



# Ingesta de microplásticos por el pez exótico *Gambusia holbrooki* en dos lagunas costeras mediterráneas

C. M. Rodríguez-Sierra<sup>1,2</sup>, M. Antón-Pardo<sup>3</sup>, X. D. Quintana<sup>3</sup>, X. Armengol<sup>1</sup>

(1) Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva/Dep. Microbiología i Ecologia. Universitat de València. Spain. Catedrático José Beltrán, 46100 Burjassot – Valencia, España.

(2) Universidad Surcolombiana, Departamento de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Avenida Pastrana Borrero Carrera 1ra, 410007 Neiva– Huila, Colombia.

(3) GRECO, Institut d'Ecologia Aquàtica, Universitat de Girona, Facultat de Ciències, Av. Ma Aurelia Capmany, 69, 17003 Girona, España.

\* Autor de correspondencia: C. M. Rodríguez Sierra [claumiro@alumni.uv.es]

> Recibido el 21 de septiembre de 2020 - Aceptado el 25 de noviembre de 2020

**Rodríguez-Sierra, C.M., Antón-Pardo, M., Quintana, X.D., Armengol, X. 2020. Ingesta de microplásticos por el pez exótico *Gambusia holbrooki* en dos lagunas costeras mediterráneas. *Ecosistemas* 29(3):2097. <https://doi.org/10.7818/ECOS.2097>**

*Gambusia holbrooki* es un pez de origen norteamericano introducido a principios del siglo XX en humedales de la península ibérica para el control biológico de mosquitos. Su alimentación se basa principalmente en invertebrados, pero son también susceptibles de ingerir y acumular residuos de microplásticos con tamaños similares al de algunas de sus presas. En este estudio analizamos los contenidos del tracto gastrointestinal de ejemplares adultos de esta especie procedentes de dos lagunas costeras restauradas, con el objetivo de caracterizar la ingesta de microplásticos. Se analizaron 156 ejemplares de *Gambusia holbrooki*: 92 hembras y 64 machos. Las hembras presentaron un mayor peso y longitud que los machos. Un 44 % de los peces presentó algún resto de microplástico (fibras o fragmentos) en el tracto gastrointestinal. La mayor parte de los microplásticos (48 %) medían entre 100 y 400 µm y las fibras azules y los fragmentos marrones fueron los más frecuentes. El número medio de los microplásticos por individuo fue ligeramente superior en machos que en hembras, en muestras de primavera respecto a las de verano, y en la laguna G02 respecto a la L04, aunque únicamente se encontraron diferencias significativas entre las lagunas. También se observó que los individuos con pesos inferiores presentaron mayor cantidad de microplásticos. En este sentido, la presencia de microplásticos en los contenidos gastrointestinales de peces puede ser un indicador del incremento de residuos de plásticos en ecosistemas costeros mediterráneos, pudiendo llegar a alterar las dinámicas tróficas de los organismos acuáticos.

**Palabras clave:** fibras microplásticas; fragmentos microplásticos; ingesta; lagunas restauradas

**Rodríguez-Sierra, C.M., Antón-Pardo, M., Quintana, X.D., Armengol, X. 2020. Microplastics ingestion by the exotic fish *Gambusia holbrooki* in two Mediterranean coastal lagoons. *Ecosistemas* 29(3):2097. <https://doi.org/10.7818/ECOS.2097>**

*Gambusia holbrooki* is a fish of North American origin introduced in the early 20th century in wetlands of the Iberian Peninsula for the biological control of mosquitoes. This fish feeds mainly on invertebrates, but they are also susceptible to ingesting and accumulating microplastic residues similar in size to some of their usual prey. In this study, we analyzed the contents of the gastrointestinal tract of adult individuals of this species from two restored coastal lagoons, to characterize the ingestion of microplastics. 156 specimens of *Gambusia holbrooki* were analyzed: 92 females and 64 males. Females had a greater weight and length than males. 44% of the fish presented some microplastic residue (fibers or fragments) in their gastrointestinal contents. Most of the microplastics (48%) ranged between 100 and 400 µm. Blue fibers and brown fragments were the most common. The average number of microplastics per individual was slightly higher in males than in females, in spring samples than in summer ones, and in lagoon G02 compared to L04, although only significant differences were found between the lagoons. In addition, individuals with lower weight presented a greater amount of microplastics. In this sense, the presence of microplastics in the gastrointestinal contents of fish can be an indicator of the increase in plastic residues in Mediterranean coastal ecosystems, with the potential to alter the trophic dynamics of aquatic organisms.

**Key Words:** microplastic fibers; microplastic fragments; ingestion; restored lagoons

## Introducción

La creciente presencia de plásticos en los ecosistemas acuáticos ha sido considerada como un problema ambiental emergente a escala global (Browne et al. 2008; UNEP 2011; Granek et al. 2020; Oliveira et al. 2020; Stock et al. 2020;), especialmente por su posible interferencia en las redes tróficas (Browne et al. 2007; Provencher et al. 2015; Au et al. 2017). La erosión de los plásticos da lugar a fragmentos de pequeño tamaño, incluyendo los denominados microplásticos (MP en adelante) que han sido definidos como partículas de plástico de menos de 5 mm (Ory et al. 2018), y que

pueden ser clasificados según tamaño, origen, forma, polímero, tipo o color (Derraik 2002; Browne et al. 2011; Cole et al. 2011; Rillig 2012; Wagner et al. 2014).

Existe cierta preocupación acerca del impacto que las distintas formas, tamaños o composición de los plásticos puede tener sobre la biota acuática (Thompson et al. 2004; Browne et al. 2007; Mo-chamad et al. 2019; Wang et al. 2020), por lo que es importante conocer su procedencia, prevalencia y abundancia en estos sistemas (Auta et al. 2017; Collard et al. 2019). Por otro lado, también es importante investigar acerca de los procesos de transferencia trófica de microplásticos y su posible interacción con factores bióticos y

abióticos. La identificación de los factores que influyen en su captura, ingesta y absorción, el tiempo de residencia en organismos acuáticos, su posible bioacumulación, los efectos físicos de su agregación en el tracto gastrointestinal, y su potencial para actuar como vectores para la transferencia de otros contaminantes, son aspectos importantes sobre los que se tiene escasa información (Au et al. 2017; Roch et al. 2020;).

A pesar de que existen bastantes estudios sobre los plásticos hallados en el mar y en algunos organismos marinos (Shawn y Day 1994; Thompson et al. 2009), la información sobre éstos en aguas continentales es escasa (Adeogun et al. 2020). Los plásticos o sus fragmentos se encuentran ampliamente distribuidos por el medio terrestre y pueden ser transportados por diversos medios (viento, escorrentía) y llegar a los sistemas acuáticos, tanto al mar como a hábitats lóticos y lénticos (Thompson et al. 2009). Una vez los plásticos llegan a los sistemas acuáticos, dependiendo de su densidad, pueden flotar y mantenerse en la columna de agua, o hundirse y acumularse en los sedimentos. En cualquier caso, estos plásticos continúan su proceso de erosión, dando lugar a fragmentos más pequeños que se acumulan en los sedimentos o quedan en suspensión en la columna de agua (Van Cauwenberghe et al. 2013, 2015; Desforges 2014; Lechthaler et al. 2020; Pengfei et al. 2020; Wendt-Potthoff y Gabel 2020). Existen estudios que han demostrado que los fragmentos de plásticos y MP pueden ser ingeridos, intencionada o accidentalmente, por una amplia variedad de grupos taxonómicos acuáticos, como crustáceos (*Daphnia magna*, *Gammarus pulex*, *Notodromas monacha*), oligoquetos (*Lumbriculus variegatus*), moluscos (*Potamopyrgus antipodarum*, *Mytilus edulis*), peces (*Gobio gobio*) (Rosenkranz et al. 2009; Imhof et al. 2013; Wagner et al. 2014; ), además de aves, tortugas y mamíferos marinos (Teuten et al. 2009; Colabuono et al. 2010; Lavers et al. 2014; Provencher et al. 2015; Gil-Delgado et al. 2017).

