

# **ACUIPLAS.** Acuicultura responsable: Microplásticos.

A 2. Informe técnico del análisis de microplásticos en filetes de pescado, piensos para acuicultura y muestras de agua.

1.	INTRODUCCIÓN .....	3
2.	OBJETIVO .....	3
3.	METODOLOGÍA.....	4
3.1.	Muestras.....	4
3.2.	Extracción microplásticos.....	6
3.3.	Filtración y secado.....	7
3.4.	Aislamiento y análisis .....	7
4.	RESULTADOS .....	8
4.1.	Microplásticos en filetes de pescado .....	8
4.2.	Microplásticos en pienso.....	8
4.3.	Microplásticos en agua .....	9
4.4.	Tabla general de resultados .....	10
5.	CONCLUSIONES .....	10
6.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	13
7.	ANEXOS .....	15
7.1.	Anexo 1.....	15

## 1. INTRODUCCIÓN

Como se ha descrito en profundidad en el informe anterior “A1. *Identificación de la problemática asociada a la contaminación por plásticos*”, los microplásticos son un contaminante antropogénico emergente, actualmente reconocidos como uno de los contaminantes ambientales más importantes y en continuo crecimiento, y que genera una gran cantidad de impactos ecológicos (Gregory, 2009). Una vez que se liberan al medio ambiente, especialmente cuando alcanzan aguas continentales u oceánicas, pueden ser ingeridos por peces, algas, moluscos o pequeños invertebrados, pudiendo llegar finalmente al ser humano. Hoy día, están considerados como una amenaza global para todos los ecosistemas, no solo por el daño físico inducido a los organismos que los ingieren y la capacidad de lixiviación de sus componentes, sino también como potenciales portadores de contaminantes orgánicos e inorgánicos (Bayo et al., 2018), con una interacción con los seres vivos aún no suficientemente descrita.

Es por ello que en el presente informe se presentan los resultados de los análisis para la determinación de presencia o ausencia de polímeros microplásticos en tres matrices distintas: músculo de pescado de cultivo, pienso para acuicultura y agua adyacente a instalaciones acuícolas.

## 2. OBJETIVO

El objetivo del presente estudio es determinar la presencia/ausencia de residuos plásticos en el pescado de acuicultura, a través de un análisis de los mismos en tres matrices diferentes directamente relacionadas con el cultivo de peces.

En este sentido, el presente informe aporta información científica contrastada acerca del análisis de microplásticos en tres matrices diferentes: filete de pescado de cultivo; pienso para acuicultura; y muestras de agua adyacente a instalaciones acuícolas, con el fin de evaluar si una posible presencia de microplásticos tanto en el agua de cultivo como en el pienso administrado a los peces, pudiera tener un impacto en la presencia de éstos en el filete de pescado de cultivo.

## 3. METODOLOGÍA

### 3.1. Muestras

Respecto a la recogida de muestras, éstas se tomaron de cinco empresas productoras que operan actualmente en España, concretamente en las comunidades autónomas de Andalucía, Región de Murcia, Comunidad Valenciana, Islas Canarias y Galicia. El objetivo ha sido seleccionar puntos geográficos estratégicos en los que se desarrolla una importante actividad acuícola como es el levante español, Galicia y las Islas Canarias.

Las muestras de las diferentes matrices seleccionadas para llevar a cabo el estudio han sido tomadas por el personal asignado por las empresas, con el fin de unificar el procedimiento se ha desarrollado un protocolo, el cual queda incluido en el Anexo 1 del presente informe. Por tanto, la información necesaria para la toma y envío de todas las muestras, queda recogida de acuerdo a dicho protocolo, y detallada a continuación para cada matriz.

#### ***Filetes de pescado***

Se han tomado muestras de filetes de pescado de tres especies de cultivo: dorada (*Sparus aurata*); lubina (*Dicentrarchus labrax*); y rodaballo (*Scophthalmus maximus*), las cuales fueron engordadas en cinco instalaciones de cultivo distintas: tres instalaciones ubicadas a lo largo del mar Mediterráneo (levante español) y dos en el océano Atlántico (Islas Canarias y Galicia).

Cada muestra consta de diez individuos recogidos de un mismo tanque o vivero. Una vez recogidas las muestras, los peces que componen cada una de ellas, se filetearon seleccionando únicamente el músculo de cada individuo. El objetivo fue obtener resultados más precisos sobre el filete de los individuos ya que, en estas especies, ésta es la parte que fundamentalmente se emplea para consumo humano.

