



Seminario de Licenciatura en Ciencias Biológicas

Microplásticos en mitílidos del golfo San Jorge, Patagonia Argentina

**Alumno: Gustavo D. Mendez
Director: Dr. Adrián O. Cefarelli
Co-Director: Dr. Damián G. Gil**

Universidad
Nacional de la
Patagonia San Juan
Bosco. Facultad de
Ciencias Naturales
y Ciencias de la
Salud.

Departamento de
Biología y Ambiente

Comodoro Rivadavia,
Chubut, Argentina.

2023

A Gustavo Mendez padre

Papi

Agradecimientos

- A la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. A la Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud por permitirme culminar mis estudios.
- Al Dr. Adrián Cefarelli y Dr. Damián Gil, por su continuo apoyo y observación en este camino.
- Al Instituto de Desarrollo Costero Dr. Héctor E. Zaixso, donde llevé a cabo gran parte de mi trabajo de Seminario.
- A la Dra. Paula Stoyanoff por su asistencia y ayuda como tutora y asesora en mi carrera.
- A Javier Tolosano, Romina Verga, Renato Frías por su colaboración en el muestreo y trabajo de campo.
- A Virginia Sequeira por su ayuda en el laboratorio.
- A mi familia y amigos por acompañarme en este proceso.
- A Bere, mi compañera y amor, me soportó y acompañó siempre en las largas horas de trabajo.
- El presente seminario ha sido realizado en el marco de los siguientes proyectos:
PIP 11220200102946CO "Evaluación de la presencia y concentración de microplásticos en distintos ambientes y organismos del golfo San Jorge y mar patagónico". CONICET y PI N° 1563 "Evaluación de la presencia de microplásticos en ambientes y organismos costeros del Golfo San Jorge - Mar Argentino". Secretaría de Ciencia y Técnica-UNPSJB.

Índice

	1. Resumen
4	
2.	Introducción..... 5
3.	Objetivos..... 9
3.1.	Objetivo general..... 9
3.2.	Objetivos específicos 9
4.	Materiales y métodos 10
4.1.	Área de estudio..... 10
4.2.	Sitio de muestreo..... 11
4.3.	Muestreo 12
4.3.	Tratamiento de las muestras 14
4.4.	Identificación y caracterización de microfibras 16
4.5.	Análisis estadístico..... 17
5.	Resultados 19
5.1.	Conformación de los <i>pools</i> de mejillón (talla e índice de condición)..... 19
5.2.	Validación de la metodología utilizada. Identificación y caracterización de micropartículas..... 21
5.2.1.	Digestión de las muestras 21
5.2.2.	Identificación y validación de micropartículas 21
5.2.3.	Caracterización morfológica y morfométrica 26
5.3.	Concentración de micropartículas en tejidos blandos de <i>Mytilus platensis</i> 29
6.	Discusión..... 32
7.	Conclusiones..... 38
8.	Bibliografía 40

1. Resumen

Los desechos de productos plásticos son motivo de grave preocupación internacional debido a su durabilidad y resistencia a la corrosión. Particularmente en los últimos años se ha centrado el enfoque en las micropartículas y fibras plásticas de tamaños menores de 5 mm, comúnmente denominadas microplásticos (MP), y presentes tanto en los ecosistemas marinos como en los terrestres. En el mar, la ingestión de microplásticos por una amplia gama de organismos puede producir efectos letales o subletales, bioacumulación, y transferencia de la toxicidad adquirida desde los niveles tróficos inferiores a los superiores. El conocimiento científico de esta problemática es aún muy limitado, especialmente en el Mar Argentino, donde al respecto se han realizado escasos estudios. El presente trabajo de seminario aborda por primera vez el estudio de micropartículas de origen antrópico en ambientes costeros de la región central del Golfo San Jorge. Su objetivo general fue evaluar la presencia y concentración de estas micropartículas en mejillones (*Mytilus platensis* d'Orbigny, 1842) en cuatro sitios cercanos a Comodoro Rivadavia y Rada Tilly, y con diferentes grados de urbanización. Las muestras fueron tratadas con peróxido de hidrógeno al 30 %, para luego ser filtradas a través de filtros de policarbonato de 10 μm de poro, los que fueron montados sobre portaobjetos y analizados con microscopía óptica. A su vez, una fracción de las fibras encontradas se aislaron para la determinación de su composición química a través de espectroscopia Raman. Los resultados indicaron la presencia de fibras plásticas y no plásticas de origen antrópico en mejillones en los cuatro sitios muestreados. La concentración media de microplásticos, considerando los cuatro sitios, fue de $0,51 \pm 0,19$ ítems/g_(peso húmedo), con concentraciones significativamente superiores en sitios con mayor grado de urbanización. En cambio, la concentración media de fibras no plásticas considerando tres sitios fue de $8,96 \pm 4,50$ ítems/g_(peso húmedo), con mayores concentraciones en los sitios no urbanizados. En general, las fibras plásticas resultaron transparentes o incoloras, y su composición fue mayoritariamente de PET (polietileno tereftalato). También se determinaron fibras de algodón, ambos componentes de origen textil. Si bien se comprobó la existencia de microplásticos, con concentraciones comparables a otras regiones similares de la costa argentina, los valores obtenidos no excedieron los niveles críticos de contaminación por microplásticos indicados en el hemisferio Norte. Dada la alta variabilidad en los patrones observados, es necesario profundizar los estudios a través de mayores y sostenidas frecuencias de muestreo, así como con la implementación de metodologías estandarizadas a fin de establecer interpretaciones y comparaciones de los resultados con aquellos obtenidos desde diferentes estudios nacionales e internacionales.

2. Introducción

Los plásticos son polímeros sintéticos de alto peso molecular derivados del petróleo, carbón y gas natural. Específicamente existen distintos tipos de polímeros plásticos y aditivos que pueden ser combinados en materiales que adquieren características propias. Los polímeros más comunes son el polietileno, polipropileno, poliestireno, poliamida, policloruro de vinilo o PVC, entre otros (Avio *et al.* 2017). La producción y consumo de plástico ha aumentado considerablemente durante las últimas décadas. Debido a su facilidad de fabricación, bajo costo, elevada resistencia a los productos químicos, al agua y a la temperatura, el plástico ha reemplazado a numerosos materiales tradicionales, tales como el vidrio, el cartón, el metal, la cerámica o la piedra (Shah *et al.* 2008, Thompson *et al.* 2009, Sharma y Chatterjee 2017). La durabilidad de los plásticos y su potencial uso en diversas aplicaciones fueron anticipados desde un comienzo, no así los problemas asociados con su manejo. Cantidades sustanciales de desechos plásticos se acumulan voluntaria e involuntariamente en ambientes naturales, contaminando los ecosistemas terrestres y marinos (Thompson *et al.* 2009). Si bien se desconoce con precisión la cantidad de plástico que ingresa al océano a partir de los residuos generados en tierra, Jambeck *et al.* (2015) estimaron entre 4,8 y 12,7 millones de toneladas métricas durante el año 2010. Alrededor de la mitad de los productos plásticos existentes poseen la capacidad de flotar en el agua de mar, y representan una alta proporción de los desechos costeros. En tal sentido, la contaminación por plásticos en las playas es una de las expresiones más visibles del impacto negativo de las actividades humanas (Claereboudt 2004). No obstante, se calcula que la carga total de plástico flotante detectable representa sólo entre 1 y 10% de la cantidad total de plástico que ingresa al océano, persistiendo el interrogante de dónde y en qué forma permanece el plástico remanente (Jambeck *et al.* 2015, Clark *et al.* 2016).

Progresivamente se está tomando conciencia de que por más grandes que sean los océanos, no poseen una capacidad infinita para absorber desechos humanos. La basura plástica ha sido reconocida como un contaminante emergente motivo de preocupación internacional y representa una amenaza para la vida en el mar y la seguridad alimentaria (Cole *et al.* 2011, Li *et al.* 2019). Si bien los meso y macroplásticos (partículas mayores a 5 mm según Lippiatt *et al.* 2013 y Eriksen *et al.* 2014) han recibido históricamente la mayor atención, la problemática de la contaminación es aún más compleja y en los últimos años se ha centrado el enfoque en las micropartículas y fibras plásticas, comúnmente denominadas microplásticos, los cuales están presentes en diferentes ambientes. Según su origen, los microplásticos se

clasifican en primarios y secundarios. Los primeros son partículas micrométricas utilizadas en la industria textil, como exfoliantes en cosméticos, como abrasivos industriales, entre otros, y llegan directamente al océano a través de la escorrentía y de los efluentes urbanos. Pero la mayor parte de los microplásticos en los océanos son derivados secundarios que provienen de la degradación y fragmentación de productos más grandes que de alguna u otra manera llegan al mar (Piha *et al.* 2011). Aunque no existe un acuerdo generalizado, el término microplástico engloba a las partículas plásticas con un tamaño menor de 5 mm (Avio *et al.* 2017, Sharma y Chatterjee 2017). Por otra parte, el término nanoplástico incluye partículas menores de 100 nm, las cuales se originan por la fragmentación de fibras sintéticas (ej. durante el lavado de prendas de vestir) o por el desgaste de los mencionados microplásticos (Sharma y Chatterjee 2017).

Dado que los estudios de detección de microplásticos en el ambiente marino son relativamente nuevos, no existe aún consenso respecto a un protocolo válido que permita determinar su presencia y abundancia. Estos protocolos implican una serie de pasos y detalles a tener en cuenta: sitios y estrategia de muestreo, tamaño de la muestra, almacenamiento de la muestra, solución de digestión, tamaño de poro de filtro, unidades de reporte, control de contaminación, etc. (Rochman *et al.* 2017, Li *et al.* 2019). Así mismo, se han desarrollado distintos métodos para la caracterización física y química de los microplásticos según el tamaño de la partícula, entre ellos: caracterización mediada por el uso de microscopio óptico o estereoscópico, tinción para microscopía de fluorescencia, microscopía electrónica de barrido/espectroscopia de rayos x de dispersión de energía, espectroscopia Raman o espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) y microFTIR (Torres Hernández 2017).

El actual interés y preocupación acerca de los microplásticos en los océanos radica en que los mismos pueden ingresar en las redes tróficas y transferirse desde los niveles inferiores o los niveles superiores. La ingestión de microplásticos por una amplia gama de organismos marinos puede provocar efectos letales o subletales en ellos (Clark *et al.* 2016, Avio *et al.* 2017, Shahnawaz *et al.* 2019). Por ejemplo, se ha detectado la absorción de perlas de nanopoliestireno en productores primarios (microalgas coloniales plantónicas) inhibiendo el proceso de fotosíntesis. Asimismo, se ha comprobado que la ingestión de microplásticos por el zooplancton interfiere en sus procesos fisiológicos tales como su tasa de alimentación y éxito reproductivo (Bhattacharya *et al.* 2010, Cole *et al.* 2013, Avio *et al.* 2017). En invertebrados bentónicos costeros (ej., crustáceos, equinodermos, poliquetos, moluscos, etc.) se han documentado efectos ecotoxicológicos tales como mortalidad, alteraciones en la función reproductiva (disrupción endócrina), neurotoxicidad, alteraciones fisiológicas y de

comportamiento, estrés oxidativo, efecto en la hemolinfa, genotoxicidad, entre otros (Avio *et al.* 2015, 2017, de Sá *et al.* 2018). Estos estudios, en su mayoría, han sido desarrollados en condiciones controladas de laboratorio donde las concentraciones de microplásticos fueron superiores a los niveles presentes en el ambiente. En cuanto a los vertebrados, los peces son el grupo más estudiado y son generalmente depredadores intermedios o que se encuentran en la cima de la red trófica, por lo tanto, pueden llegar a ingerir microplásticos directamente o mediante el consumo de presas que los contengan. En peces marinos se han descrito similares efectos ecotoxicológicos, así como una reducción en su rendimiento predatorio. Las aves y mamíferos marinos son los grupos menos estudiados respecto a la contaminación por microplásticos, no obstante, es también conocida la ingestión de macro y microplásticos por parte de ellos (Fossi *et al.* 2012, Herzke *et al.* 2016, de Sá *et al.* 2018, Perez-Venegas *et al.* 2020).

En particular, en estudios de laboratorio sobre bivalvos mitílicos se advirtieron efectos negativos en la tasa de filtración y, por consiguiente, en su alimentación al exponerlos a diferentes concentraciones de perlas de nanopoliestireno (Wegner *et al.* 2012). Además, hay evidencia de acumulación de partículas plásticas de entre 3 y 10 μm en los tejidos digestivos, translocación al sistema circulatorio y fuertes respuestas inflamatorias (Browne *et al.* 2008, von Moos *et al.* 2012).

Los estudios en el campo sobre las diferentes especies del género *Mytilus* son menos frecuentes que aquellos llevados a cabo en laboratorio (Avio *et al.* 2017). No obstante, Li *et al.* (2019) recopiló resultados de distintos trabajos llevados a cabo en el hemisferio norte donde la abundancia de microplásticos varió desde 0,05 hasta 259 ítems/g_(peso húmedo). Estos valores dispares pueden representar una variación de abundancia de microplásticos según el área, o también, se pueden atribuir a la diversidad de métodos utilizados en su cuantificación. Según Li *et al.* (2015) la abundancia de microplásticos en mejillones está estrechamente relacionada con la actividad humana, ya que mejillones de áreas con intensa actividad antrópica contienen concentraciones significativamente más altas.

Si bien la contaminación por microplásticos es un hecho que afecta a todos los océanos del planeta, es necesario llevar a cabo estudios locales o regionales que establezcan niveles de base, particularmente cuando el grado de contaminación depende del área de estudio. Específicamente en el Mar Argentino existe escasa información sobre la presencia y efectos de los microplásticos. La gran mayoría de los estudios sobre microplásticos han sido publicados a partir del año 2017. Ronda *et al.* (2021) señala un total de nueve trabajos desarrollados en ambientes marinos, seis de ellos utilizan matrices biológicas como indicadores, de los cuales particularmente tres refieren a tejidos blandos de mitílicos. Pérez *et al.* (2020) reportó un promedio de 8,6

ítems/individuo en el Canal de Beagle para el mejillón (*Mytilus chilensis*) y, por otro lado, Ríos *et al.* (2020) indicó una concentración media de 0,3 ítems/g_(peso húmedo) en la Península Valdés para la cholga (*Aulacomya atra*). Truchet *et al.* (2021), por su parte, indicó valores en la zona de Claromecó de entre 0,15 a 0,25 y 0,3 a 0,5 ítems/g_(peso húmedo) para las especies de mejillín *Brachidontes rodriguezii* y la almeja amarilla *Amarilladesma mactroides*, respectivamente. Trabajos más recientes están siendo desarrollados o se encuentran en proceso de publicación.