Los peces están en los últimos eslabones de la cadena trófica de sistemas acuáticos continentales y tienen un papel destacado en la transferencia de energía entre niveles tróficos, así que los estudios centrados en la ingestión de microplásticos pueden tener relevancia en estos hábitats. Además, debido a que en muchos peces el tipo de alimentación y la dieta puede variar en función de la edad (Hyslop 1980; Costello 1990; Granado 2002; Bennemann et al. 2006), las variaciones inter- e intraespecíficas en la ingesta de microplásticos pueden ser considerables.

La ingestión y acumulación de fragmentos de plásticos pueden generar alteraciones fisiológicas y metabólicas en los organismos (Browne et al. 2008; Maocai et al. 2019; Boyero et al. 2020; Wang et al. 2020). Estudios como el de Da Costa Araujo y Malafaia (2020), demuestran que los peces son capaces de ingerir hasta 1.26 partículas de MP/g, y que su acumulación puede alcanzar el nivel trófico superior y desencadenar cambios de comportamiento; concretamente falta de agregación social defensiva y reducción de la evaluación de riesgo. Sin embargo, en otros organismos acuáticos (Gammaridae) se demostró que el tamaño y el tipo de microplásticos ingeridos no afectaron su comportamiento alimenticio ni locomotor (Almut et al. 2020).

Entre los sistemas acuáticos continentales, un caso particular son las lagunas costeras, muchas veces situadas en zonas altamente antropizadas y que han sufrido importantes impactos (paseos marítimos, urbanización, destrucción de dunas). Esto se acentúa en lagunas costeras mediterráneas, ya que son altamente vulnerables a la degradación como consecuencia de los usos del suelo (agricultura, turismo) y el vertido de residuos en sus proximidades o en sus efluentes (Rillig 2012; Armengol et al. 2018; Comín 2018; Quintana et al. 2018a, 2018b). Además, la presencia de desechos plásticos en ambientes costeros ha sido identificado como un problema global y creciente (UNEP 2011; Stock et al. 2020). Por tanto, este tipo de lagunas (objeto de nuestro estudio) son susceptibles de albergar grandes cantidades de plásticos y microplásticos.

En este tipo de lagunas, uno de los peces que suele ser más abundante es *Gambusia holbrooki*, un pequeño pez Poecílido, con rango de tamaño entre 1 y 5 cm de longitud, de origen norteameri-

cano que fue introducido a principios del siglo XX en humedales de la península ibérica para el control biológico de los mosquitos. Esta especie tiene una gran amplitud de dieta y, en su medio natural, incluye una extensa gama de alimentos que pueden variar estacionalmente (Alcaraz y Gacia-Berthou 2007). Debido a esta amplitud de dieta y a la poca selectividad de presas, la ingesta de microplásticos puede tener mayor relevancia en esta especie, que también puede alimentarse tanto en el bentos como en la columna de agua (García-Berthou y Moreno-Amich 1992; Rincón 2002; Alcaraz y Gacia-Berthou 2007). Dada su abundancia y su carácter invasor en España y Europa (Ruiz-Navarro 2011; Cano-Rocabayera et al. 2020; Shaolin et al. 2020) su captura está permitida e incentivada, por lo que esta especie puede ser adecuada para investigar la ingesta de plásticos a través del análisis de su tracto gastrointestinal. En las lagunas restauradas de la Pletera, en el litoral de Girona (Noreste de España), *G. holbrooki* es una especie abundante que compite con otras especies autóctonas, especialmente con el fartet (*Aphanius iberus*), un pequeño pez ciprinodóntido en peligro de extinción, endémico de la península ibérica e incluido en el anexo I de la Directiva Hábitats (Doadrio et al. 2011).

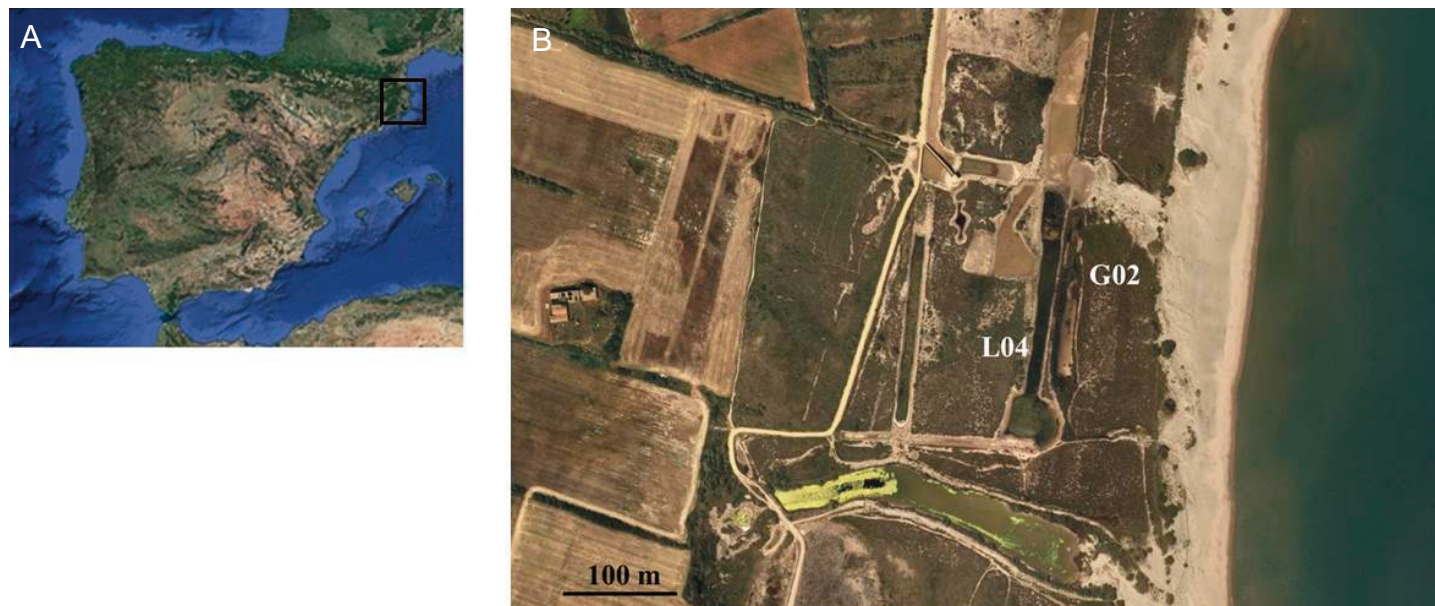
Los objetivos de este estudio son (i) cuantificar la prevalencia, abundancia y características de los microplásticos hallados en los contenidos gastrointestinales de individuos de la especie *Gambusia holbrooki*, y (ii) analizar los factores que afectan la presencia de microplásticos en esta especie, teniendo en cuenta datos biométricos de los ejemplares capturados (longitud y peso), su sexo, la laguna de procedencia, y la época de captura (primavera y verano).