Por último, los filetes de cada una de las muestras se homogenizaron previamente a su análisis. La información relativa a la toma de muestras queda detallada en la siguiente tabla:

**Tabla 1.** Información relativa a la toma de muestra de peces de cultivo

Codificación	Cantidad de individuos	Especie	Tipo de instalación	Código de tanque o vivero	Número total de tanques o viveros	Fecha / hora de la toma de muestra	Comunidad Autónoma	Biomasa de músculo obtenida (gr)
M-CMR	M1	Lubina	Mar abierto	J03	22	22/04/2019 15:00	Andalucía	2.758
	M2			J21		22/04/2019 15:50		2.282
	M3			CB20		23/04/2019 8:00		2.697
M-AQN	M1	Lubina	Mar abierto	5	22	10/04/2019 0:30	Canarias	2.374
	M2			4		10/04/2019 3:00		2.242
	M3			7		12/04/2019 1:00		2.372
M-PCA	M1	Dorada	Mar abierto	21	24	24/04/2019 9:15	Región de Murcia	1.749
	M2	Lubina		12		24/04/2019 11:00		2.150
	M3			2		24/04/2019 11:16		2.286
M-SSF	M1	Rodaballo	Tierra	V4	500	29/04/2019 10:05	Galicia	3.247
	M2			X20		29/04/2019 10:10		3.366
	M3			Y23		29/04/2019 10:15		3.234
M-ADR	M1	Dorada	Mar abierto	AC56	37	16/05/2019 2:00	Valencia	2.008
	M2			AC01		22/05/2019 10:00		2.093
	M3			AC67		22/05/2019 4:00		2.222

### *Pienso*

Se ha determinado la presencia o ausencia de microplásticos de muestras de pienso utilizados en la fase de engorde por tres de las empresas productoras que colaboran en el proyecto ACUIPLAS. A continuación, en la siguiente tabla se detallan las especies destino de las muestras de pienso que se tomaron para análisis.

**Tabla 2.** Especies destino de las muestras de pienso

Codificación	Cantidad de muestra (gr)	Especie
P-CMR	2.000	Lubina
P-PCA	2.000	Lubina / Dorada
P-SSF	2.000	Rodaballo

### *Agua*

Se tomaron muestras de agua adyacente a las instalaciones de tres empresas productoras que colaboran en el proyecto ACUIPLAS. Para las dos instalaciones en mar abierto, se tomaron muestras de agua del mismo punto a tres profundidades distintas (0, 10 y 20m). Para la instalación en tierra, la muestra de agua se tomó del punto de entrada de agua, justo donde comienza el canal de entrada.

Tabla 3. Información de toma de muestras de agua

Codificación		Volumen de muestra (mL)	Tipo de instalación	Fecha / hora de la toma de muestra	Comunidad Autónoma
A-CMR	0	1.000	Mar abierto	08/05/2019 9:30	Andalucía
	10	1.000			
	20	1.000			
A-PCA	0	1.000	Mar abierto	24/04/2019 10:20	Región de Murcia
	10	1.000			
	20	1.000			
A-SSF	0'	1.000	Tierra	29/04/2019 8:57	Galicia

### 3.2. Extracción microplásticos

#### *Filetes de pescado*

Para la extracción de los posibles microplásticos presentes en las quince muestras de filetes de pescado, se ha seguido la metodología descrita por Karami *et al.* (2017), con algunas modificaciones: a una cantidad de aproximadamente de 6 g de muestra, previamente triturada y secada a 50°C durante 24 h hasta peso constante, posteriormente se le añaden 60 ml de una disolución de KOH al 10% (w/v). El conjunto se sitúa en matraces de 250 ml de capacidad y se incuban a 40°C durante 48 h. Transcurrido ese tiempo de digestión, se añaden 100 ml de disolución de NaCl (120 g/L), se agita manualmente y se deja decantar durante 30 minutos. A continuación, se procede a la filtración del sobrenadante tal y como se especifica en el siguiente apartado.

Con el fin de validar la metodología de digestión con KOH en el laboratorio, se ha trabajado con patrones internos de polietileno en dos muestras al azar de filetes de pescado, observándose que, en ambas, se recuperaba el microplástico artificialmente añadido. Las muestras se han analizado siempre por triplicado.