Los mitílidos han sido recomendados como excelentes indicadores locales de la contaminación por microplásticos en distintas zonas costeras (Fossi *et al.* 2018). Además, cumplen un rol importante como ingenieros ecosistémicos ya que pueden modificar la distribución de materiales y energía en el lugar en que se encuentran, creando un microhábitat único para el desarrollo y ocupación de varias especies de invertebrados intermareales (Bertness *et al.* 2006, Prado y Castilla 2006, Zaixso *et al.* 2015). Los mitílidos también forman parte de varias de las redes tróficas costeras (Bayne 1976, Gil y Zaixso 2008, Palomo *et al.* 2019).

Con el objeto de ampliar el escaso conocimiento que existe sobre el tema en nuestro país y, particularmente en la región costera más poblada de Patagonia (Comodoro Rivadavia, Rada Tilly y Caleta Olivia), el presente trabajo evalúa por primera vez la presencia y concentración de microplásticos y micropartículas no plásticas de origen antrópico en mejillones (*Mytilus platensis*) de la costa central de Golfo San Jorge.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

El objetivo general del presente Seminario es evaluar la presencia y concentración de micropartículas de origen antrópico, con especial atención a los microplásticos, en mitílidos de la especie *Mytilus platensis* de la zona central del Golfo San Jorge y su relación con áreas urbanizadas.

3.2. Objetivos específicos

- Evaluar diferentes técnicas de identificación de micropartículas.

- Caracterizar las micropartículas encontradas en tejidos blandos del mejillón *M. platensis* en función de su forma, tamaño, coloración y composición química.

- Determinar la concentración de micropartículas y evaluar cambios espaciales respecto a zonas con distinto grado de urbanización (Comodoro Rivadavia, Rada Tilly y alrededores).

4. Materiales y métodos

4.1. Área de estudio

El Golfo San Jorge es el accidente geográfico más amplio de la costa argentina, extendiéndose desde Cabo Dos Bahías (44°55'S, 60°32'O) hasta Cabo Tres Puntas (47°06'S, 65°52'O) y ha sido reconocido como una de las regiones prioritarias para las investigaciones oceanográficas, ecológicas y pesqueras del país (Góngora *et al.* 2012, St-Onge y Ferreyra 2018). La importancia que se le asigna radica en la gran diversidad de ambientes que posee, en su alta productividad y biodiversidad, en el alto valor y complejidad de los servicios que su ecosistema marino brinda a la sociedad, y en el hecho de ser un escenario clave en el transporte de hidrocarburos y potencial explotación petrolera "offshore" (Dans *et al.* 2020). El golfo está expuesto a presiones diversas, asociadas al creciente desarrollo urbano y al aumento sostenido de las actividades humanas y la explotación de recursos (Mincyt 2014). El mismo, recibe descargas de aguas residuales urbanas e industriales de las ciudades de Comodoro Rivadavia, Rada Tilly y Caleta Olivia, las cuales presentan escaso o nulo tratamiento (Mazón 2010, Verga *et al.* 2020). Comodoro Rivadavia es la ciudad más poblada del golfo y se caracteriza por presentar un territorio urbano disperso y fragmentado, atravesado por numerosos conflictos urbanísticos y ambientales relacionados con la actividad extractiva hidrocarburífera (Usach y Freddo 2015). Asimismo, en ciertos barrios costeros de la ciudad son comunes las actividades industriales, basurales clandestinos a cielo abierto, vertidos, efluentes cloacales y pluviales (Fig. 1), que determinan paisajes con alto grado de deterioro y contaminación (Raimondo 2010, Usach y Freddo 2015, Verga *et al.* 2020).

La localidad de Rada Tilly, con condiciones climáticas similares, no está exenta de las problemáticas ambientales de la región. La industria petrolera y los desagües cloacales mal diseñados que desembocan en el mar, son las principales causas de la grave contaminación que sufren las playas de la ciudad. Además, los desechos pesqueros y los basurales a cielo abierto que también terminan en el mar (Scavuzzo 2022).

La región presenta un clima dominado por escasas precipitaciones y fuertes vientos (media 32 km/h) predominantes del oeste que favorecen el arrastre de los desechos y la basura hacia el mar (Dans *et al.* 2020). El resultado final es una mayor contaminación de la costa atlántica afectando el océano, la flora, la fauna y la vida diaria de la sociedad (Scavuzzo 2022).



Figura 1: Diferentes tipos de impactos en zonas cercanas a las costas de las localidades de Comodoro Rivadavia y Rada Tilly.

4.2. Sitio de muestreo

Los sitios de muestreo seleccionados se encuentran en inmediaciones de las localidades de Comodoro Rivadavia y Rada Tilly (Fig. 2). Se escogieron cuatro sitios cuya morfología es de plataformas de abrasión, dos ubicadas en cercanías de las mencionadas localidades y otras dos alejadas de las mismas: restinga de Stella Maris (SM-Comodoro Rivadavia) y Falsa Punta del Marqués (RT-Rada Tilly) como sitios con evidente impacto antrópico (efluentes y basurales costeros próximos), y como sitios con menor grado de impacto antrópico: Playa Quinta Rossi (QR - 45° 40' S - 67° 21' O,

~15 km al norte de la zona urbanizada y próximo al acceso de Rocas Coloradas - Área Natural Protegida de la Provincia del Chubut) y Restinga de Punta Maqueda (MAQ - 46° 01' S - 67° 36' O, entre Rada Tilly y Caleta Olivia) (Fig. 2).

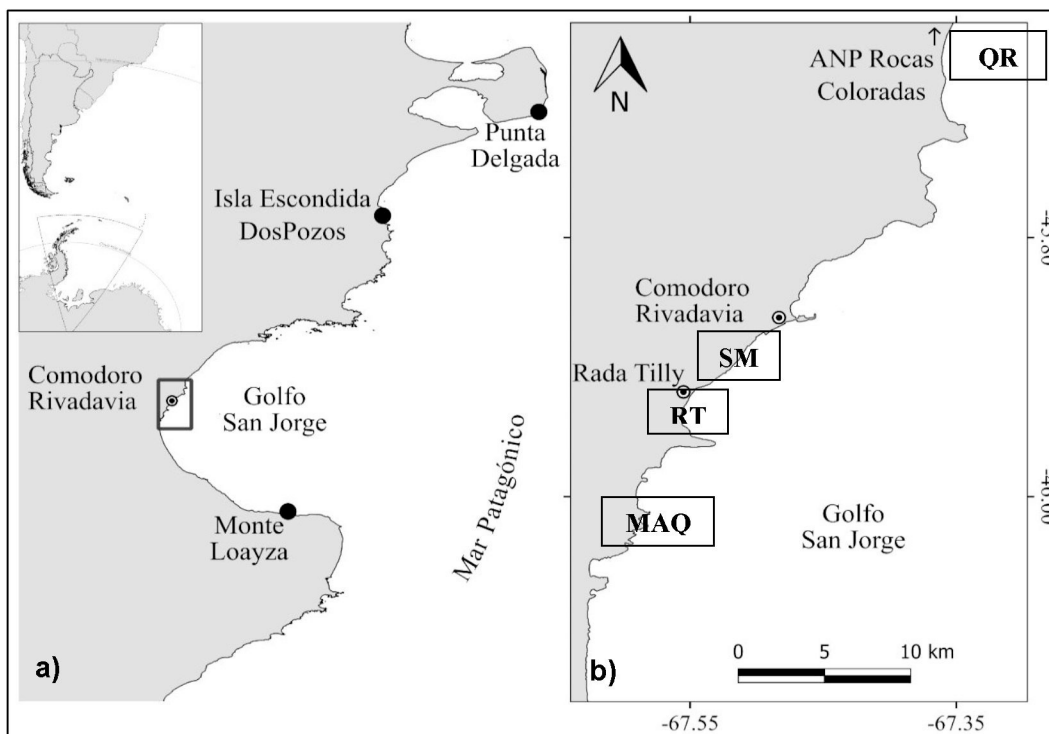


Figura 2: a) Límites del Golfo San Jorge. b) Zonas de muestreo: QR (Quinta Rossi), SM (Stella Maris), RT (Rada Tilly) y MAQ (Punta Maqueda).

En líneas generales, las plataformas de abrasión de los cuatro sitios de muestreo presentan condiciones ambientales similares con respecto a la orientación (Este), y grado relativo de exposición al oleaje (semiexpuestas a expuestas) y sobre ellas se desarrollan comunidades bentónicas diversas dominadas por el mejillín del sur *Perumytilus purpuratus* y en menor prevalencia el mejillón *Mytilus platensis* y la cholga *Aulacomya atra atra* hacia niveles inferiores de la restinga (Cabezas *et al.* 2007).

4.3. Muestreo

Con el objetivo de determinar y cuantificar la presencia de micropartículas de origen antrópico en invertebrados filtradores (mitílidos) del intermareal rocoso, en cada sitio se recolectó a mano alrededor de 50 mejillones de la especie *Mytilus platensis* provenientes de bancos mixtos durante febrero de 2021. A fin de complementar el presente trabajo en futuras instancias, también se tomaron muestras de mejillín (50

individuos) y cholga (30 individuos). Las muestras se tomaron durante marea baja de sicigia, y se almacenaron en recipientes de aluminio en freezer hasta su posterior análisis en laboratorio (Fig. 3). Los individuos recolectados tuvieron rangos de tallas similares y se recogieron de horizontes intermareales equivalentes entre los distintos sitios de muestreo (mesolitoral inferior para mejillón y mejillín e infralitoral superior para cholga). Dado que los sitios pueden presentar heterogeneidad ambiental, se realizaron muestreos aleatorios en al menos dos zonas dentro de cada sitio.



Figura 3: a): sitio y detalle de muestra Stella Maris (SM). b): sitio y detalle de muestra Rada Tilly (RT). c): mejillinar playa de Rada Tilly (RT). d): mejillones de playa Punta Maqueda (sitio MAQ).

4.3. Tratamiento de las muestras

En laboratorio se seleccionaron 15 mejillones por muestra, a los cuales, una vez descongelados en estufa y previo lavado exterior con agua destilada filtrada y extracción del biso, se les midió el largo máximo de valva usando calibre ($\pm 0,01$ mm) (Fig. 4). Los tejidos blandos de cada individuo fueron extraídos cuidadosamente de sus valvas con bisturí y pinzas y pesados con balanza a fin de obtener la concentración de microplásticos por unidad de peso (Fig. 4). Con el objeto de reducir los tiempos de digestión, luego del pesado se descartaron los músculos abductores. La metodología empleada para la digestión de los tejidos restantes corresponde a una adaptación de Li *et al.* (2015) en la cual los tejidos blandos fueron distribuidos en conjuntos (*pools*) de cinco individuos cada uno ($n=3$) para ser luego digeridos por 24-48 horas dentro de recipientes de vidrio (capacidad 1 l) utilizando 300 ml de una solución de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 30 % a 60 °C en estufa. Los recipientes fueron agitados periódicamente (Fig. 4).

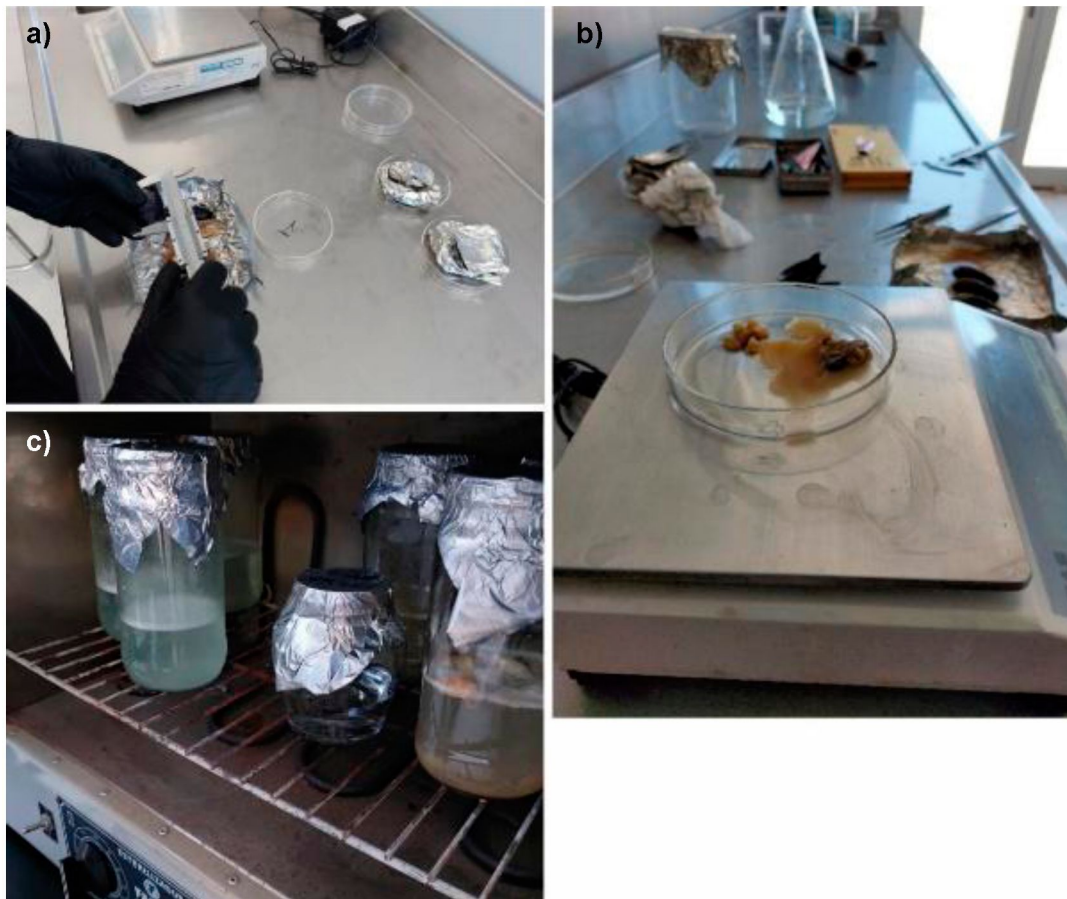


Figura 4: a): Medición de valvas de *M. platensis*. b): Pesaje de tejidos blandos. c): Digestión de tejidos blandos.