## Materiales y métodos

### Área de estudio

La marisma de La Pletera (Girona, NE España) es un área protegida constituida por un conjunto de lagunas costeras que no tienen conexión continua con el mar ni con aguas dulces superficiales. El régimen hídrico de todas las lagunas está caracterizado por un lado por las entradas de aguas (dulces o marinas) impredecibles, principalmente durante invierno, seguidas por un periodo sin entradas superficiales, pero donde la circulación subterránea es muy importante (Menció et al. 2017); y por otro, por la evaporación en verano y la consecuente concentración de sales y nutrientes (Quintana et al. 2018a). Esto tiene una fuerte influencia sobre las dinámicas temporales de salinidad y nutrientes, así como en la estructura de las comunidades acuáticas. En los años 80 la zona fue objeto de un plan de urbanización, en el que se soterró parte de la marisma. Este proyecto se realizó de manera parcial y fue paralizado a finales de los 80. En los últimos años, dos proyectos de restauración se han llevado a cabo para recuperar la función ecológica de este ecosistema: Life Ter Vell – Pletera (LIFE99 NAT/E/006386), entre 1999 y 2003; y Life Pletera (LIFE13 NAT/ES/001001), entre 2014 y 2018. Para el presente estudio se seleccionaron dos lagunas (G02 y L04) que fueron restauradas en estos proyectos (Fig. 1). La laguna G02 fue restaurada en 2002, mientras que la laguna L04 fue restaurada durante el proyecto más reciente (2015). Las dos lagunas están paralelas a la costa (la G02 más próxima al mar y separada por 100 m aproximadamente) y separadas entre ellas por una mota de pocos metros, lo que hace que las aguas puedan conectarse de manera esporádica cuando el nivel de agua es alto. Ambos sistemas tienen forma alargada con una longitud cercana a 200 m y una profundidad media aproximada de 1 m. Cubriendo una gran superficie de las lagunas se desarrollan praderas de *Ruppia cirrhosa*, y las dos contienen poblaciones de la especie amenazada *Aphanius iberus*, además de la invasora *Gambusia holbrooki*. Durante los meses que abarcó este estudio (abril y julio 2019), las dos lagunas tuvieron valores de conductividad altos, especialmente en verano (G02 entre 35-49 mS/cm y L04 entre 27-44 mS/cm, respectivamente en primavera-verano). El oxígeno estuvo cercano a la saturación en L04 (99-104%) y más bajo en G02 (20-12 %); aunque en verano se pueden producir situaciones de anoxia de duración variable sobre todo en esta última laguna (Bas-Silvestre et al. 2020).





**Figura 1.** Imagen satelital del área de estudio indicando las localidades de muestreo La Pletera, Girona, España, 42.030857°N, 3.192621° E, **A)** Ubicación de Girona y **B)** lagunas G02 y L04. Inst. Geogr. Nacional, Data SIO, NOAA, U.S. Navy, NGA, GEBCO.

**Figure 1.** Satellite image of the study area indicating the sampling locations La Pletera, Girona, Spain, 42.030857 ° N, 3.192621 ° E, **A)** Girona location and **B)** G02 and L04 lagoons. Inst. Geogr. Nacional, Data SIO, NOAA, U.S. Navy, NGA, GEBCO.

### Toma de muestras, análisis de los tractos gastrointestinales y tratamiento estadístico

Las muestras de peces se colectaron en las dos lagunas restauradas en los meses de abril y julio de 2019. Se colocaron 6 redes tipo nasa (*fyke net*) en las zonas litorales y someras de cada sistema acuático, durante un periodo aproximado de 24 h. Los ejemplares de *Gambusia* retenidos en las redes se extrajeron y se fijaron con etanol al 90% para su posterior procesamiento. Una vez en el laboratorio, se separaron los adultos siguiendo los criterios morfológicos externos propuestos por [Pyke \(2005\)](#); presencia de gonopodio bien desarrollado en machos y mancha peritoneal oscura en el costado de las hembras. De cada individuo se registró el sexo, su longitud total empleando un ictiómetro ( $\pm 0.1$  mm), y peso utilizando una balanza ( $\pm 0.001$  g) con ionizador (VWR SM625iION). La disección de los peces se realizó bajo observación al estereomicroscopio Leica M205C, con cámara integrada Leica EC3, siguiendo las metodologías planteadas por [Hyslop \(1980\)](#), [Granado \(2002\)](#), y [Bennemann et al. \(2006\)](#). Se extrajo todo el tracto gastrointestinal, almacenándolo en viales de 1.5 ml de capacidad por cada individuo, y se conservaron en etanol 90%. Siguiendo la metodología planteada por [Sánchez-Hernández et al. \(2010\)](#), se realizó un lavado gástrico empleando inyección a presión de 0.5 ml de solución salina (NaCl 0.9%) y posteriormente se realizó la disección y limpieza de los restos del tracto gastrointestinal. Tanto el contenido producto del lavado gástrico como el contenido obtenido de la disección del tracto gastrointestinal, fueron montados en portaobjetos con glicerina al 10% y cubiertos con un cubreobjetos, para su observación, recuento e identificación. Previo a la disección de los ejemplares y de los tractos gastrointestinales, se estableció un protocolo de observación y de limpieza tanto de equipos de óptica, instrumentos de disección y láminas de montaje en fresco, comprobando que estaban limpios (sin fibras o fragmentos). Una vez desarrollados los lavados gástricos, se verificó bajo estereomicroscopio, que no hubiese presencia de otro tipo de elementos exógenos. Tanto el montaje con el contenido extraído, como el tracto gastrointestinal se manipularon en placas Petri de plástico limpias, que se taparon y almacenaron cuidadosamente para evitar su posible contaminación. Con la intención de evaluar posibles contaminaciones atmosféricas de plásticos en el laboratorio, realizamos una comprobación *a posteriori*. Para ello dispusimos en tres

zonas de trabajo del laboratorio dos láminas portaobjetos por zona, cada uno con dos gotas de glicerina al 10% que se mantuvieron sin cubrir durante 48 horas. Al observar los portaobjetos, transcurridas 48 horas, sólo se observaron algunas fibras muy grandes (varios cm) e incoloras, muy diferentes a las encontradas en los peces, lo que nos lleva a pensar que la contaminación atmosférica por MP no fue importante en nuestro laboratorio y no afecta sustancialmente a nuestros datos.

La clasificación y recuento del contenido gastrointestinal (incluyendo los microplásticos), se realizó con un microscopio invertido Leica DMIL Led. La diferenciación entre microplásticos y otras fibras de origen natural se realizó de manera visual, basándonos en los colores homogéneos, las formas más rectas o angulosas y sin divisiones ([Hidalgo-Ruz et al. 2012](#)). Se siguió la clasificación de microplásticos basada en su tamaño, forma, y color, propuesta por [Wagner et al. \(2014\)](#) y [Lopes et al. \(2020\)](#), así como el establecimiento de condiciones de manejo de las muestras en laboratorio ([Hidalgo-Ruz et al. 2012](#)). En relación con el tamaño, los MP se consideraron grandes (de 1 a 5 mm) y pequeños (de 20  $\mu$ m a 1 mm); y según su forma, se clasificaron en fragmentos (redondos o angulares) o fibras (con un eje longitudinal dominante, que fue medido). En cuanto al color, se dividieron en azules, rojos, verdes, marrones y otros colores.

El total de peces capturados se clasificó por categorías: sexo, laguna y época de captura, para analizar los resultados. Se calculó la prevalencia de microplásticos como el porcentaje (%) de individuos con MP (incluyendo fibras y fragmentos) en el tracto gastrointestinal, en las diferentes categorías. También se estimó el número medio de MP por individuo, utilizando para este cálculo únicamente aquellos individuos que contenían MP.

Para comparar los tamaños y pesos de los peces, así como establecer las posibles diferencias entre el número de MP ingeridos entre las distintas categorías, se realizaron análisis de Kruskal-Wallis para cada factor, ya que no se cumplió el supuesto de normalidad (Shapiro test) para realizar un test paramétrico. Para comprobar si había algún efecto del peso de los peces sobre el número de microplásticos ingeridos, se realizó un modelo lineal generalizado (glm: generalized linear model) con distribución de "Poisson". Los análisis se realizaron con el programa R ([R Core Team 2019](#)).

## Resultados

### Prevalencia de microplásticos en las poblaciones de *Gambusia holbrooki*

Para estimar la proporción de individuos que tenían MP en el tracto gastrointestinal, se analizaron los contenidos de 156 ejemplares adultos de *Gambusia holbrooki* que fueron capturados en las trampas. El total de ejemplares incluía 92 hembras (59%) y 64 machos (41%). Los datos biométricos mostraron que las hembras presentaban un mayor peso ( $0.43 \pm 0.31$  g) y longitud ( $3.42 \pm 0.63$  cm) frente a los machos ( $0.11 \pm 0.03$  g y  $2.60 \pm 0.26$  cm); encontrándose diferencias significativas tanto para el peso ( $H = 92.55$ ,  $p < 0.001$ ) como para la longitud ( $H = 73.90$ ,  $p < 0.001$ ) entre ambos sexos.

