

ORIGINAL ARTICLE / ARTÍCULO ORIGINAL

Estandarización de un protocolo para evaluar microplásticos en bivalvos marinos en el departamento de Lima, Perú

STANDARDIZATION OF A PROTOCOL TO EVALUATE MICROPLASTICS IN MARINE BIVALVES IN THE DEPARTMENT OF LIMA, PERU

Fernando Valencia-Velasco¹; Angélica Guabloche-Zuñiga¹; Lorena Alvarino¹ & José Iannacone^{1,2}

¹ Grupo de Investigación en Sostenibilidad Ambiental (GISA), Escuela Universitaria de Posgrado (EUPG), Laboratorio de Ecología y Biodiversidad Animal (LEBA). Facultad de Ciencias Naturales y Matemática (FCCNM). Universidad Nacional Federico Villarreal (UNFV), Lima, Perú.

Correo electrónico: fernandovalencia635@gmail.com

² Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Ricardo Palma. Santiago de Surco, Lima, Perú.

Correo electrónico: joseiannaconeoliver@gmail.com

Corresponding Author: joseiannaconeoliver@gmail.com

Valencia-Velasco *et al.*

Microplastics in marine bivalves

Recibido: 24 abr. 2020
Aceptado: 25 abr. 2020

ABSTRACT

The large number of microplastics (PM) that are thrown into the sea increases considerably, affecting marine animals and especially invertebrates, in the course of years. MPs pose a threat to food safety. Therefore, a protocol for evaluating MP in marine bivalves *Choromytilus chorus* (Molina, 1782) and *Aulacomya atra* (Molina, 1782) in the department of Lima, Peru was

standardized. The bivalves were obtained from the Ancón fishing terminal, Lima, Peru. The most efficient procedure was determined during the digestion of the organic matter with hydrogen peroxide (H_2O_2), and the flotation and filtration of the PM using *C. chorus* for this standardization. During H_2O_2 digestion the most suitable container was the 1L clear glass bottle with 2 cm opening and 25 cm height. The volume of 30% H_2O_2 that allowed the best digestion of 99% organic matter in *C. chorus* was 18 g in 200 mL of H_2O_2 . The water bath was more effective than the magnetic oscillator, since it allows evaluating and a greater number of samples, with oscillation and constant temperature up to 48 h of digestion. During MP flotation and filtration, fill up to $\frac{3}{4}$ of a L bottle with saturated saline and then use a 10 mL volumetric glass pipette to carefully remove the supernatant and empty the contents into a glass petri dish clean proved to be the best flotation method for PM extraction to use. In the characterization of PM for both bivalve species, two types of PM were obtained: fibers that are the most abundant, showing red, blue and white colors; and yellow and white pellets. The concentrations of PM were 1.91 ± 0.11 items·g⁻¹ and 1.64 ± 0.08 items·g⁻¹ for *C. chorus* and *A. atra*, respectively. The standardization of this protocol was optimal for laboratory conditions, achieving a good classification and observation of the PM, which will allow other researchers to use this protocol, taking into account that there are no studies on these two invertebrates in Peru yet.

Key words: *Aulacomya atra* – *Choromytilus chorus* – microplastics – mollusks

RESUMEN

La gran cantidad de microplásticos (MP) que son arrojados en el mar va aumentando considerablemente, afectando a los animales marinos y sobre todo a los invertebrados, en el transcurso de los años. Los MP representan una amenaza para la inocuidad alimentaria. Por lo cual se estandarizó un protocolo para evaluar MP en los bivalvos marinos *Choromytilus chorus* (Molina, 1782) y *Aulacomya atra* (Molina, 1782) en el departamento de Lima, Perú. Los bivalvos fueron obtenidos del terminal pesquero de Ancón, Lima, Perú. Se determinó cuál fue el procedimiento más eficaz durante la digestión de la materia orgánica

con peróxido de hidrogeno (H_2O_2), y la flotación y filtración de los MP usando a *C. chorus* para esta estandarización. Durante la digestión con H_2O_2 el envase más adecuado fue la botella de vidrio de transparente de 1 L con 2 cm de abertura y 25 cm de altura. El volumen de H_2O_2 al 30% que permitió la mejor digestión de la materia orgánica al 99% en *C. chorus* fue 18 g en 200 mL de H_2O_2 . El baño maría fue más eficaz que el oscilador magnético, pues permite evaluar y un mayor número de muestras, con oscilación y temperatura constante hasta las 48 h de digestión. Durante la flotación y filtración de MP, se llenó hasta los $\frac{3}{4}$ de botella de un L con solución salina saturada y luego emplear una pipeta de vidrio volumétrica de 10 mL para sacar el sobrenadante con mucho cuidado y vaciar el contenido en una placa Petri de vidrio limpia mostró ser el mejor método de flotación para la extracción de MP a utilizar. En la caracterización de MP para ambas especies de bivalvos se obtuvieron dos tipos de MP: fibras que son las más abundantes, mostrando colores rojo, azul y blanco; y pellets de color amarillo y blanco. Las concentraciones de MP fueron de $1,91 \pm 0,11$ ítems·g⁻¹ y $1,64 \pm 0,08$ ítems·g⁻¹ para *C. chorus* y *A. atra*, respectivamente. La estandarización de este protocolo resultó óptima para las condiciones del laboratorio, logrando una buena clasificación y observación de los MP, lo que permitirá que otros investigadores puedan utilizar este protocolo, tomando en cuenta que aún no hay estudios en estos dos invertebrados en el Perú.

Palabras clave: *Aulacomya atra* – *Choromytilus chorus* – microplásticos – moluscos

INTRODUCCIÓN

En 1907, el ganador del Premio Nobel en Química, el belga Leo Hendrick Baekeland (1863-1944) creó la primera sustancia de plástico sintética, la baquelita. No fue hasta medio siglo después, en los años cincuenta, que éstas fibras sintéticas comenzaron a producirse masivamente (Derraik, 2002).

La producción mundial de plásticos creció casi un 3,16% en el 2018 respecto al 2017 alcanzando los 359 mill de t métricas (NG, 2020), si la tendencia de producción y consumo continúa, se estima que se alcanzará los 1.000 mill de t

para el 2050 (GESAMP, 2019). Siendo mayormente atribuidos a seis tipos diferentes de plásticos: polietileno (PE), polipropileno (PP), cloruro de polivinilo (PVC), poliuretano (PU), poliestireno (PS) y tereftalato de polietileno (PET) (Miller *et al.*, 2017).

La persistencia de los plásticos en la naturaleza puede conducir a riesgos para la salud pública en el ser humano y para la fauna silvestre, produciendo cambios en los ecosistemas, exponiendo sustancias químicas que están presentes en la composición de éstos o que han sido adsorbidos por el medio acuático (Ashton *et al.*, 2010; Engler, 2012; Rochman *et al.*, 2014; Woodall, 2014; Wang *et al.*, 2016; Miller *et al.*, 2017; Granek *et al.*, 2020).

La Organización de las Naciones Unidas (ONU) en el 2016 determinó que 800 especies acuáticas fueron contaminadas por MP, siendo 69% mayor que lo registrado en 1977 (GESAMP, 2019). En el Perú, el 2018 se estableció la ley que regula el plástico de un solo uso, y los recipientes o envases plásticos descartables (El Peruano, 2018), con la que se espera una reducción de la contaminación plástica y microplástica (MP), a pesar que se dio un periodo de cumplimiento.

Los MP a menudo se encuentran en el tracto digestivo de los organismos acuáticos como bivalvos y peces pequeños que se consumen enteros, y que tienen más probabilidades de exponer los MP en la dieta humana, por lo que representan una amenaza a la inocuidad alimentaria (Salim *et al.*, 2013; Galloway, 2015; GESAMP, 2019; Jabeen *et al.*, 2017).

Los MP también están en el aire, pero es más difícil la contaminación por esta vía, debido a que se cuenta con los vellos nasales que no permiten el ingreso directo de los MP (Smith *et al.*, 2018). Aún no hay estimaciones sobre la cantidad de MP que pueda generar un problema grave de salud al hombre, al ser expulsados por las heces o exista una translocación a cualquier sistema como circulatorio o respiratorio (Prata *et al.*, 2019).