#### *Pienso*

Para la extracción de los posibles microplásticos presentes en las tres muestras de pienso para acuicultura, se procedió de forma similar a lo realizado en otros estudios llevados a cabo por el grupo de investigación de microplásticos de la Universidad Politécnica de Cartagena (Bayo *et al.*, 2019). Básicamente, se trata de un método de extracción por densidad con una disolución de cloruro de sodio (NaCl) de 120 g/L (2.05 M). Para ello, se pesan aproximadamente 100 g de pienso, previamente secado a 50°C durante 24 h hasta peso constante, para 1,5 L de disolución de cloruro de sodio, colocándose el conjunto en agitación

mecánica en dispositivo jar-test durante una hora. Después de 30 minutos de decantación, el sobrenadante se filtra y se siguen los mismos pasos descritos anteriormente para las muestras de filetes de pescado. Las muestras se analizan siempre por triplicado.

### *Agua*

Las muestras de agua no requieren proceso de extracción previo a filtración y secado.

### 3.3. Filtración y secado

Tanto las muestras de agua, como el sobrenadante obtenido de las muestras de filetes de pescado y pienso, se han sometido a una filtración al vacío a través de embudo Büchner, utilizando un filtro de membrana (Prat Dumas, Couze-St-Front, Francia, diámetro 110 mm). La pared del embudo se lava dos veces con agua bi-distilada y también se filtra. Las micropartículas aisladas se recuperan mediante agitación orbital (150 rpm, 30 min), colocando los filtros en placas Petri de vidrio de 120 mm, después de lavar con 15 ml de agua bi-distilada. Las muestras se dejan secar durante la noche a 100°C en una estufa de aire forzado FD 23 (Binder GmbH, Tuttlingen, Alemania).

Todos los experimentos han sido llevados a cabo a temperatura ambiente (20 °C). Además, se han analizado muestras de control negativo o blancos de procedimientos durante todo el estudio, filtrando a vacío tanto la propia disolución de cloruro de sodio como la de hidróxido de potasio, para determinar cualquier posible contaminación microplástica durante el trabajo de laboratorio. No se ha detectado ningún tipo de micropartícula en ninguno de estos blancos.

El uso de dispositivos plásticos de laboratorio se ha limitado al máximo, y todos los artículos de vidrio han sido lavados a fondo con agua del grifo y dos veces con agua destilada antes de cada experimento, cubriendo el material con papel de aluminio para mitigar la contaminación.

### 3.4. Aislamiento y análisis

Para el estudio morfométrico de las micropartículas aisladas en los procedimientos anteriores y susceptibles de ser microplásticos, se ha empleado un estereomicroscopio trinocular SZ61 TR (Olympus Co., Tokio, Japón), con rango de magnificación de entre 6,7 y 45 aumentos. El dispositivo lleva acoplada una cámara digital de alta resolución MC190HD de Leica, con software para la medida y procesado de imágenes Leica Application Suite (LAS) 4.8.0, de Microsystems Ltd., que permite el estudio del tamaño, medida de ejes, forma y color de las

micropartículas extraídas, así como la conservación del conjunto de imágenes obtenidas en una base de datos para un posterior análisis.

A continuación, cada una de estas micropartículas fotografiadas son aisladas en placa Petri de 40 mm y se analizan de forma individual mediante espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) (ThermoNicolet 5700, Madison, WI, USA), con resolución de  $16\text{ cm}^{-1}$  y un intervalo de longitud de onda de entre  $400$  y  $4000\text{ cm}^{-1}$ , para conocer así su composición por medio de la comparación de los espectros obtenidos con bibliotecas de referencia del propio equipo. Las bibliotecas de referencia empleadas para este estudio han sido: Hummel Polymer and Additives (2011 espectros de infrarrojo), Polymer Additives and Plasticizers (1799 espectros de infrarrojo), Sprouse Scientific Systems Polymers by ATR Library (500 espectros de infrarrojo) y Rubber Compounding Materials (350 espectros de infrarrojo).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Microplásticos en filetes de pescado

No se han observado partículas microplásticas en ninguna de las quince muestras de pescado analizadas en este estudio.

### 4.2. Microplásticos en pienso

Una vez finalizado el método de extracción anteriormente descrito, se pasó a la identificación de las micropartículas encontradas. En el caso de los piensos analizados, los resultados medios fueron:

- P-CMR: 17,89 ítems/kg.
- P-PCA: 25,72 ítems/kg.
- P-SSF: 35,61 ítems/kg.