Del total de individuos estudiados, 100 correspondían a muestras tomadas en primavera (64%) y 56 en verano (36%); y 85 procedían de la laguna G02 (55%) y 71 de L04 (45%). Un 44% del total de individuos analizados presentaron MP, con porcentajes similares en los dos sexos, lagunas y épocas de muestreo (Fig. 2).

### Caracterización de los microplásticos

En la figura 3, se muestran algunos ejemplos de fibras y fragmentos de MP. En las fibras dominaba el componente lineal,

encontrándose algunas desgarradas, mientras que los fragmentos presentaron formas irregulares.

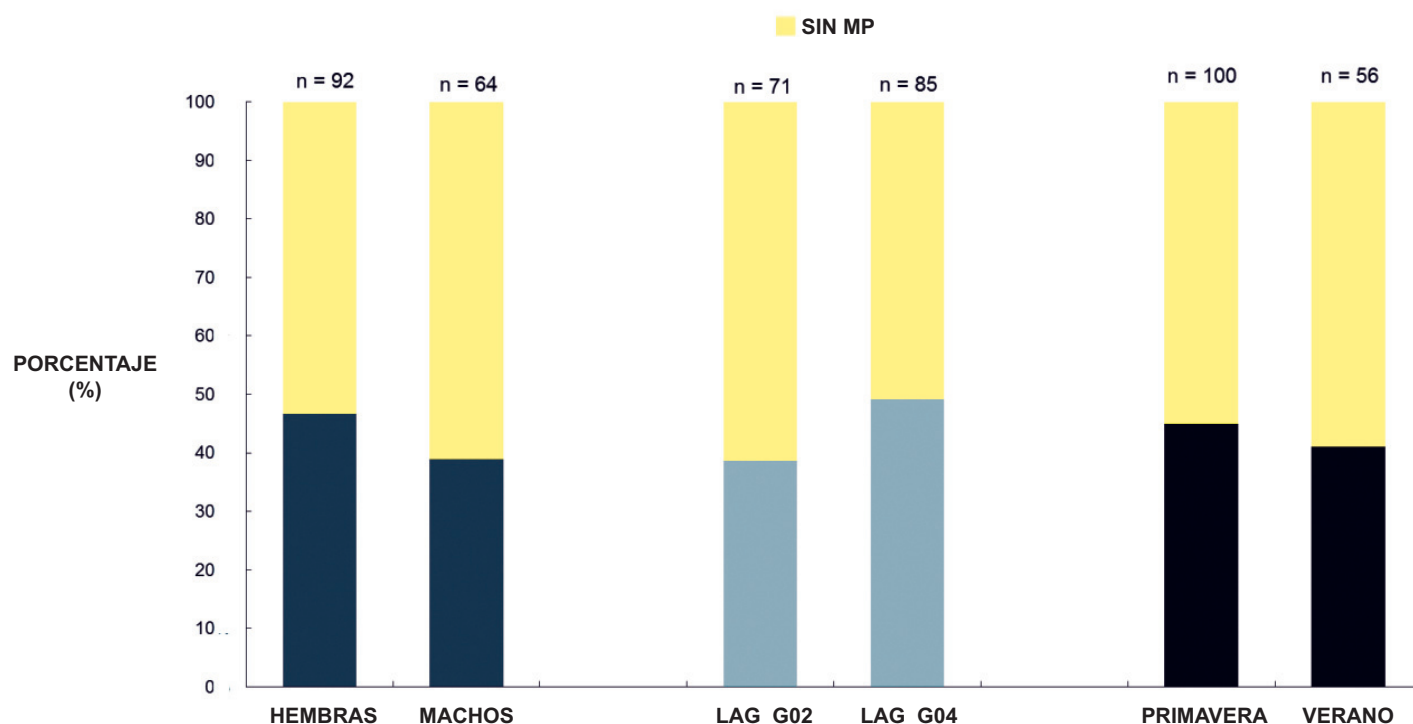
Respecto al tamaño de las fibras de MP se han dividido en rangos de tamaños (Fig. 4A). Los microplásticos más abundantes tenían entre 100 y 400  $\mu\text{m}$  (48%), mientras que los MP menores de 100  $\mu\text{m}$  y los mayores de 1 mm fueron los menos frecuentes (4 y un 11%, respectivamente). Por lo que respecta a los fragmentos de MP, el más pequeño tenía una superficie de 10 x 5  $\mu\text{m}$  y el más grande de 88 x 75  $\mu\text{m}$ .

Las fibras azules fueron las más frecuentes (Fig. 4B), con más del 60% del total de elementos, mientras que, en el caso de los fragmentos, el color más frecuente fue el marrón (36%).

### Análisis de los factores que afectan la presencia y número de microplásticos

El número medio de MP encontrados fue ligeramente superior en los machos respecto a las hembras, en las muestras de primavera respecto a las de verano, y en la laguna G02 respecto a la L04; aunque únicamente se encontraron diferencias significativas entre las lagunas ( $H = 4.55$ ,  $p < 0.05$ ; Fig. 5)

Al representar el número de microplásticos ingeridos en función del peso de los ejemplares de *Gambusia* (Fig. 6), se obtuvo una relación negativa significativa ( $p < 0.02$ ), aunque con un bajo porcentaje de varianza explicada ( $R^2 = 0.07$ ).



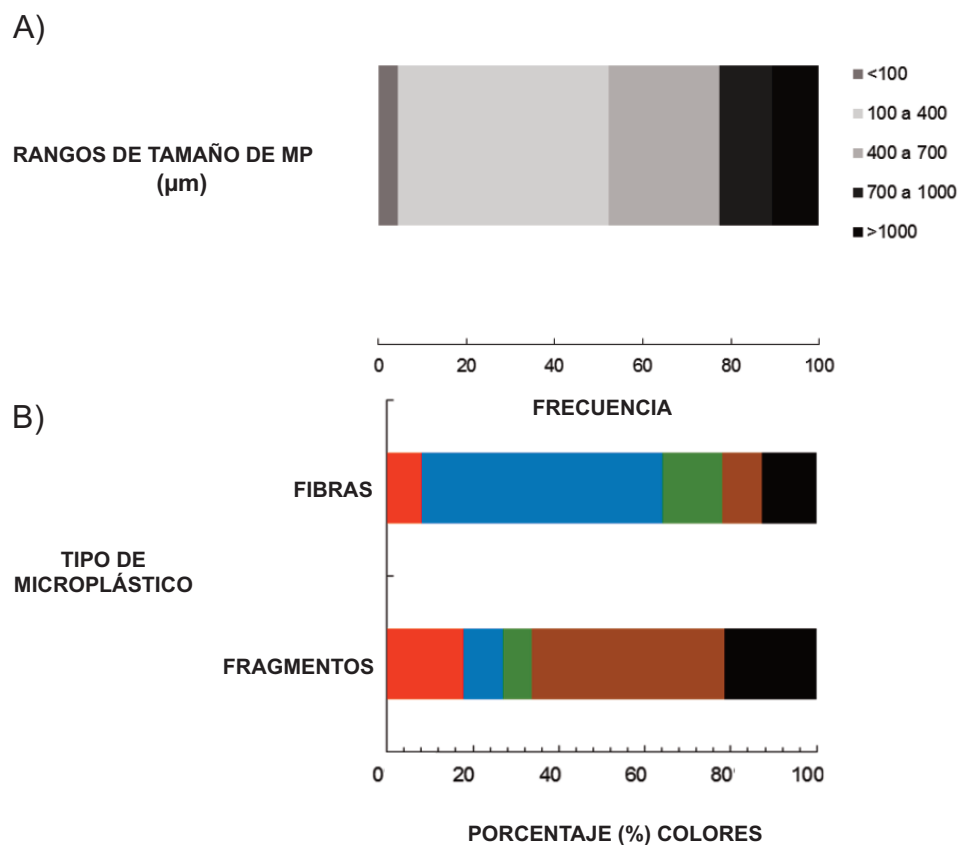
**Figura 2.** Prevalencia de los ejemplares con presencia de microplásticos (MP) en el tracto gastrointestinal diferenciados por sexo (macho/hembra), laguna (G02/L04) y estación del año (primavera/verano). El color amarillo indica ausencia de MP para cada categoría.