Las investigaciones en los bivalvos demostrarían que estos moluscos marinos están siendo contaminados por MP, debido a que son filtradores que absorben todo lo que está en su entorno y forman parte de la cadena trófica que afectan a muchos vertebrados y aves marinas (Mathalon & Hill, 2014; Van

Cauwenberghe & Janssen, 2014; Paul-Pont *et al.*, 2016; Purca & Henostroza, 2017; Fang *et al.*, 2019). Los bivalvos son conocidos como buenos bioindicadores de contaminación de MP (Von Moos *et al.*, 2012; De Witte *et al.*, 2014; Avio *et al.*, 2015; Purca & Henostroza, 2017). Se ha demostrado que los MP, se adhieren al cuerpo, a las gónadas, a las branquias, etc. de los bivalvos (Kolandhasamy *et al.*, 2018).

En el Perú, se tiene un estudio con MP en el bivalvo *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) colectados en los mercados pesqueros de Lima, Perú (De la Torre *et al.*, 2019). Escasas investigaciones en el Perú, han sido realizadas principalmente en peces y en la arena de playas marinas (Purca & Henostroza, 2017; Ory *et al.*, 2018; De-la-Torre, 2019ab; De-la-Torre *et al.*, 2019abc; Iannacone *et al.*, 2019; De-la-Torre *et al.*, 2020).

Un problema que se observa es que los métodos que describen la separación e identificación de MP en bivalvos son altamente variables y es necesario que se estandarizen para hacer comparaciones adecuadas (Miller *et al.*, 2017; Phuong *et al.*, 2018ab; Covernton *et al.*, 2019; Thiele *et al.*, 2019; von Friesen *et al.*, 2019; Baechler *et al.*, 2020). Otros países, toman en cuenta las limitaciones que tienen los laboratorios y la gran variedad de digestores de materia orgánica (MO) para la extracción de MP, los cuales muestran diferentes niveles de eficacia (Van Cauwenberghe & Janssen, 2014; Li *et al.*, 2015; Vandermeersch *et al.*, 2015; Lusher *et al.*, 2017). Por lo que se deben priorizar el uso de materiales y equipos que no requirieran de altos presupuestos, buscando la mayor eficacia de los insumos utilizados (Miller *et al.*, 2017).

Aulacomya atra (Molina, 1782) “choro” es un recurso hidrobiológico bentónico costero de aguas superficiales, cuyo hábitat es el sustrato rocoso de hasta 70 m de profundidad. Se distribuye principalmente entre Perú y Chile (Paredes *et al.*, 2016). La pesquería de este recurso es de alta importancia comercial, al ser una especie de alto valor biológico proteico para el consumo humano (Ríos *et al.*, 2018). El cambio climático y la sobreexplotación del recurso mediante la pesca artesanal influyen significativamente en su sostenibilidad, en relación a su biometría y abundancia (Solis *et al.*, 2019; Gonzales Vargas & Espinoza-Ramos, 2020). Por lo que en el Perú, existe un programa de recuperación de

este recurso hidrobiológico y se ha creado una Comisión Sectorial de Trabajo Técnico (PRODUCE, 2018b).

Choromytilus chorus (Molina, 1782) “choro zapato” es una especie de bivalvo de importancia ecológica y económica pesquera (Avendaño & Cantillán, 2011). Se distribuye desde el Callao, Perú hasta el sureste del Pacífico de Chile (Paredes *et al.*, 2016; Ruiz-Velásquez *et al.*, 2017; Benítez *et al.*, 2018).

En el Perú, ambas especies de moluscos son consumidas por el ser humano principalmente en fresco y durante el 2017 fueron extraídas 2.688 t (PRODUCEa, 2018).

A la fecha no se tiene en el Perú una estandarización de un protocolo para evaluar MP en estas dos especies de bivalvos de importancia ecológica y económica. El objetivo de la presente investigación fue estandarizar un protocolo para evaluar MP en bivalvos marinos en el departamento de Lima, Perú.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención Material biológico

La obtención del material biológico fue realizada en el puerto de Ancón (77°10'9,55"LO, 11°46'17,36" LS), departamento de Lima, Perú a 43 km al norte del centro de Lima, Perú durante el verano del 2019. Las dos especies de bivalvos evaluadas, *A. atra* y *C. chorus* presentan importancia comercial y son de alto consumo por la población peruana (AFIB-DGIRDL, 2016). Las muestras fueron transportadas en una caja enfriadora con hielo a una temperatura de 5°C a 10 °C, para evitar la descomposición de los bivalvos hasta un máximo de 2 h de transporte. En el laboratorio se realizó la verificación taxonómica con la Guía ilustrada para el reconocimiento de las especies de moluscos bivalvos con valor comercial (IMARPE, 2016).

Como paso previo a la estandarización se evaluó un aproximado de 100 individuos de cada una de las dos especies, a cada una de los cuales se les tomó la longitud con un pie de rey marca Mitutoyo®. Se registró el peso con valvas y sin valvas de cada uno de los individuos en una balanza analítica

marca AND® con una resolución de 0,0001 g. La determinación de la longitud y del peso de cada bivalvo fue realizada en el Laboratorio. Todo el material utilizado fue lavado con agua filtrada que se obtuvo por medio de un embudo y un filtro de nitrocelulosa con poro de 11 μm .

Estandarización del protocolo

Se empleó únicamente a *C. chorus* para determinar cuál fue el procedimiento más eficaz durante la digestión de la MO con peróxido de hidrogeno (H_2O_2), y la flotación y filtración de MP.

Digestión con peróxido de hidrogeno (H_2O_2)

Se realizó en tres etapas secuenciales que seleccionaron el procedimiento más eficaz.

Tipo de recipiente: para la digestión de los tejidos blandos de *C. chorus*, se evaluó la eficacia de tres tipos de recipientes en la obtención de MP y una idónea observación de la eficacia del digestor en: (1) vaso tipo Beaker, (2) botella comercial transparente alta y (3) botella color ámbar, todos de 1 L de capacidad. La eficacia fue evaluada porcentualmente y se emplearon los criterios señalados por Li *et al.* (2015) en base al grado de transparencia y digestión de la MO.

Número de especímenes, grupos de tamaño y límite de peso: se realizaron tres diferentes ensayos. El primero que evaluó el efecto del número de especímenes de *C. chorus* consistió en estratificar al azar en 2, 3 y 4 especímenes. Cada agrupación contó con 3 repeticiones. El segundo, determinó el efecto del grupos de tamaño del bivalvo y consistió en formar 3 grupos de acuerdo al peso de los especímenes sin valvas; el grupo 1 presentó bivalvos de menor peso entre 3 g a 4,5 g, el grupo 2, los de mediano peso entre 4,6 g a 6 g y el grupo 3 los más pesados de 6 g a más. Cada grupo contó, nuevamente con 3 repeticiones. Finalmente, para el tercer ensayo que evaluó el efecto del límite del peso, no importó el número, ni peso de los especímenes individuales, sino que tres grupos presentaran como máximo 18 g, 20 g o 25 g.

Tipo de equipamiento: se colocó en un baño maría con oscilación a 65°C, y en paralelo se colocaron en un oscilador magnético. En ambos equipos se evaluó el tiempo de digestión a 24 h y 48 h de exposición (Li *et al.*, 2016). Se analizó la eficiencia del baño María y del oscilador magnético, como fuentes de calor en el proceso de digestión. El baño maría utiliza al agua como fuente de calor y el oscilador es de contacto directo con el metal. (Li *et al.*, 2015). Se usaron dos diferentes tipos de volúmenes de 200 mL y 250 mL de H₂O₂ al 30 % a los recipientes de 1 L con los tejidos de *C. chorus*, para digerir la MO (Li *et al.*, 2015).

Luego de la selección del mejor protocolo de digestión con H₂O₂ se continuó con la etapa de flotación y filtración de MP.

Flotación y filtración de Microplástico

Se siguieron tres procesos alternos para evaluar la flotación y filtración más eficaz.

Primero: a cada frasco con la MO blanda digerida de los bivalvos se le colocó una concentración de 0,37 g·mL⁻¹ de NaCl filtrado y reposada toda una noche. Al día siguiente se filtró el sobrenadante con papel filtro de membrana de celulosa con una porosidad de 11 um y 120 mm de diámetro, y seguidamente el filtro se colocó en una placa Petri de vidrio con cubierta, lavada con agua filtrada.

Segundo: a otro grupo se le agregó 0,37 g·mL⁻¹ de NaCl y se dejó reposar toda la noche, esta solución fue agregada hasta el tope de la botella y fue cubierta por un portaobjetos o laminilla, el cual se sacó y se revisó directamente al microscopio óptico, este proceso fue repetido 3 veces para evitar la pérdida de MP.

