



NOTA / NOTE

## Evaluación de las técnicas para la digestión y extracción de microplásticos ingeridos por el zooplancton marino

### Assessment of techniques for the digestion and extraction of microplastics ingestion by marine zooplankton

Laura Sofía Coral-Chamorro<sup>1</sup>, Jenny Alejandra Ruiz-Jiménez<sup>1</sup>, María Isabel Criales-Hernández<sup>2\*</sup> y

0000-0002-4301-3886

0000-0001-9700-3774

0000-0001-5608-8943

Rafael Cabanzo-Hernández<sup>3</sup>

0000-0002-6907-2120

1. Laboratorio de Hidrobiología, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Santander, Colombia. [laura2181317@correo.uis.edu.co](mailto:laura2181317@correo.uis.edu.co), [alejandrar.jj@gmail.com](mailto:alejandrar.jj@gmail.com)

2. Universidad Nacional de Colombia–Sede Bogotá –Facultad de Ciencias–Departamento de Biología, Bogotá, Colombia. [micrialesh@unal.edu.co](mailto:micrialesh@unal.edu.co)\*

3. Laboratorio de Espectroscopía Atómica y Molecular (LEAM), Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Santander, Colombia. [rcabanzo@uis.edu.co](mailto:rcabanzo@uis.edu.co)

\* Autor de correspondencia / Corresponding author

#### RESUMEN

Existe un incremento de publicaciones por conocer la problemática de la contaminación marina por microplásticos (MPs), donde ya se reconocen algunos de los efectos que pueden tener en el zooplancton. Este aumento de publicaciones requiere que se revisen las metodologías para unificar criterios de comparación, por lo que es de gran importancia unificar técnicas para las metodologías de extracción de los microplásticos ingeridos por el zooplancton para determinar la abundancia y las características de los MPs. A partir de una búsqueda en bases de datos, se escogieron cuatro técnicas específicas para la degradación de la materia orgánica representada por el zooplancton. Las técnicas fueron evaluadas en cuatro aspectos: 1) Eficiencia de la degradación de la materia orgánica, 2) Duración y condiciones de temperatura para el procesamiento, 3) Efecto físico de la digestión sobre los microplásticos, 4) cuantificar los MPs a partir de la tasa de ingestión. Se emplearon cincuenta individuos para cada uno de los grupos más abundantes correspondientes a las familias Paracalanidae, Corycaeidae y Oncaeidae, y al filo Chaetognatha. Los resultados obtenidos mostraron que la mejor técnica fue la de Md Amin *et al* (2020) con modificaciones, en la que no se observaron alteraciones en la integridad de los MPs y la tasa de ingestión fue similar a la que se reporta para estos organismos.

**PALABRAS CLAVE:** costa del Caribe colombiano, contaminación emergente, técnicas de degradación, microplásticos, invertebrados.

#### ABSTRACT

Marine pollution caused by microplastics (MPs) in the ocean has been very high in recent years, and their effects on zooplankton have been recognized. The crescent publications require review of the methodologies to unify the criteria of comparison. It is of great importance to establish unified techniques for the extraction methodologies of microplastics ingested by zooplankton to determine the abundance and characteristics of MPs. Databases were used to find specific techniques for the digestion of organic material from marine organisms, and four specific techniques were chosen for zooplankton degradation. The chosen techniques were evaluated in four aspects: 1) The efficiency of digestion was evaluated on zooplankton samples, 2) The efficiency of digestion in different duration and temperature conditions was assessed, 3) Evaluate the effect physics of digestions on microplastics, 4) Quantifying MPs from the ingestion rate. Fifty individuals were chosen from the most abundant groups corresponding to the families Paracalanidae, Corycaeidae, Oncaeidae, and the phylum Chaetognatha were used. The best technique obtained was Md Amin *et al* (2020) with our modifications. The organic matter was totally degraded, not changes in the physic integrity of MPs were observed, and the ingestion rates were similarly reported for other authors in these organisms.

**KEYWORDS:** Caribbean Colombian coast, digestión, microplastics, emerging pollutants, zooplankton.

DOI: <https://doi.org/10.25268/bimc.invemar.2024.53.1.1277>

Publicado por Invemar

Este es un manuscrito de acceso abierto bajo la licencia CC Reconocimiento-No Comercial-Compartir Igual

Published by Invemar

This is an open Access article under the CC BY-NC-SA

La acumulación y aumento de plásticos en el ecosistema marino se ha convertido en una problemática durante los últimos años, contaminando desde regiones costeras (Chenillat *et al.*, 2021) hasta regiones oceánicas (Lebreton *et al.*, 2018); por efectos erosivos, los plásticos se fragmentan en partículas más pequeñas también conocidas como microplásticos (MPs: 1  $\mu\text{m}$ –5 mm) (Frias y Nash, 2019). Los microplásticos (MPs) se sabe que están presentes en todo el océano global y pueden ser encontrados por muchas especies, incluidas las del zooplancton. Aunque se encuentran dentro del rango de tamaño de las presas del zooplancton, pocos estudios sobre la ingestión de MP se han llevado in situ (Zavala-Alarcón *et al.* 2023), para lo cual también se necesitan protocolos de digestión para determinar la abundancia y las características de los microplásticos (Alfonso *et al.* 2021). Como resultado de diversas investigaciones, se ha registrado la ingesta de MPs en peces (Calderón *et al.*, 2019; Zitouni *et al.*, 2021; Garcés-Ordóñez *et al.* 2022), bivalvos (Lo y Chan, 2018; Liu *et al.* 2021), crustáceos (Cau *et al.*, 2019; Yin *et al.*, 2022) y en la comunidad zooplanctónica (Lee *et al.*, 2013; Cole *et al.*, 2015; Jeong *et al.*, 2017, Alfonso *et al.* 2021; Zavala-Alarcón *et al.* 2023); los animales pueden ingerir MPs al confundirlos con presas o de manera pasiva al filtrar el agua marina (Md Amin *et al.*, 2020). La ingesta de partículas plásticas ha desencadenado efectos adversos como la reducción del consumo de alimentos, incorporación de MPs en los tejidos corporales, daños físicos en el tracto digestivo y disrupciones endocrinas en los organismos (de Sá *et al.*, 2018; Lo y Chan, 2018; Yu *et al.* 2020; Zitouni *et al.*, 2021; He *et al.*, 2022).

El zooplancton generalmente se alimenta en las aguas superficiales donde la abundancia de MPs es superior a la que se puede encontrar a media agua, por lo que se aumentan las posibilidades de encuentro e ingestión (Steinberg y Landry, 2017; Botterell *et al.*, 2019). En Colombia, se ha registrado principalmente la presencia de MPs en áreas marinas (Acosta-Coley *et al.*, 2019; Garcés-Ordóñez *et al.*, 2021, 2022), y dentro del contenido estomacal de peces (Calderon *et al.*, 2019; Tafurt-Villarraga *et al.*, 2021; Jimenez-Cárdenas *et al.*, 2022); no obstante, en el país hasta la fecha no existe información publicada acerca de la ingesta de MPs por el zooplancton. Aunque la atención sobre la contaminación de MPs, es algo que se investiga actualmente, se mantienen muchas preguntas sobre los efectos que pueden tener sobre los ecosistemas marinos incluyendo su impacto potencial sobre el ciclo del carbono (Shen *et al.*, 2020) y la producción secundaria a través de la ingestión (Troost *et al.*, 2018). Por

The accumulation and increase of plastics in the marine ecosystem have become a significant issue in recent years, contaminating from coastal regions (Chenillat *et al.*, 2021) to oceanic areas (Lebreton *et al.*, 2018). Due to erosive effects, plastics break down into smaller particles known as microplastics (MPs: 1  $\mu\text{m}$ –5 mm) (Frias and Nash, 2019). Microplastics (MPs) are known to be present throughout the global ocean and can be found by many species, including zooplankton. Although they fall within the size range of zooplankton prey, few in situ studies on MPs ingestion have been conducted (Zavala-Alarcón *et al.*, 2023), requiring digestion protocols to determine abundance and characteristics of microplastics (Alfonso *et al.*, 2021). Various studies have reported MPs ingestion by fish (Calderón *et al.*, 2019; Zitouni *et al.*, 2021; Garcés-Ordóñez *et al.*, 2022), bivalves (Lo and Chan, 2018; Liu *et al.*, 2021), crustaceans (Cau *et al.*, 2019; Yin *et al.*, 2022), and zooplankton communities (Lee *et al.*, 2013; Cole *et al.*, 2015; Jeong *et al.*, 2017, Alfonso *et al.*, 2021; Zavala-Alarcón *et al.*, 2023). Animals may ingest MPs by mistaking them for prey or passively while filtering seawater (Md Amin *et al.*, 2020). Ingesting plastic particles has triggered adverse effects, including reduced food consumption, incorporation of MPs into body tissues, physical damage to the digestive tract, and endocrine disruptions in organisms (de Sá *et al.*, 2018; Lo and Chan, 2018; Yu *et al.*, 2020; Zitouni *et al.*, 2021; He *et al.*, 2022).

