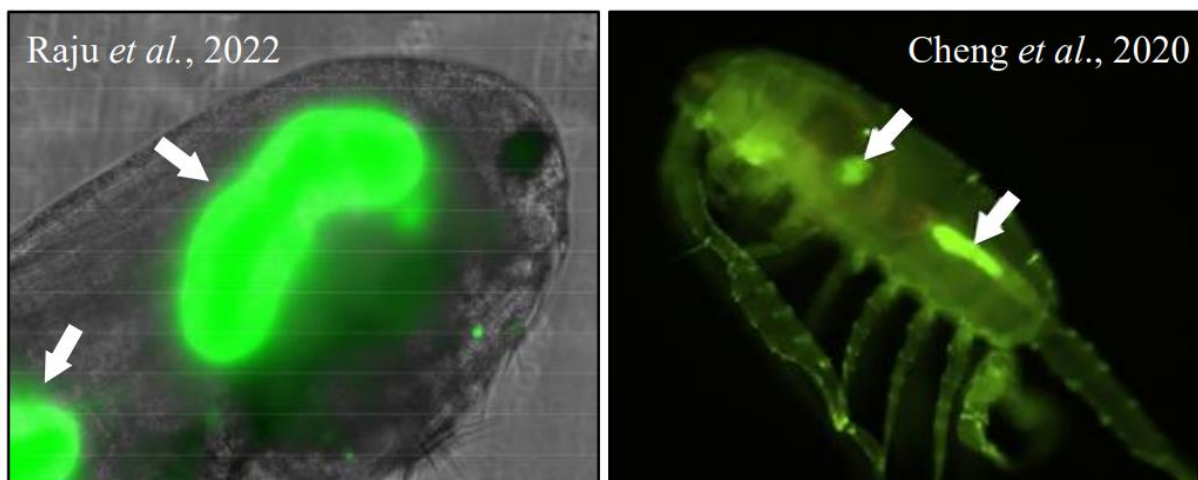


Efectos intergeneracionales de la exposición crónica a microplásticos de baja densidad en el zooplancton: el caso del copépodo *Paracalanus parvus* en el Golfo de Nicoya, Costa Rica.

Bellier Benjamin



Introducción del Anteproyecto de Tesis presentado en la Universidad de Costa Rica en la carrera de GIACT como requisito para la obtención del título de la Maestría

Costa Rica

Septiembre 2022



Contenido

Lista de abreviaturas

Lista de las figuras

I. Introducción	1
II. Materiales y métodos.....	3
Recolección y cultivo de copépodos	3
Tipos y concentraciones de microplásticos analizados	3
Protocolo experimental	4
Medidas de las variables	5
Análisis de datos.....	7
III. Cronograma	8
IV. Presupuesto	8
V Referencias	9

Lista de abreviaturas

MP = Microplásticos

BBC = Bomba Biológica del Carbono

PE = Polietileno

PP = Polipropileno

PS = Poliestireno

GN = Golfo de Nicoya

AMA = Agua de Mar Artificial

Lista de las figuras

Figura 1. Protocolo experimental del estudio. En azul el poliestireno (PS), en verde el polietileno (PE) y en rojo el polipropileno (PP) a concentraciones fuertes (FE: 0,23mg.L⁻¹), medias (ME: 0,15mg.L⁻¹) y pequeñas (PE: 0,023mg.L⁻¹) para cada generación (Gen.). Cada control (Testigo) y tratamiento (PS, PE, PP) se realizó por triplicado.

Figura 2. Ciclo de vida simplificado de *Paracalanus parvus* con los tiempos utilizados en los diferentes experimentos del estudio: t0 = lanzamiento de los nauplios, t1 = primeras mediciones y t2 = segundas mediciones y lanzamiento de la siguiente generación.

Figura 3. Protocolo experimental simplificado de las medidas de las variables según los tiempos del estudio. Fito. = fitoplancton; repro. = reproductivas; F_x = generacion al año x; F_{x+1} = generacion al año x+1; ☹ = muerto y ☺ = vivo.

Figura 4. Cronograma del proyecto de tesis.

Figura 5. Presupuesto del proyecto de tesis.

I. Introducción

El plástico es uno de los materiales más utilizados en las actividades humanas debido a su facilidad de elaboración, su bajo costo y la disponibilidad de materias primas para su producción (Debeaufort et al., 2022). Esta producción está aumentando, pasando de 230 millones de toneladas en 2009 a 367 millones de toneladas en 2020 (PlasticsEurope, 2010 ; PlasticsEurope, 2021). Así, cada año se produce una enorme cantidad de residuos plásticos que se llegan al medio marino, sobre todo por medio de los ríos (Bai et al., 2021). De hecho, en 2014, la cantidad mundial de residuos plásticos oceánicos flotante se estimó en más de 250.000 toneladas (Eriksen et al., 2014).

