

MONITORIZACIÓN DEL IMPACTO DE LAS BASURAS MARINAS EN TORTUGAS MARINAS



PROTOCOLO PARA LA TOMA DE DATOS DE INGESTIÓN Y ENMALLAMIENTO EN TORTUGA BOBA¹

(*Caretta caretta* Linnaeus, 1758)



Referencia recomendada

INDICIT consortium, 2018

Monitorización del impacto de la basura en tortugas marinas. Protocolo para la colecta de datos en ingestión y enmallamiento de tortugas marinas (*Caretta caretta* Linnaeus, 1758).

Producto D2.6 elaborado por el Proyecto Europeo "Implementación del indicador sobre el impacto de la basura en tortugas marinas y biota en el marco de las Convenciones Regionales Marinas (RSC – OSPAR/Barcelona) y la Directiva marco para la estrategia Marina (indicit-europa.es)

Grant agreement 11.0661/2016/748064/SUB/ENV.C2.Bruxelles.22p

Para cualquier consulta relacionada con este protocolo, por favor contacte con :

coordination@indicit-europa.eu



INDÍCE

INTRODUCCIÓN	4
A. DATOS GENERALES PARA EJEMPLARES VIVOS Y/O MUERTOS	5
A.1. NOTAS PRELIMINARES EN EL LUGAR DEL DESCUBRIMIENTO	5
1. Persona de contacto	5
2. Datos sobre el ejemplar encontrado	5
3. Datos a tomar en el lugar de encuentro	5
A.2. DESCRIPCIÓN DE LA CONDICIÓN CORPORAL DEL ANIMAL	6
1. Estado de conservación o grado de descomposición	6
2. Circunstancia del descubrimiento	6
3. Causa probable de muerte / varamiento	7
4. Estado de salud	7
5. Arte de pesca de captura incidental	7
6. Lesiones principales	8
7. Zonas corporales afectadas	8
8. Tipo de enmallamiento	8
9. Basura causante del enmallamiento	9
10. Otros parámetros descriptivos	9
A.3. DATOS BIOMÉTRICOS	10
B. MUESTREO DE BASURAS MARINAS EN CADÁVERES - PROTOCOLO PARA ANIMALES MUERTOS	11
B.1. NECROPSIA DE LA TORTUGA	11
B.2. EXTRACCIÓN DEL CONTENIDO DEL TRACTO DIGESTIVO	12
B.3. EXTRACCIÓN DE LAS BASURAS MARINAS	12
C. MUESTREO DE BASURAS MARINAS EN HECES - PROTOCOLO PARA ANIMALES VIVOS	13
C.1. RECOGIDA DE HECES	13
C.2. RECOLECCIÓN DE BASURAS DE LA MUESTRA DE HECES	13
D. ANÁLISIS Y CLASIFICACIÓN DE LAS BASURAS	14
D.1. CLASIFICACIÓN DE BASURAS	14
D.2. TOMA DE DATOS	15
REFERENCIAS	16
APÉNDICE 1 – FORMULARIO DE REGISTRO DE DATOS	17
APÉNDICE 2 – LISTA DE MATERIALES	19
Para la recogida de la tortuga y la toma de muestras in situ	19
Para la toma de de muestras d ejemplares muertos en laboratorio y la extracción de basuras del tracto digestivo	19
Para la toma de muestras en ejemplares vivos en centros de recuperación y la extracción de basuras ingeridas de la heces	19
PROTOCOLO PARA LA EXTRACCIÓN DE MICRO-PLÁSTICOS (OPCIONAL)	20
1. Acciones previas para evitar la contaminación	20
1. Para animales muertos	20
2. Para animales vivos	20
2. Extracción de micro basuras ingeridas	20

¹El protocolo para animales muertos puede aplicarse a otras especies de tortugas marinas



INTRODUCCIÓN

El presente protocolo pretende responder a los requerimientos de la MSFD para el indicador 10.2.1 “Tendencia de las cantidades y composición de basura ingerida por animales marinos”. El Proyecto INDICIT propone a las tortugas marinas como especie indicadora para el estudio de la ingestión de basura por parte de organismos marinos a través del desarrollo y la implementación del indicador “Basura ingerida por tortugas marinas”. Este documento recoge las metodologías estandarizadas para la extracción de la basura ingerida por animales muertos y/o vivos. Este documento incluye varias modificaciones de la metodología original testada en Italia desde 2012 (Matiddi et al., 2011; MSFD TG Litter, 2013), siguiendo los primeros ensayos realizados por Camedda et al., 2014 y Matiddi et al., 2017, e incluidos en el Proyecto Europeo INDICIT (GA n°11.0661/2016/748064/SUB/ENV.C2), así como gracias a los aportes de los Centros de Recuperación y Redes Varamiento colaboradoras de este proyecto.

Este protocolo propone una serie de parámetros “básicos” y “opcionales”. Los **parámetros básicos** (resaltados en negrita en el protocolo) se corresponden con los parámetros fundamentales para determinar los criterios del indicador. Los parámetros opcionales (resaltados en negrita, cursiva y en gris) permiten mejorar los conocimientos sobre el comportamiento de la tortuga boba y su probabilidad de ingerir basura, así como mejorar los criterios del indicador en desarrollo. Los **parámetros opcionales** también pretenden ayudar a evaluar mejor la relevancia de 2 nuevos indicadores sobre el impacto de la basura, para los que este proyecto ha propuesto estudios piloto (“Enmallamiento de organismos marinos en basura” e “Ingestión de microplásticos por tortugas marinas y peces”). Siguiendo las directrices del Grupo técnico de Basuras Marinas de la MSFD (Galgani et al., 2013) y la nueva decisión de la Comisión (Decision 2017/848 of the 17th March 2017), la talla mínima de las basuras consideradas para el indicador “Basura ingerida por tortugas marinas” es de 1mm, que incluye tanto micro (1-5mm) como macro (>5mm) plásticos.

En el Apéndice 1 del presente documento se incluye un **formulario de observación**. Para facilitar el almacenaje de datos y los análisis estadísticos, los datos se recogerán en una **tabla estandarizada** elaborada por el proyecto INDICIT, por lo que se ruega que se respeten las unidades y las listas de opciones establecidas en el protocolo, especificando todos los comentarios y otras propuestas en la columna “Notas”. **Deben rellenarse todas las casillas** con información o datos, o con 0 o “NA” (información no disponible o no evaluable).

NOTA: La tortuga boba (*Caretta caretta*) es una especie protegida, por lo que solo personal autorizado puede llevar a cabo el manejo de ejemplares de esta especie vivos o muertos, o parte de estos. En cuanto se localice un animal, su manipulación y recuperación debe ser informada y coordinada con las autoridades responsables. Se debe tener en cuenta que serán necesarios permisos CITES si los ejemplares o muestras de éstos van a ser enviados o recibidos.

NOTA: Se deben tomar las precauciones sanitarias necesarias para el manejo de ejemplares muertos o animales salvajes vivos, que minimicen el riesgo de enfermedades infecciosas como zoonosis. La zona de intervención debe estar alejada de los transeúntes y el manejo debe llevarse a cabo con un traje de protección con gafas, guantes y botas de goma, que deben ser desinfectados y desechados adecuadamente tras la intervención. Se aconseja llevar 2 pares de guantes, unos resistentes a cortes y otros que puedan ser intercambiados para escribir o en caso de corte.