Los dos tipos de polímeros plásticos aislados en las muestras de pienso fueron el polietileno, tanto de alta (HDPE) como de baja densidad (LDPE) y el copolímero de etileno y acetato de vinilo (EVA), encontrándose:

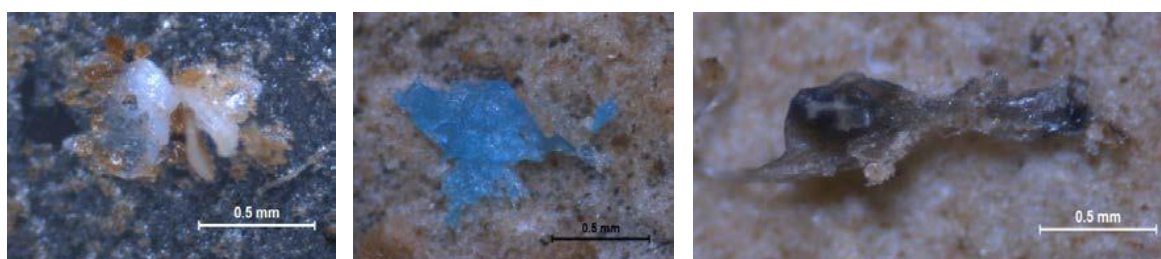
- P-CMR: Copolímero de etileno y acetato de vinilo (EVA)
- P-PCA: Polietileno (HDPE y LDPE)



- P-SSF: Polietileno (HDPE y LDPE) y copolímero de etileno y acetato de vinilo (EVA)

El polietileno pertenece a la categoría de polímeros termoplásticos y constituyó, en 2017, uno de los tipos de plásticos más demandado en Europa (17,5%), tan solo por detrás del polipropileno (PlasticsEurope, 2018). Se emplea para la fabricación de bolsas, empaquetado de alimentos o cubiertas de invernaderos, entre otros usos, por lo que tiene una gran presencia en el medio ambiente en forma de microplástico, tal y como ha demostrado el grupo de investigación de microplásticos de la Universidad Politécnica de Cartagena en medios tan diferentes como son las aguas residuales (Olmos *et al.*, 2019), el sedimento de costas (Bayo *et al.*, 2019) o los fangos de depuradoras (Bayo *et al.*, 2016). Se trata, por tanto, de un material muy ubicuo, presente en muchos medios.

El etilvinilacetato (EVA) es un polímero termoplástico conformado por unidades repetitivas de etileno y acetato de vinilo. En la industria, este polímero se utiliza en general como aditivo para mejorar el pegado-despegado de envolturas de plástico para empaques y, debido a su elasticidad y buenas propiedades barrera, como sustituto del corcho para muchas aplicaciones. Además, su formato espumoso, comúnmente conocido como caucho expandido o gomaespuma, tiene múltiples usos, desde productos de uso doméstico como colchones o asientos, hasta la fabricación industrial de aislantes térmicos y acústicos. También, debido a su baja densidad y alta resistencia a condiciones ambientales adversas, se utiliza para la fabricación de productos flotantes en agua de todo tipo.



**Figura 1.** Ejemplos de microplásticos aislados en las muestras de pienso: (a) copolímero de etileno y acetato de vinilo (EVA) aislado en muestra de pienso P-CMR; (b) polietileno de baja densidad (LDPE) aislado en muestra de pienso P-PCA; (c) polietileno de alta densidad (HDPE) aislado en muestra de pienso P-SSF

#### 4.3. Microplásticos en agua

No se han observado partículas microplásticas en ninguna de las siete muestras de agua analizadas en este estudio.

#### 4.4. Tabla general de resultados

A continuación, en la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos para cada una de las muestras analizadas.

**Tabla 4.** Resultado de análisis de microplásticos por muestra

Muestra		Ítems/Kg
M-CMR	M1	0
	M2	0
	M3	0
M-AQN	M1	0
	M2	0
	M3	0
M-PCA	M1	0
	M2	0
	M3	0
M-SSF	M1	0
	M2	0
	M3	0
M-ADR	M1	0
	M2	0
	M3	0
P-CMR		17,89
P-PCA		25,72
P-SSF		35,61
A-CMR	0	0
	10	0
	20	0
A-PCA	0	0
	10	0
	20	0
A-SSF	0'	0

## 5. CONCLUSIONES

Como conclusión principal, los resultados de este estudio demuestran la ausencia de microplásticos en el filete de todas las muestras de pescado analizadas, habiendo analizado un total de 15 muestras, cada una de ellas compuesta por 10 individuos (150 individuos en total).

En relación a las muestras de pienso, se ha detectado presencia de microplásticos en los piensos suministrados a las especies analizadas, pero se ha demostrado que no hay transferencia de éstos a los filetes de pescado analizados y, por tanto, tampoco existe riesgo de transferencia de microplásticos por ingesta a los seres humanos.