Transcurrido el tiempo óptimo de digestión, la solución obtenida fue filtrada a través de filtros de policarbonato de 10 μm de poro marca Osmonics, utilizando entre 5 y 11 filtros por muestra (*pool*). La filtración fue realizada a través de un tren de filtrado conectado a una bomba de vacío marca Arcano de $\frac{1}{4}$ Hp y 1 bar de presión, utilizando en simultaneo dos copas con sus respectivos filtros (Fig. 5). Los filtros resultantes del procedimiento ya optimizado fueron montados entre portaobjetos y cubreobjetos.

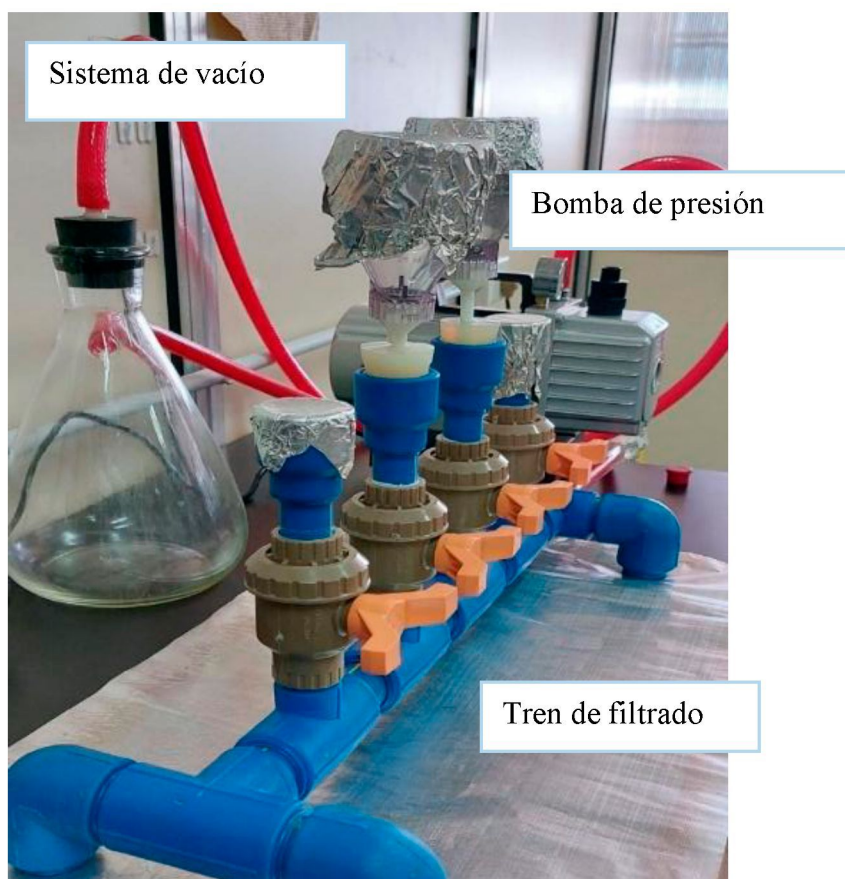


Figura 5: Dispositivo para realizar el filtrado de la solución obtenida luego de la digestión de los tejidos blandos de *M. platensis*.

A fin de poner a prueba diferentes técnicas de detección de microplásticos, de una misma muestra (SM) se obtuvieron dos *pools*, uno destinado de manera exploratoria a la detección por medio de técnicas de tinción de Rojo Nilo y otro destinado a la detección por medio de técnicas convencionales (microscopía óptica, lupa y método de aguja caliente, del inglés “*hot needle*”). Para el primer caso los filtros fueron teñidos con 2 o 3 gotas de colorante rojo Nilo para luego llevarlos a estufa a 60° C durante 10 minutos antes de su observación siguiendo el protocolo de Erni-Cassola (2017). El rojo Nilo es un colorante hidrófobo fluorescente, soluble en lípidos que, disuelto en etanol a una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ permite teñir las partículas de plástico

sin dañarlas (Erni-Cassola *et al.* 2017, Torres Hernández 2018). Además, de manera exploratoria se utilizaron diferentes materiales plásticos y no plásticos conocidos para evaluar la técnica de tinción y *hot needle*.

Los filtros del segundo *pool* y de los demás sitios fueron montados entre porta y cubreobjetos y almacenados en cajas de Petri de vidrio para luego ser analizados mediante las técnicas convencionales.

En todos los pasos se tuvo sumo cuidado para tratar de evitar la contaminación por microplásticos externos a la muestra en el laboratorio, entre otras medidas: uso de guardapolvo de algodón y guantes de nitrilo, el material y equipamiento utilizado fue lavado con agua destilada y con alcohol. Todo material líquido empleado (agua destilada, peróxido de hidrogeno, etanol, etc.) fue previamente filtrado a través de filtros de fibra de vidrio de 0,7 μm de poro marca Whatman. Además, se realizaron blancos procedimentales durante la digestión, durante el filtrado y durante el análisis de las muestras (Torres Hernández 2018, Dehaut *et al.* 2019).

4.4. Identificación y caracterización de microfibras

A modo exploratorio y a fin de detectar las partículas de plástico contenidas en los filtros teñidos con rojo Nilo se utilizó un microscopio equipado con epifluorescencia marca Zeiss Standard 50 provisto con un epicondensador de fluorescencia (IV-FI), objetivos Neofluar, una lámpara halógena 12V 100W y una caja reflectora para excitación en azul-violeta la cual emite a 495 nm de longitud de onda.

La identificación y cuantificación sistemática de microplásticos y partículas no plásticas de origen antrópico se realizó aplicando métodos ópticos, de deformación por aguja caliente (*hot needle*) y posterior validación por espectroscopia RAMAN. Se trabajó así con muestras independientes utilizando los filtros sin teñir. Para ello, se utilizó un microscopio óptico (MO) marca Olympus modelo BX51 con una cámara montada Olympus modelo DP71 (Fig. 6). En una primera etapa las partículas se asignaron a categorías plásticas y no plásticas según aspectos morfológicos según recomendaciones citadas por Lusher *et al.* (2020). Los presuntos materiales plásticos y una fracción de no plásticos fueron fotografiados y marcados en el preparado y posteriormente, utilizando microscopio estereoscópico (ME) marca Olympus SZX16, fueron sometidos a la prueba de aguja caliente para comprobar si se trataba de microplásticos o partículas no plásticas. Los microplásticos se derriten rápidamente, mientras que las partículas no plásticas se carbonizaban (De Witte *et al.* 2014, Lusher *et al.* 2017, 2020).



Figura 6: Observación de partículas al Microscopio óptico (arriba a la izquierda se observa la toma de fotografía).

Las partículas no plásticas se contabilizaron en tres de los cuatro sitios (MAQ, QR y RT) por lo que solo se exhiben resultados descriptivos. Por otro lado, una submuestra de 20 presuntos microplásticos y de microfibras no plásticas fueron seleccionadas y enviadas al Instituto de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de Materiales (INTEMA) de la Universidad Nacional de Mar del Plata para su análisis por espectroscopia RAMAN mediante Microscopio Confocal acoplado a espectrómetro Raman, marca Renishaw, modelo inVia con el objeto de validar su composición química.

Se caracterizó el color, textura y forma (fibras o fragmentos) de todas las partículas y sobre las fotografías tomadas a una submuestra de 323 se realizó la caracterización morfométrica (longitud y ancho) a través del software ImageJ (Abràmoff *et al.* 2004). Las fibras se definieron como partículas sustancialmente más largas que anchas mientras que como fragmentos se consideraron aquellas partículas irregulares de formas variables sin el predominio de un eje o dimensión (Lusher *et al.* 2020).

4.5. Análisis estadístico

En una primera instancia y con el objeto de verificar la adecuada conformación de los *pools* de mejillones utilizados para la detección de microplásticos se realizó un análisis exploratorio sobre los tamaños corporales (longitud de la valva) discriminado

por sitio y condición de impacto antrópico que consistió en el cálculo de estadísticos de posición y dispersión junto con la interpretación y análisis de métodos gráficos (histogramas y *box-plot*). Además, se examinó la variabilidad en el índice de condición entre los sitios a través de un modelo de análisis de la covarianza de una entrada (ANCOVA). El modelo consideró el peso húmedo como variable respuesta, la talla como covariable y los sitios como factor fijo. Se realizaron comparaciones ortogonales utilizando coeficientes polinomiales para contrastar entre sitios urbanizados versus no urbanizados, entre sitios urbanizados y entre sitios no urbanizados. Se verificaron los supuestos de homogeneidad de varianzas (Levene), normalidad (análisis de residuales) y homogeneidad de pendientes para el análisis del ANCOVA y se verificó la condición de ortogonalidad en los contrastes (Sokal y Rholf 1995).

Con el objetivo de describir la morfometría de las fibras plásticas y no plásticas se realizaron análisis exploratorios descriptivos de las variables longitud y ancho de las mismas por sitio, y por tipo de condición de cada sitio (urbanizado vs. no urbanizado).

Se estimó la concentración de microplásticos por individuos y por peso húmedo, se calcularon mínimos, máximos y medias indicando su desvío estándar (\pm DE). En el caso de los valores expresados por individuos se realizó un análisis descriptivo sin pruebas formales de hipótesis dado que puede estar sesgado por el tamaño o peso de los mejillones. Para los valores expresados por peso húmedo se realizaron pruebas de ANOVA de una entrada con contrastes ortogonales para analizar escalas de variabilidad espacial y su relación con zonas urbanizadas. Los datos fueron transformados a raíz cuadrada dada la relación lineal encontrada entre las medias y sus varianzas y a la naturaleza de la variable respuesta (conteo en una variable continua; distribución de Poisson (Underwood 1997, Sokal y Rholf 1995). Se comprobó la homogeneidad de varianzas mediante el test de Levene, y se inspeccionó la distribución normal de los residuales a través de métodos gráficos (gráficos P-P).

Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software de análisis *Statistica 8.0* (StaSoft) y en todos ellos se utilizó un nivel de significación de 5%.

5. Resultados

5.1. Conformación de los *pools* de mejillón (talla e índice de condición)

El análisis exploratorio indicó que el tamaño de los mejillones (longitud de las valvas) utilizados en los procedimientos analíticos osciló entre 41,5 y 56,3 mm con una media de $46,87 \pm 3,55$ mm (\pm DE; n=60) (Fig. 7). La longitud media de las valvas entre los sitios estudiados osciló entre 44,46 y 48,81 mm siendo relativamente homogénea la conformación de los *pools* de mejillones entre sitios urbanizados y no urbanizados (Tabla 1). Se observó cierta variabilidad menor en la conformación de los *pools* de mejillones dentro de cada sitio (Fig. 8).

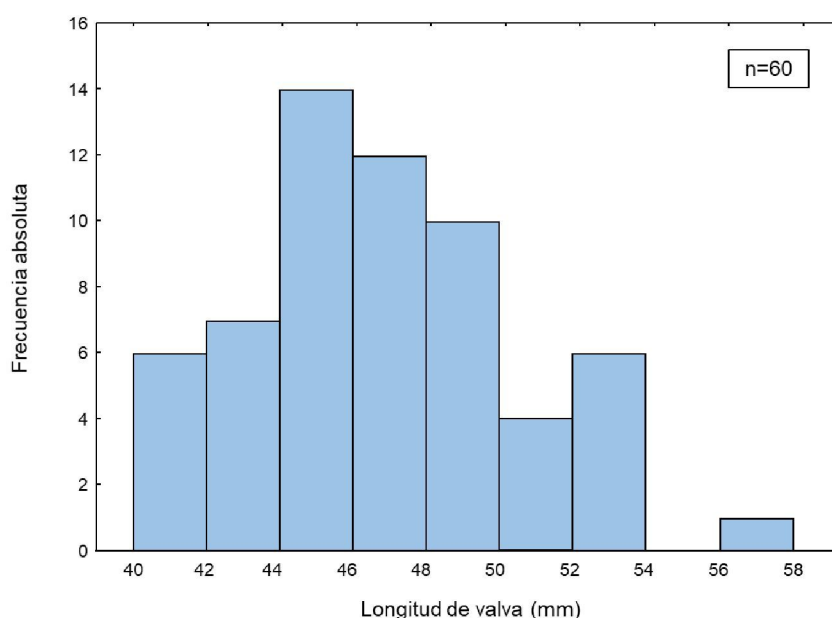


Figura 7: Histograma de frecuencias absolutas de la talla de mejillón.