A.. DATOS GENERALES PARA EJEMPLARES VIVOS Y/O MUERTOS

A.1

NOTAS PRELIMINARES EN EL LUGAR DEL DESCUBRIMIENTO



NOTA: Es muy importante tomar fotografías del animal antes de cualquier manipulación para verificar las condiciones del varamiento. Colocar una cinta métrica junto al animal puede ayudar a mostrar el orden de magnitud en la fotografía. Por favor especifique si se toman fotografías en la columna "Foto del encuentro" en el archivo Excel

A.2

DESCRIPCIÓN DE LA CONDICIÓN CORPORAL DEL ANIMAL

1. Estado de conservación o grado de descomposición

Anote **el estado** de conservación según los 5 niveles que se describen a continuación:



Nivel 1: VIVA



Nivel 2: FRESCA

Muerta recientemente, tortuga en buenas condiciones.



Nivel 3: PARCIAL

Órganos internos todavía en buenas condiciones. Autolisis (inchada), mal olor, modificaciones del color de la piel.



Nivel 4: AVANZADA

Algunas escamas levantadas o perdidas. Es posible tomar datos biométricos (CCLst), presencia/ausencia de basuras y datos de enmallamiento.



Nivel 5: MOMIFICADA

Pérdida de partes del cuerpo o del esqueleto. Órganos internos expuestos. Material digestivo perdido.

- En animales en **Nivel 1**, el estudio de basuras puede llevarse a cabo mediante la colecta y estudio de heces en el centro de recuperación.
- Los **Niveles 2 y 3** son adecuados para el análisis en la necropsia de basura ingerida por la tortuga.
- De los animales en **Nivel 4** se pueden obtener datos biométricos y conseguir información sobre presencia/ausencia de plásticos ingeridos (para el análisis de ocurrencia o prevalencia, FO%) y sobre enmallamiento en basuras.
- Los animales en **Nivel 5** normalmente han perdido el material gastrointestinal, por lo que no es posible realizar el análisis de la basura ingerida².

2. Circunstancia del descubrimiento

Elige una de las siguientes 4 categorías:

- **Varado:** Animal encontrado varado en la playa o en la costa,
- **By-catch/Pesca:** Animal capturado activamente por pescadores (ej. ingestión de anzuelo, atrapado en una red, entregada por pescadores, etc.),
- **Encontrada en el mar:** Animal localizado flotando en la superficie del agua,
- **Muerta en el Centro de Recuperación:** El animal llega vivo pero muere durante su recuperación.

² Algunos tejidos (músculo, etc.) pueden recogerse y conservarse en etanol 95% o congelarse a -20°C para estudios genéticos.

3. Causa probable de muerte / varamiento

Si es posible, deduzca la **causa posible de muerte o, en animales vivos, de varamiento**, mediante el examen externo o mediante la observación de los órganos internos de los animales muertos durante la necropsia. También deben observarse la cavidad oral en busca de presencia de objetos extraños. Elige entre las siguientes 10 categorías:

- **Pesca accidental:** presencia de anzuelo/s ingerido/s, síndrome de descompresión, atrapado en una red/artes de pesca (en este caso, rellene en la columna “Tipo de enmallamiento” y “Material de enmallamiento”), individuo ahogado en un arte de pesca ...,
- **Enmallamiento en basura:** enmallamiento en desechos diferentes a los descritos en el apartado anterior. Por favor, rellene la columna “Tipo de enmallamiento” y “Material de enmallamiento”,
- **Ingestión de basura:** obstrucción y/o perforación del tracto digestivo, u otros síntomas,
- **Traumatismo antropogénico:** colisión con embarcaciones y/o hélice, individuos apuñalados, arponeados, golpeados con objetos contundentes, etc,
- **Trauma natural:** p.e., ataque de tiburón,
- **Síntomas de enfermedad:** relacionados con malnutrición, problemas de flotabilidad, caquexia, dermatitis, conjuntivitis, rinitis, etc...
- **Aceites / Petróleo:** ingestión o impregnación en aceites, petróleo, hidrocarburos...,
- **Sana:** Sin lesiones, daños o enfermedades aparentes,
- **Indeterminada:** no es posible identificar la causa de muerte / varamiento,
- **Otras:** por favor, especificar en la columna “Notas”.

4. Estado de salud

Indique el **Estado de salud** del animal según su condición corporal (Fig. 2).



Fig. 2. Estado de salud según observación visual de la forma del plastrón (Thomson et al., 2009)

5. Arte de pesca accidental

Si el animal ha sido capturado por un arte de pesca, especifique una de las 6 categorías siguientes:

- Palangre
- Pesca de arrastre
- Pesca con red de cerco
- Pesca de caña
- Arte desconocida
- Otra/s: Por favor especifique en la columna “Notas”.

Por favor, si es posible, especifique en la columna “Notas” la distancia a la costa y el tiempo de calado (tiempo en que el arte está sumergido).

6. Lesiones principales

En caso de que existan lesiones, indique las **principales lesiones** observadas en el animal (fractura, amputación, corte, abrasión, otras) según la Fig.3. Para lesiones de otro tipo, por favor especifíquelo en la columna “Notas”.



FRACTURA

En caparazón, cabeza, mandíbulas, plastrón o otros huesos. Normalmente causada por colisión con embarcaciones.



AMPUTACIÓN

Parcial (solo una fracción de una o varias aletas) o total (una o varias aletas perdidas completamente)



CORTES Y EROSIONES

Cortes producidos por diferentes tipos de basuras, normalmente en tejidos blandos (aletas o cuello)



ABRASIÓN

Pérdida o erosión de los escudos producida por la fricción de ciertos materiales adheridos al animal (enmallamiento).

Fig. 3. Tipología de las principales lesiones observadas en tortugas marinas. De izquierda a derecha: Fractura, Amputación, Cortes y erosiones y Abrasión

7. Zonas afectadas

Si el animal presenta lesiones o heridas, indique qué **partes del cuerpo** se ven afectadas:

- **ADD (RFF)** aleta anterior derecha;
- **AAI (LFF)** aleta anterior izquierda;
- **APD (RRF)** aleta posterior derecha;
- **API (LRF)** aleta posterior izquierda; **cuello**; **caparazón**; **plastrón**; **cabeza**; **varias zona** (si hay lesiones en varias zonas de la carcasa) u **otras** (por favor especifique en la columna “Notas”).

8. Tipo de enmallamiento

Si el ejemplar se ha encontrado enmallado en basura marina, indique el tipo de enmalle según las siguientes 3 categorías:

- **Activo:** Enmallado en un arte de pesca activa, por ejemplo: un individuo liberado del enmallamiento por un pescador; o bien, parte de la red o arte de pesca ha sido cortado para liberar al animal o por el propio animal tras el enmallamiento. La presencia de un anzuelo se considera como enmallamiento activo,
- **Pasivo:** El ejemplar ha quedado enmallado en desechos no relacionados con artes de pesca o con desechos de artes de pesca abandonados en el mar hace tiempo (por favor indique los signos de que el material está degradado o lleva mucho tiempo abandonado en el mar en la columna “Notas”),
- **Indeterminado.**

9. Basura causante del enmallamiento

Si la tortuga se ha encontrado enmallada en basura marina, indique el **tipo de basura que causa el enmallamiento** según la siguiente clasificación (Fig.4):

- Redes o restos de redes (N),
- Monofilamentos (nylon) (L),
- Cuerdas o amasijos de cuerdas (R),
- Bolsas de plástico (Pb),
- Rafia (Rf),
- Otros plásticos (Ot),
- Múltiples materiales (Mu),
- Desconocido (Unk).

