguientes:

- a. Puesta a punto y comprobación de la validez de la técnica de incubación rotatoria mediante la rueda de zooplancton como método de exposición a microplásticos en este tipo de bioensayos con copépodos.
- b. Comprobación de la ingestión de microplásticos por parte del modelo biológico propuesto.
- c. Análisis del impacto ambiental que suponen ciertos contaminantes orgánicos hidrófobos y los microplásticos, de forma aislada o en combinación.
- d. Comparación del nivel de sensibilidad que muestra *Acartia clausi* como indicador biológico con respecto a otros organismos acuáticos estándar.

3. Materiales y métodos

3.1. Compuestos químicos

Tanto el compuesto de referencia, 3,5-diclorofenol (3,5-DCP), con número CAS 591-35-5, como el BP-3, CAS 131-57-7, el 4-NP, CAS 104-40-5, y el 4-MBC, CAS 36861-47-9, son compuestos orgánicos hidrófobos obtenidos de la casa Sigma-Aldrich (Alemania). En todos los casos, las soluciones madre se prepararon en DMSO (Sigma-Aldrich), previamente almacenado en oscuridad a 20°C, debido a la escasa solubilidad de los compuestos. Las soluciones que componen los tratamientos, obtenidas a partir de la madre, se realizaron diluyendo en agua de mar filtrada (AMF) a 0,22 µm hasta alcanzar la concentración requerida.

3.2. Microplásticos

Se utilizaron tres tipos de microplásticos:

- Para documentar su ingestión, se usaron microesferas de polietileno marcadas con fluorescencia verde (longitudes de onda de 414 nm de excitación y 575 nm de emisión), de un tamaño entre 1 y 4 µm y una densidad de 1,3 g cm⁻³ (*Cospheric*, California-EEUU).
- Para los bioensayos de toxicidad se usaron MP de polietileno puro de baja densidad (LDPE), de un tamaño entre 4 y 6 µm y una densidad de 0,96 g cm⁻³, adquiridos de *Micropowders Inc.*, Nueva York-EEUU.
- Adicionalmente, se hizo uso de MP de 4 a 6 µm con BP-3 ya adherido, obtenidos de la Universidad de Örebro (Suecia).

La elección del tamaño en todos los casos se debe a la similitud con el del alimento natural de estos organismos: el fitoplancton (Turner, 2004).

3.3. Material biológico

Los organismos elegidos como indicador biológico fueron individuos de la especie *Acartia clausi*, Subclase *Copepoda*, en concreto en la fase de larva nauplio. Estos se obtuvieron a partir de un *stock* aislado y controlado por la ECIMAT (Universidad de Vigo). Los individuos proceden de Ancona (Italia) y fueron proporcionados por el Instituto de Investigaciones Marinas de Vigo.

3.4. Bioensayos

Se adaptó una metodología estandarizada para llevar a cabo los diferentes bioensayos (norma ISO 14669:1999).

Inicialmente, entre 48 y 72 horas antes de cada bioensayo, se siguió un procedimiento común en el que se separó una fracción de adultos del *stock* preparado, haciendo uso de un tamiz de 300 μm , y se traspasó a una jarra de un litro de capacidad, donde se les dejó incubar a una temperatura de 20 °C, un fotoperiodo de 16h-8h de luz-oscuridad y con una aireación continua por burbujeo (con aire filtrado). Durante este periodo es necesario alimentar a los adultos con una dieta de microalgas, en este caso *Rhodomonas lens*, administradas en el momento de la separación de la población. Cuando transcurre este periodo de incubación de adultos, el contenido de la jarra se filtra a través de un tamiz de 40 μm , de forma que se retengan solamente las larvas nauplio, que tendrán alrededor de 24 horas de vida, y se concentran en un recipiente de menor capacidad.

3.4.1. Tipos de bioensayos

Los ensayos realizados en este trabajo siguen el protocolo estandarizado que puede adaptarse a uno de estos dos modelos:

Estático: El estandarizado en la norma ISO. Con el objetivo de probar sustancias hidrófobas, se diseñaron placas que contienen 20 huecos para viales de vidrio descubiertos de 3 mL de capacidad. Mediante una lupa binocular, se atraparon de forma individual las larvas nauplio con una pipeta Pasteur de vidrio. Se añadió un solo individuo (larva) en cada uno de los viales, hasta un total de 40 individuos por tratamiento (2 réplicas de 20 individuos), y se cubrieron. El periodo de incubación es de 48 horas, y se mantuvieron en unas condiciones de 20°C de temperatura, con un fotoperiodo de 16h-8h de luz-oscuridad y desprovistos de una fuente de aireación y alimentación.

Dinámico o rotatorio: Se desarrolló en una rueda de zooplancton o agitador rotatorio. Se usaron viales de vidrio, de 27 mL, y en cada uno de ellos se introdujeron 10 larvas, se llenaron hasta el máximo de su capacidad y se cerraron con tapones de rosca recubiertos de teflón. La duración y condiciones de temperatura fueron idénticas a las del bioensayo estático y se mantuvo la ausencia de aireación y alimentación, así como el uso de AMF como diluyente. Se le suma la condición del movimiento giratorio a una velocidad de 1 rpm, lo que permite mantener homogénea la mezcla. En los casos en los que el bioensayo incluyera

un compuesto químico para estudiar su toxicidad, se asignaron 4 viales (réplicas) a cada tratamiento, es decir, un total de 40 individuos, al igual que en el caso anterior.

3.4.2. Pruebas previas para evaluar la supervivencia en agitación rotatoria

Una vez obtenida una cantidad significativa de larvas nauplio, se realizaron pruebas preliminares para asegurar la validez y viabilidad de los bioensayos posteriores que se llevarían a cabo en la rueda de zooplancton. Para ello, se prepararon 20 viales de vidrio que contenían solamente AMF. Así se pudo comprobar la tolerancia de estos organismos al giro continuo efectuado por el agitador y a la falta de aporte de oxígeno y alimentación durante el test.

3.4.3. Pruebas previas para evaluar la calidad biológica del stock de copéodos

Utilizando como tóxico de referencia al 3,5-DCP, se realizaron bioensayos para comprobar la correspondencia del resultado con el que recoge la norma ISO 14669. Los ensayos se realizaron tanto en condiciones estáticas como rotatorias, usando como niveles de exposición del tóxico 0, 100, 250, 500, 1000, 2000, 4000 y 8000 $\mu\text{g L}^{-1}$, sumándoles un control del transportador DMSO.