Zooplankton generally feeds in surface waters where MPs abundance is higher than at mid-depth, increasing the chances of encounter and ingestion (Steinberg and Landry, 2017; Botterell *et al.*, 2019). In Colombia, the presence of MPs has been mainly reported in marine areas (Acosta-Coley *et al.*, 2019; Garcés-Ordóñez *et al.*, 2021, 2022), and within the stomach contents of fish (Calderon *et al.*, 2019; Tafurt-Villarraga *et al.*, 2021; Jimenez-Cárdenas *et al.*, 2022). However, there is no published information on MPs ingestion by zooplankton in Colombia to date. Despite the current focus on MPs pollution, many questions remain about its effects on marine ecosystems, including potential impacts on the carbon cycle (Shen *et al.*, 2020) and secondary production through ingestion (Troost *et al.*, 2018). Zooplankton plays a crucial role in marine ecosystems, facilitating energy transfer through the food web and representing the early life stage of many marine species. Given their varied feeding habits and the size range of their prey, zooplankton is one of the most sensitive groups to MPs (Moore, 2008; Zavala-Alarcón *et al.*, 2023).

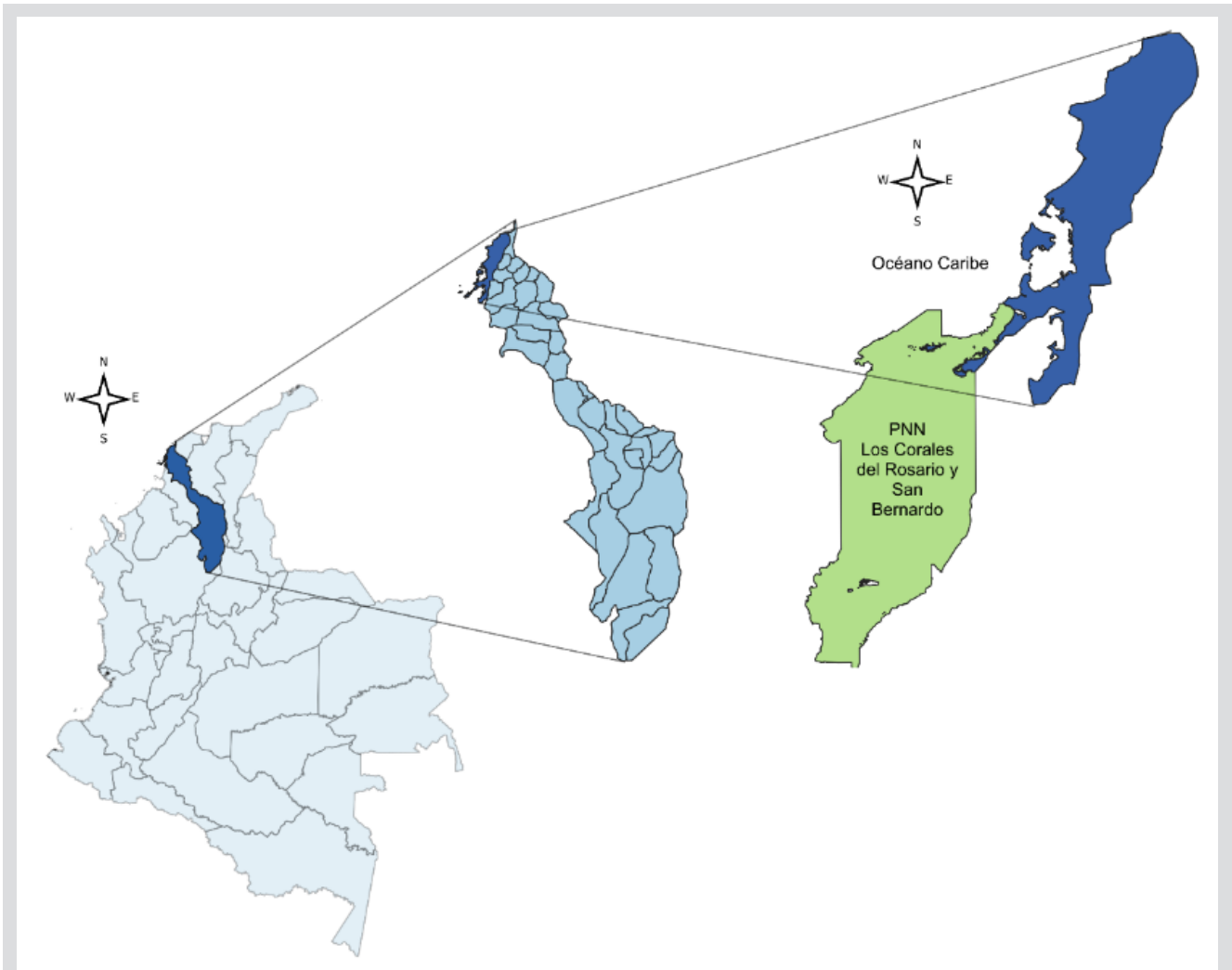
lo que el zooplancton juega un papel fundamental en los ecosistemas marinos, permite la transferencia de energía a lo largo de la red alimentaria, y comprende la etapa temprana de la vida de muchas especies marinas. Dado que muchas de estas especies presentan diferentes hábitos alimentarios y los microplásticos se encuentran dentro del rango de tamaño de sus presas, el zooplancton es uno de los grupos más sensibles a los MPs. (Moore, 2008; Zavala-Alarcón *et al* 2023).

Debido a que las muestras que se analizan de MPs en los ecosistemas marinos y organismos del zooplancton son usualmente obtenidos con redes de plancton, presentan gran cantidad de materia orgánica (MO) representada principalmente por organismos del zooplancton y fitoplancton. Para lo que es necesario efectuar técnicas de digestión para degradar la MO de los organismos y la detección de MPs ingeridos, se han seguido diferentes protocolos que utilizan diferentes reactivos (ácidos, bases, oxidantes, enzimas), concentraciones, pasos en la digestión, duración y condiciones de temperatura, dependiendo del tipo de organismos (Desforges *et al.*, 2015; Cau *et al.*, 2019; Md Amin *et al.*, 2020; Lusher *et al.*, 2020; Zheng *et al.*, 2020; Alfonso *et al.*, 2021; Aytan *et al.*, 2022). Considerando el incremento exponencial de los estudios sobre MPs en las fracciones más pequeñas a 100µm que son las que se encuentran ingeridos por el zooplancton (Zhang *et al.* 2020; Alfonso *et al.* 2021), el presente trabajo tiene como objetivo encontrar los efectos de los protocolos sobre los organismos y los MPs, mejorando la eficiencia en los métodos para investigar la presencia de estos, contribuyendo a establecer una metodología eficiente y estandarizada para su investigación.