Para cada categoría, por favor describa o especifique el tipo de material en la columna “Notas”. En particular, para los materiales derivados de la pesca, indique si están colonizados por algas, cirrípedos, etc., o si parece un objeto viejo y/o abandonado hace tiempo.

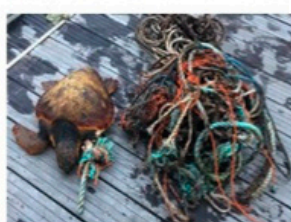
ARTES DE PESCA



(N) Redes de pesca



(L) Monofilamentos (nylon)



(R) Cuerdas

(Mu) MÚLTIPLES MATERIALES



BASURAS DERIVADAS DE USUARIOS



(Pb) Bolsas plásticas



(Rf) Sacos / telas de rafia



(Ot) Otros

(UNK) DESCONOCIDO



Fig. 4. Clasificación de la basura que causa enmallamiento en tortugas marinas y otros organismos marinos: de izquierda y derecha y de arriba abajo: Fragmentos de red, sedal monofilamento, cuerdas, múltiples materiales, bolsas de plástico, sacos de rafia, otros y desconocido

10. Otros parámetros descriptivos

Inspeccione visualmente al animal indicando sus **reservas de grasa** según el estado de su cuello. En el caso de animales muertos, este dato se puede observar al abrir el animal y observar la cantidad de grasa que recubre los músculos abdominales (Fig. 7c). Elija una de las 3 opciones siguientes:

- Delgada (cuello hundido)
- Normal
- Gorda.

Si es posible, especifique el **sexo** (Macho o Hembra) del ejemplar (Fig.5) según la longitud de la cola y de las uñas de las aletas delanteras. En animales muertos puede confirmarse por la observación directa del aparato genital durante la necropsia. De otra forma, indique NI (no identificado) si no es posible conocer el sexo del animal

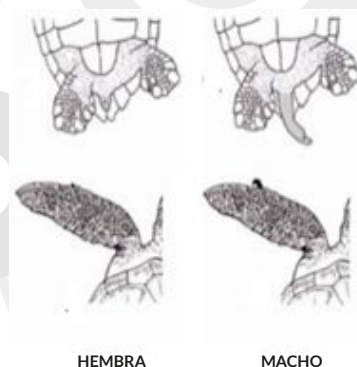


Fig. 5. Determinación del sexo en tortugas marinas (Wyneken, 2001)

A.3

DATOS BIOMÉTRICOS

La Fig 6 muestra los distintos tipos de **longitud y ancho** del caparazón (tanto básicos como opcionales) que se toman en tortugas marinas (en centímetros y con una precisión de 0,01cm), así como su peso (en kilogramos y con una precisión de 0,01Kg):

- **Longitud Curva del Caparazón standard (LCCst)**
 - Longitud Curva del Caparazón mínima (**LCCmin**)
 - Longitud Curva del Caparazón máxima (**LCCmax**)
- **Longitud Recta del Caparazón standard (LRCst)**
 - Longitud Recta del Caparazón mínima (**LRCmin**)
 - Longitud Recta del Caparazón máxima (**LRCmax**)
- **Ancho Curvo del Caparazón (ACC)**
- **Ancho Recto del Caparazón (ARC)**
- **Longitud Curva del Plastrón (LCP)**
- **Longitud Recta del Plastrón (LRP)**
- **Ancho Curvo del Plastrón (ACP)**
- **Ancho Recto del Plastrón (ARP)**

Para tomar las medidas curvas se utiliza una cinta métrica flexible y para las rectas un calibre o pie de rey.

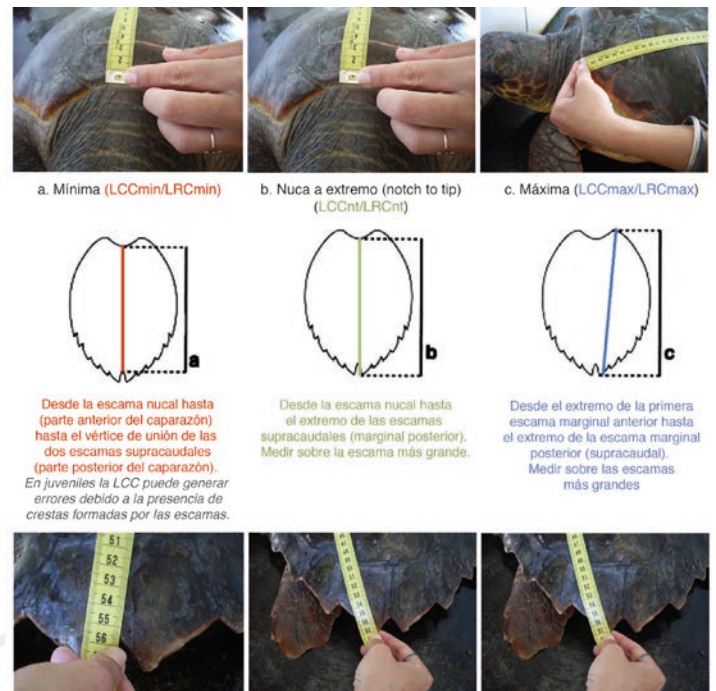
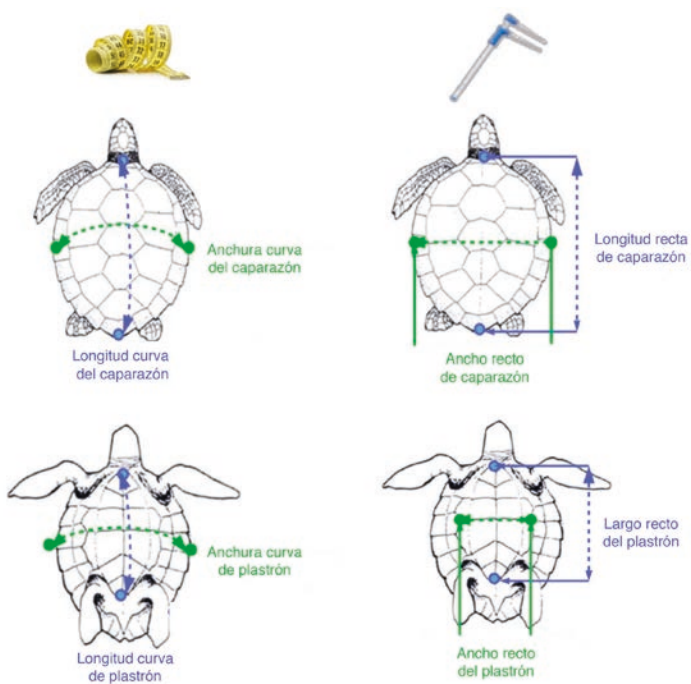


Fig. 6. Parámetros biométricos (caparazón y plastrón).