Una vez en los océanos, los procesos bióticos, abióticos y biológicos transforman los macroplásticos en microplásticos (MP), de menos de 5 mm (van Sebille et al., 2015). Sin embargo, los MP utilizados como materia prima en la industria del plástico, entre otros, pueden liberarse en el medio marino directamente con este tamaño (Cole et al., 2011 ; Barboza y Gimenez, 2015). Por lo tanto, en el medio marino, los MP podrían causar importantes consecuencias medioambientales. En efecto, pueden ser asimilados por una gran variedad de organismos como los peces (Boerger et al., 2010), las ostras (Sussarellu et al., 2016), los mejillones (Browne et al., 2008) o diferentes grupos de zooplancton (Fonty, 2021) como los copépodos marinos (Cole et al., 2013 ; Desforges et al., 2015 ; Fueser et al., 2020). Esos últimos son los metazoos (animales multicelulares) más numerosos del zooplancton marino (Morales-Ramírez, 2001) y son esenciales en el funcionamiento del ecosistema pelágico (Kasapidis et al., 2018) por su importancia en las redes alimentarias o la bomba biológica de carbono (BBC), por ejemplo.

Los copépodos desempeñan un papel clave en la BBC, facilitando el secuestro de carbono a través de los flujos de sus materiales fecales hacia el bentos (Turner, 2015 ; Cole et al., 2016). Además, este transporte proporciona alimento a la biota que vive en el sedimento (Buesseler et al., 2007 ; Cole et al., 2016). Algunos estudios de laboratorio han demostrado que tras el consumo de MP por parte de los copépodos, estos MP son expulsados en las materiales fecales (Cole et al., 2013 ; Lee et al., 2013 ; Cole et al., 2016). Otros estudios han mostrado que estos MP tienen efectos negativos en la producción (Cole et al., 2016 ; Coppock et al., 2019 ; Wieczorek et al., 2019) y en el tamaño de las materiales fecales (Yu et al., 2020 ; Rodríguez-Torres et al., 2020 ; Svetlichny et al., 2021). Estas últimas tienen menor densidad y fluyen más lentamente (Cole et al., 2016 ; Coppock et al., 2019 ; Wieczorek et al., 2019), lo que puede implicar una reducción de la eficiencia de la BBC.

El efecto negativo de los MP sobre la BBC podría ser amplificado, afectando al reclutamiento, y *in fine*, al tamaño de la población global (Bai et al., 2021). En efecto, se ha demostrado que la ingestión de MP en los copépodos disminuye la actividad de alimentación y, de hecho, reduce la ingesta total de energía (Bai et al., 2021). Varios estudios han demostrado que los MP reducen, en los copépodos, el desarrollo (Jeong et al., 2017 ; Cole et al., 2019), la fertilidad (Jeong et al., 2017 ; Zhang et al., 2019), el éxito de la eclosión de los huevos (Cole et al., 2015) y la supervivencia (Lee et al., 2013 ; Zhang et al., 2019 ; Yu et al., 2020 ; Svetlichny et al., 2021). De facto, los copépodos representan un modelo popular para los estudios ecotoxicológicos, ya que son sensibles a los factores de estrés ambiental (Raju et al., 2022).

En el medio marino, los MP son factores de estrés ambiental a los que los copépodos se enfrentan constantemente a lo largo de sus generaciones. Así, un estudio multigeneracional sobre los MP es muy importante, ya que puede simular el escenario de la vida real y, por lo tanto, tener relevancia e importancia medioambiental (Bai et al., 2021). Sin embargo, según nuestros conocimientos, sólo hay dos estudios multigeneracionales de estrés por MP en copépodos marinos. Lee *et al.* (2013) demostraron que, en las dos generaciones estudiadas, las concentraciones de MP (por encima de las del medio ambiente) en *Trigriopus japonicus* redujeron la fecundidad al empobrecer la nutrición e inhibir la fertilización. Zhang *et al.* (2019) mostraron que a una concentración más baja de MP (representativa del medio ambiente) se observa poco efecto, pero a una más alta (representativa del medio ambiente) se reduce la supervivencia y la capacidad reproductiva en el copépodo *T. japonicus*. Pocos estudios han analizado el efecto de los MP a concentraciones ambientalmente representativas sobre los copépodos (Bai et al., 2021).

Costa Rica tiene un alto nivel de contaminación por plásticos (Rodríguez et al., 2019) y se han publicado pocos estudios sobre este tema y ninguno estudio en el caso particular de la contaminación por MP en los copépodos. Las interacciones más frecuentes entre los plásticos y la biota se producen en las aguas superficiales, donde se acumulan los plásticos de baja densidad como el polietileno (PE), el polipropileno (PP) y el poliestireno (PS) (Cole et al., 2016). Por lo tanto, para nuestro estudio, hemos elegido la especie de copépodo *Paracalanus parvus* porque es cosmopolita y se encuentra en la capa superior del mar (Niermann y Greve, 1997). Su carácter cosmopolita podría permitirnos de reiterar la misma experiencia en diferentes partes del mundo que tienen diferentes concentraciones de MP para compararlas.

El presente estudio investigará el efecto de la exposición crónica de MP de baja densidad (PE, PP y PS) sobre el valor selectivo y el papel en la BBC en el copépodo *P. parvus* a lo largo de

varias generaciones. Tras la exposición crónica e intergeneracional a los MP, se esperan impactos individuales que podrían suponer impactos ecológicos a través de la BBC en particular. En particular estamos esperando efectos sobre: (1) el desarrollo (tiempo de desarrollo y tamaño del cuerpo), la fecundidad (producción de huevos), la sobrevivencia, e *in fine* la fitness de la población y (2) el flujo de materia fecal (producción, volumen o densidad o tasa de hundimiento) representativa de la eficiencia de la BBC. Por lo tanto, el presente estudio estimará a lo largo de tres generaciones el impacto de tres concentraciones de los MP de baja densidad en el copépodo *P. parvus*, utilizando las variables descritas anteriormente.