3.4.4. Pruebas de ingestión de microplásticos

En este caso, siguiendo los pasos del bioensayo rotatorio, se utilizaron 12 viales en los que se añadieron las larvas y las esferas de polietileno marcadas con fluorescencia verde, a una concentración de 10 mg L^{-1} .

3.4.5. Bioensayos de toxicidad de microplásticos puros

Se establecieron varios tratamientos para observar si existía toxicidad por parte de los MP (polietileno puro) de forma aislada: un control con AMF y cuatro concentraciones crecientes de MP de 1, 3, 10 y 30 mg L^{-1} , haciendo uso del agitador rotatorio.

3.4.6. Bioensayos de toxicidad con microplásticos y contaminantes orgánicos hidrófobos

- Toxicidad del BP-3 disuelto y unido a MP (bioensayo rotatorio). Para ello se realizó una prueba con BP-3 disuelto y MP con BP-3 adherido a diferentes concentraciones: baja (0,2 $\mu\text{g L}^{-1}$) y alta (20 $\mu\text{g L}^{-1}$), en ambos casos. Los tratamientos utilizando MP con BP-3 adherido se prepararon a concentraciones de 1 y 10 mg L^{-1} .

En el diseño del bioensayo se contó con tres controles (AMF, 1 y 10 mg L⁻¹ de MP), dos tratamientos con 0,2 y 20 µg L⁻¹ de BP-3 disuelto y otros cuatro combinando las concentraciones de MP unido a BP-3.

- Toxicidad del 4-NP y 4-MBC en ausencia y presencia de MP (bioensayo rotatorio). Se llevó a cabo un proceso de incubación denominado *spiking*, de una duración de 48 horas, antes del inicio del bioensayo en sí. En este proceso se incuban los MP a diferentes concentraciones (1 y 10 mg L⁻¹) combinados con las concentraciones del tóxico (15, 40 y 100 µg L⁻¹ en el caso del 4-NP; 80, 240 y 720 µg L⁻¹ en el caso del 4-MBC), facilitando así su unión. Lo que se obtiene es una suspensión que contiene el microplástico unido al compuesto, con la máxima cantidad que haya podido captar del tóxico que corresponda, y AMF, que a su vez posee una cierta cantidad del compuesto libre indeterminada.

Una vez se obtuvieron las suspensiones adecuadas, se prepararon los diferentes tratamientos resultantes de la combinación de concentraciones de MP y de los tóxicos, así como cuatro controles que contenían AMF, DMSO, 1 y 10 mg L⁻¹ de MP y tres tratamientos que incluían solamente el tóxico disuelto en cada caso.

3.4.7. Tratamiento estadístico

Tras finalizar los bioensayos, se hizo un recuento de individuos muertos y vivos con la ayuda de una lupa binocular. Con estos datos, se calculó el porcentaje de supervivencia para cada vial en cada tratamiento. Haciendo uso de *software* estadístico (Excel, Statistica, IBM SPSS, DataFit y Deltagraph), se procedió a analizar los datos de supervivencia obtenidos. Inicialmente, el porcentaje de supervivencia se corrigió en todos los casos con respecto al control, y se trabajó con su inversa, es decir, con datos de mortalidad.

Para comprobar la normalidad de los datos se utilizó el test de Shapiro-Wilk, mientras que, para la homocedasticidad o igualdad de varianzas, el test de Levene. En los casos en los que cumplieran los criterios necesarios de normalidad y homogeneidad de varianzas, se optaría por realizar un análisis de varianzas o ANOVA. En el caso contrario de no cumplirlas ($p < 0.05$), aun realizando una transformación angular de los datos, se utilizaron tests no paramétricos: H de Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney. Finalmente, se calcularon los valores de CL₅₀ y CL₁₀ y sus intervalos de confianza al 95%, mediante el modelo de dosis-respuesta de Weibull (Christensen, 1984; Murado *et al.*, 2002).

4. Resultados y discusión

4.1. Supervivencia de *Acartia clausi* en agitación rotatoria

Tras el periodo de 48 horas de incubación en el agitador, se obtuvieron una serie de valores de supervivencia para cada una de las réplicas. A partir de estos datos, se calculó una supervivencia total de individuos del 91,9%, resultado que se acepta como válido al no superar el 10% de mortalidad (ISO 14669:1999). Asimismo, el valor medido de oxígeno final fue de aproximadamente el 70%.

Este resultado nos revela que las larvas presentan tolerancia a las condiciones establecidas para el desarrollo de bioensayos rotatorios, lo que permite el avance del estudio.

4.2. Calidad biológica del stock de copéodos

Los individuos expuestos a las diferentes concentraciones del tóxico de referencia (3,5-DCP), tanto para el ensayo estático como rotatorio, mostraron las tasas de supervivencia que se observan en la **Tabla 1**. Esos valores permitieron calcular la CL_{50} y los límites de confianza que se necesitan para verificar la validez del ensayo (**Tabla 2**).

Tabla 1

Porcentajes de supervivencia obtenidos en los modelos de bioensayo estático y rotatorio tras la exposición a 3,5-DCP a diferentes concentraciones.

Muestra	C (AMF)	C (DMSO)	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇
Concentración (mg L ⁻¹)	0	0	0,1	0,25	0,5	1	2	4	8
Supervivencia estático (%)	92,5	86,1	87,5	69,2	44,74	51,4	2,6	0	0
Supervivencia rotatorio (%)	100	100	97,5	95	57,1	31,3	6,7	0	0

Tabla 2

Valores de CL_{50} y sus intervalos de confianza al 95% obtenidos para el tóxico de referencia en nuestro caso y en el recogido en la norma ISO 14669:1999.

Ensayo	Rotatorio	Estático	ISO 14669
CL_{50} (mg L ⁻¹)	624,5 (450,9-797,9)	825,6 (294,5-1356,8)	950 (662-1238)

Al comparar los resultados que propone la norma ISO 14669 con los obtenidos, podemos verificar que los intervalos de confianza se solapan para ambos casos, así como entre los dos bioensayos realizados, por lo que los resultados se consideran válidos. Por lo tanto, la condición del *stock* de copépodos empleado es óptima.

En los siguientes gráficos de las curvas de dosis-respuesta (**Fig. 1**) se muestra el ajuste entre las líneas estimadas para nuestros resultados, usando los valores calculados para los parámetros siguiendo el modelo de Weibull (incluida la CL_{50}), y los datos de mortalidad obtenidos en los ensayos experimentales. En este ajuste, ambas representaciones se acoplan de forma adecuada.