**Figure 2.** Prevalence of specimens with the presence of microplastics (MP) in their digestive tract differentiated by sex (male / female), lagoon (G02/L04) and season (spring / summer). Yellow color indicates absence of MP for each category.



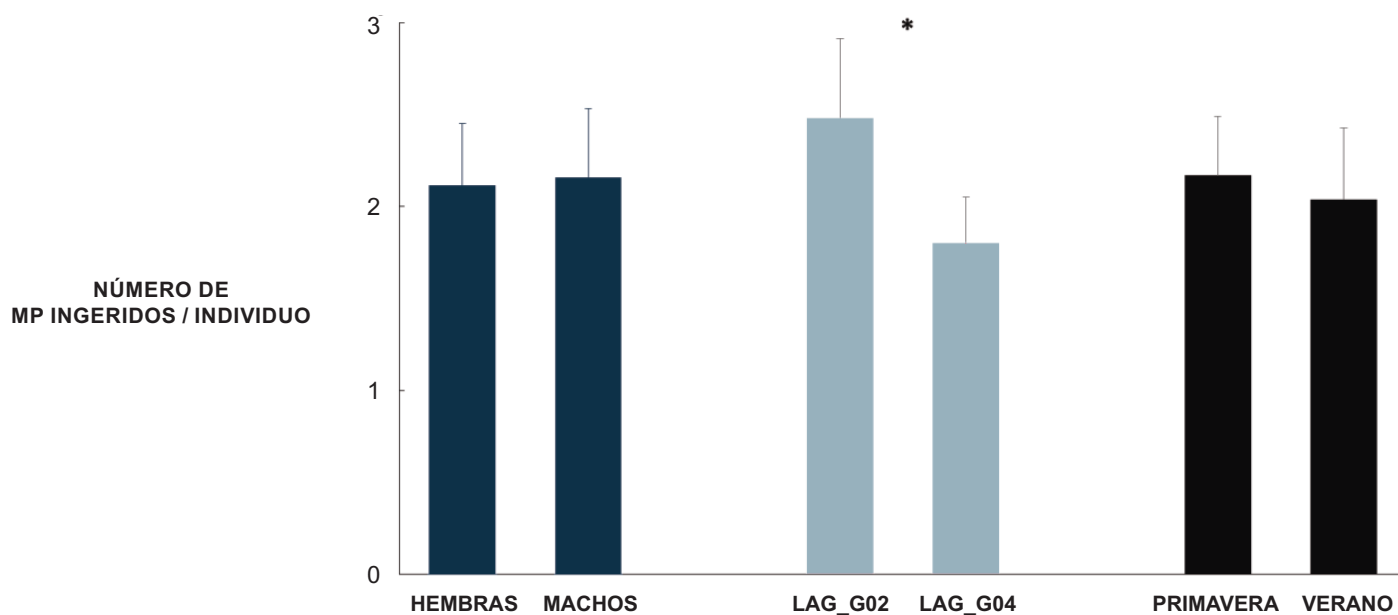
**Figura 3.** Fotografías de distintas tipologías y colores de MP; se muestran fibras en la parte superior y fragmentos en la inferior.

**Figure 3.** Pictures of different types and colors of MP; fibers are shown in the upper part and fragments in the lower part.



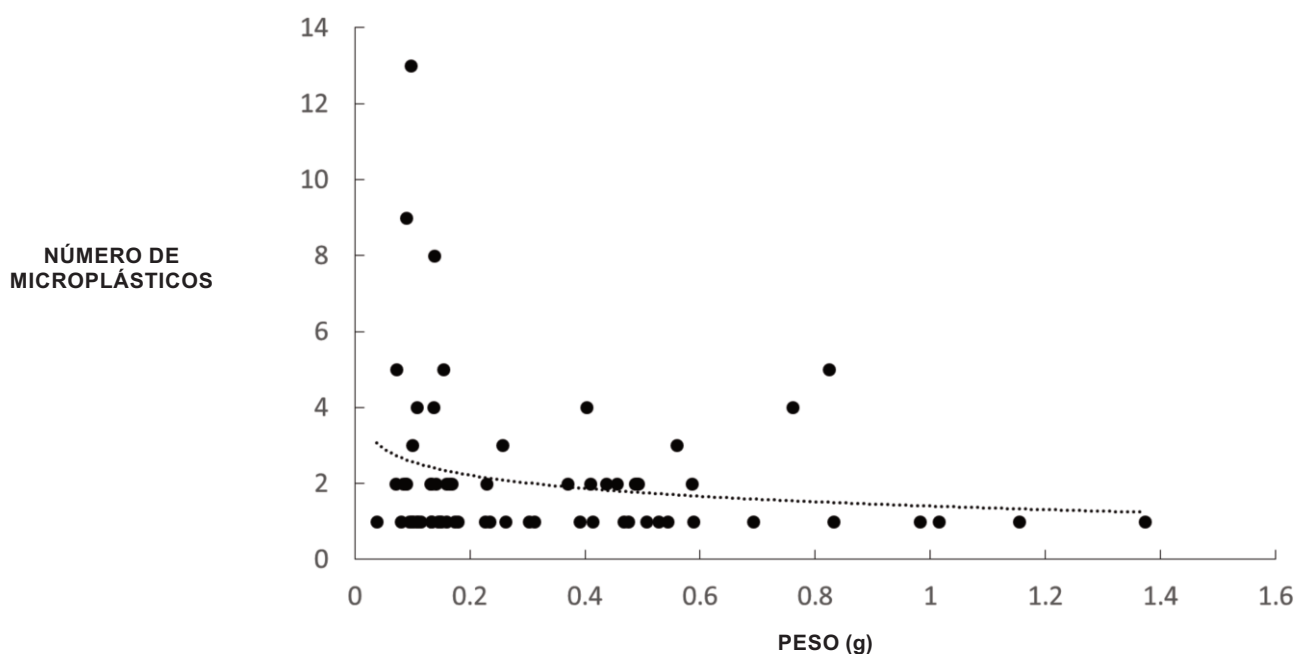
**Figura 4.** Diagrama de barras representando: **A)** la proporción de los diferentes rangos de tamaño (µm) de fibras de MP y **B)** la proporción de los distintos colores de MP encontrados tanto en las fibras como en los fragmentos.

**Figure 4.** Bar diagram representing: **A)** the proportion of the different size ranges (µm) of MP fibers and **B)** the proportion of the different MP colors found in both the fibers and the fragments.



**Figura 5.** Número medio de MP (fibras y fragmentos) ingeridos por pez, para las categorías: sexo, laguna y estación del año. Las líneas situadas sobre las barras muestran la desviación típica. El asterisco indica diferencias significativas ( $p$ -valor  $< 0.05$ ).

**Figure 5.** Average number of MP (fibers and fragments) ingested per fish, for the categories: sex, lagoon and season. The lines above the bars show the standard deviation. The asterisk indicates significant differences ( $p$ -value  $< 0.05$ ).



**Figura 6.** Representación de la cantidad de MP (fibras y fragmentos) por individuo en función de su peso. Se muestra también la línea de ajuste logarítmica.

**Figure 6.** Representation of the amount of MP (fibers and fragments) per individual as a function of their weight. The logarithmic fit line, is also shown.



## Discusión

Diversos estudios han documentado los efectos negativos que pueden tener los macroplásticos para la vida silvestre (Provencher et al. 2015; Browne et al. 2011; Gil-Delgado et al. 2017). Sin embargo, los impactos de microplásticos menores de 1mm son poco conocidos (Browne et al. 2008). Este mismo autor demostró que tras la ingestión, los MP pueden acumularse en el intestino de *Mytilus edulis*. Los MP son potenciales estresores de aquellos organismos capaces de ingerirlos, como los peces, produciendo efectos como la falta de formación de grasa (que afecta negativamente sus migraciones), el bloqueo de secreción enzimática gástrica, la disminución del estímulo de alimentación, niveles bajos de hormonas, ovulación retrasada o falla reproductiva (Azarelló y Van Vleet 1987; Derraik 2002).