En cualquier caso, respecto a la cantidad detectada en éstas: P-CMR; P- PCA; P-SSF (17,89; 25,72; 35,61 ítems/kg respectivamente), cabe destacar que cada vez son más los estudios que evidencian la presencia de microplásticos en productos de naturaleza y procedencia muy diversa por tratarse los microplásticos de sustancias de naturaleza ubicua. A modo de ejemplo, en miel se ha encontrado 166 ítems/kg, en agua mineral embotellada entre 2 y 241 ítems/l y en cerveza entre 2 y 109 ítems/l (Barboza *et al*, 2018). Mientras que, en un estudio realizado en distintos tipos de sal de mesa común, se han detectado cantidades de microplásticos entre 550 y 681 ítems/Kg en muestras de sal marina (Yang *et al*, 2015). En cuanto a su bioacumulación en la cadena alimentaria terrestre, en avicultura se ha encontrado presencia de microplásticos en el músculo de pollos en cantidades cercanas a 57 ítems/individuo (Huerta *et al*, 2017).

Existe una alta variabilidad en cuanto a la presencia de microplásticos en diferentes productos, por lo que resulta complejo establecer un umbral que permita discernir entre concentraciones altas y bajas. No obstante, en base a los resultados que se han obtenidos en estudios similares., todo parece indicar que las cantidades encontradas en las muestras de pienso son particularmente bajas en comparación con dichos resultados.

Respecto a la procedencia de los microplásticos encontrados en las muestras de pienso analizadas, esta presencia puede deberse a la posible existencia de éstos en las materias primas utilizadas para la fabricación de los piensos (tanto agrícolas como marinos), al proceso de recolección, procesado y transporte de esas materias primas, al proceso de fabricación de los piensos o al material empleado en su empaquetado que, al tratarse en la mayoría de los casos de polímeros plásticos, éstos pueden sufrir degradación o fragmentación, originando los denominados microplásticos secundarios. No obstante, se prevé en estudios posteriores realizar una evaluación y comparativa para confirmar esta hipótesis.

En cuanto a las muestras de agua, no se han detectado microplásticos en ninguna de ellas. Conviene mencionar, como se ha descrito en el informe anterior “A1. *Identificación de la problemática asociada a la contaminación por plásticos*”, que, en mares y océanos, la distribución de los microplásticos no es homogénea. Esto se debe a su pequeño tamaño y baja densidad, lo cual contribuye a su transporte generalizado a través de corrientes oceánicas (Cole y col., 2011). Teniendo en cuenta que las muestras se han tomado en puntos muy localizados y, por tanto, sujetos a estos patrones generalizados de transporte, difícilmente se puede concluir la no presencia de microplásticos en el agua de las áreas geográficas seleccionadas.

Por otro lado, cabe destacar que la presencia de microplásticos en mares y océanos es comúnmente cuantificada en Kg/Km<sup>2</sup> de superficie (FAO, Fisheries and Aquaculture Technical Paper No. 615). Esto nos da una idea de la dimensión y número de muestras necesarias para determinar la concentración de microplásticos en el océano para una zona geográfica seleccionada.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbasi, S., Soltani, N., Keshavarzi, B., Moore, F., Turner, A., Hassanaghaei, M. (2018): “Microplastics in different tissues of fish and prawn from the Musa Estuary, Persian Gulf”, *Chemosphere*, 205, 80-87.
- Amsden, B., Cheng, Y.L., 1995. A generic protein delivery system based on osmotically rupturable monoliths. *Journal of Controlled Release*, 33(1): 99–105.
- Bayo, J., Guillén, M., Olmos, S., Jiménez, P., 2018. Microplastics as vector for persistent organic pollutants in urban effluents: The role of polychlorinated biphenyls. *International Journal of Sustainable Development and Planning* 13(4): 671–682.
- Bayo, J., Rojo, D., Olmos, S., 2019. Abundance, morphology and chemical composition of microplastics in sand and sediments from a protected coastal area: The Mar Menor lagoon (SE Spain). *Environmental Pollution* 252: 1357–1366.
- Barboza, A., Vethaak, A., Lavorante, B., Lundebye, A., Guilhermino, L., 2018. Marine microplastic debris: An emerging issue for food security, food safety and human health. *Marine Pollution Bulletin*, Vol 133, 336-348.
- Crawford, C.B., Quinn, B., 2017. *Microplastic Pollutants*. Elsevier: Kidlington, UK, 315 pp.
- Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C. & Galloway, T.S. 2011. Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. *Mar. Poll. Bull.*, 62(12): 2588-2597.
- Del Amo, E.M., Urtti, A., 2008. Current and future ophthalmic drug delivery systems: a shift to the posterior segment. *Drug Discovery Today*, 13(3-4): 135–143.
- FAO, 2017. *Microplastics in fisheries and aquaculture. Status of knowledge on their occurrence and implications*. Roma.
- Gregory, M.R., 2009. Environmental implications of plastic debris in marine settings entanglement, ingestion, smothering, hangers-on, hitch-hiking and

alien invasions. *Phil. Trans. R. Soc. B* 364: 2013–2025.