Tabla 1: Mínimos, máximos y media de la longitud de valva de los individuos muestreados. DE: desvío estándar. IC 95%: intervalo de confianza. Longitud de la valva en mm.

	n	Mínimo	Máximo	Media \pm DE	IC 95%	
					inferior	superior
Urbanizado						
SM	15	41,50	48,50	$44,46 \pm 1,87$	43,43	45,50
RT	15	43,90	53,60	$48,83 \pm 2,86$	47,24	50,41
<i>Pool</i>	30	41,50	53,60	$46,66 \pm 3,25$	45,43	47,86
No urbanizado						
MAQ	15	41,60	49,50	$45,39 \pm 2,63$	43,93	46,84
QR	15	41,90	56,30	$48,81 \pm 4,23$	46,47	51,15
<i>Pool</i>	30	41,60	56,30	$47,10 \pm 3,87$	45,65	48,55

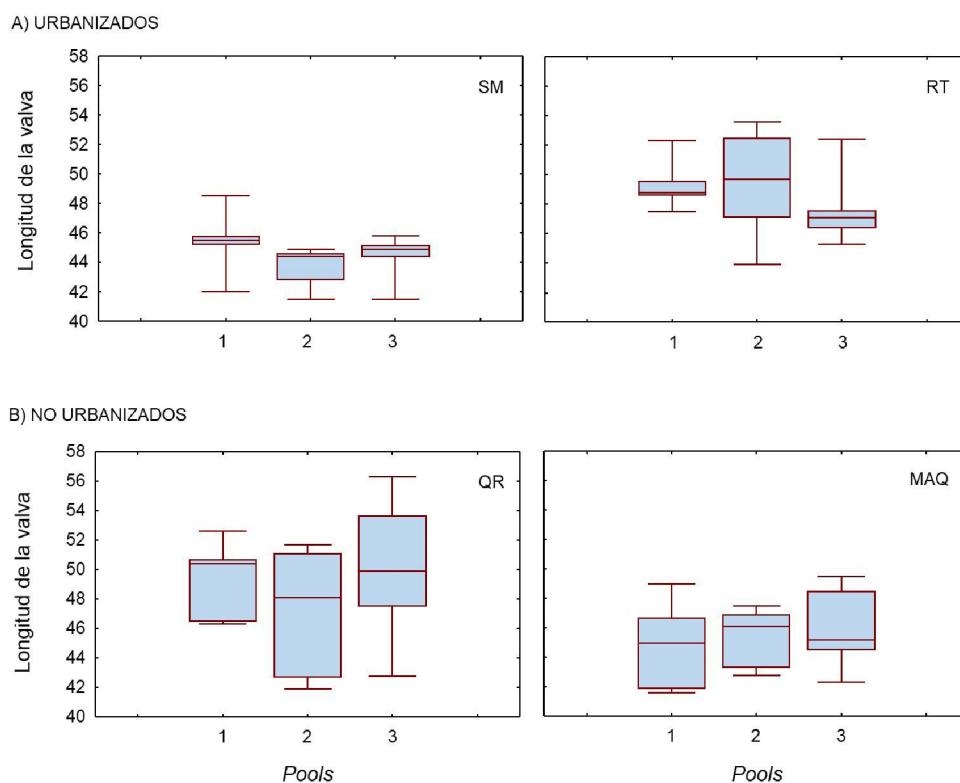


Figura 8: Variabilidad en la longitud de las valvas (mm) del mejillón entre sitios estudiados y dentro de cada *pool* de individuos (*Box plot*). A) sitios urbanizados. B) sitios no urbanizados. SM (Stella Maris), RT (Rada Tilly), QR (Quinta Rossi) y MAQ (Punta Maqueda).

El índice de condición corporal de los mejillones, medido a través del análisis de pesos húmedos medios ajustados por el efecto del tamaño corporal (Fig. 9), indicó variabilidad entre los sitios evaluados (Tabla 2). Las comparaciones ortogonales polinomiales no encontraron diferencias significativas en las medias ajustadas entre los sitios urbanizados y los sitios no urbanizados, observándose la mayor variabilidad dentro de los sitios no urbanizados (QR > MAQ; Tabla 2).

Tabla 2: Índice de condición del mejillón: Modelo de ANCOVA con discriminación de contrastes polinomiales. FV: Fuentes de variación gl: grados de libertad. SC: suma de cuadrados. SM: cuadrados medios. F: estadístico de F. p: probabilidad.

FV	gl	SC	SM	F	P
Longitud de valva	1	10,25	10,25	22,9	< 0,001
Sitios	3	7,64	2,55	5,69	< 0,001
Urb vs No Urb	1	1,2	1,2	2,68	0,107
e/ Urbanizados	1	1,63	1,63	3,63	0,062
e/ No Urbanizados	1	3,74	3,74	8,35	0,006
Residual	55	24,61	0,45		
Total	59	48,46			

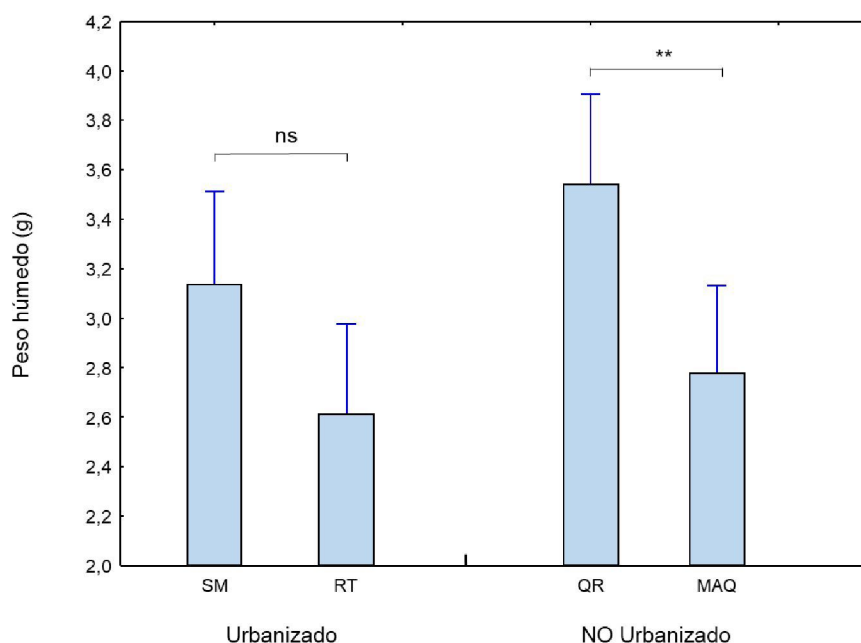


Figura 9: Medias ajustadas de pesos húmedos de mejillón (tejidos blandos) discriminados por sitios urbanizados y no urbanizados. SM (Stella Maris), RT (Rada Tilly), QR (Quinta Rossi) y MAQ (Punta Maqueda). Se indican diferencias significativas según contraste ortogonal polinomial (Tabla 2), ns: no significativo; *: $0,01 < p < 0,05$; **: $0,001 < p < 0,01$; ***: $< 0,001$. Talla de ajuste: 46,9 mm.

5.2. Validación de la metodología utilizada. Identificación y caracterización de micropartículas

5.2.1. Digestión de las muestras

La digestión con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) de los tejidos blandos de *Mytilus platensis* presentó inconvenientes en los primeros ensayos. Transcurridas 24 horas la materia orgánica no se degradaba totalmente y se observaban “grumos” en la solución resultante, los cuales obstruían los filtros. Debido a esto se optó por hacer agitaciones periódicas cada 6 horas durante la digestión y prolongar 24 horas más el proceso. Por otro lado, fue necesario filtrar la solución digerida sin dejar transcurrir más de un día finalizada la etapa de digestión.

5.2.2. Identificación y validación de micropartículas

La utilización del colorante rojo Nilo para la detección de microplásticos por fluorescencia no arrojó los resultados esperados. En principio, partículas presumiblemente plásticas, dada su fluorescencia en la longitud de onda del color verde, no demostraron ser plásticos al ser testeadas por el método de aguja caliente.

Por otra parte, preparados que no fueron teñidos y que contenían partículas plásticas y no plásticas conocidas, presentaban o no fluorescencia de manera indistinta al ser observadas con microscopia de epifluorescencia (Fig. 10).

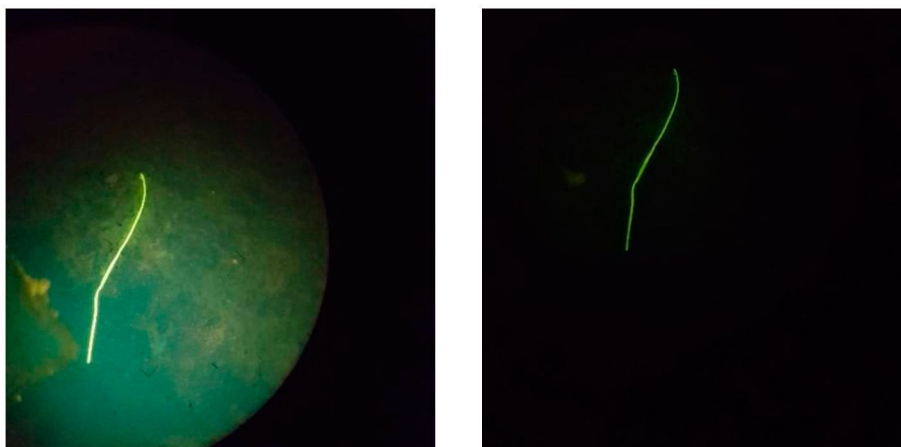


Figura 10: Fibra testeada como no plástica (en ambas fotos se observa la misma fibra) observada al microscopio equipado con epifluorescencia (400x). Obsérvese el detalle de fluorescencia siendo una partícula no plástica.

Agotada la instancia de experimentación con la tinción de rojo Nilo se aplicó el método óptico y de *hot needle* (aguja caliente) sobre las partículas, en donde se observó que los microplásticos se derretían o fundían rápidamente. En cambio, las partículas no plásticas se carbonizaban, observando las “cenizas” remanentes y un color negro grisáceo característico. En total se encontraron 1716 partículas, de las cuales 70 resultaron plásticas, lo que corresponde a un 4,08% (Fig. 11 y 12).

La validación de una submuestra de 20 partículas por espectroscopia RAMAN indicó que la composición de las mismas fue mayoritariamente PET (polietileno tereftalato) y algodón. Ambos componentes indican además fibras de origen textil. Algunas muestras presentaron, además de picos de PET o de algodón, otros picos atribuidos a colorantes. En las figuras 13 y 14 se muestran los espectros adquiridos y el de la base de datos que soportó su asignación.

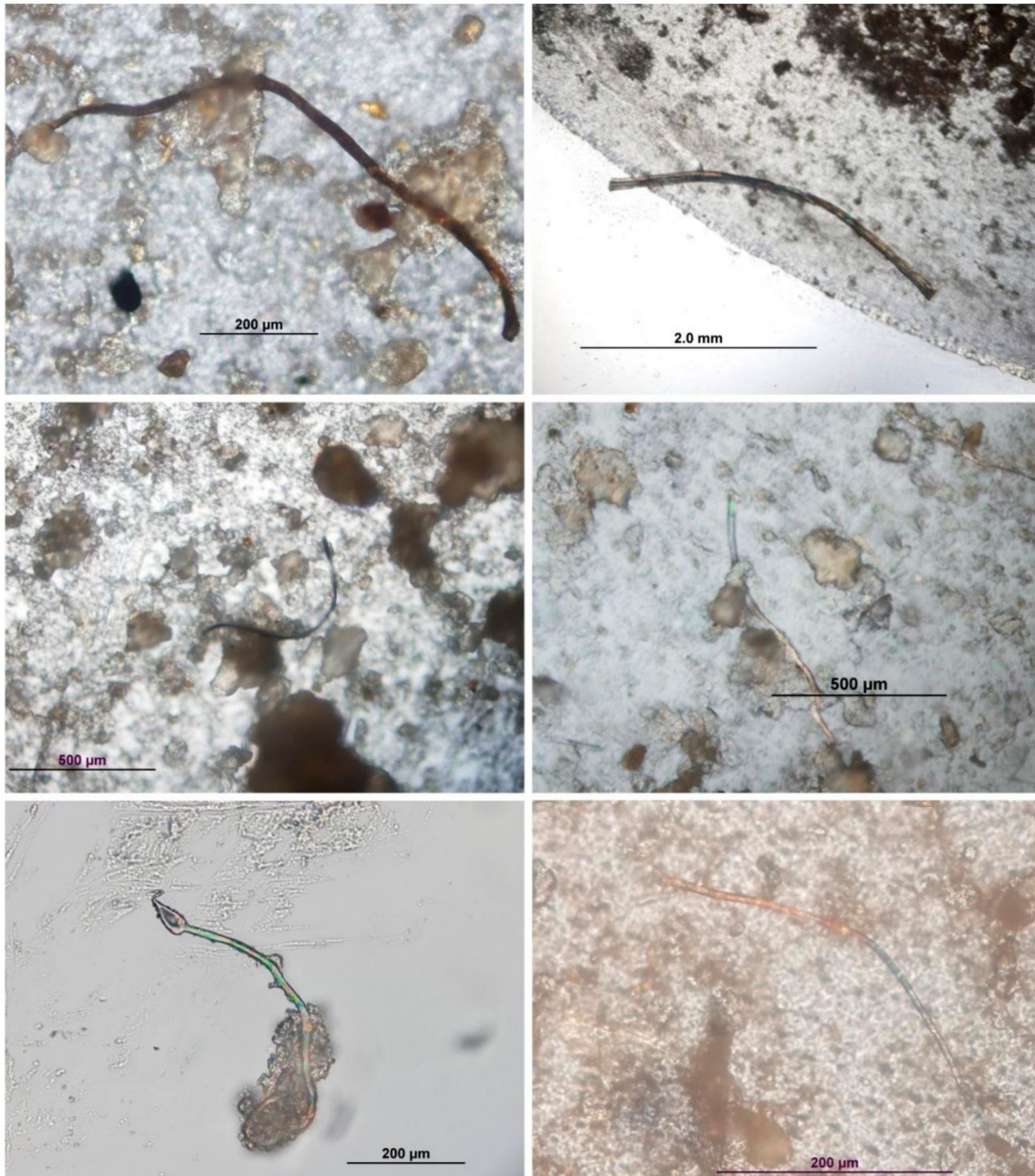


Figura 11: Fotomicrografías de fibras plásticas. Obsérvese el aspecto “liso” de las fibras y sus extremos acabados. Abajo, a la izquierda, una fibra parcialmente quemada con aguja caliente.