En los últimos años, un creciente número de estudios se han centrado en la ingesta de microplásticos por peces y sus posibles efectos en diferentes especies. Aunque en nuestro caso hemos estudiado una única especie, *G. holbrooki*; el número de ejemplares analizados en este trabajo (156) es superior al analizado por otros estudios recientes, que normalmente estudian individuos de varias especies (e.g. Adeogun et al. 2020; Gomes et al. 2020). El rango de tamaño de los individuos estudiados es semejante al encontrado en otras poblaciones de esta especie (e.g. García-Berthou y Moreno 1992; Zulian et al. 1995); y la proporción de sexos fue de 3 hembras frente a 2 machos, con un mayor tamaño y peso en las hembras.

Un primer aspecto a tratar es evaluar el porcentaje de la población (prevalencia) que presenta MP en su tracto gastrointestinal. Existen datos que muestran que los valores de prevalencia de MP en peces presentan gran variabilidad: desde un 88% en peces de la cuenca del Amazonas en el este de Brasil (Gomes et al. 2020), 70% en peces comerciales marinos (Adeogun et al. 2020), 35% en peces planctívoros del Pacífico de California (Boerger et al. 2010), 33% en peces de estuario en Goiânia, Brasil (Possatto et al. 2011), 18% en peces del Mar Mediterráneo en Italia (Romeo et al. 2015), y 12% en la especie *Gobio gobio* en ríos de Francia (Sánchez et al. 2014). Nuestros datos varían entre 39 y 49% de prevalencia de MP, según la categoría elegida, por lo que estarían en el rango medio-alto de prevalencia en relación a los trabajos previos.

Para la caracterización de los MP, hemos identificado tipologías y tamaños similares a las propuestas en otros estudios similares (Derraik 2002; Browne 2007; Wagner et al. 2014; Lopes et al. 2020). Las formas y el pequeño tamaño de los MP encontrados nos llevan a pensar que éstos provienen principalmente de la fragmentación de productos de plástico más grandes. Debido al reducido tamaño de los peces de nuestro estudio, la mayoría de los plásticos encontrados en los tractos digestivos corresponderían a la categoría de pequeños microplásticos (20 µm a 1 mm; Wagner et al. 2014), aunque algunas de las partículas de menos de 20 µm entrarían dentro de la categoría de nanoplásticos (Thompson et al. 2009; Maocai et al. 2019), aspecto que podría abrir una nueva ventana al estudio del impacto de estos nanoplásticos en los peces. El análisis realizado en peces de mayor talla mostró que el tamaño de los MP más frecuentes fue mayor que en los pequeños (Adeogun et al. 2020), lo que sugiere que el tamaño de los MP ingeridos podría estar relacionado con el tamaño de los peces.

Por lo que respecta al color de los MP encontrados en nuestro estudio, el azul fue el más frecuente en las fibras y el marrón en los fragmentos, aunque es difícil afirmar si realmente existen preferencias por algún color o simplemente se debe a que son los colores de MP más abundantes de cada tipo, en las zonas en que los peces han comido. Ory et al. (2018) en un experimento de laboratorio realizado con juveniles de la especie *Seriola lalandi*, pez marino planctívoro, halló que los MP blancos, azules, traslúcidos y amarillos eran frecuentemente consumidos cuando la ingesta se realizaba junto con un suplemento alimenticio. También observó que el color negro era el más seleccionado sobre los otros colores. Este autor explica que estas preferencias por colores pueden deberse a que, si estamos en un sistema acuático de aguas claras, la visibilidad de una partícula por parte del individuo dependerá

principalmente del contraste con el entorno. Otra explicación sería que seleccionasen aquellos plásticos que se asemejasen más al alimento suministrado. Estos resultados apoyan la suposición de que los peces planctívoros, que detectan sus presas con la vista, pueden capturar microplásticos accidentalmente, debido al parecido con sus presas. Derraik (2002) corrobora que distintos grupos de vertebrados de alimentación acuática (incluyendo aves, peces y tortugas) seleccionan plásticos específicamente en base a sus formas colores y tamaños confundiendo con presas.

En relación con la cantidad de MP ingerida, en los experimentos de Ory et al. (2018) reportaron que los peces llegaron a ingerir un promedio de hasta 6.8 MP por pez. En el caso de peces del Amazonas (Gomes et al. 2020), las cantidades medias ingeridas (entre 1.4 y 4.8 MP por individuo) fueron similares a las estimadas en nuestros peces (entre 1.8 y 2.5). Al comparar la cantidad de MP promedio en las diferentes categorías en que hemos clasificado nuestros individuos, solo se encontraron diferencias significativas al comparar las dos lagunas. Aunque son semejantes y están muy próximas; la cubeta de ambas lagunas fue re-excavada como parte de la restauración ambiental (Quintana et al. 2018a), con lo que podría existir alguna relación entre la "edad" de las lagunas y la presencia de MP, ya que los peces de la laguna restaurada antes (más antigua), fueron los que mayor cantidad de MP tuvieron. Sin embargo, otros factores que afectasen de manera diferencial a la distribución de las poblaciones de peces y de sus áreas de alimentación en las dos lagunas (zonas anóxicas, macrófitos, etc.) también podrían explicar estas pequeñas diferencias observadas.

Algunos estudios sugieren la importancia que puede tener para los peces el hecho de que los plásticos puedan acumularse en el tracto gastrointestinal (Derraik 2002; Browne 2008). Al relacionar en nuestro estudio el peso de los peces y la cantidad de MP, hemos encontrado una débil relación negativa, entre el peso y la cantidad de MP. Este dato sugiere que, en contra de lo que parecía más intuitivo, los peces más grandes tienen menor cantidad de MP. Sin embargo, factores como la estructura de talas, factor de condición (Arias et al. 2019), ecología trófica y sexo de los peces; u otros relacionados con las características ambientales de la laguna, distribución y cantidad de MP, podrían influir en esta relación. Posteriores estudios incluyendo estos y otros aspectos podrían ayudar a esclarecer esta idea.

## Conclusión

Dentro de la amplia gama de ítem alimenticios que *Gambusia holbrooki*, ingiere como parte de su dieta, los ítems más frecuentemente encontrados son artrópodos, crustáceos, moluscos larvas y pupas de invertebrados acuáticos, algas y otro tipo de material vegetal. Dados los resultados obtenidos, destacamos que es relevante la presencia de microplásticos como parte de esta composición dietaria, empezando a delinear un problema en relación con el impacto de los microplásticos en la biota de sistemas acuáticos restaurados.

Este trabajo pone de manifiesto la abundancia de MP en los sistemas costeros y la facilidad con que estos pueden incorporarse a las redes tróficas acuáticas. Se ha encontrado una prevalencia relevante de MP en tractos intestinales de la especie invasora *Gambusia holbrooki*, de diferentes tipos, tamaños y formas. Futuros estudios deben analizar los posibles efectos que la incorporación de MP puede tener sobre las comunidades acuáticas, especialmente en especies autóctonas que se encuentren en estatus de conservación vulnerable. Dadas sus características, status y abundancia pensamos que *G. holbrooki* puede ser un excelente modelo con el que realizar investigaciones de este tipo.