II. Materiales y métodos

Recolección y cultivo de copépodos

Individuos de *P. parvus* se recolectará en el Golfo de Nicoya (GN), costa pacífica de Costa Rica, utilizando una red de plancton con una malla de 50µm (SDMO Quiniou ® - F131P50). Las muestras se mantendrán frías hasta que llegar a las instalaciones del Centro de Investigación en Ciencias del Mar y Limnología (CIMAR), San José, Universidad de Costa Rica, en baldes colocados en una hielera. Además, se tomarán tres muestras de agua de mar en el estuario del GN para medir las características de esta agua como el oxígeno disuelto, la salinidad y el pH (Hanna instruments ® - HI-98194) con el fin de preparar agua de mar artificial (AMA) de nuestros experimentos de acuerdo con las condiciones del GN. Los individuos adultos de *P. parvus* muestreados serán elegidos mediante una pipeta de transferencia bajo un microscopio de luz invertido (Olympus IX71) de acuerdo a la metodología descrita por Shore et al. (2021). Los copépodos se transferirán en recipientes de 3 litros y se cultivarán en el laboratorio antes de los experimentos. Se mantendrán los recipientes con los copépodos a una temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 2$ (Jeyaraj y Santhanam, 2013) en un ciclo de luz/oscuridad de 12h/12h. Como alimento se utilizará *Isochrysis galbana* ($6\mu\text{m} \pm 1$) con una concentración de 20 000 células.mL⁻¹ y que se renovará cada día (Jeyaraj y Santhanam, 2013).

Tipos y concentraciones de microplásticos analizados

En este estudio, utilizaremos tres MP diferentes: PE (MPP-635VF; Micro Powders ® ; $6\mu\text{m} \pm 2$; densidad de 0.97), PP (428116 ; Sigma Aldrich ® ; $5.5\mu\text{m} \pm 1.5$; densidad de 0.9) y PS (07312-5 ; Polybead ® ; $6\mu\text{m}$; densidad de 1.05). Los tamaños de MP utilizados ($6\mu\text{m} \pm 0.5$ en promedio) se eligieron para que fueran similares en tamaño a su alimento: *Isochrysis galbana*. Las concentraciones de MP se seleccionaron a partir del estudio de Zhang et al. (2019) y Goldstein et al. (2012) para ser representativo del medio ambiente, ya sea: 0.023mg.L⁻¹ (mar

abierto) y 0.23mg.L^{-1} (giros oceánicos) . Se establecerá una tercera concentración intermedia de 0.15mg.L^{-1} .

Protocolo experimental

Se llevarán a cabo experimentos de exposición crónica y multigeneracional utilizando la metodología de trabajos anteriores (Lee et al., 2013 ; Zhang et al., 2019 ; Shore et al., 2021). Se realizarán varios experimentos para medir: (1) el desarrollo (tiempo de desarrollo del naupli hasta el adulto y tamaño del cuerpo de los adultos), (2) la fecundidad (producción de huevos), (3) la sobrevivencia (número de individuos vivos) y (4) las características de las materiales fecales (producción y tamaño). Estas mediciones nos permitirán estimar el volumen, la densidad y la tasa de hundimiento de las materiales fecales, así como la “fitness” de la población. Para cada generación (3 generaciones), cada control (exposición sin MP) y cada tratamiento (exposición con diferentes tipos y concentraciones de MP) tendrá tres réplicas (Fig. 1).

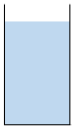
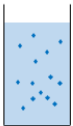


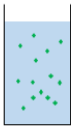


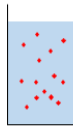
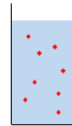

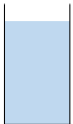
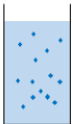


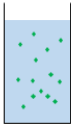


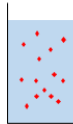
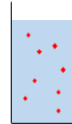

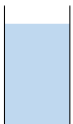
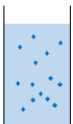


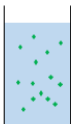


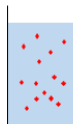


Gen.	Testigo	Poliestireno (PS)			Polietileno (PE)			Polipropileno (PP)		
1		[FE] 	[ME] 	[PE] 	[FE] 	[ME] 	[PE] 	[FE] 	[ME] 	[PE] 
2		[FE] 	[ME] 	[PE] 	[FE] 	[ME] 	[PE] 	[FE] 	[ME] 	[PE] 
3		[FE] 	[ME] 	[PE] 	[FE] 	[ME] 	[PE] 	[FE] 	[ME] 	[PE] 

Figura 1. Protocolo experimental del estudio. En azul el poliestireno (PS), en verde el polietileno (PE) y en rojo el polipropileno (PP) a concentraciones fuertes (FE: 0.23mg.L^{-1}), medias (ME: 0.15mg.L^{-1}) y pequeñas (PE: 0.023mg.L^{-1}) para cada generación (Gen.). Cada control (Testigo) y tratamiento (PS, PE, PP) se realizó por triplicado.