B. MUESTREO DE BASURAS MARINA EN CADÁVERES - PROTOCOLO PARA ANIMALES MUERTOS

En los supuestos de animales muertos en estado de descomposición de niveles 3 y 4 es necesario comprobar la integridad del tracto digestivo antes de transportar al animal al laboratorio o centro donde se vaya a realizar la necropsia.

En todos los supuestos (a excepción del Nivel 5), si la necropsia no se puede realizar inmediatamente después de encontrar el animal, el cadáver debe conservarse congelándose a -20°C .

B.1 NECROPSIA DE TORTUGA

Siga los pasos descritos en la Fig 7:

Retire y separe el plastrón del caparazón mediante una incisión en el borde exterior (línea amarilla) (Fig. 7a). Esta operación debe realizarse con bisturí o bien cortar con inclinación horizontal para no afectar la integridad de los órganos internos (Fig. 7b).

Una vez se tiene acceso al interior del animal se deben cortar los ligamentos de unión de la cintura pectoral y pélvica. Indique la **Reserva de grasa** del animal (Fig.7c) según los siguientes criterios:

- Atrofia de los músculos pectorales (ninguna, moderada, severa),
- Grosor de la grasa en cavidades articulares y membrana celómica (abundante, normal, baja o nula),
- Por último, complete la descripción de la reserva de grasa indicando el estado trófico del animal (delgado, normal o gordo).

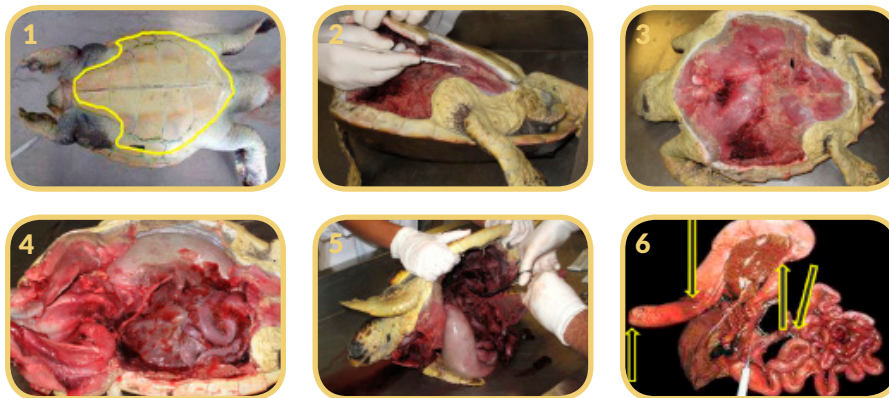


Fig. 7. Secuencia de la necropsia de una tortuga boba: a) vista ventral de una tortuga muerta. La línea amarilla indica la forma de separar el plastrón del resto de la tortuga; b) cortes horizontales para evitar afectar los órganos interiores; c) vista ventral de la tortuga una vez abierta (se pueden observar reservas de grasa (color marrón) en los músculos); d) retirar el músculo pectoral y el corazón; e) extracción del tracto gastrointestinal (GI); f) Vista del tracto intestinal. Las flechas amarillas indican donde deben sujetarse las abrazaderas para separar las 3 secciones del tracto gastrointestinal

- Exponer el sistema gastrointestinal (GI) retirando del animal los músculos pectorales y el corazón (Fig.7d y 7e). La sangre puede retirarse de la cavidad abdominal inclinando cuidadosamente la tortuga hacia un lado.
- Cierre el tracto atando una cuerda en el esófago, proximal a la boca, así como en la cloaca, lo más cercano posible al orificio anal. Posteriormente, retire el sistema gastrointestinal completo y colóquelo en una bandeja. Este proceso es más fácil si se lleva a cabo entre, al menos, dos personas: una persona mantiene sujeto el animal acostado de un lado, mientras la otra persona va separando del caparazón los ligamentos y membranas de los diferentes órganos, extrayendo el GI del animal.
- Aísle las diferentes partes del GI (esófago, estómago, intestinos) mediante estrangulamiento y corte entre las 2 puntos de cierre (flechas amarillas, Fig. 7f) localizados en el esfínter gastroesofágico y el esfínter pilórico

NOTA: Si es posible determinarlo, indique el sexo del animal si no ha sido posible determinarlo durante el examen externo

B.2

EXTRACCIÓN DEL CONTENIDO DIGESTIVO

Separar las 3 partes del GI (esófago, estómago, intestinos) mediante un segundo estrangulamiento en el borde cortado, para evitar el derrame del contenido (Fig.8a).

Abra cada sección del GI con una tijera y vacíe el contenido sobre un tamiz de 1 mm de luz de malla⁴.

NOTA: Cada muestra que no pueda ser analizada inmediatamente debe conservarse en un bote o bolsa con cierre hermético, rotulados con marcador permanente con el código de identificación del animal y la sección correspondiente. Se propone utilizar 2 letras para el país _ 2 letras para la región / Institución _ Año _ Mes _ Día _ N° tortuga _ Tipo de muestra (Heces / Eso / Estom / Intest). (Por ejemplo: FR_GR_2017_03_12_9_Oeso corresponde al esófago del noveno individuo encontrado por el centro de rescate de le Grau du Roi en Francia, el 12 de marzo de 2017). La muestra se almacenará a -20 ° C, en espera de los análisis de laboratorio.

Para extraer el contenido de cada sección del GI, limpie el contenido con abundante agua corriente (Fig.8b) para eliminar la porción líquida, el mucus y la materia digerida no identificable⁵.

Inspeccione el contenido para detectar la presencia de alquitrán, aceite o material particularmente frágil, que deba tratarse por separado, apuntarlo en la columna "Notas" del archivo Excell de INDICIT.

Enjuague todo el contenido recogido en el tamiz de 1 mm (Fig.8b, c) y guárdelo en frascos con etanol 70% o en bolsas con cierre hermético, indicando en la etiqueta el código de la muestra (código del animal y la respectiva sección del GI).



Fig. 8. Análisis del contenido del GI: a) Secciones separadas del GI: esófago (superior), estómago (medio) e intestino (inferior); b) apertura de una sección del tracto y lavado de contenido; c) extracción del contenido.

B.3

EXTRACCIÓN DE BASURAS MARINAS

La recolección de los fragmentos de basura se realiza manualmente mediante observación visual directamente en el tamiz de 1 mm (Fig. 8c)⁶ Indicar en la columna "Notas" la presencia de cualquier oclusión digestiva o perforación causada por estos residuos.

³Las 3 partes del GI (esófago, estómago, intestino) son analizadas por separado para evaluar posibles diferencias en el conteo de basuras por sección y evaluar mejor el tránsito digestivo de la basura marina.

⁴Para separar micro (1-5 mm) de macro-ítems (parametro opcional), se puede superponer un tamiz de 5 mm de luz de malla sobre el de 1 mm (ver sección F de este documento).

⁵Las muestras pueden tomarse en este paso para determinar la dieta mediante análisis de ADN. El protocolo puede solicitarse a coordination@indicit-europa.eu.

⁶El contenido biológico puede ser almacenado con el fin de analizar la dieta e identificar las principales presas ingeridas en relación a la basura marina ingerida.