## Agradecimientos

El presente trabajo fue desarrollado con el apoyo logístico, técnico, financiero y científico de los Grupos de Investigación: GRECO e Instituto de Ecología Acuática de la Universitat de Girona, y del grupo de investigación en Biogeografía de sistemas acuáticos, del

Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva de la Universidad de Valencia. Este estudio se ha financiado gracias a los proyectos METACOM-SET (CGL2016-78260-P), del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad y del proyecto EXOCRUST (AICO/2020/182) de la Generalitat Valenciana. Agradecemos también a la Editora G. Lacerot y a dos revisores anónimos que contribuyeron con sus apreciaciones a mejorar el presente artículo

## Referencias

- Adeogun, A., Ibor, O., Khan, E., Chukwuka, A., Omogbemi, E., Arukwe, A. 2020. Detection and occurrence of microplastics in the stomach of commercial fish species from a municipal water supply lake in southwestern Nigeria. *Environmental Science and Pollution Research* 27:31035-31045.
- Alcaraz, C., García-Berthou, E. 2007. Food of an endangered cyprinodont (*Aphanius iberus*): ontogenetic diet shift and prey electivity. *Environmental Biology of fishes*. 78:193-207.
- Almut, G., Schaefer, M., Blum T., Honnen, W. 2020. Toxicidad de partículas microplásticas con y sin tributilestano adsorbido (TBT) en *Gammarus fossarum* (Koch, 1835). *Limnología Fundamental y aplicada* 194(1):57-65.
- Arias, A.H., Ronda, A.C., Oliva, A.L., Marcovecchio, J.E. 2019. Evidence of microplastic ingestion by fish from the bahía Blanca estuary in Argentina South America. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 102 (6): 750-756
- Armengol, X., Antón-Pardo, M., Ortells, R., Olmo, C. 2018. Las malladas de La Devesa de El Saler: la recuperación de un conjunto de lagunas interdunares costeras en el Parque Natural de l'Albufera. En: Quintana, X., Boix, D., Gascón, S., Sala, J. (eds.). *Gestión y restauración de lagunas costeras mediterráneas en Europa*, pp. 194-220. Catedra D'ecosistemes Litorals Mediterranis. Reserca i Territori 10. Girona, España.
- Au, S.Y., Lee, C.M., Weinstein, J.E., Van den Hurk, P., Klaine, S.J. 2017. Trophic transfer of microplastics in aquatic ecosystems: Identifying critical research needs. *Integrated Environmental Assessment and Management* 13(3): 505-509.
- Auta, H.S., Emenike, C.U., Fauziah, S.H. 2017. Distribución e importancia de los microplásticos en el medio marino Una revisión de las fuentes, el destino, los efectos y las posibles soluciones. *Environment International* 102: 165-176.
- Azzarello, M.Y., Van-Vleet, E.S. 1987. Marine birds and plastic pollution. *Marine Ecology Progress Series* 37: 295-303.
- Bas-Silvestre, M., Quintana, X.D., Compte, J., Gascón, S., Antón-Pardo, M., Obrador, B. 2020. Ecosystem metabolism dynamics and environmental drivers in Mediterranean confined coastal lagoons. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 245(106989).
- Bennemann, S., Casatti, L., De Oliveira D. 2006. Alimentação de peixes: proposta para análise de itens registrados em conteúdos gástricos. *Biota Neotropica* 6 (2).
- 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* 60:2275-2278.
- Boyer, L., López-Rojo, N., Bosch, J., Alonso, A., Correa-Araneda, F., Pérez, J. 2020. Microplastics impair amphibian survival, body condition and function. *Chemosphere* 244(125500).
- Browne, M.A., Galloway, T., Thompson, R. 2007. Microplastic – An emerging contaminant of potential concern? *Integrated Environmental Assessment and Management* 3(4): 559-566.
- Browne, M.A., Dissanayake, A., Galloway, T., Lowe, D.M., Thompson, R. 2008. Ingested Microscopic plastic translocates to the circulatory system of the Mussel, *Mytilus edulis* (L). *Environmental Science Technology* 42(13): 5026-5031.
- Browne, M.A., Crump, P., Niven, S.J., Teuten, E.L., Tonkin, A., Galloway, T., Thompson, R.C. 2011. Accumulations of microplastic on shorelines worldwide: sources and sinks. *Environmental Science and Technology* 45(21): 9175-9179.
- Cano-Rocabayera, O., Vargas-Amengual, S., Aranda, C., de Sostoa, A., Maceda-Veiga, A. 2020. Mosquito larvae consumption in turbid waters: the role of the type of turbidity and the larval stage in native and invasive fish. *Hydrobiologia* 847: 1371-1381.
- Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Montone, R.C. 2010. Polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in plastics ingested by seabirds. *Marine Pollution Bulletin* 60: 630-634.
- Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., Galloway, T.S. 2011. Microplastics as contaminants in the marine environment: A review. *Marine Pollution Bulletin* 62: 2588-2597.
- Collard, F., Gasperi, J., Gabrielsen, G., Tassin, B. 2019. Plastic particle ingestion by wild freshwater fish: A critical Review. *Environmental Science Technology* 53(22): 12974-12988.
- Comín, F.A. 2018. Introducción: un enfoque integrador para la restauración de las lagunas costeras del mediterráneo. En: Quintana, X., Boix, D., Gascón, S., Sala, J. (eds.). *Gestión y restauración de lagunas costeras mediterráneas en Europa*, pp. 10-21. Catedra D'ecosistemes Litorals Mediterranis. Reserca i Territori 10. Girona España.
- Costello, M.J. 1990. Predator feeding strategy and prey importance: a new graphical analysis. *Journal of Fish Biology* 36:261-263.
- Da Costa Araújo A.P., Malafaia, G. 2020. Ingestion of microplastics induces behavioral disorders in mice: a preliminary study on the effects of trophic transfer through tadpoles and fish. *Diario de materiales peligrosos* 401(123263).
- Derraik, J.G. 2002. The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. *Marine Pollution Bulletin* 44: 842- 852.
- Desforges, J.P., Galbraith, M., Dangerfield, N., Ross, P.S. 2014. Widespread distribution of microplastics in subsurface seawater in the NE Pacific Ocean. *Marine Pollution Bulletin* 79: 94- 99
- Doadrio, I., Perea, S., Garzón-Heydt, P., González, J.L. 2011. *Ictiofauna Continental Española*. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, Madrid, España.
- García-Berthou, E., Moreno-Amich, R. 1992. Age and growth of an Iberian cyprinodont, *Aphanius iberus* (Cuv. & Val.), in its most northerly population. *Journal of Fish Biology* 40: 929-937.
- Gil-Delgado, J.A., Guijarro, D., Gosálvez, R.U., López-Iborra, G.M., Ponz, A., Velasco, A. 2017. Presence of plastic particles in waterbirds faeces collected in Spanish Lakes. *Environmental pollution* 220: 732- 736.
- Gomes, D., Raiol, N., Picanço, A., Silva, D., Serrão, V., Schlemmer, L., Fogaça de Assis, L. 2020. Contamination of stream fish by plastic waste in the Brazilian Amazon. *Environmental Pollution* 266: 115241.
- Granado Lorenzo, C. 2002. *Ecología de Peces*. Capítulo 9 Alimentación. Universidad de Sevilla. Sevilla, España. 353 pp.
- Granek, E.F., Brander, S.M., Hollands, E.B. 2020. Microplastics in aquatic organisms: Improving understanding and identifying research directions for the next decade. *Limnology and Oceanography Letters* (5): 1- 4.
- Hidalgo-Ruz, V., Gutow, L., Thompson, R., Thiel, M. 2012. Microplastics in the Marine Environment: A Review of the Methods Used for Identification and Quantification. *Environmental Science and Technology* 46, 3060-3075.
- Hyslop, E. 1980. Stomach contents analysis a review of methods and their application. *Journal of Fish Biology* 17: 411-429.
- Imhof, H.K., Ivleva, N.P., Schmid, J., Niessner, R., Laforsch, C. 2013. Contamination of beach sediments of a subalpine lake with microplastic particles. *Current Biology* 23: R867-R868.
- Lavers, J.L., Bond, A.L., Hutton, I. 2014. Plastic ingestion by flesh-footed shearwaters (*Puffinus carneipes*): implications for fledgling body condition and the accumulation of plastic-derived chemicals. *Environmental Pollution* 187: 124-129.
- Lechthaler, S., Dolny, R., Spelthahn, V., Pinnekamp, J., Linnemann, V. 2020. Sampling concept for microplastics in combined sewage-affected freshwater and freshwater sediments. *Fundamental Applied Limnology* 194(1): 37-48
- Lopes, C., Raimundo, J., Caetano, M., Garrido, S. 2020. Microplastic ingestion and diet composition of planktivorous fish. *Limnology and Oceanography Letters* 5: 103-112.
- Maocai, S., Yaxin, Z., Yuan, Z., Biao, S., Guangming, Z., Duofei, H., et al, 2019. Recent advances in toxicological research of nanoplastics in the environment: A review, *Environmental Pollution* 252, A( 511-521).
- Menció, A., Casamitjana, X., Mas-Pla, J., Coll, N., Compte, J., Martinoy, M., Pascual, J., Quintana, X.D. 2017. Groundwater dependence of coastal lagoons: the case of La Pleta salt marshes (NE Catalonia). *Journal of Hydrology* 552: 793-806.
- Mochamad, R.I., Wahyudin, L.M., Prihadi, D.J. 2019. Microplastics Ingestion by Fish in The Pangandaran Bay, Indonesia. *World News of Natural Sciences* 23: 173-181.
- Oliveira, C., Corrêa, C., Smith, W. 2020. Food ecology and presence of microplastic in the stomach content of neotropical fish in an urban river of the upper Paraná River Basin. *Revista ambiente & água* 15 (4) 2551.