Se realizó una revisión de la literatura en las bases de datos Google Scholar, Web of Science y Scopus con las palabras clave “microplásticos”, “ingestión”, “organismos acuáticos”, los protocolos elegidos se aplicaron y ajustaron a partir de una muestra piloto recolectada en Isla Arena dentro del Parque Nacional Natural Corales del Rosario y de San Bernardo (PNNCRSB), Colombia, ubicada en las siguientes coordenadas geográficas 10° 08' 55.3" N 75° 43' 45.1" W (ver Figura 1). Los organismos zooplanctónicos se recolectaron con una red mini bongo de 30 cm de diámetro, provista con dos redes de 200 µm y 500 µm, y un contador mecánico General Oceanic para determinar el volumen de agua filtrada; se realizó un arrastre oblicuo de acuerdo con la metodología de Smith y Richardson (1979), desde la superficie hasta el fondo a partir de un espacio de seguridad aproximado de un metro sobre el fondo, por cinco minutos de arrastre de fondo a una velocidad de 5.6 km/h. El material biológico se fijó en

Samples analyzed for MPs in marine ecosystems and zooplankton organisms are usually obtained with plankton nets, containing a significant amount of organic matter (OM) mainly represented by zooplankton and phytoplankton organisms. Digestion techniques are necessary to degrade the OM of organisms and to detect ingested MPs, and different protocols have been followed using various reagents (acids, bases, oxidants, enzymes), concentrations, digestion steps, duration, and temperature conditions depending on the type of organisms (Desforges *et al.*, 2015; Cau *et al.*, 2019; Md Amin *et al.*, 2020; Zheng *et al.*, 2020; Lusher *et al.*, 2020; Alfonso *et al.*, 2021; Aytan *et al.*, 2022). Considering the exponential increase in studies on MPs in the smaller fractions up to 100µm, which are ingested by zooplankton (Zhang *et al.*, 2020; Alfonso *et al.*, 2021), this study aims to explore the effects of digestion protocols on organisms and MPs, improving the efficiency of methods to investigate their presence and contributing to establishing an efficient and standardized methodology for research.

A literature review was conducted on Google Scholar, Web of Science, and Scopus using the keywords “microplastics,” “ingestion,” “aquatic organisms,” and chosen protocols were applied and adjusted based on a pilot sample collected on Isla Arena within Corales del Rosario and San Bernardo National Natural Park (PNNCRSB), Colombia, located at 10° 08' 55.3" N 75° 43' 45.1" W (Figure 1). Zooplankton organisms were collected with a 30 cm diameter mini bongo net equipped with two nets of 200 µm and 500 µm, and a General Oceanic mechanical counter to determine the filtered water volume. An oblique tow was conducted following the methodology of Smith and Richardson (1979), from the surface to the bottom with an approximate safety space of one meter above the bottom, for five minutes of bottom trawling at a speed of 5.6 km/h. The biological material was fixed in 4 % formaldehyde seawater neutralized with sodium tetraborate ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 / \text{Na}_2 * 2 \text{B}_2\text{O}_3$ ) and transported to the hydrobiology laboratory at Universidad Industrial de Santander, Colombia, where the four most abundant zooplankton groups from the 200 µm net were observed and separated. Fifty (50) individuals from each zooplankton group were then separated and measured using a Discovery V.12 stereomicroscope with an Axiocam ERc 5s camera via ZEISS ZEN software (Blue edition). Finally, to validate the different protocols, the MPs ingestion rate was estimated.



**Figura 1.** Área de estudio y ubicación de muestreo en Isla Arena, Parque Nacional Natural Corales del Rosario y San Bernardo, Bolívar, Colombia.

**Figure 1.** Study area and sampling location in Isla Arena, Corales del Rosario and San Bernardo National Natural Park, Bolívar, Colombia.

agua de mar con formol al 4 % neutralizado con tetraborato de sodio ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 / \text{Na}_2 * 2 \text{B}_2\text{O}_3$ ) y se transportó al laboratorio de hidrobiología de la Universidad Industrial de Santander, Colombia, en donde se observaron y separaron los cuatro grupos más abundantes del zooplancton provenientes de la red de 200  $\mu\text{m}$ . Posteriormente, se separaron y midieron cincuenta (50) individuos de cada grupo de zooplancton empleando un estereomicroscopio Discovery V.12. con cámara AxioCam ERc 5s mediante el software ZEISS ZEN (Blue edition). Por último, para validar los diferentes protocolos se estimó la tasa de ingestión de MPs.

Con el propósito de evitar la contaminación en el laboratorio, se utilizó material de vidrio, sustancias filtradas con membrana de microfibras de vidrio (0.45  $\mu\text{m}$  de poro), limpieza con alcohol al 70 % y agua destilada, manipulación

To avoid contamination in the laboratory, glass material was used, substances were filtered with a glass microfiber membrane (0.45  $\mu\text{m}$  pore), cleaning with 70 % alcohol and distilled water, substance handling and filtrations in gas extraction hoods; organisms were rinsed with ultrapure deionized water (type I) to remove salts and impurities and deposited in glass jars. Tweezers were used to remove external material. To determine MPs integrity, control samples with MPs particles in a glass jar were used, evaluating the impact of the procedure for each of the employed protocols.



de sustancias y filtraciones en cabinas de extracción de gases; los organismos se lavaron con agua desionizada ultrapura (tipo I) para retirar las sales e impurezas y depositarlo en los frascos de vidrio, con pinzas se retiró cualquier material externo. Para determinar la integridad de los MPs se emplearon muestras de control con partículas de microplásticos en un frasco de vidrio y de esta manera evaluar el impacto del procedimiento para cada uno de los protocolos empleados.

Para la degradación de los organismos y extracción de MPs, se seleccionaron cuatro protocolos: dos de estos protocolos fueron desarrollados por Aytan *et al.* (2022), mientras que los otros dos provienen de las investigaciones de Cau *et al.* (2019) y Md Amin *et al.* (2020) (Tabla 1). Los protocolos se eligieron a partir de los resultados encontrados en las bases de datos donde se observa una amplia diversidad de técnicas de digestión para los análisis de MPs, con solo unos pocos estudios que evalúan la eficiencia de la digestión de la MO y organismos del zooplancton de los taxones que constituyeron el objeto de este estudio; adicionalmente se consideró la facilidad y disponibilidad de los reactivos (Li *et al.* 2016; Sun *et al.*, 2017; Kosore *et al.* 2018; Botterell *et al.* 2019; Calderón *et al.*, 2019; Cau *et al.*, 2019; Garcés-Ordóñez *et al.*, 2020; Md Amin *et al.*, 2020; Zheng *et al.*, 2020; Aytan *et al.*, 2022; Jiménez-Cárdenas *et al.*, 2022). Los protocolos seleccionados fueron aplicados a muestras compuestas por 50 organismos de los cuatro grupos de zooplancton encontrados más abundantes los cuales corresponden a las familias Paracalanidae, Corycaeidae y Oncaeidae, y al filo Chaetognatha.

Four protocols were selected for organism degradation and MPs extraction: two of these protocols were developed by Aytan *et al.* (2022), while the other two come from the research of Cau *et al.* (2019) and Md Amin *et al.* (2020) (Table 1). The protocols were chosen based on the results found in the databases, which show a wide diversity of digestion techniques for PM analysis, with only a few digestion techniques for MPs analysis, with only a few studies evaluating the efficiency of OM digestion and zooplankton organisms of Taxons that constituted the object of our study; additionally the ease and availability of reagents was considered (Li *et al.* 2016; Sun *et al.*, 2017; Kosore *et al.* 2018; Botterell *et al.* 2019; Calderón *et al.*, 2019; Cau *et al.*, 2019; Garcés-Ordóñez *et al.*, 2020; Md Amin *et al.*, 2020; Zheng *et al.*, 2020; Aytan *et al.*, 2022; Jiménez-Cárdenas *et al.*, 2022). The selected protocols were applied to samples composed of 50 organisms from the four most abundant zooplankton groups, corresponding to the Paracalanidae, Corycaeidae, Oncaeidae, and Chaetognatha families.

**Tabla 1.** Características y generalidades de los protocolos seleccionados con la finalidad de conseguir la degradación de organismos zooplanctónicos.

**Table 1.** Characteristics and generalities of the selected protocols aimed at achieving the degradation of zooplanktonic organisms.