C. MUESTREO DE BASURA MARINA EN HECES - PROTOCOLO PARA ANIMALES VIVOS

C.1 RECOGIDA DE HECES

NOTA: Para mantener una homogeneidad en la toma de datos que permita la comparación entre diferentes tortugas y regiones a lo largo del tiempo, las heces recolectadas se analizarán solo para los individuos que permanecen como mínimo 1 mes en el centro de rescate. Las heces se recogen hasta 2 meses después de la llegada del animal.

Lavar con cuidado la tortuga con agua para evitar la contaminación y colocar al animal en un tanque individual (Fig. 8a).

Colocar un filtro de 1 mm de luz de malla en todos los tubos de descarga o sistemas de desagüe del tanque (Fig. 9b).

Controlar diariamente el agua del tanque filtrándola a través del tamiz de malla de 1 mm utilizando uno o varias de los siguientes métodos:

- Recoger las heces manualmente con un salabre con tamaño de malla de 1mm (Fig. 9c),
- Colocar un colector flexible de 1 mm de malla en el tubo de drenaje (Fig. 9d),
- Colocar un tamiz rígido de malla de 1 mm debajo del drenaje (Fig. 9e)

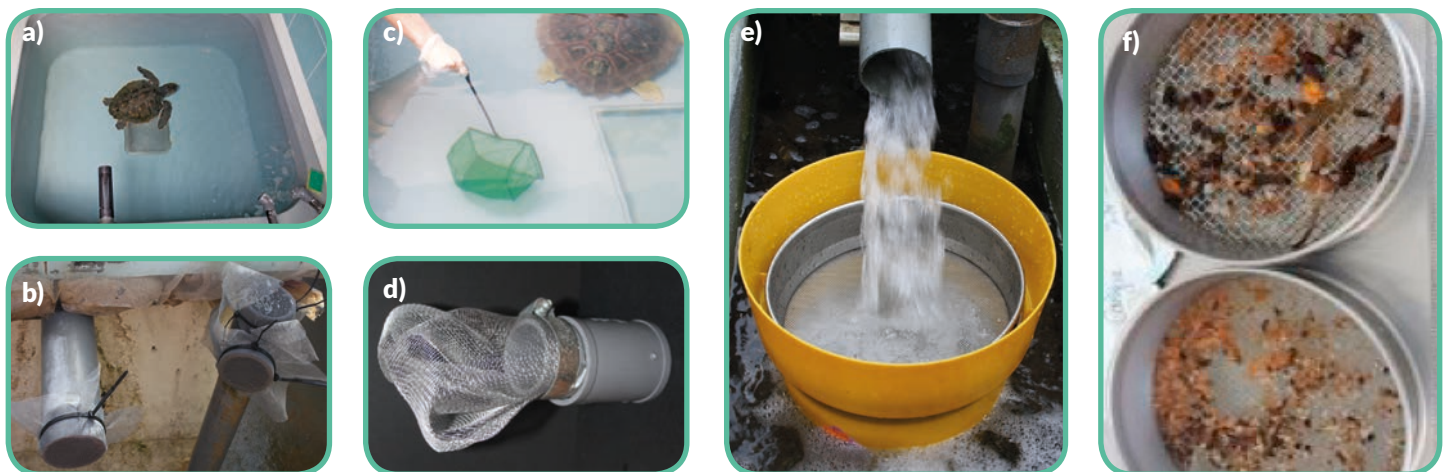


Fig. 9. Secuencia de muestreo de heces. a) Acomodación de la tortuga en un tanque individual; b) disposición de malla flexible de 1 mm de luz en tubos de descarga o rebosaderos del tanque; c) salabre de 1 mm de malla para retirar las heces manualmente; d) colector con malla de 1 mm dispuesta en el tubo de descarga para filtrar el tanque de agua; e) tamiz rígido de malla de 1 mm para filtrar el tanque de agua; f) muestra recogida en un tamiz rígido.

NOTA: Las muestras que no puedan ser analizadas inmediatamente se conservarán en un bote o bolsa con cierre hermético, rotulados con marcador permanente con el código de identificación del animal y de la muestra. Ej. 2 letras para el país _ 2 letras para la región / Institución _ Año _ Mes _ Día _ N ° tortuga _ Tipo de muestra. La muestra se almacenará a -20 ° C o en alcohol 70°C, a temperatura ambiente en espera de los análisis de laboratorio.

C.2 RECOGIDA DE BASURAS DE LA MUESTRA DE HECES

Lavar los tamices y los colectores con abundante agua sobre un tamiz rígido (malla de 1 mm) (Fig. 9f).

La recogida de residuos debe realizarse manualmente mediante observación visual directamente desde el tamiz de 1 mm.

D. ANALISIS Y CLASIFICACIÓN DE LAS BASURAS

D.1 CLASIFICACIÓN DE BASURAS

Especificar el **protocolo** que se está utilizando, diferenciando "Necropsia" o "Heces".

Para cada sección del GI del animal necropsiado (Sección B de este documento) o para heces (Sección C de este documento), los ítems de basura deben ser clasificados de acuerdo a las siguientes categorías (Tab 1., Fig. 10)⁷.

Tab. 1. Clasificación de ítems de basura que se encuentren en tortugas marinas

TIPO	CÓDE	DESCRIPCIÓN
Plástico industrial	IND PLA	Gránulos de plástico industriales, generalmente cilíndricos pero a veces también ovalados, esféricos o cúbicos, o presuntos artículos industriales, utilizados para las esferas pequeñas (vítreos, lechosos ...)
USE - tipo lámina	USE SHE	Restos flexibles y muy finos, p. ej. De bolsas, papel de aluminio, bolsas agrícolas, bolsas de basura ...
USE - filamento	USE THR	Materiales con forma de filamento o hilo: p. ej. Trozo de hilo de nylon, fragmentos de red, restos de ropa y/o tejidos...
USE - foam	USE FOA	Plásticos de espuma, p. ej., espuma de poliestireno, goma suave (como en el relleno de colchón) ...
USE - fragmentos	USE FRAG	Fragmentos de plásticos duros quebradizos. Plásticos de tipo más grueso, que pueden ser ligeramente flexibles, pero nunca similares a USE - SHE.
Otros plásticos	USE POTH	Cualquier otro tipo de plástico, incluidos elásticos, goma densa, filtros de cigarrillos, piezas de globos, balas de pistola de aire, etc. Especificar en la columna "Notas".
Basuras no plásticas	OTHER	Otros tipos de basuras de composición diferente del plástico
Comida Natural	FOO	Alimento natural de tortugas marinas (por ejemplo, trozos de cangrejos, medusas, fragmentos de algas, etc.)
Restos naturales no identificados como dieta	NFO	Cualquier elemento natural, pero que no pueda considerarse como alimento nutritivo normal para las tortugas marinas (piedras, fragmentos de madera, piedra pómez, etc.)