Se utilizarán diferentes tiempos (t) durante los experimentos (Fig. 2). El tiempo 0 (t_0) corresponderá al lanzamiento de los nauplios (~ 200) recién eclosionados ($< 24\text{h}$). Al tiempo 1 (t_1), es decir aproximadamente 25 ± 5 días, los copépodos serán apenas adultos, es decir, acabarán de adquirir la capacidad de reproducirse. Al llegar a t_1 , una primera muestra de

individuos (~100) recién adultos (adultos_{t1}) se utilizará para realizar mediciones de desarrollo, fecundidad, supervivencia y materiales fecales. Al tiempo 2 ($t2$) una segunda muestra de individuos (~100) adultos (adultos_{t2}) se utilizará para realizar las mismas mediciones que antes. Después de esta etapa, cinco parejas reproductoras en los adultos todavía expuestos a los MP serán elegidas para crear la siguiente generación. Se aplicará la misma metodología para la segunda y tercera generación.

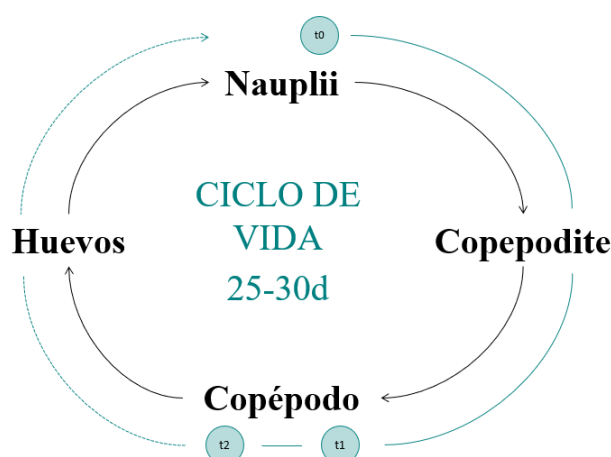


Figura 2. Ciclo de vida simplificado de *Paracalanus parvus* con los tiempos utilizados en los diferentes experimentos del estudio: $t0$ = lanzamiento de los nauplios, $t1$ = primeras mediciones y $t2$ = segundas mediciones y lanzamiento de la siguiente generación.

Para cada réplica (ver la parte “*Protocolo experimental*”), ($t0$) doscientos nauplios recién eclosionados (<24 h) serán transferidos y mantenidos en un vaso de precipitados de 1L de solución AMA (600 nauplios para cada tipo de MP en cada generación), ($t1$) hasta que las hembras adultas produzcan sacos de huevos, es decir, entre 25 y 30 días después de eclosionar (Jeyaraj y Santhanam, 2013). Luego, los adultos no muestreados en $t1$ serán expuestos a los MP durante otros 5 días. La duración total del experimento será de 90 ± 15 días. El agua se renovará cada 72 horas utilizando el método de Shore *et al.* (2021), es decir, sifonando a la inversa el medio del vaso de precipitados al 80% (0,8L) utilizando un tamiz de $30\mu\text{m}$ para evitar la pérdida de copépodos. A continuación, se añadirá a cada réplica el volumen que falte con la concentración adecuada de alimento y/o de MP para obtener un volumen de 1L.

Medidas de las variables

El protocolo experimental para medir las diferentes variables se muestra en la Fig. 3. Una vez que los nauplios serán transferidos al medio de estudio, se estimará el tiempo de desarrollo hasta la fase adulta $_{t1}$. En $t1$, para cada réplica, se transferirá un volumen de 0,5L del volumen de 1L a un nuevo vaso de precipitados de 0,5L. A continuación, el contenido de cada vaso de

precipitados se filtrará a través de un tamiz de 30 μm . Los copépodos así obtenidos se colocarán en una placa de Petri. Se anotará el número de adultos muertos y vivos, teniendo en cuenta que un individuo se considera muerto si no se observa ningún movimiento durante ~ 10 segundos. Los adultos supervivientes serán sexados según el método de Kouwenberg (1993) y se creará una pareja de adultos reproductores que se colocará en una placa de Petri que contenga 25mL de AMA con las concentraciones adecuadas de alimento y/o MP (ver parte “*Recolección y cultivo de copépodos*” y “*Tipos y concentraciones de microplásticos analizados*”). Esta pareja reproductora se utilizará para estimar la producción de huevos tras un periodo de incubación de 48 horas. A continuación, los huevos puestos se contarán mediante fotografías tomadas con un microscopio de luz invertido (Olympus IX71) y se analizarán en el software Mesurim 2. Además, se colocarán al azar cinco adultos (machos o hembras) en una placa de Petri que contenga 25mL de AMA con las concentraciones adecuadas de alimento y/o MP (ver parte “*Recolección y cultivo de copépodos*” y “*Tipos y concentraciones de microplásticos analizados*”). Al cabo de 48 horas, las materiales fecales se contarán mediante fotografías tomadas con un microscopio de luz invertido (Olympus IX71) y se analizarán en el software Mesurim 2. A continuación, se anestesiarán (yodo ácido de Lugol según el método de Shore *et al.*, 2021) los adultos vivos y se seleccionarán al azar diez de ellos (machos o hembras), por cada réplica, para medir sus cuerpos utilizando una lupa binocular (Optica SFX-91D) y un marco de referencia (es decir un MP pre-medido). Luego, en t2, se seguirá el mismo protocolo. Sin embargo, se crearán cinco parejas reproductoras adicionales con respecto al t1 y cada una de ellas se colocará en una placa de Petri que contenga 25mL de AMA con las concentraciones adecuadas de alimento y/o MP (ver parte “*Recolección y cultivo de copépodos*” y “*Tipos y concentraciones de microplásticos analizados*”). Estas parejas reproductoras se utilizarán para generar la siguiente generación. Por último, repetimos el mismo proceso hasta haber medido las variables para las tres generaciones estudiadas.