Protocolo / Protocol	Sustancia / Substance	Muestra / Sample	Cantidad de elementos degradados / Number of degraded elements
Aytan <i>et al.</i> (2022)	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30 % (reacción de Fenton) / (Fenton reaction)	Materia orgánica de la muestra de zooplancton / Organic matter from zooplankton sample	No aplica / Not applicable
Cau <i>et al.</i> (2019)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 15 %	<i>Nephrops norvegicus</i> and <i>Aristeus antennatus</i>	89 y 63 estómagos de las especies, respectivamente / 89 and 63 stomachs of the species, respectively
Aytan <i>et al.</i> (2022)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30 %	Pellets fecales de Calanoida / Fecal pellets of Calanoida	20 – 40 individuos con pellets disponibles / 20 – 40 individuals with available pellets
Md Amin <i>et al.</i> (2020)	HNO <sub>3</sub> 65 %	Larva de pez / Fish larva, Crustacea, Polichaeta, Chaetognatha	20 individuos de cada grupo / 20 individuals from each group

El protocolo de Aytan *et al.* (2022) emplea la reacción Fenton, que consiste en la combinación de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2$  al 30 %, para la degradación de MO en muestras de agua. Esta misma metodología se utiliza por otros autores para la eliminación de la MO presente en los organismos más grandes (Tagg *et al.*, 2017; Al-Azzawi *et al.*, 2020; Lucher *et al.*, 2020; Schrank *et al.*, 2022). Los resultados obtenidos en el laboratorio con esta técnica no lograron una degradación completa de los organismos. Se implementaron modificaciones a este protocolo duplicando el volumen  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30 % en la fórmula de Fenton y se prolongó la fase de calentamiento a dos horas adicionales. Las condiciones de temperatura se mantuvieron constantes debido a que la reacción de Fenton es exotérmica, y un aumento de la temperatura podría implicar riesgos en el laboratorio y tratando de mantener la integridad de los MPs que según los autores no debe exceder los 60 °C cuando se utilizan reacciones oxidativas y alcalinas (Lusher *et al.*, 2020; Alonso *et al.*, 2021).

El protocolo de Cau *et al.* (2020) usa peróxido de hidrógeno al 15 % para la degradación de los crustáceos *Nephrops norvegicus* y *Aristeus antennatus*; los crustáceos son un grupo taxonómico dominante en el plancton y que presentan una mayor dificultad para degradar la MO debido a la presencia de quitina en los exoesqueletos (Souza *et al.*, 2011). Los volúmenes de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 2 mL se modificaron a fin de adaptarlos a la MO presente en el zooplancton. La temperatura y el tiempo establecido por los autores en el protocolo, no consiguió degradar los organismos especialmente copépodos y quetognatos (ver Tabla 2, Figura 2). Para lograr degradar a los organismos zooplanctónicos especialmente los crustáceos como copépodos y quetognatos se modificó el tiempo de calentamiento hasta 12 h con la misma temperatura (50 °C), como se registra en la Tabla 2, sin obtener resultados 100 % efectivos en la degradación y con consecuencias posiblemente en la integridad de los MPs (Alonso *et al.*, 2021).

En el protocolo de Aytan *et al.* (2022) también utilizaron  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30 % para la degradación de MO del zooplancton, a una temperatura controlada de 45 °C en un periodo de 4 h a 6 h. Este protocolo tampoco logró la degradación total de los organismos de zooplancton. En este sentido, con la finalidad de digerir los organismos se ajustó el volumen de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 2 mL y se incrementó la temperatura hasta llegar a 75 °C por 12 h, a pesar de que Alonso *et al.* (2021) sugiere que altas temperaturas pueden dañar la integridad de los MPs, en nuestros resultados no se logró ni siquiera degradar la MO (Tabla 2, Figura 2).

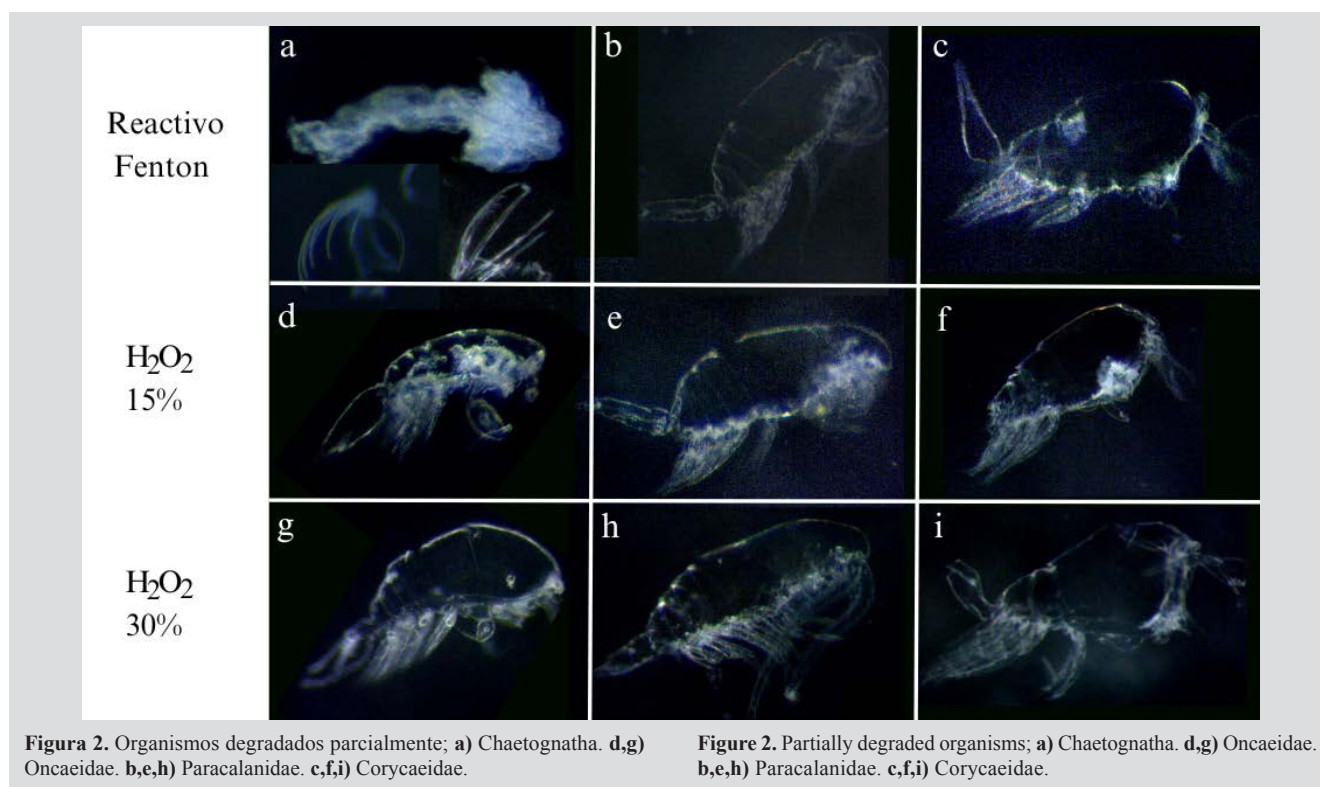
The protocol by Aytan *et al.* (2022) employs the Fenton reaction, combining  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2$  at 30 %, for OM degradation in water samples. This methodology is used by other authors for removing OM from larger organisms (Tagg *et al.*, 2017; Al-Azzawi *et al.*, 2020; Lucher *et al.*, 2020; Schrank *et al.*, 2022). However, the laboratory results with this technique did not achieve complete degradation of organisms. Modifications were made to this protocol by doubling the  $\text{H}_2\text{O}_2$  at 30 % volume in the Fenton formula and extending the heating phase by two additional hours. Temperature conditions were kept constant because the Fenton reaction is exothermic, and an increase in temperature could pose risks in the laboratory while trying to maintain MPs integrity, as authors suggest not exceeding 60 °C when using oxidative and alkaline reactions (Lusher *et al.*, 2020; Alonso *et al.*, 2021).

