

Evaluación preliminar de micro y nanoplásticos en moluscos y peces consumidos en Euskadi y riesgos asociados para la salud humana

Miren P. Cajaraville

“Cell Biology in Environmental Toxicology CBET+” consolidated research group

“Environmental Contamination and Toxicology” PhD program

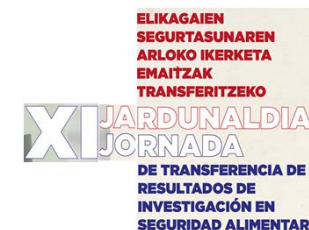
Zoology and Animal Cell Biology Department

Faculty of Science and Technology, and Plentzia Marine Station,

University of the Basque Country (UPV/EHU)

<http://www.ehu.es/cellbiologyinenvironmental toxicology>

ÍNDICE

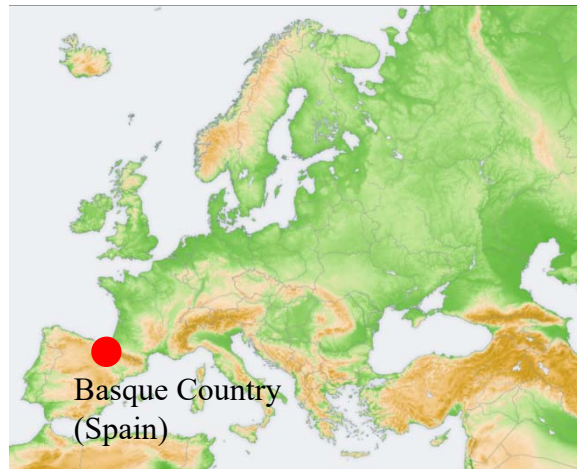


- 1. Presentación del grupo**
- 2. Introducción**
- 3. Objetivos del proyecto**
- 4. Materiales y métodos**
- 5. Resultados relevantes para reducir riesgos en la cadena agroalimentaria vasca**
- 6. Conclusiones**
- 7. Agentes colaboradores de la cadena agroalimentaria vasca y aplicabilidad en su sector**
- 8. Actividades de difusión y transferencia realizadas**

Presentación del grupo

Grupo Biología Celular en Toxicología Ambiental CBET+

Reconocido como grupo consolidado tipo A desde 2001



Facultad de Ciencia y Tecnología, Campus de Leioa,
UPV/EHU



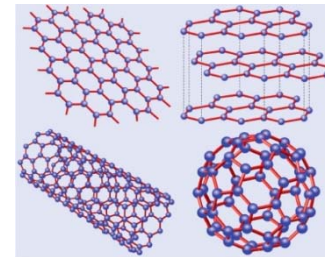
Centro de Investigación en Biología marina
y Biotecnología Experimentales
Estación Marina de Plentzia,
PiE-UPV/EHU (2012)

Principales áreas de investigación:

1. Toxicología de nanomateriales, micro y nanoplásticos y otros contaminantes emergentes (disruptores endocrinos)

2. Reproducción y diferenciación sexual en organismos acuáticos en el contexto del cambio ambiental global

3. Evaluación integrada de la salud de los ecosistemas acuáticos y terrestres y de la salud humana en relación con la contaminación



Principal experiencia:

-Desarrollo y aplicación de **biomarcadores celulares y moleculares** tempranos de la exposición y efectos de la contaminación, para entender los **mecanismos de toxicidad** de los contaminantes químicos.

Adverse Outcome Pathways

-Desarrollo y aplicación de **ensayos de toxicidad**

Evaluación de riesgo ambiental y humano



Principales proyectos sobre micro y nanoplásticos



PLASFITO
 “Fate and effect of the microplastics, nanoplastics and additives coming from the degradation of fishing gears during their life cycle. Study in the Bay of Biscay”
 (Euskampus Missions 1.0)
 2022-2024.



@fieraproject



FIERA
 “Fate and Impact of Environmentally ReAlistic nanoplastics and of novel bioplastics in the aquatic environment”
 (Spanish Ministry MCIU)
 2022-2025.



AquEus

“Towards a joint Aquitania-Euskadi research and higher education alliance to tackle potential risks posed by environmental and bio-based microplastics and nanoplastics in the Gulf of Biscay”
 2024-2027



CAS6
 “Towards a technological platform for nanoplastics detection”
 (EC JRC, CAS Project 30602)
 2021-2023.