Tercero: Finalmente, a otro grupo se le adicionó 0,37 g·mL⁻¹ de NaCl hasta los ¾ de la botella y con una pipeta de vidrio se obtuvo 10 mL del sobrenadante, y se calentó a 40 °C hasta obtener todo el material completamente seco, y luego se revisó al estereoscopio.

Luego de la selección del protocolo más eficaz de la flotación y filtración de MP con *C. chorus* se continuó con la cuantificación y caracterización de MP con ambas especies de bivalvos: *A. atra* y *C. chorus*

Microplástico

Se consideró MP a todo plástico menor a 5 mm (Barborza *et al.*, 2019). Como parte de esta estandarización se hizo un conteo de MP en *A. atra* y *C. chorus* en base al número de ítems-botella⁻¹; número de ítems por individuo (ítems-individuo⁻¹) y por número de ítems encontrados por g (ítems·g⁻¹), también se clasificaron acorde al color y la forma por el método de identificación visual (Hidalgo-Ruz *et al.*, 2012; Rezania *et al.*, 2018). En adición, se consideró meso-plástico a todo plástico mayor a 5 mm y menor a 20 mm encontrado en el ensayo (Andrady, 2017; Miller *et al.*, 2017).

Análisis de datos

La prueba de t de Student se usó con el fin de comparar los ítems de MP para el total MP, para fibras, pellets y colores, ítems·g⁻¹ y ítems-individuo⁻¹ e ítem-botella⁻¹. Se empleó el estadístico F de Fisher para la prueba de homogeneidad de Varianzas de Levene. El estadístico (K-S) Kolmogorov-Smirnov para evaluar la normalidad de los datos. En el caso de no cumplir ninguno de los dos supuestos para las pruebas paramétricas fue empleada la prueba de U de Mann-Whitney. Para comparar el número de ítems·g⁻¹ de MP según color de fibra se usó la prueba de ANDEVA, y posterior prueba de Tukey. Para todos los casos se empleó el software estadístico SPSS versión 25,00. Se usó un valor de significancia de 0,05 para una adecuada contrastación de los datos.

Aspectos éticos

Los autores señalan que se cumplieron todas las normas éticas nacionales o internacionales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Digestión con peróxido de hidrogeno (H₂O₂)

Tipo de recipiente: el uso de vaso beacker de 1 L se mostró poco eficaz debido que cuenta con una abertura de 11,5 cm, la cual es muy grande y podría ser propensa a una contaminación cruzada, por los MP que se encuentran en el aire (Smith, 2018). También, para analizar la diferencia de densidades no se mostró muy eficaz por su ancho.

La botella de vidrio color ámbar se mostró más eficaz para la extracción de MP por diferencia de densidades, aunque no permitió observar bien el proceso de digestión y son de mejor manejo para el uso del oscilador magnético en comparación al del baño maría, por su tamaño de 14 cm y abertura de 3 cm.

La botella de vidrio de color transparente de 2 cm de abertura y 25 cm de altura demostraron ser las más adecuadas para el proceso de digestión de MP, pero al realizar la extracción con una pipeta de vidrio volumétrica no permitió un buen manejo y el otro inconveniente fue que al ser muy largos no se usó adecuadamente en el baño maría que se tenía en el laboratorio. Se comprobó que las botellas de L y de color transparente, permitieron observar la digestión con mejor precisión. Li *et al.* (2015) señalan que en otros ensayos utilizan matraces que ayudaron a evitar que los MP migren a zonas donde se pueden adherir y así realizar un mal conteo de los mismos.

Número de especímenes, grupos de tamaño y límite de peso: Al colocar en la botella de vidrio de 1 L de color transparente comparativamente 2, 3 y 4 especímenes de *C. chorus*, se observó que cuando fue realizado con 200 mL de H₂O₂ se vio un incremento en la eficacia de la digestión de la MO al emplear solo 2 individuos en comparación con 3 y 4 especímenes. Al utilizar 250 mL de H₂O₂ también se vio el mismo patrón de incremento en la eficacia al emplear un número menor de individuos (Fig. 1). Al separar por pesos en 3 intervalos con 3 individuos de *C. chorus* por envase, la digestión con el primer grupo de menor peso para 200 mL y 250 mL de H₂O₂ fue óptima al 99 % para ambos volúmenes; en el segundo intervalo la digestión para 200 mL disminuyó en un 5 % y para 250 mL de 3 % en relación al primer grupo. Finalmente, para el tercer grupo con los individuos más grandes la digestión de la MO disminuyó en un 17 % para 200 mL y para 250 mL fue una disminución del 15 % en relación al primer grupo (Fig. 2).

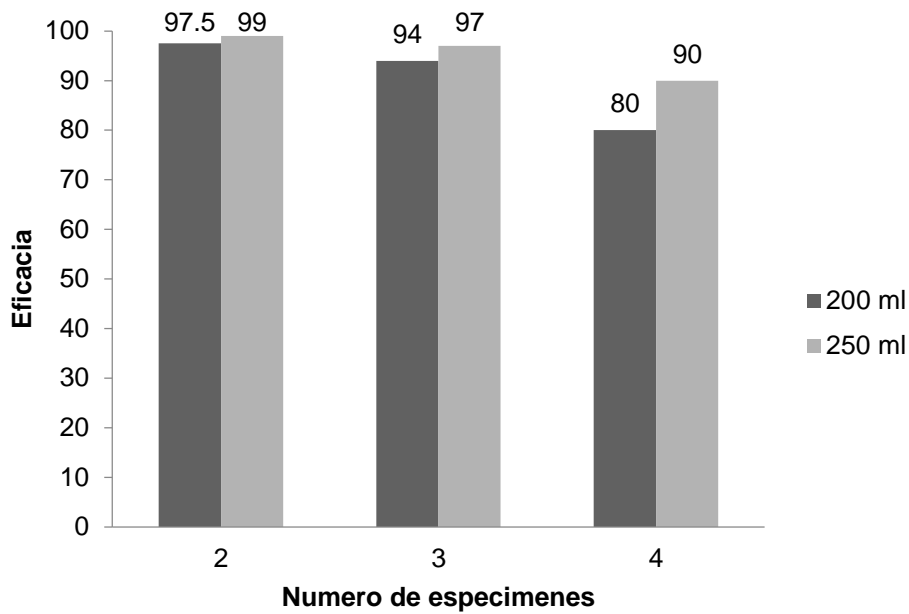


Figura 1. Porcentaje de eficacia en la digestión de la materia orgánica (MO) con H_2O_2 respecto al número de especímenes por frasco de *Choromytilus chorus*.

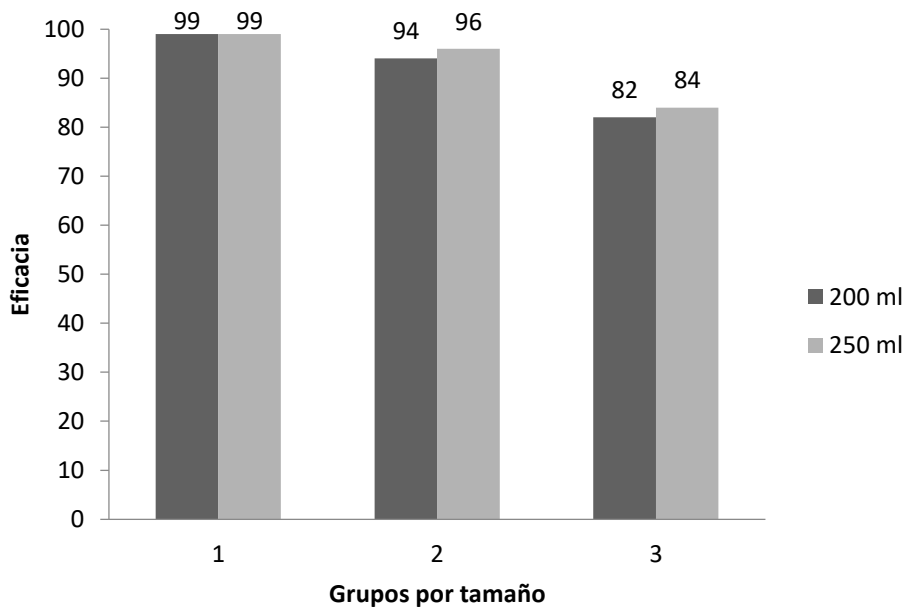


Figura 2. Porcentaje de eficacia en la digestión de la materia orgánica (MO) con H_2O_2 por grupos de tamaño de *Choromytilus chorus*. Grupo de tamaño 1: peso entre 3 g a 4,5 g. Grupo de tamaño 2: peso entre 4,6 g a 6 g. Grupo de tamaño 3: peso de 6 g a más.