The protocol by Cau *et al.* (2020) uses 15 % hydrogen peroxide for the degradation of *Nephrops norvegicus* and *Aristeus antennatus* crustaceans; crustaceans, being a dominant taxonomic group in plankton, which present greater difficulty in degrading OM due to the presence of chitin in exoskeletons (Souza *et al.*, 2011).  $\text{H}_2\text{O}_2$  volumes at 2 mL were modified to adapt to zooplankton OM. The temperature and time set by the authors in the protocol did not degrade the organisms, especially copepods and chaetognaths. To degrade zooplankton organisms, especially crustaceans like copepods and chaetognaths, the heating time was extended to 12 h at the same temperature (50 °C), as reported in Table 2, without obtaining 100 % effective degradation and possibly affecting MPs integrity (Alonso *et al.*, 2021).

In Aytan *et al.*'s (2022) protocol,  $\text{H}_2\text{O}_2$  at 30 % was also used for zooplankton OM degradation, with a controlled temperature of 45 °C over a period of 4 h to 6 h. This protocol also failed to achieve total degradation of zooplankton organisms. To digest organisms, the  $\text{H}_2\text{O}_2$  volume was adjusted to 2 mL, and the temperature was increased to 75 °C for 12 h. Despite suggestions that high temperatures can damage MPs integrity (Alfonso *et al.*, 2021), our results did not even achieve OM degradation (Table 2, Figure 2).

**Tabla 2.** Protocolos seleccionados y adaptados para obtener la degradación de zooplancton marino.

Protocolo / Protocol	Sustancia / Substance	Original			Modificación / Modification		
		Vol	T	Tiempo / Time	Vol	T	Tiempo / Time
Aytan <i>et al.</i> (2022)	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30 % (Reactivo de Fenton) / (Fenton Reagent)	20 mL (FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O) + 20 mL (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30 %)	45 °C	Hasta que se degrade la materia orgánica o hasta 72 h / Until organic matter degrades or up to 72h	10 mL (FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O) + 20 mL (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30 %)	45 °C	74 h
Cau <i>et al.</i> (2019)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 15 %	Hasta cubrir la muestra / Enough to cover the sample	50 °C	Durante la noche / Overnight	2 mL	50 °C	12h
Aytan <i>et al.</i> (2022)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30 %	Hasta cubrir la muestra / Enough to cover the sample	45 °C	4 h – 6 h	2 mL	75 °C	7 h – 12 h
Md Amin <i>et al.</i> (2020)	HNO <sub>3</sub> 65 %	17 µL – 20 µL	80 °C	30 min	2 mL	80 °C	1 h

**Table 2.** Selected and adapted protocols for achieving marine zooplankton degradation.

**Figura 2.** Organismos degradados parcialmente; a) Chaetognatha. d,g) Oncaeidae. b,e,h) Paracalanidae. c,f,i) Corycaeidae.

**Figure 2.** Partially degraded organisms; a) Chaetognatha. d,g) Oncaeidae. b,e,h) Paracalanidae. c,f,i) Corycaeidae.

El protocolo de Md Amin *et al.* (2020) usaron entre 17 µl – 20 µl de ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) al 65 % por un tiempo de calentamiento de 30 min para degradar los organismos zooplanctónicos; el volumen propuesto del ácido no fue suficiente para cubrir la muestra de zooplancton por lo que se aumentó a 2 mL. Adicionalmente, el tiempo de calentamiento establecido por el autor no consiguió degradar los ganchos de los Chaetognathos, razón por la que el tiempo se incrementó

In Md Amin *et al.*'s (2020) protocol, between 17 µl – 20 µl of 65 % nitric acid (HNO<sub>3</sub>) was used for 30 min to degrade zooplankton organisms. The proposed acid volume was not sufficient to cover the zooplankton sample, so it was increased to 2 mL. Additionally, the author's specified heating time did not fully degrade the chaetognath hooks, so the time was increased to 1 h. To avoid physical damage to MPs, the temperature was not

a 1 h; para evitar daños físicos en los MPs, la temperatura no fue modificada, la integridad de los plásticos, a pesar de las recomendaciones de Alfonso *et al.* (2021), se mantuvo al compararlo con la muestra control. Después de realizados los procedimientos, se filtraron las soluciones con una membrana de éster de nitrato de celulosa (0.45  $\mu\text{m}$  de poro) con área de 5  $\text{cm}^2$ , y lo retenido en el filtro se observó en el estereomicroscopio.

Los protocolos basados en la oxidación y acidificación (Cau *et al.* 2019; Md Amin *et al.*, 2020; Aytan *et al.*, 2022), solo lograron degradaciones parciales en algunos grupos de zooplancton en determinadas condiciones; con respecto a la oxidación, el peróxido de hidrógeno es eficiente en la remoción de MO según lo registrado en sedimentos, muestras de agua (Aytan *et al.*, 2022), en tejidos blandos de *Mytilus edulis* (Li *et al.*, 2016; Kolandhasamy *et al.*, 2018), y en la digestión parcial del tracto intestinal de peces y langostas (Avio *et al.*, 2015; Cau *et al.*, 2019). No obstante, los organismos utilizados en nuestra investigación al poseer estructuras quitinosas no se degradan completamente (Figura 2); similar a lo registrado por Cole *et al.* (2014), donde se observó que el peróxido de hidrógeno removió parcialmente las muestras de zooplancton por un periodo de hasta siete días.

La reacción de Fenton es un proceso que combina oxidación y bases cuando se combina el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , 30 %) con sulfato de hierro (II) ( $\text{FeSO}_4$ ); esta disolución ha demostrado ser eficiente en la descomposición de MO en muestras de lodo provenientes de aguas residuales (Al-Azzawi *et al.*, 2020) y en la degradación de MO disuelta en muestras de agua marinas (Aytan *et al.*, 2022). En varias investigaciones, se ha considerado la reacción Fenton como una reacción clave para estandarizar un método en la digestión de MO (Tagg *et al.*, 2017; Al-Azzawi *et al.*, 2020; Schrank *et al.*, 2022) por ser efectiva en un tiempo de menor exposición y por no tener efectos adversos en la composición física y química de los plásticos (Al-Azzawi *et al.*, 2020; Schrank *et al.*, 2022); sin embargo, en nuestra investigación, las estructuras de los organismos zooplanctónicos utilizados se degradaron parcialmente.

La metodología de Fenton presenta una reacción exotérmica, es decir, que alcanza temperaturas hasta los 90 °C (Al-Azzawi *et al.*, 2020) por lo que se requieren frascos cónicos a partir de 100mL para evitar el derrame del contenido, lo que dificulta la extracción de MPs inmersos en muestras de tamaño reducido. Möller *et al.* (2020) registraron que la reacción de Fenton no es suficiente para obtener la remoción completa de MO al igual que lo observado en este estudio, lo

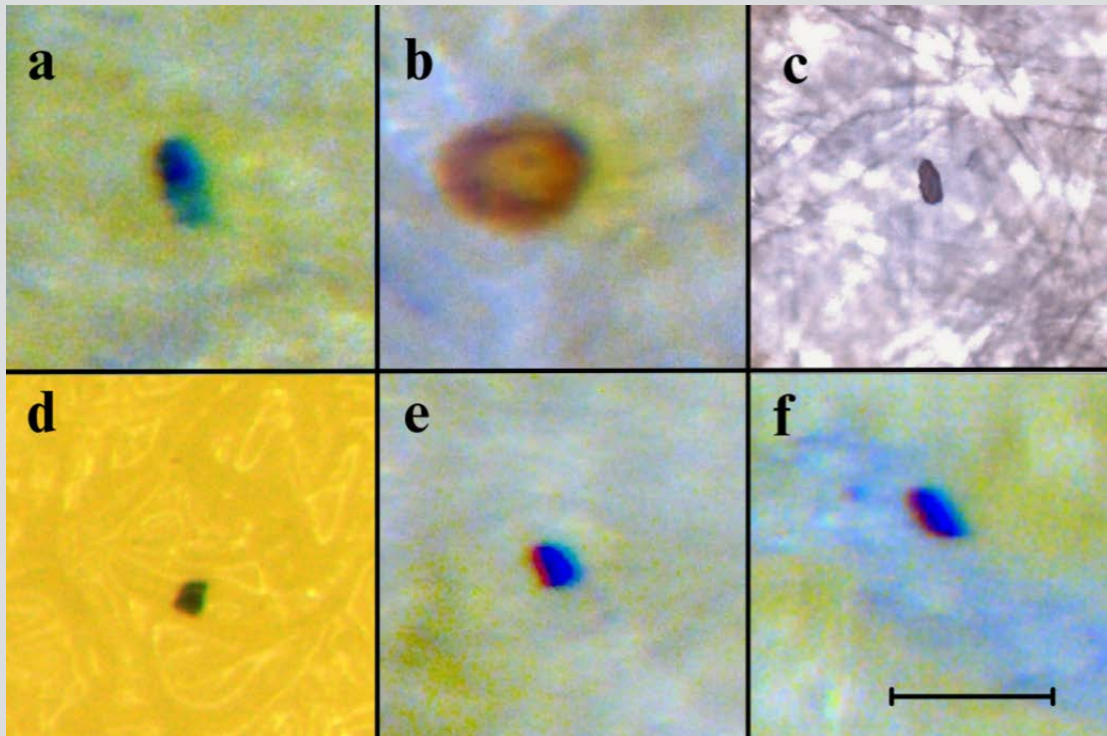
modificado, and MPs integrity was maintained compared to the control sample Alfonso *et al.* (2021). After the procedures, the solutions were filtered with a cellulose nitrate ester membrane (0.45  $\mu\text{m}$  pore) with an area of 5  $\text{cm}^2$ , and the retained material on the filter was observed under the stereomicroscope.