ENSURE² Project

“ENvironmental Safety of polyUrethanes from REnewable sources and from REcycled plastics: hazard assessment based on a battery of alternative methods”
 (Spanish Ministry MCIU)
 2022-2024.



MIKRONANOPLAS
 “Microplásticos en moluscos y peces del País Vasco de interés para el consumo humano”
 (Gobierno Vasco, ELIKA)
 2022-2023.

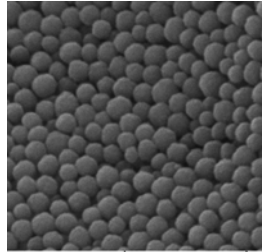
Introducción

Contaminación por micro y nanoplasticos (MNP)



Microplásticos
1 μ m – 1 mm

(Hartmann et al., 2019)



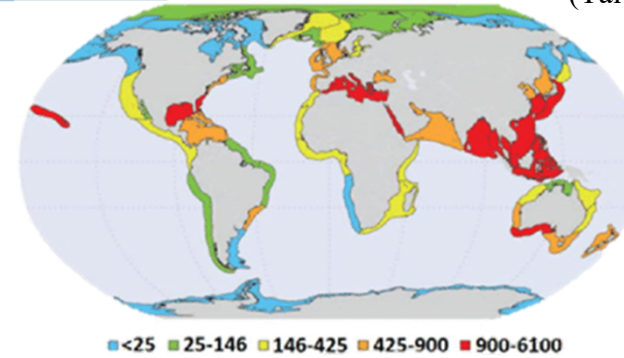
SEM HV: 15.00 kV
WD: 7.976 mm
Date(m/d/y): 11/01/11
Performance

Nanoplasticos
< 1 μ m

Amplia distribución

Macroplastics (grams / km²)

(Talvitie, 2018)



BoB: zona de acumulación de plásticos

Micro/nanoplasticos 1,802,461 items/km² (Ruiz et al., 2022)

Clasificación

Primarios

Secundarios

Redes de pesca

2963 km² perdidos/año
(Richardson et al., 2022)

Aditivos

DBP

Dibutil ftalato

BPA

Bisfenol A

DEHP

Di(2-Etilhexil)ftalato



Presencia de MNPs en mariscos y peces



Sin estandarizar
ni armonizar

Técnicas de análisis

LD-IR

Laser Direct
Infrared

FT-IR

Fourier-transform
infrared spectroscopy

RAMAN

Pyr-GC/MS

Pyrolysis-Gas Chromatography/
Mass Spectrometry

TD-GC/MS

Thermal Desorption-Gas
Chromatography/ Mass Spectrometry

Identificación
de polímeros +
aditivos

Rutas de exposición
en humanos

Efectos de los MNPs sobre la salud humana

Inhalación

Absorción a
través de la piel

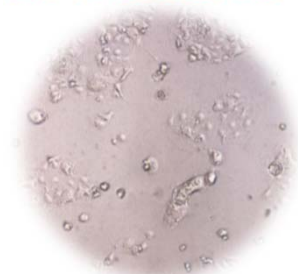
Ingestión

TRACTO GASTROINTESTINAL

Citotoxicidad

Daño a la función de barrera
Inflamación intestinal
Interacción con el microbioma

(Wen et al., 2022)



Caco-2
línea celular de
adenocarcinoma
colorectal
humano

Objetivos del proyecto

General

Determinar la presencia de microplásticos en especies seleccionadas de moluscos y peces del País Vasco de interés para el consumo humano y realizar una primera evaluación del riesgo potencial para la salud humana.