- Huerta, E. & Vega, Jorge & Quej, Victor & Chi, Jesus & Cid, Lucero & Chi, Cesar & Escalona-Segura, Griselda & Gertsen, Henny & Salánki, Tamás & Ploeg, Martine & Koelmans, Albert & Geissen, Violette. (2017). Field evidence for transfer of plastic debris along a terrestrial food chain. *Scientific Reports*. 7. 10.1038/s41598-017-14588-2.
- Karami, A., Golieskardi, A., Choo, C.K., Romano, N., Ho, Y.B., Salamatinia, B., 2017. A high-performance protocol for extraction of microplastics in fish. *Science of the Total Environment* 578: 485–494.
- Mason, S. A., Welch, V. G., & Neratko, J. (2018). Synthetic Polymer Contamination in Bottled Water. *Frontiers in Chemistry*, 6. doi:10.3389/fchem.2018.00407.
- Olmos, S., López-Castellanos, J., Bayo J., 2019. Are advanced wastewater treatment technologies a solution for total removal of microplastics in treated effluents? *Water Resources Management X*, 229: 109–116.
- Panebianco, A., Nalbone, L., Giarratana, F., & Ziino, G. (2019). First discoveries of microplastics in terrestrial snails. *Food Control*, 106722. doi: 10.1016/j.foodcont.2019.106722.
- PlasticsEurope, 2018. *Plastics – the facts 2018: An analysis of European Plastics, Production, Demand and Waste Data*. Disponible en: [www.plasticseurope.org](http://www.plasticseurope.org) (Consulta: 24/07/2019).

## 7. ANEXOS

### 7.1. Anexo 1

#### **ACUIPLAS. Protocolo para la toma y envío de muestras.**

Este protocolo tiene como objetivo estandarizar los métodos de colección y envío de muestras, asegurando su calidad y correcta conservación durante el proceso de transporte. En concreto se tomarán muestras a partir de tres matrices diferentes: Peces de cultivo, Agua y Pienso.

##### **1. Peces de cultivo**

Para la determinación de la cantidad de microplásticos presente en el tejido de peces procedentes de la actividad acuícola, se tomarán muestras de éstos en cada una de las cinco instalaciones que colaborarán en el proyecto ACUIPLAS. La toma y envío de muestras de peces de cultivo se llevará a cabo siguiendo los pasos descritos a continuación:

##### **➤ VIVEROS EN MAR ABIERTO**

1. Se tomarán un total de tres muestras en cada instalación.
2. Cada muestra procederá de un único vivero escogido aleatoriamente, siendo necesario escoger de manera aleatoria un total de tres viveros para la toma de muestras.
3. Dichos viveros deberán contener ejemplares que hayan alcanzado su talla comercial.
4. Cada muestra consistirá en diez peces escogidos, a su vez, aleatoriamente en cada uno de los viveros.
5. Los ejemplares que formarán las muestras deberán ser adultos que hayan alcanzado la talla comercial. Así mismo, es necesario que el peso total de los diez ejemplares pertenecientes a cada muestra alcance al menos 5 Kg.
6. Idealmente, los ejemplares de cada muestra se empaquetarán para su envío de manera independiente, de forma que cada paquete contenga únicamente los diez ejemplares pertenecientes a la misma muestra.

7. En caso de que, debido a su tamaño, no se puedan empaquetar todos los ejemplares pertenecientes a una muestra en un único paquete, se dividirá la muestra en el número de paquetes que sea necesario, asegurando que en cada paquete únicamente se introducen ejemplares pertenecientes a la misma muestra.
8. Las muestras se enviarán en fresco, usando una cantidad suficiente de hielo natural o mediante los métodos de envío estandarizados de cada instalación. En cualquier caso, se ha de garantizar una temperatura entre 3 y 4 °C durante todo el proceso de transporte.
9. El tiempo transcurrido desde la toma de muestras hasta su recepción en CTAQUA no debe superar las 72 horas.
10. En cada paquete deberá anotarse la siguiente información:
  - Instalación de cultivo
  - Fecha y hora de la toma de muestras
  - Número de peces contenidos
  - Número de muestra a la que pertenecen los peces (M1, M2, M3)
  - Número del vivero del que proceden los peces y número de viveros totales en la instalación
  - Nombre de la persona responsable de la toma de muestras
11. Las tres muestras deberán enviarse a la vez, idealmente las tres contenidas en un paquete mayor.
12. La fecha de la toma de muestras se determinará en función de la disponibilidad de cada instalación, quedando, en cualquier caso, comprendida entre las fechas 25-marzo-2019 y 30-abril-2019.