Además, se calculará una estimación del volumen fecal y de la tasa de hundimiento de la materia fecal utilizando el método de Shore *et al.* (2021). Para el volumen fecal, se utilizará la ecuación del volumen de un cilindro: $V = \pi r^2 h$; donde r es el radio del círculo en la base del cilindro y h es la altura del cilindro. Para la tasa de hundimiento de la materia fecal, se utilizará la ecuación de Stokes modificada para cilindros de inmersión (Shore *et al.*, 2021): $\omega_s = 0.0790 \frac{1}{\mu} (\rho_s - \rho) g L^2 \left(\frac{L}{D}\right)^{-1.664}$; donde μ es la viscosidad del agua ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$), ρ_s la densidad de las materiales fecales ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$), ρ la densidad del agua ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$), g la aceleración debida a la gravedad ($981 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-2}$), L la longitud (cm) y D el diámetro de las materiales fecales (cm). El

volumen de materia fecal está fuertemente correlacionado con el tamaño del cuerpo del animal en los copépodos (Uye y Kaname, 1994). Así, el valor de la densidad de la materia fecal de Feinberg & Dam (1998) se utilizará dado el tamaño similar entre *Acartia tonsa* (0.8mm según el estudio de 1999 de Kiørboe et al.) y *P. parvus* (0.85mm +/- 0.05 según el estudio de 2022 de Razouls et al.). Por tanto, se supone que la densidad de sus materiales fecales también es similar. Por último, la “fitness” se calculará y estimará según el método de Shore *et al.* (2021) como sigue: $F = e^{\sum s f}$; donde F es la “fitness”, s la supervivencia (número de supervivientes) y f la fecundidad (número de huevos). De este modo, será posible comparar la estimación de la “fitness” entre el grupo de control y los grupos expuestos a los diferentes tipos y concentraciones de MP.

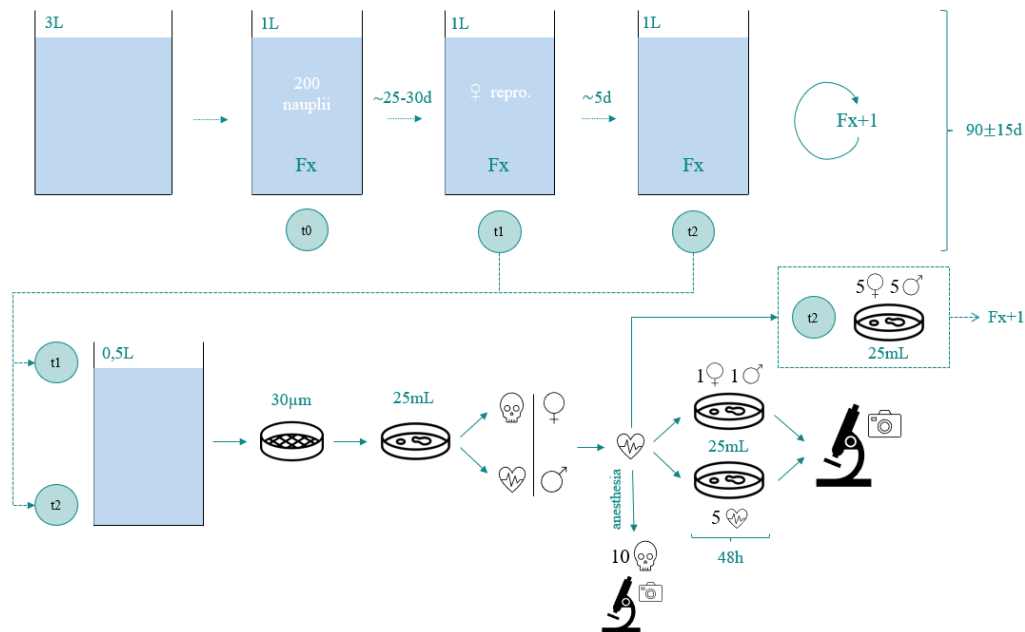


Figura 3. Protocolo experimental simplificado de las medidas de las variables según los tiempos del estudio. Fito. = fitoplancton ; repro. = reproductivas ; F_x = generación al año x ; F_{x+1} = generación al año x+1 ; ☠ = muerto y ♥ = vivo.

Análisis de datos

Todos los datos se expresarán como media \pm desviación estándar ($n = 3$). Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software R Studio (v.4.2.2.). Se utilizará un ANOVA de una vía para evaluar si las medias difieren significativamente entre los distintos tratamientos. Además, se utilizará la prueba de la diferencia mínima significativa de Fisher (Fisher, 1934) y la prueba post hoc de Dunnett (Dunnett, 1955) para comparar cuáles grupos tendrán medias y varianzas significativamente diferentes. Se indicaron diferencias significativas a $p < 0,05$ (*), $p < 0.01$ (**) y $p < 0.001$ (***).