Específicos

1

Analizar la **presencia** de microplásticos en moluscos y peces consumidos en el País Vasco y su **composición** en **polímeros y aditivos seleccionados**

2

Realizar una **evaluación de la exposición** de los consumidores vascos a microplásticos a través del consumo de moluscos y peces contaminados, según los resultados obtenidos en el objetivo 1

3

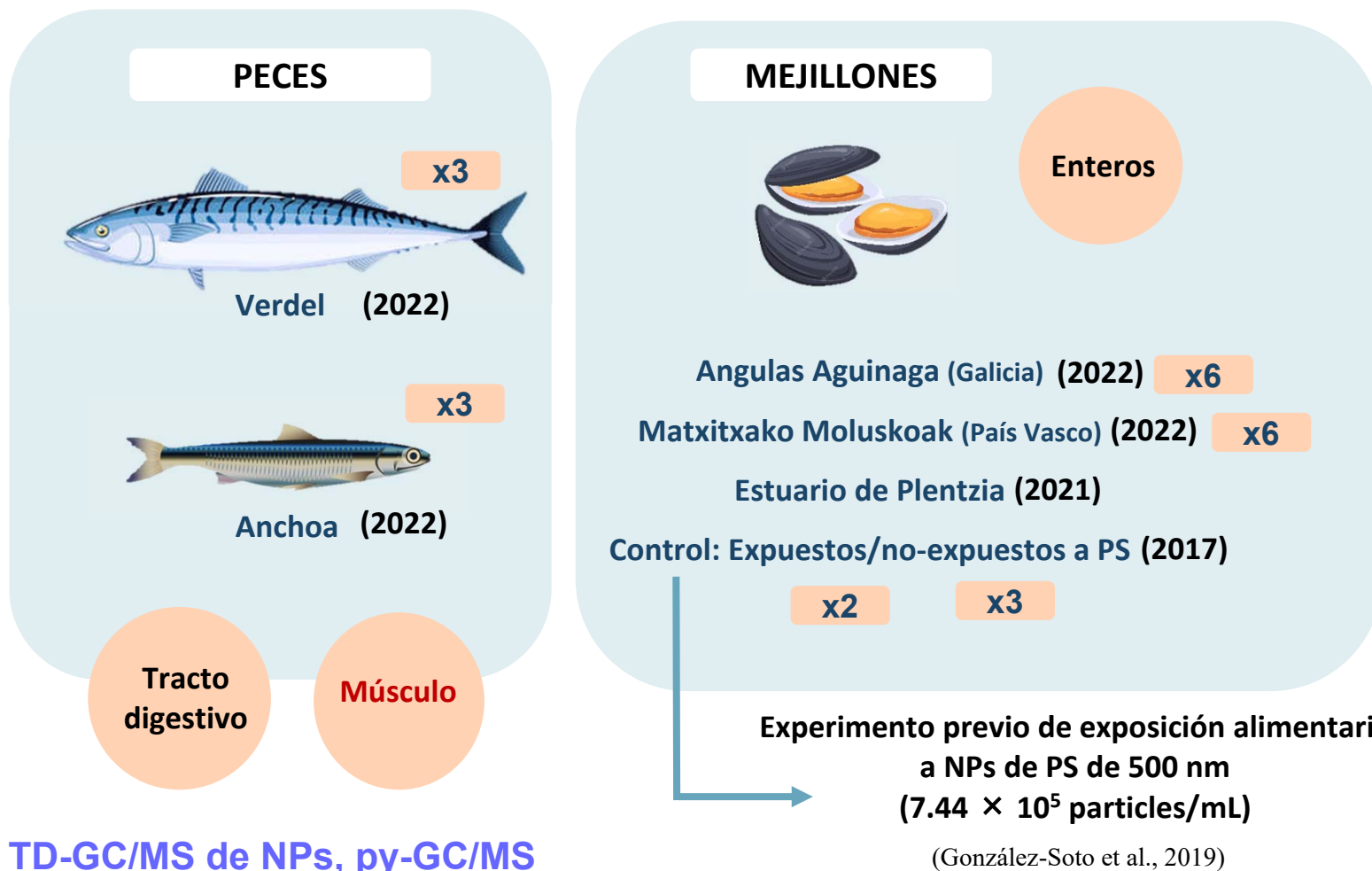
Realizar una **evaluación del peligro** del consumo de alimentos contaminados por microplásticos para la salud humana, en base a ensayos de toxicidad *in vitro* en una línea celular humana relevante (células intestinales)

El análisis de **microplásticos** se ha ampliado también a los **nanoplásticos** (<1 μm), analizando muestras extraídas y filtradas a través de filtros con un tamaño de poro de 0.4 μm .