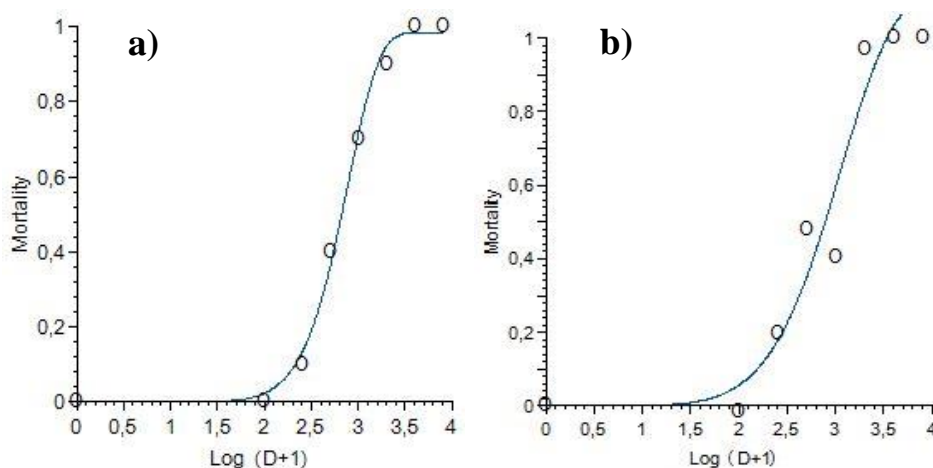


Figura 1

Representación gráfica de los datos de mortalidad con respecto a las diferentes concentraciones de 3,5-DCP en escala logarítmica, tanto para los obtenidos experimentalmente (O) como para la línea estimada teórica (—). a) bioensayo rotatorio, b) bioensayo estático.

4.3. Ingestión de microplásticos

Los copépodos fueron extraídos de los viales y observados, tras su inmovilización con etanol diluido, mediante un microscopio de fluorescencia acoplado a un ordenador que permite el análisis de imágenes y su captura.

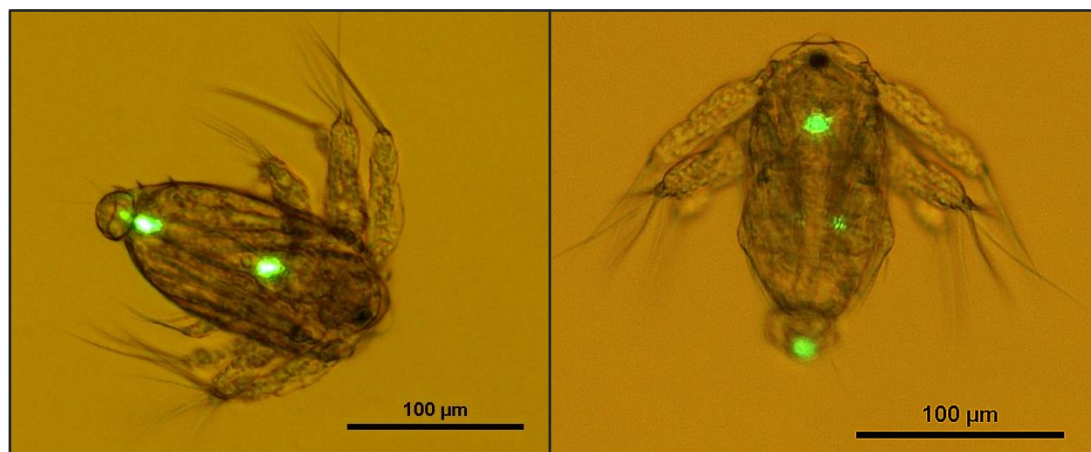


Figura 2

Microplásticos marcados con fluorescencia verde presentes en el tracto digestivo del copépodo *A. clausi* en fase de larva nauplio, tras 48h de exposición en la rueda de zooplancton.

Como se advierte en la **Fig.2**, se produce una ingestión de los microplásticos por parte de las larvas. Por el tamaño detectado de los MP marcados ingeridos, podemos decir que se trata de conjuntos de partículas más pequeñas que se han acumulado en el intestino poco a poco. Además, se aprecia que esto ocurre en las porciones superior e inferior del tracto digestivo en mayor cantidad que en la media. En estudios con otras especies se ha analizado este hecho y se ha visto que se acumulan en la porción anterior y pasan a la posterior agregados de forma muy compacta para su egestión (Cole *et al.*, 2013).

4.4. Toxicidad de microplásticos puros

Según los datos recogidos en la **Tabla 3**, la supervivencia media de los individuos fue del 98,96%, lo que pone de manifiesto que *a priori* no existe toxicidad apreciable con este tipo de material por sí solo. El valor de la NOEC superaría los 30 mg L⁻¹. Este nivel supera en gran medida a las concentraciones habituales en el medio marino (media de 1,7 µg L⁻¹ y máximo de 26 µg L⁻¹; Suaria *et al.*, 2016), y supera incluso las encontradas en las zonas de mayor acumulación como los giros centrales oceánicos (máximo <1 mg L⁻¹; Law *et al.*, 2014), por lo que no se esperan efectos tóxicos en el medio natural.

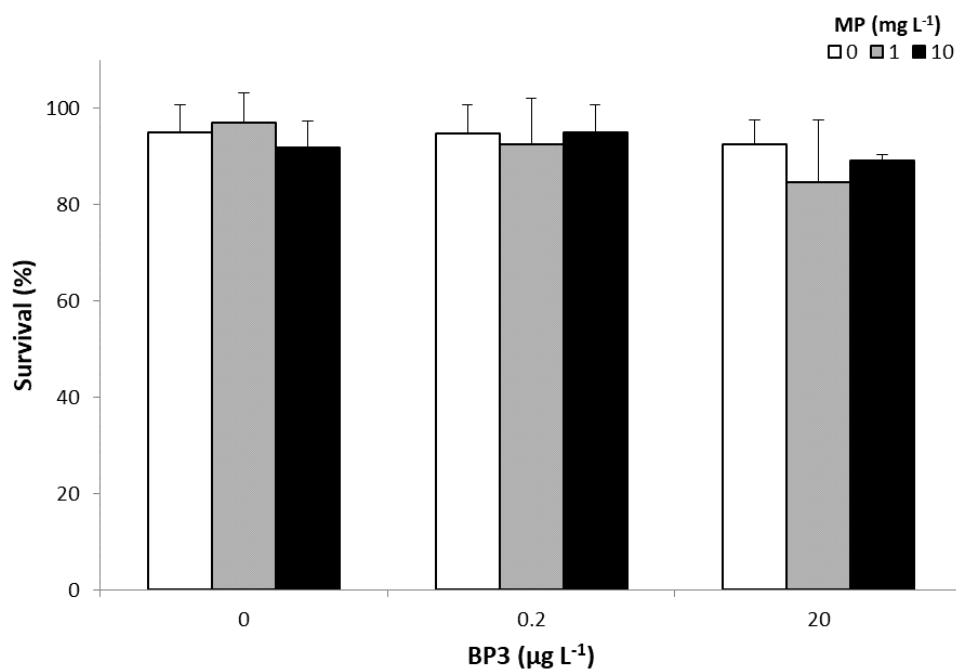
Tabla 3

Porcentaje de supervivencia correspondiente al control (C_{AMF}), y al resto de los tratamientos (T_{1-4}) con las diferentes concentraciones de microplásticos puros.