Protocols based on oxidation and acidification (Cau *et al.*, 2019; Md Amin *et al.*, 2020; Aytan *et al.*, 2022) only achieved partial degradation in some zooplankton groups under certain conditions. Regarding oxidation, hydrogen peroxide is efficient in removing OM, as reported in sediments, water samples (Aytan *et al.*, 2022), soft tissues of *Mytilus edulis* (Li *et al.*, 2016; Kolandhasamy *et al.*, 2018), and the partial digestion of fish and lobster intestinal tracts (Avio *et al.*, 2015; Cau *et al.*, 2019). However, the organisms used in our research, having chitinous structures, were not fully degraded (Figure 2), similar to findings by Cole *et al.* (2014), where hydrogen peroxide partially removed zooplankton samples for up to seven days.

The Fenton reaction is a process that combines oxidation and bases when combining hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , 30 %) with iron sulfate (II) ( $\text{FeSO}_4$ ). This solution has proven efficient in decomposing OM in sludge samples from wastewater (Al-Azzawi *et al.*, 2020) and degrading dissolved OM in marine water samples (Aytan *et al.*, 2022). In several studies, the Fenton reaction has been considered a key method for standardizing the digestion of organic matter (OM) (Tagg *et al.*, 2017; Al-Azzawi *et al.*, 2020; Schrank *et al.*, 2022) due to its effectiveness in a shorter exposure time and its lack of adverse effects on the physical and chemical composition of plastics (Al-Azzawi *et al.*, 2020; Schrank *et al.*, 2022). However, in our research, the structures of the zooplankton organisms used were only partially degraded.

The Fenton methodology involves an exothermic reaction, reaching temperatures up to 90 °C (Al-Azzawi *et al.*, 2020), requiring conical flasks of at least 100 mL to prevent content spillage, making it challenging to extract microplastics (MPs) from small-sized samples. Möller *et al.* (2020) reported that the Fenton reaction alone is insufficient for complete OM removal, as observed in our study. A complementary step, such as the use of digestive enzymes, is necessary for total digestion, increasing sample processing costs. No alterations in the integrity of MPs were observed, similar to the findings of Hurley *et al.* (2018), who reported that MP forms maintain their integrity between 86 % and 90 %, depending on the shape and polymer composition.





**Figura 3.** Ejemplos de MPs ingeridos por zooplancton marino; **a,b)** Chaetognatha. **c)** Corycaeidae. **d)** Oncaeidae. **e,f)** Paracalanidae. (Barra de escala = 200  $\mu\text{m}$ ).

**Figure 3.** Examples of MPs ingested by marine zooplankton; **a,b)** Chaetognatha. **c)** Corycaeidae. **d)** Oncaeidae. **e,f)** Paracalanidae. (Scale bar = 200  $\mu\text{m}$ ).

que hace necesario realizar un paso complementario como el uso de enzimas digestivas para conseguir la digestión total, que aumentan los costos de procesamiento de las muestras. No se evidenció alteraciones en la integridad de los MPs similar a lo evaluado por Hurley *et al.* (2018) quienes encontraron que las formas de MPs mantienen su integridad entre un 86 al 90 % dependiendo de la forma y composición del polímero.

La acidificación ha demostrado ser útil en la remoción de material orgánico de muestras marinas, facilitando el aislamiento de MPs (Avio *et al.*, 2015); asimismo, el ácido nítrico ha sido utilizado en la digestión de muestras de zooplancton (Sun *et al.*, 2017; Desforges *et al.*, 2019; Zavala-Alarcón *et al.*, 2023) y en tractos digestivos de camarones (Gurjar *et al.*, 2021). En este trabajo de investigación se modificó el tiempo de exposición de ácido nítrico al 65 % de 30 min a 1 h; en este aspecto, se obtuvieron resultados positivos de una degradación completa de los organismos zooplanctónicos y una integridad en las características físicas de los MPs.

Algunos autores sugieren que el ácido nítrico cuando se somete a presiones y temperaturas altas puede oxidar, destruir y dañar los polímeros de los MPs que son intolerantes a bajos pH como el poliestireno, polietileno y poliamidas (Cole *et al.*, 2014;

Acidification has proven useful for removing organic material from marine samples, facilitating MPs isolation (Avio *et al.*, 2015). Nitric acid has been used in the digestion of zooplankton samples (Sun *et al.*, 2017; Desforges *et al.*, 2019; Zavala-Alarcón *et al.*, 2023) and shrimp digestive tracts (Gurjar *et al.*, 2021). In this research the exposure time of 65 % nitric acid was modified from 30 minutes to 1 hour, resulting in positive outcomes with complete degradation of zooplankton organisms and preserved physical characteristics of MPs.

Some authors suggest that nitric acid, under high pressures and temperatures, can oxidize, destroy, and damage polymer MPs intolerant to low pH, such as polystyrene, polyethylene, and polyamides (Cole *et al.*, 2014; Schrank *et al.*, 2022). Desforges *et al.* (2015) used 100 % nitric acid for 30 minutes, finding MPs in samples of the copepod *Neocalanus cristatus* and krill *Euphausia pacifica*, reporting that acid impact on MPs depends on exposure time and concentration. Md Amin *et al.* (2020) and Zavala-Alarcón *et al.* (2023) used 65 % and 55 % nitric acid, respectively, modifying Desforges *et al.*'s (2015) methodology, showing no impact on the physical and chemical integrity of MPs.

Schrank *et al.*, 2022); en este sentido, Desforges *et al.* (2015) utilizaron ácido nítrico al 100 % por 30 min y encontraron MPs en muestras del copépodo calanoideo *Neocalanus cristatus* y en muestras de krill de *Euphausia pacifica*, registrando que el impacto del ácido en los MPs depende del tiempo de exposición y la concentración. Asimismo, Md Amin *et al.* (2020) y Zavala-Alarcón *et al.* (2023) usaron ácido nítrico al 65 % y 55 %, respectivamente, modificando la metodología realizada por Desforges *et al.* (2015); en este aspecto, evidenciaron que la integridad física y química de los MPs no fue afectada.