Objetivo 1: Materiales y métodos

Identificación de polímeros y aditivos

1er SET: análisis visual y FT-IR de MPs; TD-GC/MS de NPs



2º SET: TD-GC/MS de NPs, py-GC/MS



Matxitxako Moluskoak (País Vasco) (2022) x3

Identificación de polímeros y aditivos

1er y 2º SET: TD-GC/MS



TD-GC/MS

1. Extraction: KOH-NaClO digestion
2. Filtration: 0.4 µm pore size
3. Clean up
4. Quantification: TD-GC/MS



2º SET: Py-GC/MS

8 Polymers:
 Polypropylene (PP), Polystyrene (PS), Polyvinyl chloride (PVC), Polyethylene terephthalate (PET), Polyethylene (PE), Nylon 6 (PA6), Polyurethane (PU), Polyacrylonitrile (PACN)

3 Chemical additives:
 Bisphenol-A (BPA), di-n-butyl phthalate (DBP), di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)

Limits of detection of plastic polymers and additives (µg/g dry weight).

Polymer								Plastic additives		
PP	PS	PVC	PET	PE	PA6	PU	PACN	BPA	DBP	DEHP
30	30	10	30	200	10	10	10	0,01	0,01	0,01

13 Polymers



Objetivo 2: Materiales y métodos

Evaluación de la exposición en los consumidores vascos

Ingesta diaria estimada
Estimated Daily Intakes (EDIs):

$$EDI = C (\mu\text{g polímero o aditivo plástico/g}) \times IR (\text{g/día})$$

(Rubio-Armendáriz et al., 2022)

C = Suma de las concentraciones de todos los polímeros o aditivos ($\mu\text{g polímero o aditivo/g}$) para cada especie, para la media de marisco o pescado, o para todos los mariscos+pescados

IR = Tasa de ingestión = gramos por día consumidos para cada tipo de marisco o pescado o para todos los mariscos+pescados

IR: Tasas de ingestión para cada especie y para el total, para la población vasca en 2021

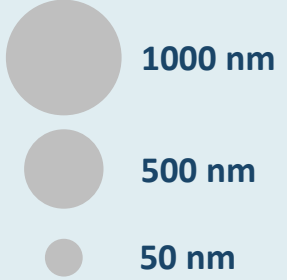
	Consumo per capita por día	
Total marisco+pescado	78.90 g	MAPA, 2021
Verdel	0.68 g	
Anchoa	1.10 g	
Mejillón	3.70 g	

- Las concentraciones de polímeros/aditivos se estimaron a partir de las concentraciones medias en mejillón, verdel y anchoa
- Teniendo en cuenta que el tracto digestivo (TD) suele contener las concentraciones más altas de MNPs en peces, se corrigieron las concentraciones de polímeros o aditivos medidos en TD con un factor de 10% peso del TD con respecto al peso total de verdes o anchoas

Objetivo 3: Materiales y métodos

Evaluación de la toxicidad de MNPs sobre la línea celular Caco-2

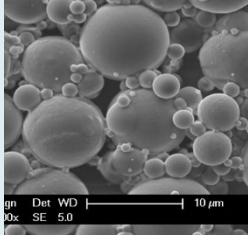
PS



1000 nm
500 nm
50 nm

Polysciences Inc.

PE



200-9900 nm

Cospheric LLC.

Lixiviados de redes de pesca que contienen MNPS

PA 6: Poliamida 6
PBS: Polibutileno succinato
50% bio-basado



T0: No envejecido
T60: envejecido artificialmente 60 días

PLASFITO Project
(Dusacre et al., 2023)

Dynamic light scattering (DLS)



Concentraciones de medida:
PS/PE: 25 µg/ml
Lixiviados redes de pesca: 100%

Caracterización de las partículas

Z-average: tamaño hydro/agregación

Polydispersity index (PDI): tamaño hydro/agregación

Z-Potential: carga superficial/ estabilidad



Agua/
Lixiviado



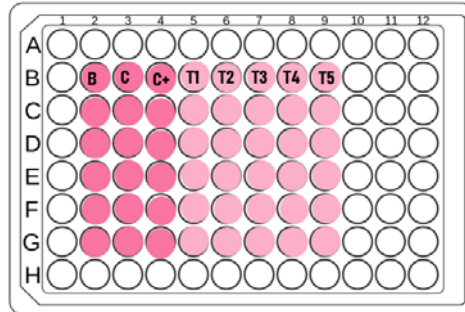
Medio de cultivo
(EMEM+FBS)