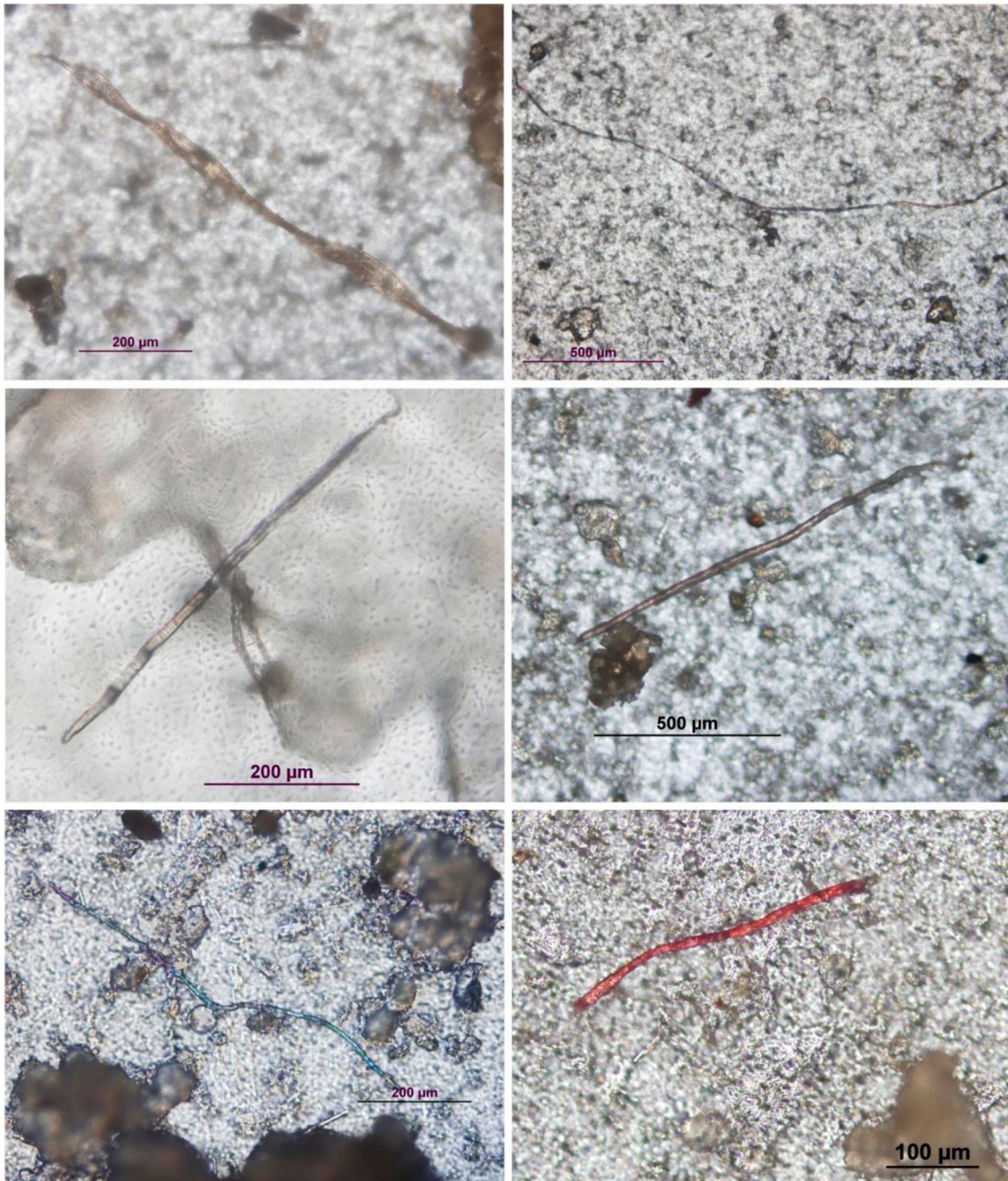


Figura 12: Fotomicrografías de fibras no plásticas. Se aprecian diferentes grosores y formas. Obsérvese el aspecto “rugoso” de las fibras, secciones aplanadas y extremos irregulares

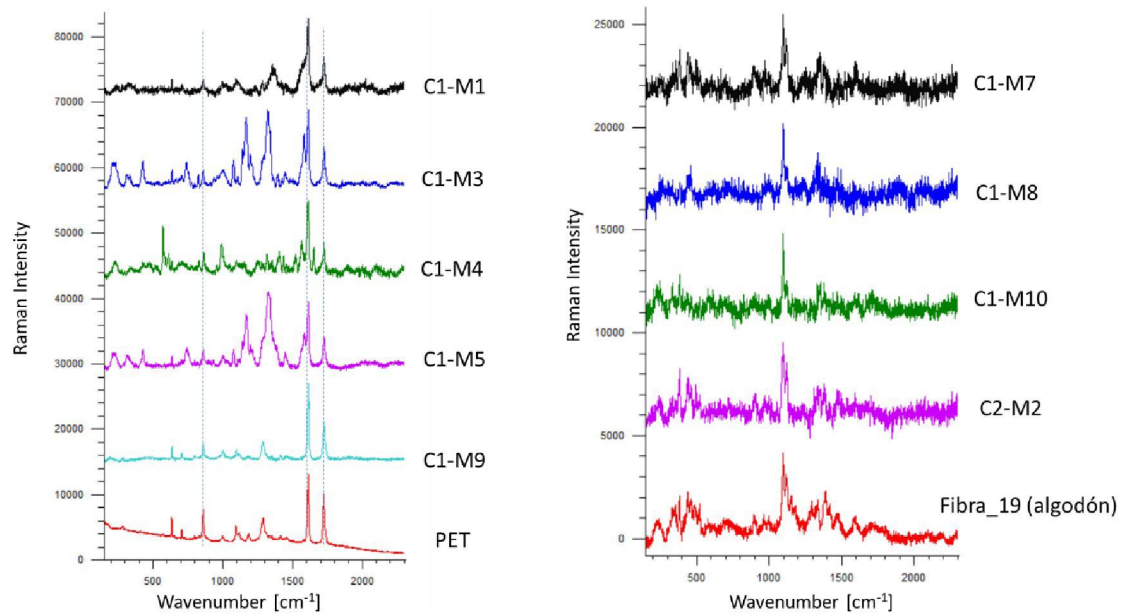


Figura 13: Resultados de espectroscopia de RAMAN. Se observan los espectros de las partículas enviadas para su validación y la identificación según la base de datos en la parte inferior de cada gráfico. Izquierda, PET. Derecha, fibra de algodón.

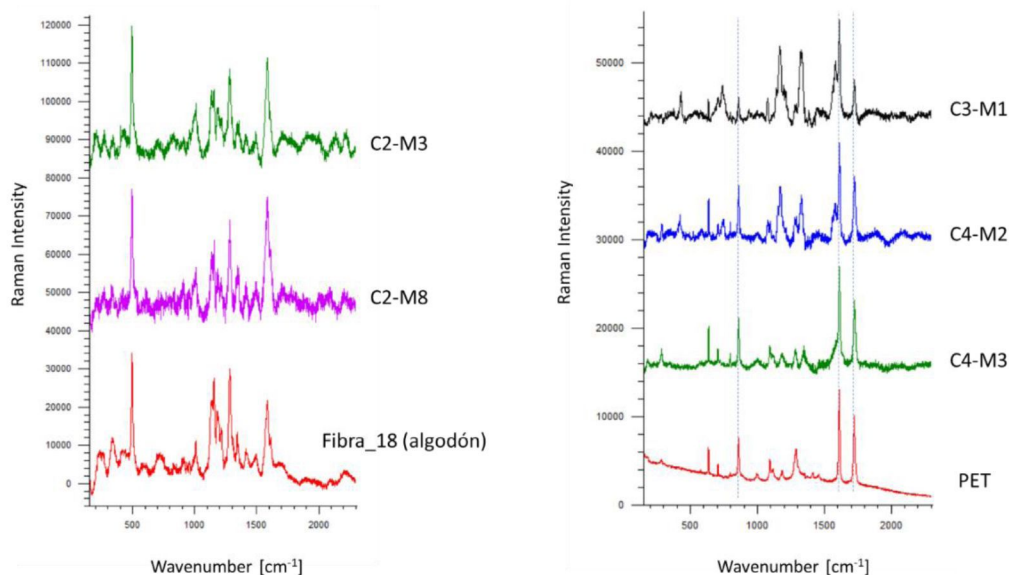


Figura 14: Resultados de espectroscopia de RAMAN. Se observan los espectros de la base de datos en la base de cada gráfico. Izquierda, fibra de algodón. Derecha, PET.

De las 20 fibras analizadas, 13 se consideraron inicialmente plásticas y 7 no plásticas utilizando los métodos ópticos y testeó por aguja caliente antes señalados. Del total de 13 fibras consideradas plásticas, 8 fueron validadas como PET (Polietileno Tereftalato), una no pudo ser localizada, dos fueron validadas como fibras no plásticas (algodón de origen textil) y las dos restantes no arrojaron datos concluyentes, pero presumiblemente también serían algodón. De las 7 fibras consideradas inicialmente

como no plásticas, una no se pudo localizar y 6 fueron identificadas como fibras de origen textil de naturaleza no plástica (Fig. 15).

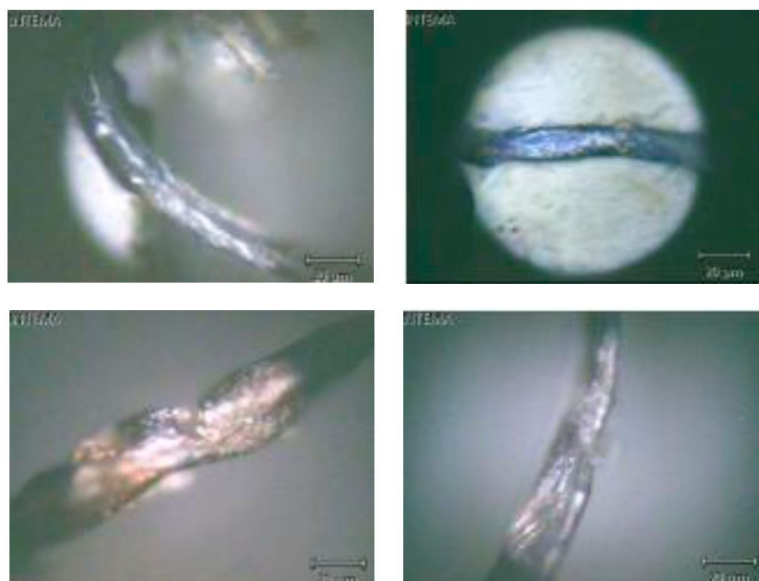


Figura 15: Detalle de fibras que fueron sometidas a prueba RAMAN. Arriba fibras identificadas como PET. Abajo: fibras de algodón.

Los métodos de reconocimiento visual y aguja caliente utilizados sobre las partículas presumiblemente plásticas y no plásticas, tuvieron una efectividad del 78% (n=18) contrastándolos con la espectroscopia RAMAN. El porcentaje restante se atribuye en un 11% a no comprobables y en un 11% a error de identificación por los métodos usados en el laboratorio.

5.2.3. Caracterización morfológica y morfométrica

La mayoría de las partículas encontradas fueron fibras (significativamente más largas que anchas) y, un reducido número (tres) se observó en forma de fragmentos irregulares (n=1716). La caracterización morfométrica de una submuestra (323 partículas fotografiadas) indicó fuerte asimetría positiva en su distribución de tamaños, siendo las fibras no plásticas significativamente de mayor longitud que las fibras plásticas (prueba U de Mann-Whitney $Z=-4,31671$, $p < 0,001$; Fig. 16). Las fibras plásticas tuvieron un largo y ancho medio de $497,57 \pm 306,15$ y $13,70 \pm 15,03 \mu\text{m}$, respectivamente, y las partículas no plásticas una media de $753,52 \pm 559,93$ y $14,40 \pm 9,07 \mu\text{m}$ para su largo y ancho, respectivamente (Tabla 3). Las longitudes y anchos medios tuvieron variabilidades similares entre los diferentes sitios. La longitud media de

las fibras plásticas y no plásticas se visualizaron levemente incrementada en sitios urbanizados con respecto a los sitios no urbanizados (Tabla 3; Fig. 17).

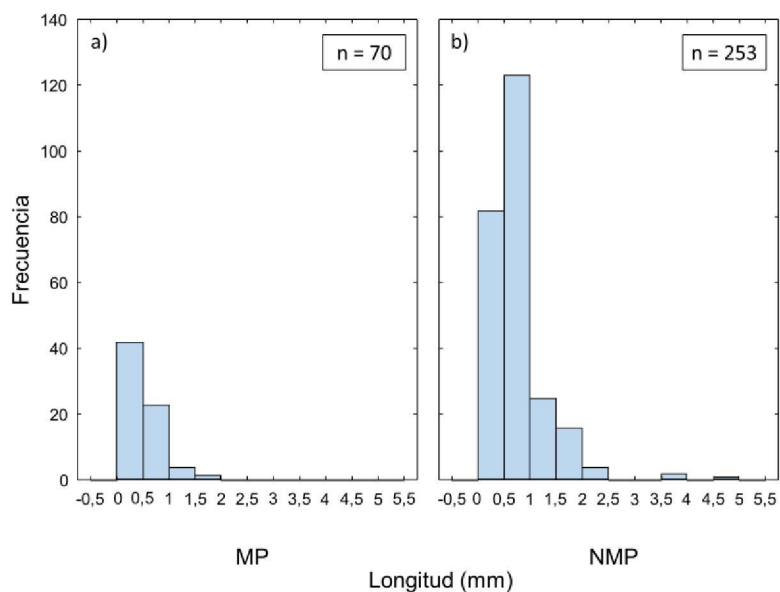


Figura 16: Distribución de frecuencias de longitud de fibras (mm). a) plásticas (MP) y b) no plásticas (NMP).

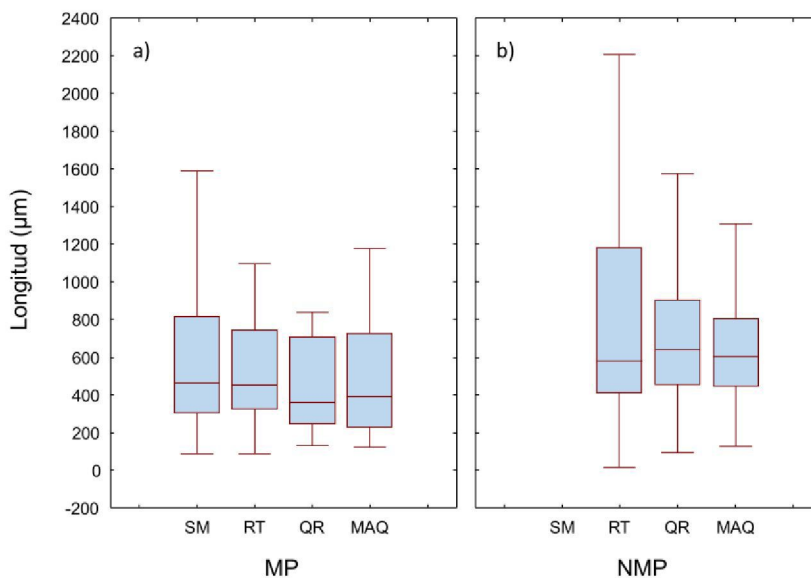


Figura 17: Grafico *box-plot* de las longitudes de las fibras por sitio, teniendo en cuenta su naturaleza. a): fibras plásticas (MP). b): fibras no plásticas (NMP).

Tabla 3: Longitud y ancho de las fibras A) plásticas y B) no plásticas halladas en *Mytilus platensis*. Se muestran mínimos y máximos. DE: desvío estándar.