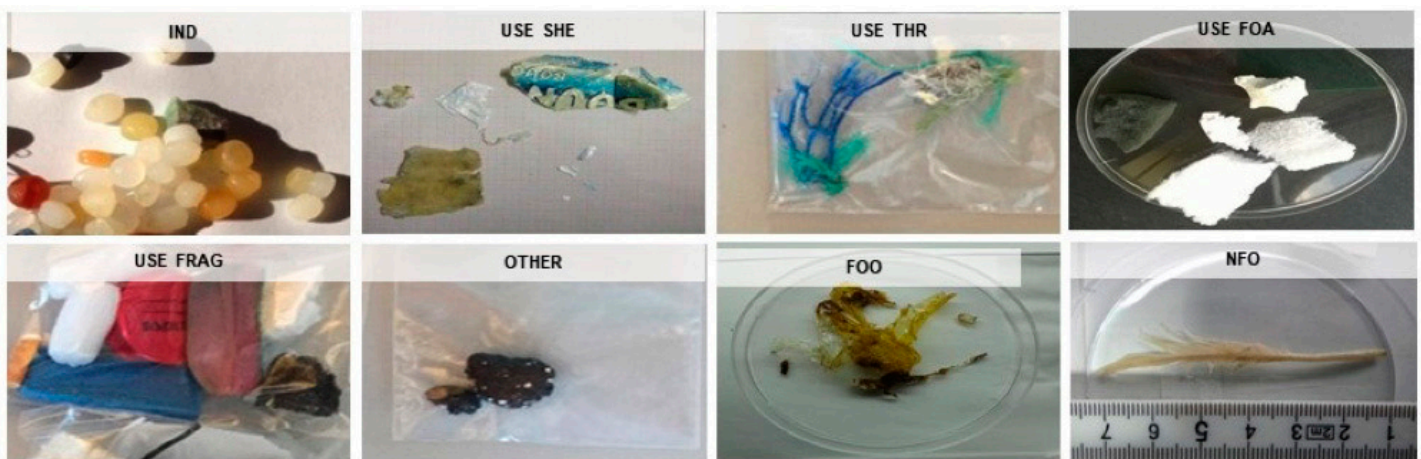


Fig. 10. Ejemplos de categorías establecidas para el análisis de basuras ingeridas en tortugas marinas (ver Tabla 1).

⁷ La clasificación de los ítems de basura ha sido establecida por el consorcio INDICIT, siguiendo la guía MSFD (Galgani et al., 2013) y los trabajos de socios y colaboradores del proyecto INDICIT (ej. centros de recuperación y redes de varamientos). Las diferentes categorías de basuras pueden ser identificadas visualmente y confirmadas mediante un estereomicroscopio.

D.2

TOMA DE DATOS

Para **cada sección** de GI de un animal necropsiado, o para las muestras obtenidas de heces de animales vivos que llevan de 1 a 2 meses en tanques de recuperación, se debe **tomar el peso seco de restos de comida (FOO) y de restos naturales que no sean identificados como dieta de tortugas (NFO)**, y para cada categoría de basura se deben apuntar los siguientes parámetros:

- **Peso seco** (gramos, precisión 0.01 g): Secar la muestra 24h a temperatura ambiente o en 12h en una estufa a 35°C, y registrar el peso seco de cada categoría de basura en gramos,
- **Número de ítems**: Apuntar todos los ítems contados,

Para cada **ejemplar** (muestras totales, por ejemplo el total obtenido de todo el GI de un animal necropsiado o el total de basuras obtenido de la heces de un animal recogido durante 1-2 meses desde su llegada al centro de rescate), registrar:

- La **frecuencia** de aparición: Presencia o ausencia de basura ingerida, 1 si al menos un ítem de basura ha sido encontrado, 0 si no se ha encontrado ningún ítem de basura,
- **Cantidad de basura ingerida en términos de:**
 - **Peso seco total de basura** (gramos, precisión 0.01 g): suma del peso seco medido para ítems no naturales después de secar los ítems 24h a temperatura ambiente o 12h en estufa a 35°C.
 - **Número total de ítems de plástico**: Contar todos los ítems de plástico observados (por categorías, IND-PLA, USE-SHE, USE-THR, USE-FOA, USE-FRAG, USE-POTH), independientemente del tamaño,
 - **Volumen total de ítems de plástico** (mililitros, precisión 0.01 ml): Medir el volumen de todas las categorías de plásticos (IND-PLA, USE-SHE, USE-THR, USE-FOA, USE-FRAG, USE-POTH) en un vaso graduado y registrar la variación de agua. (Fig. 11). Empújese la basura flotante en el agua con una varilla o una regla.
- **Número total de ítems por categorías de tamaño:**
 - **Número total de micro-plásticos (1-5 mm)**⁸: Contar todos los ítems de plástico cuyo lado mayor esté entre 1 y 5 mm,
 - **Número total de meso-plásticos (5 -25 mm)**: Contar todos los ítems de plástico cuya longitud máxima esté entre 6 y 25 mm,
 - **Número total de macro-plásticos (> 25 mm)**: Contar todos los ítems de plástico cuya longitud máxima sea mayor de 25 mm,
- **Número total de ítems por categoría de color:**
 - **Número total de ítems de plástico blanco-transparente**: Contar todos los ítems de plástico de color blanco opaco o transparente,
 - **Número total de ítems de plástico de colores oscuros**: Contar todos los ítems de plástico de color oscuro (negro, azul, marrón, verde oscuro...)⁹,
 - **Número total de ítems de plástico de colores claros**: Contar todos los ítems de plástico de color claro (crema, amarillo, rosál, verde claro...)⁸,

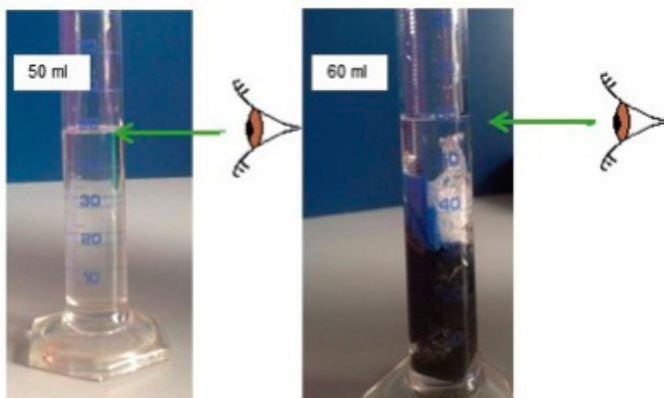


Fig. 11. El volumen de ítems corresponde a la diferencia entre el volumen con (derecha) y el volumen sin (izquierda) basura. El volumen se lee considerando el fondo del menisco formado por el agua.

⁸ Si se utilizan 2 tamices (de 1 y 5 mm de malla) cuando se hace el lavado del GI o de las heces, este valor correspondería al total de ítems de plástico encontrados en el tamiz de 1 mm. Remitirse al apéndice 3 para un protocolo específico para evaluar las micro-basuras en las tortugas marinas.

⁹ El color puede especificarse en la columna "Notas".



Referencias

Bjorndal KA, Bolten AB, Chaloupka MY. (2000) Green turtle somatic growth model: evidence for density dependence. *Ecol Appl* 10:269–282

Camedda A., Marra S., Matiddi M., Massaro G., Coppa S., Perilli A., Ruiu A., Briguglio P. and de Lucia G.A. (2014) Interaction between loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) and marine litter in Sardinia (Western Mediterranean Sea). *Marine Environmental Research*. 100, 25-32.