Al analizar las botellas que contenían 20 g de MO con 200 mL de H₂O₂, se mostró una digestión de 95% y al someterla a 250 mL, la digestión fue de un 99%. Para el análisis de las botellas con 25 g de MO con 200 mL de H₂O₂ se vio una disminución en la digestión del 9% y al someterla a 250 mL la digestión disminuyó en un 5%. Acorde a estos resultados se hizo una prueba más en la que se colocó 18 g de MO con 200 mL y 250 mL de H₂O₂ mostrando una digestión del 99% para ambos casos. Optimizando así el uso del H₂O₂ (Fig. 3).

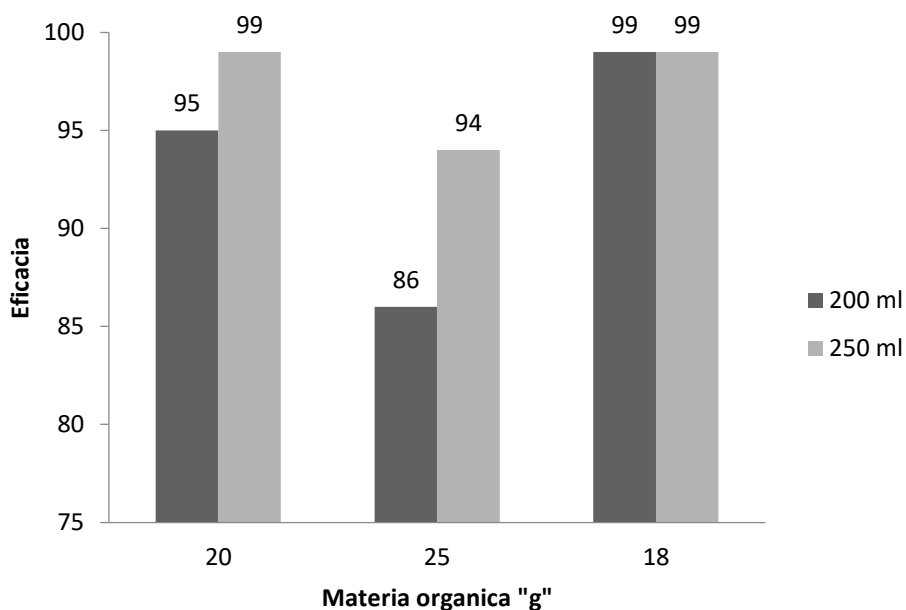


Figura 3. Porcentaje de eficacia en la digestión de la materia orgánica (MO) en g con H₂O₂ con límite de peso en *Choromytilus chorus*.

Tipo de equipamiento: El uso del oscilador magnético permitió lograr una digestión del 94 % utilizando 20 g de MO con 200 mL de H₂O₂. Se comparó con el baño maría a la misma concentración y la eficacia aumento a 99 % de digestión. El oscilador magnético empleado en el laboratorio permite el uso de una sola botella, el baño maría permite el uso de 12 botellas con muestras. Se observó que mantener las muestras a una temperatura de 65 °C sin oscilación no es suficiente para obtener una buena digestión al 99%, por lo que el movimiento se hace necesario para este protocolo. El baño maría fue más eficaz que el oscilador magnético, pues permite evaluar y un mayor número de muestras, con oscilación y temperatura constante hasta las 48 h de digestión.

Para obtener una mejor digestión se utilizó 48 h de exposición a 65 °C en el baño maría como lo estableció Li *et al.* (2015) en su protocolo. A las 24 h no se observó una digestión óptima, después de este proceso se dejó 24 h más a temperatura ambiente en reposo, y no se vio necesario más tiempo.

El NaCl utilizado fue una concentración saturada a 60 °C para evitar que el agua se evapore. Li *et al.* (2015) emplearon una solución salina saturada. En cambio, Li *et al.* (2016) mencionan que utilizaron una solución salina sobresaturada con una concentración de 1,2 g·mL⁻¹ de NaCl, lo que para este experimento resultó muy complicado de obtener por lo cual se llegó a saturar 800 mL de agua filtrada con 296 g ± 0,5 g de NaCl, alcanzado una densidad de 1,1 g·mL⁻¹. Para Mathalon & Hill (2014), 250 g·L⁻¹ de NaCl es necesario para generar diferencia de densidades entre MP y cualquier artefacto en el envase. Se ha señalado como ventajas del uso del NaCl para la flotación de los MP, el que sea una metodología relativamente barata y simple, de baja peligrosidad, y que es un método verificado para PS, PA, PP, PVA y PE. Sin embargo entre las principales desventajas se indica que sus tasas de recuperación de MP son solo entre 85% y 95%, se requiere múltiples separaciones de densidad para lograr altas tasas de recuperación, y finalmente puede emplear mucho tiempo (Miller *et al.*, 2017).

La cantidad de MO como máximo para 200 mL de H₂O₂ al 30 % fue de 5 g (Li *et al.*, 2015). Mathalon & Hill (2014) utilizó 150 mL de H₂O₂ al 30 % para la digestión de 10 g de MO. En esta estandarización se comprobó que la digestión de los bivalvos no se realiza al 100 %, pero si se muestra alta eficacia con un peso mucho mayor al de 5 g. Los experimentos mostraron que se puede usar hasta 18 g de MO si se usa 200 mL de H₂O₂, con un protocolo que no separa al azar, ni por intervalos de tamaño y peso, si no por una agrupación de bivalvos que no excedan el peso límite de 18 g. Esta estandarización está apoyado por la agitación y temperatura constante el cual no fue modificado del protocolo de Li *et al.* (2015), debido a que una temperatura mayor a 65 °C puede ocasionar la pérdida de MP y el no mantener en oscilación las muestras dificulta la rápida digestión (Claessens *et al.*, 2013; Miller *et al.*, 2017). Se realizó estos experimentos utilizando el H₂O₂ minimizando los costos y obteniendo los mejores resultados.

El tiempo de digestión con H_2O_2 al 30 % fue de 24 h a una temperatura de 65°C con oscilación constante y después se dejó reposar por 24 h o 48 h de exposición a temperatura ambiente según el grado de digestión (Li *et al.*, 2015). Para esta fase se vio necesario que la digestión sea por 48 h con una temperatura de 65 °C, oscilación constante a 80 rpm y por 24 h a temperatura ambiente, lo que corroboró que a mayor cantidad de MO a digerir es mayor el tiempo de digestión (Mathalon & Hill, 2014). En los experimentos se observó que hay un límite de MO para un volumen de H_2O_2 al 30 % que se puede digerir a pesar de darle un tiempo más prolongado el cual muestra que para 20 g de MO se hace necesario usar más de 210 mL de H_2O_2 y si la cantidad de MO fuera de 25 g es necesario el uso de más de 250 mL de H_2O_2 para la digestión.

El uso de H_2O_2 para la digestión de MO blanda como la del tejido de los bivalvos tiene una alta eficacia cuando se quiere obtener MP (Miller *et al.*, 2017). Algunos ácidos hacen una digestión mucho más rápida pero con resultados menos eficaces en la obtención de MP ya que estos ácidos como el HNO_3 deterioran las fibras MP o las decoloran (Vandermeersch *et al.*, 2015; Miller *et al.*, 2017). También se ha encontrado en la literatura científica que el uso de métodos de digestión alcalinos como el KOH para invertebrados marinos, tiene una alta eficacia y no genera ningún cambio en los MP que se desean analizar (Claessens *et al.*, 2013; Thiele *et al.*, 2020). Miller *et al.* (2017) señalan que el KOH tiene como ventajas el emplear una metodología simple, ser relativamente barato, tiempo de digestión corto de solo 24 h y ser fácilmente accesible en el laboratorio. Sin embargo, puede presentar como desventaja que las tasas de recuperación registradas son por peso y no por abundancia, y su aplicabilidad a todo tipo de muestras no es bien conocida.