III. Cronograma

ACTIVIDADES	2022				2023							
	S	O	N	D	E	F	M	A	M	J	J	A
BÚSQUEDA DE INFORMACIÓN PARA LA INTRODUCCIÓN Y LOS MÉTODOS DE LA TESIS												
Búsqueda para la introducción												
Fin de la introducción												
Búsqueda para los métodos												
Fin de los métodos												
MUESTRAS Y CULTIVO DE COPÉPODOS EN EL MARCO DE LA TESIS												
Muestras en el GN												
Protocolo experimental												
REDACTAR LOS RESULTADOS Y LA DISCUSIÓN DE LA TESIS												
Cálculos												
Análisis sobre R Studio												
Búsqueda para la discusión												
Formato final de la tesis												
PREPARAR Y PRESENTAR LA TESIS												
Revisión de la tesis												
Defensa de la tesis												

Figura 4. Cronograma del proyecto de tesis.

IV. Presupuesto

ACTIVIDADES Y MATERIALES		COSTO (USD)	COSTO ASEGURADO (USD)	COSTO NECESITADO (USD)	FUENTE
TRABAJO DE CAMPO					
Viaje		300	300	-	UCR
Comida		70	-	70	yo
Bote		290	290	-	UCR
Materiales	Red a plancton	459,29	459,29	-	UCR
	Baldes	48,45	48,45	-	UCR
	Hielera	96,90	96,90	-	UCR
	Medidas de agua	2042,35	2042,35	-	UCR
TRABAJO DE LABORATORIO					
Materiales	Pipetas de transferencia	65,21	65,21	-	UCR
	Lupa binocular Optica SFX-91D	502,91	502,91	-	UCR
	Microscopio Olympus IX71	8000	8000	-	UCR
	Cámara para microscopio	36,34	-	36,34	yo
	Tamiz 30µm	251,16	251,16	-	UCR
	Tubo	5,77	5,77	-	UCR
	Placa de Petri	1361,35	1361,35	-	UCR
	Vaso de precipitado 3L	443,8	443,8	-	UCR
	Vaso de precipitado 1L	569,77	569,77	-	UCR
	Vaso de precipitado 0,5L	107,56	107,56	-	UCR
Fitoplancton	<i>Isochrysis galbana</i>	125	-	125	yo
Microplásticos	Poliétileno (PE)	11,54	-	11,54	yo
	Polipropileno (PP)	50,82	-	50,82	yo
	Poliestireno (PS)	16	-	16	yo
TOTAL		14854,22	14544,52	309,70	

Figura 5. Presupuesto del proyecto de tesis.

V Referencias

- Bai, Z., Wang, N., & Wang, M. (2021). Effects of microplastics on marine copepods. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 217, 112243. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2021.112243>
- Barboza, L. G. A., & Gimenez, B. C. G. (2015). Microplastics in the marine environment: Current trends and future perspectives. *Marine Pollution Bulletin*, 97(1–2), 5–12. <https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2015.06.008>
- Boerger, C. M., Lattin, G. L., Moore, S. L., & Moore, C. J. (2010). Plastic ingestion by planktivorous fishes in the North Pacific Central Gyre. *Marine Pollution Bulletin*, 60(12), 2275–2278. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.08.007>
- Browne, M. A., Dissanayake, A., Galloway, T. S., Lowe, D. M., & Thompson, R. C. (2008). Ingested microscopic plastic translocates to the circulatory system of the mussel, *Mytilus edulis* (L.). *Environmental Science and Technology*, 42(13), 5026–5031. <https://doi.org/10.1021/es800249a>
- Buesseler, K. O., Lamborg, C. H., Boyd, P. W., Lam, P. J., Trull, T. W., Bidigare, R. R., Bishop, J. K. B., Casciotti, K. L., Dehairs, F., Elskens, M., Honda, M., Karl, D. M., Siegel, D. A., Silver, M. W., Steinberg, D. K., Valdes, J., van Mooy, B., & Wilson, S. (2007). Revisiting carbon flux through the ocean's twilight zone. *Science*, 316(5824), 567–570. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1137959/SUPPL_FILE/BUESSELER.SOM.PDF
- Cheng, Y., Wang, J., Yi, X., Li, L., Liu, X., & Ru, S. (2020). Low microalgae availability increases the ingestion rates and potential effects of microplastics on marine copepod *Pseudodiaptomus annandalei*. *Marine Pollution Bulletin*, 152, 110919. <https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2020.110919>
- Cole, M., Coppock, R., Lindeque, P. K., Altin, D., Reed, S., Pond, D. W., Sørensen, L., Galloway, T. S., & Booth, A. M. (2019). Effects of nylon microplastic on feeding, lipid accumulation, and moulting in a coldwater copepod. *Environmental Science and Technology*, 53(12), 7075–7082. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b01853>
- Cole, M., Lindeque, P., Fileman, E., Halsband, C., & Galloway, T. S. (2015). The impact of polystyrene microplastics on feeding, function and fecundity in the marine copepod *Calanus helgolandicus*. *Environmental Science and Technology*, 49(2), 1130–1137. <https://doi.org/10.1021/es504525u>
- Cole, M., Lindeque, P., Fileman, E., Halsband, C., Goodhead, R., Moger, J., & Galloway, T. S. (2013). Microplastic ingestion by zooplankton. *Environmental Science and Technology*, 47(12), 6646–6655. <https://doi.org/10.1021/es400663f>
- Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., & Galloway, T. S. (2011). Microplastics as contaminants in the marine environment: A review. *Marine Pollution Bulletin*, 62(12), 2588–2597. <https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2011.09.025>
- Cole, M., Lindeque, P. K., Fileman, E., Clark, J., Lewis, C., Halsband, C., & Galloway, T. S. (2016). Microplastics alter the properties and sinking rates of zooplankton faecal pellets. *Environmental Science & Technology*, 50(6), 3239–3246. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05905>
- Coppock, R. L., Galloway, T. S., Cole, M., Fileman, E. S., Queirós, A. M., & Lindeque, P. K. (2019). Microplastics alter feeding selectivity and faecal density in the copepod, *Calanus helgolandicus*. *Science of the Total Environment*, 687, 780–789. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.009>
- Debeaufort, F., Galić, K., Kurek, M., Benbettaieb, N., & Ščetar, M. (2022). Matériaux et procédés d'emballage pour les industries alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques. *ISTE Editions*, 1-19. https://books.google.co.cr/books/about/Mat%C3%A9riaux_et_proc%C3%A9d%C3%A9s_d_emballage_pou.html?id=2h1VEAAAQBAJ&redir_esc=y
- Desforges, J. P. W., Galbraith, M., & Ross, P. S. (2015). Ingestion of microplastics by zooplankton in the Northeast Pacific Ocean. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 69(3), 320–330. <https://doi.org/10.1007/s00244-015-0172-5>
- Dunnett, C. W. and Sobel, M. (1955). Approximations to the probability integral and certain percentage points of a multivariate analogue of Student's *t*-distribution. *Biometrika*, 42: 258–60. https://www.jstor.org/stable/2333441#metadata_info_tab_contents