Muestra	C_{AMF}	T_1	T_2	T_3	T_4
Concentración MP ($mg L^{-1}$)	0	1	3	10	30
Supervivencia (%)	97,5	97,3	100	100	100

4.5. Toxicidad de microplásticos y contaminantes orgánicos hidrófobos

Tras el recuento de las larvas para todas las combinaciones de tratamientos en los tres casos, se extrajeron los resultados de supervivencia, que se pueden consultar en el *Anexo I*, representados en los siguientes gráficos:

**Figura 3**

Porcentaje de supervivencia de las larvas nauplio frente a las diferentes concentraciones de BP-3 combinadas con las de MP. Barras de error: desviación estándar.

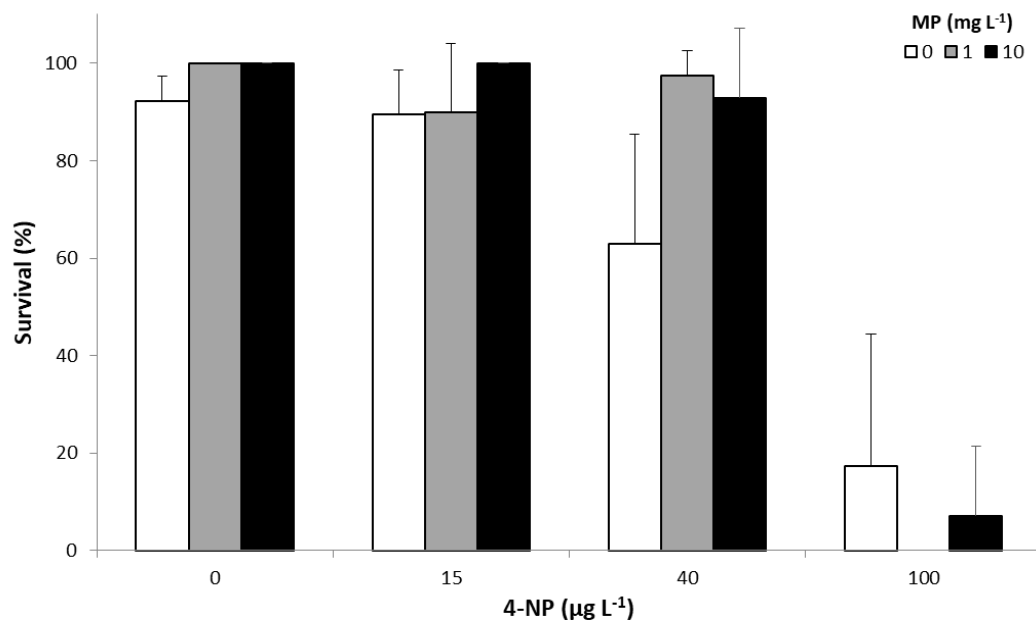


Figura 4

Porcentaje de supervivencia de las larvas nauplio frente a las diferentes concentraciones de 4-NP combinadas con las de MP. Barras de error: desviación estándar.

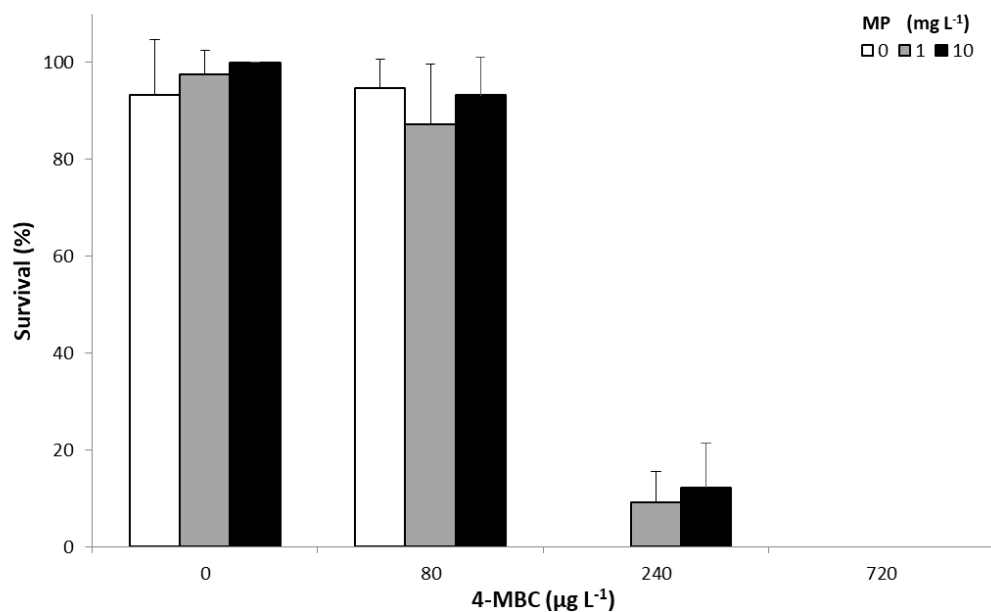


Figura 5

Porcentaje de supervivencia de las larvas nauplio frente a las diferentes concentraciones de 4-MBC combinadas con las de MP. Barras de error: desviación estándar.

En todos los casos, los datos de supervivencia no siguen una distribución normal ($p < 0,05$), ni las varianzas de la variable son homogéneas entre los grupos ($p < 0,05$), por lo que no se cumplen los requisitos para un análisis de tipo paramétrico (ANOVA). En el equivalente no paramétrico H de Kruskal-Wallis, se obtuvieron los siguientes valores:

Tabla 4

Valores de significancia para microplásticos y tóxicos calculados mediante el test H de Kruskal-Wallis en los diferentes ensayos realizados. * indica $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

	<i>p-value</i> MP	<i>p-value</i> tóxico
MP/BP-3	0,567	0,038*
MP+4-NP	0,103	0,000***
MP+4-MBC	0,681	0,000***

Al analizar estos resultados, vemos que en ningún caso la presencia de microplásticos en los tratamientos aumenta de forma significativa la mortalidad ($p > 0,05$). Mientras que, en el caso de los contaminantes, su adición sí la aumenta. En concreto, el efecto es mucho más significativo para el 4-NP y el 4-MBC ($p < 0,001$) que para el BP-3 ($p < 0,05$).