Flotación y filtración de microplásticos

Uno de los principales problemas fue lograr la flotación de los MP y determinar la forma más adecuada de obtención. Cuando se colocó la solución saturada de NaCl se observó que se formaba espuma en el frasco y eso dificultó el trasvaso por el filtro a otro recipiente. La generación de espuma no permitió observar con claridad los MP en el papel filtro. Aparte que este se saturaba con cristales de sal, por ello este método fue descartado.

Al probar el método de flotación al tope de la botella con el uso de una laminilla (Iannacone *et al.*, 2019), no mostró eficacia, debido a que la espuma generada por la reacción del agua con NaCl y con el H₂O₂, causaba el derrame del contenido y pérdida de MP. La laminilla solo contenía espuma y muy poco se observó por lo cual se tuvo que descartar este protocolo (Iannacone *et al.*, 2019).

Llenar hasta los $\frac{3}{4}$ de botella de un L con solución salina saturada y luego emplear una pipeta de 10 mL para sacar el sobrenadante con mucho cuidado y vaciar el contenido en una placa Petri de vidrio limpia mostró ser el mejor método a utilizar. Para evitar que los MP se adhieran a la pipeta, con agua filtrada se limpió y vació el contenido en otra placa Petri. Esta acción se hizo por 2 veces para evitar pérdida de MP, demostrando así que es la que proporcionó un mejor resultado.

El método de filtración para este tipo de protocolos usa mayormente una bomba de vacío, filtros de nitrocelulosa con una porosidad menor o igual a 5 μ m y una buena limpieza del lugar del trabajo para evitar la contaminación cruzada por MP que se pueden encontrar en aire (Li *et al.*, 2015). En este estudio no se utilizó una bomba de vacío, pero si fueron probados los métodos clásicos para la búsqueda de MP en arena (Iannacone *et al.*, 2019), lo cual permitió comparar la eficacia de estos protocolos. Sin lugar a dudas, el utilizar una pipeta de 5mL de vidrio resultó ser adecuado para el presente estudio, fue menos costoso que el uso de una bomba de vacío. Sin embargo, se sabe que el uso del método de la pipeta tiene sus limitaciones, debido a que puede que los MP más pequeños se adhieran en la pipeta generando un error en el conteo de estos.

Microplásticos

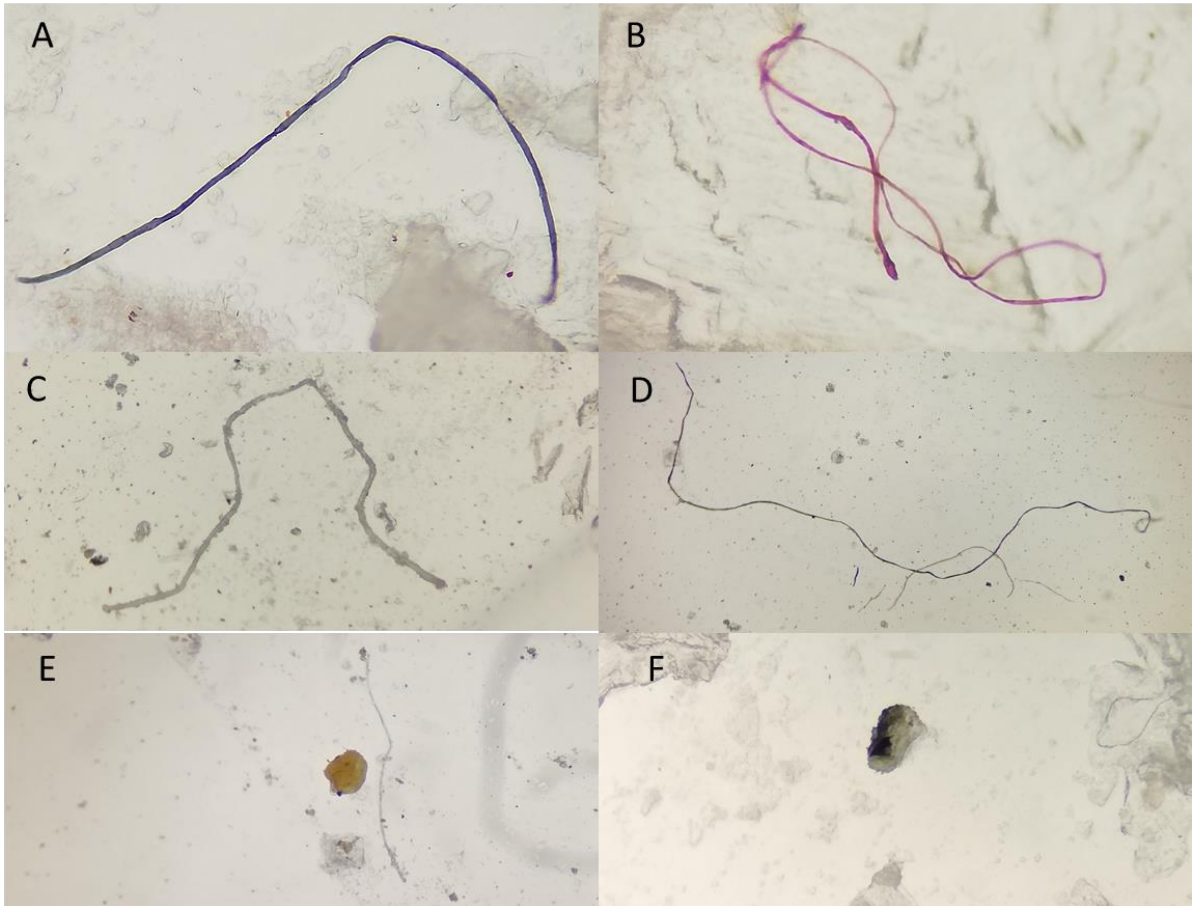


Figura 4. Microplásticos encontrados en *Aulacomya atra* y en *Choromytilus chorus* en el puerto de Ancón, departamento de Lima, Perú: A: Fibra color azul, B: Fibra color rojo, C: Fibra color blanco, D: Fibra color azul de tamaño peculiar, E: Pellet color amarillo, F: Pellet color blanco.