Matiddi M., Hochscheid S., Camedda A., Baini M., Cocumelli C., Serena F., Tomassetti P., Travaglini A., Marra S., Campani T., Scholl F., Mancusi C., Amato E., Briguglio P., Maffucci F., Fossi MC., Bentivegna F., de Lucia G.A. (2017) Loggerhead Sea Turtles (*Caretta caretta*): a Target Species for Monitoring Litter Ingested by Marine Organisms in the Mediterranean Sea. *Environmental Pollution*. 230, 199-209.

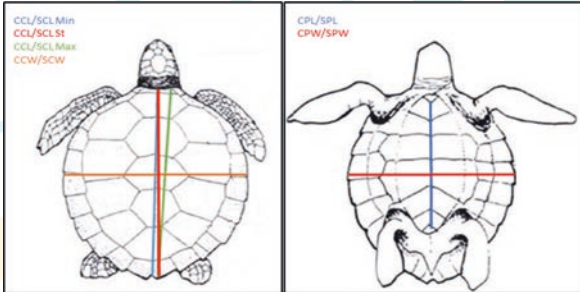
Matiddi M., van Franeker J.A., Sammarini V., Travaglini A., Alcaro L. (2011) Monitoring litter by sea turtles: an experimental protocol in the Mediterranean. *Proceedings of the 4th Mediterranean Conference on Sea Turtles*. 7-10 November, Naples.

MSFD TG Marine Litter: Hanke G, Galgani F, Werner S, Oosterbaan L, Nilsson P, Fleet D, Kinsey S, Thompson R, Palatinus A, Van Franeker J, Vlachogianni T, Scoullou M, Veiga J, Matiddi M, Alcaro L, Maes T, Korpinen S, Budziak A, Leslie H, Gago J, Liebezeit G. (2013) Guidance on Monitoring of Marine Litter in European Seas. EUR 26113. Luxembourg (Luxembourg): Publications Office of the European Union; 2013. JRC83985

Thomson J.A., Burkholder D., Heithaus M.R. and Dill L.M. (2009) Validation of a Rapid Visual-Assessment Technique for Categorizing the Body Condition of Green Turtles (*Chelonia mydas*) in the Field. *Copeia* 2009, No. 2: 251–255.

Wyneken J. (2001) The anatomy of sea turtles. US Department of Commerce NOAA technical memorandum NMFS-SEFSC-470, 172 p.

APÉNDICE 1 - EJEMPLO DE FORMULARIO DE REGISTRO DE DATOS 1/2

OBSERVATION SHEET - Litter ingestion by sea turtles			
COLLECTOR:		LOCAL CODE:	
INSTITUTION:			
CONTACT:			
Discovery circumstances:			
SPECIES	<input type="checkbox"/> <i>Caretta caretta</i> <input type="checkbox"/> <i>Dermochelys coriacea</i> <input type="checkbox"/> <i>Chelonia mydas</i> <input type="checkbox"/> Other		
INDIVIDUAL TAG	Tag number: _____ Electronic chip N°: _____		
INDIVIDUAL CODE:	CC RR (Region) YY MM DD n°		
DATE OF DISCOVERY (yyyy/mm/dd):			
LOCATION:		X CORD : _____ Y CORD : _____	
CIRCUMSTANCES	<input type="checkbox"/> By-catch/Fishery <input type="checkbox"/> Stranding <input type="checkbox"/> Dead at rescue centre <input type="checkbox"/> Found at sea <input type="checkbox"/> Other <input type="checkbox"/> NR		
BY-CATCH ENGINE CAUSE	<input type="checkbox"/> Longline <input type="checkbox"/> Trawl <input type="checkbox"/> Drift net <input type="checkbox"/> Fishing rod <input type="checkbox"/> Other <input type="checkbox"/> NR		
CAUSE OF DEATH/STRANDING	<input type="checkbox"/> Bycatch/Fisheries <input type="checkbox"/> Entanglement in debris <input type="checkbox"/> Ingestion of litter <input type="checkbox"/> Anthropogenic trauma <input type="checkbox"/> Natural trauma <input type="checkbox"/> Natural disease <input type="checkbox"/> Oils <input type="checkbox"/> Healthy <input type="checkbox"/> Other <input type="checkbox"/> NR		
ENTANGLEMENT TYPE	<input type="checkbox"/> Active <input type="checkbox"/> Passive <input type="checkbox"/> NR		
LITTER CAUSING ENTANGLEMENT	<input type="checkbox"/> Net pieces <input type="checkbox"/> Monofilament lines <input type="checkbox"/> Rope/s <input type="checkbox"/> Plastic bags <input type="checkbox"/> Raffia <input type="checkbox"/> Other <input type="checkbox"/> NR		
PICTURES <input type="checkbox"/>	Picture names :		
Animal body condition:			
CONSERVATION STATUS	<input type="checkbox"/> 1 - Alive <input type="checkbox"/> 2 - Fresh <input type="checkbox"/> 3 - Partial <input type="checkbox"/> 4 - Advanced <input type="checkbox"/> 5 - Momified <input type="checkbox"/> NR		
HEALTH STATUS (Plastron shape)	<input type="checkbox"/> Poor (concave) <input type="checkbox"/> Fair (plane) <input type="checkbox"/> Good (convex) <input type="checkbox"/> NR		
MAIN INJURIES	<input type="checkbox"/> No injuries <input type="checkbox"/> Fracture <input type="checkbox"/> Amputation <input type="checkbox"/> Sectionning <input type="checkbox"/> Abrasion <input type="checkbox"/> Other		
AFFECTED PARTS	<input type="checkbox"/> Flipper () <input type="checkbox"/> Carapace <input type="checkbox"/> Neck <input type="checkbox"/> Head <input type="checkbox"/> Plastron <input type="checkbox"/> Other		
FAT RESERVES	<input type="checkbox"/> Thin <input type="checkbox"/> Fat <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> NR		
Biometric measurements:			
Curved measurements (0,01cm)		Straight measurements (0,01cm)	
CCLst	cm	SCLst	cm
CCLmax	cm	SCLmax	cm
CCLmin	cm	SCLmin	cm
CCW	cm	SCW	cm
CPL	cm	SPL	cm
CPW	cm	SPW	cm
WEIGHT (0,01kg)			
NOTES AND REMARKS (Discovery and Animal conditions):			

APÉNDICE 1 - EJEMPLO DE HOJA DE OBSERVACIÓN 2/2

INDIVIDUAL CODE:								
CC		RR (Region)		YY		MM		DD
								n°
Extraction of ingested litter								
PROTOCOL		<input type="checkbox"/> Necropsy <input type="checkbox"/> Observation of faeces						
ARRIVAL DATE		/	/	DEPARTURE DATE		/	/	
DEAD DATE		/	/					
FAT RESERVES		<input type="checkbox"/> Thin <input type="checkbox"/> Fat <input type="checkbox"/> Normal						
Please describe:								
VISCERAS STATUS (note the presence of any infection, suspect colour, fluid effusion, perforation, presence of oil, etc.):								
DIGESTIVE TRACT (note the presence of any infection, suspect colour, fluid effusion, perforation, presence of oil, etc.):								
TURTLE BEHAVIOUR AND TREATMENTS:								
Capacities of digestive tract section and gut content								
	FULL				EMPTY			
	mass	Vol (V1)	vol (V0)	V1-V0	mass	Vol (V1)	vol (V0)	V1-V0
ŒSOPHAGUS								
STOMACH								
INTESTINES								
Marine debris measurements								
	ŒSOPHAGUS		STOMACH		INTESTINES			
	DRY MASS	NUMBER	DRY MASS	NUMBER	DRY MASS	NUMBER		
Ind. Plastic								
USE SHE								
USE THR								
USE FOA								
USE FRAG								
Other (USE poth)								
Non plastic								
FOO (nat. Food)								
NFO (nat. no food)								
TOTAL								
	TOTAL DEBRIS		NUMBER OF ITEMS		NUMBER OF ITEMS			
	dry mass		micro (1-5mm)		white transparent			
	number of items		meso (5-25mm)		dark coloured			
	volume		macro (>25mm)		light coloured			