Evaluación de la toxicidad de MNPs sobre la línea celular Caco-2

Test de toxicidad *In vitro* : ensayo de viabilidad celular MTT

x6 réplicas x3 placas

PS NPs

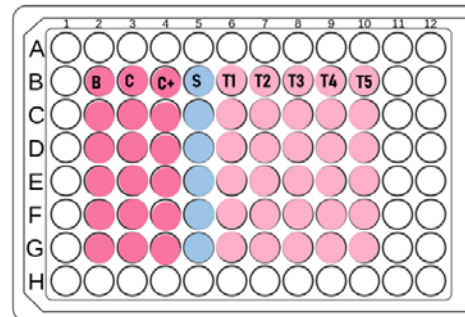


Blank (B): CGM, No cells.
 Negative Control (C-): CGM + Cells
 Positive Control (C+): H2O2 + CGM

T1: 25 µg/ml
 T2: 50 µg/ml
 T3: 75 µg/ml
 T4: 100 µg/ml
 T5: 200 µg/ml

(Cortés et al., 2019;
 Katsumiti et al., 2020;
 Domenech et al., 2021)

PE MNPs

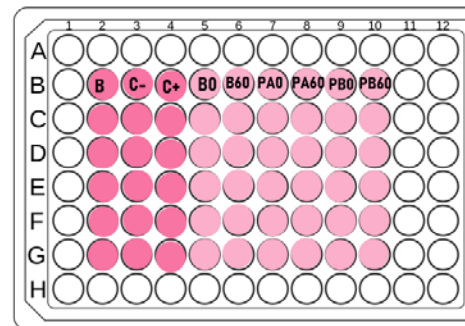


Blank (B): CGM, No cells.
 Negative Control (C-): CGM + Cells
 Positive Control (C+): H2O2 + CGM
 Vehicle control (S): 0.004%
 Tween 80 + CGM

T1: 25 µg/ml
 T2: 50 µg/ml
 T3: 75 µg/ml
 T4: 100 µg/ml
 T5: 200 µg/ml

(Gautam et al., 2022: 1, 10, 100, 500, 1000
 µg/cm²)

Lixiviados
 redes pesca



Blank (B): CGM, No cells.
 Negative Control (C-): CGM + Cells
 Positive Control (C+): H2O2 + CGM

T0: No envejecido
 T60: envejecido
 artificialmente 60 días

 B0/B60 blancos: Agua
 filtrada (envejecida/no
 envejecida)

Conclusiones

1

Se ha demostrado la **presencia de MNPs y aditivos químicos en mejillones y peces** consumidos en la CAV

2

Los mejillones y peces representan una **f fuente de exposición humana a MNPs** para la población de la CAV

3

Los NPs de PS y los MNPs de PE no son citotóxicos para las células Caco-2 mientras que **los lixiviados de redes de pesca que contienen MNPs y aditivos químicos reducen significativamente la viabilidad celular de las Caco-2**

El marisco y pescado representa una Fuente de exposición a MNPs y aditivos para los consumidores vascos, pudiendo producir efectos tóxicos como daño en las células intestinales

Agentes colaboradores de la cadena agroalimentaria vasca y aplicabilidad en su sector

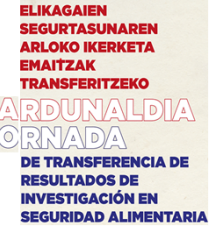


Se han establecido colaboraciones con el sector agroalimentario vasco:

- Matxitxako moluskoak
- Angulas Aguinaga S.A.U.
- Cofradía de pescadores de Bermeo

Actividades de difusión y transferencia realizadas

Difusión y transferencia de resultados a la comunidad científica



1. Comunicaciones a congresos, jornadas y reuniones científicas

Cajaraville, MP. *Preliminary studies on the risks posed by micro and nanoplastics on human health through fish and shellfish consumption*. Xth Meeting of the Spanish Network of Nanotechnology in Food, AESAN, Madrid, 19 Octubre 2023. Conferencia invitada.

Dusacre, E; Clérandeau, C; Lecomte, S; Morin, B; Lagarde, F; Cajaraville, MP; Cachot, J. *Ecotoxicity of the mixture of microplastics, nanoplastics and additives produced from the degradation of fishing nets*. SETAC Europe 33rd annual meeting, Dublin, 30 Abril-4 Mayo 2023. Póster.