➤ **PLANTAS DE CULTIVO EN TIERRA**

1. Se tomarán un total de tres muestras en cada instalación.
2. Cada muestra procederá de un único tanque escogido aleatoriamente, siendo necesario escoger de manera aleatoria un total de tres tanques para la toma de muestras.
3. Dichos tanques deberán contener ejemplares que hayan alcanzado su talla comercial.
4. Cada muestra consistirá en diez peces escogidos, a su vez, aleatoriamente en cada uno de los tanques.



5. Los ejemplares que formarán las muestras deberán ser adultos que hayan alcanzado la talla comercial. Así mismo, es necesario que el peso total de los diez ejemplares pertenecientes a cada muestra alcance al menos 5 Kg, no suponiendo un problema en caso de que el peso total sea notablemente superior.
6. Idealmente, los ejemplares de cada muestra se empaquetarán para su envío de manera independiente, de forma que cada paquete contenga únicamente los diez ejemplares pertenecientes a la misma muestra.
7. En caso de que, debido a su tamaño, no se puedan empaquetar todos los ejemplares pertenecientes a una muestra en un único paquete, se dividirá la muestra en el número de paquetes que sea necesario, asegurando que en cada paquete únicamente se introducen ejemplares pertenecientes a la misma muestra.
8. Las muestras se enviarán en fresco, usando una cantidad suficiente de hielo natural o mediante los métodos de envío estandarizados de cada instalación. En cualquier caso, se ha de garantizar una temperatura entre 3 y 4 °C durante todo el proceso de transporte.
9. El tiempo transcurrido desde la toma de muestras hasta su recepción en CTAQUA no debe superar las 72 horas.
10. En cada paquete deberá anotarse la siguiente información:
  - Instalación de cultivo
  - Fecha y hora de la toma de muestras
  - Número de peces contenidos
  - Número de muestra a la que pertenecen los peces (M1, M2, M3)
  - Número del tanque del que proceden los peces y número de tanques totales en la instalación
  - Nombre de la persona responsable de la toma de muestras
11. Las tres muestras deberán enviarse a la vez, idealmente las tres contenidas en un paquete mayor.
12. La fecha de la toma de muestras se determinará en función de la disponibilidad de cada instalación, quedando, en cualquier caso, comprendida entre las fechas 25-marzo-2019 y 30-abril-2019.

## 2. Agua

Se tomarán muestras de agua adyacente a los viveros en mar abierto o a la toma de agua de la planta en tres de las cinco instalaciones que colaborarán en el desarrollo del proyecto ACUIPLAS. Dichas muestras se analizarán para determinar la cantidad de microplásticos presentes en el agua perteneciente a las zonas geográficas donde se desarrolla la actividad. El protocolo de toma y envío de estas muestras queda descrito a continuación.

### ➤ VIVEROS EN MAR ABIERTO

1. Se tomarán muestras de agua a tres profundidades distintas (de superficie a fondo) correspondientes a 0, 10 y 20 metros. De modo que se tomará una muestra en cada una de las profundidades descritas.
2. Las tres muestras de agua se tomarán en una misma coordenada geográfica, la cual corresponderá a una distancia horizontal perpendicular a la línea de costa desde el vivero hacia mar adentro. Esta distancia será de entre 0.5 y 1.0 metros.
3. El vivero se escogerá aleatoriamente de entre aquellos que compongan la línea que se encuentre a una mayor distancia de la línea de costa.
4. La fecha de toma de muestras de agua deberá coincidir con la fecha de toma de muestras de peces de cultivo.
5. El tiempo transcurrido para la toma de las tres muestras no deberá superar los 60 minutos.
6. El volumen necesario para cada muestra será de 1 litro.
7. Los recipientes de las muestras deberán garantizar un cierre hermético para evitar derrames y estar fabricados en vidrio, descartando cualquier material derivado de elastómeros, plásticos o fibras.
8. En cada recipiente de muestra deberá anotarse la siguiente información:
  - Instalación de cultivo
  - Localización geográfica de la toma de muestra (longitud, latitud)
  - Profundidad de la muestra (0, 10 o 20 metros)
  - Fecha y hora de la toma de la muestra
  - Condiciones climáticas
  - Estado de la marea
  - Número del vivero adyacente a la localización geográfica de la toma de muestras y número total de viveros de la instalación