Con el propósito de contrastar los resultados y evaluar interacciones que se puedan producir entre los microplásticos y contaminantes, se realizó el test U de Mann-Whitney, comparando cada tratamiento de forma individual con los controles correspondientes (*Tablas 5, 6 y 7*).

Tabla 5

Valores de significancia obtenidos en la prueba U de Mann-Whitney al comparar cada tratamiento (columna 1) con los controles (fila 1), en el caso del **BP-3**.

	MP0BP0	MP1BP0	MP10BP0	MP0BP0,2	MP0BP20
MP1BP0	0,739				
MP10BP0	0,343				
MP0BP0,2	0,752				
MP0BP20	0,495				
MP1BP0,2	0,752	0,508		0,877	
MP1BP20	0,137	0,166			0,180
MP10BP0,2	1,000		0,343	0,752	
MP10BP20	0,063		0,439		0,098

Tabla 6

Valores de significancia obtenidos en la prueba U de Mann-Whitney al comparar cada tratamiento (columna 1) con los controles (fila 1), en el caso del **4-NP**. * indica $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

	MP0NP0	MP1NP0	MP10NP0	MP0NP15	MP0NP40	MP0NP100
MP1NP0	0,046*					
MP10NP0	0,046*					
MP0NP15	0,877					
MP0NP40	0,020*					
MP0NP100	0,019*					
MP1NP15	0,762	0,131		0,762		
MP1NP40	0,155	0,317			0,018*	
MP1NP100	0,013*	0,008**				0,131
MP10NP15	0,046*		1,000	0,046*		
MP10NP40	0,439		0,317		0,076	
MP10NP100	0,017*		0,011*			0,508

Tabla 7

Valores de significancia obtenidos en la prueba U de Mann-Whitney al comparar cada tratamiento (columna 1) con los controles (fila 1), en el caso del **4-MBC**. * indica $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

	MP0MBC0	MP1MBC0	MP10MBC0	MP0MBC80	MP0MBC240	MP0MBC720
MP1MBC0	0,659					
MP10MBC0	0,248					
MP0MBC80	1,000					
MP0MBC240	0,018*					
MP0MBC720	0,018*					
MP1MBC80	0,463	0,122		0,369		
MP1MBC240	0,032*	0,018*			0,047*	
MP1MBC720	0,018*	0,011*				1,000
MP10MBC80	1,000		0,131	0,538		
MP10MBC240	0,032*		0,014*		0,047*	
MP10MBC720	0,018*		0,008**			1,000

Si examinamos los resultados del test no paramétrico U de Mann-Whitney conjuntamente con los resultados de supervivencia observamos lo siguiente:

En el bioensayo con **BP-3** (*Tabla 5, Fig. 3*) observamos que tanto para microplásticos como para el contaminante no existen efectos significativos en ninguno de los casos. Este resultado se contradice con el obtenido en la prueba H de Kruskal-Wallis. Ello se debe a que el test H de Kruskal-Wallis posee una potencia estadística mayor al operar con un conjunto de datos mucho más amplio.

En el caso del 4-NP y 4-MBC el resultado es diferente. Por un lado, en el bioensayo con **4-NP** (*Tabla 6, Fig. 4*), observamos que en tratamientos con el contaminante sin MP, disminuye la supervivencia a partir de una concentración de $40 \mu\text{g L}^{-1}$. Sin embargo, a $40 \mu\text{g L}^{-1}$, cuando el contaminante está unido a MP (1 y 10 mg L^{-1}), no existen diferencias con el control de AMF+DMSO. Incluso si se compara con el control de 4-NP sin MP, se aprecia un efecto a favor de la supervivencia cuando la concentración de MP es baja (1 mg L^{-1}). Esto mismo ocurre a $15 \mu\text{g L}^{-1}$ añadiendo una concentración de MP de 10 mg L^{-1} . Por el contrario, una concentración de $100 \mu\text{g L}^{-1}$, siempre afecta negativamente a la supervivencia de las larvas, independientemente de la presencia de MP. Cabe señalar que la concentración de $40 \mu\text{g L}^{-1}$ es la que más información nos aporta, debido a que se trata de una concentración que causa respuestas parciales, es decir, a las que no existen ni una supervivencia ni mortalidad del 100%.

En cuanto a los microplásticos aislados, se exponen signos de que puedan presentar efectos sobre la población ($p=0,046$), notándose un aumento en el porcentaje de supervivencia con respecto al control de AMF+DMSO.

Por otro lado, en el bioensayo con **4-MBC** (*Tabla 7, Fig. 5*), vemos que a partir de una concentración de $240 \mu\text{g L}^{-1}$, el contaminante afecta negativamente a la supervivencia de la población, obteniendo un 100% de mortalidad. En los tratamientos con MP añadidos (1 y 10 mg L^{-1}), a $240 \mu\text{g L}^{-1}$, se detecta un aumento de la supervivencia en comparación al control del tóxico aislado. En el caso de una concentración de $720 \mu\text{g L}^{-1}$, es tan elevada que la supervivencia continúa siendo nula en todos los tratamientos evaluados.

Se pone de manifiesto, por tanto, una interacción entre los MP y los HOC. Por un lado, este material de polietileno ha resultado ser aparentemente inocuo. En los casos en los que su toxicidad aumenta, es siempre debido a la que presentan los contaminantes a los que están adheridos estos plásticos y, tras comparar con los controles pertinentes, no se observa que

exista un efecto negativo por su parte. Cuando los resultados muestran una interacción entre los HOC y los microplásticos significativa, esta resulta beneficiosa para la supervivencia de los individuos.

A pesar de que los microplásticos han sido descritos como vectores de los HOC a los organismos que los ingieren, en este caso no se aprecia esa característica. Más bien parece que, el hecho de estar adsorbido el tóxico al MP reduce su biodisponibilidad y su asimilación en el interior del tubo digestivo del organismo. Esto explicaría el efecto beneficioso de los MP encontrado en el experimento con 4-MBC a $240 \mu\text{g L}^{-1}$ y con 4-NP a 15 y $40 \mu\text{g L}^{-1}$.