González-Soto, N; Dusacre, E; Landro, S; Hafez, T; Sánchez, N; González, R; Ramirez, T; Arribas, G; Yabar, G; Ekoya, F; Pérez, K; Smith, G; Rodríguez, O; Le Picard, C; Passos, M; Schirinzi, G; Sendra, M; Katsumiti, A; Bilbao, E; Tomovska, R; Peña, C; Eceiza, A; Iturrondobeitia, M; Ibarretxe, J; Gilliland, D; Serra, M-A; Cachot, J; Orbea, A; Cajaraville, MP. *Assessing the environmental impact of micro- and nanoplastics, novel bio-based polymers and other emerging pollutants on aquatic biota*. VI JORNADAS DE INVESTIGACIÓN DE LA FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LA UPV/EHU. Leioa, 26-27 Abril 2023. Póster.

Landro, S.M., Arrighetti, F., Bilbao, E., & Cajaraville, M.P. *Integrated assessment of the health status of mussels *Mytilus galloprovincialis* in the Bay of Biscay*. Comunicación presentada en el 32nd Congress of the new European Society for Comparative Physiology and Biochemistry ESCPB, Naples, 28-31 Agosto 2022.

Pérez, K; Dusacre, E; Cachot, J; Katsumiti, A; Cajaraville, MP. *Micro and nanoplastics as potential hazards for human health: effects of polystyrene nanoplastics, polyethylene micro- and nanoplastics and fishing net leachates on human intestinal Caco-2 cells*. SETAC Europe 34th Annual Meeting, Seville, Spain, 5-9 May 2024. Póster.

2. Publicaciones

Dusacre, E; Le Picard, C; Hausard, V; Rigolet, C; Ekoja, F; Morgane, J; Clérandeau, C; Lagarde, F; Lecomte, S; Morin, B; Cajaraville, MP; Cachot, J. *Distinct toxicity profiles caused by new and aged conventional and biodegradable fishing nets' leachates*. En preparación.

Landro, S.M., González-Soto, N; Bilbao, E; Arrighetti, F., Cajaraville, M.P. *Integrated assessment of the health status of mussels *Mytilus galloprovincialis* in the Bay of Biscay*. En preparación.

Pérez, K; Dusacre, E; Cachot, J; Katsumiti, A; Cajaraville, MP. *Micro and nanoplastics as potential hazards for human health: effects of polystyrene nanoplastics, polyethylene micro- and nanoplastics and fishing net leachates on human intestinal Caco-2 cells*. En preparación.

Actividades de difusión y transferencia realizadas

Difusión y transferencia de resultados a la comunidad científica



3. Tesis doctorales

Dusacre, E. *Fate and effects of micro and nanoplastics and additives resulting from the degradation of fishing gear in the Bay of Biscay.* Tesis doctoral en co-tutela, Universidad de Burdeos y UPV/EHU. Supervisado por **Jerome Cachot y Miren P. Cajaraville**. En curso.

Landro, S.M. *El mitílido *Brachidontes rodriguezii* (d'Orbigny, 1864) como bioindicador y centinela de contaminación ambiental en áreas costeras de Argentina.* Tesis doctoral en co-tutela, Universidad de Buenos Aires y UPV/EHU. Supervisada por **Florencia Arriguetti y Miren P. Cajaraville**. Agosto de 2023.

4. Trabajos fin de máster

Pérez, K. *Micro- and nanoplastics in edible fish and mollusk species in the Basque Country and associated risk assessment for human health.* Máster en Contaminación y Toxicología Ambientales CTA, UPV/EHU. Supervisada por **Miren P. Cajaraville**, en colaboración con **Alberto Katsumiti** (GAIKER). Defendida en septiembre de 2023 en la Estación Marina de Plentzia, PIE-UPV/EHU.

5. Formación de alto nivel

Del Castillo, M. Práctica profesional del Erasmus Mundus Master in Environmental Contamination and Toxicology ECT+, UPV/EHU. Supervisada por **Miren P. Cajaraville**. Octubre-Noviembre 2023. Curso online de Bioseguridad (Comisión de Ética, UPV/EHU) para la acreditación para trabajar con células humanas, en el mismo periodo.