A) Fibras plásticas

	Longitud fibra (µm)				Ancho fibra (µm)			
	n	Min	Max	Media ± DE	n	Min	Max	Media ± DE
Urbanizado								
SM	10	89,61	1589,91	574,47 ± 450,39	10	6,73	22,81	13,33 ± 4,69
RT	23	122,13	1179,23	486,39 ± 316,41	23	5,29	31,15	13,99 ± 6,57
Pool	33	89,61	1589,91	513,08 ± 357,17	33	5,29	31,15	13,79 ± 5,99
No urbanizado								
MAQ	20	87,02	1097,49	511,63 ± 262,06	20	5,61	16,69	10,75 ± 3,05
QR	17	132,83	840,5	450,91 ± 253,87	17	3,15	130,24	16,98 ± 29,49
Pool	37	87,02	1097,49	483,73 ± 256,57	37	3,15	130,24	13,61 ± 20,03
Total	70	87,02	1589,91	497,57 ± 306,15	70	3,15	130,24	13,70 ± 15,03

B) Fibras no plásticas

	Longitud fibra (µm)				Ancho fibra (µm)			
	n	Min	Max	Media ± DE	n	Min	Max	Media ± DE
Urbanizado								
SM	-	-	-	-	-	-	-	-
RT	43	14,95	4624,22	941,36 ± 915,49	43	6,88	74,56	17,13 ± 11,13
Pool	43	14,95	4624,22	941,36 ± 915,49	43	6,88	74,56	17,13 ± 11,13
No urbanizado								
MAQ	108	129,08	2175,211	665,61 ± 367,69	108	3,32	98,56	14,74 ± 10,46
QR	102	93,01	3749,231	767,42 ± 516,72	102	1,82	32,91	12,89 ± 5,68
Pool	210	93,01	3749,231	715,06 ± 448,16	210	1,82	98,56	13,84 ± 8,51
Total	253	14,949	4624,223	753,52 ± 559,93	253	1,82	98,56	14,4 ± 9,07

En cuanto a la morfología de las partículas, la “textura” de las formas plásticas se observaron al MO como de aspecto “liso”, con o sin brillo, y con extremos acabados, mientras que las formas no plásticas mostraron, generalmente, irregularidades en sus extremos, secciones aplanadas y un aspecto “rugoso” (Figs. 11 y 12). Respecto a la coloración de las fibras plásticas y no plásticas observadas al ME se observó una predominancia de partículas incoloras. En menor proporción se presentaron algunos colores; entre ellos, azul, violeta, amarillo y negro, este último opaco a diferencia de los demás colores que fueron, en general, translucidos (Tabla 4).

Tabla 4: Porcentajes de fibras plásticas (MP) y no plásticas (NMP) según su coloración observado con microscopio estereoscópico en cada sitio de muestreo.

	QR		SM		RT		MAQ	
	MP	NMP	MP	NMP	MP	NMP	MP	NMP
incolora	90,00%	99,64%	100,00%	-	70,00%	98,97%	75,00%	96,53%
negro	10,00%	0,12%	-	-	25,00%	1,03%	18,75%	0,79%
azul	-	-	-	-	5,00%	-	6,25%	-
amarilla	-	0,12%	-	-	-	-	-	2,68%
violeta	-	0,12%	-	-	-	-	-	-

5.3. Concentración de micropartículas en tejidos blandos de *Mytilus platensis*

Los resultados cuantitativos indicaron la presencia de fibras plásticas y no plásticas (ej.: algodón) de origen antrópico en los cuatro sitios examinados. La concentración media de microplásticos (MP), considerando los cuatro sitios, fue de $0,51 \pm 0,19$ ítems/g_(peso húmedo). En cambio, la concentración media de fibras no plásticas (NMP) considerando tres sitios (MAQ, QR y RT) fue de $8,96 \pm 4,50$ ítems/g_(peso húmedo) (Tabla 5a). Las concentraciones expresadas en ítems por individuos se indican también en Tabla 5.

Tabla 5: Concentración de partículas plásticas (A) y no plásticas (B) en mejillones expresadas en ítems/individuo y en ítems/g_(peso húmedo) según sitio y grado de urbanización de la zona central del Golfo San Jorge.

A) Fibras plásticas									
	ítems/individuo				ítems/g _(peso húmedo)				
	n	Min	Max	Media ± DE	n	Min	Max	Media ± DE	
Urbanizado									
SM	3	0,60	2,20	1,40 ± 0,80	3	0,41	0,86	0,65 ± 0,23	
RT	3	0,80	1,40	1,13 ± 0,31	3	0,47	0,71	0,56 ± 0,13	
Pool	6	0,60	2,20	1,27 ± 0,56	6	0,41	0,86	0,61 ± 0,17	
No urbanizado									
MAQ	3	0,80	1,80	1,27 ± 0,50	3	0,33	0,70	0,49 ± 0,19	
QR	3	1,00	1,40	1,20 ± 0,20	3	0,27	0,36	0,31 ± 0,05	
Pool	6	0,80	1,80	1,23 ± 0,34	6	0,27	0,70	0,40 ± 0,16	
Total	12	0,60	2,20	1,25 ± 0,44	12	0,27	0,70	0,51 ± 0,19	
B) Fibras no plásticas									
	ítems/individuo				ítems/g _(peso húmedo)				
	n	Min	Max	Media ± DE	n	Min	Max	Media ± DE	
Urbanizado									
SM	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	
RT	3	4,80	19,00	11,80 ± 7,10	3	2,80	8,18	5,61 ± 2,69	
Pool	3	4,80	19,00	11,80 ± 7,10	3	2,80	8,18	5,61 ± 2,69	
No urbanizado									
MAQ	3	23,00	37,40	29,07 ± 7,46	3	8,98	15,62	11,46 ± 3,63	
QR	3	12,20	54,60	37,73 ± 22,49	3	3,27	14,15	9,82 ± 5,77	
Pool	6	12,20	54,60	33,40 ± 15,72	6	3,27	15,62	10,67 ± 4,40	
Total	9	4,80	54,60	26,20 ± 16,84	9	2,80	15,62	8,96 ± 4,50	

El análisis de la varianza con contrastes ortogonales planeados arrojó diferencias significativas entre sitios urbanizados (SM y RT) respecto a sitios no urbanizados (MAQ y QR) ($p < 0,05$) (Tabla 6). Los sitios urbanizados (SM y RT) presentaron una mayor concentración de fibras plásticas que los sitios no urbanizados (MAQ y QR). Los sitios SM y RT registraron una media de $0,65 \pm 0,23$ y $0,56 \pm 0,13$ ítems/g_(peso húmedo) respectivamente. En comparación, los sitios no urbanizados MAQ y QR registraron una media de $0,49 \pm 0,19$ y $0,31 \pm 0,05$ ítems/g_(peso húmedo) respectivamente.

En el caso de las fibras no plásticas, los datos fueron más variables y si bien no se realizaron inferencias estadísticas dada la asimetría del diseño (ausencia de datos de SM donde se encuentra un efluente urbano cercano) y la alta variabilidad, se observó una mayor concentración en los sitios no urbanizados (MAQ y QR: $\bar{x} = 11,46 \pm 3,63$ y $9,82 \pm 5,77$ ítems/g_(peso húmedo)), respectivamente, en relación al sitio urbanizado RT donde la concentración media registrada fue de $5,61 \pm 2,69$ ítems/g_(peso húmedo) (Tabla 5).

Tabla 6: Variación de la concentración de partículas plásticas entre sitios urbanizados y no urbanizados. ANOVA con comparaciones planeadas a través de contrastes polinomiales. FV: fuentes de variación sc: suma de cuadrados, gl: grados de libertad: cm: cuadrado medio, f: valor de f, p: probabilidad asociada al estadístico F.

FV	SC	gl	CM	F	p
Sitios	0,096	3	0,03	2,67	0,11
Urb vs No Urb	0,065	1	0,065	5,46	0,04
e/ Urbanizados	0,004	1	0,004	0,33	0,58
e/ No Urbanizados	0,027	1	0,027	2,23	0,17
Residual	0,095	8	0,012		
Total	0,191	11			

6. Discusión

La cuantificación de microplásticos en matrices biológicas puede realizarse a nivel individual o combinando muestras biológicas individuales como se realizó en este seminario (Pérez *et al.* 2020, Ronda *et al.* 2021). El análisis de la información dispuesta en muestreos compuestos (*pools*) permite reducir costos e incrementar el número de individuos totales que se examinan en el estudio. Sin embargo, la combinación de muestras puede ocultar la variación biológica e introducir sesgos, especialmente cuando los individuos que conforman la muestra compuesta (*pool*) presentan diferencias en sus edades o tamaños corporales (Caudill 2010, 2011). La variabilidad observada en la conformación de los *pools* dentro de cada sitio y entre sitios sugiere características de tamaño corporal variables pero similares en los grupos a contrastar lo cual indica una adecuada distribución procedimental de individuos. El índice de condición, medido a través del peso de sus partes blandas y ajustado por el efecto del tamaño corporal o su peso total, ha sido utilizado ampliamente para examinar características nutricionales y fisiológicas entre poblaciones de mitílidos, se incluye también su uso para observar los efectos de la acumulación de microplásticos o la acumulación en sí misma (von Moos *et al.* 2012, Santana *et al.* 2018, Truchet *et al.* 2021). En particular, el presente análisis de condición destacó diferencias menores entre los sitios evaluados, sugiriendo que la población de Quinta Rossi exhibe mayores pesos para el mismo rango de talla. No obstante, es importante aclarar que esta diferencia se explicaría principalmente por la presencia de perlas en gran parte de los mejillones examinados. El sitio de Quinta Rossi exhibió mayores niveles de turbidez y sedimento en el sustrato comparado con los otros sitios. Además, se observaron mayores porcentajes de parasitismo por el isópodo *Edotia doellojuradoi* que en otros sitios examinados (obs. pers.). Si bien estos no fueron considerados en el pesaje de los tejidos blandos, existe la posibilidad de que remanentes accidentales de los mismos, podrían haber afectado el cálculo del índice de condición para el mencionado sitio. Además, el isópodo habita la cavidad paleal del mejillón y sujetándose de las branquias consume del material filtrado y agregado por cordones mucosos antes de ingresar al sistema digestivo lo cual induce una reducción en el índice de condición sobre todo en meses de primavera y posteriores al desove estival (Zaixso *et al.* 2009). Esto sugiere que podría existir alguna interacción compleja (no examinada aún) entre estos simbioses y la concentración de micropartículas. En el caso de la población de Quinta Rossi, cualquier efecto en la condición propiciada por el isópodo *E. dollejouradoi* estaría enmascarada por la presencia de perlas en el manto.

La extracción de microplásticos de tejidos animales requiere un proceso de digestión seguro y ecológico que evite efectos no deseados (Lusher y Hernández-Milian 2018). En los estudios realizados en Argentina (Ronda *et al.* 2021) el agente oxidante más utilizado para digerir diferentes tejidos (tractos gastrointestinales, músculos y tejidos blandos) ha sido el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 30% a temperaturas entre 45 y 65 °C y en menor grado el hidróxido de potasio (KOH) al 10% a 40 °C o ácido nítrico (HNO_3) 22,5 M. Sobre material biológico, el HNO_3 muestra una eficacia de digestión mayor que el H_2O_2 , sin embargo, también puede degradar algunos tipos de polímeros ampliamente utilizados por el hombre (Torres-Hernández 2018). Varios autores (Claessens *et al.* 2013, Mathalon y Hill 2014, Li *et al.* 2015) indican el uso de H_2O_2 a diferentes concentraciones y con diferentes tiempos de digestión y ninguno advierte sobre posibles interferencias en la identificación o degradación de microplásticos. Sin embargo, Torres Hernández (2018) resalta la falta de validación del método con polímeros en cantidades conocidas que permitan calcular las eficiencias de extracción. Por otro lado, según los mismos autores, la digestión de la muestra con H_2O_2 no es 100% efectiva tal como lo observado en este trabajo mediante la formación de “grumos” bajo determinadas circunstancias. Shim *et al.* (2016) también menciona que la materia orgánica y algunos polímeros naturales no son completamente oxidados por H_2O_2 , agente oxidante utilizado en este estudio. La utilización de otros tratamientos químicos en base a enzimas, ácidos o bases fuertes tampoco aseguran una total digestión (Claessens *et al.* 2013, Cole *et al.* 2014).

Ante la necesidad de una técnica que permita la identificación de microplásticos de manera eficaz, rápida y económica se optó en una primera instancia por el uso del colorante Rojo Nilo ya que su uso ha sido difundido y recomendado por varios autores como una forma efectiva para tal fin (Shim *et al.* 2016, Erni-Cassola *et al.* 2017, Maes *et al.* 2017). Según estos autores, además del reconocimiento de microplásticos, el método permite la cuantificación de los mismos empleando el software ImageJ (Erni-Cassola *et al.* 2017). Por otro lado, Shim *et al.* (2016) indica que una de las limitaciones de este colorante es la co-tinción de lípidos naturales y materia orgánica junto con las partículas de plástico. Esto explicaría los resultados obtenidos en el presente estudio donde partículas que presentaron fluorescencia posteriormente fueron testeadas y reconocidas como no plásticas.

Otro método sugerido para la identificación de partículas plásticas es el de la aguja caliente o *hot needle* dada su simpleza, practicidad y fiabilidad. La mayor parte de los testeos realizados en el presente estudio se llevaron a cabo con este procedimiento obteniendo mejores resultados que con los ensayos de tinción (efectividad del 78% contrastada con Espectroscopia RAMAN). Varias publicaciones

han sugerido su uso para separar muestras plásticas de no plásticas (De Witte *et al.* 2014, Lusher *et al.* 2017, 2020). Algunos autores recomiendan incluso el uso de este método para identificar distintos tipos de polímeros de acuerdo a su punto de fusión (Lusher *et al.* 2020). La practicidad de este ensayo contrasta con el hecho de que la muestra es destruida parcial o totalmente en el proceso y esto limita una posterior caracterización de la naturaleza de las partículas.