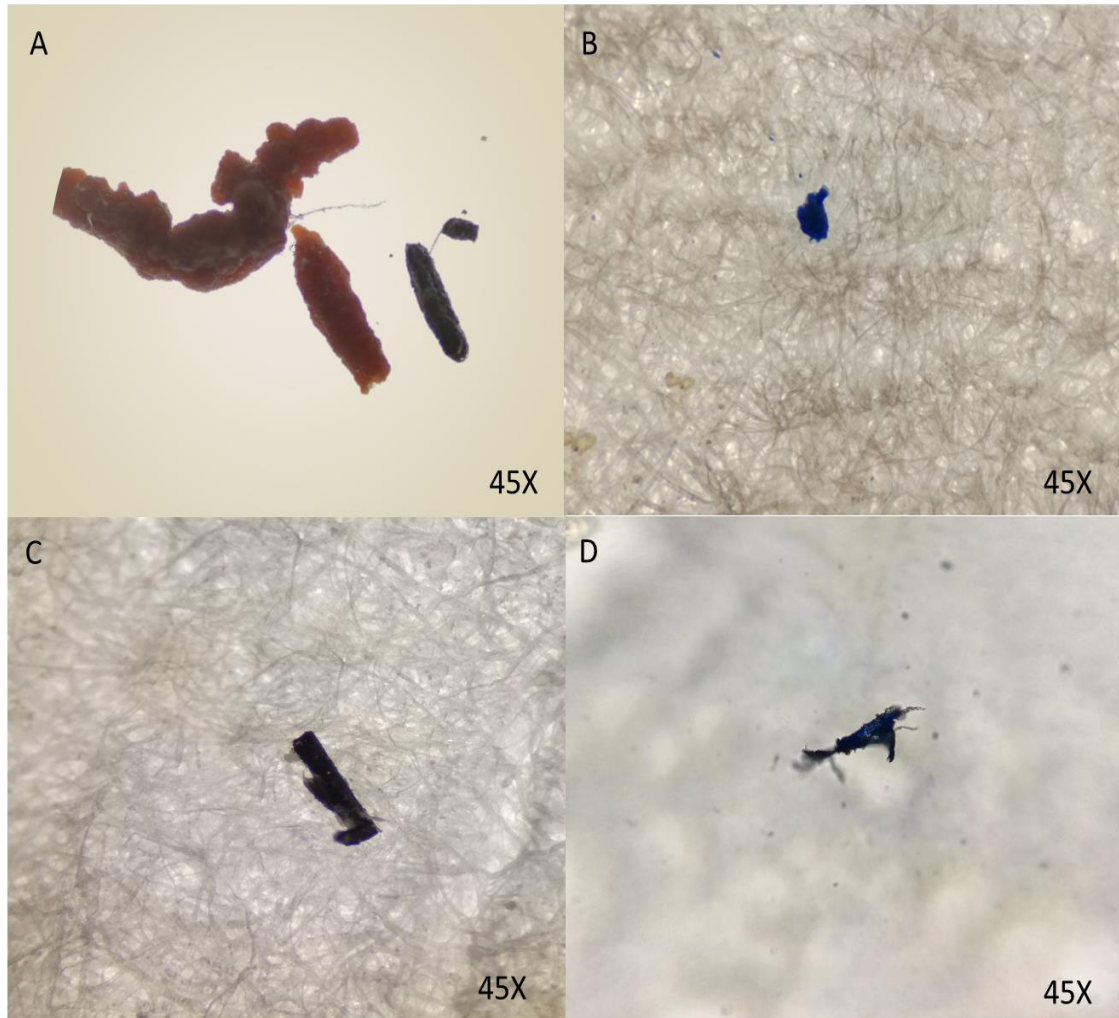


Figura 5. Meso-plásticos encontrados en *Aulacomya atra* y en *Choromytilus chorus* en el puerto de Ancón, departamento de Lima, Perú; A: meso-plástico con fibras envueltas; B: Artefacto no identificado envuelto en fibras MP; C: meso-plástico duro; D: meso-plástico azul con fibras MP.

Los tipos de MP encontrados se clasificaron en fibras de color blanco, rojo y azul; y los pellets de color blanco y amarillo (Tabla 1). Para *A. atra* y para *C. chorus* se obtuvo la siguiente secuencia en valores porcentuales: fibras > pellets y meso-plásticos. En relación a los colores de MP para *A. atra* se observa el siguiente ordenamiento en porcentaje: fibra roja > fibra azul > fibra blanco > pellets amarillo > pellet blanco. Similarmente en *C. chorus* se obtuvo el siguiente ordenamiento en porcentaje: fibra roja > fibra azul > fibra blanco > pellets amarillo = pellet blanco (Tabla 1, Fig. 4). Los meso-plástico que se

encontraron estaban enredados en fibras de MP como se muestra en la Fig. 5. A, B. No se logró identificar algunas muestras ya que no tenían forma, pero se determinó que contaban como meso-plástico.

En la Tabla 1 nos muestra los valores de ítem·g⁻¹, ítem·individuo⁻¹ e ítems·botella⁻¹.

Tabla 1. Valores porcentuales de MP y meso-plástico encontrados en *Aulacomya atra* y *Choromytilus chorus* procedentes de Ancón, Lima, Perú.

Especies de bivalvos	fibras (%)	pellets (%)	meso-plásticos (%)	fibra blanco (%)	fibra azul (%)	fibra roja (%)	pellets blanco (%)	pellets amarillo (%)	item·g ⁻¹ (%)	item·individuo ⁻¹ (%)	Ítems·botella ⁻¹ (%)
<i>Aulacomya atra</i>	92,68	6,05	1,27	14,84	36,77	42,26	2,90	3,23	1,91±0,11	11,48±0,64	34,44±1,91
<i>Choromytilus chorus</i>	90,48	7,48	2,04	16,92	33,46	41,35	4,14	4,14	1,64±0,08	9,85±0,45	29,55±1,36

La Tabla 2 nos muestra que no se encontraron diferencias significativas entre el número de MP tipo fibras, pellets y según colores entre *A. atra* y en *C. chorus* según la prueba de t de student. En el único caso que se encontraron diferencias fue para las fibras azules, presentándose valores mayores de ítems de MP para *A. atra* que para *C. chorus*. De igual forma al comparar los ítems de MP entre los tres colores de fibras se observó una mayor cantidad para el color rojo y azul en comparación con el blanco (F = 43,20, p<0,001; F_{Levene} = 1,67, p <0,19). Nuestros resultados concuerdan con Rezanía *et al.* (2018), quienes señalan que los colores dominantes en la biota acuática son el negro y el azul, y mayormente de fibras y fragmentos.

Los resultados obtenidos en *A. atra* y *C. chorus* fueron comparados con la literatura académica, Li *et al.*, (2015) evaluaron a 9 especies de bivalvos en Asia, y obtuvieron que lo más común eran las fibras que los pellets. En los especímenes evaluados, se encontraron de 2,1 a 10,5 ítems·g⁻¹ y 4,1 a 57,2 ítems·individuo⁻¹ de MP. En el presente estudio se obtuvieron cantidades menores de MP para ambas unidades de medida (tabla 1), lo que evidencia niveles mucho más bajos de MP en el Perú en comparación al ambiente marino del continente Asiático (Jambeck *et al.*, 2015).

Tabla 2. Pruebas estadísticas de comparación entre cantidades de MP en *Aulacomya atra* y en *Choromytilus chorus* en el puerto de Ancón,

departamento de Lima, Perú. t = Prueba de t de Student. F = Estadístico de Fisher para la prueba de homogeneidad de Varianzas de Levene. K-S = Kolmogorov-Smirnov para la normalidad. * = fue empleada la prueba de U de Mann-Whitney al no cumplir los datos la prueba de Kolmogorov-Smirnov de Normalidad. P = significancia.

MP	t	p	F	p	K-S	p
fibras	1,2	0,25	2,27	0,15	0,70	,69
pellets	1,06	0,31	1,56	0,23	0,70	,69
meso-plásticos	0,76	0,46	0,81	0,38	0,26	1,00
fibras blancas	0,11	0,91	1,19	0,29	0,26	1,00
fibras azules	18,0*	0,04	4,05	0,06	1,41	0,04
fibras rojas	1,61	0,13	0,02	0,89	0,94	0,34
pellets blancos	0,80	0,43	2,35	0,15	0,47	0,98
pellets amarillos	0,6	0,55	1,55	0,23	0,70	0,69
item·g ⁻¹	2,06	0,06	2,36	0,14	0,94	0,34
item·individuo ⁻¹	2,08	0,05	2,54	0,13	0,94	0,34
Ítems·botella ⁻¹	2,08	0,05	2,52	0,13	0,65	0,79

Kolandhasamy *et al.* (2018) encontró en el tracto intestinal de especímenes de cultivo del bivalvo *Mytilus edulis* Linnaeus, 1798, 9,2 ítems·g⁻¹ de MP. Esta investigación evidencia que los MP no solo ingresan por filtración, sino también por ingestión. Li *et al.* (2018) mostraron que en el molusco *M. edulis* de consumo humano directo en los supermercados del Reino Unido variaron entre 0,7 a 2,9 ítems·g⁻¹ y 1,1 a 6,4 ítems·individuo⁻¹, mostrando que la contaminación MP es alta en comparación a las especies evaluadas en la presente investigación.

En otro estudio con *M. edulis* y *Crassostrea gigas* Thunberg, 1793 (Ostreidae) colectadas de Alemania y Francia de granjas especializadas en su cultivo para el consumo humano se encontró 0,36 ítems·g⁻¹ y 0,47 ítems·g⁻¹, que muestran niveles de MP numéricamente más bajos que los encontrados en nuestro trabajo. Estos resultados se obtuvieron después de ser lavados y pasar por un proceso de digestión acida lo que puede afectar al proceso de extracción MP, debido a que la digestión acida no es la óptima para este tipo de ensayos por que tiende a degradar las fibras plásticas (Van Cauwenbergue *et al.*, 2014; Miller *et al.*, 2017).

Estudios en el Golfo Pérsico encontraron una alta concentración de MP en una diversidad de especies marinas de 12,8 a 20,0 ítems·g⁻¹ y en bivalvos estudiados encontró de 0,2 a 2,2 ítems·g⁻¹ resultados similares a los encontrados en este estudio, demostrando así que no solo los bivalvos están contaminados sino también otros tipos de invertebrados que se encuentran por debajo de la cadena trófica (Naji *et al.*, 2018).

Se determinó cuál fue el procedimiento más eficaz durante la digestión de la materia orgánica con peróxido de hidrogeno (H₂O₂), y la flotación y filtración de los MP usando a *C. chorus* para esta estandarización.