- Ory, N.C., Gallardo, C., Lenz, M., Thiel, M. 2018. Capture, swallowing, and egestion of microplastics by a planktivorous juvenile fish. *Environmental Pollution* 240: 566–573.
- Pengfei, W., Yuanyuan, T., Miao, D., Siqing, W., Hangbiao, J., Yunsong, L., et al. 2020. Spatial-temporal distribution of microplastics in surface water and sediments of Maozhou River within Guangdong-Hong Kong-Macao Greater Bay Area. *Science of the total environment* 717: 135187.
- Possatto, F.E., Barletta, M., Costa, M.F., do Sul, J.A.I., Dantas, D.V. 2011. Plastic debris ingestion by marine catfish: an unexpected fisheries impact. *Marine Pollution Bulletin* 62:1098–1102.
- Provencher, J.F., Bond, A.L., Mallory, M.L. 2015. Marine birds and plastic debris in Canada: a national synthesis and a way for forward. *Environmental Review* 23: 1-13.
- Pyke, G. 2005. A review of the biology of *Gambusia affinis* and *G. holbrooki*. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 15: 339–365.
- Quintana, X.D., Boix, D., Casamitjana, X., Colomer, A., Compte, J., Cunillera-Montcusí, D., et al. 2018a. Acciones de gestión y restauración de las lagunas costeras confinadas mediterráneas en los humedales del Empordà y del Baix Ter. En: Quintana, X., Boix, D., Gascón, S., Sala, J. (eds.). *Gestión y restauración de lagunas costeras mediterráneas en Europa*, pp. 173-192. Catedra D'ecosistemes Litorals Mediterranis. Reserca i Territori 10. Girona España.
- Quintana, X., Boix, D., Gascón, S., Sala, J. 2018b. *Gestión y restauración de lagunas costeras mediterráneas en Europa*. Catedra D'ecosistemes Litorals Mediterranis. Reserca i Territori 10. Girona España. 220 pp.
- R Core Team 2019. R: A language and environment for statistical computing. [Software] R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponible en: <https://www.R-project.org/>
- Rillig, M.C. 2012. Microplastic in terrestrial ecosystems and the soil? *Environmental Science and Technology* 46: 6453–6454.
- Rincón, P. 2002. Interaction between the introduced eastern mosquitofish and two autochthonous Spanish toothcarps. *Journal of Fish Biology* 61:1560-1585.
- Roch, S., Friederich, C., Brinker, A. 2020. Uptake routes of microplastics in fishes: practical and theoretical approaches to test existing theories. *Nature research. Scientific reports*. 10:3896.
- Romeo, T., Battaglia, P., Peda, C., Consoli, P., Andaloro, F., Fossi, M.C. 2015. First evidence of presence of plastic debris in stomach of large pelagic fish in the Mediterranean Sea. *Marine Pollution Bulletin* 95:358–361.
- Rosenkranz, P., Chaudry, Q., Stone, V., Fernandes, T.F. 2009. A comparison of nanoparticle and fine particle uptake by *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28 (10): 2142-2149.
- Ruiz-Navarro, A., Moreno-Valcárcel, M., Torralva, M., Oliva-Paterna, F.J. 2011. Life-history traits of the invasive fish *Gambusia holbrooki* in saline streams (SE Iberian Peninsula): Does: salinity limit its invasive success? *Aquatic Biology* 13:149-161.
- Sánchez, W., Bender, C., Porcher, J.M. 2014. Wild gudgeons (*Gobio gobio*) from French rivers are contaminated by microplastics: Preliminary study and first evidence. *Environmental Research* 128:98-100.
- Sánchez-Hernández, J., Servia, M.J., Vieira-Lanero, R., Cobo, F. 2010. Evaluación del lavado gástrico como herramienta para el análisis de la dieta en trucha común. *Limnética* 29 (2) 369- 378.
- ShaoLin, X., Aiguo, Z., Yongyong, F., Yue, Z., Junyi, L., Zhuolin, S., Lanfen, F., Jixing, Z. 2020. Cytochrome P450 1A mRNA in the *Gambusia affinis* and Response to Several PAHs. *Biochemical Genetics* 58: 551-565.
- Shawn, D.G., Day, R.H. 1994. Colour – and form – dependent loss of plastic micro-debris from the North Pacific Ocean. *Marine Pollution Bulletin* 28: 39-43.
- Stock, F., Kochleus, C., Spira, D., Brennholt, N., Bänsch-Baltruschat, B., Demuth, S., Reifferscheid, G. 2020. Plastic in aquatic environments – Results of an international survey. *Fundamental and applied limnology* 194(1): 67- 76.
- Teuten, E.L., Saquing, J.M., Knappe, D.R.U., Barlaz, M.A., Jonsson, S., Bjorn, A., et al. 2009. Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. *Philosophical Transactions Royal Society. B Biological Sciences* 364: 2027–2045.
- Thompson, R., Olsen, Y., Mitchell, R.P., Davis, A., Rowland, S.J., John, A.W.G., McGonigle, D., Russell, A.E. 2004. Lost at sea: Where is all the plastic? *Science* 304, 838.
- Thompson, R.C., Swan, S.H., Moore, C.J., Vom Saal, F.S. 2009. Our plastic age. *Philosophical Transactions Royal Society, B: Biological Sciences* 364: 1973–1976.
- UNEP 2011. UNEP Year book. Emerging issues in our global environment. United Nations Environment Programme, Nairobi, Kenya. Disponible en: <http://hdl.handle.net/20.500.11822/8276>
- Van Cauwenberghe, L., Devriese, L., Galgani, F., Robbins, J., Janssen, C.R. 2015. Microplastics in sediments: A review of techniques, occurrence and effects. *Marine Environmental Research* 111: 5-17.
- Van Cauwenberghe, L., Vanreusel, A., Mees, J., Janssen, C.R., 2013. Microplastic pollution in deep-sea sediments. *Environmental Pollution* 182, 495-499.
- Wagner, M., Scherer, C., Alvarez-Muñoz, D., Brennholt, N., Bourrain, X., Buchinger, S., et al. 2014. Microplastics in freshwater ecosystems: what we know and what we need to know. *Environmental Sciences Europe* 26:12.
- Wang, W., Ge, J., Yu, X. 2020. Bioavailability and toxicity of microplastics to fish species: A review. *Ecotoxicology Environmental Safety* 189:109913.
- Wendt-Potthoff, K., Gabel, F. 2020. Plastic in freshwater ecosystems. *Fundamental Applied Limnology* 194(1): 33-35.
- Zulian, E., Bisazza, A., Marin, G. 1995. Variations in male body size in natural populations of *Gambusia holbrooki*. *Ethology Ecology and Evolution* 7: 1-10.