Respecto al cálculo de las CL_{10} y CL_{50} , los valores obtenidos fueron los siguientes:

Tabla 8

Resultados de CL_{50} y CL_{10} correspondientes a los tratamientos estudiados con los tóxicos 4-NP y 4-MBC. n.c.: no calculable.

	Sin MP		MP (1mg L ⁻¹)		MP (10mg L ⁻¹)		Todo	
	CL ₁₀	CL ₅₀	CL ₁₀	CL ₅₀	CL ₁₀	CL ₅₀	CL ₁₀	CL ₅₀
4-NP	n.c.	45,5	71,2	84,9	n.c.	87,8	n.c.	47,9
4-MBC	166,2	193,5	91,8	164,9	167,6	210,7	114,8	177,4

Para el caso del **BP-3** no fue posible el cálculo de estos valores, debido a la inexistencia de un rango de valores de supervivencia lo suficientemente amplio; sobrevivió la mayor parte de la población en cada uno de los tratamientos. De la misma forma, los límites de confianza al 95% no fueron calculables al no haber un número proporcionado de valores de respuesta parcial en la población.

El **4-NP** presenta una mayor toxicidad, con una CL_{50} notablemente más baja ($45,5 \mu\text{g L}^{-1}$). Este valor se aproxima al resultante en otros estudios, como el expuesto por Tato *et al.*, 2017 ($29 \mu\text{g L}^{-1}$), para la misma especie. Sin embargo, *A. clausi* resulta ser mucho más sensible a esta sustancia que otros organismos miembros de la Subclase *Copepoda*, como *Tigriopus japonicus*, para el que la CL_{50} aumenta a $510 \mu\text{g L}^{-1}$ (Marcial *et al.*, 2003). Lo mismo ocurre con otras especies modelo, como *Daphnia magna*, con una CL_{50} que se sitúa alrededor de los $200 \mu\text{g L}^{-1}$ (Zhang *et al.*, 2003).

Cabe destacar que se observa un aumento del valor de la CL_{50} con la adición de microplásticos, es decir, disminuye la toxicidad del compuesto, como se comentó anteriormente.

Para el **4-MBC**, este hecho de aumento de la supervivencia con la adición de MP sólo se observa con una concentración de 10 mg L⁻¹ de MP. Las larvas de *A. clausi* parecen ser más sensibles a este compuesto (193,5 µg L⁻¹) que la especie *Daphnia magna*, que muestra una CL₅₀ de 560 µg L⁻¹ (Fent *et al.*, 2010), u otras como el erizo de mar *Paracentrotus lividus* (854 µg L⁻¹) o el mejillón *Mytilus galloprovincialis* (587,17 µg L⁻¹) (Paredes *et al.*, 2014). Además, su resistencia es similar a la de otras especies relacionadas, como el crustáceo *Siriella armata*, con una CL₅₀ de 192,6 µg L⁻¹ y algunas especies de microalgas fitoplanctónicas, como es el caso de *Isochrysis galbana*, CL₅₀ de 171,45 µg L⁻¹ (Paredes *et al.*, 2014). Sin embargo, el efecto de esta sustancia resulta ser mayor para *T. japonicus*, que presenta una CL₅₀ a 72h de 92,9 µg L⁻¹ (Chen *et al.*, 2018).

5. Conclusiones

Las conclusiones extraídas a partir de los resultados de este trabajo son las siguientes:

- Ha sido posible establecer el bioensayo rotatorio como el tipo de ensayo adecuado para la realización de pruebas con microplásticos en estos organismos. La supervivencia de la especie objeto de estudio, *Acartia clausi*, a las condiciones fijadas, ha resultado ser adecuada y cumple el criterio establecido en la norma ISO para el bioensayo estático.
- Se ha verificado la existencia de ingestión activa de los microplásticos por parte del copépodo *Acartia clausi*, al igual que ocurre en otras especies modelo diferentes y del mismo grupo ecológico y taxonómico.
- Esta especie se puede emplear como indicador biológico sensible para bioensayos de toxicidad del tipo que se muestra en esta memoria, especialmente en la fase de desarrollo de larva nauplio, siendo notablemente más sensible, en líneas generales, que otras especies u otros estados de desarrollo.
- No existe toxicidad por parte de los polímeros puros de polietileno utilizados.
- Los HOC de los que se ha hecho uso exhiben un efecto de toxicidad directo sobre los individuos y afectan de distinta forma a las diferentes especies, incluso comprendidas en el mismo grupo taxonómico. El compuesto de mayor toxicidad resultó ser el 4-NP.
- Los microplásticos no aumentan la toxicidad de dichos HOC. De hecho, en tratamientos con efecto parcial disminuyen significativamente su toxicidad.
- Se pone de manifiesto, por tanto, una interacción entre los microplásticos y los contaminantes que deriva en una disminución de su biodisponibilidad y un incremento de la tasa de supervivencia de la población.

Los resultados de este estudio ayudan a ajustar las bases para el correcto desarrollo y la mejora de los métodos empleados para la realización de bioensayos de toxicidad con modelos biológicos marinos de relevancia ambiental.

6. Perspectivas

La amenaza que supone la presencia de residuos plásticos en el medio para la fauna marina está demostrada. Sin embargo, este hecho en el caso de los microplásticos necesita una mayor investigación. De esta forma, sería interesante evaluar las interacciones que se pudieran producir entre el material particulado natural y antropogénico y sustancias químicas disueltas, tanto en el agua como en el interior del organismo de diferentes especies. Asimismo, sería útil estudiar efectos subletales a otros niveles (fisiológico, celular o molecular).

En relación a los compuestos hidrófobos orgánicos utilizados, sería conveniente profundizar en su estudio tanto en esta especie como en otras de interés. Un posible planteamiento sería el acotamiento del rango de concentraciones que permitiera el cálculo de las CL_{50} y CL_{10} de forma más precisa, ya que se trata de datos especialmente relevantes a la hora de establecer límites ambientales. Además, conocer la sensibilidad de *Acartia clausi*, como organismo que forma parte del zooplancton, a ciertos contaminantes aporta nuevos conocimientos muy útiles a la hora de establecer límites en el uso y vertido de esas sustancias al medio ambiente.

Este trabajo abre las puertas al uso de larvas nauplio de *Acartia clausi* como especie estándar a la hora de analizar los efectos ecotoxicológicos de microplásticos y otros materiales particulados en el medio marino.