- Eriksen, M., Lebreton, L. C. M., Carson, H. S., Thiel, M., Moore, C. J., Borerro, J. C., Galgani, F., Ryan, P. G., & Reisser, J. (2014). Plastic pollution in the world's oceans: more than 5 trillion plastic pieces weighing over 250,000 tons afloat at sea. *PLoS ONE*, 9(12). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0111913>
- Feinberg, L. R., & Dam, H. G. (1998). Effects of diet on dimensions, density and sinking rates of fecal pellets of the copepod *Acartia tonsa*. *Marine Ecology Progress Series*, 175, 87–96.
- Fisher, R. A. (1934). The effect of methods of ascertainment upon the estimation of frequencies. *Methods of Ascertainment*, 13-25. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1469-1809.1934.tb02105.x>
- Fonty G. (2021). L'effet des plastiques sur les écosystèmes marins. La Revue Du Centre Michel de l'Hospital, 23, 1-13. <https://polen.uca.fr/revue-cmh/index.php?id=425&file=1>
- Fueser, H., Mueller, M. T., & Traunsperger, W. (2020). Ingestion of microplastics by meiobenthic communities in small-scale microcosm experiments. *Science of the Total Environment*, 746, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141276>
- Goldstein, M. C., Rosenberg, M., & Cheng, L. (2012). Increased oceanic microplastic debris enhances oviposition in an endemic pelagic insect. *Biology Letters*, 8(5), 817–820. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2012.0298>
- Jeong, C. B., Kang, H. M., Lee, M. C., Kim, D. H., Han, J., Hwang, D. S., Souissi, S., Lee, S. J., Shin, K. H., Park, H. G., & Lee, J. S. (2017). Adverse effects of microplastics and oxidative stress-induced MAPK/Nrf2 pathway-mediated defense mechanisms in the marine copepod *Paracyclopsina nana*. *Scientific Reports*, 7(41323), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep41323>
- Jeyaraj, N., & Santhanam, P. (2013). Influence of algal diet on population density, egg production and hatching succession of the calanoid copepod, *Paracalanus parvus* (Claus, 1863). *Algal Biomass Utiln*, 4(1), 1–8. <http://storage.unitedwebnetwork.com/files/521/2824198906703a2f941bf82d0396f1c0.pdf>
- Kasapidis, P., Siokou, I., Khelifi-Touhami, M., Mazzocchi, M. G., Matthaiaki, M., Christou, E., Fernandez De Puellas, M. L., Gubanov, A., di Capua, I., Batziakas, S., & Frangoulis, C. (2018). Revising the taxonomic status and distribution of the *Paracalanus parvus* species complex (Copepoda, Calanoida) in the Mediterranean and Black Seas through an integrated analysis of morphology and molecular taxonomy. *Journal of Plankton Research*, 40(5), 595–605. <https://doi.org/10.1093/PLANKT/FBY036>
- Kjørboe, T., Seiz, E., & Visser, A. (1999). Hydrodynamic signal perception in the copepod *Acartia tonsa*. *Marine Ecology Progress Series*, 179, 97–111. <https://doi.org/10.3354/meps179097>
- Kouwenberg, J. (1993). Sex ratio of calanoid copepods in relation to population composition in the Northwestern Mediterranean. *Crustaceana*, 64(3), 281-299. https://brill.com/view/journals/cr/64/3/article-p281_3.xml
- Lee, K. W., Shim, W. J., Kwon, O. Y., & Kang, J. H. (2013). Size-dependent effects of micro polystyrene particles in the marine copepod *Tigriopus japonicus*. *Environmental Science and Technology*, 47(19), 11278–11283. https://doi.org/10.1021/ES401932B/SUPPL_FILE/ES401932B_SI_001.PDF
- Morales-Ramírez, A. (2001). Biodiversidad marina de Costa Rica, los microcrustáceos: subclase copepoda (Crustacea: Maxillopoda). *Revista de Biología Tropical*, 49. Supl. 2, 115–133. www.rtb.ac.cr, www.ucr.ac.cr
- Niermann, U., & Greve, W. (1997). Distribution and fluctuation of dominant zooplankton species in the southern black sea in comparison to the North Sea and Baltic Sea. *Sensitivity to Change: Black Sea, Baltic Sea and North Sea*, 65–77. https://doi.org/10.1007/978-94-011-5758-2_6
- PlasticsEurope. (2021). Plastics-the Facts 2021: An analysis of European plastics production, demand and waste data. *EPRO*, 1-34. <https://plasticseurope.org/wp-content/uploads/2021/12/Plastics-the-Facts-2021-web-final.pdf>
- PlasticsEurope. (2010). Plastics - the Facts 2010: An analysis of European plastics production, demand and recovery for 2009. *EPRO*, 1-32. <https://plasticseurope.org/wp-content/uploads/2021/10/2010-Plastics-the-facts.pdf>
- Raju, P., Santhanam, P., Pandian, S. S., Divya, M., Arunkrishnan, A., Devi, K. N., Ananth, S., Roopavathy, J., & Perumal, P. (2022). Impact of polystyrene microplastics on major marine primary (phytoplankton) and secondary producers (copepod). *Archives of Microbiology*, 204(84), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02697-6>