- Nombre de la persona responsable de la toma de muestras
9. Las tres muestras deberán enviarse a la vez, contenidas en un paquete mayor junto con las tres muestras de peces de cultivo.
  10. La fecha de la toma de muestras se determinará en función de la disponibilidad de cada instalación, quedando, en cualquier caso, comprendida entre las fechas 25-marzo-2019 y 30-abril-2019.

### ➤ **PLANTAS DE CULTIVO EN TIERRA**

1. Se tomará una muestra de agua proveniente del sistema principal de toma de agua de la planta. De modo que el punto de donde se tome la muestra será anterior a cualquier tipo de filtración o tratamiento previo al que se pueda someter el agua para su posterior utilización.
2. El volumen necesario de la muestra será de 1 litro.
3. EL recipiente de la muestra deberá garantizar un cierre hermético para evitar derrames y estar fabricado en vidrio, descartando cualquier material derivado de elastómeros, plásticos o fibras.
4. La fecha de toma de la muestra de agua deberá coincidir con la fecha de toma de muestras de peces de cultivo.
5. En cada recipiente de muestra deberá anotarse la siguiente información:
  - Instalación de cultivo
  - Descripción de la localización de la toma de la muestra
  - Localización geográfica del punto de toma de agua del emisario submarino de la planta
  - Fecha y hora de la toma de la muestra
  - Condiciones climáticas
  - Estado de la marea
  - Nombre de la persona responsable de la toma de muestras
6. La muestra deberá enviarse junto con las tres muestras de peces de cultivo.
7. La fecha de la toma de muestra se determinará en función de la disponibilidad de cada instalación, quedando, en cualquier caso, comprendida entre las fechas 25-marzo-2019 y 30-abril-2019.

### 3. Pienso

Se determinará la presencia o ausencia de microplásticos de muestras de pienso pertenecientes a las empresas colaboradoras del proyecto ACUIPLAS. Para ello, las tres empresas seleccionadas para enviar las muestras de agua, se encargarán, a su vez, de enviar una muestra del pienso utilizado durante la fase de engorde en sus instalaciones. El protocolo de toma y envío de estas muestras queda descrito a continuación.

1. Se tomarán un total de tres muestras de pienso pertenecientes a tres de las empresas colaboradoras.
2. La muestra consistirá en 2 Kg del pienso utilizado en la fase de engorde
3. En el recipiente de la muestra deberá anotarse la siguiente información:
  - Instalación de cultivo
  - Fecha y hora de la toma de la muestra
  - Tipo de pienso (nombre comercial) y especie destino
  - Número de lote al que pertenece la muestra
  - Nombre de la persona responsable de la toma de muestra
4. La fecha de la toma de muestra se determinará en función de la disponibilidad de cada instalación, quedando, en cualquier caso, comprendida entre las fechas 25-marzo-2019 y 30-abril-2019.

## ***NOTAS GENERALES:***

- Ctaqua facilitará a las empresas colaboradoras los recipientes para la recolección de muestras.
- Cada empresa colaboradora deberá definir a una persona de contacto, a través de la cual se realizarán todos los contactos referentes a los envíos de las muestras.
- Una vez planificada y definida la fecha de toma de muestras por parte de las empresas colaboradoras, se necesita que se pongan en contacto con la persona de contacto en CTAQUA para informar acerca de la fecha de recepción prevista. A continuación, los detalles de contacto:
  - Jose Francisco Cabello
  - Dirección e-mail: [j.cabello@ctaqua.es](mailto:j.cabello@ctaqua.es)
  - Teléfono de contacto: 619 44 90 89
- En relación al envío de las muestras, cabe mencionar que CTAQUA se encuentra muy cerca de la lonja del Puerto de Santa María, si las empresas realizan envíos regulares a lonja podemos recoger las muestras en el puesto de lonja que nos indiquen, con el objetivo de facilitar el proceso de envío a las empresas colaboradoras. No obstante, también se pueden enviar directamente a la siguiente dirección de correo postal:
  - **CTAQUA**  
Muelle Comercial S/N  
  
11500 - El Puerto de Santa María  
  
Cádiz - España