Por otra parte, la presencia de polímeros como el PET, según Schrank *et al.* (2022), se degradan utilizando ácido nítrico al 69 % durante 2 h, mientras que Zavala-Alarcón *et al.* (2023) encontraron que este polímero se degrada utilizando ácido nítrico al 55 % por 30 min, lo que evidencia que las modificaciones en el tiempo de exposición y concentración del ácido nítrico continúan siendo favorables en la conservación de la integridad de los MPs y en la digestión completa de los organismos zooplanctónicos. En cada uno de los protocolos se calculó la tasa de ingestión por grupo taxonómico, sin embargo, solo el protocolo modificado de Md Amin *et al.* (2020) se obtuvieron resultados, debido a que los otros protocolos no lograron degradar la MO y por lo tanto no se podían observar la presencia de MPs. La tasa de ingestión de MPs empleando el protocolo modificado de Md Amin *et al.* (2020) encontró los siguientes valores para cada uno de los grupos de zooplancton: Paracalanidae 16 MPs/50 (0.31), Corycaeiidae 8 MPs/50 (0.16), Oncaeiidae 8 MPs/50 (0.16) y Chaetognatha 12 MPs/50 (0.24). Los fragmentos fueron la única forma de MPs detectada para los copepodos (Paracalanidae, Corycaeiidae, Paracalanidae, Oncaeiidae); la ingesta de estas formas se asocia con su disponibilidad en el ambiente, y particularmente a que este grupo es omnívoro lo que los hace más susceptibles de ingerir MPs (Zavala-Alarcón *et al.* 2023), lo anterior también se sustenta con la investigación de Garcés-Ordoñez *et al.* (2022) quienes encontraron mayor ocurrencia de fragmentos sobre otras formas de MPs en las aguas superficiales de las áreas costeras del Caribe colombiano. Los filamentos que son la segunda forma encontrada fueron ingeridos por el grupo de Chaetognatha, como lo encontrado por otros autores (Kosore *et al.*, 2018; Md Amin *et al.*, 2020).

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los diferentes profesionales y técnicos del Parque Nacional Natural Corales del Rosario y San Bernardo, que colaboraron en la adquisición de las muestras. Agradecemos a los revisores en las sugerencias para

Schrank *et al.* (2022) reported the degradation of PET polymers using 69 % nitric acid for two hours, while Zavala-Alarcón *et al.* (2023) found that this polymer degrades using 55 % nitric acid for 30 minutes, demonstrating that modifications in exposure time and concentration of nitric acid remain favorable for preserving MP integrity and achieving complete digestion of zooplankton organisms. In each protocol, the ingestion rate per taxonomic group was calculated. However, only the modified protocol of Md Amin *et al.* (2020) yielded results (Figure 3), as other protocols failed to degrade OM, making it impossible to observe the presence of MPs. The MPs ingestion rate using the modified protocol found the following values for each zooplankton group: Paracalanidae 16 MPs/50 (0.31), Corycaeiidae 8 MPs/50 (0.16), Oncaeiidae 8 MPs/50 (0.16), and Chaetognatha 12 MPs/50 (0.24). Fragments were the only MPs form detected for copepods (Paracalanidae, Corycaeiidae, Oncaeiidae); their ingestion is associated with environmental availability, and their omnivorous nature makes them more susceptible to MPs ingestion (Zavala-Alarcón *et al.*, 2023), supported by Garcés-Ordoñez *et al.*'s (2022) findings of higher fragment occurrence in surface waters of coastal areas in the Colombian Caribbean. Filaments, the second form found, were ingested by the Chaetognatha group, consistent with other authors' findings (Kosore *et al.*, 2018; Md Amin *et al.*, 2020).

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors express gratitude to the various professionals and technicians of the Corales del Rosario and San Bernardo National Natural Park who collaborated in sample acquisition. We appreciate the reviewers for their suggestions in publishing this manuscript. This work was funded by the Vice-Rectorate of Research and Extension of Universidad Industrial de Santander, project 2839, in collaboration with National Natural Parks and Universidad Nacional de Colombia. The results are part of the thesis of one of the authors (L.S.C.C) for obtaining a degree in Biology from Universidad Industrial de Santander.



la publicación de este manuscrito. Este trabajo fue financiado por la Vicerrectoría de Investigación y Extensión de la Universidad Industrial de Santander proyecto 2839, Parques Nacionales Naturales y la Universidad Nacional de Colombia. Los resultados hacen parte de la tesis de una de las autoras (L.S.C.C) para obtener el título de bióloga en la Universidad Industrial de Santander.

## BIBLIOGRAFÍA / LITERATURE CITED

- Acosta-Coley, I., M. Durán-Izquierdo, E. Rodríguez-Cavallo, J. Mercado-Camargo, D. Méndez-Cuadro and J. Olivero-Verbel. 2019. Quantification of microplastics along the Caribbean coastline of Colombia: Pollution profile and biological effects on *Caenorhabditis elegans*. *Mar. Poll. Bull.*, 146: 574–583. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.06.084>
- Al-Azzawi, M.S., S. Kefer, J. Weißer, J. Reichel, C. Schwaller, K. Glas, ... and J.E. Drewes. 2020. Validation of sample preparation methods for microplastic analysis in wastewater matrices reproducibility and standardization. *Water*, 12(9), 2445.
- Alfonso, M.B., K. Takashima, S. Yamaguchi, M. Tanaka and A. Isobe. 2021. Microplastics on plankton samples: Multiple digestion techniques assessment based on weight, size, and FTIR spectroscopy analyses. *Mar. Poll. Bull.*, 173: 113027. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.113027>
- Avio, C.G., S. Gorbi and F. Regoli. 2015. Experimental development of a new protocol for extraction and characterization of microplastics in fish tissues: First observations in commercial species from Adriatic Sea. *Mar. Environ. Res.*, 111: 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.06.014>
- Aytan, U., F.B. Esensoy and Y. Senturk. 2022. Microplastic ingestion and egestion by copepods in the Black Sea. *Sci. Total Environ.*, 806. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150921>
- Botterell, Z.L.R., N. Beaumont, T. Dorrington, M. Steinke, R.C. Thompson and P.K. Lindeque. 2019. Bioavailability and effects of microplastics on marine zooplankton: A review. *Environ. Poll.*, 245: 98–110. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.065>
- Calderón, E.A., P. Hansen, A. Rodríguez, M.C.M. Blettler, K. Syberg and F.R. Khan. 2019. Microplastics in the digestive tracts of four fish species from the Ciénaga Grande de Santa Marta Estuary in Colombia. *Wat. Air Soil Poll.*, 230(11). <https://doi.org/10.1007/s11270-019-4313-8>
- Cau, A., C.G. Avio, C. Dessi, M.C. Follesa, D. Moccia, F. Regoli and A. Pusceddu. 2019. Microplastics in the crustaceans *Nephrops norvegicus* and *Aristeus antennatus*: Flagship species for deep-sea environments? *Environ. Poll.*, 255: 113107. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113107>
- Chenillat, F., T. Huck, C. Maes, N. Grima and B. Blanke. 2021. Fate of floating plastic debris released along the coasts in a global ocean model. *Mar. Poll. Bull.*, 165:112116. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112116>
- Cole, M., H. Webb, P.K. Lindeque, E.S. Fileman, C. Halsband and T.S. Galloway. 2014. Isolation of microplastics in biota-rich seawater samples and marine organisms. *Sci. Rep.*, 4. <https://doi.org/10.1038/srep04528>
- Cole, M., P. Lindeque, E. Fileman, C. Halsband and T.S. Galloway. 2015. The impact of polystyrene microplastics on feeding, function and fecundity in the marine copepod *Calanus helgolandicus*. *Environ. Sci. Technol.*, 49(2): 1130–1137. <https://doi.org/10.1021/es504525u>
- De Sá, L.C., M. Oliveira, F. Ribeiro, T.L. Rocha and M.N. Futter. 2018. Studies of the effects of microplastics on aquatic organisms: What do we know and where should we focus our efforts in the future? *Sci. Total Environ.*, 645: 1029–1039.
- Desforges, J.P.W., M. Galbraith and P.S. Ross. 2015. Ingestion of microplastics by zooplankton in the Northeast Pacific Ocean. *Arch. Environ. Cont. Toxicol.*, 69(3). <https://doi.org/10.1007/s00244-015-0172-5>
- Frias, J.P.G.L. and R. Nash. 2019. Microplastics: Finding a consensus on the definition. *Mar. Poll. Bull.*, 138: 145–147. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.11.022>
- Garcés-Ordóñez, O., J.F. Saldarriaga-Vélez, L.F. Espinosa-Díaz, A.D. Patiño, J. Cusba, M. Canals, ... and M. Thiel. 2022. Microplastic pollution in water, sediments and commercial fish species from Ciénaga Grande de Santa Marta lagoon complex, Colombian Caribbean. *Sci. Total Environ.*, 829: 154643. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154643>
- Gurjar, U.R., K.M. Xavier, S.P. Shukla, G., Deshmukhe, A.K. Jaiswar and B.B. Nayak. 2021. Incidence of microplastics in gastrointestinal tract of golden anchovy (*Coilia dussumieri*) from northeast coast of Arabian Sea: The ecological perspective. *Mar. Poll. Bull.*, 169: 112518.
- He, S., M. Jia, Y. Xiang, B. Song, W. Xiong, J. Cao, H., Peng, Y. Yang, W. Wang, Z. Yang and G. Zeng. 2022. Biofilm on microplastics in aqueous environment: Physicochemical properties and environmental implications. *J. Hazard. Mat.*, 424. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127286>
- Hurley, R.R., A.L. Lusher, M. Olsen and L. Nizzetto. 2018. Validation of a method for extracting microplastics from complex, organic-rich, environmental matrices. *Environ. Sci. Technol.*, 52(13): 7409–7417.
- Jeong, C.B., H.M. Kang, M.C. Lee, D.H. Kim, J. Han, D.S. Hwang, S. Souissi, S.J. Lee, K.H. Shin, H.G. Park and J.S. Lee. 2017. Adverse effects of microplastics and oxidative stress-induced MAPK/Nrf2 pathway-mediated defense mechanisms in the marine copepod *Paracyclopsina nana*. *Sci. Rep.*, 7. <https://doi.org/10.1038/srep41323>