Bibliografía

- Andrady, A. L. (2011). Microplastics in the marine environment. *Mar Pollut Bull.* 62: 1596-1605.
- Beiras, R. & Pérez, S. (2011). Manual de métodos básicos en contaminación mariña costeira. España: Universidade de Vigo.
- Calafat, A. M., Kuklenyik, Z., Reidy, J. A., Caudill, S. P., Ekong, J., Needham, L. L. (2005). Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environ Health Perspect.* 113(4):391-395.
- Carpenter, E.J., Smith, K.L. (1972). Plastics on the Sargasso Sea Surface. *Science.* 175: 1240-1241.
- Chen, L., Li, X., Hong, H., Shi, D. (2018). Multigenerational effects of 4-methylbenzylidene camphor (4-MBC) on the survival, development and reproduction of the marine copepod *Tigriopus japonicus*. *Aquat Toxicol.* 194:94-102.
- Christensen, E. R. (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. *Water Res.* 18(2):213-221.
- Cole, M., Lindeque, P., Fileman, E., Halsband, C., Goodhead, R., Moger, J., Galloway, T. S. (2013). Microplastic ingestión by zooplankton. *Environ Sci Technol.* 47(12):6646-6655.
- Cole, M., Lindeque, P., Fileman, E., Halsband, C., Galloway, T. S. (2015). The impact of polystyrene microplastics on feeding, function and fecundity in the marine copepod *Calanus helgolandicus*. *Environ Sci Technol.* 49(2):1130-1137.
- Council of the European Union. (2014). Regulation No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC
- Darbre, P. D. (2015). Endocrine disruption and human health. Academic Press.
- Derraik, J. G. B. (2002). The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. *Mar Pollut Bull.* 44(9):842-852.
- Farrell, P., Nelson, K. (2013). Trophic level transfer of microplastic: *Mytilus edulis* (L.) to *Carcinus maenas* (L.). *Environ Pollut.* 177:1-3.
- Fent, K., Kunz, P. Y., Zenker, A., Rapp, M. (2010). A tentative environmental risk assessment of the UV-filters 3-(4-methylbenzylidene-camphor), 2-ethylhexyl-4-trimethoxycinnamate, benzophenone-3, benzophenone-4 and 3-benzylidene camphor. *Mar Environ Res.* 69(1): S4-S6
- Galiè, F. (2016). Global market trends and investments in polyethylene and polypropylene. ICIS, Whitepaper.
- Gall, S. C., Thompson, R. C. (2015). The impact of debris on marine life. *Mar Pollut Bull.* 92(1-2):170-179.
- 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: 1060-3075.
- Hoegh-Guldberg, O. & Bruno, J. F. (2010). The Impact of Climate Change on the World's Marine Ecosystems. *Science.* 328 (5985):1523-1528.
- Hofkamp, L., Bradley, S., Tresguerres, J., Lichtensteiger, W., Schlumpf, M., Timms, B. (2008). Region-specific growth effects in the developing rat prostate following fetal exposure to estrogenic ultraviolet filters. *Environ Health Perspect.* 116(7): 867-872.
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. (2013). Some chemicals present in industrial and consumer products, food and drinking-water. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. IARC Monogr Eval Carcinogr Risks Hum. 101.
- International Standard Organization. (1999). ISO 14669: Water quality – Determination of acute lethal toxicity to marine copepods (Copepoda, Crustacea).
- Iñiguez, M.E., Conesa, J.A, Fullana, A. (2017). Pollutant content in marine debris and characterization by thermal decomposition. *Mar Pollut Bull.* 117(1-2):359-365.
- Islam, M. S., Tanaka, M. (2004). Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. *Mar Pollut Bull.* 48(7-8):624-649.
- Janjua, N.R., Mogensen, B., Andersson, A.M., Petersen, J. H., Henriksen, M., Skakkebaek, Wulf, H.C. (2004). Systemic absorption of the sunscreens benzophenone-3, octyl-

methoxycinnamate, and 3-(4-methyl-benzylidene) camphor after whole-body topical application and reproductive hormone levels in humans. *J Investig Dermatol.* 123:57-61.

Jiménez-Díaz, I., Molina-Molina, J. M., Zafra-Gómez, A., Ballesteros, O., Navalón, A., Real, M., Sáenz, J. M., Fernández, M. F., Olea, N. (2013). Simultaneous determination of the UV-filters benzyl salicylate, phenyl salicylate, octyl salicylate, homosalate, 3-(4-methylbenzylidene) camphor and 3 benzylidene camphor in human placental tissue by LC-MS/MS. Assessment of their in vitro endocrine activity. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 896:80-7.

Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection (GESAMP). (2015). Sources, fate and effects of microplastics in the marine environment: a global assessment. Exeter, UK: Polestar Wheatons. Editor: Kershaw, P. Rep Stud GESAMP. 90.

Kim, S., Jung, D., Kho, Y., Choi, K. (2014). Effects of benzophenone-3 exposure on endocrine disruption and reproduction of japanese medaka (*Oryzias latipes*): a two generation exposure study. *Aquat Toxicol.* 155:244-52.

Kjørboe, T. (2011). What makes pelagic copepods so successful? *J Plankton Res.* 33(5):677-685.

Kulkarni, D., Daniels, B., Preuss, T. G. (2013). Life-stage-dependent sensitivity of the cyclopoid copepod *Mesocyclops leuckarti* to triphenyltin. *Chemosphere.* 92:1145-1153.

Kusk, K. O., Avdoli, M., Wollenberger, L. (2011). Effect of 2,4-dihydroxybenzophenone (BP1) on early life-stage development of the marine copepod *Acartia tonsa* at different temperatures and salinities. *Environ Toxicol Chem.* 30(4):959-966.

Law, K L., Morét-Ferguson, S. E., Goodwin, D. S., Zettler, E. R., DeForce, E., Kukulka, T., Proskurowski, G. (2014). Distribution of Surface Plastic Debris in the Eastern Pacific Ocean from an 11-Year Data Set. *Environ Sci Technol.* 48:4732-4738.

Lotze, H. K., Lenihan, H. S., Bourque, B. J., Bradbury, R. H., Cooke, R. G., Kay, M. C., Kidwell, S. M., Kirby, M. X., Peterson, C. H., Jackson, J. B. C. (2006). Depletion, Degradation, and Recovery Potential of Estuaries and Coastal Seas. *Science.* 312: 1806-1809.

Marcial, H. S., Hagiwara, A., Snell, T. W. (2003). Estrogenic compounds affect development of

harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus*. *Environ Toxicol Chem.* 22(12):3025-3030.

Masura, J., Baker, J., Foster, G., Arthur, C. (2015). Laboratory methods for the analysis of microplastics in the marine environment: recommendations for quantifying synthetic particles in waters and sediments. NOAA Marine Program. NOAA Technical Memorandum NOS-OR&R-48.