- Razouls, C., Desreumaux, N., Kouwenberg, J., & Bovée, F. (2022). Biodiversity of marine planktonic copepods (morphology, geographical distribution and biological data). *CNRS, Sorbonne University*. <http://copepodes.obs-banyuls.fr/en>
- Rodríguez, J. V. T., Brade, K., & Sasa, K. (2019). Impacto económico del impuesto al plástico. *PNUD, Costa Rica*, 1-51. <https://costarica.un.org/es/31635-impacto-economico-del-impuesto-al-plastico-en-costa-rica>
- Rodríguez-Torres, R., Almeda, R., Kristiansen, M., Rist, S., Winding, M. S., & Nielsen, T. G. (2020). Ingestion and impact of microplastics on arctic *Calanus* copepods. *Aquatic Toxicology*, 228, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105631>
- Shore, E. A., deMayo, J. A., & Pespeni, M. H. (2021). Microplastics reduce net population growth and fecal pellet sinking rates for the marine copepod, *Acartia tonsa*. *Environmental Pollution*, 284, 117379. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2021.117379>
- Sussarellu, R., Suquet, M., Thomas, Y., Lambert, C., Fabioux, C., Eve, M., Pernet, J., le Goïc, N., Quillien, V., Mingant, C., Epelboin, Y., Corporeau, C., Guyomarch, J., Robbens, J., Paul-Pont, I., Soudant, P., & Huvet, A. (2016). Oyster reproduction is affected by exposure to polystyrene microplastics. *PNAS*, 113(9), 2430-2435 <https://doi.org/10.1073/pnas.1519019113>
- Svetlichny, L., Isinibilir, M., Mykitchak, T., Eryalçın, K. M., Türkeri, E. E., Yuksel, E., & Kideys, A. E. (2021). Microplastic consumption and physiological response in *Acartia clausi* and *Centropages typicus*: Possible roles of feeding mechanisms. *Regional Studies in Marine Science*, 43, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2021.101650>
- Turner, J. T. (2015). Zooplankton fecal pellets, marine snow, phytodetritus and the ocean's biological pump. *Progress in Oceanography*, 130, 205–248. <https://doi.org/10.1016/J.POCEAN.2014.08.005>
- Uye, S. ichi, & Kaname, K. (1994). Relations between fecal pellet volume and body size for major zooplankters of the Inland Sea of Japan. *Journal of Oceanography*, 50(1), 43–49. <https://doi.org/10.1007/BF02233855>
- van Seville, E., Wilcox, C., Lebreton, L., Maximenko, N., Hardesty, B. D., van Franeker, J. A., Eriksen, M., Siegel, D., Galgani, F., & Law, K. L. (2015). A global inventory of small floating plastic debris. *Environmental Research Letters*, 10(12), 124006. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/10/12/124006>
- Wieczorek, A. M., Croot, P. L., Lombard, F., Sheahan, J. N., & Doyle, T. K. (2019). Microplastic ingestion by gelatinous zooplankton may lower efficiency of the biological pump. *Environmental Science and Technology*, 53(9), 5387–5395. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b07174>
- Yu, J., Tian, J. Y., Xu, R., Zhang, Z. Y., Yang, G. P., Wang, X. D., Lai, J. G., & Chen, R. (2020). Effects of microplastics exposure on ingestion, fecundity, development, and dimethylsulfide production in *Tigriopus japonicus* (Harpacticoida, copepod). *Environmental Pollution*, 267, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115429>
- Zhang, C., Jeong, C. B., Lee, J. S., Wang, D., & Wang, M. (2019). Transgenerational proteome plasticity in resilience of a marine copepod in response to environmentally relevant concentrations of microplastics. *Environmental Science and Technology*, 53(14), 8426–8436. https://doi.org/10.1021/ACS.EST.9B02525/SUPPL_FILE/ES9B02525_SI_001.PDF