La espectroscopia RAMAN y la infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) ofrecen información precisa sobre la composición molecular de las partículas (Lusher *et al.* 2017, Dehaut *et al.* 2019, Baruah *et al.* 2022). Debido al costo de este tipo de técnicas, generalmente se aplican sobre submuestras de la totalidad del material identificado y/o parcialmente destruido a través de otras pruebas e incluso se elige uno sobre el otro teniendo mayor incidencia en los trabajos de investigación la técnica de FTIR (48%) sobre un 9% para la Espectroscopia RAMAN (Dehaut *et al.* 2019). En una comparación realizada por Baruah *et al.* (2022) se pueden atribuir ventajas y desventajas de cada método. La microscopia FTIR, en general, no puede detectar plásticos por debajo de 20 μm y produce espectros falsos para plásticos desgastados o de color negro. Además, requiere técnicos altamente especializados para el manejo del equipo. Por su parte la espectroscopia RAMAN no presenta estos impedimentos, proporciona un perfil de la composición polimérica de cada muestra con la ventaja de un análisis químico no destructivo y sin contacto físico, y la identificación de partículas menores a 20 μm . Una desventaja se le atribuye a que posee un inconveniente significativo de error de refracción debido a espectros no interpretables producidos por microplásticos de forma irregular (Käppler *et al.* 2016), además, presenta inconvenientes para la identificación de fibras o microplásticos que posean pigmentos (Van Cauwenberghe y Janssen 2014, Karami *et al.* 2018, Dehaut *et al.* 2019). Dicho todo esto, ambos métodos son válidos para la detección e identificación de microplásticos, pero la elección por el método de espectroscopia RAMAN se basó principalmente en los tamaños encontrados de las fibras, los cuales estaban por debajo de los 20 μm de ancho.

Si bien existen diferentes criterios de clasificación de partículas plásticas, el término microplástico engloba aquellas partículas con un tamaño menor de 5 mm (Avio *et al.* 2017, Sharma y Chatterjee 2017). La mayoría de ellos provienen de la degradación y fragmentación de productos más grandes (Piha *et al.* 2011). Por otra parte, el término nanoplástico incluye partículas menores de 100 nm, las cuales se originan por la fragmentación de fibras sintéticas (ej. durante el lavado de prendas de vestir) o por el desgaste de los mencionados microplásticos (Sharma y Chatterjee 2017). Las partículas de microplásticos exhiben diversas morfologías y, han sido

clasificadas utilizando un conjunto igualmente diverso de terminologías, que incluyen esferas, granos, perlas, gránulos, filamentos, fibras, líneas, películas, fragmentos, entre otros. Registrar la morfología de las partículas es valioso cuando se intenta identificar y clasificar. En ese sentido, Lusher *et al.* (2020) recomienda tres categorías principales con sus sub categorías: a) perlas, que son esféricas, sin bordes romos, diseñadas específicamente para ser de una forma y tamaño determinados (microplásticos primarios); b) fibras, material fibroso con mayor longitud que ancho, con un ancho medio entre 10 y 30 μm y, c) fragmentos, que puede tener bordes lisos o angulares, puede ser plano o angular y, generalmente tiene la apariencia de haberse originado de un trozo más grandes. De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, la mayor parte de partículas plásticas se incluyen en la categoría b) de esta clasificación a excepción de tres fragmentos que corresponderían a la categoría c). En general las dimensiones de esta última categoría exceden la capacidad de filtrado de los mitilidos (Bayne 1976) lo que justificaría la escasas o ausencia de fragmentos encontrados.

Comparando resultados con otros autores que desarrollaron sus estudios también con bivalvos en el Mar Argentino, Pérez *et al.* (2020) reportó para *M. chilensis* partículas que, en su mayoría, fueron fibras con largos medios de $742,3 \pm 702,1 \mu\text{m}$ y variedad de colores, siendo el negro, azul, amarillo-anaranjado y rojo los más comunes. Por otra parte, Ríos *et al.* (2020) indicó para *A. atra* en su mayoría fibras con largos promedios de $1250 \pm 200 \mu\text{m}$ y color blanco-traslucido, negro y amarillo en orden de prevalencia. Los valores aquí obtenidos se acercan a los de Pérez *et al.* (2020), pudiendo hipotetizar que se deba al uso de la misma matriz biológica y, los colores predominantes (blanco-traslucido y negro) concuerdan con los descriptos por estos autores.

De acuerdo con Torres Hernández (2018) los mejillones son excelentes indicadores para este tipo de estudios, ya que son organismos sésiles que reflejan las condiciones locales; además, son fáciles de identificar, de recolectar y cuantificar; son abundantes, están ampliamente distribuidos, resisten la acumulación de diversos contaminantes y tienen una longevidad media-larga. También fueron propuestos como bioindicadores globales al observar la gran similitud entre las formas, tipo de polímeros y espectro de tallas de microplásticos encontrados en los mejillones y en aguas circundantes (Qu *et al.* 2018, Li *et al.* 2019).

En términos generales, los resultados obtenidos sobre la concentración de microplásticos en mejillones varía entre los distintos trabajos realizados a nivel mundial. La mayoría de estos trabajos comenzaron a practicarse en el hemisferio norte y, por consiguiente, mucha de la información existente proviene de allí. En este

sentido, en el Mar de China Oriental, por ejemplo, se encontraron concentraciones superiores a las reportadas en el presente trabajo. Kolandhasamy *et al.* (2018) señalaron concentraciones de 9,2 ítems/g_(peso húmedo) mientras que Qu *et al.* (2018) indicaron cantidades entre 1,52 y 5,36 ítems/g_(peso húmedo). Valores aún más altos fueron reportados en la costa atlántica canadiense por Mathalon y Hill (2014). También para el hemisferio norte, en aguas costeras de Bélgica, Alemania y Finlandia, De Witte *et al.* (2014), Van Cauwenberghe y Janssen (2014) y Railo *et al.* (2018) reportaron concentraciones similares a las cuantificadas en este trabajo; al igual que Avio *et al.* (2017) para la costa del Mar Tirreno. Por otro lado, y como ejemplos de valores por debajo del presente, en estudios llevados a cabo en el Mar del Norte (costa franco-belga-holandesa) y costa Atlántica de Francia las concentraciones registradas fueron de 0,2 a 0,3 y 0,23 ítems/g_(peso húmedo), respectivamente (Van Cauwenberghe *et al.* 2015, Phuong *et al.* 2018a, b).

En relación a estudios llevados a cabo en el Mar Argentino, más precisamente en aguas aledañas a la ciudad de Puerto Madryn; Ríos *et al.* (2020) indicaron concentraciones entre 0,22 y 0,59 ítems/g_(peso húmedo), tal como las obtenidas en este seminario para los sitios no urbanizados. No obstante, dicho trabajo fue realizado sobre la cholga *Aulacomya atra*. Por otro lado, Pérez *et al.* (2020), expresando valores en ítems/individuo de *M. chilensis*, observó cantidades entre 5,07 y 12,13 superando altamente nuestros resultados (2,5 a 6 veces más), aunque la comparación podría estar afectada por el efecto de tamaño corporal.

En cuanto a la influencia de la urbanización, como era de esperar, la presencia de actividades industriales, basurales clandestinos a cielo abierto, vertidos, efluentes cloacales y pluviales, tanto en la ciudad de Comodoro Rivadavia como en Rada Tilly (Raimondo 2010, Usach y Freddo 2015, Scavuzzo, 2022), habrían contribuido a la mayor concentración de microplásticos, tal como la encontrada en los sitios considerados como urbanizados. Además, considerando solo los sitios de baja actividad antrópica, se podría inferir que la mayor concentración observada en playa Pta. Maqueda (MAQ) en relación a Quinta Rossi (QR) podría deberse no solo a su cercanía con las ciudades mencionadas sino también a la influencia que podría generar las localidades cercanas de la provincia de Santa Cruz o la presencia de corrientes costeras. Lo mencionado anteriormente queda expresado como un posible escenario ya que a la fecha no se cuentan con estudios de corrientes de costa para la zona que permita explicar la dinámica de partículas. Al respecto, es común encontrar macroplásticos y basura proveniente del ex basural costero de Comodoro Rivadavia (Stella Maris) en zonas aledañas y hacia el sur de Rada Tilly.

Para el caso de las partículas no plásticas que tendrían principalmente un origen textil (mayor concentración en MAQ que en QR) aplicaría la misma inferencia planteada. Por otro lado, la menor concentración de fibras no plásticas en sitios urbanizados (RT) no se condice con la misma. Futuros estudios deberán contemplar el análisis de muestras en sitios urbanizados con presencia de mayores índices de urbanización y descarga de efluentes.

Más allá de las diferentes condiciones ambientales y de contaminación inherentes a cada región del planeta y del Mar Argentino, la comparación de resultados entre los distintos trabajos se ve dificultada teniendo en cuenta la diferencia que existe entre los distintos protocolos de trabajo publicados, ya sea para la toma de muestras, tratamiento de las mismas o identificación y cuantificación de las partículas plásticas. Además, existe una falta de criterio unificado de unidad de referencia (Li *et al.* 2019, Pérez *et al.* 2020, Ronda *et al.* 2021). Por otro lado, la complejidad ambiental de los diferentes sitios de estudio hace necesario profundizar este tipo de investigaciones a diferentes escalas espaciales (locales y regionales). Finalmente, factores tales como corrientes marinas, efectos del viento, temperatura, etc. que no pudieron ser considerados para el análisis de los resultados, podrían influir en distinto grado en el transporte o deposición de las partículas en las costas del Golfo San Jorge.

Los efectos nocivos de los microplásticos sobre los seres vivos han sido estudiados y reportados en diferentes trabajos (Bhattacharya *et al.* 2010, Cole *et al.* 2013, Avio *et al.* 2015, Clark *et al.* 2016, Avio *et al.* 2017, de Sá *et al.* 2018, Shahnawaz *et al.* 2019). Si bien no fue el objetivo de este seminario contribuir a este tipo de estudios, se plantea la necesidad de realizarlos en la región. Dado que la presencia de microplásticos ya ha sido evidenciada queda por conocer cómo y en qué medida afecta a la biodiversidad de las costas del Golfo San Jorge.

7. Conclusiones

En el presente trabajo se evaluó la presencia y concentración de microplásticos en *Mytilus platensis* de la zona central del Golfo San Jorge y su relación con áreas urbanizadas. Se caracterizaron las partículas encontradas y se evaluaron diferentes técnicas de tratamiento de muestras e identificación. El área de estudio comprendió la costa de Comodoro Rivadavia, costa de Rada Tilly y zonas aledañas con menor impacto antrópico.

1. Se confirmó la presencia de microplásticos en *M. platensis* por primera vez en las costas del Golfo San Jorge.
2. Las concentraciones encontradas estuvieron por debajo o en valores similares que los registrados por otros estudios realizados en el Mar Argentino.
3. La concentración de microplásticos en *M. platensis* fue superior en sitios con mayor grado de impacto; confirmando que la influencia de la actividad antrópica influye en la concentración de microplásticos en áreas costeras.
4. Tal como consta en diversos trabajos, los mejillones, como matrices biológicas, son óptimos indicadores de contaminación por microplásticos en áreas costeras.
5. Las partículas aisladas de los tejidos blandos de *M. platensis* fueron identificadas en su mayoría como fibras (partículas considerablemente más largas que anchas).
6. El método de la aguja caliente o *hot needle* resultó ser eficiente para cumplir con los objetivos de este estudio. Dada su simpleza, practicidad y fiabilidad se sugiere su uso para una identificación temprana de partículas plásticas. Si bien existen otros métodos (espectroscopia RAMAN e infrarroja por transformada de Fourier) que son más efectivos, estos resultan más costosos, por lo que resulta inviable su uso en la totalidad de las partículas encontradas.
7. La composición polimérica de las fibras plásticas analizadas a través de espectroscopia RAMAN fue mayoritariamente polietileno tereftalato (PET). Las fibras no plásticas analizadas fueron identificadas como algodón, las cuales son también de origen antrópico.

8. Resulta necesaria, para una óptima comparación de resultados entre los distintos trabajos, la unificación de protocolos de trabajo, ya sea para la toma de muestras, tratamiento de las mismas o identificación y cuantificación de las partículas plásticas. Particularmente, es necesario contar con unidades de referencia de concentración fácilmente comparables entre sí.

9. Este trabajo pretende servir de base para futuros estudios en la región, considerando además, criterios estacionales. Se plantea la necesidad de complementar resultados a partir del análisis de otras matrices biológicas y no biológicas.

10. Se destaca la ausencia de estudios en la región que consideren los efectos que la contaminación por plásticos genera en los distintos organismos.

8. Bibliografía

- Abràmoff, M. D., Magalhães, P. J., y Ram, S. J. (2004). Image processing with ImageJ. *Biophotonics international*, 11(7), 36-42.
- Avio, C. G., Gorbi, S., Milan, M., Benedetti, M., Fattorini, D., d'Errico, G., ... y Regoli, F. (2015). Pollutants bioavailability and toxicological risk from microplastics to marine mussels. *Environmental pollution*, 198, 211-222.
- Avio, C. G., Gorbi, S., y Regoli, F. (2017). Plastics and microplastics in the oceans: from emerging pollutants to emerged threat. *Marine Environmental Research*, 128, 2-11.
- Baruah, A., Sharma, A., Sharma, S., y Nagraik, R. (2022). An insight into different microplastic detection methods. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 19(6), 5721-5730.
- Bayne, B. L. (Ed.). (1976). *Marine mussels: their ecology and physiology*. Cambridge University Press.
- Bertness, M. D., Crain, C. M., Silliman, B. R., Bazterrica, M. C., Reyna, M. V., Hildago, F., y Farina, J. K. (2006). The community structure of western Atlantic Patagonian rocky shores. *Ecological Monographs*, 76(3), 439-460.
- Bhattacharya, P., Lin, S., Turner, J. P., y Ke, P. C. (2010). Physical adsorption of charged plastic nanoparticles affects algal photosynthesis. *The journal of Physical Chemistry C*, 114(39), 16556-16561.
- Browne, M. A., Dissanayake, A., Galloway, T. S., Lowe, D. M., y Thompson, R. C. (2008). Ingested microscopic plastic translocates to the circulatory system of the mussel, *Mytilus edulis* (L.). *Environmental Science Y Technology*, 42(13), 5026-5031.
- Cabezas, E., Giménez, O., Balzi, P. P., Cerdá, R., Gil, D. G., Marcinkevicius, M., y Rico, A. (2007). Asociaciones del macrozoobentos del litoral rocoso en la costa central del golfo San Jorge (Argentina). *Nat. Patag. Cienc. Biol*, 3, 17-36.
- Caudill, S. P. (2010). Characterizing populations of individuals using pooled samples. *Journal of exposure science y environmental epidemiology*, 20(1), 29-37.
- Caudill, S. P. (2011). Important issues related to using pooled samples for environmental chemical biomonitoring. *Statistics in Medicine*, 30(5), 515-521.
- Claereboudt, M. R. (2004). Shore litter along sandy beaches of the Gulf of Oman. *Marine Pollution Bulletin*, 49(9-10), 770-777.
- Claessens, M., Van Cauwenberghe, L., Vandegehuchte, M. B., y Janssen, C. R. (2013). New techniques for the detection of microplastics in sediments and field collected organisms. *Marine Pollution Bulletin*, 70(1-2), 227-233.