Durante la digestión con H₂O₂ el envase más adecuado fue la botella de vidrio de transparente de 1 L con 2 cm de abertura y 25 cm de altura. El volumen de H₂O₂ al 30% que permitió la mejor digestión de la materia orgánica al 99% en *C. chorus* fue 18 g en 200 mL de H₂O₂. El baño maría fue más eficaz que el oscilador magnético, pues permite evaluar y un mayor número de muestras, con oscilación y temperatura constante hasta las 48 h de digestión.

Durante la flotación y filtración de MP, se llenó hasta los ¾ de botella de un L con solución salina saturada y luego emplear una pipeta de vidrio volumétrica de 10 mL para sacar el sobrenadante con mucho cuidado y vaciar el contenido en una placa Petri de vidrio limpia mostró ser el mejor método de flotación para la extracción de MP a utilizar.

Se obtuvo 2 tipos de MP fibras que son las más abundantes, mostrando colores rojo azul y blanco; pellets de color amarillo y blanco, con concentraciones bajas en comparación de las revisiones realizadas en el otro lado del mundo. Los bivalvos no solo filtran MP si no también meso-plásticos de un tamaño entre 5 mm y 20 mm.

Finalmente, es nuestros resultados evidencian que es urgente la estandarización de protocolos para MP para una coherente recopilación y análisis de datos. Métodos armonizados, rápidos y reproducibles permitirán una evaluación más precisa de los impactos y riesgos que los MP representan para la biota, en especial para los bivalvos marinos y aumentarán la comparabilidad entre las investigaciones internacionales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrady, A.L. 2017. The plastic in microplastics: A review. *Marine Pollution Bulletin*, 119: 12-22.
- Área Funcional de Investigaciones en Biodiversidad (AFIB) - Dirección General de Investigaciones de Recursos Demersales y Litorales (DGIRDL). 2016. *Guía ilustrada para reconocimiento de especies de moluscos bivalvos con valor comercial*, Vol. 2. Industria Gráfica O'Diana, pp.1-88.
- Ashton, K.; Holmes, L. & Turner, A. 2010. Association of metals with plastic production pellets in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 60: 2050–2055.
- Avendaño, M. & Cantillánez, M. 2011. Reestablecimiento de *Choromytilus chorus* (Molina, 1782) (Bivalvia: Mytilidae) en el norte de Chile. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 39: 390-396.
- Avio, C.G.; Gorbi, S.; Milan, M.; Benedetti, M.; Fattorini, D.; d'Errico, G.; Pauleto, M.; Bargelloni, L & Regoli, F. 2015. Pollutants bioavailability and toxicological risk from microplastics to marine mussels. *Environmental Pollution*, 198: 211-222.
- Baechler, B.R.; Granek, E.F.; Hunter, M.V. & Conn, K.E. 2020. Microplastic concentrations in two Oregon bivalve species: Spatial, temporal, and species variability. *Limnology and Oceanography Letters*, 5: 54–65
- Barboza, L.G.A.; Frias, J.P.G.L.; Booth, A.M.; Vieira, L.; Masura, J.; Baker, J.; Foster, G. & Guilhermino, L. 2019. *Microplastics Pollution in the Marine Environment*. In: Sheppard, C. (Comp.). *World Seas: An Environmental Evaluation*. Volume III: Ecological Issues and Environmental Impacts. Elsevier. Países Bajos. pp. 329-351.
- Benítez, S.; Lagos, N.A.; Osóres, S.; Opitz, T.; Duarte, C.; Navarro, J.M.; Lardies, M.A. 2018. High pCO₂ levels affect metabolic rate, but not feeding behavior and fitness, of farmed giant mussel *Choromytilus chorus*. *Aquaculture Environment Interactions*, 10: 267–278.
- Claessens, M.; Van Cauwenberghe, L.; Vandegehuchte, M.B. & Janssen, C.R. 2013. New techniques for the detection of microplastics in sediments and field collected organisms. *Marine Pollution Bulletin*, 70: 227-233.
- Covernton, G.A.; Collicutt, B.; Gurney-Smith, H.J.; Pearce, C.M.; Dower, J.F.; Ross, P.S. & Dudas, S.E.. 2019. Microplastics in bivalves and their habitat in relation to shellfish aquaculture proximity in coastal British Columbia, Canada. *Aquaculture Environment Interactions*, 11: 357–374.
- Derraik, J.G.B. 2002. The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. *Marine Pollution Bulletin*, 44: 842–852.
- De Witte, B.; Devriese, L.; Bekaert, K.; Hoffman, S.; Vandermeersch, G.; Cooreman, K. & Robbens, J. 2014. Quality assessment of the blue mussel (*Mytilus edulis*): Comparison between commercial and wild types. *Marine Pollution Bulletin*, 85: 146-155.
- De-la-Torre, G. 2019a. Microplásticos en el medio marino: una problemática que abordar. *Revista Ciencia y Tecnología*, 15: 27-37.
- De-la-Torre G.E. 2019b. Microplastics: an emerging threat to food security and human health. *Journal of Food Science and Technology*, 1-8.
- De-la-Torre, G.; Mendoza-Castilla, L., & Pilar, R. 2019a. Microplastic contamination in market bivalve *Argopecten purpuratus* from Lima, Peru. *Manglar*, 16: 85-89.

- De-la-Torre G.E. Dioses-Salinas DC, Pérez-Baca BL, & Santillán L. 2019b. Microplastic abundance in three commercial fish from the coast of Lima, Peru. *Brazilian Journal of Natural Sciences*, 2(3), 171-171.
- De-la-Torre G.E., Apaza-Vargas D.M., & Santillán L. 2019c. Microplastic ingestion and feeding ecology in mollusks from the coast of Lima, Peru. *Environmental Pollution*, 244, 522-533.
- De-la-Torre, G.E.; Dioses-Salinas, D.C.; Castro, J.M.; Antay, R.; Yupanqui-Fernández, N.; Dante Espinoza-Morriberón, D. & Saldaña-Serrano, M. 2020. Abundance and distribution of microplastics on sandy beaches of Lima, Peru. *Marine Pollution Bulletin*, 151: 110877.
- El Peruano, 2018. *Ley que regula el plástico de un solo uso y los recipientes o envases descartables*. Ley N° 30884. El Peruano. Miércoles 19 de diciembre de 2018. En: <https://busquedas.elperuano.pe/download/url/ley-que-regula-el-plastico-de-un-solo-uso-y-los-recipientes-ley-n-30884-1724734-1>
- Engler, R.E. 2012. The complex interaction between marine debris and toxic chemicals in the ocean. *Environmental science & technology*, 46: 12302-12315.
- Fang, C.; Zheng, R.; Chen H.; Hong, F.; Lin, L.; Lin, H.; Guo, H.; Bailey, C.; HelmutSegner, H.; Mu, J. & Bo, J. 2019. Comparison of microplastic contamination in fish and bivalves from two major cities in Fujian province, China and the implications for human health. *Aquaculture*, 512: 734322.
- Galloway, T.S. 2015. *Micro- and Nano-plastics and Human Health*. In: Bergmann, M.; Gutow, L. & Klages, M. (eds) *Marine Anthropogenic Litter*. Springer, Cham.
- GESAMP (Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection). 2019. *Guidelines on the monitoring and assessment of plastic litter and microplastics in the ocean (Kershaw, P.J.; Turra, A. & Galgani, F. eds.)*, (IMO/FAO/UNESCO-IOC/UNIDO/WMO/IAEA/UN/UNEP/UNDP/ISA Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection). *Rep. Stud. GESAMP No. 99*, 130p.
- Gonzales, A.M. & Espinoza, L.A. 2020. Efecto de la pesca artesanal de *Aulacomya atra* (Mollusca: Mytilidae) en la sostenibilidad del recurso. *Avances*, 22: 64-80.
- Granek, E.F.; Brander, S.M. & Holland, E.B. 2020. Microplastics in aquatic organisms: Improving understanding and identifying research directions for the next decade. *Limnology and Oceanography Letters*, 5: 1–4.
- Hidalgo-Ruz, V.; Gutow, L.; Thompson, R.C.; Thiel, M. 2012. Microplastics in the Marine Environment: A Review of the Methods Used for Identification and Quantification. *Environmental Science & Technology*, 46:3060-3075.
- Iannacone, J.; Huyhua, A.; Alvarino, L.; Valencia, F.; Principe, F.; Minaya, D.; Ortega, J.; Argota, G. & Castañeda, L. 2019. Microplásticos en la zona de marea alta y supralitoral de una playa arenosa del litoral costero del Perú. *The Biologist (Lima)*, 17: 335-346.
- IMARPE (Instituto del Mar Peruano). 2016. Guía de campo ilustrada para reconocimiento de especies de moluscos bivalvos con valor comercial. Serie de divulgación científica. Vol 2.N°1. Industria Gráfica O'Diana. 84 p.
- Jabeen, K.; Su, L.; Li, J.; Yang, D.; Tong, C.; Mu, J. & Shi, H. 2017. Microplastics and mesoplastics in fish from coastal and fresh waters of China. *Environmental Pollution*, 221: 141-149.