Ministry of Environment and Food. (2015). Survey and health assessment of UV filters. Copenhagen, Denmark: Danish Environmental Protection Agency.

Murado, M. A., González, M^a. P., Vázquez, J. A. (2002). Dose-response relationships: an overview, a generative model and its application to the verification of descriptive models. *Enzyme Microb Technol.* 31(4):439-455.

National Ocean Service [sede Web]. National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA); 2017 [acceso 9 de enero de 2018]. What is the biggest source of pollution in the ocean? Disponible en: <https://oceanservice.noaa.gov/facts/pollution.html>

O'halloran, S. L., Liber, K., Gangl, J. A., Knuth, M. L. (1999). Effects of repeated exposure to 4-nonylphenol on the zooplankton community in littoral enclosures. *Environ Toxicol Chem.* 18(3):376-385.

Paredes, E., Perez, S., Rodil, R., Quintana, J. B., Beiras, R. (2014). Ecotoxicological evaluation of four UV filters using marine organisms from different trophic levels *Isochrysis galbana*, *Mytilus galloprovincialis*, *Paracentrotus lividus* and *Siriella armata*. *Chemosphere.* 104:44-50.

Preuss, T. G., Brinkmann, M., Lundström, E., Bengtsson, B. E., Breitholtz, M. (2011). An individual-based modeling approach for evaluation of endpoint sensitivity in harpacticoid copepod life-cycle tests and optimization of test design. *Environ Toxicol Chem.* 30(10):2353-62.

Schlumpf, M., Cotton, B., Conscience, M., Haller, V., Steinmann, B., Lichtensteiger, W. (2001). In vitro and in vivo estrogenicity of UV screens. *Environ Health Perspect.* 109(3).

Setälä, O., Fleming-Lehtinen, V., Lhtiniemi, M. (2014). Ingestion and transfer of microplastics in the planktonic food web. *Environ Pollut.* 185:77-83.

Suaris, G., Avio, C., Mineo, A., Lattin, G., Magaldi, M. G., Belmonte, G., Moore, C. J., Regoli, F., Aliani, S. (2016). The Mediterranean

Plastic Soup: synthetic polymers in Mediterranean Surface waters. *Sci. Rep.* 6:37551.

Tato, T., Salgueiro-González, N., León, V. M., González, S., Beiras, R. (2017). Ecotoxicological evaluation of the risk posed by bisphenol A, triclosan and 4-nonylphenol in coastal waters using early life stages of marine organisms (*Isochrysis galbana*, *Mytilus galloprovincialis*, *Paracentrotus lividus* and *Acartia clausi*). *Environ Pollut.* 232:173-182.

Torres, T., Cunha, I., Martins, R., Santos, M. M. (2016). Screening the toxicity of selected personal care products using embryo bioassays: 4-MBC, Propylparaben and Triclocarban. *Int J Mol Sci.* 17(10).

Tureson, E. U., Stiernström, S., Minten, J., Adolfsson-Erici, M., Bengtsson, B. E., Breitholtz, M. (2007). Development and reproduction of the freshwater harpacticoid copepod *Attheyella crassa* for assessing sediment-associated toxicity. *Aquat Toxicol.* 83(3):180-9.

Turner, J. T. (2004). The importance of small planktonic copepods and their roles in pelagic marine food webs. *Zool Stud.* 43(2):255-266

UNEP. (2016). Marine plastic debris and microplastics: Global lessons and research to inspire action and guide policy change. United Nations Environment Programme, Nairobi.

UNESCO [sede Web]. Intergovernmental oceanographic commission; 2017 [acceso 19 de enero de 2018]. Facts and figures on marine pollution. Disponible en: <http://www.unesco.org/new/en/natural-sciences/ioc-oceans/focus-areas/rio-20-ocean/blueprint-for-the-future-we-want/marine-pollution/facts-and-figures-on-marine-pollution/>

U.S. Environmental Protection Agency (EPA). (2010). Nonylphenol (NP) and Nonylphenol Ethoxylates (NPEs) Action Plan.

Van Cauwenberghe, L., Devriese, L., Galgani, F., Janssen, C. (2015). Microplastics in sediments: A review of techniques, occurrence and effects. *Marin Environ Res.* 111: 5-17.

Wang, J., Pan, L., Wu, S., Lu, L., Xu, Y., Zhu, Y., Guo, M., Zhuang, S. (2016). Recent advances on endocrine disrupting effects of UV filters. *Int J Environ Res Public Health.* 13(8):782

World Health Organization (WHO). (2012). State of the science of endocrine disrupting chemicals. United Nations Environment Programme.

Zhang, L., Gibble, R., BAer, K. N. (2003). The effects of 4-nonylphenol and ethanol on acute toxicity, embryo development, and reproduction in *Daphnia magna*. *Ecotoxicol Environ Saf.* 55:330:337.

ANEXO I: Resultados de supervivencia de larvas nauplio de *A. clausi* expuestas a concentraciones crecientes de microplásticos y de los HOC

Tabla 1

Porcentajes de supervivencia obtenidos a diferentes concentraciones de MP unidos a BP-3 en concentraciones crecientes. *MP ya unidos, sin *spiking*.

	MP (0 mg L ⁻¹)	MP* (1 mg L ⁻¹)	MP* (10 mg L ⁻¹)
BP-3 (0 µg L⁻¹)	95,0	96,9	91,9
BP-3 (0,2 µg L⁻¹)	94,7	92,5	95,0
BP-3 (20 µg L⁻¹)	92,5	84,7	89,1

Tabla 2

Porcentajes de supervivencia obtenidos tras la exposición a diferentes combinaciones de concentraciones de MP y 4-NP.

	MP (0 mg L ⁻¹)	MP (1 mg L ⁻¹)	MP (10 mg L ⁻¹)
4-NP (0 µg L⁻¹)	92,2	100,0	100,0
4-NP (15 µg L⁻¹)	89,4	90,0	100,0
4-NP (40 µg L⁻¹)	62,9	97,5	92,9
4-NP (100 µg L⁻¹)	17,4	0,0	7,1

Tabla 3

Porcentajes de supervivencia obtenidos tras la exposición a diferentes combinaciones de concentraciones de MP y 4-MBC.

	MP (0 mg L ⁻¹)	MP (1 mg L ⁻¹)	MP (10 mg L ⁻¹)
4-MBC (0 µg L⁻¹)	93,3	97,5	100,0
4-MBC (80 µg L⁻¹)	94,7	87,2	93,3
4-MBC (240 µg L⁻¹)	0,0	9,2	12,3
4-MBC (720 µg L⁻¹)	0,0	0,0	0,0