- Clark, J. R., Cole, M., Lindeque, P. K., Fileman, E., Blackford, J., Lewis, C., ... y Galloway, T. S. (2016). Marine microplastic debris: a targeted plan for understanding and quantifying interactions with marine life. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 14(6), 317-324.
- Cole, M., Lindeque, P., Fileman, E., Halsband, C., Goodhead, R., Moger, J., y Galloway, T. S. (2013). Microplastic ingestion by zooplankton. *Environmental Science and Technology*, 47(12), 6646-6655.
- Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., y Galloway, T. S. (2011). Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. *Marine Pollution Bulletin*, 62(12), 2588-2597.
- Cole, M., Webb, H., Lindeque, P. K., Fileman, E. S., Halsband, C., y Galloway, T. S. (2014). Isolation of microplastics in biota-rich seawater samples and marine organisms. *Scientific Reports*, 4(1), 4528.
- Dans, S. L., Cefarelli, A. O., Galván, D.E., Góngora, M.E., Martos, P. y Varisco, M. A. (eds.). (2020). Programa de Investigación y Monitoreo del Golfo San Jorge. Pampa Azul. *Fundación de Historia Natural Félix de Azara*, 1-99.
- de Sá, L. C., Oliveira, M., Ribeiro, F., Rocha, T. L., y Futter, M. N. (2018). Studies of the effects of microplastics on aquatic organisms: what do we know and where should we focus our efforts in the future? *Science of the Total Environment*, 645, 1029-1039.
- De Witte, B., Devriese, L., Bekaert, K., Hoffman, S., Vandermeersch, G., Cooreman, K., y Robbens, J. (2014). Quality assessment of the blue mussel (*Mytilus edulis*): Comparison between commercial and wild types. *Marine Pollution Bulletin*, 85(1), 146-155.
- Dehaut, A., Hermabessiere, L., y Duflos, G. (2019). Current frontiers and recommendations for the study of microplastics in seafood. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 116, 346-359.
- Eriksen, M., Lebreton, L. C., Carson, H. S., Thiel, M., Moore, C. J., Borerro, J. C., y 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(12), e111913.
- Erni-Cassola, G., Gibson, M. I., Thompson, R. C., y Christie, J. A. (2017). Lost, but found with Nile Red; a novel method to detect and quantify small microplastics (20 μm –1 Mm) in environmental samples. *Environmental Science and Technologies*, 51, 13641–13648.
- Fossi, M. C., Panti, C., Guerranti, C., Coppola, D., Giannetti, M., Marsili, L., y 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(11), 2374-2379.
- Fossi, M. C., Pedà, C., Compa, M., Tsangaris, C., Alomar, C., Claro, F., *et al.* (2018). Bioindicators for monitoring marine litter ingestion and its impacts on Mediterranean biodiversity. *Environmental Pollution*, 237, 1023-1040.
- Gil, D. G. y Zaixso, H. E. (2008). Feeding ecology of the subantarctic sea star *Anasterias minuta* within tide pools in Patagonia, Argentina. *Revista de Biología Tropical*, 56(3), 311-328.
- Góngora, M. E., González-Zevallos, D., Pettovello, A., y Mendía, L. (2012). Caracterización de las principales pesquerías del golfo San Jorge Patagonia, Argentina. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 40(1), 1-11.
- Herzke, D., Anker-Nilssen, T., Nøst, T. H., Götsch, A., Christensen-Dalsgaard, S., Langset, M., ... y Koelmans, A. A. (2016). Negligible impact of ingested microplastics on tissue concentrations of persistent organic pollutants in northern fulmars off coastal Norway. *Environmental Science and Technology*, 50(4), 1924-1933.
- Jambeck, J. R., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T. R., Perryman, M., Andrady, A., *et al.* (2015). Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science*, 347(6223), 768-771.
- Käppler, A., Fischer, D., Oberbeckmann, S., Schernewski, G., Labrenz, M., Eichhorn, K. J., y Voit, B. (2016). Analysis of environmental microplastics by vibrational microspectroscopy: FTIR, Raman or both? *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408, 8377-8391.
- Karami, A., Golieskardi, A., Choo, C. K., Larat, V., Karbalaei, S., y Salamatinia, B. (2018). Microplastic and mesoplastic contamination in canned sardines and sprats. *Science of the Total Environment*, 612, 1380-1386.
- Kolandhasamy, P., Su, L., Li, J., Qu, X., Jabeen, K., y Shi, H. (2018). Adherence of microplastics to soft tissue of mussels: a novel way to uptake microplastics beyond ingestion. *Science of the Total Environment*, 610, 635-640.
- Li, J., Lusher, A. L., Rotchell, J. M., Deudero, S., Turra, A., Bråte, I. L. N., ... y Shi, H. (2019). Using mussel as a global bioindicator of coastal microplastic pollution. *Environmental Pollution*, 244, 522-533.
- Li, J., Yang, D., Li, L., Jabeen, K., y Shi, H. (2015). Microplastics in commercial bivalves from China. *Environmental Pollution*, 207, 190-195.
- Lippiatt, S., Opfer, S., y Arthur, C. (2013). Marine debris monitoring and assessment: recommendations for monitoring debris trends in the marine environment. NOAA Marine Debris Program.

- Lusher, A. L., Welden, N. A., Sobral, P., y Cole, M. (2017). Sampling, isolating and identifying microplastics ingested by fish and invertebrates. In *Analysis of Nanoplastics and Microplastics in Food* (pp. 119-148). CRC Press.
- Lusher, A. L., y Hernández-Milian, G. (2018). Microplastic extraction from marine vertebrate digestive tracts, regurgitates and scats: a protocol for researchers from all experience levels. *Bio-Protocol*, 8(22), e3087-e3087.
- Lusher, A. L., Bråte, I. L. N., Munno, K., Hurley, R. R., y Welden, N. A. (2020). Is it or isn't it: the importance of visual classification in microplastic characterization. *Applied Spectroscopy*, 74(9), 1139-1153.
- Maes, T., Jessop, R., Wellner, N., Haupt, K., y Mayes, A. G. (2017). A rapid-screening approach to detect and quantify microplastics based on fluorescent tagging with Nile Red. *Scientific Reports*, 7(1), 44501.
- Mathalon, A., y Hill, P. (2014). Microplastic fibers in the intertidal ecosystem surrounding Halifax Harbor, Nova Scotia. *Marine Pollution Bulletin*, 81(1), 69-79.
- Mazón, H. R. (2010). *Cambios en las comunidades intermareales y su relación con la contaminación. Aportes para la gestión de efluentes urbanos de la ciudad de Comodoro Rivadavia*. Tesis Licenciatura en Gestión Ambiental, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Comodoro Rivadavia, Argentina.
- Mincyt (2014). Programa estratégico de investigación y monitoreo a largo plazo del Golfo San Jorge.
- Palomo, M. G., Bagur, M., Calla, S., Dalton, M. C., Soria, S. A., Hawkins, S. J., *et al.* (2019). Biodiversity and interactions on the intertidal rocky shores of Argentina (south-west Atlantic). *Interactions in the marine benthos: Global patterns and Processes*, 164-189.
- Perez-Venegas, D. J., Toro-Valdivieso, C., Ayala, F., Brito, B., Iturra, L., Arriagada, M., *et al.* (2020). Monitoring the occurrence of microplastic ingestion in Otariids along the Peruvian and Chilean coasts. *Marine Pollution Bulletin*, 153, 110966.
- Phuong, N. N., Poirier, L., Pham, Q. T., Lagarde, F., y Zalouk-Vergnoux, A. (2018a). Factors influencing the microplastic contamination of bivalves from the French Atlantic coast: location, season and/or mode of life? *Marine Pollution Bulletin*, 129(2), 664-674.
- Phuong, N. N., Zalouk-Vergnoux, A., Kamari, A., Mouneyrac, C., Amiard, F., Poirier, L., y Lagarde, F. (2018b). Quantification and characterization of microplastics in blue mussels (*Mytilus edulis*): protocol setup and preliminary data on the contamination of the French Atlantic coast. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 6135-6144.

- Piha, H. E., Hanke, G., Galgani, F., Werner, S., Alcaro, L., Mattidi, M., *et al.* (2011). Marine litter: Technical recommendations for the implementation of MSFD requirements. Publications Office of the European Union.
- Prado, L., y Castilla, J. C. (2006). The bioengineer *Perumytilus purpuratus* (Mollusca: Bivalvia) in central Chile: biodiversity, habitat structural complexity and environmental heterogeneity. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 86(2), 417-421.
- Qu, X., Su, L., Li, H., Liang, M., y Shi, H. (2018). Assessing the relationship between the abundance and properties of microplastics in water and in mussels. *Science of the Total Environment*, 621, 679-686.
- Railo, S., Talvitie, J., Setälä, O., Koistinen, A., y Lehtiniemi, M. (2018). Application of an enzyme digestion method reveals microlitter in *Mytilus trossulus* at a wastewater discharge area. *Marine Pollution Bulletin*, 130, 206-214.
- Raimondo, A. M. (2010). Propuesta para una definición de la franja costera, usos y actividades en la costa de Comodoro Rivadavia-Chubut. Patagonia Argentina. *Párrafos Geográficos*, 9(1), 66-100.
- Ríos, M. F., Hernández-Moresino, R. D., y Galván, D. E. (2020). Assessing urban microplastic pollution in a benthic habitat of Patagonia Argentina. *Marine Pollution Bulletin*, 159, 111491.
- Rochman, C. M., Regan, F., y Thompson, R. C. (2017). On the harmonization of methods for measuring the occurrence, fate and effects of microplastics. *Analytical Methods*, 9(9), 1324-1325.
- Ronda, A. C., Arias, A. H., Rimondino, G. N., Pérez, A. F., Harte, A., y Marcovecchio, J. E. (2021). Plastic impacts in Argentina: a critical research review contributing to the global knowledge. *Current Environmental Health Reports*, 8, 212-222.
- Santana, M. F., Moreira, F. T., Pereira, C. D., Abessa, D. M., y Turra, A. (2018). Continuous exposure to microplastics does not cause physiological effects in the cultivated mussel *Perna*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 74, 594-604.
- Scavuzzo I. C. (2022). [CON]CIENCIA. Centro de investigación ambiental Rada Tilly. Facultad de Arquitectura y Urbanismo - Universidad Nacional de la Plata.
- Shahnawaz, M., Sangale, M. K., y Ade, A. B. (2019). Bioremediation technology for plastic waste. Springer Nature Singapore Pte Ltd.
- Sharma, S., y Chatterjee, S. (2017). Microplastic pollution, a threat to marine ecosystem and human health: a short review. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 21530-21547.

- Shim, W. J., Song, Y. K., Hong, S. H., y Jang, M. (2016). Identification and quantification of microplastics using Nile Red staining. *Marine Pollution Bulletin*, 113(1-2), 469-476.
- Sokal, R. R. y Rohlf F. J. (1995). *Biometry*, The principles and practice of statistics in biological research. W. H. Freeman and Company.
- Thompson, R. C., Moore, C. J., Vom Saal, F. S., y Swan, S. H. (2009). Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1526), 2153-2166.
- Torres Hernández, S. (2018). Comparativa metodológica y propuesta de un protocolo para la extracción y detección mediante fluorescencia de microplásticos en muestras biológicas. Tesis de Biología. Universidad de las Islas Baleares.
- Truchet, D. M., Lopez, A. F., Arduoso, M. G., Rimondino, G. N., Buzzi, N. S., Malanca, F. E., *et al.* (2021). Microplastics in bivalves, water and sediments from a touristic sandy beach of Argentina. *Marine Pollution Bulletin*, 173, 113023.
- Underwood, A. J. (1997). *Experiments in ecology: their logical design and interpretation using analysis of variance*. Cambridge University Press.
- Usach, N., y Freddo, B. (2015). Crecimiento de una ciudad dispersa: análisis y reflexiones del caso de la ciudad de Comodoro Rivadavia. *Informes Científicos Técnicos-UNPA*, 7(1), 219-243.
- Van Cauwenberghe, L., y Janssen, C. R. (2014). Microplastics in bivalves cultured for human consumption. *Environmental Pollution*, 193, 65-70.
- Van Cauwenberghe, L., Claessens, M., Vandegehuchte, M. B., y Janssen, C. R. (2015). Microplastics are taken up by mussels (*Mytilus edulis*) and lugworms (*Arenicola marina*) living in natural habitats. *Environmental Pollution*, 199, 10-17.
- Verga, R. N., Tolosano, J. A., Cazzaniga, N. J., y Gil, D. G. (2020). Assessment of seawater quality and bacteriological pollution of rocky shores in the central coast of San Jorge Gulf (Patagonia, Argentina). *Marine Pollution Bulletin*, 150, 110749.
- von Moos, N., Burkhardt-Holm, P., y Köhler, A. (2012). Uptake and effects of microplastics on cells and tissue of the blue mussel *Mytilus edulis* L. after an experimental exposure. *Environmental Science and Technology*, 46(20), 11327-11335.
- Wegner, A., Besseling, E., Foekema, E. M., Kamermans, P., y Koelmans, A. A. (2012). Effects of nanopolystyrene on the feeding behavior of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(11), 2490-2497.
- Zaixso, H. E., Boraso, A. L., Pastor, C. T., Lizarralde, Z. I., Dadon, J. R., y Galvan, D. E. (2015). El bentos costero patagónico. En Zaixso H. E. y Dadón J. R. (eds.).

Zona Costera de la Patagonia Argentina. Editorial Universidad de la Patagonia
San Juan Bosco, Comodoro Rivadavia.

Zaixso, H. E., Stoyanoff, P., & Gil, D. G. (2009). Detrimental effects of the isopod, *Edotia doellojuradoi*, on gill morphology and host condition of the mussel, *Mytilus edulis platensis*. *Marine Biology*, 156, 2369-2378.