- Jambeck, J.R.; Geyer, R.; Wilcox, C.; Siegler, T.R.; Perryman, M.; Andrady, A.; Narayan, R. & Law, K.L. 2015. Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science*, 347: 768-771.
- Kolandhasamy, P.; Su, L.; Li, J.; Qu, X.; Jabeen, K. & Shi, H. 2018. Adherence of microplastics to soft tissue of mussels: A novel way to uptake microplastics beyond ingestion. *Science of the Total Environment*, 610-611: 635-640.
- Li, J.; Yang, D.; Li, L.; Jabeen, K. & Shi, H. 2015. Microplastics in commercial bivalves from China. *Environmental Pollution*, 207: 190–195.
- Li, J.; Qu, X.; Su, L.; Zhang, W.; Yang, D.; Kolandhasamy, P.; Li, D. & Shi, H. 2016. Microplastics in mussels along the coastal waters of China. *Environmental Pollution*, 214: 177–184.
- Li, J.; Green, C.; Reynolds, A.; Shi, H. & Rotchell, J.M. 2018. Microplastics in mussels sampled from coastal waters and supermarkets in the United Kingdom. *Environmental pollution*, 241: 35-44.
- Lusher, A.L.; Welden, N.A.; Sobral, P. & Cole, M. 2017. Sampling, isolating and identifying microplastics ingested by fish and invertebrates. *Analytical Methods*, 9: 1346-1360.
- Mathalon, A. & Hill, P. 2014. Microplastic fibers in the intertidal ecosystem surrounding Halifax Harbor, Nova Scotia. *Marine Pollution Bulletin*, 81: 69-79.
- Miller, M.E.; Kroon, F.J. & Motti, C.A. 2017. Recovering microplastics from samples: A Review of current practices. *Marine Pollution Bulletin*, 123: 6-18.
- Naji, A.; Nuri, M. & Vethaak, A.D. 2018. Microplastics contamination in molluscs from the northern part of the Persian Gulf. *Environmental pollution*, 235: 113-120.
- NG (National Geographic). 2020. *20 datos sobre el problema del plástico en el mundo*. Miércoles 22 de abril de 2020. En: https://www.nationalgeographic.com.es/mundo-ng/20-datos-sobre-problema-plastico-mundo_15282
- Ory, N.; Chagnona, C.; Felix, F.; Fernández, C.; Ferreira, J.L.; Gallardo, C.; Garcés-Ordóñez, O.; Henostroza, A.; Laaz, E.; Mizraji, R.; Mojica, H.; Murillo-Haro, V.; Medina, L.O.; Preciado, M.; Sobral, P.; Urbina, M.A. & Thiel, M. 2018. Low prevalence of microplastic contamination in planktivorous fish species from the southeast Pacific Ocean. *Marine Pollution Bulletin*, 127: 211–216.
- Paredes, C.; Cardoso, F.; Santamaría, J.; Esplana, J. & Llaja, L. 2016. Lista anotada de los bivalvos marinos del Perú. *Revista peruana de biología*, 23: 127-150.
- Paul-Pont, I.; Lacroix, C.; Fernández, C. G.; Hégarret, H.; Lambert, C.; Le Goïc, N.; Frere, L.; Cassone, A.; Sussarellu, R.; Fabioux, C.; Guyomarch, J.; Albertosa, M.; Huvet, A & Soudant, P. 2016. Exposure of marine mussels *Mytilus* spp. to polystyrene microplastics: toxicity and influence on fluoranthene bioaccumulation. *Environmental Pollution*, 216: 724-737.
- Phuong, N.N.; Poirier, L.; Pham, Q.T.; Lagarde, F.; 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: 664-674.

- Phuong, N.N.; Zalouk-Vergnoux, A.; Kamari, A.; Mouneyrac, C.; Amiard, F.; Poirier L. & 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.
- Purca, S. & Henostroza, A. 2017. Presencia de microplásticos en cuatro playas arenosas de Perú. *Revista peruana de biología*, 24: 101-106.
- Prata, J. C.; da Costa, J. P.; Lopes, I.; Duarte, A. C. & Rocha-Santos, T. 2019. Environmental exposure to microplastics: an overview on possible human health effects. *Science of the Total Environment*, 13: 44-55.
- PRODUCE (Ministerio de la Producción). 2018a. *Anuario Estadístico Pesquero y Acuicola 2017*. Ministerio de la producción. Produce. Lima, Perú. 205 p.
- PRODUCE (Ministerio de la Producción). 2018b. Declaran en recuperación al recurso hidrobiológico choro y crean Comisión Sectorial de Trabajo Técnico. Resolución Ministerial N° 506-2018-PRODUCE. Normas Legales El Peruano. 13 de noviembre del 2018.
- Rezania, S.; Park, J.; Din, M.F.M.; Taib, S.M.; Talaiekhosani, A.; Yadav, K.K. & Kamyab, H. 2018. Microplastics pollution in different aquatic environments and biota: A review of recent studies. *Marine Pollution Bulletin*, 133: 191-208.
- Ríos, V.; Ocampo, N. & Astorga-España, M.S. 2018. Composición química proximal y morfometría de cholga (*Aulacomya ater*, Molina, 1782) y chorito (*Mytilus chilensis*, Hupé, 1854) comercializados en la Región de Magallanes. *Anales Instituto Patagonia (Chile)*, 46:49-58.
- Rochman, C.M.; Kurobe, T.; Flores, I. & Teh, S.J. 2014. Early warning signs of endocrine disruption in adult fish from the ingestion of polyethylene with and without sorbed chemical pollutants from the marine environment. *Science of the Total Environment*, 493: 656-661.
- Salim, S. Y.; Kaplan, G.G. & Madsen, K.L. 2014. Air pollution effects on the gut microbiota: a link between exposure and inflammatory disease. *Gut microbes*, 5: 215-219.
- Smith, L.E. 2018. Plastic ingestion by *Scylliorhinus canicula* trawl captured in the North Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 130: 6–7.
- Solís, M.A.; Ballesteros, M. & Riascos, J.M. 2019. The early life history transitions of the bivalve *Aulacomya atra* from the Humboldt Current System off Peru are affected by human exploitation and modulated by El Niño–La Niña cycle. *Frontiers in Marine Science*, 6: 496.
- Thiele, C.J.; Hudson, M.D. & Russell, A.E. 2019. Evaluation of existing methods to extract microplastics from bivalve tissue: Adapted KOH digestion protocol improves filtration at single-digit pore size. *Marine Pollution Bulletin*, 142: 384–393.
- Van Cauwenberghe, L. & Janssen, C.R. 2014. Microplastics in bivalves cultured for human consumption. *Environmental pollution*, 193: 65-70.
- Vandermeersch, G.; Van Cauwenberghe, L.; Janssen, C. R.; Marques, A.; Granby, K.; Fait, G.; Kotterman, M. J.J.; Diogène, J.; Bekaert, K.; Robbens, J. & Devriese, L. 2015. A critical view on microplastic quantification in aquatic organisms. *Environmental Research*, 143, Part B: 46-55.
- Von Friesen, L.W.; Granberg, M.E.; Hassellöv, M.; Gabrielsen, G.W. & Magnusson, K. 2019. An efficient and gentle enzymatic digestion protocol

- for the extraction of microplastics from bivalve tissue. *Marine Pollution Bulletin*, 142: 129–134.
- Von Moos, N.; Burkhardt-Holm, P. & 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 & technology*, 46: 11327-11335.
- Wang, J.; Tan, Z.; Peng, J.; Qiu, Q. & Li, M. 2016. The behaviors of microplastics in the marine environment. *Marine Environmental Research*, 113: 7-17.
- Woodall, L.C.; Sanchez-Vidal, A.; Canals, M.; Paterson, G.L.J.; Coppock, R.; Sleight, V.; Calafat, A.; Rogers, A.D.; Narayanaswamy, B.E. & Thompson, R.C. 2014. The deep sea is a major sink for microplastic debris. *Royal Society Open Science*, 1: 140-317.