- Jimenez-Cárdenas, V., A. Luna-Acosta and L.D. Gómez-Méndez. 2022. Differential presence of microplastics and mesoplastics in coral reef and mangrove fishes in Isla Grande, Colombia. *Microplastics*, 1(3), 477–493. <https://doi.org/10.3390/microplastics1030034>
- Kolandhasamy, P., L. Su, J. Li, X. Qu, K. Jabeen and H. Shi. 2018. Adherence of microplastics to soft tissue of mussels: A novel way to uptake microplastics beyond ingestion. *Sci. Total Environ.*, 610: 635–640.
- Kosore, C., L. Ojwang, J. Maghanga, J. Kamau, A. Kimeli, J. Omukoto, N. Ngisiang'e, J. Mwaluma, H. Ong'ada, C. Magori and E. Ndirui. 2018). Occurrence and ingestion of microplastics by zooplankton in Kenya's marine environment: First documented evidence. *Afr. J. Mar. Sci.*, 40: 225–234. <https://doi.org/10.2989/1814232X.2018.1492969>
- Lee, K.W., W.J. Shim, O.Y. Kwon and J.H. Kang. 2013. Size-dependent effects of micro polystyrene particles in the marine copepod *Tigriopus japonicus*. *Environ. Sci. Technol.*, 47(19): 11278–11283. <https://doi.org/10.1021/es401932b>
- Li, J., X. Qu, L. Su, W. Zhang, D. Yang, P. Kolandhasamy, D. Li and H. Shi. 2016. Microplastics in mussels along the coastal waters of China. *Environ. Poll.*, 214: 177–184. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.04.012>
- Liu, Y., R. Li, J. Yu, F. Ni, Y. Sheng, A. Scircle, ... and Y. Zhou. 2021. Separation and identification of microplastics in marine organisms by TGA-FTIR-GC/MS: A case study of mussels from coastal China. *Environ. Poll.*, 272: 115946.
- Lo, H.K.A. and K.Y.K. Chan. 2018. Negative effects of microplastic exposure on growth and development of *Crepidula onyx*. *Environ. Poll.*, 233: 588–595. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.10.095>
- Lusher, A.L., K. Munno, L. Hermabessiere and S. Carr. 2020. Isolation and extraction of microplastics from environmental samples: An evaluation of practical approaches and recommendations for further harmonization. *App. Spectr.*, 74:1049–1065. <https://doi.org/10.1177/0003702820938993>
- Md Amin, R., E.S. Souhaimi, S.T. Anuar and Z. Bachok. 2020. Microplastic ingestion by zooplankton in Terengganu coastal waters, Southern South China Sea. *Mar. Poll. Bull.*, 150. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110616>
- Möller, J.N., M.G. Löder and C. Laforsch. 2020. Finding microplastics in soils: A review of analytical methods. *Environ. Sci. Technol.*, 54(4): 2078–2090.
- Schrank, I., J.N. Möller, H.K. Imhof, O. Hauenstein, F. Zielke, S. Agarwal, ... and C. Laforch. 2022. Microplastic sample purification methods—Assessing detrimental effects of purification procedures on specific plastic types. *Sci. Total Environ.*, 833: 154824.
- Shen, M., S. Ye, G. Zeng, Y. Zhang, L. Xing, W. Tang, X. Wen and S. Liu. 2020. Can microplastics pose a threat to ocean carbon sequestration? *Mar. Poll. Bull.*, 1(150): 110712. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110712>
- Souza, C.P., B.C. Almeida, R.R. Colwell and I.N.G. Rivera. 2011. The importance of chitin in the marine environment. *Mar. Biotechnol.*, 13(5): 823–830. <https://doi.org/10.1007/s10126-011-9388-1>
- Steinberg, D.K. and M.R. Landry. 2017. Zooplankton and the ocean carbon cycle. *Ann. Rev. Mar. Sci.*, 9(1): 413–444. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010814-015924>
- Sun, X., Q. Li, M. Zhu, J. Liang, S. Zheng and Y. Zhao. 2017. Ingestion of microplastics by natural zooplankton groups in the northern South China Sea. *Mar. Poll. Bull.*, 115(1-2): 217–224. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.12.004>
- Tafurt-Villarraga, D., A. Molina and G. Duque. 2021. Feeding habits of three species of sole fish (Pleuronectiformes: Achiridae) in Buenaventura Bay, Colombian Pacific. *Rev. Biol. Trop.*, 69(3): 1055–1068.
- Tagg, A.S., J.P. Harrison, Y. Ju-Nam, M. Sapp, E.L. Bradley, C.J. Sinclair and J.J. Ojeda. 2017. Fenton's reagent for the rapid and efficient isolation of microplastics from wastewater. *Chem. Comm.*, 53(2): 372–375.
- Troost, T.A., T. Desclaux, H.A. Leslie, M.D. Van Der Meulen and A.D. Vethaak. 2018. Do microplastics affect marine ecosystem productivity? *Mar. Poll. Bull.*, 135: 17–29. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.05.067>
- Yin, J., J.Y. Li, N.J. Craig and L. Su. 2022. Microplastic pollution in wild populations of decapod crustaceans: A review. *Chemosphere*, 291(P2), 132985. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132985>
- Yu, S.P.Y., M.C. Cole and B.K. Chan. 2020. Effects of microplastic on zooplankton survival and sublethal responses. *Oceanogr. Mar. Biol.*
- Zavala-Alarcón, F.L., J.P. Huchin-Mian, M.D.P. González-Muñoz and E.R. Kozak. 2023. In situ microplastic ingestion by neritic zooplankton of the central Mexican Pacific. *Environ. Poll.*, 319: 120994.
- Zheng, S., Y. Zhao, W. Liangwei, J. Liang, T. Liu, M. Zhu, Q. Li and X. Sun. 2020. Characteristics of microplastics ingested by zooplankton from the Bohai Sea, China. *Sci. Total Environ.*, 713. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136357>
- Zitouni, N., N. Bousserhine, O. Missawi, I. Boughattas, N. Chèvre, R. Santos, S. Belbekhouche, V. Alphonse, F. Tisserand, L. Balmassiere, S.P. Dos Santos, M. Mokni, H. Guerbej and M. Banni. 2021. Uptake, tissue distribution, and toxicological effects of environmental microplastics in early juvenile fish *Dicentrarchus labrax*. *J. Hazard. Mat.*, 403. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124055>

RECIBIDO / RECEIVED: 04/04/2023

ACEPTADO / ACCEPTED: 21/11/2023