Olajide, K.O. Práctica profesional del Erasmus Mundus Master in Environmental Contamination and Toxicology ECT+, UPV/EHU. Supervisado por **Nagore González-Soto y Miren P. Cajaraville**. Septiembre-Noviembre 2022.

Parvin, AL. Práctica profesional del Erasmus Mundus Master in Environmental Contamination and Toxicology ECT+, UPV/EHU. Supervisada por **Miren P. Cajaraville**. Septiembre-Noviembre 2023. Curso online de Bioseguridad (Comisión de Ética, UPV/EHU) para la acreditación para trabajar con células humanas, en el mismo periodo.

Podar, A. Práctica profesional del Erasmus Mundus Master in Environmental Contamination and Toxicology ECT+, UPV/EHU. Supervisado por **Miren P. Cajaraville**. Septiembre-Noviembre 2023. Curso online de Bioseguridad (Comisión de Ética, UPV/EHU) para la acreditación para trabajar con células humanas, en el mismo periodo.

Actividades de difusión y transferencia realizadas



Difusión y transferencia de resultados al sector de la cadena agroalimentaria vasca. Reuniones y contactos vía email.

Difusión y transferencia de resultados a la sociedad. Divulgación y ciencia ciudadana.

Conferencias/debates

- "Itsasoa gure zaborren gotorleku" celebrada en Kulturate de **Arrasate** en enero del 2023.
- Sesión de debate "Gure planeta plastikotan ito da?" de la **Basque Environment and Ocean Week 2023**.
Itsasmuseum, Bilbao Junio 2023.

Talleres/Stands

- Organización y participación en talleres de divulgación sobre microplásticos dentro de la expedición Tara Europa-TREC 2023 (EMBRC-UPV/EHU) con parada en Bilbao-Plentzia. Junio 2023.
- Participación en el taller "**Kutsadura Ikustezina**" organizado por el ayuntamiento de Bakio dentro de ASTEKLIMA, septiembre 2022.
- Organización y participación en talleres dentro de la "Zientzia Astea" (UPV/EHU):**
"Herritarren Zientzia: Itsas hondakinen arrantza" junto con Mater Ontzi Museo Ekoaktiboa. Noviembre 2022.
"Itsas Kutsadura Ikustezina" junto con Itsasmuseum, Bilbao. Noviembre 2023
- Participación en el **Stand Temático "Plentziako Itsas Estazioa"** en la **Ikertzaileen Europako Gaua**, organizado en Bilbao por la UPV/EHU. Septiembre 2022 y 2023.

Otros

- "**Itsas Festibala**" organizado por MATER Ontzi Museo Ekoaktiboa, Pasaia, en Mayo 2022.
- "**Zero Zabor Uretan**" campaña de concienciación organizada por MATER Ontzi Museo Ekoaktiboa en distintos puertos/pueblos (Getaria, Ondarru, Bermeo, Bakio, Portugalete) en Julio 2022 y (en Bermeo) en Julio 2023.
- Participación como miembros del tribunal en la dinámica "**Itsas Hondakinen Erronka**" organizado por Mater Ontzi Museo Ekoaktiboa, Mayo-Junio 2023.

Gracias por vuestra atención! Eskerrik asko!

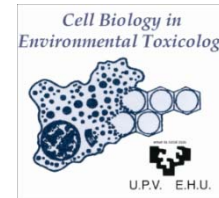
ELIKAGAIEN
SEGURTASUNAREN
ARLOKO IKERKETA
EMAITZAK
TRANSFERITZEKO

XI JARDUNALDIA
JORNADA
DE TRANSFERENCIA DE
RESULTADOS DE
INVESTIGACIÓN EN
SEGURIDAD ALIMENTARIA

Equipo de investigación



Karla Pérez, Nagore González-Soto, Sonia Landro,
Eider Bilbao, Amaia Orbea, Miren P Cajaraville



Colaboradores

Edgar Dusacre, Jerome Cachot (U Bordeaux-EPOC)



Julien Gigault (CNRS and U Laval)



Alberto Katsumiti (Gaiker)



Sophie Lecomte (U Bordeaux-CBMN)



Soledad Muniategui (U Coruña)



Marta Sendra (U Burgos)



Pilar Yeste (U Cádiz)



Email de contacto: miren.p.cajaraville@ehu.es