APENDICE 2 – LISTA DE MATERIALES

Para el rescate del animal y toma de muestras en el lugar de encuentro

Cuerda (para marcar la zona)		Lápiz	
Traje de protección integral		Formulario de recogida de datos	
Gafas y mascar protectora		Frascos o bolsas para toma de muestras	
Guantes resistentes a cortes		Nevera	
Guantes		Rotulador permanente	
Botas		Contenedores de transporte para la tortuga	
Cámara de fotos		Bolsas de basura	
Cinta métrica			

Para la recogida de muestras en animales muertos en laboratorio y para la extracción de basura ingerida del tracto digestivo

En el laboratorio o sala de necropsias		Para la necropsia y/o a recogida de muestras	
Cámara fría o arcones de congelación (-20°C) de gran capacidad		Abrazaderas, cuerdas de cocina o abrazaderas de plástico (mínimo 6)	
Estufa (no obligatorio)		Escalpelo (si es posible de cuchillas intercambiables)	
Bolsas de basura		Tijeras	
Para los manipuladores		Clips dentados	
Traje de protección integral		Contenedores metálicos	
Gafas y mascar de protección		Contenedores para muestras (Frascos / bolsas zip)	
Guantes resistentes a cortes		Para el análisis de la basura ingerida	
Guantes		Tamiz de 1mm de luz de malla	
Botas		Tamiz de 5mm de luz de malla (opcional – para el estudio de microplásticos ingeridos)	
Para notas y recogida de información		Probetas (10 ml, 25 ml, 50 ml)	
Cámara de fotos		Regla (>1 mm)	
Lápiz		Balanza de precisión (0.01 g)	
Formulario de recogida de datos		Lupa binocular (opcional)	
Rotulador permanente			
Para toma de datos biométricos			
Cinta métrica			
Calibre o pie de rey (grande)			

Para la recogida de muestras en animales vivos en centros de rescate y extracción de basura ingerida de las heces

En el laboratorio		Para la recogida de muestras y análisis de la basura ingerida	
Nevera (-20°C)		Rotulador permanente	
Estufa (no obligatorio)		Formulario de recogida de datos	
Bolsas de basura		Contenedores para muestras (tubos, frascos o bolsas zip)	
Para los manipuladores		Tamiz de 1mm de luz de malla	
Gafas y mascar protectora (opcional)		Tamiz de 5mm de luz de malla (opcional – para el estudio de microplásticos ingeridos)	
Guantes		Probetas (10 ml, 25 ml, 50 ml) (opcional)	
Para toma de notas y recogida de información		Regla (opcional)	
Cámara de fotos		Balanza de precisión (0.01 g)	
Lápiz		Lupa binocular (opcional)	
Formulario de recogida de datos		Rejillas de filtración de 1 mm de luz de malla (para los sistemas de entrada y salida de agua del tanque)	
Rotulador permanente		Rejilla flexible de 1mm de luz de malla	
Para toma de datos biométricos		Micro bolas de 1mm de diámetro (opcional)	
Cinta métrica			
Calibre o pie de rey (grande)			

PROTOCOLO PARA LA EXTRACCIÓN DE MICRO-PLÁSTICOS (OPCIONAL)

1. ACCIONES PREVIAS PARA EVITAR LA CONTAMINACIÓN

1. Para animales muertos

- Hacer un lavado exhaustivo con agua filtrada de las secciones del tracto digestivo antes de abrirlas sobre un tamiz de 1 mm de luz de malla.
- Hacer un lavado exhaustivo de todos los instrumentos utilizados durante los análisis del contenido intestinal y de basuras.

2. Para animales vivos

- Hacer un lavado exhaustivo de la tortuga antes de ponerla en un tanque utilizando agua corriente.
- Colocar el filtro de malla de 1 mm en el tubo de entrada de agua del tanque de muestreo.
- Eviscerar los alimentos (pescado, calamar, cangrejo, etc.) antes de abastecer a las tortugas para evitar la contaminación causada por posibles micros plásticos ingeridos por las presas.
- Utilizar un tanque vacío ("control") ubicado cerca del tanque de muestreo para controlar la contaminación procedente del aire.

2. EXTRACCIÓN DE MICRO-BASURA INGERIDAS

Para evaluar específicamente las micro-basuras ingeridas se propone utilizar **dos tamices superpuestos** de 1 y 5 mm que permitan recoger independientemente todos los elementos de entre 1 y 5 mm de tamaño en la malla de 1 mm. **Las metodologías para la recogida del contenido intestinal y las heces son similares a las descritas en los capítulos anteriores (secciones B y C del presente documento).**

Las basuras de menor tamaño (<5mm) pueden quedar camufladas entre el contenido biológico de la muestra (contenido digestivo de animales muertos, y/o heces de animales vivos), por lo que para poder localizar las micro basuras se realiza una digestión química del material orgánico, introduciendo el filtro de 1 mm en un frasco de vidrio con H₂O₂ o KOH. Este proceso requiere de 12 a 24h, dependiendo de la cantidad de materia orgánica que presente la muestra (Fig.11).

Una vez digerido todo el componente orgánico, la localización de las micro-basuras es rápida, fácil y más efectiva. El análisis y clasificación de las micro-basuras se realiza de forma similar a la descrita en el apartado D de este documento.

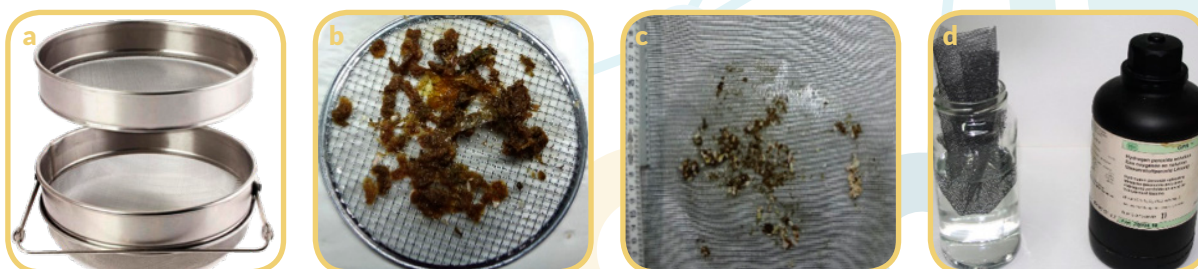


Fig. 11. Metodología de extracción de micro-basuras. a) Método de dos cedazos; recolección de muestras en cedazo rígido de 5mm; c) recolección de muestras en malla flexible de 1 mm; d) digestión de la muestra de 1 mm en H₂O₂